

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ
И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

БИОЭНЕРГЕТИКА КЛЕТКИ. ХИМИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Под редакцией
профессора В.Ю. Сереброва
профессора Г.А. Сухановой

Учебное пособие

Рекомендуется Учебно-методическим объединением
по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов
России в качестве учебного пособия для студентов,
обучающихся по специальности 06.01.12 –
«Медицинская биохимия»

Томск
Сибирский государственный медицинский университет
2008

УДК 577.15 (075)

ББК Р252.0я7

Б638

Рецензенты:

Заведующий кафедрой биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии Красноярской государственной медицинской академии, д-р мед. наук, профессор **А.Б. Салмина**

Заведующий кафедрой биологической химии Новосибирского государственного медицинского университета, д-р мед. наук, профессор **В.И. Шарапов**

Авторы:

Д.И. Кузьменко, Т.В. Жаворонок, И.П. Мамонтова,
В.В. Андрушкевич, А.М. Тырышкин

Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов :

Б638 учебное пособие. / Д.И. Кузьменко, Т.В. Жаворонок, И.П. Мамонтова, В.В. Андрушкевич, А.М. Тырышкин / под ред. В.Ю. Сереброва и Г.А. Сухановой. – Томск: Сибирский государственный медицинский университет, 2008. – 180 с.

ISBN 978-5-98591-031-5

В учебном пособии обобщён опыт, накопленный в процессе проведения учебных практикумов, необходимых для освоения студентами основ медико-биологического эксперимента и базовых исследований в клинике. Изучение основополагающих положений методологии проведения биохимических исследований поможет студентам глубже усвоить механизмы энергетических процессов и каскады биохимических реакций, развивающихся при формировании в организме типовых патологических процессов. Пособие содержит подробное изложение количественных методов определения ключевых метаболитов энергетических и патохимических процессов клетки, вопросы по изучаемым темам к каждому занятию, а также контрольные вопросы для проведения итоговых тестирований и экзаменов.

Пособие предназначено для проведения практических занятий. Материал соответствует программе обучения, плану практических занятий и тематике лекционных курсов «Химия патологических процессов» и «Биоэнергетика клетки».

Предназначено для студентов, обучающихся по специальности 06.01.12 – «Медицинская биохимия».

УДК 577.15 (075)

ББК Р252.0я7

Утверждено и рекомендовано к печати: Учебно-методической комиссией медико-биологического факультета (протокол № 8 от 24 апреля 2007 г.) и Центральным методическим советом (протокол № 4 от 24 апреля 2007 г.) ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава

ISBN 978-5-98591-031-5

© Сибирский государственный медицинский университет, 2008
© Д.И. Кузьменко, Т.В. Жаворонок, И.П. Мамонтова,
В.В. Андрушкевич, А.М. Тырышкин, 2008

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ЧАСТЬ I. НЕКОТОРЫЕ ОСНОВЫ МЕТОДОЛОГИИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	10
ТЕМА: ПОДГОТОВКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА	10
I. Приготовление гомогената ткани.....	10
II. Выделение митохондрий методом дифференциального центрифугирования по Weinbach.....	11
III. Фракционирование гомогената печени крыс методом дифференциального центрифугирования.....	13
ТЕМА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ВЕЩЕСТВА В ИССЛЕДУЕМОМ РАСТВОРЕ	16
I. Калибровочные кривые.....	16
II. Вычисление концентрации вещества с использованием молярного коэффициента экстинкции.....	21
Лабораторная работа 1	
I. Калибровочная кривая для количественного определения неорганического фосфата методом Боданского.....	23
II. Определение концентрации неорганического фосфата в биологических пробах методом Кондрашовой.....	25
Лабораторная работа 2	
Калибровочные кривые для количественного определения белка	26
I. Определение концентрации белка биуретовым методом.....	27
II. Определение концентрации белка микробиуретовым методом.....	29
III. Определение концентрации белка методом Лоури.....	31
IV. Спектрометрический метод определения концентрации белка	32
V. Определение концентрации белка методом Бредфорд.. ..	33
ЧАСТЬ II. БИОЭНЕРГЕТИКА КЛЕТКИ	37
ТЕМА: ГЛИКОЛИЗ	37
Раздел I. ПИРОВИНОГРАДНАЯ КИСЛОТА И АКТИВНОСТЬ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ	37
Лабораторная работа 3	
Колориметрическое определение пировиноградной кислоты в гомогенате мозга и печени крыс.....	40
Лабораторная работа 4	
Колориметрическое определение пировиноградной кислоты в моче.....	43

Лабораторная работа 5	
Энзиматическое определение пирувата в тканях мозга, печени, сердца крыс методом Цока и Лампрехта.....	46
Лабораторная работа 6	
Определение активности пируватдегидрогеназного комплекса в митохондриальной фракции.....	48
Раздел II. МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА И АКТИВНОСТЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ	51
Лабораторная работа 7	
Колориметрическое определение молочной кислоты в гомогенатах тканей крыс.....	54
Лабораторная работа 8	
Энзиматическое определение молочной кислоты в гомогенатах тканей крыс.....	57
Лабораторная работа 9	
Определение активности лактатдегидрогеназы в гомогенатах тканей крыс методом Бергмейера.....	60
Раздел III. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ГЛИКОЛИЗА	62
Лабораторная работа 10	
Количественное определение фруктозо-1,6-дифосфата в гомогенате тканей крыс.....	63
ТЕМА: БИОЭНЕРГЕТИКА МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ	
Раздел I. АКТИН СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ	68
Лабораторная работа 11	
Выделение очищенного препарата G-актина из скелетных мышц крыс.....	69
Раздел II. МИОЗИН СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ	71
Лабораторная работа 12	
Выделение препарата миозина из скелетных мышц крыс.....	72
Лабораторная работа 13	
Определение АТФ-азной активности миозина.....	74
Лабораторная работа 14	
Определение числа сульфгидрильных групп миозина методом титрования пара-хлормеркурибензоатом.....	76
ТЕМА: БИОЭНЕРГЕТИКА ТКАНЕВОГО ДЫХАНИЯ	
Раздел I. H^+-АТФ-азная АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ	79
Лабораторная работа 15	
Определение H^+ -АТФ-азной активности митохондрий печени крыс.....	81

Раздел II. ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД В ИЗУЧЕНИИ ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ.....	82
Лабораторная работа 16	
Изучение дыхания гомогената печени крыс полярографическим методом.....	85
Раздел III. КОМПОНЕНТЫ АДЕНИЛОВОЙ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ.....	99
Лабораторная работа 17	
Количественное определение компонентов адениловой системы в печени крыс.....	101
ЧАСТЬ III. ХИМИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ.....	103
ТЕМА: ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ДЕГРАДАЦИИ МАКРОМОЛЕКУЛ.....	103
Раздел I. АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОДУКТОВ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ.....	104
Лабораторная работа 18	
Количественное определение малонового диальдегида в печени крыс.....	106
Лабораторная работа 19	
Количественное определение гидроперекисей липидов методом Плацера (в модификации).....	108
Раздел II. ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ.....	109
Лабораторная работа 20	
Количественное определение карбонильных производных окисленных белков.....	112
ТЕМА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ.....	116
Лабораторная работа 21	
Определение активности супероксиддисмутазы.....	118
Лабораторная работа 22	
Определение активности каталазы.....	120
ТЕМА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ МАРКЁРНЫХ ФЕРМЕНТОВ.....	124
Раздел I. МАРКЁРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КЛЕТКИ.....	124
Лабораторная работа 23	
Определение активности 5'-нуклеотидазы в печени крыс.....	126
Раздел II. МАРКЁРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ЛИЗОСОМ.....	129

Лабораторная работа 24	
Определение активности катепсина Д в гомогенате печени крыс.....	131
Лабораторная работа 25	
Определение активности кислой фосфатазы в гомогенате печени крыс.....	134
Раздел III. МАРКЁРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ МИТОХОНДРИЙ.....	138
Лабораторная работа 26	
Определение активности сукцинатдегидрогеназы в гомогенате печени крыс..	139
Раздел IV. МАРКЁРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ФРАКЦИИ МИКРОСОМ.....	142
Лабораторная работа 27	
Определение активности глюкозо-6-фосфатазы в гомогенате печени крыс....	144
ЧАСТЬ IV. КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ	147
Вопросы для подготовки к итоговым занятиям по курсу «БИОЭНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТКИ».....	147
Семинар № 1. «Механизмы процессов фотосинтеза. Общие вопросы биоэнергетики».....	147
Семинар № 2. «Механизмы биоэнергетических процессов в митохондриях, их регуляция и нарушения. Митохондриальные болезни».....	149
Контрольные вопросы для подготовки к экзаменам по курсу «БИОЭНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТКИ».....	153
Вопросы для подготовки к итоговым занятиям по курсу «ХИМИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ».....	159
Семинар «АПОПТОЗ».....	159
Семинар «ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТКЕ».....	159
Семинар «ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ».....	160
Контрольные вопросы для подготовки к экзаменам по курсу «ХИМИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ».....	161
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	164
СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	175

ВВЕДЕНИЕ

Курс «Биоэнергетика клетки» посвящён изучению важнейшего из свойств живых организмов – способности улавливать, преобразовывать и запасать энергию в форме, доступной для использования, то есть для совершения различных видов полезной работы. Процесс жизнедеятельности неразрывно связан с работой. Любой организм и его части движутся, преодолевая сопротивление среды. При этом они выполняют механическую работу. Менее заметна, но еще более значима для организма внутренняя работа. Так, для синтеза биоорганических молекул требуется химическая работа, для установления и поддержания разности концентраций – осмотическая работа, а для разности электрических потенциалов – электрическая работа. Некоторые организмы способны испускать свет, для этого тоже требуется работа. Способность выполнять работу называется энергией.

Согласно определению В.П. Скулачева, биоэнергетика – отрасль функциональной биологии, изучающая превращение энергии внешних ресурсов в биологически полезную работу. Биоэнергетика как наука существует более 50 лет. Благодаря появлению хемиосмотической гипотезы Питера Митчела (1961) наши знания в этой области удалось в значительной степени упорядочить.

Биоэнергетические процессы – лишь часть метаболических реакций, которые предназначены для поставки энергии в форме, доступной для использования организмом. В.П. Скулачев предлагает разделять эти процессы на две группы: одни из них локализованы в мембранах, а другие – в цитоплазме. В каждой из этих групп используется своя «валюта» для оплаты энергетических затрат. В мембранах это разность электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\mu\text{H}$) или разность электрохимических потенциалов ионов Na ($\Delta\mu\text{Na}$), вне мембран – молекулы АТФ или другие высокоэнергетические соединения. Энергия $\Delta\mu\text{H}$ и $\Delta\mu\text{Na}$ может обратимо превращаться в энергию АТФ. Следует помнить, что именно мембранные биоэнергетические системы занимают центральное положение в процессах получения конвертируемой энергии, потребляемой клеткой.

Энергетика любого организма, вне зависимости от степени сложности его структурно-функциональной организации, очень чутко реа-

гирует на любые изменения, происходящие в окружающей среде. Компенсаторно-адаптивные реакции биоэнергетических систем обеспечивают выживание организма благодаря тому, что эти реакции позволяют адекватно изменять (адаптировать) энергообеспечение процессов жизнедеятельности, приводя их в соответствие с реальными затратами энергии. Именно поэтому знание закономерностей протекания биоэнергетических процессов, их регуляции, а также механизмов нарушения энергетического сопряжения и овладение основами современных методов изучения этих процессов имеет большое теоретическое и практическое значение.

В рамках курса **«Химия патологических процессов»** изучается молекулярная интерпретация нарушений биохимических процессов, протекающих в клетках и тканях организма человека при патологических состояниях.

В разделе «Локализация ферментов в клетке» представлены методики, позволяющие определять активность ферментов, являющихся маркерами (индикаторами) различных клеточных компартментов. Так, 5'-нуклеотидаза относится к индикаторным ферментам плазматической мембраны клетки. Повышение её активности в плазме крови, выявляемое при токсическом гепатите, свидетельствует о повреждении мембран гепатоцитов. Чистоту мембран эндоплазматического ретикулума, выделенных путем дифференциального центрифугирования, можно оценить по активности фермента глюкозо-6-фосфатазы в микросомальной фракции. Активность сукцинатдегидрогеназы принадлежит исключительно митохондриям. Для характеристики фракции лизосом используют определение свободной, общей и неседиментируемой (неосаждаемой) активности катепсина D. Соотношение этих показателей позволяет оценить степень проницаемости лизосомальной мембраны для субстратов и ферментов при повреждении лизосом.

В разделе «Перекисное окисление липидов» рассматриваются методические подходы для изучения активности этого процесса. Диеновые конъюгаты относятся к промежуточным продуктам процесса ПОЛ. Одним из конечных продуктов перекисного окисления липидов является малоновый диальдегид, определение концентрации которого осуществляется по реакции с тиобарбитуровой кислотой. При оценке состояния процессов ПОЛ большое значение имеет определение уровня окислительной модификации белков по содержанию карбонильных производных и активности антиоксидантных ферментов.

Супероксиддисмутаза, каталаза и глутатионпероксидаза участвуют в защите клетки от свободных радикалов и перекиси водорода.

Методы оценки активности процессов ПОЛ и антиоксидантных ферментов широко используются для характеристики особого состояния тканевого метаболизма, получившего название «окислительный стресс». Окислительный стресс является неизбежным следствием сдвигов гомеостаза организма, которые могут быть вызваны воздействием широко круга физических, химических и биологических факторов. При этом нарушается баланс между темпами образования активных форм кислорода, свободных радикалов и гидроперекисей липидов, с одной стороны, и функциональными возможностями системы антиоксидантной защиты (АОЗ) – с другой. В такой ситуации система АОЗ уже не способна адекватно противостоять усиленной продукции прооксидантов. Избыток свободных радикалов и перекисных соединений существенно увеличивает активность процессов ПОЛ, что приводит к повреждению структуры и нарушению функций липидов, белков, углеводов и нуклеиновых кислот.

Окислительный стресс является ведущим патогенетическим звеном таких заболеваний, как сахарный диабет, атеросклероз, ревматоидный артрит, фиброз легких и многих других, во многом он определяет темпы биологического старения. Изучение состояния процессов ПОЛ и функциональной активности системы АОЗ – важный этап характеристики свойств новых лечебных и косметических препаратов, а также пищевых продуктов.

Таким образом, практикум по курсу «Химия патологических процессов» позволит студентам получить необходимые знания и навыки, которые составят основу научного подхода к планированию и реализации информативных комплексов клинико-биохимического обследования пациентов с различными заболеваниями.

ЧАСТЬ I. НЕКОТОРЫЕ ОСНОВЫ МЕТОДОЛОГИИ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ТЕМА: ПОДГОТОВКА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

I. Приготовление гомогената ткани

Исследование тканевых гомогенатов широко используется в научных целях. Этот методический прием применяют в клинике при исследовании биопсийного материала и кусочков различных тканей, взятых во время хирургических операций.

Целью гомогенизации является разрушение структуры клеточных стенок и/или мембран. Гомогенат ткани может быть использован как материал для исследования активности ферментов, содержания различных метаболитов, а также для дальнейшего фракционирования клеточных компонентов.

Выбор метода разрушения клеточной структуры и среды суспендирования зависит от ткани и от целей исследования.

Все этапы и процедуры приготовления гомогената проводят на холоде. Оптимальная температура составляет +2° С. Посуда, инструменты и растворы, используемые для получения гомогената, должны быть предварительно охлаждены до этой температуры. Лучшие результаты получают при работе в специальных камерах с охлаждением.

Навеску ткани, отмытую от крови, быстро измельчают ножницами или пропускают через металлический пресс, иногда растирают в ступке с кварцевым песком (мышечная и соединительная ткани). Все процедуры прodelываются максимально быстро и на холоде.

Для приготовления гомогенатов тканей из таких органов, как печень, селезенка, тимус, с целью максимального сохранения клеточных структур чаще всего используют стеклянный гомогенизатор с тефлоновым пестиком типа Поттера и Даунса – соответственно с ручным или механическим приводом.

Эффективность гомогенизации зависит от скорости вращения пестика (800, 1000 или 2000 об/мин), зазора между пестиком и стаканом (обычно 0,14–0,16 мм), количества движений пестика вверх-вниз

(8–10 движений) и времени гомогенизации (0,5–1,5 мин). Стакан гомогенизатора обязательно помещается в ледяную баню, полученный гомогенат фильтруют через один слой капрона или 3–4 слоя марли, чтобы отделить неразрушенные кусочки ткани. Полученный гомогенат хранят в пробирках с крышками, помещенных в ледяную баню.

Результат гомогенизации можно контролировать морфологически с использованием так называемых "витальных" красителей типа акридинового оранжевого, трипанового синего, определяя процент неразрушенных клеток, или биохимически, оценивая активность ферментов цитозоля и субклеточных частиц.

К другим методам разрушения тканевой и клеточной структур относятся действие осмотического шока, многократное замораживание-оттаивание, обработка ферментами (трипсин, лизоцим, β -гиалуронидаза, липаза), органическими растворителями (толуол, этилацетат), ультразвуком, высоким давлением.

Среда суспендирования для гомогенизации тканей обычно имеет нейтральное значение pH и необходимое осмотическое давление, предохраняющее частицы от набухания и разрыва. Готовится она чаще всего на основе буферного раствора (обычно трис-HCl, pH 7,4) с добавлением 0,25 М сахарозы или 0,2 М KCl. Иногда добавляют вещества, препятствующие инактивации ферментов (например, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), связывающий двухвалентные ионы металлов, или глутатион, препятствующий переокислению липидных компонентов).

Соотношение ткань : среда (вес/объем) может быть различным. Обычно готовят исходный 10 % гомогенат (1 г ткани на 9,0 мл среды).

II. Выделение митохондрий из печени крыс методом дифференциального центрифугирования по Weinbach

РЕАКТИВЫ:

Среда для приготовления гомогената печени и выделения митохондриальной фракции представляет собой 0,25 М раствор сахарозы, содержащий 0,001 М динатриевой соли ЭДТА и 0,02 М трис-HCl буфер (pH 7,4).

Для приготовления 1,0 л среды следует взвесить 85,5 г сахарозы, 2,42 г трис-основания и 0,292 г динатриевой соли ЭДТА.

Перед использованием среду выделения следует охладить до +2° С. До этой же температуры должны быть охлаждены все инструменты и посуда.

ХОД РАБОТЫ:

Печень быстро извлекают из брюшной полости крысы и дважды промывают охлаждённой средой выделения и помещают в чашку Петри, стоящую на льду. Печень измельчают ножницами, полученные кусочки снова дважды промывают охлаждённой средой выделения. Кусочки печени в соотношении к среде выделения 1 : 9 (вес/объём) гомогенизируют в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (600–800 об/мин) в течение 40 сек.

Полученный гомогенат разливают в пластмассовые центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин при 600 g в рефрижераторной центрифуге. Температура ротора центрифуги на всём протяжении процедуры выделения митохондрий не должна превышать +2° С. Супернатант, полученный после первого центрифугирования, сливают в чистые центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин при 8500 g. Полученный осадок митохондрий ресуспендируют в среде выделения и дважды отмывают, центрифугируя по 10 мин при 8500 g. Рабочую суспензию митохондрий готовят путём ресуспендирования осадка отмытых органелл в 0,2–0,25 мл среды выделения. Концентрация белка в полученной суспензии митохондрий должна составлять 25–35 мг/мл. Суспензию митохондрий хранят в пробирке с крышкой на ледяной бане. Поскольку выделенные митохондрии даже при условии их хранения на льду подвергаются «старению» (потеря прочного сопряжения между дыханием и фосфорилированием), рекомендуется все исследования с препаратом проводить в течение 1 часа после получения рабочей суспензии.

Пересчёт указанного значения относительного центробежного ускорения (**g**) в соответствующую ему частоту вращения ротора используемой центрифуги (**об/мин**) ведут с помощью формулы:

$$\text{об/мин} = \sqrt{\frac{g}{1.11 \cdot 10^{-5} \cdot R}}, \text{ где:}$$

g – требуемое относительное центробежное ускорение (600 g и 8500 g);
R – радиус ротора центрифуги в см.

III. Фракционирование гомогената печени крысы методом дифференциального центрифугирования

Метод дифференциального центрифугирования разработан Христианом Де Дювом (1955). Он основан на различиях в скорости седиментации (осаждения) частиц, отличающихся по размерам и плотности (удельному весу). Гомогенат ткани центрифугируют при ступенчатом увеличении центробежного ускорения, которое подбирают так, чтобы на каждом этапе осаждалась определенная субклеточная фракция. Схематически процесс представлен на рисунке 1. Как видно из схемы, осадок, получаемый на каждой из стадий процесса, отделяют от надосадочной жидкости и несколько раз промывают для получения относительно чистой осадочной фракции. Каждая фракция субклеточных частиц имеет определенный диапазон значений размера и плотности. В силу этого получить абсолютно чистый и гомогенный осадок (не содержащий некоторой примеси «примыкающих» по плотности и размеру частиц из соседних фракций) практически невозможно. Вместе с тем, при условии максимального точного подбора скоростей центрифугирования (максимальное соответствие требуемому значению центробежного ускорения), а также соблюдении ряда других методических правил, загрязнение каждой из субклеточных фракций можно минимизировать до допустимого уровня.

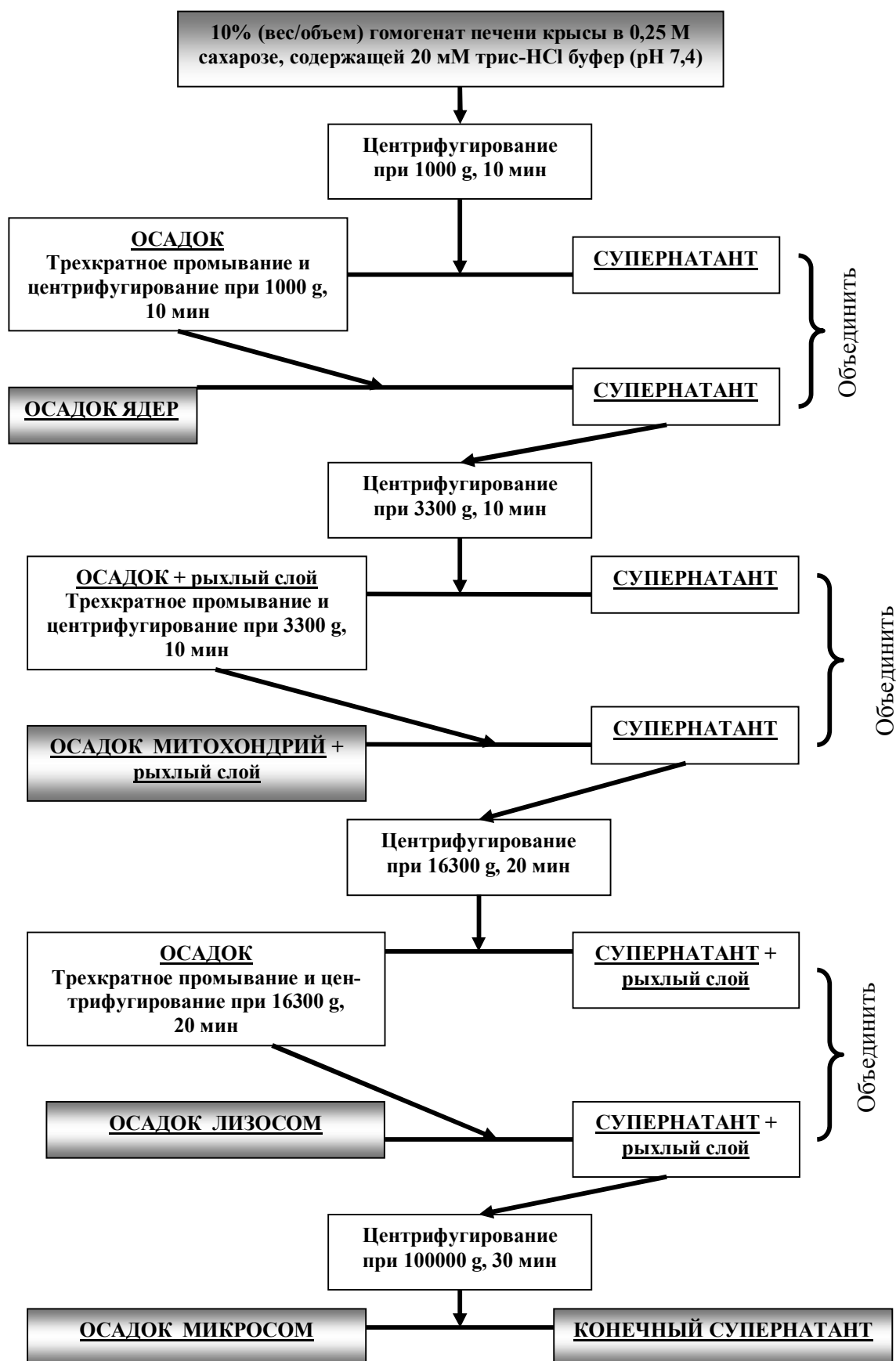


Рис. 1. Схема получения субклеточных фракций из гомогената печени крысы методом дифференциального центрифугирования по Х. Де Дюву и соавт. (Ch. De Duve et al., 1955).

Чистоту каждой из полученных в виде осадка субклеточных фракций чаще всего оценивают по величине удельной активности маркёрного для данной фракции фермента. Ее сравнивают с удельной активностью этого же маркёрного фермента во всех других полученных фракциях. Результат оформляют в виде гистограммы (рис. 2): по оси абсцисс последовательно откладывают относительное количество белка в каждой из фракции в порядке их выделения; по оси ординат – удельную активность маркёрного для данной фракции фермента. По площади столбиков можно определить активность фермента в каждой из полученных фракций в %.

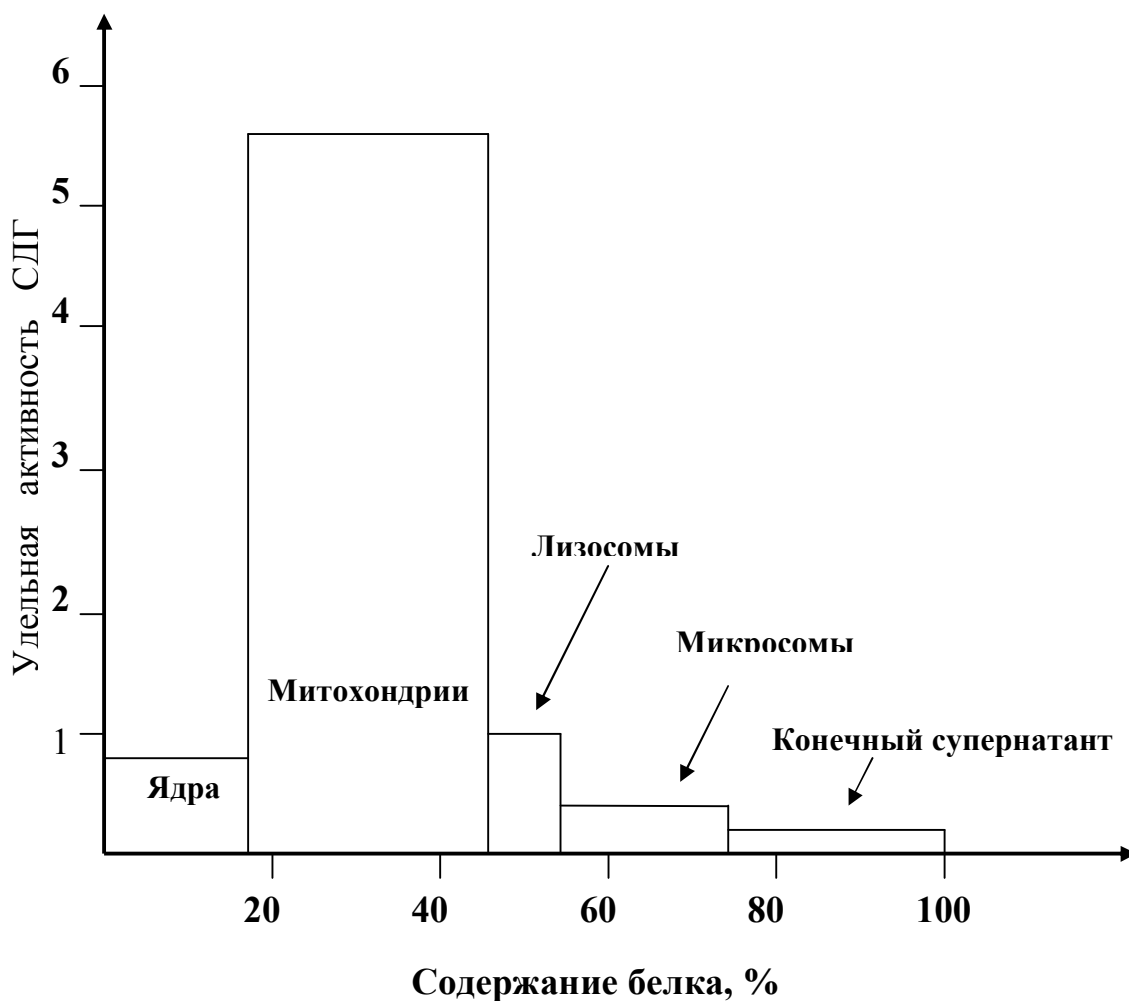


Рис. 2. Распределение активности СДГ между субклеточными фракциями, выделенными из гомогената печени крысы.

Пример: Оценка чистоты фракции митохондрий, выделенных при дифференциальном центрифугировании из гомогената печени крыс.

Одним из маркерных ферментов митохондрий является сукцинатдегидрогеназа (СДГ). При правильно подобранных режимах центрифугирования взаимозагрязнение СДГ-активностью субклеточных фракций, плотность которых близка к таковой для митохондрий, будет минимальным. Гистограмма будет иметь вид, как на рисунке 2.

ТЕМА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ВЕЩЕСТВА В ИССЛЕДУЕМОМ РАСТВОРЕ

I. Калибровочные кривые

МОТИВАЦИЯ:

Концентрации веществ в биологических пробах в норме варьируют в строго определённом диапазоне, а при патологии изменяются в пределах, не превышающих критические для жизни значения. Более 80 % важных с клинической точки зрения метаболитов человеческого организма можно определить с помощью различных оптических методов количественного анализа. Оптический количественный анализ, основанный на регистрации интенсивности поглощения светового пучка с определённой длиной волны при его прохождении через исследуемый раствор, называется адсорбционной фотометрией.

В большинстве случаев оптимальным для расчёта концентрации светопоглощающих растворов является графический метод. Он заключается в построении калибровочной кривой, представляющей собой график зависимости экстинкций (E) от известных концентраций (C) поглощающего вещества (хромофора). Концентрацию вещества откладывают на оси абсцисс (ось X), а экстинкцию – на оси ординат (ось Y). После измерения экстинкции раствора определяемого вещества с помощью калибровочного графика находят его концентрацию в пробе.

Перед обработкой серии калибровочных проб сначала следует хорошо отработать метод лабораторного исследования, иначе точность расчетов по калибровочной кривой будет неудовлетворительной из-за неадекватности условий и техники обработки стандартных и опытных проб. При смене реактивов необходимо построить новый калибровочный график. Для получения точных и воспроизводимых результатов соблюдают правило – каждый исследователь использует только свою калибровочную кривую.

Требования к условиям построения калибровочных кривых

1. Калибровочный раствор помимо стандартного вещества должен содержать все основные компоненты биологической жидкости, влияющие на интенсивность окраски определяемого вещества.
2. Навеска стандарта должна быть достаточно большой для уменьшения технической ошибки взвешивания. Взвешивают не в бюксе, а на листочке целлофана или полиэтилена с последующим количественно полным перенесением вещества в мерную посуду.
3. Мерную посуду следует обезжирить и вымыть хромовой смесью.
4. Сначала готовят основной раствор; чем он концентрированнее, тем дольше в нём сохраняется стандартное вещество. Разведения стандартного вещества должны не только охватывать диапазон физиологических концентраций, но и выходить за пределы минимальных и максимальных величин. Так, содержание общего белка в норме составляет 65–85 г/л, а стандартные растворы готовят в диапазоне от 40 до 120 г/л.
5. Измерение оптической плотности начинают со стандартного раствора меньшей концентрации. Каждое разведение промеряют 3–5 раз в 3-х сериях. В целом одно разведение промеряют 6–12 раз. При построении калибровочной кривой учитываются средние значения.
6. По оси абсцисс (ось X) откладывают концентрации вещества в стандартных растворах, по оси ординат (ось Y) – величины полученных экстинкций. Графики строят не менее чем по 5 точкам: обычно 5–8 точек, различающихся по концентрации поглощающего вещества не более чем на 30 %. Кривая откладывается так, чтобы 3 из 5 точек легли на линию, а остальные располагались равномерно близ нее, отклоняясь в ту и другую сторону. Точки обозначают крестами, оси координат – жирной линией. На их фоне кривая должна представлять тонкую линию. Отдельные точки, значительно смещающиеся от калибровочной кривой, обычно являются результатом ошибки определения, поэтому их не учитывают.
7. Кривая проводится из точки начала координат под углом 45°, поэтому при необходимости применяется масштабирование. В правом верхнем углу указывают наименование кривой, метод, светофильтр, длину оптического пути кюветы (мм), дату по-

строения. Экстинкция обычно должна быть в пределах 0,1–0,3 единиц абсорбции (максимум – до 0,7).

Пример построения калибровочной кривой

Нормальные значения определяемой величины составляют 60–80 г/л, калибровочные стандарты – 20, 40, 60, 80, 100, 120 г/л. Из каждого разведения стандарта выполняют исследование 3-х проб. Измеряют экстинкции каждого из растворов, содержащих одинаковое количество стандарта, полученные значения усредняют (если одно из 3-х значительно отклоняется, его не учитывают).

Масштаб калибровочного графика должен быть достаточно крупным – 20 см и более на каждой оси. Для того чтобы кривая располагалась под углом около 45° к осям, берут максимальные значения концентрации и абсорбции, если между ними в пределах этих значений сохраняется прямо пропорциональная зависимость. Максимальная концентрация калибровочного стандарта – 120 г/л, максимальное значение экстинкции – 0,6. На основании этих данных находят факторы калибровки по формулам:

$$C_{\max} / 20 = 120 / 20 = 6 \text{ г/л.}$$

$$E_{\max} / 20 = 0,6 / 20 = 0,03.$$

Полученные цифры – это «цена деления», соответствующая масштабу 1 см на осях концентрации (С) и экстинкции (Е). Для облегчения процедуры откладывания на оси ординат значений абсорбции стандартных и опытных проб рекомендуется разделить величину экстинкции на цену деления. Например: $0,2 / 0,03 = 6,67$. Полученное число показывает, на каком расстоянии от точки (0;0) в см следует сделать отметку для восстановления из неё перпендикуляра: отмеряют отрезок в 6 см и 7 мм. Аналогично обчисляют остальные значения, размещают их на вертикальной и горизонтальной осях.

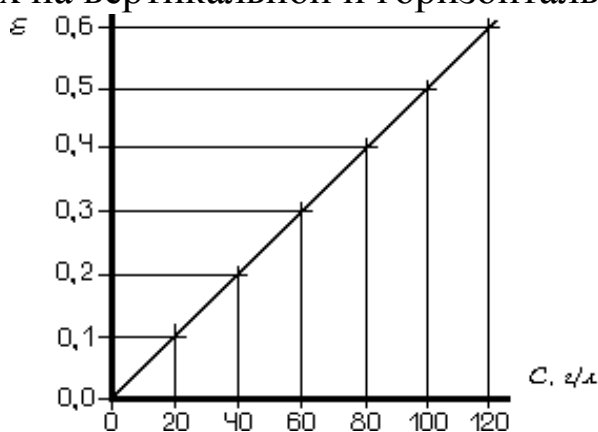


Рис. 3. Схематический вид калибровочной кривой.

Необходимо помнить, что в дальнейшем условия обработки опытных проб должны быть аналогичны условиям, в которых выполнялись калибровочные пробы. Для построения графика должна использоваться та же методика и те же реактивы, что и для обработки биопроб. По калибровке нельзя определять результаты, полученные с помощью других методов и реактивов.

Расчёт концентрации вещества по отношению к стандартной пробе

Расчёт концентрации вещества по отношению к стандартной пробе является альтернативным методом вычисления содержания вещества в биологических пробах с использованием калибровочного графика. Этот способ расчёта менее точен, поскольку используется только одна калибровочная точка и, следовательно, увеличивается возможность получения ошибочных результатов.

II. Вычисление концентрации вещества с использованием молярного коэффициента экстинкции

Атомы, ионы, молекулы или функциональная группа в составе более сложной молекулы, которые поглощают электромагнитное излучение оптического диапазона со строго определённой длиной волны, называются хромофорами. Примером хромофоров может быть ароматическая аминокислота триптофан, обеспечивающая поглощение оптического излучения с длиной волны 280 нм, что лежит в основе спектрофотометрического определения концентрации белковых растворов. Примерами хромофоров другой категории могут служить продукты взаимодействия определяемого соединения с некоторыми веществами. Эти продукты окрашены и их растворы прозрачны, то есть они не рассеивают проходящий световой поток. Для аналитических целей пригодны только такие цветные реакции, в результате которых интенсивность окраски образующегося продукта будет пропорциональна концентрации определяемого вещества. Иными словами, интенсивность поглощения (экстинкция, E) хромофора (продукта реакции) должна быть прямо пропорциональна концентрации определяемого вещества. На этом принципе основаны множество колориметрических методов определения концентраций различных веществ в растворах.

Связь между оптической плотностью (экстинкцией) и концентрацией вещества (хромофора) в изучаемом растворе описывает закон Бугера-Ламберта-Бэра:

$$E = \varepsilon * C * l, \text{ где:}$$

E – экстинкция (оптическая плотность), величина безразмерная;

ε – молярный коэффициент экстинкции, $\text{моль}^{-1} * \text{см}^{-1} * \text{л}$ или $\frac{\text{л}}{\text{моль} * \text{см}}$;

C – концентрация вещества в растворе, моль/л ;

l – толщина кюветы, см .

Из приведённой формулы следует, что молярный коэффициент экстинкции обозначает экстинкцию хромофора в кювете толщиной 1 см при концентрации хромофора в растворе 1 моль/л. Таким образом, зная величину ε и определив E раствора хромофора в кювете толщиной 1 см, можно вычислить концентрацию хромофора (C) по формуле:

$$C (\text{моль/л}) = \frac{E}{\varepsilon * l} = \frac{E \text{ моль} * \text{см}}{\varepsilon * \text{л} * \text{см}}.$$

Молярные коэффициенты экстинкции для многих хромофоров известны. Значения некоторых из них приведены в таблице 1.

Таблица 1

Молярные коэффициенты экстинкции для некоторых хромофоров

Соединения	Длина волны максимума поглощения, нм	ε , $\text{моль}^{-1} * \text{см}^{-1} * \text{л}$
Триптофан	280	$5,6 * 10^3$
ДНК	260	$6,6 * 10^3$
НАДН, НАДФН	340	$6,22 * 10^3$
Аденин	260	$13,4 * 10^3$
Гуанин	260	$7,2 * 10^3$
Цитозин	260	$5,55 * 10^3$
Тимин	260	$7,4 * 10^3$
Триметиновый комплекс, образующийся при взаимодействии МДА и 2-тиобарбитуровой кислоты	532	$1,56 * 10^5$
Пара-хлормеркури-бензоат (п-ХМБ)	232	$1,69 * 10^4$

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:

Освоение наиболее часто используемых методов количественного определения белка (колориметрическими и спектрофотометрическим) и неорганического фосфора в биологических жидкостях, знакомство с основами методологии выбора вариантов построения калибровочной кривой.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Технику приготовления и хранения стандартных растворов.
2. Требования к условиям построения градуировочной кривой.
3. Правила построения калибровочной кривой.
4. Правила оформления калибровочного графика.
5. Критерии проверки точности калибровочного графика.
6. В каких пределах разведения стандартного вещества должны охватывать диапазон физиологической концентрации этого вещества.
7. Правила расчёта количества вещества в пробе по эталонному раствору с известной концентрацией поглощающего вещества.
8. Правила расчёта количества вещества в пробе с учётом коэффициента молярной экстинкции поглощающего вещества.
9. Основные причины нарушения прямо пропорциональной зависимости между абсорбцией и концентрацией, от которых зависит прямопропорциональность калибровочной кривой.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Правильно подготовить посуду для выполнения работы по построению калибровочной кривой.
2. Рассчитать и приготовить необходимые для работы реактивы.
3. Работать с фотоколориметром, аналитическими весами.
4. С помощью предложенного метода построить калибровочный график и правильно его оформить:
 - а) графики для количественного определения белка,
 - б) график для определения количества неорганического фосфата.
5. Найти по калибровочному графику количество определяемого вещества в пробе.
6. Проверить точность калибровочного графика.
7. Рассчитать содержание вещества, используя экстинкцию эталонной пробы с известной концентрацией, или формулу, учиты-

вающую молярный коэффициент поглощения определяемого вещества.

ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

1. Как правильно подготовить посуду для выполнения работ по построению калибровочного графика?
2. По каким правилам осуществляют построение калибровочной кривой?
3. Какие параметры откладывают по оси абсцисс и по оси ординат при построении калибровочного графика?
4. Назовите минимальное количество точек, по которым можно построить калибровочный график.
5. В каком диапазоне единиц абсорбции должны быть значения экстинкции калибровочных проб, используемых для построения калибровочной кривой? Какое значение является максимальным?
6. Какие сведения указывают в правом верхнем углу при построении калибровочной кривой?
7. В каких случаях при построении калибровочной кривой применяется масштабирование?
8. Чем отличаются условия обработки калибровочных и опытных проб?
9. Назовите особенности стандартных растворов.
10. При каких условиях необходимо строить новый калибровочный график?
11. Какие параметры, кроме молярного коэффициента экстинкции, учитывают в формуле при расчете концентрации вещества по данным оптической плотности с использованием закона Бугера-Ламберта-Бера?
12. Какие способы расчета концентрации определяемого вещества в биологических пробах Вы знаете?

