

Лекция 1 ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ БИОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

- 1 Влияние кислотности среды (рН) на биологические процессы
- 2 Ионизация аминокислот и белков в растворах
- 3 Особенности биохимических исследований на разных уровнях организации
- 4 Исследование растительного материала

1 Влияние кислотности среды (рН) на биологические процессы

Организмы и клетки, как правило, весьма устойчивы даже к значительным изменениям кислотности окружающей среды. Внутриклеточные процессы, наоборот, обладают высокой чувствительностью к этому показателю (рН) и протекают в среде, рН которой строго регулируется. Чувствительность биологических процессов к рН обусловлена целым рядом причин:

- ионы водорода могут выступать в качестве катализатора ряда процессов;
- ионы водорода могут быть реагентом или продуктом реакции;
- при изменении рН может измениться проницаемость клеточной мембраны, а следовательно, и распределение веществ или ионов по обе ее стороны.

Большинство внутриклеточных процессов протекает при нейтральных значениях рН, в такой среде их скорость максимальна. Но есть исключения: например, гидролазы лизосом обладают максимальной активностью при рН 5,0; желудочный сок млекопитающих имеет весьма необычную величину рН – около 1, так как именно при этом значении рН активность фермента пепсина, максимальна.

В биологических системах постоянная величина рН поддерживается с помощью эффективных буферных систем, которые препятствуют изменениям рН, возникающим в ходе метаболического образования кислот (например, молочной кислоты) и оснований (например, аммиака). Большинство буферных систем, содержащихся в клеточных жидкостях, включают фосфаты, бикарбонаты, аминокислоты и белки. Среди них наиболее важной группой физиологических буферов являются **белки**. Так, например, буферная емкость крови в основном определяется белком гемоглобином. При изучении метаболических процессов *in vitro* возникает необходимость в применении «нефизиологических» буферных растворов.

Буферным раствором называется такой раствор, который препятствует изменению концентрации ионов водорода при добавлении к нему кислоты или щелочи. Величину буферного действия характеризуют буферной емкостью, равной количеству сильного основания (кислоты), которое необходимо добавить для изменения рН раствора на одну единицу.

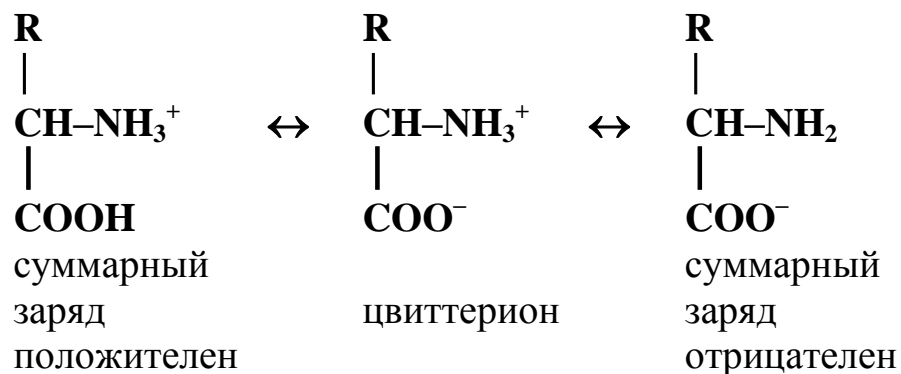
Обычно пользуются буферными растворами, состоящими из смеси слабой кислоты или основания и соли этой кислоты (например, смесь уксусной кислоты и натрия-ацетата). Буферные растворы, применяемые для биологических исследований, должны удовлетворять ряду требований:

- должны обладать достаточной буферной емкостью в требуемом диапазоне рН;
- обладать высокой степенью чистоты;
- хорошо растворяться в воде и не проникать через биологические мембраны;
- обладать устойчивостью к действию ферментов и гидролизу;
- показатель рН буферных растворов должен как можно меньше зависеть от температуры и ионного или солевого состава среды;
- раствор не должен оказывать токсического или ингибирующего действия;
- *Раствор не должен поглощать свет в видимой или ультрафиолетовой областях спектра (*в соответствии с целями дальнейшего анализа).

К сожалению, этим требованиям удовлетворяют далеко не все буферные растворы. Так, фосфатные буферные системы обладают способностью осаждать поливалентные катионы и во многих системах выступают в качестве метаболитов или ингибиторов. До недавнего времени насчитывалось всего несколько буферных растворов, рН которых лежит в важной для биохимии области 6,0 – 8,0 и которые удовлетворяют перечисленным выше требованиям. Но в последние десятилетия появился целый ряд так называемых *цвиттерионных буферов* (ГЭПЭС – N-2-оксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота, ПИПЭС – пиперазин-N-N'-ди(2-этансульфоновая кислота)). Для получения буферных растворов, применимых в широком диапазоне значений рН, используются смеси разных буферов. Например, буферы Мак-Ильвейна имеют рН с областью значений от 2,2 до 8,0 и