Лабораторная работа 1

I. КАЛИБРОВОЧНАЯ КРИВАЯ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФАТА МЕТОДОМ БОДАНСКОГО

МОТИВАЦИЯ:

Определение количества неорганического фосфора в растворах – необходимый элемент при изучении активности широкого спектра ферментов (5'-нуклеотидаза, АТФ-аза и пр.) и ферментативной активности белков (миозин и пр.). Вместе с тем изменение количества неорганического фосфора в крови является одним из косвенных признаков нарушения гомеостаза организма и имеет клиническое значение.

ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ:

1. Роль неорганического фосфата в структуре макроэргических соединений.
2. Понятия "макроэргические соединения", "макроэргическая связь".
3. Структура и функции макроэргических соединений.
4. Ферменты, участвующие в переносе фосфатных групп.
5. В чем заключается принцип методов определения количества фосфора?
6. Почему используется метод определения количества неорганического фосфата в экспериментах по изучению активности ферментов? Примеры.
7. Какие требования предъявляются к посуде, используемой для определения количества неорганического фосфора?

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Определение содержания неорганического фосфора по В.Е. Боданскому основано на образовании фосфомолибдата аммония с последующим восстановлением его аскорбиновой кислотой в молибденовую синь, количество которой пропорционально исходному содержанию фосфора.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические весы.
2. Мерные цилиндры, колбы на 100 мл.
3. Пипетки на 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 мл.

4. Химические пробирки.
5. Фотоэлектроколориметр.

РЕАКТИВЫ:

1. основной стандартный раствор фосфора – 0,44 г KN_2PO_4 растворяют в мерной колбе на 100 мл; рабочий стандартный раствор фосфора – 1,0 мл основного стандартного раствора доводят водой до метки в мерной колбе на 100 мл (в 1,0 мл рабочего стандартного раствора – 0,01 мг фосфора).
2. 10 % раствор трихлоруксусной кислоты.
3. Молибденовый реактив. 2,5 г молибденово-кислого аммония растворяют в 60,0 мл дистиллированной воды, фильтруют в мерную колбу на 100 мл. В другой колбе к 25,0 мл воды добавляют 7,5 мл концентрированной H_2SO_4 . Вторым раствором приливают к первому и доводят объём дистиллированной водой до метки.
4. 0,1 М раствор HCl .
5. 1 % раствор аскорбиновой кислоты (готовить ex tempore на 0,1 М HCl).

ХОД РАБОТЫ:

Для построения калибровочного графика используют рабочий стандартный раствор фосфора. Готовят калибровочные пробы согласно Таблице 2. В 6 пробирок наливают рабочий стандартный раствор, 10 % ТХУ и доводят суммарный объём жидкости в каждой пробирке дистиллированной водой до 9,0 мл. Для каждой точки на калибровочной кривой определение выполняют трижды. Следовательно, из каждой пробы в три чистые пробирки переносят по 1,5 мл смеси, затем во все пробирки добавляют по 1,0 мл 1 % раствора аскорбиновой кислоты и по 1,0 мл молибденового реактива. Параллельно ставят контрольную пробу, содержащую 1,5 мл 10 % раствора ТХУ, 1,0 мл 1 % раствора аскорбиновой кислоты и 1,0 мл молибденового реактива. Все пробы инкубируют 10 мин при комнатной температуре, затем измеряют их оптическую плотность при длине волны 640 нм (630–690 нм, на ФЭКе используют красный светофильтр) против контроля на реактивы.

Подготовка калибровочных проб для определения неорганического фосфата

Стандартный рабочий раствор фосфора (мл)	Количество фосфора в пробе (мкг)	10 % раствор ТХУ (мл)	H ₂ O дистиллированная (мл)
0,6	6	2,5	5,9
1,2	12	2,5	5,3
2,4	24	2,5	4,1
3,6	36	2,5	2,9
4,8	48	2,5	1,7
6,0	60	2,5	0,5

По полученным данным строят калибровочную кривую с соблюдением всех правил построения. При построении калибровочного графика по оси ординат (ОУ) откладывают среднеарифметическое значение из 3-х показателей экстинкции, а по оси абсцисс (ОХ) – содержание фосфора в мкг согласно таблице.

II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФАТА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБАХ МЕТОДОМ КОНДРАШОВОЙ

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Метод основан на использовании различия спектров поглощения молибдатных комплексов в ультрафиолетовой области спектра, что дает возможность определять фосфат в составе фосфорно-молибденовой кислоты без предварительного отделения её от молибдата аммония.

РЕАКТИВЫ:

1. Этанол 96 %.
2. 8 N раствор H₂SO₄.
3. 10 % раствор молибдата аммония на 8 N H₂SO₄.
4. Стандартный раствор KН₂РO₄ известной концентрации.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

Измерение уровня неорганического фосфата проводится в кислотном экстракте ткани. Реакционная смесь для одной пробы содержит 3,0 мл 96

% этанола и 0,4 мл 10 % раствора молибдата аммония на 8 N серной кислоте. В измерительную кювету с реакционной смесью вносят 0,1 мл кислотного экстракта ткани, перемешивают и немедленно измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 390 нм. Измерение проводят против контрольной пробы, состав которой идентичен составу реакционной смеси.

В стандартную пробу вместо экстракта ткани вносят 0,1 мл раствора KH_2PO_4 известной концентрации и далее обрабатывают согласно методике. Экстинкцию стандарта измеряют также против контрольной пробы. Расчёт производят по формуле, выражая содержание фосфата в мкмоль на 1 г ткани:

$$C_0 = \frac{E_0 C_{cm}}{E_{cm} B}, \quad \text{где}$$

C_0 – концентрация фосфора в пробе,

$C_{ст}$ – концентрация в стандартной пробе,

E_0 – экстинкция опытной пробы,

$E_{ст}$ – экстинкция стандартной пробы,

B – величина навески ткани в граммах в пересчёте на 1 л раствора.

Лабораторная работа 2

КАЛИБРОВОЧНЫЕ КРИВЫЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА

МОТИВАЦИЯ:

Определение концентрации белка – одна из необходимых процедур в лабораторных экспериментах при выделении, разделении и очистке белковых фракций, исследовании активности ферментов, обычно соотносимой с количеством белка в пробе. Кроме того, количественное определение белка в биологических жидкостях (кровь, моча, ликвор, транссудаты, экссудаты и др.) имеет важное значение в клинической диагностике. Наиболее часто для определения содержания белка в биологических жидкостях используют колориметрические (биуретовый, Лоури) и спектрофотометрический методы.

ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ:

1. Определение понятий "первичная", "вторичная", "третичная", "четвертичная" структура белка. Связи, поддерживающие эти структуры.
2. Элементарный состав белков.

3. Простые и сложные белки.
4. Функции белков в организме.
5. На какие группы подразделяются методы определения количества белка в биологических жидкостях?
6. В чём заключается принцип определения количества белка колориметрическими методами?
7. Какие колориметрические методы определения содержания белка Вы знаете? Каковы их общие черты и различия?
8. В чём заключается принцип определения количества белка спектрофотометрическим методом?
9. Назовите критерии выбора метода определения количества белка.
10. В чём состоят преимущества и недостатки колориметрических и спектрометрических методов определения содержания белка?

I. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА БИУРЕТОВЫМ МЕТОДОМ

ПРИНЦИП МЕТОДА:

В основе биуретового метода лежит способность ионов Cu^{2+} к образованию с пептидными связями молекул белка хелатных соединений фиолетового цвета в щелочной среде.

Биуретовая реакция развивается в присутствии белков и пептидов, содержащих не менее 2-х пептидных связей. В щелочной среде происходит таутомерная перегруппировка по месту пептидных связей, в результате которой атом Cu взаимодействует с кислородом и азотом, и образуется стабильный комплекс, имеющий синюю окраску, интенсивность которой пропорциональна концентрации белка в растворе.

Биуретовую реакцию нельзя проводить в присутствии солей аммиака, т.к. образуются медно-аммиачные комплексы, наличие которых искажает результаты. Этот метод обычно применяют при концентрации белка в растворе от 1 до 10 мг/мл. Чувствительность биуретового метода составляет 1/16 от чувствительности метода Лоури.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические весы.
2. Мерные цилиндры, колбы на 100 мл.
3. Микропипетка с переменным объёмом – 0,2 мл, сменные наконечники.

4. Пипетки на 1,0; 2,0 и 5,0 мл.
5. Химические пробирки.
6. Фотоэлектроколориметр.

РЕАКТИВЫ:

1. Биуретовый реактив. К 0,75 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ добавляют 3 г реактива $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (натрий-калий винно-кислый), и 250 мл дистиллированной воды. К раствору при энергичном помешивании добавляют 150 мл 10 % NaOH и 1 г KI . Общий объем раствора доводят до 1,0 л.
2. Стандартный раствор белка (альбумин) – 10 мг/мл.
3. NaOH , 3 % раствор.

ХОД РАБОТЫ:

Готовят калибровочные пробы, используя таблицу 3.

Для каждой точки на калибровочной кривой определение выполняют трижды. В контрольной пробе вместо стандартного раствора белка используют дистиллированную воду. После доведения калибровочных проб дистиллированной водой до 1,0 мл во все пробирки добавляют по 4,0 мл биуретового реактива и перемешивают. Инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Затем измеряют оптическую плотность при 540 нм в кюветах 5 мм против контроля.

По полученным данным строят калибровочную кривую с соблюдением всех правил, проверяют точность построения графика.

Таблица 3

Подготовка калибровочных проб для определения белка биуретовым методом

Проба	Стандартный раствор белка (мл)	Количество белка в пробе (мг)	H_2O (мл)	Биуретовый реактив (мл)
Контроль	–	–	1,0	4,0
1	0,1	1	0,9	4,0
2	0,2	2	0,8	4,0
3	0,4	4	0,6	4,0
4	0,6	6	0,4	4,0
5	0,8	8	0,2	4,0
6	1,0	10	–	4,0

II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА МИКРОБИУРЕТОВЫМ МЕТОДОМ

ПРИНЦИП МЕТОДА:

В основе микробиуретового метода лежит специфическая реакция ионов Cu^{2+} с пептидными связями молекул белка в щелочной среде с образованием хелатных продуктов фиолетового цвета, интенсивность окраски пропорциональна числу пептидных связей.

Микробиуретовый метод считается точным и специфичным, применяется при концентрации белка в растворе от 0,02 до 0,53 г/л.

Чувствительность микробиуретового метода составляет 0,003 г/л.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические весы.
2. Микропипетка на 0,2 мл, сменные наконечники.
3. Пипетки на 1,0; 2,0 и 5,0 мл.
4. Химические пробирки.
5. Мерные цилиндры, колбы на 100 мл.
6. Фотоэлектроколориметр.

РЕАКТИВЫ:

1. Стандартный раствор белка – 1 мг/мл.
2. NaOH, 3 % раствор.
3. Реактив Бенедикта – 17,3 г цитрата натрия и 10 г карбоната натрия растворяют при нагревании в 50,0 мл воды, добавляют 1,73 г сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), предварительно растворённого в 10,0 мл воды, доводят объём смеси дистиллированной водой до метки в мерной колбе на 100 мл).

ХОД РАБОТЫ:

Калибровочные пробы готовят согласно таблице 4.

Таблица 4

Подготовка калибровочных проб для определения белка микробиуретовым методом

Стандартный раствор белка (мл)	H ₂ O (мл)	Содержание белка в калибровочной пробе (мг/мл)
0,2	0,8	0,2
0,4	0,6	0,4
0,6	0,4	0,6
0,8	0,2	0,8
1,0	—	1,0

Из каждой полученной калибровочной пробы в отдельные пробирки отбирают по 0,1 мл, после чего во все пробирки приливают по 4,0 мл 3 % раствора NaOH. Пробы хорошо перемешивают и инкубируют в течение 2 мин при комнатной температуре.

Затем во все пробирки добавляют по 0,2 мл реактива Бенедикта, тщательно перемешивают и инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин.

Экстинкцию проб измеряют при длине волны 330 нм против контрольной пробы, в которой раствор белка заменяют 0,1 мл дистиллированной воды.

Для каждой точки на калибровочной кривой определение выполняется трижды (при построении графика используют среднеарифметическое значение экстинкции).

III. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА МЕТОДОМ ЛОУРИ

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Метод Лоури основан на колориметрическом определении продуктов восстановления фосфомолибденового-фосфовольфрамового реагента реактива Фолина медно-белковым комплексом.

Этот метод сочетает в себе биуретовую реакцию на пептидные группы белка с реакцией на ароматические радикалы аминокислот. Метод является более чувствительным, чем биуретовый, а потому чаще применяется в лабораториях при определении небольших концентраций белка, но менее специфичен, чем биуретовый метод. Нижний предел обнаружения белка методом Лоури – 25 мкг/мл.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические весы.
2. Пипетки на 0,2; 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 мл.
3. Мерный цилиндр на 50 мл, колбы.
4. Пробирки.
5. Термостат.
6. Спектрофотометр.

РЕАКТИВЫ:

1. Реактив А: 2 % раствор Na_2CO_3 в 0,1 N растворе NaOH.
2. Реактив В: 0,5 % раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 % растворе цитрата Na.
3. Реактив С: ex tempore! смешивают 1,0 мл реактива В с 50,0 мл реактива А.
4. Стандартный раствор белка (альбумин) – 200 мкг/мл.
5. Реактив Фолина: 100 г $\text{NaW}_6\text{O}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 25 г $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворить в 700 мл H_2O , добавить 50 мл 85 % раствора ортофосфорной кислоты и 100 мл концентрированной HCl. Смесь кипятят 10 часов. В охлаждённую смесь добавляют 150 мл Li_2SO_4 , 50 мл H_2O и несколько капель Br_2 . Избыток брома удаляют кипячением в течение 15 мин. Раствор охлаждают, фильтруют и доводят водой до 1,0 л.

ХОД РАБОТЫ:

Готовят калибровочные пробы согласно таблице 5, в контрольной пробе вместо стандартного раствора белка используют дистиллированную воду.

Таблица 5

Подготовка калибровочных проб для определения белка методом Лоури

№	Содержание белка в пробе (мкг)	Раствор белка (мл)	H ₂ O дистил (мл)	Раствор С (мл)	Реактив Фолина (мл)
К	-	-	0,4	2,0	0,2
1	20	0,1	0,3	2,0	0,2
2	40	0,2	0,2	2,0	0,2
3	60	0,3	0,1	2,0	0,2
4	80	0,4	—	2,0	0,2

К 0,4 мл раствора белка добавляют 2,0 мл раствора С и инкубируют 10 мин при 27° С. Затем добавляют 0,2 мл раствора Фолина, перемешивают и инкубируют 40 мин при 27° С. Измеряют экстинкцию против контроля при 750 нм в кюветах 5 мм.

Для каждой точки на калибровочной кривой определение выполняется трижды (при построении графика используют среднеарифметическое значение экстинкции). По полученным данным строят калибровочную кривую с соблюдением правил построения. Проверяют точность построения графика.

IV. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Метод основан на поглощении ультрафиолетового света в диапазоне длин волн 260–280 нм радикалами ароматических аминокислот (в основном тирозина, триптофана), содержащихся практически во всех белках. Для количественного определения белка обычно проводят измерение экстинкции растворов при 260 и 280 нм, учитывая, что максимум поглощения света нуклеиновыми кислотами – 260 нм. Рассчитывают содержание белка по формуле, эмпирически полученной Калькарсом, или используют соответствующую номограмму.

Метод не следует применять к материалу, где концентрация нуклеиновых кислот больше 20 %. Оптимальная концентрация белка в растворе для спектрофотометрии лежит в пределах 0,2–2,0 мг/мл. Чувствительность метода – 1 мкг/мл. Недостаток метода – его малая специфичность, так как помимо белков могут одновременно давать поглощение свободные ароматические аминокислоты, пуриновые основания, пептиды и пр. Преимущества – простота определения и возможность использования раствора белка в последующей работе.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Пипетки на 2,0 мл.
2. Пробирки.
3. Спектрофотометр.

ХОД РАБОТЫ:

Раствор белка помещают в кварцевую кювету и измеряют экстинкции при 280 и 260 нм против растворителя.

Расчёт проводят по формуле Калькара:

$$X_{(МГ)} \text{ белка} = 1,45 \cdot E_{280} - 0,674 E_{260}$$

где: E_{280} и E_{260} – экстинкции, измеренные при соответствующих длинах волн; 1,45 и 0,674 – эмпирические коэффициенты.

V. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА МЕТОДОМ БРЕДФОРД

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Метод разработан Marion Bradford в 1976 году. В основе метода лежит взаимодействие красителя кумасси голубого G-250 (Coomassie blue G-250) с остатками аргинина и лизина белковых молекул.

Молекулы свободного красителя существуют в растворе в так называемой красной форме, которая имеет максимум поглощения при длине волны 495 нм. В результате образования комплекса красителя с белком красная форма красителя переходит в синюю форму с максимумом поглощения при 595 нм. Образование комплекса происходит быстро – за 1–2 мин.

Метод отличается не только простотой выполнения и малыми затратами времени на проведение анализа, но и существенно превосходит по чувствительности метод Лоури (в 4 раза). Нижний предел обнаружения белка методом Бредфорд – 6 мкг/мл.

Кумасси голубой G-250 не взаимодействует со свободными аргинином и лизином, а также с пептидами, имеющими массу менее 3000 Да, что исключает влияние пептидных БАВ на результат анализа. Кроме того, при использовании метода Бредфорд, в меньшей степени, чем в случае метода Лоури, проявляются помехи, которые оказывают присутствующие в биологическом материале небелковые компоненты на процесс формирования специфического хромогенного комплекса.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические весы.
2. Автоматические пипетки переменного объема (20–100 мкл и 0,2–1,0 мл).
3. Мерный цилиндр, мерные колбы на 50 и 1000 мл.
4. Пробирки.
5. Спектрофотометр.

Вся стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта: она не должна содержать следов детергентов или щелочей, которые способны исказить результаты анализа.

РЕАКТИВЫ:

1. Краситель Кумасси голубой G-250. Для приготовления рабочего раствора Кумасси голубого необходимо 100 мг кристаллического красителя растворить в 50,0 мл 96° этанола. Полученный раствор смешать со 100,0 мл 85 % фосфорной кислоты и объем смеси довести до 1,0 л с помощью дистиллированной воды. Раствор следует профильтровать. Готовый рабочий раствор Кумасси голубого хранят в плотно закрывающейся стеклянной таре при комнатной температуре в течение 2–3 недель. Если раствор не используется ежедневно, его следует периодически фильтровать для удаления образующегося преципитата красителя.
2. Этанол, 96°.
3. Фосфорная кислота, 85 %.
4. Сывороточный альбумин.

ХОД РАБОТЫ:

Для построения калибровочного графика согласно Таблице 6 используют стандартный раствор сывороточного альбумина с концентрацией 1 мг/мл. Калибровочные пробы для каждой точки выполняют трижды.

После доведения калибровочных проб дистиллированной водой до объёма 100 мкл (0,1 мл) во все пробирки добавляют по 5,0 мл рабочего раствора Кумасси голубого и содержимое пробирок тщательно перемешивают.

Пробы инкубируют 3 мин при комнатной температуре.

Оптическую плотность измеряют при длине волны 595 нм в кюветках из оптического стекла толщиной 10 мм против контроля. Кварцевые кюветки использовать не рекомендуется вследствие интенсивной адсорбции красителя на поверхности кварцевого стекла, что может существенно исказить результаты и обусловить сильный разброс экстинкций в параллельных пробах. Можно использовать кюветки из полистирола.

По полученным данным строят калибровочную кривую.

Таблица 6

Подготовка калибровочных проб для определения белка методом Бредфорд

№	Стандартный раствор альбумина (мкл)	Дистиллированная вода (мкл)	Количество белка в пробе (мг)	Рабочий раствор Кумасси голубого (мл)
Контроль	-	100	-	5,0
1	10	90	10	5,0
2	20	80	20	5,0
3	40	60	40	5,0
4	60	40	60	5,0
5	80	20	80	5,0
6	100	-	100	5,0

При определении концентрации белка в биологических образцах следует подобрать оптимальное разведение материала.

Обычно используют разведения от 1:10 до 1:1000. Для реакции в пробирку вносят 100 мкл разведенного дистиллированной водой материала и добавляют 5,0 мл рабочего раствора Кумасси голубого. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и пробу инкубируют при комнатной температуре в течение 3 мин. Развивающаяся окраска стабильна в течение 1 ч.

Оптическую плотность измеряют при длине волны 595 нм против контроля, где материал заменяют 100 мкл дистиллированной воды.

Концентрацию белка в пробах определяют по калибровочному графику с учетом разведения материала.

ЧАСТЬ II. БИОЭНЕРГЕТИКА КЛЕТКИ

ТЕМА: ГЛИКОЛИЗ

Раздел I. ПИРОВИНОГРАДНАЯ КИСЛОТА И АКТИВНОСТЬ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

МОТИВАЦИЯ:

В организме пировиноградная кислота является одним из центральных метаболитов и находится на перекрёстке нескольких метаболических путей. К наиболее важным реакциям обмена пирувата относятся аланинаминотрансферазная, лактатдегидрогеназная, реакции карбоксилирования, протекающие под действием пируваткарбоксилазы и НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы, а также реакция окислительного декарбоксилирования, катализируемая пируватдегидрогеназным комплексом.

Пировиноградная кислота является промежуточным продуктом углеводного обмена. В анаэробных условиях (гипоксия) пировиноградная кислота восстанавливается в молочную кислоту. В аэробных условиях пируват в результате окислительного декарбоксилирования превращается в ацетил-КоА, который в цикле Кребса окисляется до CO_2 и H_2O с образованием восстановленных эквивалентов и сопровождается субстратным синтезом АТФ. Полная утилизация 1-й молекулы пирувата сопровождается получением 15 молекул АТФ.

Методы количественного определения пировиноградной кислоты в тканях и сыворотке крови позволяют выявить нарушения углеводного обмена. Так, при авитаминозе и гиповитаминозе B_1 в крови и других тканях, особенно в мозге, накапливается большое количество пировиноградной кислоты и увеличивается её выделение с мочой.

Содержание пирувата возрастает при сахарном диабете, сердечной недостаточности, гиперфункции гипофизарно-адреналовой системы. Количество пировиноградной кислоты увеличивается после введения некоторых лекарств – камфоры, стрихнина, адреналина. При наркозе содержание пирувата в крови снижается.

Концентрация пирувата и в ещё большей мере соотношение пируват / лактат являются прогностическими признаками относитель-

ной кислородной недостаточности в ткани. Даже кратковременные физические нагрузки приводят к сдвигам этого соотношения в тканях.

Существует несколько методов количественного определения пировиноградной кислоты в тканях и биологических жидкостях, как энзиматических, так и колориметрических.

Реакцию окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты катализирует пируватдегидрогеназа (пируват-липоатоксидоредуктаза, КФ. 1.2.4.1), которая относится к числу наиболее сложных по своей структуре мультиэнзимных комплексов. Молекулярная масса комплекса, выделенного из различных источников (*E. coli*, сердце свиньи и др.), составляет величину порядка $(4-9) \cdot 10^6$. В состав комплекса входят три фермента, катализирующие последовательные этапы процесса окислительного декарбоксилирования пирувата (пируватдегидрогеназа, дегидролипоилтрансацилаза, дигидролипоилдегидрогеназа), а также коферментные формы 5 витаминов (ТПФ, ЛК, ФАД, НАД, КоА).

Строгая упорядоченность структуры пируватдегидрогеназного комплекса обеспечивает максимальную эффективность биохимических реакций и создаёт предпосылки для функционирования механизмов регуляции. Комплекс локализован исключительно в митохондриях и используется как маркёр этих субклеточных структур.

Скорость окисления пировиноградной кислоты контролируется одновременно несколькими регуляторными факторами – концентрацией ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} , неорганического фосфата, отношением окисленных и восстановленных форм пиридиновых нуклеотидов и т. д.

В физиологических условиях наиболее важна регуляция активности пируватдегидрогеназного компонента комплекса, который катализирует первый, наиболее медленный этап превращения пирувата. Изменение активности фермента происходит за счёт циклов фосфорилирования-дефосфорилирования. Химическая модификация осуществляется специфической киназой, фосфорилирующей ферментативный белок, и фосфатазой. Эти регуляторные ферменты вместе с функциональными компонентами составляют пируватдегидрогеназный комплекс.

Роль пируватдегидрогеназы в различных тканях животных неодинакова. В головном мозге окислительное декарбоксилирование пирувата является основным путём ввода окисляемых метаболитов (ацетил-КоА) в ЦТК и заметно преобладает над другими путями ме-

таболизма субстрата в митохондриях. Это доминирование сохраняется при различных функциональных состояниях, вплоть до экстремальных воздействий. Напротив, в митохондриях печени, сердца, почек активность пируватдегидрогеназы одного порядка с активностью аланинаминотрансферазы, пируваткарбоксилазы, НАДФ-малатдегидрогеназы, а при некоторых воздействиях значительно уступает им.

Для анализа активности пируватдегидрогеназы предложено несколько спектрофотометрических методов с использованием как естественного (НАД), так и искусственных (различные красители) акцепторов водорода, а также методы с использованием пирувата, содержащего радиоактивную метку (1^{14}C -пируват и др.).

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:

Познакомить студентов с методами количественного определения содержания пировиноградной кислоты и активности пируватдегидрогеназного комплекса в различных тканях: печени, мозге, мышцах, сыворотке крови, моче.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Пути образования и метаболизма пировиноградной кислоты.
2. Процессы окислительного декарбоксилирования пирувата.
3. Состав и особенности функционирования пируватдегидрогеназного комплекса.
4. Взаимосвязь обменов веществ на уровне пирувата.
5. Пути регулирования метаболизма пировиноградной кислоты.
6. Энергетический выход катаболизма пирувата до конечных продуктов.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Приготовить необходимые для работы реактивы.
2. Работать с центрифугой, фотоколориметром, аналитическими весами.
3. Построить калибровочный график.
4. Декапитировать крысу.
5. Получить сыворотку крови без следов гемолиза.
6. Извлечь ткань и гомогенизировать её в гомогенизаторе.
7. Провести дифференциальное центрифугирование с выделением фракции митохондрий.

8. С помощью предложенного метода определить количество пирувиноградной кислоты в полученных гомогенатах, сыворотке и моче.
9. Провести определение активности пируватдегидрогеназного комплекса.
10. Произвести правильный расчёт содержания пирувата в анализируемом биоматериале.
11. Обсудить полученные результаты и сделать выводы.

ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

1. Роль пирувиноградной кислоты в метаболизме углеводов, белков, жиров.
2. Механизм окислительного декарбоксилирования пирувата, основные ферменты и коферменты, участвующие в нём.
3. Назвать основные источники образования пирувата в тканях.
4. Пути альтернативного использования цитозольного НАДН.
5. Каким образом происходит превращение пирувата в лактат, каков источник НАДН для этой реакции в цитозоле?
6. На каком принципе основан метод колориметрического определения содержания пирувата в тканях?
7. На каком принципе основан метод энзиматического определения содержания пирувата в тканях?
8. Каковы принципы составления реакционной среды для определения активности пируватдегидрогеназного комплекса?

Лабораторная работа 3

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ В ГОМОГЕНАТЕ МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Метод основан на образовании гидразона в результате взаимодействия пирувиноградной кислоты с динитрофенилгидразином. Образующийся гидразон в щелочной среде даёт окраску, интенсивность которой пропорциональна концентрации пирувата.

ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Центрифужные пробирки, центрифуга.
2. Микропипетка на 0,2 мл.

3. Пипетки на 1,0; 2,0 и 5,0 мл.
4. Химические пробирки с притёртыми пробками.
5. Мерные колбы на 25, 50 и 100 мл.
6. Фотоэлектроколориметр.

РЕАКТИВЫ:

1. Стандартный раствор пирувата. Сначала готовят основной стандартный раствор: 25 мг пировиноградной кислоты или 31,5 мг натриевой соли пирувата растворяют в 25,0 мл H_2O (1,0 мл раствора содержит 1 мг вещества). Из этого реактива готовят рабочий стандартный раствор: берут 1,0 мл и доводят водой до метки в мерной колбе на 100 мл.
2. 5 % и 20 % растворы ТХУ.
3. 0,1 % раствор 2,4-динитрофенилгидразина (2,4-ДФГ). 100 мг 2,4-ДФГ растирают в ступке с 20 мл концентрированной HCl , переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят до метки водой и хранят в холодильнике в тёмной бутылке.
4. Толуол.
5. 10 % раствор Na_2CO_3 .
6. 1,5 N раствор $NaOH$.

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ:

Для построения калибровочной кривой используют рабочий стандартный раствор пировиноградной кислоты (1,0 мл содержит 0,01 мг вещества). Калибровочные пробы для каждой точки выполняют трижды. Схема приготовления калибровочных проб и количественного определения пировиноградной кислоты представлена в таблице 7.

Таблица 7

Подготовка калибровочных проб для определения пирувиноградной кислоты в печени и мозге крыс

Проба	Рабочий стандарт пирувата (мл)	Количество пирувата в пробе (мкг)	H ₂ O (мл)	20 % ТХУ (мл)	5 % ТХУ (мл)	0,1 % 2,4-ДФГ (мл)
Контроль	–	–	2,0	2,0	1,0	1,0
1	0,1	1,0	1,9	2,0	1,0	1,0
2	0,2	2,0	1,8	2,0	1,0	1,0
3	0,4	4,0	1,6	2,0	1,0	1,0
4	0,6	6,0	1,4	2,0	1,0	1,0
5	0,8	8,0	1,2	2,0	1,0	1,0
6	1,0	10,0	1,0	2,0	1,0	1,0
7	1,2	12,0	0,8	2,0	1,0	1,0
8	1,4	14,0	0,6	2,0	1,0	1,0
9	1,8	18,0	0,2	2,0	1,0	1,0

В пробирки разливают 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,8 мл рабочего раствора пирувата и доводят объем жидкости в каждой пробе до 2,0 мл. В каждую пробирку добавляют по 2,0 мл 20 % раствора ТХУ, затем по 1,0 мл 5 % раствора ТХУ и по 1,0 мл 0,1 % раствора 2,4-ДФГ, оставляют в темноте на 20 мин. После инкубации добавляют по 4,0 мл толуола и встряхивают в течение 2 мин: от тщательности встряхивания зависит конечный результат. Смесь в пробирке расслаивается. Для быстрого и лучшего расслоения фаз на этом и последующем этапах методики рекомендуется центрифугирование смеси при 3000 об/мин в течение 10 мин. Нижний водный слой отсасывают и выливают. К толуоловым экстрактам (верхний слой) добавляют по 4,0 мл 10 % раствора Na₂CO₃ и встряхивают в течение 5 мин. Расслоение фаз смеси достигается ее центрифугированием. В щелочной среде гидразон переходит в водную фазу (нижний слой), 3,0 мл которой переносят в чистую пробирку. К водно-щелочному экстракту, окрашенному в желтый цвет (более или менее темный в зависимости от количества гидразона), прибавляют 3,0 мл 1,5 N раствора NaOH. Появляется красно-розовое окрашивание, которое измеряют на ФЭЖе

при зелёном светофилтре (длина волны 530 нм) в кювете с длиной хода луча 1 см против контроля.

По результатам измерений высчитывают среднее значение из 3-х определений экстинкции для каждой точки. По средним строят калибровочную кривую. На оси ОХ откладывают значения концентрации пирувата в стандартных пробах, на оси ОУ – соответствующие значения экстинкции.

ХОД АНАЛИЗА:

Навеску мозга 300 мг или печени 500 мг растирают на холоде с 2,0 мл 20 % раствора ТХУ. Ставят на лёд на 10 мин для более полного осаждения белков. Затем центрифугируют в течение 10–15 минут. Собирают супернатант (1). К осадку приливают 1,0 мл холодной 5 % ТХУ, перемешивают и снова центрифугируют. Надосадочную жидкость (2) переносят к 1-му надосадку.

К центрифугату (1+2) прибавляют 1,0 мл 0,1 % раствора 2-4-ДФГ и ставят в темноту на 20 минут. Затем добавляют 4,0 мл толуола и встряхивают в течение 2 мин. Жидкость расслаивается. Нижний водный слой отсасывают и выливают. К толуоловому экстракту добавляют точно 4,0 мл 10 % раствора Na_2CO_3 . Пробирку встряхивают в течение 5 мин, затем жидкости дают расслоиться. В щелочной среде гидразон переходит в водный раствор. Водно-щелочной экстракт, окрашенный в желтый цвет, более или менее тёмный в зависимости от количества гидразона, переносят в количестве 3,0 мл в чистую пробирку, прибавляют 3,0 мл 1,5 N раствора NaOH, перемешивают. Появляется красно-розовое окрашивание, интенсивность которого измеряют на ФЭКе при зелёном светофилтре (длина волны 530 нм) против контроля. Содержание пиروиноградной кислоты определяют согласно калибровочному графику и выражают в мкг на г ткани.

Лабораторная работа 4

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ

ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Микropипетка на 0,2 мл, сменные наконечники.
2. Химические пробирки с притертыми пробками.
3. Центрифужные пробирки, центрифуга.
4. Мерные колбы на 25, 50 и 100 мл.

5. Пипетки на 1,0 мл, 2,0 мл и 5,0 мл.
6. Фотоэлектроколориметр или спектрофотометр.

РЕАКТИВЫ:

1. 0,1 % раствор 2,4-ДФГ. Для приготовления раствора 100 мг 2,4-ДФГ растирают в ступке с 20,0 мл концентрированной HCl, переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят до метки водой и хранят в холодильнике в тёмной бутылке.
2. Основной раствор пировиноградной кислоты (содержит 0,5 мг пировиноградной кислоты в 1,0 мл). Для приготовления этого раствора отвешивают 50 мг пировиноградной кислоты или 62,5 мг натриевой соли пирувата, растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл. Перед употреблением из основного раствора пирувата готовят рабочий раствор пирувата разведением в 10 раз (содержит 50 мкг пировиноградной кислоты в 1,0 мл).
3. 25 % раствор КОН в этиловом спирте.

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ:

Для построения калибровочной кривой используют рабочий стандартный раствор пировиноградной кислоты. Схема приготовления калибровочных проб для определения в них содержания пирувата представлена в таблице 8. Калибровочные пробы для каждой точки выполняют трижды.

Таблица 8

Подготовка калибровочных проб для определения пировиноградной кислоты в моче

Проба	Рабочий стандарт пирувата (мл)	Количество пирувата в пробе (мкг)	H ₂ O (мл)	25 % КОН (мл)	0,1 % 2,4-ДФГ (мл)
Контроль	–	–	2,0	1,0	1,0
1	0,1	5	1,9	1,0	1,0
2	0,2	10	1,8	1,0	1,0
3	0,4	20	1,6	1,0	1,0
4	0,6	30	1,4	1,0	1,0
5	0,8	40	1,2	1,0	1,0
6	1,0	50	1,0	1,0	1,0

Для построения калибровочной кривой в пробирки согласно таблице последовательно наливают рабочий стандартный раствор пировиноградной кислоты или натриевой соли пирувата и доводят объём жидкости в каждой пробе до 2,0 мл. В каждую пробирку добавляют по 1,0 мл 25 % раствора КОН, перемешивают и инкубируют в темноте 15 мин.

По окончании инкубации пробы фотометрируют на ФЭКе с синим светофильтром в кюветах на 0,5 см против контроля.

При построении калибровочной кривой на оси ординат указывают величину оптической плотности (ΔE), найденную как среднее арифметическое из трёх параллельных определений, а на оси абсцисс – соответствующее ей содержание пировинограднокислого натрия в микрограммах.

ХОД РАБОТЫ:

Манипуляции с контрольной и опытной пробами проводят одновременно. Абсолютно необходимым условием является работа только с сухими пипетками и пробирками. Берут две пробирки, в контрольную наливают 1,0 мл воды, а в опытную – 1,0 мл мочи. В обе пробирки приливают по 1,0 мл 20 % спиртового раствора КОН, перемешивают точно 1 мин. Затем приливают по 0,5 мл 0,1 % раствора 2,4-ДФГ, перемешивают и оставляют стоять 15 мин при комнатной температуре. Фотометрируют опытную пробу на ФЭКе (против контроля на реактивы) в кюветах 0,5 см с синим светофильтром.

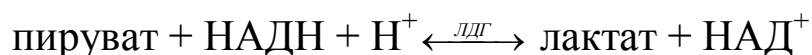
Содержание пировиноградной кислоты определяют по калибровочному графику, найденную величину умножают на суточный диурез (средняя величина для мужчин – 1500 мл, для женщин – 1200 мл) и получают содержание пирувата в суточной моче. За сутки с мочой выделяется 10–25 мг пировиноградной кислоты – от 113,7 до 283,9 мкМ/сут.

Лабораторная работа 5

ЭНЗИМАТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРУВАТА В ТКАНЯХ МОЗГА, ПЕЧЕНИ, СЕРДЦА КРЫС МЕТОДОМ ЦОКА И ЛАМПРЕХТА

ПРИНЦИП МЕТОДА:

В присутствии лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) пируват восстанавливается до лактата согласно реакции:



Количество использованного в реакции пирувата эквивалентно количеству НАДН·Н, убыль которого регистрируют спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические весы.
2. Центрифужные пробирки.
3. Микропипетки на 0,2 и 0,05 мл, сменные наконечники.
4. Пипетки на 1,0 и 2,0 мл.
5. Ледяная баня.
6. Мерные колбы на 25, 50 и 100 мл.
7. Спектрофотометр.
8. Центрифуга.

РЕАКТИВЫ:

1. 0,6 М раствор хлорной кислоты (ex tempore!).
2. 5 М раствор K_2CO_3 .
3. 0,5 М триэтаноламиновый буфер (рН 7,6) с 5 мМ ЭДТА, готовят накануне эксперимента, перед использованием контролируют значение рН.
4. 6 мМ раствор НАДН (ex tempore!).
5. Раствор лактатдегидрогеназы. Препарат лактатдегидрогеназы, хранящийся в холодильнике, разводят бидистиллированной водой так, чтобы полученный раствор содержал около 0,5 мг ферментного белка в 1,0 мл.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

Навеску свежей (или замороженной в жидком азоте, жидком воздухе) ткани мозга, печени, сердца (около 300 мг) помещают в цен-

трифужную пробирку, стоящую во льду, куда предварительно налито 2,0 мл 0,6 М HClO_4 . Пробу перемешивают, добавляют перхлорную кислоту до общего соотношения 9:1 (9,0 мл кислоты на 1 г ткани) и оставляют во льду на 15 мин для более полной экстракции пирувата. Осажденные белки отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин. Безбелковую надосадочную жидкость переносят в центрифужную пробирку и удаляют избыток хлорной кислоты добавлением 0,2 мл 5 М раствора K_2CO_3 . Пробу перемешивают и оставляют на 10 мин во льду для более полного осаждения перхлората калия, после чего осадок отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин или фильтрованием. Нейтрализованный таким образом безбелковый экстракт нагревают до комнатной температуры и используют для проведения ферментативной реакции.

В кювету спектрофотометра (1 см) наливают 1,2 мл триэтаноламинового буфера и 0,8 мл тканевого экстракта. Пробу перемешивают и устанавливают «нуль» спектрофотометра. Затем в кювету вносят 0,05 мл раствора НАДН, снова перемешивают и измеряют исходное значение оптической плотности – E_1 . После этого к пробе добавляют 0,05 мл препарата лактатдегидрогеназы, перемешивают и через 5–10 мин после прекращения ферментативной реакции, о которой судят по установившейся величине оптической плотности, измеряют величину E_2 .

Чтобы учесть изменение оптической плотности пробы, связанное с добавлением ферментативного белка, к одной из проб после окончания лактатдегидрогеназной реакции добавляют еще 0,05 мл препарата фермента, перемешивают и сразу измеряют оптическую плотность (E_3).

Содержание пирувиноградной кислоты (в мкмольях на 1 г ткани) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{\Delta E \cdot V \cdot K}{6,22}, \text{ где:}$$

ΔE – изменение оптической плотности пробы в ходе ферментативной реакции восстановления пирувата, $\Delta E = (E_1 - E_2) - (E_3 - E_2)$;

V – конечный объём пробы в кювете (2,1 мл);

6,22 – коэффициент микромолярной экстинкции восстановленной формы пиридиннуклеотидов при длине волны 340 нм и кювете шириной 1 см;

K – коэффициент разведения по отношению к 1 г ткани (здесь – 12,44).

РАСЧЁТ КОЭФФИЦИЕНТА РАЗВЕДЕНИЯ:

Расчёт коэффициента разведения проводят следующим образом. При осаждении тканевых белков к 1 г ткани добавлено 9,0 мл хлорной кислоты. Учитывая, что среднее содержание воды в тканях составляет 75 %, 1 г ткани соответствует 9,75 мл кислого экстракта. Для нейтрализации кислого экстракта в пробу добавлено 0,2 мл K_2CO_3 , т.е. объем нейтрализованного экстракта, соответствующий 1 г ткани, составляет 9,95 мл. На определение взято 0,8 мл нейтрализованного экстракта, что соответствует 80,4 мг ткани. Следовательно, коэффициент разведения по отношению к 1 г ткани составляет $1:0,0804=12,44$.

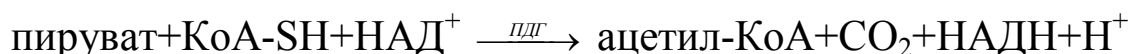
Описанный энзиматический метод количественного определения пирувата достаточно прост, хорошо воспроизводится и позволяет обнаруживать до 0,005 мкмоль пирувата в пробе. С помощью этого метода получены данные (средние из 20–25 определений) по содержанию пирувата в тканях крыс (мкмоль на 1 г): головной мозг – $0,152 \pm 0,018$, печень – $0,101 \pm 0,012$, сердце – $0,142 \pm 0,015$, почки – $0,126 \pm 0,015$.

Лабораторная работа 6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА В МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Метод Линна и соавторов основан на способности пируватдегидрогеназного комплекса осуществлять окислительное декарбоксилирование пирувата с одновременным восстановлением НАД по схеме:



Скорость накопления в инкубационной среде восстановленной формы НАД, измеряемая при длине волны 340 нм, отражает скорость окисления субстрата и служит мерой активности ферментативного комплекса.

ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Пластиковые центрифужные пробирки.
2. Микропипетки на 0,2 и 0,05 мл.
3. Пипетки на 1,0 и 2,0 мл.
4. Ледяная баня.
5. Мерные колбы на 25, 50 и 100 мл.
6. Спектрофотометр.
7. Центрифуга.
8. Гомогенизатор.

РЕАКТИВЫ:

1. 0,01 М фосфатный буфер (рН 7,5) для выделения митохондрий (см. описание в Приложении)
2. Тритон X-100.
3. 70 мМ трис-НС1 буфер (рН 8,0) (см. описание в Приложении).
4. 0,1 % раствор коэнзима А (M=767,5) на 70 мМ трис-НС1 буфере (рН 8,0) готовят *ex tempore*, непосредственно перед спектрофотометрированием.
5. Инкубационная среда для проведения ферментативной реакции, с содержанием компонентов в расчёте на 1 пробу объёмом 1,8 мл:

Буфер трис-НС1	140 мкмоль	(Mm=121,14 – гидроксиметил)
Пируват натрия	5 мкмоль	(Mm=110,0)
MgCl ₂ * 6H ₂ O	20 мкмоль	(Mm=203,3)
Тиаминпирофосфат	2 мкмоль	(Mm=460,8 – хлорид)
НАД	2 мкмоль	(Mm=663,4; 705,4 – соль Li)
Меркаптоэтанол	5 мкмоль	(Mm=78,1)
ЭДТА	1 мкмоль	(Mm=292,2; 372,3 – соль Na ₂)

Инкубационную среду готовят *ex tempore!* (перед спектрофотометрированием); меркаптоэтанол (HSCH₂CH₂OH) можно заменить другим SH-реагентом, например дитиотриэтолом (HSCH₂CHONCHONCH₂SH, Mm=154,3).

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

Для анализа берут навеску исследуемой ткани 1 г и гомогенизируют в четырёхкратном объёме 0,01 М фосфатного буфера. Выделяют митохондрии из гомогената с помощью дифференциального цен-

трифугирования (см. описание в Части I). Осадок митохондрий подвергают трёхкратному замораживанию-оттаиванию для того, чтобы разрушить субклеточные частицы и обеспечить максимальную доступность субстрата и кофакторов для фермента. (Альтернативный вариант – однократное замораживание-оттаивание с добавлением детергента Тритон X-100, что меньше повреждает белковые структуры). После окончания этой процедуры пробы центрифугируют 25 мин при 18000–20000 об/мин.

Для проведения ферментативной реакции в кювету спектрофотометра шириной 1 см наливают 1,8 мл инкубационной среды, добавляют 0,1 мл митохондриального препарата, размешивают и устанавливают щель прибора. Реакцию начинают внесением в кювету 0,1 мл раствора коэнзима А. Изменение оптической плотности пробы, вызванное образованием восстановленной формы НАД, регистрируют при длине волны 340 нм через каждые 15 сек в течение 2 мин. Параллельно с проведением ферментативного анализа в той же суспензии митохондрий методом Лоури или микробиуретовым методом определяют количество белка, что необходимо для дальнейших расчётов.

Активность пируватдегидрогеназы (нмоль НАДН/мин на 1 мг белка) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{\Delta E \cdot V}{6,22 \cdot a} \text{ , где:}$$

ΔE – изменение оптической плотности пробы за 1 мин;

V – конечный объем пробы в кювете (2,0 мл);

6,22 – коэффициент микромолярной экстинкции восстановленной формы

пиридиновых нуклеотидов при длине волны 340 нм;

a – количество мг белка в пробе, определенное в той же суспензии митохондрий (методом Лоури и др.) параллельно с проведением ферментативного анализа.

Средние значения (из 8–10 определений) активности пируватдегидрогеназы (мкмоль НАДН/мин на 1 мг белка) в митохондриях различных тканей крыс составляют: кора больших полушарий мозга – $33,10 \pm 1,37$, стволовая часть мозга – $26,42 \pm 11,18$, печень – $10,49 \pm 1,15$, сердце – $23,74 \pm 2,02$.

Описанный метод определения активности пируватдегидрогеназы чувствителен и позволяет выявить активность ферментативного комплекса в 0,5–1,0 мг митохондриального белка. Однако необходимо иметь в виду, что результаты определения активности могут искажаться, если в тканевом препарате присутствует лактатдегидрогеназа. Кроме того, при анализе тканей с относительно низкой активностью пируватдегидрогеназы и высокой активностью митохондриальной лактатдегидрогеназы (например, печень) в качестве субстрата в инкубационную среду предпочтительнее вводить не пируват, а лактат лития. В подобных случаях активность пируватдегидрогеназного комплекса рекомендуется контролировать каким-либо другим методом. Так, очень удобен и хорошо воспроизводится метод оценки скорости окисления пирувата по скорости декарбоксилазной реакции (с использованием 2,6-дихлорфенолиндофенола в качестве искусственного акцептора электронов).

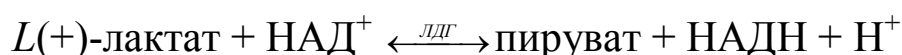
Раздел II. МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА И АКТИВНОСТЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

МОТИВАЦИЯ:

Молочная кислота является конечным продуктом гликолиза, протекающего в анаэробных условиях. Такие условия возникают в интенсивно работающей мышце, при гипоксии. В тканях животных молочная кислота играет особую роль в связи с тем, что этот субстрат представляет собой своеобразный метаболический тупик: основным путем обмена лактата является легко обратимая лактатдегидрогеназная реакция. Скорость других реакций образования или использования молочной кислоты несравненно ниже, чем скорость взаимопревращения лактата и пирувата. Таким образом, лактат можно рассматривать как тканевой резерв активно метаболизирующего пирувата.

Обратимость лактатдегидрогеназной реакции и высокая активность фермента позволяют паре субстратов лактат-пируват играть важную роль в контроле над отношением окисленных и восстановленных форм НАД. Существуют методы расчёта отношения $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ в цитоплазматическом компартменте клетки по содержанию лактата и пирувата в ткани.

При значениях рН, близких к нейтральным, равновесие катализируемой ферментом реакции



сдвинуто в сторону образования молочной кислоты и НАД⁺. При недостатке кислорода образующийся НАДН реокисляется не за счёт O₂ в митохондриях, куда НАДН попадает через митохондриальные водород-переносящие шунты, а за счёт пирувата, восстанавливающегося с помощью лактатдегидрогеназы в лактат. Это приводит к повышению концентрации лактата.

Повышение уровня молочной кислоты в крови может иметь место при некоторых патологических состояниях, если в отдельных органах и тканях создаются условия гипоксии и нарушается утилизация пирувата в цикле трикарбоновых кислот.

Для определения количества молочной кислоты в тканях животных и биологических жидкостях существуют колориметрические методы, однако более простыми, чувствительными и быстрыми являются энзиматические.

Лактатдегидрогеназа (L-лактат: НАД оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.27) относится к числу наиболее активных ферментов, осуществляющих окислительно-восстановительные превращения.

Фермент выделен в кристаллическом виде из многих источников и хорошо изучен. Молекулярная масса его около 140000. Лактатдегидрогеназа – тетрамер, состоящий из 2-х типов неидентичных субъединиц (Н- и М-типа). Разные сочетания субъединиц объясняют существование 5 изоферментов, отличающихся по своим электрофоретическим и другим свойствам и по величине K_M для субстратов. Изоферментный спектр лактатдегидрогеназы в разных тканях различен, соотношение отдельных изоферментов может изменяться при экспериментальных воздействиях и патологии.

Лактатдегидрогеназа локализована преимущественно в цитоплазматической фракции, однако в ряде тканей фермент обнаружен и на внешней мембране митохондрий. Доля митохондриального фермента в общей лактатдегидрогеназной активности в большинстве тканей не превышает 1 %, а в мозге может достигать 5–7 %.

Методы определения активности лактатдегидрогеназы основаны на использовании как естественных, так и искусственных акцепторов водорода.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:

Познакомить студентов с методами определения лактатдегидрогеназной активности тканей и количественного определения молочной кислоты, величина содержания которой является прогностиче-

ским признаком относительной кислородной недостаточности в тканях организма. Показать, что кратковременные физические нагрузки приводят к увеличению содержания молочной кислоты в скелетных мышцах и других тканях организма (печень, мозг, сердце, кровь).

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Стадии гликолиза.
2. Характеристика ферментов гликолиза.
3. Лактатдегидрогеназа и её изоферменты.
4. Обратимость реакций гликолиза, глюконеогенез.
5. Энергетическая составляющая процессов гликолиза.
6. Субстратное фосфорилирование.
7. Метаболиты, на уровне которых осуществляется взаимосвязь гликолиза с другими процессами обмена веществ.
8. Биологический смысл этапов гликолиза.
9. Регуляция процессов гликолиза, уровни регуляции.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Приготовить необходимые реактивы.
2. Декапитировать крысу.
3. Извлечь ткань, приготовить в гомогенизаторе её гомогенат.
4. Работать с центрифугой, ФЭКом, аналитическими весами.
5. Освоить этапы предложенной методики, получить результаты количественного анализа содержания лактата в пробе и произвести их подсчёт.
6. Обсудить результаты работы и сделать выводы.

ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

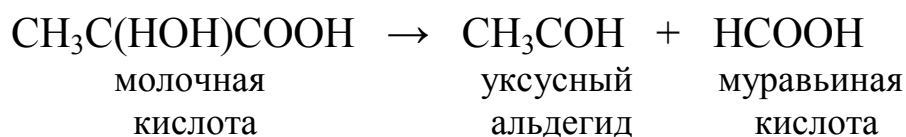
1. В каких компартментах клетки локализованы реакции гликолиза?
2. Какие продукты образуются в результате:
 - а) гликолиза?
 - б) аэробных процессов?
3. Назовите факторы, приводящие к накоплению молочной кислоты в тканях.
4. Почему аэробные процессы в клетке тормозят гликолиз?
5. Как осуществляется регуляция интенсивности гликолиза?
6. В чём заключается принцип метода определения количества молочной кислоты?

Лабораторная работа 7

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ГОМОГЕНАТАХ ТКАНЕЙ КРЫС

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Молочная кислота при нагревании с концентрированной серной кислотой переходит в ацетальдегид, дающий с пара-оксидифенилом характерную окраску, интенсивность которой пропорциональна концентрации ацетальдегида.



ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Центрифужные пробирки, центрифуга.
2. Широкие пробирки.
3. Микропипетки.
4. Пипетки на 1,0 мл и 2,0 мл.
5. Капельница, стеклянные палочки.
6. ФЭК.
7. Инструменты для забоя животного и взятия проб биологического материала.

РЕАКТИВЫ:

1. 5 % и 10 % раствор ТХУ.
2. 4 % и 20 % раствор CuSO_4 .
3. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ в виде тонко измельченного порошка CaO .
4. 5 % раствор KOH .
5. 1,5 % раствор п-оксидифенила в 0,5 % растворе KOH . Взвешивают 150 мг п-оксидифенила и растворяют в 2,0 мл 5 % раствора KOH , доводят объем дистиллированной водой до 10,0 мл – раствор стоек 1–2 месяца.
6. 0,9 % раствор NaCl .
7. H_2SO_4 марки ХЧ по Савалю (удельный вес 1,84).
8. Стандартный раствор молочной кислоты. Сначала готовят основной стандартный раствор, для чего отвешивают на аналитических весах 60,6 мг молочно-кислого лития и растворяют в 50,0 мл H_2O (содержит 1,0 мг молочной кислоты в 1,0 мл). Из него

готовят рабочий стандартный раствор, для чего берут 1,0 мл основного раствора и доводят его водой до метки в мерной колбе на 100 мл.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА:

Приготовление гомогената и экстракция белков ткани мозга или печени: навеску ткани (500 мг) растирают на холоде с 3,0 мл 5 % раствора ТХУ. Гомогенат помещают на 30 мин в холодильник для лучшего экстрагирования белков, затем центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин.

Приготовление гомогената и экстракция белков мышечной ткани: бедренные мышцы помещают в чашку Петри, находящуюся на льду. Ткань по возможности тщательно освобождают от связок, жира и измельчают ножницами. Взвешивают 500 мг измельченной ткани и на холоде растирают с 3,0 мл 10 % ТХУ. Гомогенат помещают на 30 мин в холодильник для лучшей экстракции белков, затем центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин.

Приготовление гомогената и экстракция белков ткани сердца: ткань миокарда помещают в охлажденный 0,9 % раствор NaCl, освобождая её от крови, подсушивают фильтровальной бумагой. Взвешивают 500 мг ткани и растирают на холоде с 3,0 мл 5 % раствора ТХУ. Гомогенат помещают на 30 мин в холодильник для лучшего экстрагирования белков. Затем центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин.

Приготовление гомогената и экстракция белков крови: в центрифужную пробирку, содержащую 0,5 мл дистиллированной воды, помещают 0,2 мл крови. Микропипетку тщательно промывают той же водой. Содержимое пробирки перемешивают и к гемолизату добавляют 3,0 мл 10 % раствора ТХУ. Пробу ставят на 10 мин на лёд для лучшего осаждения белка, а затем центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин.

ХОД РАБОТЫ:

Для осаждения углеводов 1,0 мл гомогената (для всех тканей) помещают в центрифужную пробирку, добавляют 0,5 мл 20 % раствора сульфата меди, 4,0 мл дистиллированной воды и 0,5 г тонко растёртого порошка гидроксида кальция. Пробу тщательно перемешивают стеклянной палочкой, и развивается голубое окрашивание.

Если окраска зелёная, то пробы отбрасываются. В таком случае перед повторением исследования в первую очередь следует проверить качество реактива гидроокиси кальция.

Пробы помещают в холодильник на 30 мин (можно оставить на 24 ч) для более полного осаждения углеводов, а затем центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин. В чистую сухую широкую химическую пробирку переносят 0,5 мл прозрачного бесцветного супернатанта. Погрузив пробирки в ледяную баню, очень осторожно по стенке настилают 3,0 мл концентрированной H_2SO_4 , затем перемешивают стеклянной палочкой. Далее в пробирки добавляют каплю (0,05 мл) 4 % раствора $CuSO_4$, всё перемешивают. После этого пробирки помещают в кипящую водяную баню на 5 мин, при этом молочная кислота превращается в ацетальдегид. Пробы охлаждают холодной водой до $20^\circ C$, добавляют одну каплю (0,05 мл) 1,5 % раствора пара-оксидифенила (недостаточное охлаждение пробирок ведёт к снижению результатов), содержимое пробирок тщательно встряхивают. Затем пробирки помещают в термостат при $37^\circ C$ на 30 мин, периодически встряхивая. В пробирках развивается голубое окрашивание. Далее пробы помещают в кипящую водяную баню на 90 сек. За это время голубая окраска раствора переходит в устойчивую фиолетовую окраску, а непрореагировавший пара-оксидифенил разрушается.

Если после добавления пара-оксидифенила образуется зелёное окрашивание, то следует заменить гидроокись кальция или CaO . Пробирку охлаждают в холодной воде до $20^\circ C$. Пробу фотометрируют против концентрированной серной кислоты при длине волны 574 нм (красный светофильтр).

Параллельно с опытной пробой готовят контрольную и стандартную пробы. В контрольную вносят 5,0 мл дистиллированной воды, а в стандартную – 5,0 мл стандартного раствора молочно-кислого лития. Затем обе пробы обрабатываются, как и опытные (добавляют 0,5 мл 20 % раствора $CuSO_4$, 0,5 г тонко растертого порошка CaO и т. д.). Из показателей экстинкции опытной пробы вычитают показания экстинкции контрольной пробы.

РАСЧЁТ:

Концентрацию лактата в исследуемой ткани определяют по калибровочной кривой или по формуле:

$$X(\text{мг} / \text{г} \cdot \text{ткани}) = \frac{(E_o - E_k) * 0,05}{(E_{cm} - E_k) * m}, \text{ где:}$$

X – концентрация молочной кислоты в пробе;
E_o – экстинкция опытной пробы;
E_к – экстинкция холостой пробы;
E_{ст} – экстинкция стандартного раствора;
m – масса навески в граммах;
0,05 – количество миллиграммов молочной кислоты в стандартном растворе.

Для определения содержания лактата в крови используют формулу:

$$X(\text{мг} / \text{л}) = \frac{C_{\text{к}} * 1000}{V_{\text{кр}}}, \text{ где:}$$

X – концентрация лактата в исследуемой пробе;
C_к – концентрация лактата по калибровке в мг;
V_{кр} – объём крови, взятой для анализа в мл;
1000 – перерасчёт на 1,0 л крови.

Лабораторная работа 8

ЭНЗИМАТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ГОМОГЕНАТАХ ТКАНЕЙ КРЫС

ПРИНЦИП МЕТОДА:

В присутствии лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) молочная кислота переходит в пировиноградную, полному окислению лактата содействует связывание образующегося пирувата в реакции с гидразин-глициновым буфером:



Образование восстановленной формы НАД, эквимольное количеству окисленного лактата, регистрируют спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Центрифужные пробирки, центрифуга.
2. Микропипетка на 0,05 мл со сменными наконечниками.
3. Пипетки на 1,0, 2,0 и 5,0 мл.
4. Мерные колбы, стаканы, стеклянные палочки.
5. Ледяная баня.

6. Спектрофотометр.
7. Инструменты для забоя животного и взятия проб биологического материала.

РЕАКТИВЫ:

1. 6 % раствор HClO_4 , ex tempore!
2. 5 М раствор K_2CO_3 .
3. 0,2 % раствор натриевой соли ЭДТА ($M_m=372,3$).
4. Гидразин-глициновый буфер (рН 9,5): 0,4 М гидразин ($M_m=32$), 1 М глицин ($M_m=75,1$), готовят на 0,2 % растворе натриевой соли ЭДТА.
5. $5 \cdot 10^{-2}$ М раствор НАД ($M_m=663, 4$; соль Li – $M_m=705,4$), ex tempore! (навеску разводят непосредственно перед употреблением).
6. Раствор лактатдегидрогеназы (хранящийся в холодильнике препарат фермента перед употреблением разводят бидистиллированной водой так, чтобы содержание белка составляло около 5,0 мг/мл).

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

Навеску замороженной в жидком азоте и растёртой ткани (около 250–300 мг) помещают в центрифужную пробирку, находящуюся во льду, куда предварительно налит 1,0 мл 6% HClO_4 . После перемешивания к пробе добавляют HClO_4 до конечного соотношения 1:4 (на 1 г ткани 4,0 мл кислоты), ещё раз тщательно перемешивают и оставляют на 10 мин во льду. Осадок белка отделяют центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин. Для удаления избытка хлорной кислоты к надосадочной жидкости, не содержащей белка, добавляют 5 М K_2CO_3 из расчета 0,05 мл на 1,0 мл пробы, перемешивают и помещают на лёд до полного прекращения выделения CO_2 . Осадок перхлората калия отделяют фильтрованием или центрифугированием в течение 5 мин при 3000 об/мин. Для проведения энзиматической реакции берут 0,2 мл нейтрализованного тканевого экстракта, предварительно нагретого до комнатной температуры.

В кювету спектрофотометра (1 см) наливают 2,2 мл инкубационной среды, состоящей из 2,0 мл гидразин-глицинового буфера и 0,2 мл раствора НАД; добавляют 0,2 мл нейтрализованного тканевого экстракта и измеряют исходную величину оптической плотности (E_{11}) при длине волны 340 нм. Щель прибора при этом устанавливают по

гидразин-глициновому буферу. К пробе добавляют 0,05 мл раствора лактатдегидрогеназы, перемешивают и после окончания ферментативной реакции измеряют конечное значение оптической плотности (E_2). Об окончании реакции судят по прекращению нарастания оптической плотности пробы. Обычно время протекания реакции составляет 3–5 мин и зависит от активности использованного препарата лактатдегидрогеназы.

Для внесения поправки на изменение оптической плотности, связанное с добавкой ферментного препарата, в контроль вместо 0,2 мл тканевого экстракта вносят 0,2 мл воды, проводят аналогичные измерения и получают E_k .

Содержание лактата (в мкмольях на 1 г ткани) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{\Delta E V K}{6,22}, \quad \text{где:}$$

$\Delta E = (E_2 - E_1) - E_k$ – изменение оптической плотности пробы за время реакции

V – конечный объем пробы (2,45);

6,22 – коэффициент микромолярной экстинкции восстановленной формы пиридиновых нуклеотидов при длине волны 340 нм;

K – фактор разведения пробы по отношению к 1 г ткани, в данном случае равен 22,5 (расчёт фактора разведения приведён при описании метода количественного определения пирувата в лабораторной работе 5).

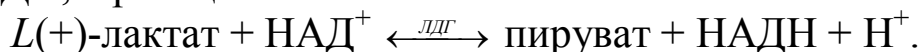
Описанный метод высокоспецифичен, достаточно прост, даёт хорошо воспроизводимые результаты. С помощью этого метода получены данные (средние из 20–25 определений) по содержанию молочной кислоты в тканях взрослых крыс (мкмоль на 1 г ткани): головной мозг – $1,41 \pm 0,23$, печень – $1,83 \pm 0,40$, сердце – $2,01 \pm 0,47$, почки – $1,65 \pm 0,39$.

Лабораторная работа 9

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ГОМОГЕНАТАХ ТКАНЕЙ КРЫС МЕТОДОМ БЕРГМЕЙЕРА

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Активность лактатдегидрогеназы оценивается по скорости окисления НАДН, в реакции



Скорость регистрируется спектрофотометрически по убыли величины оптической плотности при длине волны 340 нм (можно использовать 366 нм).

ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Пластиковые центрифужные пробирки.
2. Микропипетка на 0,05 мл со сменными наконечниками.
3. Пипетки на 1,0, 2,0 и 5,0 мл.
4. Мерные колбы, стаканы, стеклянные палочки.
5. Ледяная баня.
6. Скоростная центрифуга.
7. Спектрофотометр.
8. Секундомер.
9. Инструменты для забоя животного и взятия биологических проб.

РЕАКТИВЫ:

1. 0,05 М К-фосфатный буфер, рН 7,5 (см. буфер в Приложении).
2. $3 \cdot 10^{-4}$ М раствор пирувата натрия на 0,05 М калий-фосфатном буфере рН 7,5 (ex tempore!).
3. $9 \cdot 10^{-3}$ М раствор НАДН (ex tempore!), непосредственно перед проведением спектрофотометрического анализа.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

Для определения берут 0,5 г ткани. Субклеточные фракции получают методом дифференциального центрифугирования (см. описание в Части I), используя сахарозную или солевую среду выделения. Определение проводят в гомогенате ткани, цитоплазматической фракции или суспензии митохондрий.

В кювету спектрофотометра (1 см) наливают инкубационную среду, состоящую из 3,0 мл калий-фосфатного буфера с содержанием

пирувата, и 0,05 мл раствора НАДН. Затем вводят 0,1 мл образца, содержащего фермент, быстро перемешивают и измеряют исходную величину оптической плотности (E_1). Регистрацию показаний спектрофотометра проводят с интервалом 30 сек в течение 3–5 мин и рассчитывают среднее значение изменения оптической плотности пробы за 1 мин.

Лактатдегидрогеназа – очень активный фермент, поэтому предварительно необходимо подобрать соответствующее разведение анализируемых образцов. Например, цитоплазматическую фракцию, полученную из 10%-го гомогената печени крыс после осаждения ядер и митохондрий, следует развести (бидистиллированной водой или калий-фосфатным буфером) в 30–50 раз. Оптимальное разведение препарата такое, при котором $\Delta E/\text{мин}$ при длине волны 340 нм составляет 0,04–0,08.

Активность лактатдегидрогеназы (мкмоль НАДН/мин на 1 мг белка) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{\Delta E \cdot V}{6,22 \cdot a}, \text{ где:}$$

ΔE – среднее значение изменений оптической плотности пробы в ходе ферментативной реакции за 1 мин;

V – конечный объём пробы в кювете (3,15 мл);

6,22 – коэффициент микромолярной экстинкции восстановленной формы пиридиннуклеотидов при длине волны 340 нм и кювете шириной 1 см;

A – количество белка в пробе, определённое в параллельном образце методом Лоури или другим (мг).

Описанный метод определения активности ЛДГ высокоспецифичен, прост, даёт хорошо воспроизводимые результаты, используется при анализе активности фермента в различных тканевых препаратах и биологических жидкостях. Средние значения (из 81–10 определений) активности ЛДГ в цитоплазматической фракции тканей крыс (нмоль НАДН/(мин·мгбелка)): головной мозг – 410 ± 52 , печень – 642 ± 81 , сердце – 1658 ± 110 , почки – 1210 ± 83 .

Раздел III. **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ГЛИКОЛИЗА**

МОТИВАЦИЯ:

Изучение активности различных реакций гликолиза позволяет не только судить об интенсивности процесса в целом, но также выявлять тот этап гликолиза, на уровне которого может происходить торможение окисления в условиях воздействия на организм фармакологических препаратов, токсинов и пр. При нарушении работы ферментных систем на промежуточных этапах гликолиза происходит накопление соответствующих промежуточных метаболитов, что даёт информацию о локализации повреждения.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:

Познакомить студентов с одним из методов оценки интенсивности гликолитических процессов по накоплению одного из промежуточных продуктов: фруктозо-1,6-дифосфата.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Реакции гликолиза.
2. Локализацию гликолиза в клетке.
3. Лимитирующие стадии гликолиза.
4. Реакции гликолиза, которые могут быть обращены при глюконеогенезе.
5. Конечные продукты гликолиза в аэробных и анаэробных условиях.
6. Способы регуляции гликолиза.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Самостоятельно декапитировать крысу.
2. Извлечь ткань и приготовить гомогенат при помощи гомогенизатора.
3. Работать с аналитическими весами, центрифугой, фотоколориметром.
4. Рассчитать навески реактивов для приготовления необходимых растворов.
5. Построить калибровочный график для количественного определения фруктозы.

6. Определить количество фруктозо-1,6-дифосфата в гомогенатах тканей крысы.
7. Провести окончательный расчет содержания фруктозо-1,6-дифосфата в соответствующей ткани.
8. Обсудить полученные результаты и сформулировать выводы.

ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

1. В чём заключается принцип количественного метода определения фруктозо-1,6-дифосфата?
2. Почему при обращении реакций I стадии гликолиза происходит накопление фруктозо-1,6-дифосфата?
3. По изменению концентрации каких метаболитов обычно судят об активности гликолитического процесса?
4. Какие лимитирующие стадии гликолиза Вам известны?
5. Какова судьба продуктов превращения фруктозо-1,6-дифосфата:
3-фосфоглицеринового альдегид (3-ФГА) и 1,3-дифосфоглицериновой кислоты (1,3-диФГК)?
6. Как функционирует глицерофосфатный водородпереносящий шунт митохондрий?
7. В чём состоит отличие каталитических свойств ферментов гексокиназы и глюкокиназы? Охарактеризуйте ферменты I стадии гликолиза.
8. Что такое «аэробный гликолиз»?

Лабораторная работа 10

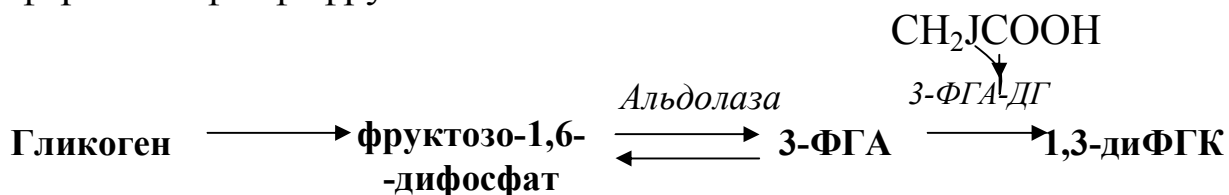
КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФРУКТОЗО-1,6-ДИФОСФАТА В ГОМОГЕНАТЕ ТКАНЕЙ КРЫС

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Об интенсивности гликолиза *in vitro* обычно судят по скорости убыли субстрата (гликогена, глюкозы) или по скорости прироста конечного продукта процесса – лактата.

Однако существует другой подход: используют специфические ингибиторы, которые останавливают гликолиз на определённой стадии, что сопровождается накоплением соответствующего промежуточного продукта. В предлагаемой работе применяется ингибитор – монойодуксусная кислота (монойодацетат), являющийся сульфгидрильным ядом. Этот ингибитор специфически угнетает активность

дегидрогеназы 3-фосфоглицеринового диальдегида (3-ФГА-ДГ). В результате действия ингибитора равновесие альдолазной реакции сдвигается влево и начинает накапливаться фруктозо-1,6-дифосфат. Это происходит вследствие необратимости предыдущего этапа гликолиза, на котором образуется фруктозо-1,6-дифосфат с участием фермента фосфофруктокиназы:



За ходом процесса следят по скорости накопления фруктозо-1,6-дифосфата в параллельных пробах: в присутствии и в отсутствии моноиодацетата. Количество фруктозо-1,6-дифосфата в пробах определяют по цветной реакции с резорцином, в результате которой образуется окрашенный продукт, обладающий максимумом поглощения при 510 нм.

В качестве источника ферментативной активности используют гомогенат печени, миокарда, скелетных мышц крысы либо безмитохондриальный супернатант, получаемый при центрифугировании гомогената тканей (10000–12000 g).

ОБОРУДОВАНИЕ:

Вся посуда для анализа должна быть тщательно вымыта с обязательным применением хромовой смеси.

1. Микropипетка на 0,2 мл, сменные наконечники.
2. Пипетки на 1,0; 2,0 и 5,0 мл.
3. Центрифужные пробирки, центрифуга с охлаждением, способная обеспечить центробежное ускорение 600 g и 900 g.
4. Мерные колбы на 25, 50 и 100 мл.
5. Сухо-воздушный термостат на +37° С.
6. Водяной термостат на +80° С.
7. Фотоколориметр или спектрофотометр.
8. Гомогенизатор, чашка Петри.
9. Инструменты для декапитации крысы и извлечения тканей.

РЕАКТИВЫ:

1. Фосфатный буфер 0,1 М (рН 7,4). Буфер готовят согласно таблице, указанной в Приложении.
2. ТХУ, 10 % раствор.

3. Гликоген, 0,5 % раствор на фосфатном буфере.
4. Резорцин, 0,1 % раствор в 95 % этаноле.
5. HCl концентрированная.
6. Стандартный раствор фруктозы 0,3 мМ (Mm=180,2).
7. Монойодусная кислота, 0,5 М раствор (Mm=186).

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ:

Для количественного определения фруктозо-1,6-дифосфата готовят ряд стандартных растворов, содержащих от 0,06 до 0,3 мМ фруктозы в пробе, по нижеследующей схеме (таблица 9). Из схемы следует, что объём всех проб для построения калибровочной кривой доводят дистиллированной водой до 1,0 мл.

Таблица 9

Подготовка калибровочных проб для определения фруктозо-1,6-дифосфата по стандартным разведениям фруктозы

№ проб стандартных растворов	Концентрация фруктозы в пробе, мМ	Объём стандартного раствора фруктозы, мл	Дистиллированная вода, мл
Слепая проба	–	–	1,0
1	0,06	0,2	0,8
2	0,12	0,4	0,6
3	0,18	0,6	0,4
4	0,24	0,8	0,2
5	0,3	1,0	–

Далее, во все пробы последовательно добавляют по 1,0 мл раствора резорцина и по 3,0 мл концентрированной HCl. СОЛЯНУЮ КИСЛОТУ НАБИРАТЬ В СТЕКЛЯННУЮ ПИПЕТКУ ТОЛЬКО С ПОМОЩЬЮ РЕЗИНОВОЙ ГРУШИ! Содержимое пробирок тщательно перемешивают после добавления каждого из ингредиентов, затем пробирки помещают на 8 мин в водяной термостат (температура +80° С). Точно по истечении времени инкубации пробирки извлекают из термостата, охлаждают и измеряют оптическую плотность окрашенных проб на фотоколориметре или спектрофотометре при

длине волны 510 нм против слепой пробы, где вместо фруктозы содержится дистиллированная вода.

На основе полученных результатов строят калибровочный график, представляющий собой зависимость оптической плотности окрашенного продукта от концентрации фруктозы в её стандартных растворах.

Если в исследуемом растворе определяют дифосфорное производное фруктозы, то измеренную в эксперименте оптическую плотность следует умножить на коэффициент 1,9. Это необходимо вследствие того, что интенсивность окраски фруктозодифосфата с резорцином составляет всего 52,5 % от окраски, развивающейся со свободной фруктозой.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГОМОГЕНАТА ИЗ ТКАНЕЙ КРЫСЫ:

Ткани для приготовления гомогената извлекают тотчас после декапитации животного. Все операции следует проводить при температуре не выше +4° С. Навески тканей: печень (250 мг), сердце (500 мг), скелетные мышцы (500 мг) тщательно измельчают ножницами и переносят в стакан гомогенизатора. Навеску ткани гомогенизируют 1–2 мин в 7 объёмах охлаждённого фосфатного буфера. Гомогенат центрифугируют (с охлаждением до +4° С) 10 мин при 600 g для осаждения неразрушенных клеток и ядерной фракции. Супернатант используют в качестве источника гликолитических ферментов. Для получения безмитохондриальной фракции первоначальный гомогенат центрифугируют 10 мин (с охлаждением до +4° С) при 10000 g.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

Анализ проводят по схеме, представленной в таблице 10:

После добавления ТХУ в пробы 2 и 3 их тщательно перемешивают и оставляют на 10 мин на холоде для более полного осаждения белков. Далее, все пробы центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10–15 мин или фильтруют для отделения коагулированного белка.

Для количественного определения фруктозо-1,6-дифосфата в исследуемом материале используется супернатант (ТХУ-фильтрат).

**Схема определения фруктозо-1,6-дифосфата
в гомогенате печени крыс**

Реагенты	Пробы		
	1	2	3
Раствор гликогена, мл	0,9	0,9	0,9
Раствор моноацетата, мл	–	0,1	–
H ₂ O, мл	0,1	–	0,1
Раствор ТХУ, мл	2,0	–	–
Гомогенат, мл	1,0	1,0	1,0
Все пробы инкубируют в течение 30 мин при температуре +37° С			
Раствор ТХУ, мл	–	2,0	2,0

В три чистые пробирки помещают по 1,0 мл супернатанта (ТХУ-фильтрата), полученного после обработки проб 1, 2 и 3 (на пробирки с помощью маркера наносят соответствующую нумерацию). Отдельно готовят слепую пробу: вместо 1,0 мл супернатанта берут 1,0 мл дистиллированной воды. Далее слепая проба обрабатывается параллельно с пробами 1, 2 и 3. Во все пробирки последовательно добавляют по 1,0 мл раствора резорцина и по 3,0 мл раствора концентрированной HCl. **СОБЛЮДАТЬ ОСТОРОЖНОСТЬ!** Пробы тщательно перемешивают и помещают точно на 8 мин в водяной термостат (температура +80° С). После охлаждения проб измеряют их оптическую плотность при длине волны 510 нм против слепой пробы.

С помощью калибровочного графика определяют количество фруктозо-1,6-дифосфата в пробах 1, 2 и 3.

Проба 1 показывает исходное (до начала инкубации *in vitro*) содержание фруктозо-1,6-дифосфата в исследуемой ткани. Проба 2 позволяет судить о количестве фруктозо-1,6-дифосфата, накапливающегося *in vitro* за период инкубации гомогената в присутствии моноацетата. Проба 3 показывает содержание фруктозо-1,6-дифосфата, образующегося *in vitro* за период инкубации гомогената в отсутствие моноацетата. Для вычисления прироста фруктозо-1,6-дифосфата в пробах 2 и 3 за период их инкубации *in vitro*, из полученных значений концентраций метаболита в пробах 2 и 3 вычитается его величина в пробе 1. Активность гликолитического процесса в пробах 2 и 3 выражают в ммоль фруктозо-1,6-дифосфата на 1 г ткани в час.

ТЕМА: БИОЭНЕРГЕТИКА МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

Раздел I. АКТИН СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

МОТИВАЦИЯ:

Актин – это белок мышечных фибрилл, его молекулярная масса равна 70 кД. Это один из белков, обеспечивающих биоэнергетику живой мышцы. Различают глобулярную форму белка, представляющую собой мономеры G-актина, которые содержат молекулу АТФ и ион Ca^{2+} . G-актин полимеризуется в нити F-актина, образуя фибриллярную форму. Молекулы F-актина существуют в виде линейных полимеров, свёрнутых в сверхспираль, напоминающую две нити бус, скрученных по оси относительно друг друга с шагом спирали 36,5 нм. Процесс перехода G-актина в F-актин сопровождается отщеплением неорганического фосфора АТФ. Этому переходу способствуют ионы металлов, например, калия, магния. F-актин легко образует комплекс с миозином, носящий название актомиозина. Актин и миозин – базис основных единиц миофиламентов.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:

Научиться выделять белок мышечных фибрилл – актин – из биологического материала (скелетные мышцы крыс).

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Строение и классификацию белков.
2. Основные и вспомогательные белки, участвующие в акте мышечного сокращения.
3. Структурные элементы миоцита.
4. Биохимию мышечной ткани.
5. Виды мышечной ткани.
6. Механизм сокращения мышечного волокна.
7. Источники энергии мышечной деятельности.
8. Регуляцию сокращения мышц.
9. Маркеры распада мышечной ткани.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Приготовить необходимые для работы реактивы.
2. Декапитировать крысу, правильно извлечь ткань мышц и приготовить биологический материал для исследования.

3. Работать с аналитическими весами, центрифугой, фотоколориметром (или спектрофотометром).
4. Выполнять очистку белка переосаждением в изоэлектрической точке.
5. Определять содержание белка в пробе биуретовым и другими методами.
6. Произвести правильный расчёт содержания актина в пробе.
7. Обсудить полученные результаты и сделать выводы.

ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

1. Дать характеристику глобулярных и фибриллярных белков. Назвать представителей этих классов белков.
2. Что собой представляет актин? Назвать формы его существования.
3. Какие факторы препятствуют переходу актина из одной формы в другую?
4. Какая форма актина образует комплекс, называемый актомиозином?
5. Каким образом актин участвует в мышечном сокращении? Каков пусковой механизм этого процесса?
6. Какие ещё белки необходимы для сокращения мышечного волокна? Какова их роль?
7. С какой целью проводят обработку ткани ацетоном в процессе выделения актина?
8. Чем экстрагируется актин из ацетонового порошка? Как осуществляется дальнейшая очистка актина?

Лабораторная работа 11

ВЫДЕЛЕНИЕ ОЧИЩЕННОГО ПРЕПАРАТА G-АКТИНА ИЗ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРЫС

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Принцип заключается в обработке измельчённой ткани мышц органическим растворителем – ацетоном. При этом происходит денатурация большей части сопутствующих актину белков, а также экстрагируются липиды, мешающие извлечению актина. Актин легко экстрагируется водой из ацетонового порошка, то есть гомогената, высушенного после обработки ацетоном. Дополнительно очистку выделенного актина проводят осаждением в изоэлектрической точке при

pH 4,7. Необходимое значение pH получают подкислением надосадочной жидкости соляной кислотой.

РЕАКТИВЫ:

1. Ацетон (перед работой охладить в холодильнике).
2. 1 N раствор HCl.
3. 0,1 M Na-фосфатный буфер (pH 7,4) с 1 % додецилсульфатом натрия.

Буфер готовят согласно таблице, приведенной в Приложении.

ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Инструменты для забоя животного и взятия проб биологического материала.
2. Мясорубка.
3. Центрифуга до 7000 об/мин.
4. Центрифужные пробирки.
5. Ледяная баня, лёд.
6. Пипетки на 1,0 и 5,0 мл.
7. Стеклянные палочки, стаканы на 150 мл.
8. ФЭК.
9. pH-метр.

ХОД РАБОТЫ:

Все операции по выделению актина проводят на холоде (0–4° C). Мышечную ткань (от 1 до 5 г) тщательно размельчают, дважды пропуская через мясорубку, затем полученную кашицу заливают трёхкратным объёмом холодного ацетона. Смесь оставляют стоять в стакане или в пробирке (в зависимости от взятого исходного объёма мышечной ткани) в ледяной бане на 30–40 мин при периодическом тщательном помешивании стеклянной палочкой – не реже чем через каждые 5 мин. Далее смесь центрифугируют при 2500 об/мин в течение 10 мин. Надосадок сливают. Полученный осадок извлекают на фильтровальную бумагу, хорошо промакивают другим листом фильтровальной бумаги и разрыхляют, равномерно распределяя по поверхности листа. Далее осадок тщательно подсушивают на воздухе. Высушенный осадок суспендируют в равном объёме дистиллированной воды (pH=7,0). Через 15–20 мин суспензию центрифугируют при 2000 об/мин в течение 10 мин. Полученный надосадок переносят в другую пробирку, подкисляют 0,1 N раствором HCl до значений

pH=4,7 и оставляют на холоде на 20–30 мин. Выпавший G-актин отделяют центрифугированием при 7000 об/мин в течение 15 мин. Осадок G-актина растворяют в минимальном объёме буфера – 3,0 мл, оставляют в плотно закрытой пробирке до следующего занятия.

На следующем занятии в полученных препаратах G-актина определяют содержание белка биуретовым способом, используя для расчётов калибровочную кривую, построенную на одном из предыдущих занятий. Выход белка представляют по отношению к взятой навеске ткани в количестве 1 г.

Раздел II. МИОЗИН СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

МОТИВАЦИЯ:

Миозин – это белок мышечных фибрилл, его количество составляет 50–55 % от сухой массы миофибрилл. Его молекулярная масса равна около 500 кД. Молекула миозина сильно вытянутой формы и может быть разделена без разрыва ковалентных связей на следующие субъединицы: две тяжёлые полипептидные цепи с относительной молекулярной массой 205–210 кД и несколько коротких лёгких цепей, относительная молекулярная масса которых составляет около 20 кД. Тяжёлые цепи образуют длинную закрученную α -спираль – "хвост" молекулы. Лёгкие цепи располагаются на конце тяжёлой цепи и создают глобулу – "головку" молекулы, способную соединяться с актином. Эти головки выдаются из основного стержня молекулы и принимают участие в проявлении АТФ-азной активности миозина. Количество лёгких цепей в молекуле миозина у различных видов животных и в разных типах мышц неодинаково.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Строение и классификацию белков.
2. Биохимию мышечной ткани.
3. Структурные элементы миоцита.
4. Механизм сокращения мышечного волокна.
5. Источники энергии для мышечной деятельности.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Приготовить необходимые для работы реактивы.
2. Приготовить гомогенат из мышечной ткани крысы.
3. Работать с центрифугой и водяной баней.

ВОПРОСЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ БАЗИСНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ:

1. Дайте характеристику глобулярных и фибриллярных белков. Назовите представителей этих классов белков.
2. Что представляет собой миозин? Какова его структура?
3. Что представляют собой толстые миофиламенты?
4. Каковы отличия ферментативной активности актомиозина и миозина?
5. Каким образом миозин участвует в мышечном сокращении? Каков пусковой механизм этого процесса?
6. Какие еще белки необходимы для сокращения мышечного волокна? Какова их роль?
7. Что такое "трупное окоченение"?
8. Назовите три типа мышечной ткани и охарактеризуйте их.

Лабораторная работа 12

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРЕПАРАТА МИОЗИНА ИЗ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРЫС

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Методы выделения миозина основаны на различной растворимости миозина и актомиозина и сводятся к многократному, последовательному осаждению и растворению миозина в растворах хлористого калия различной ионной силы.

Миозин и продукт его взаимодействия с актином – актомиозин – растворимы при ионной силе раствора, превышающей 0,3, и значении рН, близком к 7,0. Причём растворимость миозина, а следовательно скорость и полнота его экстракции из гомогената мышц, заметно больше, чем у актомиозина. Используя растворы с ионной силой 0,5 и сократив время экстракции до 15–20 мин, можно извлечь миозин из гомогената практически селективно, то есть с малыми примесями актомиозина. От следов актомиозина в экстракте можно избавиться почти полностью, понизив разведением ионную силу экстракта до величин, близких к 0,3, поскольку растворимость актомиозина при этой ионной силе мала по сравнению с растворимостью миозина.

РЕАКТИВЫ:

1. Свежеприготовленный раствор Бейли: 0,03 М раствор NaHCO_3 на 0,5 М растворе KCl .
2. Калий хлористый, 0,5 М. ($M_m=74,5$)

Растворы должны быть приготовлены на бидистиллированной воде, так как активность миозина резко снижается в присутствии ионов металлов.

ХОД РАБОТЫ:

Получение экстракта

Мышечную ткань в количестве 2 г измельчают на льду ножницами и гомогенизируют 30–40 сек с одним объёмом реактива Бейли (2 г принимаем за 1 объём, что будет соответствовать 2 мл раствора Бейли). К гомогенату добавляют еще 2 объёма раствора Бейли и смесь оставляют на холоде на 15–20 мин, время от времени помешивая стеклянной палочкой. Для осуществления последующих этапов методики следует вычислить конечную концентрацию KCl, которая будет достигнута в полученной смеси гомогената и реактива Бейли.

Осаждение актомиозина.

Смесь гомогената и реактива Бейли центрифугируют при охлаждении в течение 15–20 мин при 10000 об/мин. Центрифугат (надосадочную жидкость) фильтруют через двойной слой марли для удаления жира, измеряют объём полученного фильтрата и разводят его бидистиллированной водой так, чтобы конечная концентрация KCl с учётом объёма мышечной массы составила 0,25 М. Для расчёта объёма бидистиллированной воды, который потребуется для достижения указанной концентрации KCl, можно использовать уравнение:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_x, \text{ где:}$$

C_1 – концентрация KCl в фильтрате;

V_1 – объём фильтрата;

C_2 – концентрация KCl, которую требуется получить;

V_x – объём бидистиллированной воды.

Тогда:

$$V_x = (C_1 * V_1) / C_2$$

Фактический объём бидистиллированной воды, который следует добавить к смеси для получения требуемой концентрации KCl (ΔV), вычисляют по формуле:

$$\Delta V = V_1 - V_x.$$

Воду следует добавлять медленно при непрерывном помешивании. Если актомиозин сразу не выпадает в осадок, то раствор следует оставить на холоде на 0,5–2,0 часа.

Образовавшуюся желатинообразную массу энергично встряхивают и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 15–20 мин. Осадок актомиозина отбрасывают.

Осаждение миозина.

Полученный центрифугат разводят бидистиллированной водой до конечной концентрации KCl 0,04 М, измеряют объем полученной смеси и оставляют на один час на льду. Если осадок не выпадает, можно оставить на ночь в холодильнике. Затем центрифугируют при 2500 об/мин в течение 20 мин. Осадок миозина переносят стеклянной палочкой в мерную пробирку для определения его объема и растворяют его добавлением кристаллического KCl до конечной концентрации 0,5 М.

Переосаждение миозина.

Раствор миозина разводят водой до конечной концентрации 0,04 М, осторожно перемешивают и центрифугируют при 2000 об/мин в течение 20 мин. Осадок растворяют, добавляя кристаллический KCl. Раствор миозина хранят при 0° С во флаконах с возможно меньшим воздушным пространством над раствором.

В растворе миозина проводится определение содержания белка одним из колориметрических методов, определяется АТФ-азная ферментативная активность и число сульфгидрильных групп методом амперометрического титрования или титрования с параклормеркурибензоатом (п-ХМБ).

Лабораторная работа 13

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АТФ-азной АКТИВНОСТИ МИОЗИНА

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Определение количества неорганического фосфата, образующегося при расщеплении молекулы АТФ под действием миозина в присутствии ионов кальция.

РЕАКТИВЫ:

1. Хлористый калий, 0,1 М раствор.
2. Трис-НСl буфер, 0,05 М (рН 7,6), приготовленный на 0,1 М KCl.
3. Хлористый кальций, 0,1 М.

4. Раствор АТФ, 0,05 М ($M_n=551,15$).
5. Трихлоруксусная кислота, 10 % раствор.
6. Биуретовый реактив.
7. Молибденовый реактив.
8. 1 % раствор аскорбата (готовят ex tempore на 0,1 М растворе HCl).

ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Химические и центрифужные пробирки.
2. Весы, разновесы, посуда для взвешивания.
3. Пипетки на 1,0 и 5,0 мл.
4. Микропипетки со сменными наконечниками.
5. Центрифуга.
6. Водяная баня на 26° С.
7. Спектрофотометр.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

В двух пробирках к 1,0 мл буфера добавляют 0,2 мл раствора CaCl_2 , 0,3 мл раствора АТФ, 0,3 мл дистиллированной воды и оставляют на 5 мин на водяной бане при 26° С. Затем в контрольную пробу добавляют 1,0 мл холодной трихлоруксусной кислоты. Далее в обе пробы добавляют 0,2 мл раствора миозина, содержащего 2–3 мг белка (содержание белка предварительно определяют биуретовым методом, с использованием калибровочной кривой), всё хорошо перемешивают и инкубируют на водяной бане при 26° С в течение 30 мин. Реакцию в опытной пробе останавливают добавлением 1,0 мл холодного 10 % раствора ТХУ. Пробу центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин.

Далее в супернатанте опытной пробы определяют содержание неорганического фосфата, получившегося в результате ферментативного расщепления АТФ, а в контрольной пробе – количество предобразованного фосфата. Для чего переносят по 1,5 мл супернатанта в химические пробирки, в обе пробы добавляют по 1,0 мл 1 % раствора аскорбиновой кислоты и по 1,0 мл молибденового реактива. Параллельно ставят пробу для контроля на реактивы, содержащую 1,5 мл 10 % раствора ТХУ, 1,0 мл 1 % раствора аскорбиновой кислоты, 1,0 мл молибденового реактива. Все пробы одновременно инкубируют 10 мин при комнатной температуре и сразу же измеряют их оптическую плотность при длине волны 640 нм против контроля на реактивы.

Количество неорганического фосфора определяют с помощью калибровочной кривой, выполненной на предыдущем занятии. По разности контрольной и опытной проб рассчитывают количество фосфата (в мкг), образовавшегося в результате ферментативного расщепления АТФ. Далее, учитывая молекулярную массу фосфора, результат пересчитывают на мкМ фосфора / мг белка.

Лабораторная работа 14

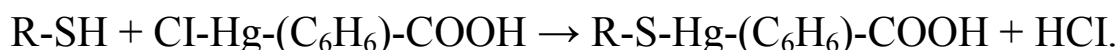
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП МИОЗИНА МЕТОДОМ ТИТРОВАНИЯ ПАРА-ХЛОМЕРКУРИБЕНЗОАТОМ

МОТИВАЦИЯ:

Среди функциональных групп белка особое место занимают SH-группы, часто необходимые для проявления биологической активности многих белков и для поддержания их макромолекулярной структуры. Известно большое количество ферментов, катализирующих самые разнообразные химические превращения, активность которых тормозится при блокировании содержащихся в них сульфгидрильных групп, особенно в активном центре фермента. Важная роль SH-групп в различных биологических процессах обусловлена их высокой реакционной способностью и многообразием химических превращений, в которые они вступают – ацилирование, окисление, алкилирование, образование меркаптидов.

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Принцип метода основан на том, что пара-хлормеркурибензоат образует со свободными SH-группами меркаптидный комплекс:



Полученный меркаптид обладает специфическим поглощением при длине волны 250 нм, что позволяет определять количество SH-групп в белках и пептидах.

РЕАКТИВЫ:

1. KCl, 0,5 М раствор (рН 7,6).
2. KOH, 2 М раствор.
3. HCl, 0,5 М раствор.

4. Пара-хлормеркурибензоат натрия, $5 \cdot 10^{-4}$ М раствор ($M_m=379$). Для приготовления $5 \cdot 10^{-4}$ М раствора навеску п-ХМБ количественно переносят в мерную колбу на 25 мл и растворяют в 10–20 мл дистиллированной воды, подщелоченной 2 М раствором КОН. Затем рН раствора доводят на рН-метре до значения 7,6, добавляя 0,5 М HCl и воду до метки. Периодически следует контролировать рН раствора, поскольку возможно его закисление за счёт азота воздуха и, как следствие, уменьшение концентрации п-ХМБ. При появлении на дне склянки осадка раствор к дальнейшему употреблению непригоден!

ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Химические пробирки.
2. Весы, разновесы, посуда для взвешивания.
3. Пипетки на 1,0 и 5,0 мл.
4. Микропипетки со сменными наконечниками.
5. Спектрофотометр.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

Предварительный этап. **Определение концентрации п-хлормеркурибензоата в растворе спектрофотометрическим методом.**

Определение основано на специфическом поглощении п-ХМБ в ультрафиолетовой области спектра при длине волны 232 нм. Коэффициент молярного поглощения п-ХМБ составляет $1,69 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Для определения концентрации полученного раствора п-ХМБ в две кюветы для спектрофотометра наливают по 2,8 мл раствора KCl. В одну из кювет добавляют 0,05 мл раствора п-ХМБ, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и измеряют оптическую плотность (D) при 232 нм. Затем ещё трижды добавляют по 0,05 мл исследуемого раствора, измеряя каждый раз оптическую плотность при 232 нм. По полученным данным рассчитывают концентрацию (C) п-ХМБ в растворе:

$$C_{\text{п-ХМБ}} = \frac{D_{232} * (2,8 + V)}{1,69 * 10^4 * V}, \text{ где:}$$

V – объём добавленного раствора п-ХМБ.

Основной этап. Титрование SH-групп миозина п-хлормеркурибензоатом.

Для определения количества SH-групп исходный раствор миозина разводят 0,5 М КС1 (рН 7,6) до конечной концентрации белка 0,85 мг/мл. В две кюветы наливают по 2,8 мл разведённого раствора миозина, измеряют оптическую плотность при 250 нм (обычно она составляет 0,4–0,6). Затем в опытную кювету добавляют 0,02 мл $5 \cdot 10^{-4}$ М раствора п-ХМБ, тщательно перемешивают и через 2 мин измеряют оптическую плотность опытной и контрольной проб. Затем в опытную пробу последовательно еще 5–6 раз добавляют по 0,02 мл раствора п-ХМБ, измеряя каждый раз спустя 2 мин экстинкцию.

Объём последующих добавляемых порций парахлормеркурибензоата уменьшают до 0,01 мл. Добавление раствора продолжают до тех пор, пока не прекратится нарастание оптической плотности при внесении новых порций п-ХМБ. Это указывает на связывание всех SH-групп.

Далее строят кривую зависимости E_{250} от объёма добавленного п-ХМБ, откладывая по оси ОХ объём, а по оси ОУ значения экстинкции.

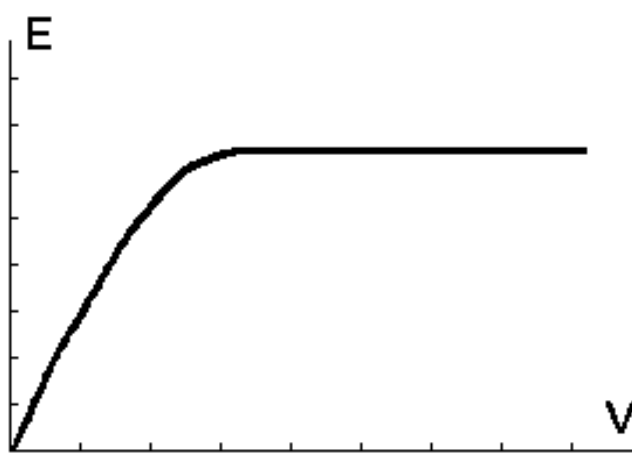


Рис. 4. Кривая титрования SH-групп.

Определяют количество раствора п-хлормеркурибензоата, соответствующее точке перегиба на кривой. Согласно уравнению реакции, содержание п-ХМБ в найденном объёме пропорционально количеству заблокированных SH-групп препарата миозина.

ТЕМА: БИОЭНЕРГЕТИКА ТКАНЕВОГО ДЫХАНИЯ

Раздел I. H^+ -АТФ-азная АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ

МОТИВАЦИЯ:

Митохондриальный аппарат клетки чрезвычайно быстро реагирует на любые сдвиги состояния организма, возникающие не только в физиологических условиях, но при воздействии на организм повреждающих факторов самой различной природы. В первую очередь этот ответ находит свое выражение в изменении функционирования энергообразующей системы митохондрий: дыхательной цепи и протонной АТФ-азы (H^+ АТФ-азы), которая является ключевым ферментом метаболизма АТФ.

Таким образом, методы оценки активности H^+ АТФ-азы широко используются в комплексе с другими методами для изучения сдвигов энергетического метаболизма, развивающихся в условиях воздействия на митохондрии *in vitro* различных биологически активных соединений (гормонов, пептидов, токсинов, фармакологических препаратов и др.), ионов (Ca^{2+} , Mg^{2+} и др.), модификаторов мембранного бислоя (детергентов, ионофоров, свободнорадикального окисления липидов), а также *in vivo*, как в физиологических условиях, так и при повреждающих организм воздействиях.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:

Ознакомить студентов с методом определения активности H^+ АТФ-азы митохондрий печени крысы, в основе которого лежит оценка скорости накопления неорганического фосфата в среде инкубации.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Хемиосмотический принцип энергетического сопряжения. Роль H^+ АТФ-азы в процессе сопряжения дыхания и фосфорилирования.
2. Роль мембран митохондрий в функционировании ферментов энергетического обмена.
3. Регуляция синтеза АТФ цепью переноса электронов, гормональная регуляция энергетического обмена митохондрий.

4. Механизмы действия на процессы энергообмена: олигомицина, ингибиторов транспорта электронов по дыхательной цепи, разобщителей и детергентов.

5. Значение определения активности H^+ АТФ-азы митохондрий.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Приготовить необходимые для работы реактивы.
2. Самостоятельно декапитировать крысу, извлечь печень, получить гомогенат.
3. Определить активность H^+ АТФ-азы.
4. Определить содержание белка в гомогенате с помощью биуретового реактива.
5. Определить концентрацию неорганического фосфата.
6. Произвести расчет активности фермента.
7. Обсудить полученные результаты, сделать выводы.

ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

1. Значение процессов окислительного фосфорилирования для жизнедеятельности клетки.

2. Хемиосмотическая гипотеза П. Митчела.

3. Трансмембранный перенос электронов и протонов с помощью дыхательных ферментов. Электрохимический потенциал ионов водорода. Протондвижущая сила.

4. Роль АТФ-синтазы в окислительном фосфорилировании.

5. Строение H^+ АТФ-азы митохондрий. Роль мембраны и мембранного окружения в функционировании фермента.

6. Механизм действия разобщителей окислительного фосфорилирования (например, 2,4-динитрофенола), ингибиторов транспорта электронов (ротенон, антимицин, цианид), олигомицина и детергентов (например, тритона X-100). Как они влияют на активность H^+ АТФ-азы?

Лабораторная работа 15

ОПРЕДЕЛЕНИЕ Н⁺-АТФ-азной АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Согласно хемиосмотической теории П. Митчела, Н⁺АТФ-аза митохондрий занимает ключевую позицию в метаболизме АТФ. Под действием фермента молекула АТФ в присутствии ионов Mg²⁺ расщепляется до АДФ и неорганического фосфата. Об активности Н⁺АТФ-азы судят по скорости накопления неорганического фосфата.

РЕАКТИВЫ:

1. Трис-НСl буфер, 0,05 М (рН 7,4).
Буфер готовят согласно таблице в Приложении.
2. MgCl₂ × 6H₂O – 0,18 М раствор (М.м.=203).
3. АТФ динатриевая соль – 0,01 М (М.м.=551,15).
4. Молибденовый реактив.
5. Аскорбиновая кислота – 1 % раствор.
6. ТХУ – 10 % раствор.

ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Ножницы, пинцет, чашка Петри, гомогенизатор.
2. Центрифуга с охлаждением.
3. Пипетки на 1,0; 5,0 и 10,0 мл.
4. Пробирки.
5. Мерный цилиндр на 10 мл.
6. Суховоздушный термостат на +37° С.
7. Фотокolorиметр или спектрофотометр.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГОМОГЕНАТА ИЗ ПЕЧЕНИ КРЫС И ПОЛУЧЕНИЕ ФРАКЦИИ МИТОХОНДРИЙ:

Печень для приготовления гомогената извлекают тотчас после декапитации животного. ВСЕ ОПЕРАЦИИ СЛЕДУЕТ ПРОВОДИТЬ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ НЕ ВЫШЕ +2° С. Навеску печени (1 г) тщательно измельчают ножницами и переносят в стакан гомогенизатора. Ткань гомогенизируют в охлаждённом трис-НСl буфере (соотношение масса ткани/объём буфера – 1:7) в течение 1–2 мин. Гомогенат центрифугируют (центрифуга с охлаждением до +4° С) в течение 10 мин при 2000 об/мин для осаждения неразрушенных клеток и ядер-

ной фракции. Полученный супернатант центрифугируют в течение 15 мин при 7000 об/мин для осаждения фракции митохондрий. К осадку митохондрий добавляют 0,5-1,0 мл трис-HCl буфера и ресуспендируют осадок для получения рабочей суспензии органелл, который используют для определения активности H^+ АТФ-азы. Рабочая суспензия хранится на льду. В суспензии определяют концентрацию белка биуретовым реактивом.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

Определение H^+ -АТФ-азной активности суспензии митохондрий проводят в двух параллельных пробах: 1 и 2. В обе пробирки, которые соответственно обозначают, последовательно вносят по 2,1 мл трис-HCl буфера, по 0,1 мл раствора $MgCl_2$ и по 0,4 мл раствора АТФ. Обе пробирки помещают на 10–15 мин в термостат с температурой $+37^\circ C$ для прогрева реакционной смеси. Затем, в пробу 1 вносят 0,5 мл суспензии митохондрий; в пробу 2 сначала вносят 0,9 мл раствора ТХУ, затем сразу же добавляют 0,5 мл суспензии митохондрий и тщательно перемешивают. Обе пробы помещают в термостат с температурой $+37^\circ C$ на 15 мин. Точно после завершения времени инкубации в пробу 1 вносят 0,9 мл раствора ТХУ. Обе пробы центрифугируют в течение 10 мин при 2000 об/мин. В супернатанте определяют содержание неорганического фосфата.

Об активности H^+ АТФ-азы судят по разнице между накопившимся неорганическим фосфатом за период инкубации (проба 1) и его исходным уровнем в суспензии митохондрий (проба 2). Активность H^+ АТФ-азы выражают в мкмоль неорганического фосфата/мин на 1 мг белка.

Раздел II. ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД В ИЗУЧЕНИИ ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ

МОТИВАЦИЯ:

Метод полярографии разработан чешским электрохимиком Ярославом Гейровским (J. Heyrovsky) в 1931 году. Большинство органических и неорганических соединений обладают электрохимической активностью (способны деполяризовать поверхность рабочего электрода), что позволило методу полярографии занять достойное место и в арсенале аналитических приемов, используемых в современной хи-

мии, биологии, биохимии, а также в экспериментальной и клинической медицине.

Полярографические методы анализа обладают высокой чувствительностью и избирательностью (возможно определение концентрации до 10^{-6} моль/л без предварительного разделения смеси) и допускают возможность исследования малых объемов растворов – до 0,01 мл. С помощью полярографических методов определяют микроэлементы, анализируют белки, нуклеиновые кислоты, витамины, пигменты и т.д. Полярографический метод в частности стал незаменимым для изучения процессов транспорта и утилизации в биосистемах одного из жизненно необходимых элементов – кислорода.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:

Ознакомить студентов с методическими приемами, используемыми для оценки скорости дыхания гомогената печени крыс (фракции митохондрий) полярографическим методом с использованием кислородного электрода Кларка.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Принцип полярографического метода количественного и качественного анализов.

2. Конструкции электродов, используемых для полярографических исследований в медицине и биологии.

3. Устройство электрода Кларка, полярографической ячейки и установки для регистрации концентрации кислорода в водных растворах.

4. Классификацию метаболических состояний митохондриального аппарата по Чансу.

5. Механизм окисления сукцината в митохондриях и его отличия от такового для НАДН-зависимых субстратов.

6. Механизм действия разобщителей-протонофоров.

7. Параметры, которые необходимо рассчитать, и основные принципы расчётов при обработке полученной в ходе эксперимента полярографической кривой.

8. Какую информацию можно получить при сопоставлении скоростей, полученных в метаболическом состоянии 3 и в присутствии разобщителя.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Приготовить гомогенат из печени крысы, выделить фракцию митохондрий методом дифференциального центрифугирования.
2. Собрать и подготовить к работе полярографическую ячейку и полярографическую установку.
3. Определять цену деления регистрирующего прибора в единицах концентрации кислорода для последующих расчетов скоростей дыхания.
4. Рассчитать скорость дыхания гомогената в различных метаболических состояниях по тангенсу угла наклона касательных к начальным участкам кинетических кривых поглощения кислорода.
5. Рассчитать величину дыхательного контроля.
6. Рассчитать скорость фосфорилирования добавки АДФ.

ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

1. Значение явления поляризации поверхности рабочего электрода для реализации полярографического метода.
2. Во сколько раз должны различаться площади поверхности рабочего и вспомогательного электродов полярографической ячейки? Почему эти отличия принципиальны для конструкции любой полярографической ячейки?
3. Какие явления отражает полярографическая кривая (полярографическая волна)?
4. Что такое предельный диффузионный ток?
5. Приемы, которые используют для устранения диффузионных ограничений величины предельного диффузионного тока.
6. Классификация конструкций электродов, используемых для регистрации концентрации кислорода в водных средах.
7. Принципиальная схема полярографа.
8. Устройство кислород-чувствительного электрода Кларка.
9. Основные отличия метаболических состояний митохондриального аппарата по Чансу.

Лабораторная работа 16

ИЗУЧЕНИЕ ДЫХАНИЯ ГОМОГЕНАТА И МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Принцип метода состоит в изучении зависимости силы тока, протекающего в цепи электродов, погруженных в исследуемый раствор, от величины приложенной к ним разности потенциалов. Эта зависимость нелинейна. График (вольт-амперная кривая или полярограмма) имеет характерную ступенчатую форму, поэтому его называют также полярографической волной. Причина появления полярографических волн – процесс концентрационной поляризации поверхности индикаторного электрода (катода) – для примера, рассмотренного ниже на рисунке 5.

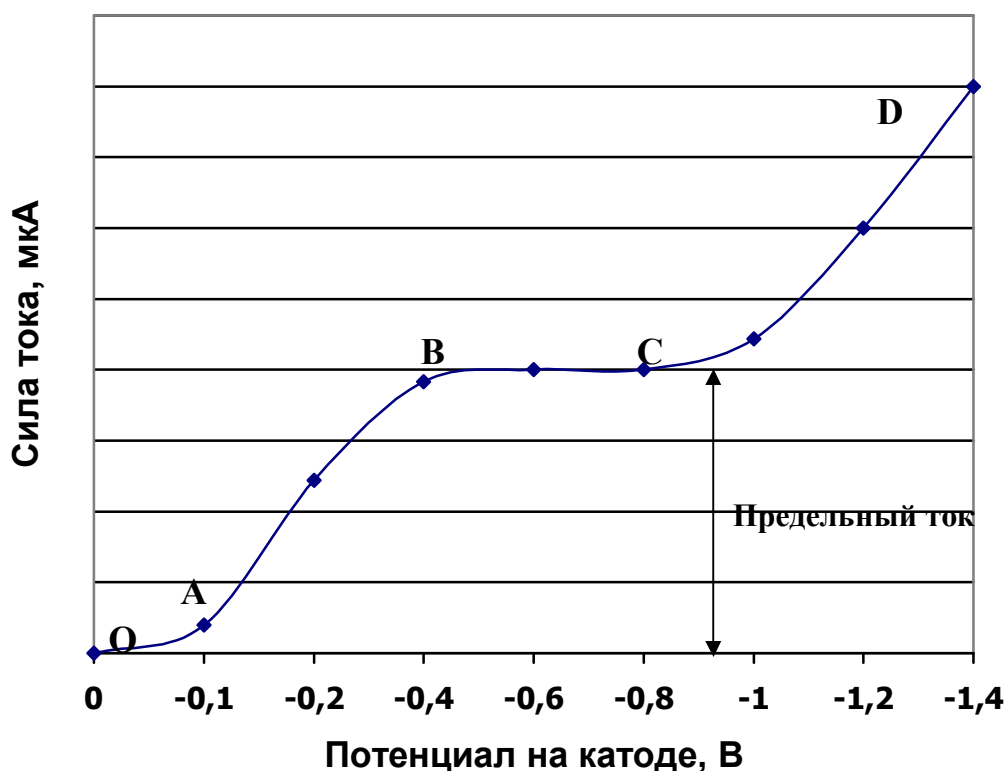


Рис. 5. Вольт-амперная кривая восстановления кислорода на платиновом катоде.

Соотношение площадей катода и анода составляет 1:100. На катоде с малой площадью поверхности плотность тока чрезвычайно высока и процесс поляризации происходит быстро. На аноде, имеющем большую площадь, то же значение разности потенциалов создаёт существенно меньшую плотность тока и поляризации его не происходит. Вольт-амперная кривая (рис. 5) показывает, что при небольшой разнице потенциалов, поданной на электроды, сила тока в цепи очень незначительна (отрезок **O – A**). Это **остаточный ток**, который обусловлен тем, что на катоде восстанавливаются другие ионы, присутствующие в растворе, поскольку их энергия оказывается достаточной для разряда при таких малых значениях потенциала. Кислород в этих условиях не восстанавливается, поскольку не достигнута величина потенциала его разрядки на платиновом катоде. При дальнейшем увеличении приложенного напряжения ток начинает заметно нарастать (отрезок **A – B**): потенциал приближается к величине потенциала разряда для кислорода и все больше число его молекул начинает восстанавливаться на катоде. Наконец достигается такое значение потенциала (точка **B**), при котором сила тока стабилизируется и удерживается на относительно постоянном уровне, несмотря на дальнейшее увеличение потенциала (отрезок **B – C**). Иными словами, достигается потенциал восстановления кислорода на платиновом катоде. Этому значению потенциала соответствует предельный ток в цепи. На графике это явление отражается в виде «ступеньки» или «волны» (отрезок **B – C**). Если продолжать увеличивать разность потенциалов, подаваемую на электроды, то ток снова начинает расти (отрезок **C – D**), что может предшествовать появлению следующей волны: на платиновом катоде начнется процесс восстановления водорода.

Величина предельного тока (высота волны) прямо пропорциональна количеству соединения-деполяризатора в изучаемом растворе. Эта закономерность составляет основу количественного анализа в полярографии. Изучение концентрации кислорода в биологических средах основано на измерении предельного тока, протекающего через ячейку, при фиксированном потенциале восстановления кислорода на катоде (Рис. 5). Такой режим измерения является разновидностью количественного полярографического анализа и называется амперометрией.

Скорость поступления молекул кислорода к поверхности катода лимитируется процессом его диффузии в растворе. Это влияет на величину предельного тока. Уменьшить диффузионные ограничения

доставки кислорода к катоду в процессе измерения и, таким образом, увеличить предельный ток (а значит и чувствительность аналитической процедуры) возможно путём перемешивания находящейся в ячейке изучаемой биологической среды с помощью магнитной мешалки.

ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Прибор «Эксперт-001».
2. Соединительные кабели.
3. Компьютер.
4. Электрод Кларка.
5. Кювета для исследуемой биосистемы.
6. Держатель для кюветы.
7. Пипетки для введения растворов в кювету.
8. Магнитная мешалка.

Характеристика электродов

В настоящее время для определения концентрации кислорода в биологических объектах применяются твердые электроды из благородных металлов очень высокой степени чистоты (99,99 %). Катод или активный электрод изготавливается из платины, анод – из серебра.

Конструкции электродов классифицируются по характеру контакта катода и анода с исследуемым биообъектом:

1. **Открытые электроды.** Рабочая поверхность катода и анода непосредственно контактирует с объектом исследования.

2. **Полузакрытые электроды.** Рабочая поверхность катода отделена от исследуемой среды электропроводной и проницаемой для кислорода пленкой, но не проницаемой для высокомолекулярных органических соединений.

3. **Закрытые (мембранные) электроды.** Электрод представляет собой электролитическую ячейку, содержащую рабочий и вспомогательный электроды в определенном объеме электролита, который отделён от исследуемой среды проницаемой для кислорода, но электроизолирующей мембраной.

В медико-биологических исследованиях наибольшее распространение получили **закрытые мембранные электроды**. Их конструкция была предложена в 1953 году **L.C. Clark** и соавторами. В дальнейшем различные варианты конструкций закрытых электродов для оп-

ределения концентрации кислорода получили название «электрод Кларка».

Конструкция электрода Кларка представлена на рисунке 6. Электрод имеет корпус из оргстекла, внутренний объём которого заполнен электролитом («внутренний электролит», обычно 0,1 М раствор KCl), который омывает платиновый катод и серебряный анод, покрытый пленкой из AgCl. Внутренний объём электрода изолирован от исследуемой биологической среды полимерной мембраной. Через мембрану могут проникать только кислород и другие газы, она обладает электроизолирующими свойствами. Таким образом, определение кислорода происходит в химически чистом растворе внутреннего электролита, в котором парциальное давление кислорода находится в динамическом равновесии с таковым в исследуемой среде.

В первых конструкциях электродов Кларка применялись мембраны из полиэтилена толщиной 20–40 мкм. Однако полиэтилен оказался гидрофильным, сравнительно мало проницаемым для кислорода и мог пропускать некоторые электролиты. Этих недостатков лишён тефлон (политетрафторэтилен). Так, скорость диффузии кислорода через тефлоновую мембрану из исследуемой среды во внутренний электролит, омывающий катод, более чем в два раза выше, чем через полиэтиленовую мембрану такой же толщины. В современных электродах Кларка применяется тефлоновая мембрана толщиной 5 мкм.

Электрод Кларка, благодаря мембране, обладает некоторой инертностью и незначительно уступает по чувствительности открытым кислородным электродам. Вместе с тем высокая стабильность и воспроизводимость его показаний, а также надёжная защита поверхности платинового катода мембраной от необратимой химической модификации сделали его одним из наиболее широко применяемых электродов в медико-биологических исследованиях.

Принципиальная схема полярографической установки и конструкция полярографической ячейки для изучения дыхания изолированных митохондрий представлены далее на рисунках 7 и 8.

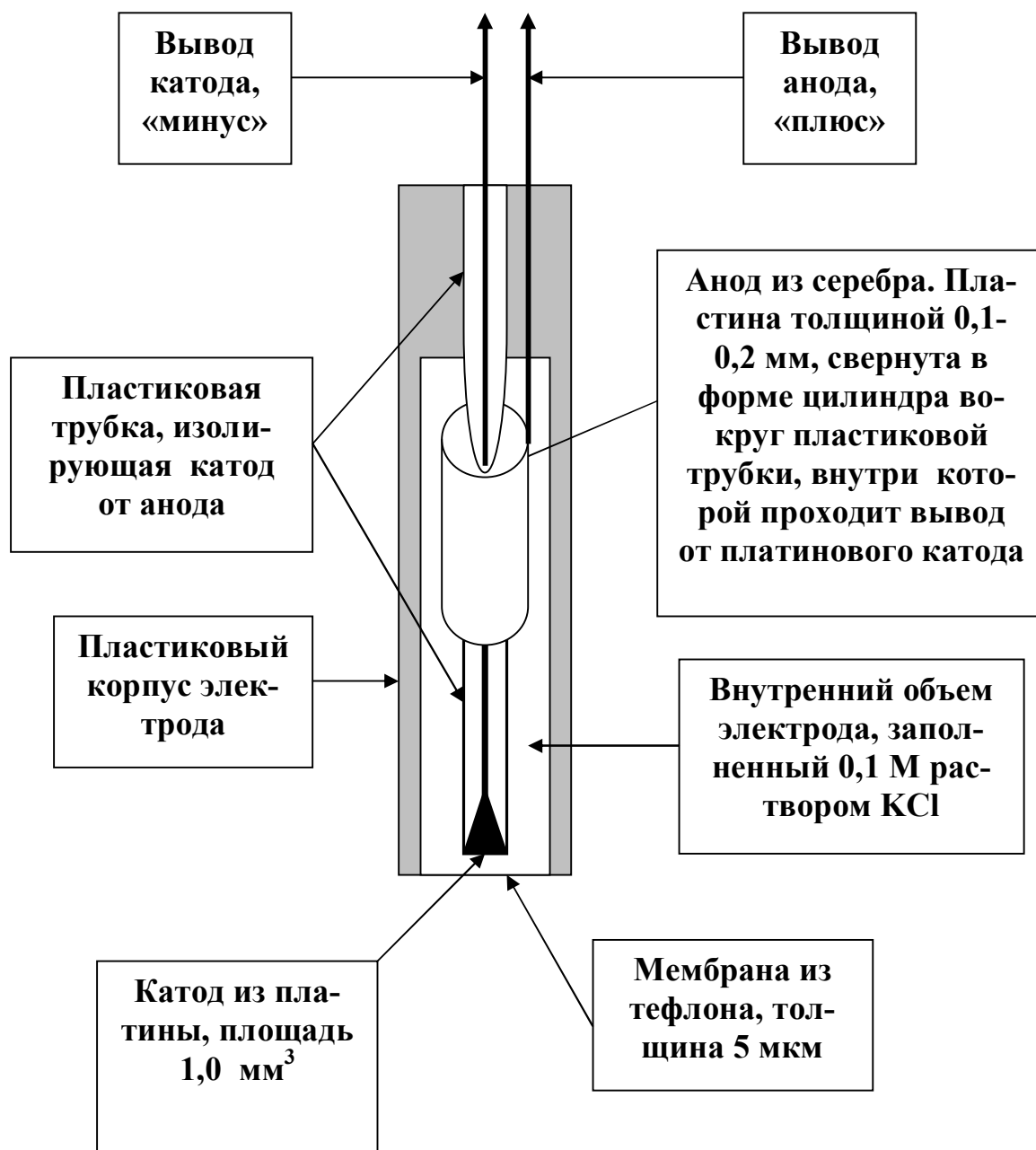


Рис. 6. Конструкции электрода Кларка.

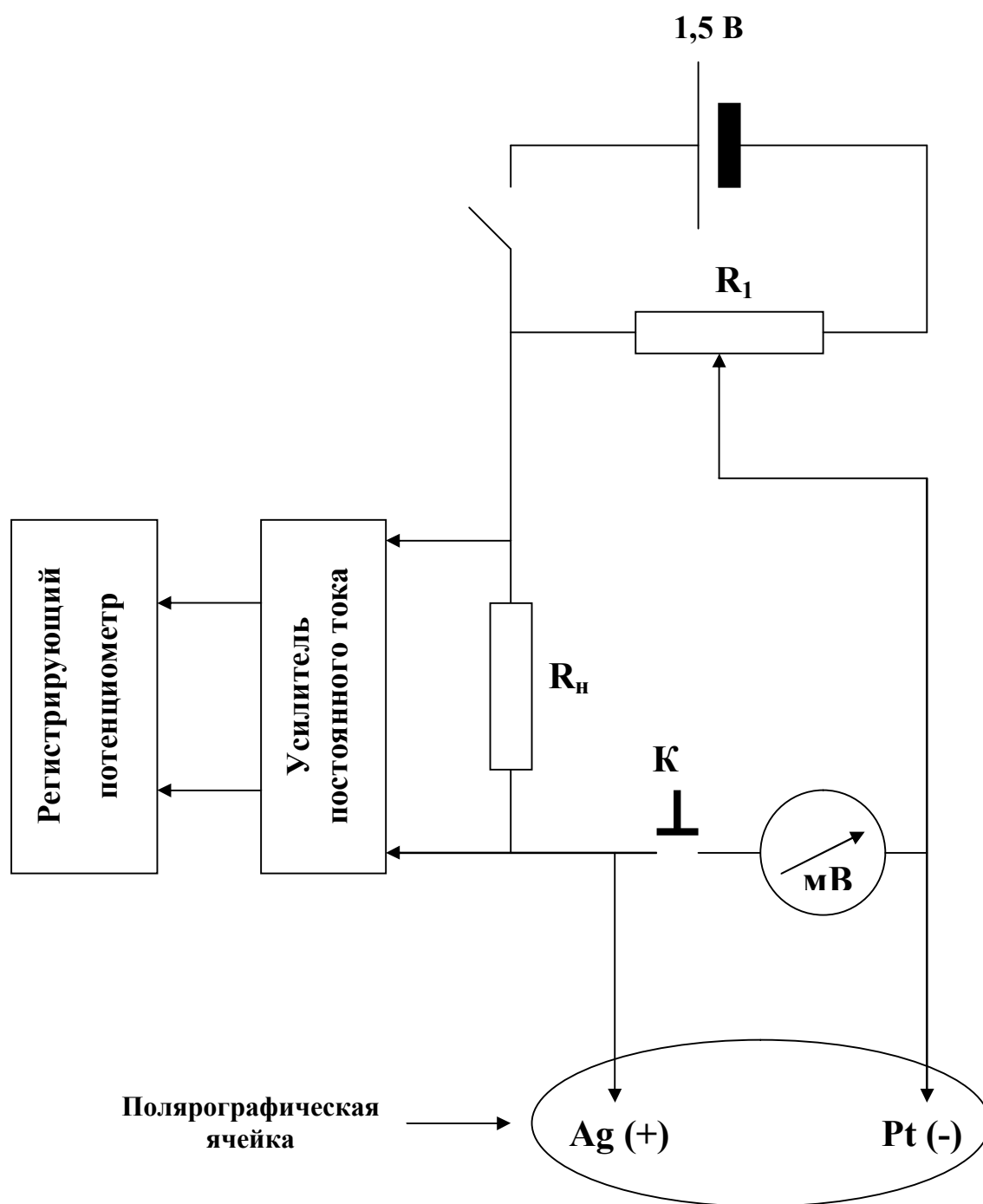


Рис. 7. Принципиальная схема полярографической установки для изучения поглощения кислорода гомогенатом печени, суспензией клеток или изолированными митохондриями.

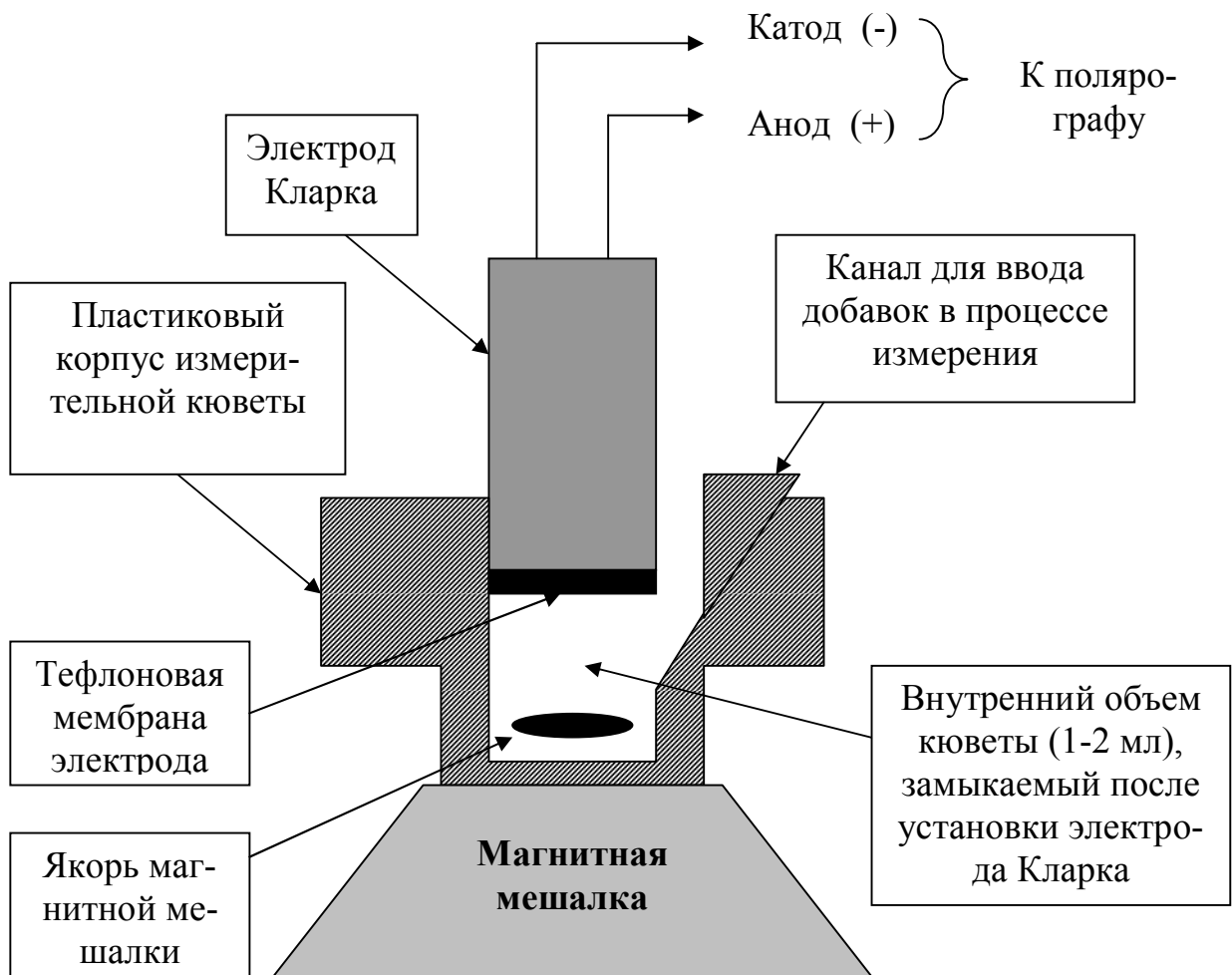
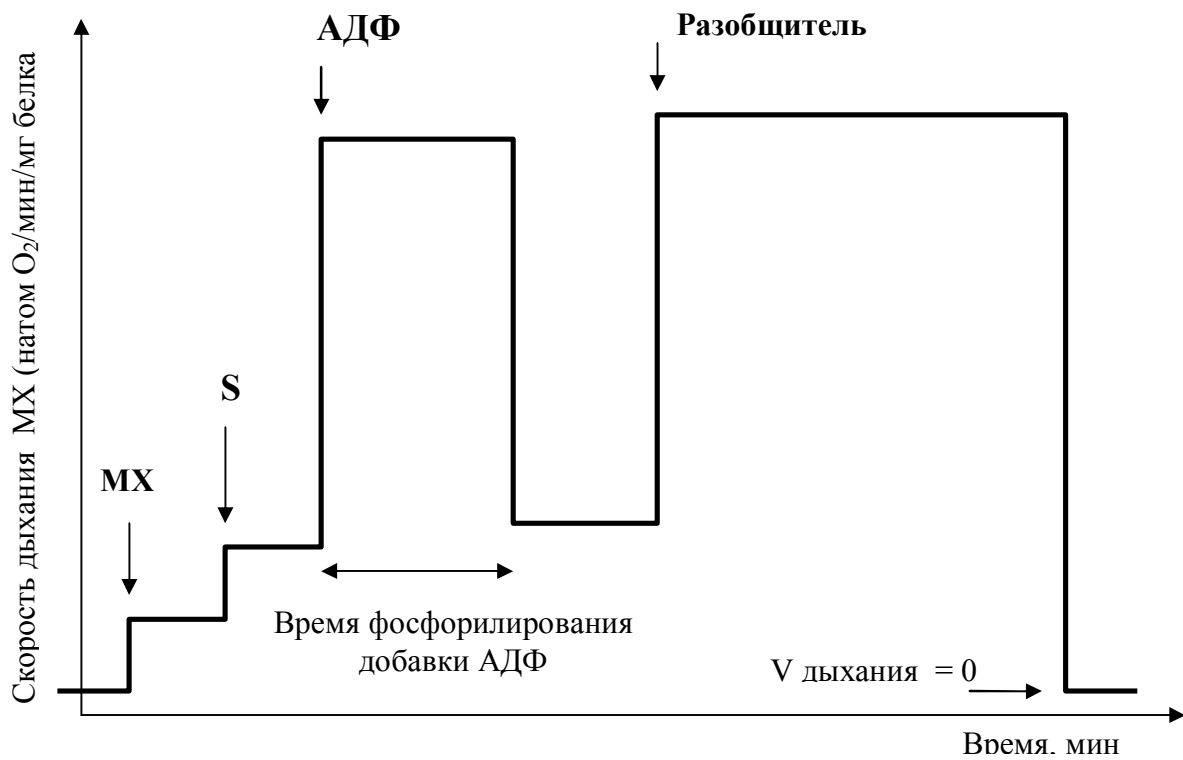
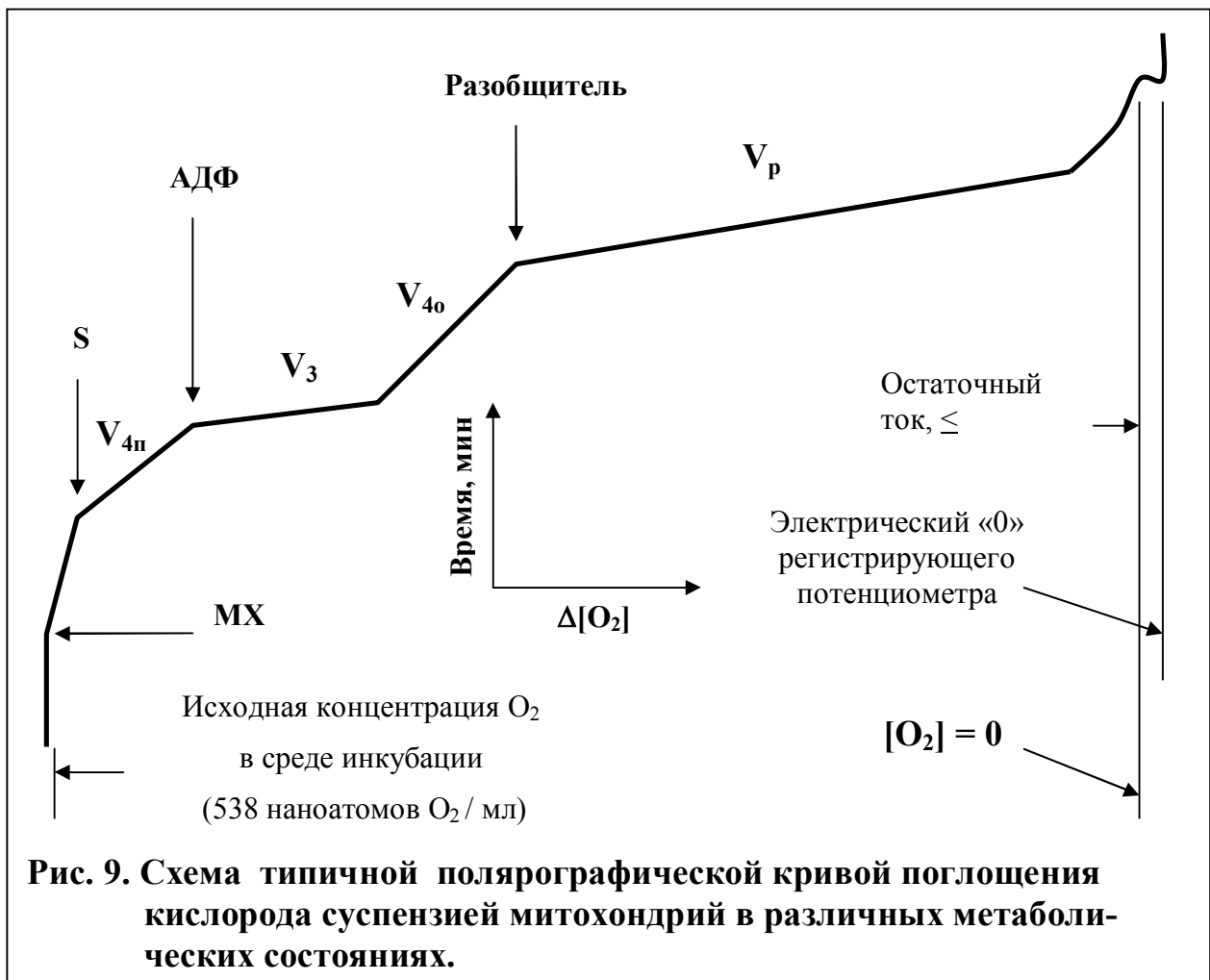


Рис. 8. Схема полярграфической ячейки для измерения поглощения кислорода с помощью электрода Кларка в замкнутом объеме биологических сред.

На рисунках 9 и 10 представлены типичная полярграфическая запись эксперимента по изучению дыхания митохондрий и принцип трансформации полярграммы в диаграмму.



РЕАКТИВЫ:

1. Среда для приготовления гомогената печени крысы:

125 мМ КСl (М.м.=74,5)

50 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4) (М.м. трис=121,14).

2. Среда инкубации для изучения дыхания безъядерного гомогената печени крысы:

125 мМ КСl,

50 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4),

5 мМ MgCl₂ x 6 Н₂О (М.м.=203,3),

20 мМ КН₂РО₄ (М.м.=136,0),

10 мМ сукцината натрия (М.м.=270,16).

3. 20 мМ раствор динатриевой соли АДФ (М.м.=471,2). При введении 0,01 мл этого раствора в кювету объёмом 1,0 мл достигается конечная концентрация 200 мкМ АДФ.

4. 5 мМ спиртовой раствор 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ), (М.м.=184,12). При введении 0,01 мл этого раствора в кювету объёмом 1,0 мл достигается конечная концентрация разобшителя 50 мкМ.

5. Реактивы для определения концентрации белка в гомогенате биуретовым методом.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

1. Подготовка к работе полярографической установки и настройка компьютерной программы регистрации поглощения кислорода.

1.1. Установить кювету в держатель и поместить в неё якорь для перемешивания среды инкубации.

1.2. Заполнить кювету средой инкубации и установить электрод Кларка так, чтобы в кювете не осталось пузыря воздуха. Излишки раствора удалить салфеткой.

1.3. Установить кювету с держателем на магнитную мешалку.

1.4. Подсоединить электрод Кларка к прибору «Эксперт-001», а выход прибора к компьютеру с помощью соответствующих кабелей:

- Включить питание прибора «Эксперт-001» кнопкой «ВКЛ» и с помощью кнопок «←» и «→» выставить режим работы прибора в качестве полярографа – на дисплее прибора появится индикация «Термооксиметр».

- Нажать кнопку «ИЗМ». На дисплее прибора «Эксперт-001» появятся значения концентрации кислорода в среде инкубации и ее температура.
- Включить магнитную мешалку. Ориентируясь на показания дисплея прибора «Эксперт-001», плавно увеличивать обороты мешалки до тех пор, пока предельный ток, соответствующий исходной концентрации кислорода в среде инкубации, не перестанет нарастать. Дальнейшие измерения проводить при этих оборотах якоря магнитной мешалки


1.5. Включить компьютер и программу для регистрации кинетики поглощения кислорода.

1.5.1. В основном окне программы нажать кнопку  и кнопку «ГРАФИК».

1.5.2. В появившемся окне «ГРАФИК» следует провести настройку режима регистрации:

- Нажать кнопку «Показывать весь график».
- В позиции “Y min” ввести значение «0».
- В позиции “Y max” ввести такое значение концентрации кислорода в среде инкубации, которое немного превышает величину, отображаемую на дисплее прибора «Эксперт-001». Это необходимо сделать для того, чтобы сигнал, соответствующий исходной концентрации кислорода в среде инкубации и «вычерчиваемый» на электронном графике, занимал большую часть шкалы электронного самописца, то есть максимально отклонялся от нуля шкалы.
- При необходимости можно сгладить флуктуации записываемого сигнала. Для этого в позиции «Фильтр» следует выставить подходящие числовые значения и утвердить выбор нажатием кнопки «Да!»
- Настройка режима регистрации завершена.

2. Запись полярографической кривой поглощения кислорода гомогенатом печени.

2.1. Запустить процесс регистрации на компьютере. Для этого в основном окне программы нажать кнопку .

2.2. Ввести в кювету через специальный канал 100 мкл гомогената и в течение 1–2 мин записывать кинетику поглощения кислорода в метаболическом состоянии 4 по Чансу (в среде инкубации присут-

ствуют: O₂, субстрат окисления, неорганический фосфат, но отсутствует акцептор неорганического фосфата – АДФ).

2.3. Ввести в кювету 10 мкл раствор АДФ и записать кинетику поглощения кислорода в процессе смены метаболических состояний: **состояние 4 → состояние 3** (активное фосфорилирование добавки АДФ) → **возврат в состояние 4** в результате завершения фосфорилирования внесенного количества АДФ.

Классификация метаболических состояний митохондрий по Б. Чанс представлена в таблице 11.

Таблица 11

**Классификация метаболических состояний митохондрий
(по Б. Чанс)**


Состояние	Наличие O ₂	Наличие субстрата окисления	Наличие Фн + АДФ	Интенсивность дыхания	Название
1	избыток	эндогенный	эндогенный	низкая	
2	избыток	нет	избыток	очень низкая	истощение по субстрату
3	избыток	избыток	избыток	высокая	активное, неконтролируемое
4	избыток	избыток	нет	низкая	неактивное, контролируемое
5	нет	избыток	избыток	нет	анаэробияз

Примечание:

Дыхательный контроль (ДК) – численное выражение прочности сопряжения дыхания и фосфорилирования препарата изолированных митохондрий. Для прочно сопряженных митохондрий ДК будет ≥ 3 .

2.4. Ввести в кювету добавку разобшителя 2,4-ДНФ в объёме 10 мкл.

Записать кинетику поглощения кислорода в разобщённом состоянии, вплоть до полного исчерпания кислорода в среде инкубации.

2.5. Остановить процесс регистрации кривой нажатием в основном окне программы кнопки  .

2.6. Записать полученный график нажатием кнопки «Запись» в окне «График».

2.7. Выйти из режима регистрации нажатием кнопки «Выход» в окне «График».

ЗАДАЧА:

Из печени интактной крысы методом дифференциального центрифугирования выделен препарат митохондрий. С помощью полярографической установки с использованием электрода Кларка записана полярографическая кривая поглощения кислорода суспензией митохондрий в различных метаболических состояниях, а также в присутствии разобщителя дыхания и фосфорилирования – 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ). Эта типичная полярограмма представлена на рисунке 11.

Методика: Состав среды инкубации для изучения дыхания полярографическим методом:

125 мМ КСl,
50 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4),
5 мМ MgCl₂ x 6 H₂O (M.m.=203,3),
20 мМ КН₂РО₄ (M.m.=136,0)

Объём полярографической кюветы составляет 1,6 мл. В кювету вводили 0,15 мл суспензии митохондрий. Концентрация белка в суспензии 28,3 мг/мл. Объёмы добавок: 0,015 мл 1 М раствора сукцината натрия; 0,015 мл 16 мМ раствора динатриевой соли АДФ; 0,015 мл 5,3 мМ спиртового раствора 2,4-ДНФ.

В ОТЧЁТЕ НЕОБХОДИМО ПРЕДСТАВИТЬ:

• цену деления шкалы регистрирующего прибора в следующем виде:

нг атомы кислорода / мм шкалы. Для расчёта принимаем, что исходное содержание в среде инкубации кислорода при температуре от +20° до +25° С составляет в среднем 538 наноатомов кислорода / мл.;

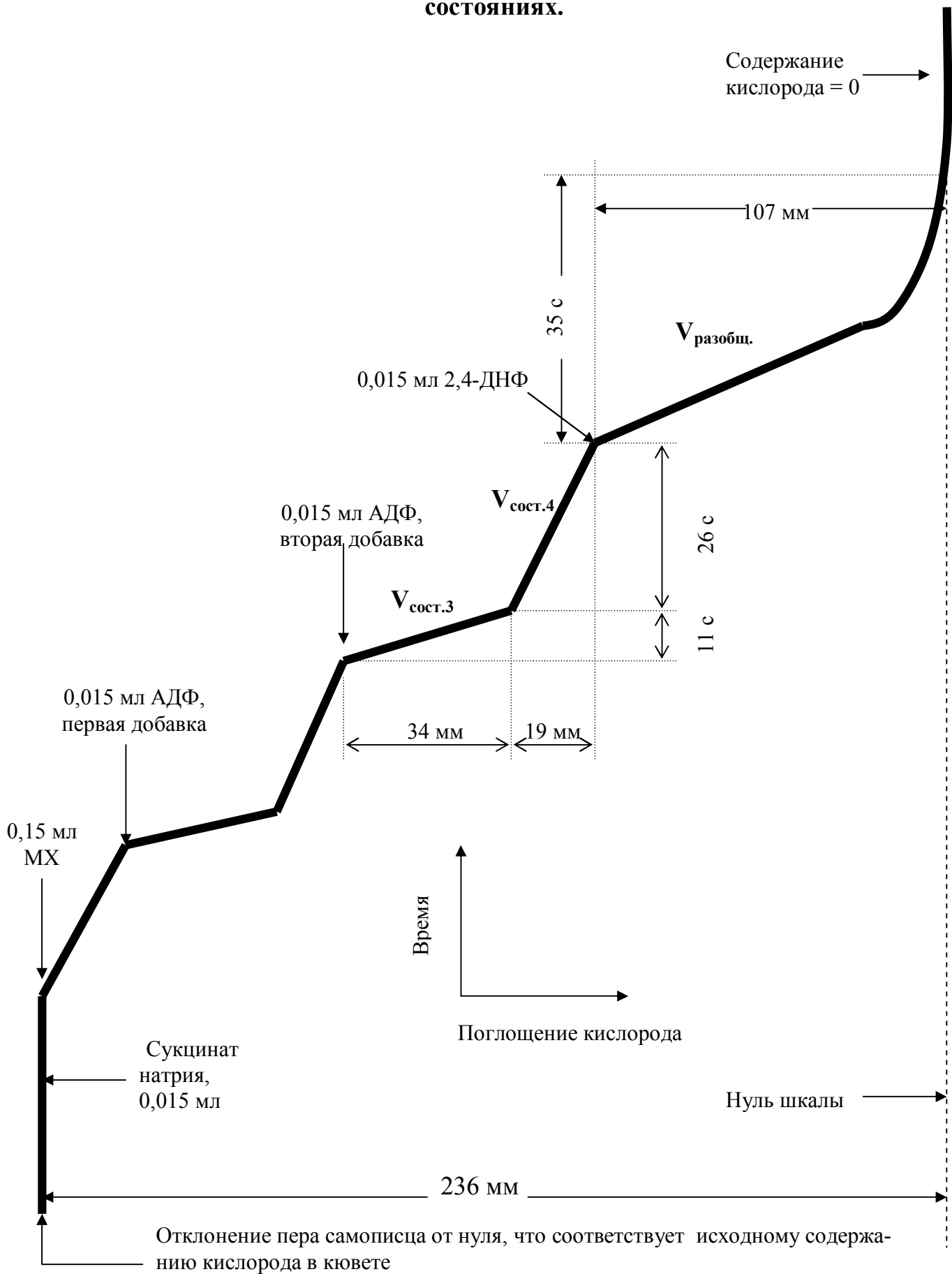
• рассчитать скорости поглощения кислорода митохондриями в метаболических состояниях 4 и 3, а также в присутствии разобщителя. Скорость выразить в: **нг атомов кислорода / мин / мг белка;**

- сравнить скорости дыхания в метаболических состояниях 3 и в присутствии разобщителя;
- рассчитать величину **дыхательного контроля по Чансу** как отношение скоростей: дыхание в состоянии 3 / дыхание в состоянии 4;
- рассчитать скорость фосфорилирования добавки АДФ и выразить в **нмоль АДФ/ мин/ мг белка**;
- рассчитать коэффициент **АДФ/О**;
- рассчитать конечные концентрации добавок сукцината натрия, АДФ и 2,4-ДНФ в полярографической кювете.

Примечание:

Расчёты производятся в отношении второй добавки АДФ, так как считается, что ответ на вторую добавку АДФ наиболее точно отражает функциональное состояние препарата митохондрий.

Рис. 11. Типичная полярографическая кривая поглощения кислорода изолированными митохондриями в различных метаболических состояниях.



Раздел III. КОМПОНЕНТЫ АДЕНИЛОВОЙ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

МОТИВАЦИЯ:

Универсальным медиатором энергии в клетке является АТФ, которая используется в биосинтетических процессах либо непосредственно, либо опосредованно через другие мононуклеотиды: ГТФ, ИТФ, ЦТФ. Весь клеточный фонд АТФ обновляется очень быстро – в течение 1 сек у *E. Coli* и 1 мин у млекопитающих. Несмотря на это, концентрация АТФ в клетке остаётся постоянной, то есть скорость использования АТФ в качестве источника энергии уравнивается скоростью фосфорилирования АДФ и АМФ в АТФ.

Одним из критериев оценки состояния адениловой системы, по которому можно судить о состоянии процессов синтеза и расходования АТФ, является энергетический заряд клетки (ЭЗ). Энергетический заряд – это мера метаболически доступной энергии, запасённой в адениловой системе.

$$\text{ЭЗ} = \frac{[\text{АТФ}] + 1/2[\text{АДФ}]}{[\text{АТФ}] + [\text{АДФ}] + [\text{АМФ}]}$$

Адениловая система полностью заряжена, если из всех возможных адениннуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ) в клетке присутствует только АТФ – в этом случае клеточная система считается полностью заряженной и ЭЗ=1. Если в клетке адениловые нуклеотиды присутствуют только в виде АМФ, то ЭЗ=0. Большинство регуляторных ферментов биосинтеза максимально активны при величине ЭЗ выше 0,85, и их активность резко падает при снижении ЭЗ ниже 0,75.

Определение одного лишь количества АТФ в ткани не является сколько-нибудь прогностическим тестом, поэтому необходимым условием является определение содержания полного набора адениннуклеотидов, включающего АМФ, АДФ и АТФ.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:

Познакомить студентов с методом количественного определения адениловых нуклеотидов в тканях и расчётом величины энергетического заряда Аткинсона – интегрального показателя величин содержания всех адениннуклеотидов в клетке.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Структуру дыхательной цепи митохондрий и точки сопряжения переноса электронов и фосфорилирования АТФ в протонной АТФ-азе.
2. Механизмы субстратного и окислительного фосфорилирования.
3. Регуляцию синтеза АТФ в клетке.
4. Роль нуклеотидов в метаболизме клетки.
5. Назначение определения энергетического заряда Аткинсона.
6. Строение моонуклеотидов, понятия «нуклеотид», «нуклеозид», «азотистое основание».

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Декапитировать крысу.
2. Извлечь ткань, заморозить её в жидком азоте.
3. Работать с аналитическими весами, центрифугой и ФЭК-ом.
4. Приготовить необходимые реактивы.
5. Нанести на пластинку «Silufol» исследуемый раствор.
6. Определить с помощью УФ-лучей локализацию адениннуклеотидов.
7. Элюировать с пластинок адениннуклеотиды.
8. Рассчитать величину энергетического заряда, интерпретировать полученный результат.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ:

1. Обмен адениловых нуклеотидов в организме.
2. Виды хроматографии.
3. На чём основан метод хроматографического разделения адениннуклеотидов?
4. Почему желательна применение жидкого азота для определения количества нуклеотидов в тканях?
5. В каких пределах возможны изменения величин энергетического заряда клетки?
6. Соотношение каких процессов отражает величина энергетического заряда клетки?

Лабораторная работа 17

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ АДЕНИЛОВОЙ СИСТЕМЫ В ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Метод основан на различной хроматографической подвижности АТФ, АДФ и АМФ в специально подобранной системе растворителей. Наибольшей подвижностью в этой системе обладают неорганический фосфор и АМФ, затем следует АДФ и с наименьшей скоростью движется АТФ.

РЕАКТИВЫ:

1. Жидкий азот.
2. 6 % раствор хлорной кислоты.
3. 5,0 N раствор КОН.
4. Система растворителей
диоксан : изопропиловый спирт : аммиак : вода (4:2:1:4).
5. 0,01 N раствор HCl.
6. 10 % раствор трихлоруксусной кислоты.

ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Фарфоровая ступка и пестик.
2. Термос для жидкого азота.
3. Центрифужные пробирки.
4. Пипетки.
5. Хроматографическая камера.
6. Пластинки «Silufol», капилляр для нанесения проб на пластинки.
7. Центрифуга.
8. Спектрофотометр.
9. Источник УФ-освещения.

ХОД РАБОТЫ:

Подготовка хроматографической камеры

В камеру для хроматографии наливают раствор, состоящий из смеси диоксан : изопропиловый спирт : аммиак : вода в соотношении 4:2:1:4. Раствор герметически закрывают на 1,5–2 часа для насыщения камеры парами растворителя.

Приготовление экстракта адениннуклеотидов

После декапитации животного ткань печени сразу помещается в жидкий азот. Затем её тщательно растирают в охлаждённой фарфоровой ступке, не допуская размораживания ткани, тщательно перемешивают с двойным объёмом хорошо охлаждённого 10 % раствора трихлоруксусной кислоты и инкубируют на холоде в течение 10 мин.

Экстракт ткани отделяют центрифугированием на лабораторной центрифуге в течение 10 мин при 3000 об/мин. Хлорную кислоту нейтрализуют добавлением 5,0 N KOH до pH=5,0. Полученный супернатант используют для хроматографического анализа.

На хроматографическую пластинку «Silufol» на расстоянии 1,5–2 см от нижнего края наносят капилляром исследуемый раствор (0,04 мл). Пластинку помещают в камеру для хроматографии и закрывают. Когда фронт растворителя поднимается до верхнего края, пластинки вынимают, сушат на воздухе, места положения нуклеотидов определяют по их флуоресценции под УФ-освещением.

Отмеченные места на хроматограмме, соответствующие определённым нуклеотидам, очерчивают карандашом, соскабливают в сухие пробирки и элюируют в 3,0 мл 0,01 N HCl в течение 1 часа. Надосадок осторожно сливают и определяют его оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 260 нм. Контролем служит участок хроматограммы, не поглощающей в УФ-области.

Расчёт концентрации нуклеотидов осуществляют по формуле:

$$C = \frac{D \cdot V_1 \cdot V_2}{14,2 \cdot 10^{-3} \cdot m \cdot V_3}, \text{ где:}$$

C – содержание адениннуклеотидов в мкмоль/г ткани,

m – масса ткани в граммах,

$14,2 \cdot 10^{-3}$ – коэффициент молярного поглощения адениннуклеотидов,

D – оптическая плотность пробы,

V_1 – объём хлорной кислоты и KOH, необходимый для экстрагирования

адениннуклеотидов,

V_2 – объём элюата,

V_3 – объём, наносимый на хроматографическую пластинку.

ЧАСТЬ III. ХИМИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

ТЕМА: ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ДЕГРАДАЦИИ МАКРОМОЛЕКУЛ

МОТИВАЦИЯ:

Анализ продуктов окислительной модификации основных макромолекул клеток и тканей (белков, липидов, нуклеиновых кислот, углеводных компонентов) используется для оценки дисбаланса окислительного метаболизма в организме.

Дисбаланс в системе «прооксиданты-антиоксиданты № и его последствия – важное звено молекулярных механизмов возникновения и хронизации ряда патологических состояний. Свободнорадикальные окислительные реакции вовлечены в патогенез таких социально значимых заболеваний, как сахарный диабет, рассеянный склероз, хронический гепатит, бронхиальная астма, атеросклероз, а также ишемических и реперфузионных повреждений миокарда, нервной ткани. Избыточной продукции свободных радикалов кислорода отводится большая роль в механизмах старения.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:

Освоить методы определения окислительно модифицированных липидных и белковых молекул в крови и различных тканях организма.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Активные формы кислорода и продуцирующие их системы.
2. Химические основы и этапы свободнорадикальных окислительных реакций.
3. Молекулярные продукты свободнорадикального окисления липидов. Их значение в формировании патологии мембран.
4. Основные мишени в структуре полипептидной цепи белка для развития реакций окислительной модификации, продукты этих реакций.

5. Значение окислительной модификации нуклеиновых кислот для генетического аппарата клетки.
6. Принципы и правила выделения, подготовки биологического материала для исследования продуктов окислительной деградации липидов и белков, сходства и отличия. Условия хранения биологического материала.
7. Методы определения продуктов перекисного окисления липидов.
8. Способы определения окислительной модификации белков.
9. Возможности репарации окисленных макромолекул.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Правильно осуществить декапитацию животного и взять пробы тканей для исследования продуктов окислительной деградации липидных и белковых макромолекул.
2. Подготовить биоматериал (гомогенизировать пробы ткани или выделить клетки крови, экстрагировать исследуемые соединения) для последующего выполнения методов.
3. Провести анализ молекулярных продуктов перекисного окисления липидов.
4. Провести оценку окислительной модификации белков плазмы крови и тканей по содержанию карбонильных производных.
5. Интерпретировать полученные результаты, сделать выводы.

Раздел I. АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОДУКТОВ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

МОТИВАЦИЯ:

В физиологических условиях, когда антиоксидантная система клеток и тканей функционирует полноценно, интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) незначительна. В этих условиях процессы ПОЛ участвуют в механизмах регуляции проницаемости биологических мембран, обновления их фосфолипидного состава и функционирования ассоциированных с мембранами ферментов. В условиях окислительного стресса, когда нарушен баланс между действием прооксидантных факторов, стимулирующих процессы ПОЛ, и активностью антиоксидантной системы, универсальным механизмом необратимого повреждения структуры и нарушения функций клеток и тканей становится гиперпродукция токсических метаболитов ПОЛ.

Перекисное окисление липидов является альтернативным процессу биологического окисления. Промежуточные и конечные продукты биологического окисления не токсичны, тогда как продукты ПОЛ (свободные радикалы, альдегиды, перекиси) обладают чрезвычайной токсичностью для клетки. Особенно подвержены перекисно-му окислению ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов мембран. Определение содержания продуктов ПОЛ имеет важное значение при исследовании механизмов возникновения патологических состояний в эксперименте и в клинике.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:

Ознакомить студентов с методами определения содержания продуктов процессов перекисного окисления липидов – гидроперекисей липидов (ГПЛ) и малонового диальдегида (МДА).

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Свободнорадикальный механизм ПОЛ.
2. Продукты ПОЛ.
3. Механизм образования МДА на примере линоленовой жирной кислоты.
4. ПОЛ в мембранах клеток и плазме крови.
5. Прооксиданты и антиоксиданты, участие в механизмах регуляции ПОЛ.
6. Механизмы повреждающего действия продуктов ПОЛ на белки.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Декапитировать крысу, извлечь ткань.
2. Работать с гомогенизатором.
3. Работать с центрифугой.
4. Приготовить необходимые реактивы.
5. Провести количественный анализ продуктов ПОЛ в биологических пробах.
6. Обсудить полученные результаты, сделать выводы.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ:

1. Активные формы кислорода.
2. Стадии свободнорадикального процесса окисления липидов.
3. Продукты ПОЛ.
4. Факторы, определяющие состояние ПОЛ в клетке.

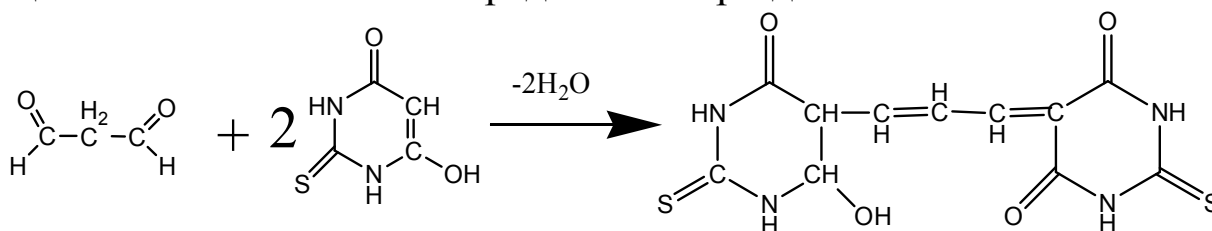
5. Понятия «прооксиданты», «антиоксиданты», примеры, механизм действия.
6. Принципы определения малонового диальдегида (МДА) и гидроперекисей липидов (ГПЛ).

Лабораторная работа 18

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В ПЕЧЕНИ КРЫС

ПРИНЦИП МЕТОДА:

В основе метода лежит реакция между МДА и 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), которая при высокой температуре и кислом значении рН протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего 1 молекулу МДА и 2 молекулы ТБК. Максимум поглощения этого комплекса определяется при длине волны 532 нм.



РЕАКТИВЫ:

1. Среда для приготовления гомогената печени: KCl – 0,175 М, трис-НСl буфер – 0,025 М (рН 7,35). KCl (Mm=74,5), трис (Mm=121,14)
2. Тиобарбитуровая кислота, 0,75 % раствор (навеску реактива растворяют в дистиллированной воде при нагревании на водяной бане), ex tempore.
3. 10 % раствор ТХУ.
4. Аскорбиновая кислота (Mm=179). Внесение навески в пробу производят ex tempore до конечной концентрации 0,8 мМ.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические весы.
2. Мерные цилиндры, колбы на 100 мл.
3. Пипетки, пробирки центрифужные и химические.
4. Фотоэлектроколориметр или спектрофотометр.
5. Гомогенизатор, ножницы, пинцет, чашка Петри.

ХОД РАБОТЫ:

Приготовление гомогената печени

Ткань печени для приготовления гомогената извлекают тотчас после декапитации животного. Все операции следует проводить при температуре не выше $+4^{\circ}\text{C}$. Для получения гомогената берут 1 г печени крысы и промывают её от крови в холодном фосфатном буфере (смотри Приложение). Навеску отмытой ткани печени тщательно измельчают ножницами и переносят в стакан гомогенизатора. Ткань гомогенизируют с охлаждённой средой при соотношении объёмов 1:10 (ткань/среда) в течение 1–2 мин. Полученный гомогенат центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин и температуре $0-4^{\circ}\text{C}$. Супернатант используют для определения содержания МДА и белка.

К 7,0 мл полученного супернатанта добавляют 7,0 мл среды для получения гомогената. Для определения исходного содержания МДА в ткани отбирают 1,0 мл полученной смеси, прибавляют к нему 1,0 мл холодной 10 % ТХУ.

Оставшуюся смесь используют для определения: 1) активности спонтанного ПОЛ и 2) активности ПОЛ в присутствии аскорбиновой кислоты. Для этого смесь делят на две порции. Первую порцию инкубируют без аскорбиновой кислоты (спонтанное ПОЛ), вторую порцию – в присутствии аскорбиновой кислоты, используя такую навеску аскорбиновой кислоты, чтобы её конечная концентрация в объеме второй порции составляла 0,8 мМ. Навеску растворяют непосредственно в объеме 2-й порции смеси. Обе порции инкубируют при 37°C в термостате.

Отбор проб (по 1,0 мл) из каждой порции для определения содержания МДА осуществляют в два параллельных ряда пробирок через 5, 10, 20, 30, 40 и 50 мин от начала инкубации. Реакцию перекисного окисления в каждой из отобранных проб останавливают добавлением 1,0 мл холодной 10 % ТХУ.

Ко всем полученным пробам приливают по 0,5 мл 0,75 % ТБК и помещают их в кипящую водяную баню на 15 мин. Содержимое пробирок окрашивается в розовый цвет. Пробы охлаждают, осадок белка удаляют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Оптическую плотность надосадочной жидкости измеряют в кювете толщиной 1,0 см при длине волны 532 нм против контрольной пробы, куда вместо гомогената вносят 1,0 мл среды для получения гомогената и обрабатывают в тех же условиях, что и опытные образцы.

РАСЧЁТ:

Расчет содержания МДА в пробах проводят с использованием коэффициента молярной экстинкции $\varepsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ и выражают в мкмоль/мг белка в пробе.

Лабораторная работа 19

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИДРОПЕРЕКИСЕЙ ЛИПИДОВ В КРОВИ И ТКАНЕВОМ ГОМОГЕНАТЕ МЕТОДОМ ПЛАЦЕРА

(в модификации В.Б. Гаврилова и М.И. Мишкорудной)

ПРИНЦИП МЕТОДА:

О содержании конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов судят по интенсивности поглощения липидным экстрактом при длине волны 233 нм.

РЕАКТИВЫ:

1. ЭДТА, раствор 10 мг/мл.
2. HCl концентрированная.
3. Гептан.
4. Изопропанол.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Торсионные весы.
2. Мерные цилиндры, пипетки.
3. Пробирки центрифужные и высокие химические пробирки с притёртой пробкой.
4. Спектрофотометр.
5. Встряхиватель.

ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА:

В работе используют гомогенат печени крыс (способ получения гомогената – в предыдущей лабораторной работе).

Получение плазмы крови. Только что полученную венозную кровь смешивают с раствором ЭДТА из расчёта 1 мг/мл. Для этого раствор ЭДТА (10 мг/мл) смешивают с кровью в соотношении 1:10, центрифугируют с охлаждением в течение 5 мин при 2,5–3 тыс. об/мин. Использование другого антикоагулянта нежелательно, по-

сколькx ЭДТА, являясь комплексоном, ингибирует свободнорадикальные реакции и не позволяет липидам дополнительно окисляться в ходе процедуры приготовления экстракта.

ХОД РАБОТЫ:

К 0,2 мл плазмы или гомогената ткани печени (0,2 мл H₂O – в контроле) добавляют 4 мл смеси гептан : изопропанол (1:1) и встряхивают 10–15 мин на лабораторном встряхивателе. Экстракцию удобно проводить в высоких пробирках (18–20 см) во избежание потери гептановой фазы, что может привести к завышению результатов. Для расслоения смеси добавляют 0,4 мл концентрированной соляной кислоты. Для устранения мутности из-за преципитированного белка желателъно центрифугировать пробы в течение 10 мин при 3000 об/мин. После центрифугирования проб и расслоения фаз отбирают верхний гептановый слой и измеряют интенсивность поглощения опытных проб против контроля при длине волны 233 нм.

РАСЧЁТ:

Результат анализа представляют в относительных единицах оптической плотности с пересчётом на 1 мл крови или 1 мг липидов. Расчёт производят по формуле:

$$C = \frac{D_{233} \cdot V_{\text{э}}}{V_{\text{пл}}}, \text{ где:}$$

$V_{\text{э}}$ – конечный объём гептан-изопропанолового экстракта (4,0 мл);

$V_{\text{пл}}$ – объём плазмы (0,2 мл);

D_{233} – оптическая плотность гептан-изопропанолового экстракта, измеренная при длине волны 233 нм.

Раздел II. ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

МОТИВАЦИЯ:

Наряду с липидами влияние прооксидантов может распространяться и на белки, в том числе на белковые компоненты ферментов, рецепторов, ионных каналов плазматических мембран, определяющих возможность нормального функционирования различных клеток и тканей в целостном организме.

Наиболее чувствительными к окислению являются SH-группы белков, поэтому первичными центрами модификации являются S-

содержащие аминокислотные остатки – цистеин, метионин. Активной окислительной модификации подвержены ароматические аминокислоты – триптофан, тирозин, гистидин. В частности, фенилаланин окисляется до тирозина, а окисление тирозиновых остатков сопряжено с образованием нерепарируемой спаренной структуры битирозина. Нет путей элиминации из организма и окисленного триптофана. Модификация основных функциональных аминокислот в составе белков приводит к структурным изменениям и фрагментации белков. Окислительное повреждение белковых молекул сопровождаются процессы кросс-линкинга, карбонилирования, гликирования и др.

При многих физиологических и патологических процессах большое значение имеет ковалентная модификация белков, связанная с металл-катализируемым окислением. Инициация окислительной деградации осуществляется за счёт ферментных и неферментных систем. Примерами ферментных систем являются НАД(Ф)·Н-оксидаза/НАД(Ф)·Н₂O₂/Fe⁺², ксантиноксидаза/ксантин/Fe⁺³ O₂, P450/P450-редуктаза/Fe⁺³ НАДФ·Н. К неферментным системам относятся Fe⁺²/O₂, Fe⁺²/H₂O₂, аскорбат/Fe⁺³/O₂, аскорбат/Cu⁺²/O₂, аскорбат/Fe⁺³/O₂/ЭДТА.

Интенсивность металл-катализируемого окисления белков оценивают с использованием различных методов. Информативный способ – определение содержания карбонильных группировок аминокислотных остатков, которые образуются в результате окислительной модификации исследуемых белков.

При оценке степени окислительной деструкции белков наиболее актуально исследование реакции карбонильных производных с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДФГ), а также с флуоресцеин-тиосемикарбазидом, флуоресцеин-амином, третичным боргидратом. Образующиеся 2,4-динитрофенилгидразоны белков определяют методом ИФА (ELISA) с помощью реакции с анти-ДФГ-антителами.

Более полное представление о степени кумулятивных повреждений долгоживущих белков в результате окисления дают дополнительная оценка модификации отдельных остатков аминокислот (тирозина и триптофана), анализ структурных изменений с помощью электрофореза и хроматографии.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Источники активных форм кислорода в организме в норме и при патологических процессах.

2. Пути взаимодействия активных форм кислорода и метаболитов перекисного окисления липидов с белковыми молекулами, образующиеся продукты.
3. Белок-липидные взаимодействия в мембранах клеток при окислительном стрессе, первичность возникновения нарушений.
4. Основные реакции окисления молекул белка и отдельных аминокислот.
5. Репарируемые и нерепарируемые продукты окислительной модификации белка, их судьба в организме.
6. Значение окислительной модификации белковых молекул в поддержании редокс-статуса клетки.
7. Методические подходы к исследованию окислительной модификации белков.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Декапитировать крысу, получить материал для исследования.
2. Работать с гомогенизатором, центрифугой.
3. Работать со спектрофотометром.
4. Приготовить необходимые реактивы.
5. Провести количественную оценку карбонильных производных окисленных белков плазмы крови и тканей.
6. Обсудить полученные результаты, сделать выводы.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ:

1. Проксиданты, их основные эффекты.
2. Свободнорадикальные механизмы ПОЛ и основные токсические эффекты продуктов процессов ПОЛ на белковые молекулы.
3. Понятие о системе антиоксидантной защиты.
4. Белковые компоненты антиоксидантной защиты.
5. Механизмы участия неферментативных компонентов и антиоксидантных ферментов в срочной и долговременной защите клетки от окислительного повреждения.
6. Факторы, определяющие окислительно-восстановительный баланс клетки и организма в целом.
7. Факторы инициации окислительного повреждения белка.
8. Механизмы окислительного повреждения белка.
9. Продукты окислительной модификации белка, возможности их репарации и элиминации.

10. Значение процессов окислительной модификации белка для функциональной активности и биоэнергетики клетки.

Лабораторная работа 20

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРБОНИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОКИСЛЕННЫХ БЕЛКОВ

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Метод основан на реакции взаимодействия окисленных карбонильных производных белков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ), протекающей с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрируют спектрофотометрически.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА:

Материал для исследования: плазма крови, гемолизат эритроцитов, тканевые гомогенаты.

Получение плазмы и гемолизата эритроцитов. Гепаринизированную цельную кровь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 мин, собирают плазму, удаляют налет клеток белой крови с поверхности осадка эритроцитов. Эритроциты трижды промывают 0,145 М раствором NaCl с последующим центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин и удалением промывной жидкости. Затем осуществляют гипотонический лизис полученной взвеси эритроцитов, добавляя 20-кратный (степень разведения лизата подбирается опытным путём) объём холодной дистиллированной воды. Через 15 мин инкубации гемолизата в холодильнике его центрифугируют в течение 30 мин при 20000 об/мин и температуре 4° С (с целью осаждения теней эритроцитов). Для анализа берут супернатант.

Получение тканевых гомогенатов. 500 мг ткани печени (или 1 г мышечной ткани) только что декапитированного животного измельчают ножницами на холоде и гомогенизируют в 7 объёмах охлажденной среды выделения (фосфатный буфер) в течение 1–2 мин.

Гомогенат центрифугируют 10 мин при 600 об/мин при 0–4° С для удаления ядер и обломков клеток. Супернатант сливают в стаканчик, стоящий во льду. Центрифугирование – желательная, но необязательная процедура, поскольку далее следует методический этап, позволяющий устранить влияние нуклеиновых кислот.

I. Модификация метода для белков плазмы крови

РЕАКТИВЫ:

1. Фосфатный буфер, 1/15М, рН 7,4. (Для приготовления буфера смотри таблицу в Приложении).
2. $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 4 мМ раствор ($M_m=278$).
3. ЭДТА динатриевая соль (трилон-Б), 1 мМ раствор ($M_m=372,3$).
4. H_2O_2 , 0,3 мМ раствор, ex tempore.
5. 2,4-ДНФГ, 0,01 М раствор в 2 М HCl ($M_m=198$), ex tempore. Для лучшего растворения – подогреть на водяной бане.
6. HCl , 2 М раствор.
7. ТХУ, 20 % раствор.
8. Этиловый спирт.
9. Этилацетат.
10. Мочевина, 8 мМ раствор ($M_m=60,1$).
11. NaCl , 0,154 М раствор.
12. Биуретовый реактив.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Спектрофотометр.
2. рН-метр.
3. Центрифуга лабораторная, весы для уравнивания пробирок.
4. Водяная баня или термостат на 37° С.
5. Аналитические весы, разновесы, посуда для взвешивания.
6. Стеклянная посуда: колбы мерные, цилиндры, стаканчики, пробирки центрифужные и химические, воронки, пипетки, палочки.
7. Пипетки автоматические и наконечники одноразовые.

ХОД РАБОТЫ:

Плазму крови перед анализом разводят 0,154 М раствором NaCl в соотношении 1:10. Параллельно в плазме определяют содержание белка биуретовым методом, что необходимо для дальнейших расчётов. Спонтанную и металл-зависимую окислительную деструкцию (модификацию) белков плазмы анализируют в параллельных пробах. Для каждого варианта исследования готовят свой контроль.

Спонтанная окислительная модификация белков. Контрольная и опытная пробы содержат 0,05 мл разбавленной плазмы и 0,95 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 7,4). Общий объём каждой пробы составляет по 1,0 мл.

Металл-зависимая окислительная модификация белков. Для инициации реакции используют среду Фентона (4 мМ раствор FeSO₄ сливают с 1 мМ раствором ЭДТА в объемном соотношении 1 : 1), которую готовят ex tempore. В контрольной и опытной пробах к 0,05 мл разбавленной плазмы приливают 0,75 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН 7,4), 0,1 мл среды Фентона и 0,1 мл 0,3 мМ раствора H₂O₂. Общий объём каждой пробы составляет 1,0 мл.

Приготовленные пробы для определения спонтанной и металл-катализируемой модификации белков (опыт и контроль) инкубируют 15 мин на водяной бане при температуре 37°C. После инкубации в опытные пробы приливают по 1,0 мл 0,01 М раствора 2,4-ДНФГ, растворённого в 2 М растворе HCl. В контрольные пробы добавляют вместо 2,4-ДНФГ равный объём 2 М раствора HCl. Для осаждения белков в каждую пробу вносят по 1,0 мл 20 % раствора ТХУ. Пробы инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем центрифугируют при 3000 g в течение 15 мин. Полученный осадок дважды промывают смесью этанола и этилацетата (1:1) для экстракции липидов и 2,4-ДНФГ, который не прореагировал с карбонильными группами окисленных белков. После каждого этапа промывания пробу центрифугируют при 3000 g в течение 15 мин. Отмытый осадок подсушивают на воздухе для удаления растворителей, а затем к нему добавляют по 3,0 мл 8 М раствора мочевины. Для лучшего растворения белка добавляют каплю 2 М раствора HCl.

Оптическую плотность 2,4-динитрофенилгидразонов, образующихся в результате окислительной деструкции (модификации) белков, измеряют при длине волны 363 нм против соответствующего контроля.

РАСЧЁТ:

При расчётах содержания карбонильных производных, регистрируемых при длине волны 363 нм, используют коэффициент молярной экстинкции

$22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Степень окислительной модификации белков можно выражать в единицах оптической плотности, отнесённых к 1 г белка или 1 мл плазмы (с учётом её разведения).

II. Модификация метода для гемолизата эритроцитов или тканевых гомогенатов

РЕАКТИВЫ:

1. HCl, 2 М раствор.
- 13.2,4-ДНФГ, 10 ммоль в 2 М растворе HCl. Для лучшего растворения – подогреть на водяной бане.
2. ТХУ, 20 % раствор.
3. Гуанидин 6 М раствор ($M_m=95,53$), содержащий 20 ммоль фосфата калия, рН раствора доводят до значения 2,3 с помощью ТХУ.
4. NaCl, 0,154 М раствор.
5. Стрептомицина сульфат, 10 % раствор в 50 ммольном растворе HEPES ($M_m=238,3$), рН 7,2.
6. Биуретовый реактив.
7. Этанол.
8. Этилацетат.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Гомогенизатор.
2. Спектрофотометр.
3. рН-метр.
4. Центрифуги лабораторные с охлаждением.
5. Ледяная баня.
6. Весы, разновесы, посуда для взвешивания.
7. Стеклопосуда: колбы мерные, цилиндры, стаканчики, пробирки центрифужные и химические, пипетки, палочки, склянки.
8. Пипетки автоматические и наконечники одноразовые.

ХОД РАБОТЫ:

При работе с тканевыми гомогенатами проводят осаждение присутствующих ДНК и РНК, которые могут заведомо ошибочно повысить уровень карбонильных соединений. Нуклеиновые кислоты осаждают 1 % раствором стрептомицина сульфата. К 1 объёму этого раствора добавляют 9 объёмов тканевого гомогената, оставляют на холоде на 15 мин. Затем центрифугируют с охлаждением 10 мин и используют для анализа супернатант.

В надосадке определяют содержание белка биуретовым методом.

Оставшийся надосадоk делят на две равные части, содержащие около 0,7–1,0 мг белка. В опытную пробу добавляют 0,5 мл 10 мМ раствора 2,4-ДНФГ в 2 М растворе HCl, в контрольную – 0,5 мл 2 М раствора HCl. Инкубируют 60 мин, встряхивая каждые 10–15 мин. Затем в обе пробы добавляют по 0,5 мл 20 % раствора ТХУ, центрифугируют при 11000 об/мин, декантируют надосадочную жидкость. Осадоk 3 раза промывают 1,0 мл смеси этанола с этилацетатом (1:1) с целью устранения непрореагировавшего 2,4-ДНФГ и примесей липидов. После каждого этапа промывания пробу центрифугируют при 3000 g в течение 15 мин. Осадоk растворяют в 0,6 мл раствора гуанидина. Для ликвидации нерастворимых компонентов жидкость центрифугируют. В случае использования фотометра с большими кюветами кратно увеличивают объёмы реагентов. Количество образовавшихся 2,4-динитрофенил-гидразонов регистрируют при длине волны 363 нм против контроля.

РАСЧЁТ:

Для расчётов концентрации используют формулу

$$C, \text{ моль/л} = \frac{E \cdot a}{\varepsilon \cdot L}, \text{ где}$$

E – значение экстинкции,

L – длина оптического пути (см),

ε – коэффициент молярной экстинкции, который при длине волны 363 нм составляет $22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$,

a – разведение, которое необходимо учитывать при расчётах.

Результат пересчитывают на 1 г белка в пробе.

ТЕМА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ

МОТИВАЦИЯ:

Аэробный метаболизм клеток и тканей может полноценно осуществляться лишь благодаря активному функционированию антиоксидантной системы. Это многоуровневая система защиты биомолекул от окислительного повреждения свободными радикалами и продуктами процесса ПОЛ. Она состоит из ферментативных и неферментативных элементов. Вышедшие из-под контроля антиоксидантной системы процессы свободнорадикального окисления (состояние окисли-

тельного стресса) могут стать причиной многих заболеваний и даже гибели организма. Одним из наиболее мощных компонентов антиоксидантной системы являются антиоксидантные ферменты.

Важнейшим ферментом антиоксидантной защиты является супероксиддисмутаза (СОД) (КФ 1.15.1.1). Выделено семейство супероксиддисмутаза, отдельные представители которого отличаются друг от друга особенностями структурной организации, входящим в состав активного центра металлом, местом локализации в клетках различных тканей. СОД эукариот представлена тремя изоэнзимами: Cu,Zn-СОД и Mn-СОД – это внутриклеточные ферменты цитозоля и митохондрий соответственно, а Cu-СОД – высокогликозилированный внеклеточный секреторный фермент. СОД регулирует уровень активных радикалов кислорода по следующим механизмам:

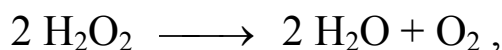
1. Действует на «первой линии защиты», катализируя превращение высокореакционного супероксид аниона $O_2^{\bullet -}$ в относительно менее активную перекись водорода и молекулярный кислород:



2. Способствует уменьшению содержания высокоактивного радикала $\bullet OH$.

Антирадикальная активность и противовоспалительные свойства супероксиддисмутаза рассматриваются как важный фактор неспецифической резистентности организма.

Каталаза (КФ 1.11.1.6) – один из наиболее филогенетически древних ферментов антиоксидантной системы организма. Каталаза относится к классу оксидоредуктаз, катализирующих окислительно-восстановительные реакции, входит в группу гидропероксидаз – ферментов, использующих в качестве субстрата H_2O_2 или органические гидроперекиси:



поэтому наряду с каталазой обладает пероксидазной активностью. По структуре – гемопrotein, содержащий 4 гемовые группы. Каталаза является внутриклеточным ферментом. В циркулирующей крови большая доля фермента локализована в цитоплазме эритроцитов. Функции каталазы:

1. Участвует в защите организма от эндогенной перекиси водорода, образующейся в результате функционирования аэробных дегидрогеназ.

2. Подавляет образование гидроксильных радикалов.

3. Защищает от окисления гемоглобин и способствует переносу кислорода внутри клеточных структур.

4. Участвует в окислительном метаболизме некоторых аминокислот.

5. Предохраняет от окисления SH-группы, в том числе входящие в активный центр многих ферментов.

Лабораторная работа 21

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ

ПРИНЦИП МЕТОДА:

В основе метода лежит способность фермента супероксиддисмутазы тормозить реакцию автоокисления адреналина в адrenoхром при рН 10,2.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические весы.
2. Мерные цилиндры, колбы на 100 мл.
3. Микропипетки на 0,1; 0,2 и 0,5 мл, сменные наконечники.
4. Пипетки на 5,0 мл.
5. Химические и центрифужные пробирки.
6. Центрифуга.
7. Термостат на 37° С.
8. Фотоэлектроколориметр или спектрофотометр.
9. Инструменты для декапитации крысы и извлечения тканей.
10. Гомогенизатор, чашка Петри.

РЕАКТИВЫ:

1. Na-карбонатный буфер 0,05 М, рН 10,2 (см. пропись в Приложении).
2. 0,05 М ЭДТА Na (на 0,05 М карбонатном буфере рН 7,4).
3. $1,8 \times 10^{-3}$ М водный раствор адреналина рН 2,5 (готовится ex tempore на воде, подкисленной 2 каплями HCl, стабилизируется 20 мин при 37° С).
4. Смесь этанол: хлороформ (2:1,5).

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ:

Гомогенат ткани печени, сыворотка крови, взвесь клеток крови – эритроцитов, лимфоцитов и др.

Перед определением активности супероксиддисмутазы из сыворотки крови полезно удалить белки и производные гемоглобина. Для осаждения этих соединений пробу обрабатывают смесью этанол:хлороформ. Для обработки 0,2 мл сыворотки крови используют 0,1 мл смеси, добавляют 0,5 мл буфера, перемешивают, центрифугируют при 5000 об/мин в течение 15 мин. На исследование берут 0,2 мл надосадочной жидкости.

ХОД РАБОТЫ:

Измерение активности супероксиддисмутазы проводят в кювете спектрофотометра. В кювету вносят следующие компоненты: первым – 3,0 мл 0,05 М Na-карбонатного буфера рН 10,2, содержащего 0,05 М раствор ЭДТА (буфер предварительно прогревают 10 минут при 37° С), затем – 0,2 мл сыворотки крови, а для холостой пробы – 0,1 мл воды, в последнюю очередь – 0,5 мл водного раствора адреналина рН 2,5. При необходимости допускается разведение сыворотки крови до 10 раз.

Сначала записывают при длине волны 480 нм скорость (V_1) свободного неингибированного автоокисления адреналина в адренохром в холостой пробе. Затем записывают скорость (V_2) автоокисления адреналина в присутствии супероксиддисмутазы исследуемого материала. Скорость окисления адреналина регистрируют в течение 2–3 минут: $(x + x_1 + x_2) / 3 = x_{cp}$ для холостой и опытной проб, при необходимости измерения можно продлить. Определяемая начальная скорость аутоокисления адреналина в холостой пробе составляет около $0,025 \text{ мин}^{-1}$.

РАСЧЁТ:

Активность СОД сыворотки вычисляют по следующей формуле:

$$A \text{ (ЕД/л)} = (V_1/V_2 - 1) n$$

или с учетом разведения сыворотки по формуле:

$$A \text{ (ЕД/г белка)} = (V_1/V_2 - 1) n / c , \quad \text{где}$$

n – разведение сыворотки,

c – концентрация белка (г/л).

При использовании неразведённой сыворотки показатель **n** в формуле не учитывается. За единицу активности супероксиддисмутазы принимают такое её количество, которое требуется для ингибирования начальной скорости автоокисления адреналина на 50%.

Лабораторная работа 22

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ

I. МЕТОД С ПРИМЕНЕНИЕМ БИХРОМАТА КАЛИЯ

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Метод основан на способности бихромата калия в уксусной кислоте во время нагревания с перекисью водорода восстанавливаться до хромацетата с формированием перхромовой кислоты, как нестабильного интермедиата. Оставшееся количество H_2O_2 определяется по измерению поглощения полученного уксуснокислого хрома в диапазоне длин волн 570-610 нм.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические весы.
2. Мерные цилиндры, колбы на 100 мл.
3. Пипетки на 1,0, 2,0 и 5,0 мл.
4. Микропипетка с переменным объёмом (с учётом объёма 0,3 мл), сменные наконечники.
5. Химические и центрифужные пробирки.
6. Термостат на 37° С.
7. рН-метр.
8. Фотоэлектроколориметр.
9. Инструменты для забоя животного и взятия проб биологического материала.
10. Гомогенизатор.
11. Центрифуга до 7000 об/мин, с охлаждением.
12. Ледяная баня, лёд.
13. Водяная баня на 100° С.

РЕАКТИВЫ:

1. 5% $K_2Cr_2O_7$ в ледяной уксусной кислоте (ЛУК), 1:3 по объёму.
2. 0,2 М H_2O_2 .

3. 0,05 М Na-K фосфатный буфер рН 7,0 (по прописи в Приложении).
4. 0,001 М ЭДТА Na (на 0,05 М фосфатном буфере рН 7,4).
5. 0,174 М KCl.
6. Тритон X-100.
7. 0,16 М основной раствор перекиси водорода для построения калибровочного графика. Готовится из концентрированного 11,76 М раствора H_2O_2 (молярность полученного раствора определяется титрованием с тиосульфатом натрия).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГОМОГЕНАТА ПЕЧЕНИ КРЫС:

Для определения активности антиокислительных ферментов орган необходимо предварительно перфузировать, чтобы освободить от следов крови, так как в эритроцитах каталаза весьма активна (также активны другие ферменты антиоксидантной защиты клетки – глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза). В печени это достигается путем перфузии печени – *v. porta in situ* – холодным 0,174 М раствором KCl. После этого печень отжимают на фильтровальной бумаге.

Так как фермент на 1/3 локализован в митохондриях, для определения общей активности фермента органеллы разрушают 1% раствором тритона X-100 в среде выделения, которая помимо тритона X-100 содержит 0,001 М раствор этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА) и 0,05 М фосфатный буфер рН 7,4.

После перфузии печени берут 500 мг навески органа, тщательно гомогенизируют в 4,5 мл среды выделения (соотношение вес/объем до 1:10). Все операции проводятся при 0–4° С. Затем гомогенат оставляют на 30 мин при той же температуре для разрушения органелл. После этого гомогенат центрифугируют при 2500 об/мин один час при температуре 0–4° С. Надосадочную жидкость используют для определения активности ферментов.

ХОД АНАЛИЗА:

К 5,0 мл буфера добавляют 0,3 мл надмитохондриальной фракции и 0,6 мл H_2O_2 , тщательно перемешивают. Отбирают пробы по 1,0 мл через 30, 60, 90, 120, 180 сек. Реакцию останавливают каждый раз добавлением 2,0 мл смеси бихромат/ЛУК. Пробы нагревают 10 мин в кипящей водяной бане, охлаждают. Измерение оптической плотности проводят при длине волны 570 нм. По калибровочной кривой опреде-

ляют количество восстановленной перекиси и далее рассчитывают активность фермента.

1 Е каталазы = 1 мкмоль H_2O_2 в мин при 25°C и pH 7,4.

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ:

Схема построения калибровочной кривой представлена в таблице 12.

Таблица 12

Построение калибровочной кривой для определения активности каталазы с помощью бихромата калия

0,16 М основной раствор перекиси водорода, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация перекиси водорода в пробе, мкмоль	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ /ЛУК, мл
1,0	0	166	2,0
0,8	0,2	128	2,0
0,6	0,4	96	2,0
0,4	0,6	64	2,0
0,2	0,8	32	2,0
0	1,0	0	2,0

Полученные пробы нагревают 10 мин в кипящей водяной бане, охлаждают и измеряют оптическую плотность при длине волны 570 нм.

II. МЕТОД С ПРИМЕНЕНИЕМ МОЛИБДАТА АММОНИЯ

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Активность фермента оценивают по скорости разложения перекиси водорода за определённое время инкубации смеси при температуре $+37^\circ\text{C}$. Количественное определение перекиси водорода проводят с помощью цветной реакции с молибденовокислым аммонием, определяя интенсивность развивающейся окраски.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические весы.
2. Мерные цилиндры.
3. Пипетки на 1,0 и 2,0 мл.
4. Микропипетка на 0,1 мл, сменные наконечники.

5. Центрифужные и химические пробирки.
6. Термостат на 37° С.
7. Центрифуга до 7000 об/мин, с охлаждением.
8. Фотоэлектроколориметр или спектрофотометр.

РЕАКТИВЫ:

1. 4 % раствор молибдата аммония.
2. 0,03 % раствор перекиси водорода.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ:

Сыворотка крови, гемолизат эритроцитов, взвесь лимфоцитов, гомогенат ткани печени.

ХОД РАБОТЫ:

К 0,1 мл сыворотки крови добавляют 2,0 мл 0,03 % раствора перекиси водорода. В холостую пробу вместо сыворотки вносят 0,1 мл дистиллированной воды. Пробы инкубируют 10 мин при 37° С. Реакцию останавливают добавлением 1,0 мл 4 % раствора молибдата аммония. Пробы центрифугируют 10 мин при 4000 об/мин. Интенсивность развивающейся окраски измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 нм против контроля. В контрольную пробу вместо перекиси добавляют 2,0 мл дистиллированной воды.

РАСЧЁТ:

Активность каталазы рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(E_x - E_0) \cdot 3,1}{V \cdot t \cdot \varepsilon}, \quad \text{где:}$$

E_x и E_0 – экстинкции холостой и опытной проб,

V – объём исследуемого материала (л),

t – время инкубации (сек),

3,1 – общее разведение,

ε – коэффициент миллимолярной экстинкции продукта взаимодействия перекиси водорода и молибдата аммония ($22,2 \cdot 10^3$ ммоль⁻¹ см⁻¹).

При определении активности каталазы в гемолизате эритроцитов или взвеси лимфоцитов производят измерение количества белка в пробе для расчёта результатов на мг белка (**количество белка в про-**

бе должно быть 1–10 мг/мл). Полученные значения используют в формуле вместо литеры V.

Активность каталазы в сыворотке крови практически здорового человека составляет $2,6 \pm 0,5$ мкат/л (Лифшиц В.М., 1996).

ТЕМА: ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ МАРКЁРНЫХ ФЕРМЕНТОВ

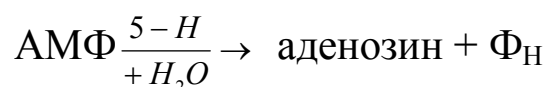
Раздел I. МАРКЁРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

МОТИВАЦИЯ:

Мембранам принадлежит важная роль в регуляции процессов жизнедеятельности целого организма и отдельной клетки, что детерминировано их структурно-метаболическими свойствами.

К маркёрным ферментам плазматической мембраны клетки относят Na^+/K^+ -АТФазу и 5'-нуклеотидазу. Их широко используют для идентификации фракций плазматических мембран, выделенных различными методами. Это интегральные энзимы, их функциональная активность зависит от состояния прилегающего слоя анулярных липидов. Оба эти фермента жизненно важны для клетки: участвуют в поддержании основных параметров ионного гомеостаза и энергетики клетки.

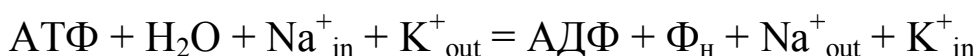
5'-нуклеотидаза (КФ 3.1.3.5). Номенклатурное название фермента: 5'-рибонуклеотид фосфогидролаза. Это липидзависимый фермент плазматической мембраны клеток, его каталитическая активность заключается в гидролизе внеклеточного АМФ с образованием внутриклеточного аденозина:



Каталитическая активность 5'-нуклеотидазы (5'-НТ) проявляется по отношению к 5'-АМФ, 5'-ЦМФ, 5'-ГМФ, 5'-ИМФ, но преимущественным субстратом для фермента служит 5'-АМФ. Активность 5'-НТ ингибируется по аллостерическому типу низкими концентрациями нуклеотидов: АТФ, УТФ, ЦТФ, ТТФ, АДФ и др., а также ионами Hg^{2+} , Fe^{2+} . Активируют работу фермента ионы Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} . 5'-НТ существует в клетке в двух формах – мембраносвязанной и растворимой. Высокая активность 5'-НТ определяется в иммунокомпетентных клетках лимфоидных органов, а также в печени. Определение активности фермента в сыворотке крови имеет диагностическое значение.

При гепатитах различной этиологии активность 5'-НТ в сыворотке крови повышается на ранних стадиях заболевания ещё до развития желтухи и увеличения активности аминотрансфераз.

Na^+/K^+ -АТФаза (К.Ф.3.6.3.9), номенклатурное название фермента: АТФ фосфогидролаза (Na^+/K^+ -обменник). Na^+/K^+ -АТФаза участвует в поддержании одного из существенных свойств, отличающих живые клетки от мёртвых: асимметричного распределения ионов натрия и калия по обе стороны клеточной мембраны. Фермент избирательно выкачивает из клетки ионы натрия и аккумулирует в ней ионы калия, используя для этой работы энергию АТФ. На каждую молекулу гидролизованного АТФ из клетки выводится три иона Na^+ и поступает в клетку два иона K^+ :



Создаваемая Na^+/K^+ -АТФазой разница концентраций одновалентных катионов используется для протекания ключевых реакций жизнедеятельности – генерации возбуждения, поддержания водно-солевого баланса, а также для регуляции клеточного метаболизма.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: познакомить студентов с методом определения активности 5'-нуклеотидазы – маркёрного фермента плазматической мембраны клеток в различных биоматериалах: суспензии плазматических мембран, суспензии лимфоцитов и в гомогенате печени крыс.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Строение и функции плазматических мембран клеток животных и человека.
2. Виды и механизмы транспорта через плазматическую мембрану.
3. Типичный спектр ферментов, присутствующих в плазматической мембране.
4. Какие ферменты, помимо 5'-нуклеотидазы, можно отнести к маркёрным ферментам плазматической мембраны клеток животных и человека?
5. Характерные функции ферментов плазматической мембраны.
6. Значение белок-липидных взаимодействий плазматической мембраны.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Приготовить необходимые для работы реактивы.

2. Работать с центрифугой, фотоколориметром, аналитическими весами.
3. Построить калибровочный график.
4. Декапитировать крысу.
5. Получить сыворотку крови без следов гемолиза.
6. Извлечь печень и гомогенизировать её в гомогенизаторе.
7. С помощью предложенного метода определить активность 5'-нуклеотидазы.
8. Произвести правильный расчет активности фермента в анализируемом биоматериале.
9. Обсудить полученные результаты и сделать выводы.

ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

1. Каковы роль и функции, выполняемые плазматической мембраной в обеспечении жизнедеятельности клеток животных и человека?
2. Механизм ферментативной реакции, катализируемой 5'-нуклеотидазой. Как осуществляется регуляция активности фермента?
3. Взаимосвязь мембранной 5'-нуклеотидазы с биоэнергетикой клетки.
4. Механизм функционирования Na^+/K^+ -АТФазы и ее регуляция.
5. На каком принципе основан метод определения активности 5'-нуклеотидазы?
6. На каком принципе основан метод определения активности Na^+/K^+ -АТФазы?
7. Какое соединение является специфическим ингибитором Na^+/K^+ -АТФазы?
8. Что произойдет с клеткой в результате подавления активности Na^+/K^+ -АТФазы?
9. Какая связь существует между активностью Na^+/K^+ -АТФазы и этиологией эссенциальной гипертензии?

Лабораторная работа 23

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ

ПРИНЦИП МЕТОДА

Активность 5'-нуклеотидазы (5'-НТ) определяют по образованию неорганического фосфора, освободившегося при гидролизе субстрата

(5'-АМФ). Определение неорганического фосфора проводят по методу В.Е. Боданского.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические и торсионные весы.
2. Химическая посуда: мерные колбы на 100 мл, цилиндры, стаканы, химические и центрифужные пробирки.
3. Микропипетки на 0,2 и 0,5 мл, сменные наконечники.
4. Пипетки на 5,0 мл.
5. Инструменты для декапитации крысы и извлечения тканей.
6. рН-метр.
7. Термостат на 37° С.
8. Центрифуга.
9. Фотоэлектроколориметр.

РЕАКТИВЫ

1. 5'-АМФ, 5 мМ раствор (ex tempore!) на 50 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,4).
2. Аскорбиновая кислота, 1 % раствор (ex tempore) водный.
3. Молибденовый реактив, 2,5 % раствор на серной кислоте (приготовление в разделе «определение неорганического фосфора по методу Боданского»).
4. MgCl₂, 10 мМ раствор.
5. Трис-НСl буфер, 50 мМ рН 7,4 (готовить по таблице в Приложении).
6. ТХУ, 10 % раствор.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ:

Активности 5'-нуклеотидазы определяют в сыворотке, суспензии плазматических мембран, суспензии лимфоцитов, гомогенате ткани печени.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

Готовят инкубационную смесь по схеме, представленной в таблице 13.

Таблица 13

Определение активности 5'-нуклеотидазы

Раствор	Холостая проба	Опытная проба
Сыворотка (гомогенат)	0,2	0,2
Трис-НСl буфер (рН 7,4)	0,5	0,5
MgCl ₂	0,2	0,2
5'-АМФ	0,2	0,2
ТХУ 10 %	2,5	–

Смесь инкубируют в течение 1 ч при 37° С и медленном покачивании. После инкубации в опытных пробах останавливают реакцию добавлением 2,5 мл охлаждённого 10 % раствора ТХУ. Белок осаждают центрифугированием в течение 10 мин при 3000 об/мин. Затем в полученной надосадочной жидкости проводят количественное определение неорганического фосфора методом Боданского по схеме, представленной в таблице 14.

Таблица 14

Определение количества неорганического фосфата

Раствор	Контроль	Опыт
Надосадочная жидкость	1,5	1,5
Молибденовый реактив	1,0	1,0
Аскорбиновая кислота	1,0	1,0

Через 10 мин фотоколориметрируют на красном светофильтре, кювета 0,5 см, против контроля на реактивы: ТХУ – 1,5 мл, молибденовый реактив – 1,0 мл, аскорбиновая кислота – 1,0 мл.

Концентрацию неорганического фосфата, образующегося при гидролизе 5'-АМФ, определяют по разнице его содержания в холостой и опытной пробах с помощью заранее построенного калибровочного графика.

РАСЧЁТ:

Активность фермента рассчитывают по формуле:

$$\text{Активность 5'-нуклеотидазы } \left(\frac{\text{мкмоль}}{\text{мин} \cdot \text{мл} \cdot \text{сыворотки}} \right) = \frac{\Phi_n}{31 \cdot t \cdot V}, \text{ где:}$$

Φ_n – количество фосфора, определенное по калибровке в 1,5 мл пробы,

31 – молекулярный вес неорганического фосфора,

t – время инкубации, мин,

V – объём сыворотки, мл.

С учётом разведения активность фермента рассчитывают по формуле:

$$\text{Активность 5'-нуклеотидазы } \left(\frac{\text{мкмоль}}{\text{мин} \cdot \text{мл} \cdot \text{сыворотки}} \right) = \frac{\Phi_n \cdot 3,6}{31 \cdot 0,2 \cdot t \cdot 1,5}, \text{ где:}$$

3,6 и 1,5 – коэффициенты пересчёта разведения на мл сыворотки крови.

Для гомогената ткани печени активность фермента рассчитывают на 1,0 мг белка в пробе или на 1,0 г ткани печени.

Раздел II. МАРКЁРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ЛИЗОСОМ

МОТИВАЦИЯ:

Во всех органах и тканях человека содержатся протеолитические ферменты. Внутриклеточные протеазы, гидролизующие белки в слабощелочной области рН, называют катепсинами. Различают пять достаточно хорошо изученных типов катепсинов, которые обозначают буквами латинского алфавита: катепсины А, В, С, D, Е.

Маркёрным ферментом лизосом является катепсин D. Увеличение активности этого фермента – один из показателей активации лизосом. Процесс активации лизосомального аппарата клетки сопровождается усилением реакций эндо- и экзоцитоза, аутофагией с последующей апластической гибелью клетки. Для характеристики степени изменения проницаемости лизосомальных мембран изучают свободную, общую и неседиментируемую (неосаждаемую) активность катепсина D, что достигается применением детергента тритона X-100. Соотношение этих показателей позволяет оценить степень проницаемости лизосомальной мембраны для субстратов и ферментов при повреждении лизосом.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:

Ознакомить студентов с методом изучения активности катепсина D в лизосомальной фракции печени.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Ферменты лизосом.
2. Реакции протеолиза с участием протеолитических ферментов.
3. Структуру лизосомальной мембраны.
4. Соединения, увеличивающие и снижающие проницаемость мембраны лизосом.
5. Определение свободной, общей и неседиментируемой активности ферментов лизосом.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Приготовить гомогенат из печени крысы.
2. Рассчитать навески, приготовить необходимые для работы реактивы.
3. Приготовить раствор гемоглобина для определения активности катепсина D.
4. Правильно провести инкубацию в присутствии тритона X-100.
5. Построить калибровочный график по тирозину.
6. Сделать расчёт активности катепсина D в нмоль тирозина/мин на 1 г печени.
7. Определить свободную и общую активность катепсина D.

ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

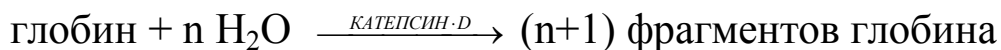
1. Структура и функции лизосом.
2. Характеристики лизосомальных ферментов.
3. Лизосомные болезни накопления.
4. Способы оценки проницаемости мембраны лизосом.
5. Методы выделения лизосом и оценки чистоты выделенной фракции лизосом.
6. Характеристика катепсина D.
7. Лабиллизаторы и стабилизаторы лизосомальной мембраны.
8. Участие лизосомального аппарата клетки в развитии патологических процессов.

Лабораторная работа 24

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНА D В ГОМОГЕНАТЕ ПЕЧЕНИ КРЫС

ПРИЦИП МЕТОДА:

Метод основан на спектрофотометрическом определении кислоторастворимых продуктов ферментативного гидролиза гемоглобина:



РЕАКТИВЫ:

1. 0,1 М ацетатный буфер, рН 5,0. Приготовление буфера: готовят 0,2 М раствор ацетата натрия, для чего 2,72 г кристаллического ацетата натрия ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) растворяют в мерной колбе на 100 мл дистиллированной водой и доводят объём раствора до метки. Смешивают 35,2 мл 0,2 М ацетата натрия и 14,3 мл 0,2 М уксусной кислоты.
2. Сахароза, 0,25 М раствор.
3. 1 % раствор гемоглобина в 0,1 М ацетатном буфере (рН 5,0).
4. ТХУ, 10 % раствор.
5. Тритон X-100, 1 % раствор.
6. Стандартный раствор тирозина: 30,0 мг тирозина растворить в 100 мл 10 % раствора ТХУ (0,1 мл такого раствора содержит 0,165 мкмоль тирозина).

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические и аптечные весы, разновесы.
2. Мерные цилиндры и колбы на 25, 50 и 100 мл.
3. Химические и центрифужные пробирки.
4. Пипетки на 5,0 мл. Пипетки переменного объёма на 0,2 и 1,0 мл, сменные наконечники.
5. Термостат на 37°С. Ледяная баня, лёд.
6. рН-метр.
7. Инструменты для забоя животного и взятия проб биологического материала.
8. Гомогенизатор.
9. Центрифуга до 4000 об/мин.
10. Спектрофотометр.

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОГО ГРАФИКА ПО СТАНДАРТНЫМ РАСТВОРАМ ТИРОЗИНА:

Для количественного определения тирозина готовят ряд его стандартных растворов по схеме, представленной в таблице 15.

Оптические плотности стандартных растворов тирозина измеряют при длине волны 280 нм против слепой пробы. Калибровочный график отражает зависимость оптической плотности стандартных растворов от содержания тирозина в пробе.

Таблица 15

Схема построения калибровочного графика

№ проб стандартных растворов	Стандартный раствор тирозина, мл	Содержание тирозина в пробе, мкмоль	Дист. вода, мл	10 % раствор ТХУ, мл
Слепая проба	–	–	2,55	0,6
1	0,1	0,165	2,55	0,5
2	0,2	0,330	2,55	0,4
3	0,3	0,495	2,55	0,3
4	0,4	0,660	2,55	0,2
5	0,5	0,825	2,55	0,1

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Навеску печени крысы 200 мг измельчают ножницами и гомогенизируют в 0,25 М растворе сахарозы в соотношении 1:2 (ткань/сахароза).

Определение свободной активности катепсина D. К 0,3 мл гомогената печени добавляют 0,15 мл раствора гемоглобина. Реакционную смесь перемешивают и инкубируют при +37° С в течение 30 мин. После окончания инкубации реакцию останавливают добавлением 0,6 мл 10 % раствора ТХУ.

Определение общей активности катепсина D. К 0,3 мл гомогената добавляют 0,1 мл 1 % раствора тритона X-100 и преинкубируют смесь при температуре +37° С в течение 10 мин. По истечении времени преинкубации к смеси приливают 0,15 мл раствора гемоглобина и пробу инкубируют в течение 30 мин при температуре +37° С. Точно по завершении времени инкубации реакцию останавливают добавлением 0,6 мл 10 % раствора ТХУ.

Далее, в пробу на свободную активность катепсина D (без тритона X-100) добавляют 2,1 мл дистиллированной воды; в пробу на об-

щую активность катепсина D (с тритоном X-100) добавляют 2,0 мл дистиллированной воды. Обе пробы центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин. Супернатанты из каждой пробы аккуратно отбирают и измеряют их оптические плотности при длине волны 280 нм против дистиллированной воды.

Одновременно с определением свободной и общей активности катепсина D необходимо поставить контроли на оптическую плотность субстрата и исследуемого материала. С этой целью готовят два контроля:

1. Контроль без тритона X-100 (контроль 1): в отдельную пробирку вносят 0,3 мл гомогената и помещают её на 30 мин в холодильник (ледяную баню). Затем в пробирку последовательно добавляют 0,6 мл раствора ТХУ, 0,15 мл раствора гемоглобина и 2,1 мл дистиллированной воды.

2. Контроль с тритоном X-100 (контроль 2): в отдельную пробирку вносят 0,3 мл гомогената, 0,1 мл раствора тритона X-100 и помещают на 30 мин в холодильник (ледяную баню). Затем последовательно добавляют 0,6 мл раствора ТХУ, 0,15 мл раствора гемоглобина и 2,0 мл дистиллированной воды.

Обе контрольные пробы центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин. Супернатанты из каждой пробы аккуратно отбирают и измеряют их оптические плотности при длине волны 280 нм против дистиллированной воды.

РАСЧЁТ:

Активность катепсина D вычисляют по формуле:

$$A_D \text{ (нмоль тирозина /мин на 1 г печени)} = \frac{X \cdot 10 \cdot 1000 \cdot 20}{3 \cdot 30}, \text{ где}$$

X – количество мкмоль тирозина по калибровочному графику, найденное с помощью ΔE . Для определения свободной активности фермента ΔE представляет собой разницу оптических плотностей между опытом (проба на свободную активность фермента) и контролем без тритона X-100 (контроль 1). Для определения общей активности фермента ΔE представляет собой разницу оптических плотностей между опытом (проба на общую активность фермента) и контролем с тритоном X-100 (контроль 2);

10/3 – коэффициент пересчёта на 1 мл исследуемого материала;

1000 – коэффициент пересчёта в нмоль;

30 – коэффициент пересчёта на 1 мин инкубации.

Активность катепсина D можно вычислить без помощи калибровочного графика, если воспользоваться формулой:

$$\Delta E \bullet 122,22 = \text{нмоль тирозина}/(\text{мин на } 1 \text{ г печени})$$

Лабораторная работа 25

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ

МОТИВАЦИЯ:

Кислая фосфатаза является ферментом лизосом и считается типичным маркерным ферментом этих внутриклеточных структур.

Фосфатазами называются ферменты, катализирующие отщепление остатка фосфорной кислоты от органических соединений. Фосфатазы подразделяются на фосфодиэстеразы и фосфомоноэстеразы. В зависимости от оптимума pH различают несколько групп фосфомоноэстераз. Наибольшее значение имеет определение фосфомоноэстеразы I или щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) с оптимумом pH 8,6–10,1, а также фосфомоноэстеразы II или кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2) с оптимумом pH 5,0–5,5.

Однако следует заметить, что обнаружение в тканях кислой фосфатазы с помощью пара-нитрофенилфосфата и β -глицерофосфата не может служить доказательством лизосомной природы этих ферментов.

Во-первых, кислые фосфатазы, расщепляющие данные субстраты, обнаружены не только в лизосомах, но и в цитозоле клетки. При этом для различных органов выявлены различные соотношения в распределении кислой фосфатазы между лизосомами и цитозолем.

Во-вторых, кислые фосфатазы лизосом и цитоплазмы отличаются по своей специфичности к субстратам. Кислая фосфатаза цитоплазмы, как правило, с большей интенсивностью расщепляет пара-нитрофенилфосфат, а лизосомная – β -глицерофосфат.

В-третьих, не являются идентичными некоторые свойства кислой фосфатазы лизосом, выделенных из различных тканей. Оказалось, что кислая фосфатаза, содержащаяся в желчи, почках, эритроцитах и предстательной железе, отличается от кислой фосфатазы, содержащейся в надпочечниках, тонкой кишке, печени, поджелудочной желе-

зе, селезенке и щитовидной железе, тем, что активность первой тормозится алкоголем, а активность второй остаётся без изменений. Одновременно установлено, что муравьиный альдегид является ингибитором фосфатазы эритроцитов и не влияет на активность фосфатазы простатического происхождения. В свою очередь, кислая фосфатаза предстательной железы полностью инактивируется винной кислотой.

Таким образом, селективное торможение кислой фосфатазы простаты винной кислотой и отсутствие торможения её муравьиным альдегидом стали основой для определения источника кислой гиперфосфатаземии.

В дифференциальной диагностике большое значение имеет определение кислой фосфатазы при новообразованиях предстательной железы – органа, наиболее богатого этим ферментом. Установлено, что большая часть кислой фосфатазы, содержащейся в предстательной железе, по своим свойствам идентична кислой фосфатазе лизосом. Отмечено, что при раке простаты повышение активности фермента встречается в 20 % случаев, а при метастазах опухоли предстательной железы в кости – в 50–90 % случаев.

ПРИЦИП МЕТОДА:

Определение фосфомоноэстеразной активности кислой фосфатазы основано на измерении количества неорганического фосфата, отщепляющегося под действием фермента от субстрата, в качестве которого используют β -глицерофосфат.

РЕАКТИВЫ:

1. 0,1 N раствор HCl.
2. 0,1 N раствор NaOH.
3. Исходный раствор β -глицерофосфата. В мерную колбу на 100 мл вносят 1 г натрий- β -глицерофосфата и 0,82 г барбитурово-кислого натрия (мединала), приливают около 30,0 мл дистиллированной воды, растворяют и доводят до метки.
4. Щелочной раствор β -глицерофосфата. В колбу на 100 мл помещают 50,0 мл исходного раствора β -глицерофосфата, 2,8 мл 0,1 N раствора NaOH и доводят дистиллированной водой до метки (pH=8,6).
5. 1 N раствор CH₃COOH.

6. Кислый раствор β -глицерофосфата. В колбу на 100 мл помещают 50 мл исходного раствора β -глицерофосфата, 5 мл 1 N CH_3COOH и доводят водой до метки (рН раствора $5,0 \pm 0,1$).
7. 10 % раствор ТХУ.
8. 2,5 % молибденовый реактив. 2,5 г молибденово-кислого аммония растворяют в 60,0 мл дистиллированной воды, фильтруют. Раствор вносят в мерную колбу на 100 мл. В другой колбе к 25,0 мл дистиллированной воды приливают 7,5 мл концентрированной H_2SO_4 . Второй раствор приливают к первому и доводят водой до метки.
9. 1 % раствор аскорбиновой кислоты (готовят ex tempore!).

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические весы.
2. Мерные цилиндры и колбы на 100 мл.
3. Пипетки на 2,0 мл. Пипетки с переменным объёмом на 0,2 и 1,0 мл, сменные наконечники.
4. Химические и центрифужные пробирки, воронки.
5. Центрифуга.
6. рН-метр.
7. Суховоздушный термостат на $+37^\circ \text{C}$.
8. Инструменты для декапитации крысы.
9. Фотоэлектроколориметр или спектрофотометр.

ХОД РАБОТЫ:

В две пробирки наливают по 1,0 мл щелочного раствора β -глицерофосфата. Первую ставят на водяную баню или в термостат при температуре 37°C и дают постоять несколько минут, чтобы пробирка прогрелась. В подогретую пробирку осторожно вводят 0,1 мл свежезятой сыворотки, смешивают, оставляют на 1 час при 37°C .

Этот час используют для определения количества фосфора во второй пробирке – контрольной. К 1,0 мл щелочного раствора β -глицерофосфата прибавляют 0,1 мл той же сыворотки, что и в первой пробе, затем добавляют 1,1 мл 10 % раствора ТХУ, перемешивают и оставляют на 5 мин в холодильнике для лучшего осаждения белка. Далее пробу центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин. Берут 1,5 мл центрифугата для определения содержания фосфора колориметрическим методом.

Спустя час первую пробирку вынимают из термостата (водяной бани) на 37° С, добавляют 1,1 мл 10 % раствора ТХУ, перемешивают, оставляют на 5 мин в холодильнике и центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Из супернатанта отбирают пробу 1,5 мл, в которой определяют количество фосфора.

Во все пробы для определения фосфора (объемом 1,5 мл) добавляют по 1,0 мл молибденового реактива, затем по 1,0 мл 1 % аскорбиновой кислоты. Параллельно ставят контрольную пробу: 1,5 мл раствора ТХУ, 1,0 мл молибденового реактива, 1,0 мл 1 % аскорбиновой кислоты. Спустя 10 мин пробы колориметрируют с красным светофильтром против контроля на реактивы.

Количество неорганического фосфата определяют с помощью калибровочного графика. При построении графика используют рабочий стандартный раствор фосфора, содержащий 0,01 мг неорганического фосфата (Таблица 2 в разделе «калибровочные графики»).

РАСЧЁТ:

Активность кислой фосфатазы выражается в мг неорганического фосфата (Φ_n). Рассчитывают количество мг Φ_n , присутствующего в пробирках 1 (P_1) и 2 (P_2). Рассчитывают разность ($P_1 - P_2$), характеризующую то количество неорганического фосфата, которое освободилось в результате деятельности фосфатазы, содержащейся в 0,1 мл сыворотки крови.

Для пересчёта на 100 мл сыворотки необходимо полученную разность умножить на 1000. Если P_1 и P_2 – количество освободившегося неорганического фосфата с участием фосфатазы, то активность фосфатазы, выражаемая в единицах В.Е. Боданского, вычисляется по формуле:

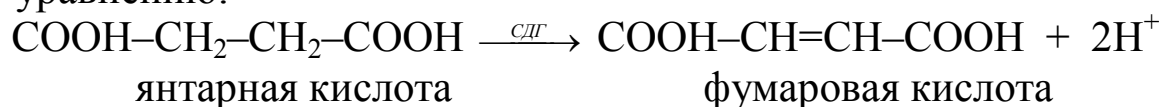
$$\text{Активность фосфатазы, (ед. Боданского)} = (P_1 - P_2) \cdot 1000.$$

Активность кислой фосфатазы в сыворотке здорового человека составляет: у взрослых 2–5 ед, у детей – 5–15 ед. Если активность фосфатазы выше 60 мг Φ_n за час, то интенсивность гидролиза может относительно уменьшиться из-за недостатка фосфата. В этих случаях сыворотку надо развести в 5 раз и повторить определение.

Раздел III. МАРКЁРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ МИТОХОНДРИЙ

МОТИВАЦИЯ:

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) локализована во внутренней (сопрягающей) мембране митохондрий и не встречается ни в каком другом внутриклеточном компартменте. Сукцинатдегидрогеназа (КФ.1.3.99.1), номенклатурное название фермента сукцинат: (акцептор) – оксидоредуктаза. Сукцинатдегидрогеназа катализирует одну из реакций цикла трикарбоновых кислот согласно следующему уравнению:



СДГ – ФАД⁺-зависимый фермент, вследствие чего электроны, поступающие в дыхательную цепь митохондрий при окислении янтарной кислоты, проходят только 2-й и 3-й пункты фосфорилирования. Это сопровождается синтезом двух молекул АТФ.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:

Познакомить студентов с методом определения активности сукцинатдегидрогеназы в суспензии изолированных митохондрий печени крыс.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Строение и принципы функционирования дыхательной цепи сопрягающей мембраны митохондрий.
2. Локализацию СДГ в митохондриях.
3. Строение сукцинатдегидрогеназы.
4. Механизм функционирования СДГ и регуляция активности фермента.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Приготовить необходимые для работы реактивы.
2. Работать с центрифугой, фотоколориметром, аналитическими весами.
3. Декапитировать крысу.
4. Извлечь печень и гомогенизировать её в гомогенизаторе.
6. Провести дифференциальное центрифугирование гомогената с выделением фракции митохондрий.
7. Провести определение активности сукцинатдегидрогеназы.

8. Произвести правильный расчет активности фермента в анализируемом биоматериале.
9. Обсудить полученные результаты и сделать выводы.

ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

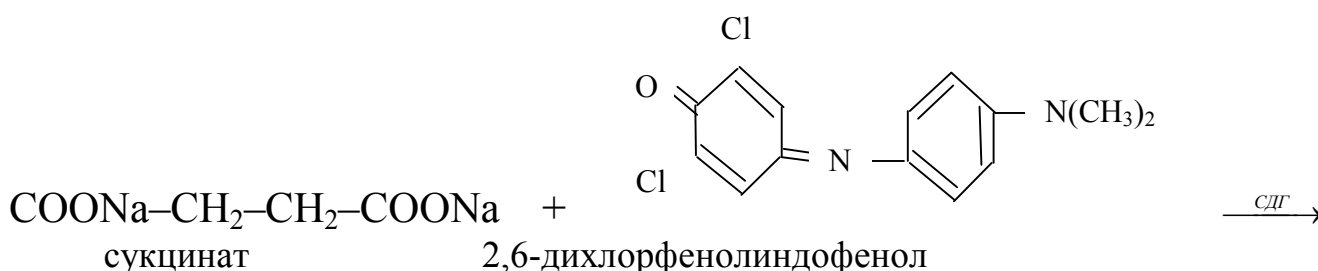
1. Цикл Кребса, его биологическое значение.
2. На каком этапе работы цикла Кребса происходит образование янтарной кислоты?
3. Назовите метаболит цикла Кребса, образующийся в результате окисления янтарной кислоты.
4. В чем состоит уникальная роль процесса окисления янтарной кислоты в обеспечении клеток метаболически доступной энергией?
5. Локализация, особенности строения сукцинатдегидрогеназы.
6. Механизмы функционирования и варианты регуляции активности сукцинатдегидрогеназы.
7. Назовите комплекс дыхательной цепи митохондрий, принимающий электроны от окисляющейся янтарной кислоты.
8. Какой пункт сопряжения в дыхательной цепи митохондрий минуют электроны при окислении янтарной кислоты?
9. Принцип метода определения активности сукцинатдегидрогеназы?

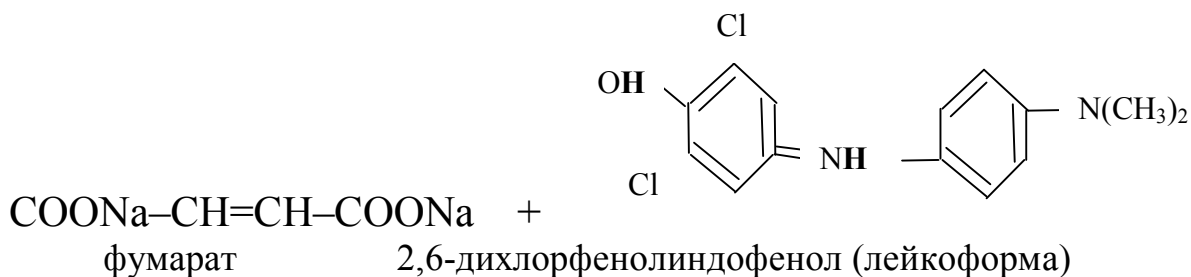
Лабораторная работа 26

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Метод основан на оценке скорости падения оптической плотности 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) при длине волны 600 нм, который восстанавливается в присутствии феназинметасульфата (ФМС) в ходе ферментативного окисления сукцината:





РЕАКТИВЫ:

1. 0,5 М раствор сукцината натрия.
2. Биуретовый реактив.
3. 0,1 М К/Na-фосфатный буфер (рН 7,4). Для приготовления буфера смотри таблицу в Приложении.
4. 0,02 М раствор феназинметасульфата.
5. 0,001 М раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола.
6. 0,05 М раствор цианида калия.

Последние три раствора готовят и используют в день опыта.

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические и аптечные весы.
2. Стаканы, мерные цилиндры, колбы на 25, 50, 100 мл.
3. Пипетки с переменным объёмом на 0,2 и 1,0 мл, сменные наконечники.
4. Химические и центрифужные пробирки.
5. Скоростная центрифуга с охлаждением.
6. Ледяная баня, лёд.
7. рН-метр.
8. Спектрофотометр, секундомер.
9. Инструменты для забоя животного и взятия проб биологического материала.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА:

Определение активности сукцинатдегидрогеназы проводят в суспензии митохондрий печени крысы. Для исследования берут 1 г печени, гомогенизируют в фосфатном буфере в соотношении 1:7 (ткань/среда выделения).

Суспензии митохондрий подвергают замораживанию и оттаиванию с последующим отмыванием части балластных белков гипотоническим раствором буфера (0,01 М К/Na-фосфатный буфер, рН 7,4).

ХОД РАБОТЫ:

Перед исследованием в суспензии митохондрий необходимо определить содержание белка (используется выполненная ранее калибровочная кривая). Полученные данные потребуются в ходе методики и во время расчёта активности сукцинатдегидрогеназы.

В пробы (конечный объём 4,0 мл) вносят 0,3 мл буферного раствора, а затем последовательно по 0,2 мл растворов сукцината натрия, феназинметасульфата, цианида калия и 2,6-дихлорфенолиндофенола. Последний раствор вносят в пробы за 10 мин до определения активности фермента. Не следует заблаговременно смешивать растворы сукцината, феназинметасульфата, 2,6-дихлорфенолиндофенола, так как может произойти неферментативное восстановление ДХФИФ. Содержимое пробирки перемешивают и инкубируют в водяной бане или термостате при 37° С в течение 2–3 мин. Затем в подогретую кювету фотометра (длина хода луча 2 см) вносят суспензию митохондрий, которая должна содержать 0,1–0,2 мг белка в 0,1–0,2 мл буферного раствора. Приготовленную смесь переливают в ту же кювету и на секундомере отмечают начало реакции. Кювету устанавливают в термостатированный при 37° С кюветодержатель и регистрируют падение оптической плотности при длине волны 600 нм через каждые 15 сек в течение 2-х мин. Аналогичным образом регистрируют падение оптической плотности в пробах, не содержащих сукцината, – пробы с "эндогенной активностью". При расчёте истинной активности сукцинатдегидрогеназы величину "эндогенной активности" фермента вычитают из величин, выражающих активность сукцинатдегидрогеназы в пробах, содержащих сукцинат. В контрольные кюветы, против которых измеряют оптическую плотность всех проб, вносят буферный раствор. Измерение активности сукцинатдегидрогеназы в суспензии митохондрий проводят по возможности быстро – в течение 2–3 мин.

РАСЧЁТ:

Для расчёта активности сукцинатдегидрогеназы используют величину падения оптической плотности (в ходе ферментативной реакции) за 1 мин на 1 мг белка. Активность сукцинатдегидрогеназы выражают в нмолях окисленного сукцината, учитывая, что снижение оптической плотности на 1,0 эквивалентно восстановлению 60 нмоль 2,6-дихлорфенолиндофенола, а количество восстановленного красителя пропорционально количеству окисленного сукцината.

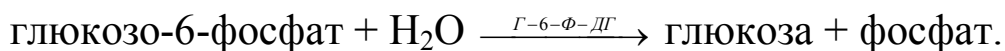
В полученных указанным методом суспензиях митохондрий активность сукцинатдегидрогеназы составляет $82,1 \pm 3,5$ нмоля окисленного сукцината за 1 мин на 1 мг белка.

Раздел IV. МАРКЁРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ФРАКЦИИ МИКРОСОМ

МОТИВАЦИЯ:

Чистоту фракции мембран эндоплазматического ретикулума, выделенных путем дифференциального центрифугирования, можно оценить по активности фермента глюкозо-6-фосфатазы, который связан с микросомальной фракцией. Глюкозо-6-фосфатаза (КФ 3.1.3.9) представляет собой фосфогидролазу, высокоспецифичную по отношению к D-глюкозо-6-фосфату.

Глюкозо-6-фосфатаза катализирует реакцию:



Глюкозо-6-фосфатаза содержится в основном в микросомах печени, почек и слизистой оболочке тонкого кишечника. Фермент имеет широкий оптимум рН между 6,0–7,0. Обычно его активность измеряют при рН 6,5.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ:

Познакомить студентов с методом определения активности глюкозо-6-фосфатазы, которая является маркерным ферментом фракции микросом.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН ЗНАТЬ:

1. Что представляет собой фракция микросом, которую можно получить с помощью дифференциального центрифугирования гомогената печени.
2. Виды, структура и функции эндоплазматического ретикулума животной клетки.
3. Ферментный комплекс мембран эндоплазматического ретикулума.
4. Субстраты и продукты системы микросомальных монооксигеназ.
5. Строение и функции цитохрома Р-450.
6. Особенности токсического типа повреждения клетки.

СТУДЕНТ ДОЛЖЕН УМЕТЬ:

1. Приготовить необходимые для работы реактивы.
2. Работать с центрифугой, фотоколориметром, аналитическими весами.
3. Построить калибровочный график для определения неорганического фосфата.
4. Декапитировать крысу, извлечь печень и приготовить гомогенат.
5. Провести дифференциальное центрифугирование с выделением фракции микросом.
6. Провести определение активности глюкозо-6-фосфатазы и корректно вычислить активность фермента.
7. Обсудить полученные результаты и сделать выводы.

ВОПРОСЫ ПО ТЕМЕ ЗАНЯТИЯ:

1. Структура и функции микросомальной системы окисления гепатоцитов. Роль печени в детоксикации ксенобиотиков.
2. Субстраты, ферменты и продукты микросомальной монооксигеназной системы со смешанными функциями.
3. Характеристика и спектр функциональной активности цитохрома P-450.
4. Основные этапы гидроксилирования.
5. Взаимодействие субстратов гидроксилирования с цитохромом P-450.
6. Участие цитохрома P-450 в окислении ксенобиотиков и природных субстратов.
7. Индукторы и ингибиторы микросомального окисления.
8. Механизм токсического действия CCl_4 .
9. Токсификация и детоксикация.
10. Токсический тип повреждения клетки.

Лабораторная работа 27

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТАЗЫ В ГОМОГЕНАТЕ ПЕЧЕНИ КРЫС

ПРИНЦИП МЕТОДА:

Об активности реакции, катализируемой глюкозо-6-фосфатазой, можно судить по скорости увеличения концентрации неорганического фосфата, освобождаемого в результате гидролиза субстрата – D-глюкозо-6-фосфата, в среде инкубации.

РЕАКТИВЫ:

1. 0,1 М цитратный буфер, рН 6,5: 2,101 г лимонной кислоты ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) растворяют в 50–75 мл дистиллированной воды в мерной колбе на 100 мл, значение рН доводят до 6,5 при помощи 30 % раствора NaOH или KOH, доливают до метки водой.
2. 0,08 М раствор глюкозо-6-фосфата ($C_6H_{11}O_9P \cdot 7H_2O$). 417 мг бариевой соли глюкозо-6-фосфата суспендируют в 2–3 мл дистиллированной воды. Добавляют столько 1 N раствора HCl, чтобы соль растворилась. Затем добавляют 114 мг Na_2SO_4 или 139 мг K_2SO_4 . Тщательно перемешивают и центрифугируют. Осадок Ba_2SO_4 отбрасывают. К надосадочной жидкости осторожно добавляют каплю раствора Na_2SO_4 . Осадок не должен образоваться. Значение рН доводят до 6,5 при помощи 30 % раствора NaOH или KOH, доливают дистиллированной водой до 10 мл.
3. 10 % раствор ГХУ.
4. 2,5 % раствор молибдата аммония. 2,5 г молибденово-кислого аммония растворяют в 60,0 мл дистиллированной воды, фильтруют. Раствор вносят в мерную колбу на 100 мл. В другой колбе к 25,0 мл дистиллированной воды приливают 7,7 мл концентрированной H_2SO_4 . Второй раствор приливают к первому и после охлаждения доводят водой до метки.
5. 1 % раствор аскорбиновой кислоты (свежеприготовленный).

ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ:

1. Аналитические и аптечные весы.
2. Мерные цилиндры, колбы на 100 мл.
3. Пипетки: 1,0 и 2,0 мл. Микропипетка на 0,1 мл, сменные наконечники.

4. Инструменты для забоя животного и взятия проб биологического материала. Гомогенизатор.
5. Центрифуга до 3000 об/мин. Скоростная центрифуга с охлаждением.
6. Центрифужные и химические пробирки.
7. Ледяная баня, лёд.
8. Водяная баня или суховоздушный термостат на 37° С.
9. рН-метр.
10. Фотоэлектроколориметр.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА:

Печень быстро извлекают из брюшной полости и тотчас охлаждают. Взвешивают 250 мг ткани, гомогенизируют с 9,75 мл буфера и фильтруют. Гомогенат содержит 2,5 мг печени в 0,1 мл. Гомогенат можно хранить на ледяной бане около 1 часа.

Микросомы обычно выделяют из 4 г печени, в пробы добавляют количество микросом, содержащее 100–150 мкг белка (см. тему «Подготовка биологического материала»).

ХОД РАБОТЫ:

На каждую пробу ставят одну контрольную пробу 1, а на каждую серию – дополнительно одну контрольную пробу 2.

В центрифужные пробирки отмеривают:

1. Опытная проба: 0,1 мл фильтрованного гомогената, инкубируют 5 мин при 37° С, добавляют 0,1 мл раствора глюкозо-6-фосфата.
2. Контрольная проба 1: 0,1 мл фильтрованного гомогената, 0,1 мл буфера.
3. Контрольная проба 2: 0,1 мл буфера, 0,1 мл раствора глюкозо-6-фосфата.

Содержимое пробирок перемешивают, отмечают время каждого добавления. Каждую пробу оставляют при 37° С на 15 мин. По истечении периода инкубации во все пробирки добавляют по 2,0 мл 10 % раствора ТХУ, затем пробы центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин.

В супернатанте проводят количественное определение неорганического фосфата. К 1,5 мл центрифугата добавляют 1,0 мл молибденового реактива, затем 1,0 мл 1% раствора аскорбиновой кислоты и спустя 10 мин колориметрируют с красным светофильтром в кювете с толщиной рабочего слоя 0,5 см.

РАСЧЁТ:

Активность глюкозо-6-фосфатазы в пробе вычисляют по формуле:

$$\text{Активность фермента (мкмоль } \Phi_{\text{H}}/\text{проба)} = \frac{E_v - E_{k_1}}{E_s} \cdot [p] \cdot 2,2, \quad \text{где}$$

E_v – экстинкция раствора опытной пробы;

E_{k_1} – экстинкция раствора контрольной пробы 1;

E_s – экстинкция раствора стандартной пробы;

$[p]$ – мкмоль Φ_{H} в стандартной пробе (здесь: 0,5 мкмоль);

2,2 – объём пробы (мл) после добавления ТХУ.

Для пересчёта содержания неорганического фосфата в другие

единицы – $\frac{\text{мкмоль } \Phi_{\text{H}}}{\text{мин} \cdot \text{г} \text{ ткани}}$: результат следует умножить на $\frac{1000}{15 \cdot 2,5}$,

где:

2,5 – мг ткани в пробе для ферментативной реакции;

15 – время рабочего хода ферментативной реакции, мин;

1000 – пересчёт для перехода от миллиграммов к граммам.

ЧАСТЬ IV. КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

Контрольные вопросы для подготовки к итоговым занятиям по курсу «БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТКИ»

Семинар № 1. «Механизмы процессов фотосинтеза. Общие вопросы биоэнергетики»

1. Каким образом образуется электромагнитное излучение, улавливаемое хлорофиллом и другими пигментами фотосинтеза?
2. В чем отличие фототрофных и хемотрофных организмов?
3. Какова функция и устройство фотосистем 1 и 2 фотосинтеза?
4. Каким образом осуществляется связь фотосистем 1 и 2 фотосинтеза?
5. Чему равно изменение свободной энергии химической реакции, укажите уравнение, с помощью которого можно её определить. Какие реакции относятся к экзергоническим?
6. Чему будет равна свободная энергия реакции, если константа химического равновесия равна 1,0?
7. Что такое признак аддитивности, и каким образом экспериментально можно определить свободную энергию гидролиза молекулы АТФ?
8. Что такое энергетический заряд клетки Аткинсона, и чему он может быть равен?
9. Какие способы окисления в клетке были предложены Вилли и Дедье?
10. Перечислите лимитирующие стадии гликолиза.
11. Напишите уравнение типичной реакции фотосинтеза и укажите также, какие доноры и акцепторы могут в ней участвовать.
12. Что собой представляют граны хлоропластов и какую функцию они выполняют?

13. Какую метаболическую функцию выполняет цикл Кальвина при фотосинтезе?
14. Что такое ациклический поток фотосинтеза? Укажите продукты этого процесса.
15. Как и где происходит синтез АТФ при фотосинтезе?
16. Укажите причины макроэргичности молекулы АТФ.
17. Нарисуйте структуру молекулы АТФ, укажите заряды группировок, определяющие макроэргические свойства АТФ
18. Как выглядит кривая активности процессов расходования АТФ при изменении энергетического заряда клетки Анкинсона от 1,0 до 0?
19. Напишите стадии преобразования пирувата при спиртовом брожении и опишите условия, в которых обычно протекает спиртовое брожение.
20. В чём состоит отличие ферментов гексокиназы и глюкокиназы?
21. В чём состоят функции пигментов фотосинтеза, и какие пигменты фотосинтеза Вы знаете?
22. В чём заключается главная особенность фотосинтеза?
23. Нарисуйте сопрягающую мембрану хлоропласта и укажите протекающие в ней процессы.
24. Как Вы себе представляете связь процессов в фотосинтезирующей клетке с процессами у гетеротрофных клеток?
25. Перечислите методы количественного определения АТФ.
26. Каким образом и почему меняется свободная энергия гидролиза АТФ при изменении рН, и как она будет меняться при усилении щелочности среды?
27. Почему АТФ занимает центральное место в энергетике клетки?
28. Перечислите основные ферменты глюконеогинеза и укажите, на каких стадиях они работают.
29. Какими продуктами заканчивается I стадия гликолиза, на каких этапах идёт при гликолизе субстратное фосфорилирование?
30. Как выглядит кривая активности процессов синтеза молекулы АТФ при изменении энергетического заряда клетки от 1,0 до 0? Укажите схематично.

Семинар. № 2.

«Механизмы биоэнергетических процессов в митохондриях, их регуляция и нарушения. Митохондриальные болезни»

1. Почему окисление янтарной кислоты имеет преимущество перед окислением других субстратов в патологических условиях клетки?
2. Перечислите биохимические реакции, приводящие к образованию восстановленных флавопротеинов – ФПН2.
3. Укажите принципы конформационной и хемиосмотической гипотез.
4. Поясните принцип функционирования I, II и III комплексов дыхательной цепи митохондрий. Каким образом в этих участках осуществляется транспорт протона?
5. Что представляет собой химера Рэкера-Стоккениуса, как она функционирует? и какое отношение имеет этот факт для гипотезы окислительного фосфорилирования?
6. Какую функцию выполняют железосернистые центры в цепи электронного транспорта?
7. Каким образом классифицируются цитохромы?
8. Чем определяется гидрофобность убихинона в митохондриальной мембране?
9. Какие из цитохромов прочно связаны с мембраной, какие нет и почему?
10. Как используется мембранный потенциал, создающийся на клеточных и митохондриальных мембранах клетки?
11. Что необходимо для синтеза АТФ в клетке? Нарисуйте схематично и укажите место транслоказ в этих процессах.
12. Как осуществляется транспорт восстановленного НАДН2 из цитозоля в митохондрии. Укажите все известные Вам механизмы.
13. Как осуществляется транспорт субстратов через митохондриальную мембрану? Укажите известные Вам примеры.

14. Что представляет собой КоQ (убихинон)? Перечислите его функции в мембране.
15. Каким образом включаются структуры железосернистых центров в апобелок? Нарисуйте схематично.
16. Чем отличаются друг от друга цитохромы цепи электронного транспорта?
17. В каких точках цепи электронного транспорта митохондрий происходит наибольший перепад СВП?
18. Как распределяется мощность дыхательной цепи митохондрий?
19. Какую функцию в цепи электронного транспорта выполняют молекулы убихинона?
20. Каким образом может регулироваться преимущественное протекание процесса расщепления глюкозы или глюконеогенеза?
21. Какие водородпереносящие митохондриальные челноки Вам известны? Укажите схему работы глицерофосфатного шунта.
22. Почему использование жирных кислот в метаболических реакциях тормозит расход глюкозы?
23. Нарисуйте схематично расположение переносчиков в дыхательной цепи митохондрий и укажите, как они связываются друг с другом. Обозначьте места самых высоких перепадов потенциалов между ними и поясните, зачем это может быть нужно.
24. В каком направлении движутся электроны в цепи дыхательных переносчиков в мембране митохондрий и почему?
25. Нарисуйте схематично, как выглядит железосерный центр.
26. Объясните, как простетическая группа цитохрома связана с полипептидной цепью?
27. Как доказывается последовательность распределения дыхательных переносчиков в дыхательной цепи?
28. Что представляет собой химическая структура цитохромоксидазы и каковы ее функции?
29. Каким образом можно выделить комплексы дыхательной цепи?
30. Какие вещества, разобщающие окислительное фосфорилирование, вы знаете? Укажите причины их действия.

31. Как с помощью химической модификации компонентов митохондриальной мембраны и СМЧ можно определить их топографию?
32. Опишите конкретные принципы и механизмы химических гипотез окислительного фосфорилирования.
33. Опишите схематично устройство III комплекса цепи дыхательных компонентов и механизм транспорта протонов в этом комплексе.
34. Опишите схематично устройство митохондриальной АТФ-азы и её функционирование.
35. Характеристика и структура НАД и НАДФ. Как работают ферменты, в которых НАД и НАДФ являются коферментами?
36. Какие соотношения между НАД и НАДФ имеются в различных отделах клетки, и какое влияние это оказывает на ведущие метаболические процессы в клетке?
37. Покажите устройство IV комплекса дыхательной цепи, как осуществляется транспорт протонов в этом пункте?
38. Опишите устройство и функции Fe-S-центров в дыхательной цепи.
39. Опишите конкретно механохимические гипотезы сопряжения окислительного фосфорилирования.
40. Как движутся электроны в цепи дыхательных ферментов митохондриальных мембран, и где происходит выход протонов в межмембранное пространство митохондрий?
41. Представьте схему синтеза ФЭП в ходе глюконеогенеза.
42. Каков принцип работы трансгидрогеназной реакции и её значение в энергетике митохондрий и метаболизме клетки?
43. Где образуется в процессе окислительного фосфорилирования градиент протонов и электрохимический потенциал? Как можно доказать его наличие?
44. Что будет происходить с интенсивностью окислительных процессов при воздействии динитрофенола на митохондриальную мембрану?
45. Что представляет собой химера Рэкера-Стоккениуса, как она функционирует, и какое отношение имеет этот факт для гипотезы окислительного фосфорилирования?

46. Какие митохондриальные метаболические реакции приобретают первостепенное значение в условиях гипоксического состояния ткани?
47. Что такое "циклы субстратных взаимопревращений", и как с их помощью может регулироваться интенсивность метаболизма?
48. Перечислите ингибиторы движения транспорта движения электронов по цепи электронного транспорта митохондрий.
49. Что такое "эффект Пастера"? Укажите его механизм.
50. Дайте определение митохондриальным болезням.
51. Опишите устройство митохондриального генома и его мутации.
52. Приведите особенности и классификацию митохондриальных болезней.
53. Что такое синдром Luft?
54. Дайте определение мутациям рибосомальной РНК митохондрий, их значение в возникновении болезней митохондрий.
55. Что представляют собой болезни MERRF и MELAS?
56. Опишите Менделевский тип наследования.
57. Какова частота встречаемости мутаций митохондриальной ДНК?

Контрольные вопросы для подготовки к экзамену по курсу «БИОЭНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТКИ»

Лекция 1.

1. История развития представлений о биоэнергетике. Роль российских учёных в развитии взглядов о процессах окислительного фосфорилирования.
2. Основной источник и пути превращения энергии в природе. Фотосинтез. Доноры и акцепторы фотосинтеза. Внутриклеточная организация фотосинтезирующих систем у бактерий, прокариотов и эукариотов.
3. Строение хлоропластов. Световая и темновая реакции фотосинтеза. Процессы, происходящие в цитозоле и тилакоидной мембране хлоропластов.

Лекция 2.

1. Пигменты фотосинтеза. Эффекты возбуждений молекулы пигмента светом. I и II системы фотосинтеза, связь систем. Главная особенность фотосинтеза.
2. Циклический и ациклический потоки фотосинтеза. Теории и механизмы окислительного фосфорилирования в хлоропластах. Количественное соотношение фотофосфорилирования и переноса электронов.
3. Термодинамическая оценка энергетики фотосинтеза.

Лекция 3.

1. Характеристика сопрягающих мембран тилакоидов хлоропластов. Сопрягающий фактор хлоропластов. Связь фотосинтеза с процессами у гетеротрофных организмов.
2. Запасы биомассы в биосфере. Годовая продукция биомассы в биосфере. Оценка энергии, которой оперирует человек, как экологическая система.
3. Молекулярный механизм преобразования энергии в клетке. Катаболизм, анаболизм, I и II законы биоэнергетики. Принцип биохимической воронки. Формы передачи химической энергии от катаболических окислительно-восстановительных реакций к анаболическим.

Лекция 4.

1. Первый и второй законы биоэнергетики. Понятие о свободной энергии химической реакции.
2. Изменение стандартной свободной энергии химической реакции. Эндергонические и экзергонические реакции. Условия термодинамического анализа биохимических систем.
3. Понятие об аддитивности химической реакции. Стандартная свободная энергия АТФ. Структурные особенности АТФ и АДФ. Структурные аспекты изменений гидролиза молекулы АТФ.
4. Принципы методов определения количества АТФ. Факторы, влияющие на скорость гидролиза АТФ. Высокоэнергетические и низкоэнергетические фосфаты. Пути ферментативного переноса фосфатных групп.

Лекция 5.

1. Макроэргические соединения. Фосфагены, их значение в клетке. Особенности обмена и функции адениловых нуклеозидтрифосфатов. Роль цАМФ и пиродифосфата.
2. Стандартные концентрации АТФ, АДФ и АМФ в клетке. Энергетический заряд клетки Аткинсона. Адениловая система – центральное звено энергетики клетки. Типы механизмов аккумуляции энергии в клетке.
3. Использование АТФ как энергетического и химического соединения в клетке.
4. Понятие о первичных акцепторах электронов при окислении. Способы окисления органических веществ в клетке.

Лекция 6.

1. Механизмы аккумуляции энергии в клетке. Гликолиз в качестве источника энергии в клетке. Глюконеогенез. Общая схема. Энергетический выход гликолиза.
2. Подробная характеристика процессов I этапа гликолиза.
3. Характеристика II стадии гликолиза. Окисление ФГА в ФГК. Окисление ФГК в ПВК.
4. Регуляция реакций гликолиза.
5. Обмен гликогена. Регуляция обмена гликогена.

Лекция 7.

1. Окисление кетокислот – пирувата, α -кетоглутарата. Характеристика пируватдегидрогеназного комплекса.
2. Реакции цикла Кребса как источника энергии в клетке, регуляторные реакции цикла трикарбоновых кислот.
3. Пути синтеза сукцинил-КоА. Процесс β -окисления жирных кислот как источник энергии в клетке. Типы тиокиназ, транспорт жирных кислот через митохондриальную мембрану.

Лекция 8.

1. Общая схема энергетики клетки. Запасание энергии в дыхательной цепи митохондрий. Расчёт коэффициента запасания энергии при окислении ФГА в клетке.
2. Понятие об окислительно-восстановительных реакциях, стандартном восстановительном потенциале. Уравнение Нернста.
3. Теории биологического окисления. Современная теория биологического окисления, её основные компоненты.
4. Характеристика пиридиннуклеотидов. Пиридинзависимые дегидрогеназы. Спектры содержания пиридиннуклеотидов в клетке. Регуляторные функции пиридиннуклеотидов.
5. Флавінзависимые дегидрогеназы характеристика их спектров.

Лекция 9.

1. Характеристика компонентов дыхательной цепи – убихинон.
2. Характеристика компонентов дыхательной цепи – цитохромы группы А, В и С.
3. Характеристика компонентов дыхательной цепи – цитохромы группы А. Цитохромоксидаза как протонный насос митохондрий.
4. Пункты наибольшего перепада потенциала в дыхательной цепи, сопряжённые с фосфорилированием. Необходимый и действительный окислительно-восстановительный потенциал мест, обеспечивающих фосфорилирование в дыхательной цепи.
5. Характеристика потока электронов по дыхательной цепи.

Лекция 10.

1. Характеристика ингибиторов по отношению к процессам дыхательной цепи митохондрии.

2. Экспериментальное доказательство расположения пунктов, приводящих к фосфорилированию в дыхательной цепи.
3. Структурированность энергетических процессов. Методические подходы для определения топографии дыхательных переносчиков. Методы определения и характеристики топографии переносчиков в мембране.
4. Химическая гипотеза сопряжения (Lippmann, 1948; Slayter, 1963), механохимическая гипотеза (1965, 1974), конформационная гипотеза (Boyer, 1953). Предпосылки их возникновения.

Лекция 11.

1. Предпосылки возникновения хемиосмотической гипотезы.
2. Основные постулаты хемиосмотической гипотезы Р. Mitchell (1961). Способы окисления аскорбата.
3. Сопрягающая мембрана – структурированность и процессы, в ней происходящие в представлении Р. Mitchell.
4. Комплексы окислительной цепи в сопрягающих мембранах и их функционирование.
5. Трансгидрогеназная реакция как IV пункт сопряжения. Функции трансгидрогеназного звена энергетического сопряжения.

Лекция 12.

1. Экспериментальное подтверждение хемиосмотической гипотезы – механизм действия разобщителей и ионофоров.
2. Роль мембран, протондвижущая сила и мембранный потенциал как экспериментальное подтверждение хемиосмотической гипотезы.
3. Косвенное доказательство наличия мембранного потенциала в митохондриях – ТФБ, ТФФ, АНС, другие синтетические проникающие ионы В.П. Скулачёва.
4. Функционирование сопрягающего устройства по схемам Р. Mitchell (1961, 1968). Вещества, ингибирующие синтез и гидролиз АТФ.

Лекция 13.

1. Фосфорилирование АДФ в АТФ-азе протонного насоса в представлении П. Митчелла. Три механизма образования АТФ. Субъединицы $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой АТФ-азы.

2. Методы реконструкции цепи окислительного фосфорилирования. Реконструкция цепи окислительного фосфорилирования. Бактериородопсиновая химера Efraim Racker – Watler Stockenius (1975).
3. Свободное окисление.
4. Мембранный потенциал как унифицированная форма энергии в клетке.

Лекция 14.

1. Проницаемость внутренней и внешней мембран митохондрии. Классификация видов транспорта через мембрану.
2. Движение анионов и катионов через внутреннюю митохондриальную мембрану.
3. Активный транспорт иона, типы активного транспорта. Предполагаемые механизмы функционирования Ca^{2+} -АТФ-азы и K^+/Na^+ -АТФ-азы. Биологический смысл функционирования.
4. Челночные митохондриальные шунты, смысл их существования в клетке. Глицерофосфатный, оксибутиратный и малатный шунты.
5. Изменение объема и формы митохондрии в процессе энергизации.
6. Пируват-малатный цикл. Взаимосвязь субстратных потоков малатного шунта с транспортом глутамата, аскорбата, α -кетоглутарата.

Лекция 15.

1. Регуляция углеводного обмена. Эффект Пастера. Причины снижения утилизации глюкозы и уровня лактата. Пункты первичного и вторичного контроля гликолитической цепи.
2. Регуляторные реакции гликолиза, их характеристика и регуляция.
3. Регуляция интенсивности процессов гликолиза окислением пирувата, кетоновых тел и жирных кислот.
4. Адениловая система, Ca^{2+} , субстратные циклы как усилители регуляции.
5. Субстратные циклы взаимопревращения, их автоколебания и авторегуляции.

Лекция 16.

1. Структура митохондрий. Химический состав и особенности наружной и внутренней мембран митохондрий. Компарментализация ферментов митохондрий.
2. Получение субклеточных компонентов клетки и их изучение, методы изучения функциональной активности митохондрий.
3. Полярнографический метод изучения дыхания митохондрий.
4. Основные метаболические состояния митохондрии.
5. Низкоэнергетический сдвиг – характеристика и условия возникновения.

Лекция 17.

1. Глюконеогенез, основные реакции. Ключевое звено глюконеогенеза – синтез ФЭП. Регуляция глюконеогенеза. Энергетическое обеспечение глюконеогенеза.
2. ЦТК, регуляторные ферменты. Регуляция ЦТК энергетическим статусом клетки.
3. Гипоксическое состояние ткани. Обращение ЦТК. Регуляция ЦТК соотношением окисленно-восстановленных форм пиридиннуклеотидов.
4. Сукцинатзависимая энергетика, её роль в метаболизме, источники янтарной кислоты в организме. Характер сопряженного окисления янтарной кислоты – обратный перенос электронов и т.д.
5. Зависимость действия янтарной кислоты от физиологического состояния организма, митохондрий, пути использования и синтеза сукцината клеткой.
6. Регуляция энергетического обмена в клетке гормонами.

Вопросы для подготовки к итоговым занятиям по курсу «ХИМИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ»

Семинар «АПОПТОЗ»

1. Характеристика некроза и апоптоза.
2. Ингибиторы и индукторы апоптоза.
3. Каспазы и их ингибиторы.
4. Механизмы гибели клеток при апоптозе.
5. Биологическое значение апоптоза.
6. Иммунологические маркеры апоптоза.
7. Биохимические основы старения клеток.
8. Значение апоптоза в развитии заболеваний.
9. Методы изучения апоптоза.

Семинар «ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТКЕ»

1. Задачи и методы цитологии ферментов.
2. Ферменты транспортных систем плазматической мембраны клетки.
3. Ферменты синтеза нуклеиновых кислот в клетке.
4. Ферменты ядра клетки (кроме ферментов синтеза нуклеиновых кислот).
5. Ферменты синтеза белка.
6. Ферменты цепи переноса электронов внутренней мембраны митохондрий.
7. Ферменты цикла трикарбоновых кислот.
8. Ферменты гликолиза.
9. Ферменты пентозофосфатного пути.
10. Ферменты лизосом.
11. Ферменты микросомальной фракции.

Семинар «ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ»

1. Активные формы кислорода и их роль в перекисных процессах.
2. Образование и метаболизм перекиси водорода в клетке.
3. Пероксисомы. Структура и функции, ферменты пероксисом.
4. Цепной свободнорадикальный механизм перекисного окисления липидов.
5. Образование продуктов ПОЛ на примере линоленовой кислоты.
6. Методы изучения процессов ПОЛ. Определение содержания свободных радикалов, продуктов ПОЛ, антиоксидантов, активности ферментов антиоксидантной защиты.
7. Регуляция процессов перекисного окисления липидов.
8. Прооксиданты. Механизмы действия.
9. Источники Fe^{2+} для процессов ПОЛ.
10. Ингибирование ПОЛ антиоксидантами.
11. Глутатион-пероксидазная система клетки.
12. Классификация перекисных систем в клетке.
13. Биологическая роль перекисей липидов в клетке.
14. ПОЛ и проблемы злокачественного роста.
15. ПОЛ при атеросклерозе.
16. Образование перекисей липидов в клетке при действии ионизирующего излучения.
17. Свободные радикалы и антиоксиданты при лазерной терапии.
18. Окислительный стресс. Перекисная гипотеза гибели клетки.

Контрольные вопросы для подготовки к экзамену по курсу «ХИМИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ»

1. Повреждение, адаптация и гибель клетки.
2. Общий адаптационный синдром. Стадии стресс-реакции. Зависимость адаптивных реакций от силы раздражителя.
3. Срочная и долговременная адаптация. Стресс-реализующие и стресс-лимитирующие системы. Роль глюкокортикоидов в реализации стресс-реакции.
4. Типы повреждения клеток: перекисный, гипоксический, токсический, апластический. Примеры.
5. Этапы гибели клеток при некрозе.
6. Общая характеристика апоптоза. История открытия апоптоза.
7. Биохимические и морфологические изменения клеток при апоптозе.
8. Внутриклеточные и внеклеточные индукторы апоптоза.
9. Митохондриальный путь активации апоптоза. Трансмембранный потенциал митохондрий.
10. Каспазы. Характеристика, основные функции. Семейства каспаз.
11. Fas-опосредуемый апоптоз. Рецепторы, адаптеры, каспазы.
12. Механизмы гибели клетки при апоптозе. Асимметричность мембранных липидов, участие белка p53.
13. Ингибиторы апоптоза. Роль теломеразы при апоптозе.
14. Механизмы апоптотической гибели клетки при повреждении внутриклеточных структур, дефиците ростовых факторов.
15. Заболевания, связанные с усилением и угнетением апоптоза. СПИД, нейродегенеративные, онкологические заболевания, вирусные инфекции.
16. Строение и функции мембран клетки. Плазматическая мембрана. Методы выделения субклеточных фракций. Критерии чистоты выделения.
17. Характеристика липидов мембран, структура и свойства. Образование дефектов в мембране.
18. Белки мембран, методы выделения и изучения их свойств. Солюбилизация мембранных белков, детергенты.
19. Белки плазматической мембраны эритроцитов. Структурные, рецепторные белки, мембранно-связанные ферменты.
20. Транспорт веществ через мембрану. Пассивный и активный механизмы транспорта.

21. Межклеточные взаимодействия. Гликокаликс, внеклеточный матрикс клетки, их состав и функции. Роль в патологии.
22. Адгезивность. Рецепторы клеточной адгезии, их взаимодействие с белками внеклеточного матрикса.
23. Механизм межклеточного взаимодействия с участием сигнальных молекул. Типы межклеточной сигнализации: эндокринная, синаптическая, аутокринная, паракринная. Специфичность сигналов.
24. Классификация первичных мессенджеров. Взаимодействие липофильных и гидрофильных молекул с рецепторами.
25. Механизм взаимодействия стероидных гормонов с внутриклеточными рецепторами.
26. Рецепторы клеточной поверхности. Рецепторы, сопряжённые с G-белками. Регулируемые ионные каналы. Рецепторы, ассоциированные с тирозиновыми протеинкиназами.
27. Каталитические рецепторы. Гуанилатциклаза, тирозинфосфатаза, серин/треониновая и тирозин/сериновая протеинкиназы.
28. Рецепторные тирозинкиназы. Механизм каскадной передачи сигналов. Ассоциация рецепторов и автофосфорилирование. Функции Ras-белка.
29. Перекисное окисление липидов. Значение свободнорадикального окисления. Свободные радикалы и продукты ПОЛ.
30. Цепной свободнорадикальный механизм ПОЛ. Особенности перекисного окисления липидов мембран и биологических жидкостей.
31. Образование продуктов ПОЛ при окислении линоленовой кислоты. Малоновый диальдегид.
32. Методы определения содержания свободных радикалов и продуктов ПОЛ.
33. Образование перекиси водорода в клетке. Неферментативный и ферментативный механизмы.
34. Пероксисомы, функции, ферментный состав. Патология пероксисом.
35. Факторы регуляции перекисного окисления липидов. Прооксиданты, антиоксиданты.
36. Антирадикальные и антиперекисные системы клетки.
37. Классификация перекисных систем клетки.
38. Образование перекисей липидов в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме, лизосомах, цитозоле.

39. Биологическая роль перекисного окисления липидов в организме. Синтез простагландинов. Окисление холестерина. Связь ПОЛ с гидроксигированием.
40. ПОЛ при патологии: старение, злокачественный рост, атеросклероз, катаракта, действие ионизирующих излучений.
41. Окислительный стресс. Перекисный тип повреждения клетки.
42. Структура и функции микросом. Микросомальная система окисления. Роль печени в детоксикации ксенобиотиков.
43. Ферменты микросом. Моноксигеназы, маркерные ферменты. Характеристика цитохрома Р-450.
44. Основные этапы гидроксигирования.
45. Субстраты гидроксигирования, характеристика ферментов и продуктов гидроксигирования. Способы оценки микросомального окисления печени.
46. Взаимодействие субстратов гидроксигирования с цитохромом Р-450.
47. Участие цитохрома Р-450 в окислении ксенобиотиков и природных субстратов.
48. НАДН-зависимые реакции гидроксигирования.
49. Индукторы и ингибиторы микросомального окисления.
50. Механизм токсического действия CCl_4 .
51. Токсификация, детоксикация. Токсический тип повреждения клетки.
52. Лизосомы, история открытия. Структура и функции лизосом.
53. Этапы образования первичных и вторичных лизосом. Ферменты лизосом.
54. Мембрана лизосом, проницаемость для субстратов и ферментов. Методы исследования лизосом.
55. Реакции лизосом при адаптации. Защитная функция лизосом.
56. Значение лизосом при воспалении, роль в патологии.
57. Лизосомные болезни накопления. Дефицит лизосомальных ферментов.
58. Апластический тип повреждения клетки. Развитие некротических процессов.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Максимальные значения концентраций и удельного веса некоторых широко используемых растворов

Вещество	Удельный вес	Максимальная концентрация	
		(%)	нормальность/ молярность
Уксусная кислота (CH ₃ COOH)	1,07	99,5	17,4/17,4
	1,05	80,0	14,3/14,3
Азотная кислота (HNO ₃)	1,42	71,0	16/16
	1,38	61,27	13,42/13,42
Соляная кислота (HCl)	1,19	37,2	12/12
Фосфорная кислота (H ₃ PO ₄)	1,69	85,0	4,9/14,7
Серная кислота (H ₂ SO ₄)	1,84	95,3	9/18
Хлорная кислота (HClO ₄)	1,15	70,0	11,6/11,6
Гидроксид аммония (NH ₄ OH)	0,9	27,0	14,3/14,3

Растворимость солей и оснований в воде

	K	Na	Ba	Ca	Mg	Al	Cr III	Fe II	Fe III	Mn II	Zn	Ag	Hg II	Cu II	Pb II
OH	р	р	р	м	м	н	н	н	н	н	н	–	–	н	н
Cl	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	н	р	р	м
S	р	р	р	м	р	–	–	н	–	н	н	н	н	н	н
SO ₃	р	р	н	н	н	–	–	н	–	н	н	н	н	н	н
SO ₄	р	р	н	м	р	р	р	р	р	р	р	м	р	р	н
PO ₄	р	р	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н
CO ₃	р	р	н	н	н	–	–	н	н	н	н	н	н	н	н
SiO ₃	р	р	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	–	н	н
NO ₃	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р
H ₃ C ₂ O ₂	р	р	р	р	р	м	р	р	р	р	р	р	р	р	р

В левом столбце даны кислотные остатки и гидроксил,
в верхней строке – металлы; римские цифры означают их валентность.
Буква "р" – растворимое в воде соединение,
буква "м" – малорастворимое,
буква "н" – нерастворимое.
Черта в клетке – данная соль не существует или разлагается водой.

Атомные массы элементов

ЭЛЕМЕНТ	АТОМНЫЙ НОМЕР	АТОМНАЯ МАССА	ЭЛЕМЕНТ	АТОМНЫЙ НОМЕР	АТОМНАЯ МАССА
Азот	N 7	14,0067	Натрий	Na 11	22,9898
Алюминий	Al 13	26,9815	Неодим	Nd 60	144,24
Аргон	Ar 18	39,948	Неон	Ne 10	20,179
Барий	Ba 56	137,33	Никель	Ni 28	58,69
Бериллий	Be 4	9,0122	Ниобий	Nb 41	92,9064
Бор	B 5	10,81	Олово	Sn 50	118,69
Бром	Br 35	79,904	Осмий	Os 76	190,20
Ванадий	V 23	50,9415	Палладий	Pd 46	106,42
Висмут	Bi 83	208,9804	Платина	Pt 78	195,08
Водород	H 1	1,0079	Празеодим	Pr 59	140,9077
Вольфрам	W 74	183,85	Рений	Re 75	186,207
Гадолиний	Gd 64	157,25	Родий	Rh 45	102,9055
Галлий	Ga 31	69,72	Ртуть	Hg 80	200,59
Гафний	Hf 72	178,49	Рубидий	Rb 37	85,4678
Гелий	He 2	4,0026	Рутений	Ru 44	101,07
Германий	Ge 32	72,59	Самарий	Sm 62	150,36
Гольмий	Ho 67	164,9304	Свинец	Pb 82	207,20
Диспрозий	Dy 66	162,50	Селен	Se 34	78,96
Европий	Eu 63	151,96	Сера	S 16	32,06
Железо	Fe 26	55,847	Серебро	Ag 47	107,8682
Золото	Au 79	196,9665	Скандий	Sc 21	44,9559
Индий	In 49	114,82	Стронций	Sr 38	87,62
Иод	I 53	126,9045	Сурьма	Sb 51	121,75
Иридий	Ir 77	192,22	Таллий	Tl 81	204,383
Иттербий	Yb 70	173,04	Тантал	Ta 73	180,9479
Иттрий	Y 39	88,9059	Теллур	Te 52	127,60
Кадмий	Cd 48	112,41	Тербий	Tb 65	158,9254
Калий	K 19	39,0983	Титан	Ti 22	47,88
Кальций	Ca 20	40,08	Торий	Th 90	232,0381
Кислород	O 8	15,9994	Тулий	Tm 69	168,9342
Кобальт	Co 27	58,9332	Углерод	C 6	12,011
Кремний	Si 14	28,0855	Уран	U 92	238,0289
Криптон	Kr 36	83,80	Фосфор	P 15	30,9738
Ксенон	Xe 54	131,29	Фтор	F 9	18,9984
Лантан	La 57	138,9055	Хлор	Cl 17	35,453
Литий	Li 3	6,941	Хром	Cr 24	51,996
Лютеций	Lu 71	174,967	Цезий	Cs 55	132,9054
Магний	Mg 12	24,305	Церий	Ce 58	140,12
Марганец	Mn 25	54,9380	Цинк	Zn 30	65,38
Медь	Cu 29	63,546	Цирконий	Zr 40	91,22
Молибден	Mo 42	95,94	Эрбий	Er 68	167,26
Мышьяк	As 33	74,9216			

Прописи наиболее распространенных буферных систем

Карбонатный буфер (натриевый)

Буферная смесь: $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{--NaHCO}_3$, 0,2 М, рН 9,2–10,7

Na_2CO_3 , м.в.=106; 0,2 М раствор содержит 21,2 г/л.

NaHCO_3 , м.в.=84; 0,2 М раствор содержит 16,8 г/л.

рН смеси при 20°C	Na_2CO_3 0,2М, мл	NaHCO_3 0,2М, мл	рН смеси при 20°C	Na_2CO_3 0,2М, мл	NaHCO_3 0,2М, мл
9,2	4,0	50	10,0	27,5	50
9,3	7,5	50	10,1	30,0	50
9,4	9,5	50	10,2	33,0	50
9,5	13,0	50	10,3	35,5	50
9,6	16,0	50	10,4	38,5	50
9,7	19,5	50	10,5	40,5	50
9,8	22,0	50	10,6	42,5	50
9,9	25,0	50	10,7	45,0	50

Фосфатный буфер (натрий-калиевый)

Буферная смесь: $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--KH}_2\text{PO}_4$ (1/15 М), рН 5,59–8,04

$\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, м.в.=178,05; 1/15 М раствор содержит 11,876 г/л.

KH_2PO_4 , м.в.=136,09; 1/15 М раствор содержит 9,078 г/л.

рН смеси	Na_2HPO_4 1/15 М, мл	KH_2PO_4 1/15 М, мл	рН смеси	Na_2HPO_4 1/15 М, мл	KH_2PO_4 1/15 М, мл
5,59	0,5	9,5	6,98	6,0	4,0
5,91	1,0	9,0	7,17	7,0	3,0
6,24	2,0	8,0	7,38	8,0	2,0
6,47	3,0	7,0	7,72	9,0	1,0
6,64	4,0	6,0	8,04	9,5	0,5
6,81	5,0	5,0			

Фосфатный буфер (натриевый)

Буферная смесь: $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$ (0,2 М), рН 5,8–8,0

$\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, м.в.=178,05; 0,2 М раствор содержит 35,61 г/л.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, м.в.=358,22; 0,2 М раствор содержит 71,64 г/л.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, м.в.=138,0; 0,2 М раствор содержит 27,6 г/л.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, м.в.=156,03; 0,2 М раствор содержит 31,21 г/л.

рН смеси	Na_2HPO_4 0,2 М, мл	NaH_2PO_4 0,2 М, мл	рН смеси	Na_2HPO_4 0,2 М, мл	NaH_2PO_4 0,2 М, мл
5,8	8,0	92,0	7,0	61,0	39,0
6,0	12,3	87,7	7,2	72,0	28,0
6,2	18,5	81,5	7,4	81,0	19,0
6,4	26,5	73,5	7,6	87,0	13,0
6,6	37,5	62,5	7,8	91,0	8,5
6,8	49,0	51,0	8,0	94,7	5,3

Фосфатный буфер

Буферная смесь: KH_2PO_4 – $\text{KOH}(\text{NaOH})$ (0,05 М), рН 5,8–8,0

KH_2PO_4 (однозамещенный), м.в.=136,09; 0,2 М раствор содержит 27,218 г/л.

рН при 25°C	0,2М KH_2PO_4 , мл	0,2 М $\text{KOH}(\text{NaOH})$, мл	Разведение
5,8	5	0,36	Водой до 20 мл
6,0	5	0,56	— // —
6,2	5	0,81	— // —
6,4	5	1,16	— // —
6,6	5	1,64	— // —
6,8	5	2,24	— // —
7,0	5	2,91	— // —
7,2	5	3,47	— // —
7,4	5	3,91	— // —
7,6	5	4,24	— // —
7,8	5	4,45	— // —
8,0	5	4,61	— // —

Буферные растворы, содержащие глицин

Буферная смесь: глицин–соляная кислота; рН 2,2–3,6

Глицин, м.в.=75,07; 0,2 М раствор содержит 15,01 г/л.

рН	0,2М раствор глицина, мл	0,2 М HCl , мл	Разведение
2,2	25	22,0	Разбавить водой до 100 мл
2,4	25	16,2	— // —
2,6	25	12,1	— // —
2,8	25	8,4	— // —
3,0	25	5,7	— // —
3,2	25	4,1	— // —
3,4	25	3,2	— // —
3,6	25	2,5	— // —

Буферная смесь: глицин–гидроксид натрия; рН 8,6–10,6

Глицин, м.в.=75,07; 0,2М раствор содержит 15,01 г/л.

рН	0,2М раствор глицина, мл	0,2 М NaOH , мл	Разведение
8,6	25	2,0	Разбавить водой до 100 мл
8,8	25	3,0	— // —
9,0	25	4,4	— // —
9,2	25	6,0	— // —
9,4	25	8,4	— // —
9,6	25	11,2	— // —
9,8	25	13,6	— // —
10,0	25	16,0	— // —
10,4	25	19,3	— // —
10,6	25	22,75	— // —

0,05 М триэтаноламиновый буфер; рН 6,8-8,6

Триэтаноламин · HCl, м.в.=185,7; 0,1 М раствор содержит 18,57 г/л.

рН	0,1 М раствор триэтанол-амин · HCl, мл	0,1 М раствор NaOH, мл	Разведение	рН	0,1 М раствор триэтанол-амин HCl, мл	0,1 М раствор NaOH, мл	Разведение
6,8	10	1,20	Разбавить водой до 20 мл — // — — // — — // —	7,8	10	5,20	Разбавить водой до 20 мл — // — — // — — // —
7,0	10	1,80		8,0	10	6,3	
7,2	10	2,43		8,2	10	7,2	
7,4	10	3,16		8,4	10	8,0	
7,6	10	4,01		8,6	10	9,20	

Лимоннокислый буфер (натриевый)

Буферная смесь: **цитрат–натриевая соль лимонной кислоты (0,1М); рН 3,0–6,6**

Лимонная кислота·H₂O, м.в.=210,14; 0,1 М раствор содержит 21,01 г/л.

Na₃–цитрат·2H₂O, м.в.=294,12; 0,1 М раствор содержит 29,41 г/л.

рН	0,1 М лимонная кислота, мл	0,1 М Na ₃ –цитрат, мл
3,0	18,6	1,4
3,2	17,2	2,8
3,4	16,0	4,0
3,6	14,9	5,1
3,8	14,0	6,0
4,0	13,1	6,9
4,2	12,3	7,7
4,4	11,4	8,6
4,6	10,3	9,7
4,8	9,2	10,8
5,0	8,2	11,8
5,2	7,3	12,7
5,4	6,4	13,6
5,6	5,5	14,5
5,8	4,7	15,3
6,0	3,8	16,2
6,2	2,8	17,2
6,4	2,0	18,0
6,6	1,4	18,0

Трис–буфер

Буферная смесь: **трис-(гидроксиметил)-аминометан – HCl (0,05 M);
pH 7,2–9,1**

Трис-(гидроксиметил)-аминометан, м.в.=121,14; 0,2 M раствор содержит 24,33 г/л.

pH		0,2 M "трис", мл	0,1 N HCl, мл	Разведение
23°C	37°C			
9,10	8,95	25	5,0	Водой до 100 мл
8,92	8,78	25	7,5	— // —
8,74	8,60	25	10,0	— // —
8,62	8,48	25	12,5	— // —
8,50	8,37	25	15,0	— // —
8,40	8,27	25	17,5	— // —
8,32	8,18	25	20,0	— // —
8,23	8,10	25	22,5	— // —
8,14	8,00	25	25,0	— // —
8,05	7,90	25	27,5	— // —
7,96	7,82	25	30,0	— // —
7,87	7,73	25	32,5	— // —
7,77	7,63	25	35,0	— // —
7,66	7,52	25	37,5	— // —
7,54	7,40	25	40,0	— // —
7,36	7,22	25	42,5	— // —
7,20	7,05	25	45,0	— // —

* Вместо добавления 0,1 N HCl лучше использовать титрование 1 N HCl до нужного значения pH, а затем довести объем водой до 100 мл.

Ацетатный буфер

Буферная смесь: **CH₃COONa–CH₃COOH (0,2 M); pH 3,6–5,8**

CH₃COONa·3H₂O, м.в.=133,05; 0,2 M раствор содержит 26,61 г/л

pH при 18°C	0,2 M CH ₃ COONa, мл	0,2 M CH ₃ COOH, мл
3,6	0,75	9,25
3,8	1,20	8,80
4,0	1,80	8,20
4,2	2,65	7,35
4,4	3,70	6,30
4,6	4,90	5,10
4,8	5,90	4,10
5,0	7,00	3,00
5,2	7,90	2,10
5,4	8,60	1,40
5,6	9,10	0,90
5,8	9,40	0,60

Вероналовый буфер

Буферная смесь: **5,5-диэтилбарбитурат Na – соляная кислота; pH 6,8– 9,6**
5,5-диэтилбарбитурат Na (веронал Na, барбитон Na), м.в.=206,18;
0,04 М раствор содержит 8,25 г/л.

pH	0,04М 5,5-диэтилбарбитурат Na, мл	0,2М HCl, мл
6,8	100	18,4
7,0	100	17,8
7,2	100	16,7
7,4	100	15,3
7,6	100	13,4
7,8	100	11,47
8,0	100	9,39
8,2	100	7,21
8,4	100	5,21
8,6	100	3,82
8,8	100	2,52
9,0	100	1,65
9,2	100	1,13
9,4	100	0,70
9,6	100	0,35

Боратные буферные растворы

Буферная смесь: **бура–борная кислота (0,2 М); pH 7,4–9,0**
Бура ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$), м.в.=381,43; 0,05 М раствор содержит 19,072 г/л.
Борная кислота, м.в.=61,84; 0,2 М раствор содержит 12,368 г/л.

pH	0,05М раствор буры, мл	0,2 М борная кислота, мл
7,4	1,0	9,0
7,6	1,5	8,5
7,8	2,0	8,0
8,0	3,0	7,0
8,2	3,5	6,5
8,4	4,5	5,5
8,7	6,0	4,0
9,0	8,0	2,0

Буферная смесь: **бура–гидроксид натрия (0,2 М); рН 9,3–10,1**
 Бура ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$), м.в.=381,43; 0,05 М раствор содержит 19,072 г/л.

рН	0,05М раствор буры, мл	0,2 М NaOH, мл	Разведение
9,3	25	0,0	Водой до 100 мл
9,4	25	5,5	— // —
9,6	25	11,5	— // —
9,8	25	17,0	— // —
10,0	25	21,5	— // —
10,1	25	23,0	— // —

Длины волн по светофильтрам на фотоэлектроколориметре

Светофильтр	Приблизительная длина волны, нм
Синий	415 ± 10
Сине-зеленый	500 ± 10
Зеленый	530 ± 10
Оранжевый	600 ± 10
Красный	630 ± 10

Таблица подбора светофильтров

Окраска раствора	Приблизительная область длин волн, нм	Светофильтр	Приблизительная область длин волн, нм
Фиолетовая	400-450	Желто-зеленый	560-575
Синяя	450-480	Желтый	575-590
Зелено-синяя	480-490	Оранжевый	590-625
Сине-зеленая	490-500	Красный	625-750
Зеленая	500-560	Пурпурный	-
Желто-зеленая	560-575	Фиолетовый	400-450
Желтая	575-590	Синий	450-480
Оранжевая	590-625	Желто-зеленый	480-490
Красная	625-750	Сине-зеленый	490-500

МЕЖДУНАРОДНАЯ СИСТЕМА ЕДИНИЦ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Масса – скалярная величина, характеризующая инерционные и гравитационные свойства тела. Массу тела в состоянии покоя определяют взвешиванием на весах. Результат взвешивания называют массой, а не весом и выражать в единицах массы – килограммах (*кг*), граммах (*г*), дольных от грамма – миллиграммах (*мг*), микрограммах (*мкг*), нанограммах (*нг*). Единицами массы следует пользоваться для выражения результатов биохимических исследований веществ, относительная молекулярная масса которых не известна.

Количество вещества – величина, определяемая числом структурных элементов (атомов, молекул, ионов, электронов и других частиц) в изучаемом веществе. За единицу количества вещества принят *моль*. Моль – это количество вещества, содержащее столько структурных единиц, сколько содержится атомов в 0,012 кг изотопа углерода ^{12}C . Число частиц в моле любого вещества одно и то же. Оно равно $6,02 \cdot 10^{23}$ и называется постоянной Авогадро. Кратные и дольные единицы от моль – киломоль (*кмоль*), миллимоль (*ммоль*), микромоль (*мкмоль*) и др. Количество вещества применяют для выражения результата исследования веществ, относительная молекулярная масса которых известна.

Молярная масса – это масса вещества, взятого в количестве 1 моль. Ее выражают в *кг/моль* или *г/моль* и обычно обозначают буквой *M*. В общем случае молярная масса вещества, выраженная в граммах, численно равна его относительной молекулярной (атомной) массе, выраженной в атомных единицах массы. Это означает, что при необходимости взять 1 моль вещества, следует брать число граммов этого вещества, равное его относительной молекулярной (атомной) массе.

Массовая концентрация компонента – отношение массы компонента к объему смеси. Единицы в СИ – $\text{кг}/\text{м}^3$ в биохимических исследованиях – *г/л*.

Молярная концентрация компонента (молярность) – отношение количества вещества к объему смеси. Единицы в СИ – $\text{моль}/\text{м}^3$, в биохимических исследованиях – *моль/л* (для выражения концентраций веществ с известной относительной молярной массой).

Нормальная концентрация (нормальность или молярная концентрация эквивалента) выражается количеством эквивалентов веще-

ства, содержащегося в 1 л раствора. Раствор, в 1 л которого содержится один эквивалент растворимого вещества, называется нормальным, 0,1 экв. вещества – децинормальным, 0,01 экв. – сантинормальным, 0,001 экв. – миллинормальным. Термин *грамм-эквивалент вещества* обозначает такое его количество в граммах, которое в данной реакции без остатка соединяется, вытесняет или эквивалентно 1,008 г водорода (т.е. 1 г-атом).

Активность фермента – понятие, применяемое для количественной характеристики ферментов как биологических катализаторов. В системе СИ единицей активности фермента является **1 катал (кат)**. 1 кат – каталитическая активность, которая обеспечивает превращение 1 моля субстрата (или образование 1 моля продукта) реакции в 1 секунду при определённых условиях. 1 кат имеет размерность – моль в секунду (*моль/с*).

Скорость ферментативной реакции определяется по убыли субстрата или образованию продукта реакции за определенное время в определенном объеме исследуемого материала. В качестве единицы СИ принимается моль в секунду на кубический метр – *моль/(с·м³)*.

Однако для выражения результатов биохимических исследований пользуются единицами моль в секунду на литр – *моль/(с·л)*, или чаще миллимоль в час на литр – *ммоль/(ч·л)*. При исследовании скорости ферментативных реакций полученный результат обычно называют *активностью фермента*: например, активность лактатдегидрогеназы в крови равна 0,8–4,0 ммоль/(ч·л).

Вследствие особенностей биохимической лабораторной практики рекомендуются некоторые дополнительные термины, производные от единиц СИ. Применительно к активности фермента – термин *каталитическая активность* и производная единица СИ моль в секунду – *моль/с*; к активности фермента, рассчитанной на определенный объем биологической жидкости, – термин *концентрация каталитической активности (каталитическая концентрация)* и производные единицы СИ – *моль/(с·л)* и *нмоль/(с·л)*. Для единицы *моль/(с·л)* рекомендуется термин *катал* и обозначение *кат*, для *нмоль/(с·л)* – *нкат*.

Показатели экскреции исследуемого компонента с суточным объемом мочи обозначают как количество выводимого вещества, отнесенное к единице измерения *сутки* (например, *моль/сут*, *ммоль/сут*, *нмоль/сут*).

Для правильного использования кратных и дольных значений единиц в системе СИ существуют определённые множители и приставки.

Единицы СИ
СИ – Systeme Internationale – SI

Множители и приставки для обозначения десятичных кратных и дольных единиц и их наименования

Множитель	Приставка	Обозначение приставки	
		Международное	Русское
10^{18}	экса (триллион)	E	Э
10^{15}	пета (биллиард)	P	П
10^{12}	тера (биллион)	T	Т
10^9	гига (миллиард)	G	Г
10^6	мега (миллион)	M	М
10^3	кило (тысяча)	k	к
10^2	гекто (сто)	h	г
10^1	дека (десяти)	da	да
10^{-1}	деци	d	д
10^{-2}	санти	c	с
10^{-3}	милли	m	м
10^{-6}	микро	μ	мк
10^{-9}	нано	n	н
10^{-12}	пико	p	п
10^{-15}	фемто	f	ф
10^{-18}	атто	a	а

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Агол, В.И. Генетически запрограммированная смерть клетки / В. И. Агол // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 6. – С. 20–24.
2. Белушкина, Н.Н. Молекулярные основы апоптоза / Н.Н. Белушкина, А. Хасан Хамад, Е.С. Северин // Вопросы биологической, медицинской, фармакологической химии. – 1998. – № 4. – С. 15–24.
3. Биленко, М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов / М. В. Биленко. – М.: Медицина, 1989. – 368 с.
4. Биологические мембраны. Методы / под ред. Дж. Финдлея, У. Эванза. – М.: Мир, 1990. – С. 150–170.
5. Биохимические основы патологических процессов: учебное пособие / под ред. проф. Е. С. Северина. – М.: Медицина, 2000. – 394 с.
6. Болдырев, А.А. Биологическое значение и возможности применения в медицине активных форм кислорода / А.А. Болдырев. – М.: Изд-во МГУ. – 1998. – Разд. 4, Гл. 1: Окислительный стресс. – С. 119–139.
7. Виноградов, А.Д. Преобразование энергии в митохондриях / А.Д. Виноградов // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 19. – С. 11–19.
8. Владимиров, Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. К. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 226 с.
9. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 12. – С. 13–19.
10. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т.9, № 4. – С. 42–49.
11. Владимирская, Е.Б. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия / Е.Б. Владимирская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 11. – С. 26–32.

12. Владимирская, Е.Б. Механизмы апоптотической смерти клеток / Е.Б. Владимирская // Гематология и гемотрансфузиология. – 2002. – Т. 47, № 2. – С. 35–40.
13. Де Дюв, К. Путешествие в мир живой клетки / К. Де Дюв. – М.: Мир, 1987. – 268 с.
14. Диксон, М. Ферменты. В 3-х т. / М. Диксон, Э. М. Уэбб. – М.: Мир, 1982.
15. Дубинина, Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса / Е.Е. Дубинина // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 561–581.
16. Зайчик, А.Ш. Основы патохимии / А.Ш. Зайчик, Л.П. Чурилов. – СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2001. – 688 с.
17. Зенгбуш, П. Молекулярная и клеточная биология / П. Зенгбуш. – М.: Мир, 1982. – Т. 2. – 342 с.
18. Зенков, Н.К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова. – М: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. – 343 с.
19. Климов, В.В. Углекислота как субстрат и кофактор фотосинтеза / В.В. Климов // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 4. – С. 23–27.
20. Кузьменко, Д.И. Свободнорадикальное окисление липидов, активные формы кислорода и антиоксиданты: роль в физиологии и патологии клетки: учебное пособие / Д.И. Кузьменко, В.Ю. Серебров, С.Н. Удинцев. – Томск: Изд-во ТПУ, 2007. – 214 с.
21. Кулинский, В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 2–7.
22. Кулинский, В.И. Обезвреживание ксенобиотиков / В. И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 8–12.
23. Ленинджер, А. Биохимия / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1976. – 876 с.
24. Ленинджер, А. Основы биохимии. В 3-х т. / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985.
25. Лушников, Е.Ф. Гибель клетки (апоптоз) / Е. Ф. Лушников, А. Ю. Абросимов. – М.: Медицина, 2001. – 192 с.

26. Любарев, А.Е. Надмолекулярная организация ферментов цикла трикарбоновых кислот / А.Е. Любарев, Б.И. Курганов // Молекулярная биология. – 1987. – Т. 21, вып. 5. – С. 1286–1296.
27. Марри, Р. Биохимия человека. В 2-х т. / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл. – М.: Мир, 1993.
28. Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология: учебное пособие для студентов медицинских вузов / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2003. – 544 с.
29. Маянский, Д.Н. Хроническое воспаление / Д.Н. Маянский. – М.: Медицина, 1991 – 272 с.
30. Молекулярная биология клетки. В 3-х т. / В. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюс, М. Рэфф, К. Робертс, Дж. Уотсон. – М.: Мир, 1994.
31. Молекулы и клетки. – М.: Мир, 1982. – Вып. 7. – 456 с.
32. Мусил, Я. Основы биохимии патологических процессов / Я. Мусил. – М.: Медицина, 1985. – 432 с.
33. Ньюсхолм, Э. Регуляция метаболизма / Э. Ньюсхолм, К. Старт. – М.: Мир, 1977. – 87 с.
34. Потапнев, М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами / М.П. Потапнев. – Иммунология. – 2002. – № 4. – С. 237–242.
35. Проскуряков, С.Я. Некроз – активная, управляемая форма программируемой клеточной гибели / С.Я. Проскуряков, В.Л. Габай, А.Г. Коноплянников // Биохимия. – 2002. – Т. 67, вып. 4. – С. 467–491.
36. Рыженкова, О.Н. Что индуцирует клеточную смерть: каспазы или митохондрии? / О.Н. Рыженкова // Вопросы медицинской химии. – 2002. – Т. 48, № 1. – С. 68–72.
37. Проскуряков, С.Я. Некроз – управляемая форма программируемой клеточной гибели / С.Я. Проскуряков, В.Л. Габай, А.Г. Коноплянников // Биохимия. – 2002. – Т. 67, вып. 4. – С. 467–491.
38. Рекер, Э. Биоэнергетические механизмы: новые взгляды / Э. Рекер. – М.: Мир, 1979. – 216 с.
39. Самуилов, В.Д. Программируемая клеточная смерть / В.Д. Самуилов, А.В. Олескин, Е.М. Лагунова // Биохимия. – 2000. – Т. 65, вып. 8. – С.1029–1046.
40. Скулачѳв, В.П. Аккумуляция энергии в клетке / В. П. Скулачѳв. – М.: Наука, 1986. – 234 с.

41. Скулачев, В.П. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии / В.П. Скулачев. – М.: Высшая школа, 1989. – 271 с.
42. Скулачев В.П. Рассказы о биоэнергетике / В.П. Скулачев. – М.: Эврика, 1981. – 245 с.
43. Скулачев, В.П. Энергетика биологических мембран / В.П. Скулачев. – М.: Наука, 1989. – 564 с.
44. Скулачев, В.П. Альтернативные функции клеточного дыхания / В.П. Скулачев // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 8. – С. 2–7.
45. Скулачев, В.П. Эволюция, митохондрии и кислород / В. П. Скулачев // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 9. – С. 4–10.
46. Скулачев, В.П. Работы по запрограммированной смерти клетки увенчаны Нобелевской премией / В.П. Скулачев // Биохимия. – 2003. – Т. 68, № 2. – С. 290–291.
47. Страйер, Л. Биохимия. В 3-х т. / Л. Страйер. – М.: Мир, 1985.
48. Суханова, Г.А. Апоптоз: учебное пособие / Г.А. Суханова, О.Е. Акбашева. – Томск: Изд-во ТПУ, 2006. – 172 с.
49. Суханова, Г.А. Биохимия клетки / Г.А. Суханова, В.Ю. Серебров – Томск: Чародей, 2000. – 184 с.
50. Тихонов, А.Н. Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза / А.Н. Тихонов // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 11. – С.8–15.
51. Уайт, А. Основы биохимии / А. Уайт, Ф. Хендлер, Р. Смит, И. Хилл. – М.: Мир, 1981. – Т. 1.– 675 с.
52. Фильченков, А.А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций / А.А. Фильченков // Биохимия. – 2003. – Т. 68, № 4. – С. 453–466.
53. Фильченков, А.А. Апоптоз и рак / А.А. Фильченков, Р.С. Стойка. – Киев, 1999.
54. Хорст, А. Молекулярные основы патогенеза болезней / А. Хорст. – М.: Медицина, 1982. – 456 с.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Бубнов, И.Г. Межотраслевая инструкция по оказанию первой помощи при несчастных случаях на производстве / И.Г. Бубнов, Н.В. Бубнова. – М.: НЦ ЭНАС, 2003. – 80 с.
2. Брусов, А.С. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина / А.С. Брусов, А.Н. Гераси-

- мов, Е.Ф.Панченко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1976. – Т. 81, № 1. – С. 33–35.
3. Гаврилов, В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В.Б. Гаврилов, М.И. Мишкорудная // Лабораторное дело. – 1983. – № 3. – С. 33–35.
 4. Захаров, Л.Н. Техника безопасности в химических лабораториях / Л.Н. Захаров. – Л.: Химия, 1985. – 184 с.
 5. Королук, М.А. Определение активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 17–19.
 6. Кондрашова, М.Н. Метод определения неорганического фосфата по спектрам поглощения молибдатных комплексов в ультрафиолете / М.Н. Кондрашова, М.Н. Лесогорова, С.Э. Шноль // Биохимия. – 1965. – Т. 30, вып. 3. – С. 567–574.
 7. Липперт, Г. Международная система единиц в медицине / Г. Липперт. – М.: Медицина, 1980. – 208 с.
 8. Лифшиц, В.М. Биохимические анализы в клинике: справочник / В.М. Лифшиц, В.И. Сидельникова. – М.: МИА, 1998. – 303 с.
 9. Практическая химия белка / под редакцией А.Дарбре. – М.: Мир, 1989. – 623 с.
 10. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 554 с.
 11. Уилсон, Дж. Молекулярная биология клетки: сборник задач / Дж. Уилсон, Т. Хант. – М.: Мир, 1994. – 520 с.
 12. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.
 13. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Analyt. Biochem. – 1976. – Vol. 7, N 1, 2. – P. 248–254.

ИНТЕРНЕТ-САЙТЫ

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>

<http://pubmedcentral.nih.gov>

<http://www.biochemistry.org/>

<http://www.lipidsonline.org>

<http://www.highwire.org/>

<http://www.jbc.org/>

<http://www.jlr.org/>

<http://www.oxisresearch.com/>

<http://www.avantilipids.com>

<http://clinchem.org>

Учебное издание

БИОЭНЕРГЕТИКА КЛЕТКИ. ХИМИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Под редакцией
профессора, д-ра мед. наук Владимира Юрьевича Сереброва
профессора, д-ра биол. наук Галины Алексеевны Сухановой

Авторы:
сотрудники кафедры биохимии и молекулярной биологии
Сибирского государственного медицинского университета:

Дмитрий Иванович Кузьменко, профессор, д-р мед. наук
Татьяна Васильевна Жаворонок, ст. преп., канд. мед. наук
Инесса Петровна Мамонтова, доцент, канд. хим. наук
Валентина Владимировна Андрушкевич, доцент, канд. мед. наук
Алексей Михайлович Тырышкин, доцент, канд. мед. наук

Редакционно-издательский отдел
Сибирского государственного медицинского университета
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
Тел. 8 (382-2) 51-57-08
Факс 8 (382-2) 51-53-15
E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru
Редактор И.А. Зеленская
Технический редактор И.Г. Забоенкова
Отв. за выпуск Е.М. Харитонова

Подписано в печать 25.03.2008 г.
Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.
Печать ризограф. Гарнитура «Times». Печ. лист. 11,4
Тираж 100 экз. Заказ №

Отпечатано в лаборатории оперативной полиграфии СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2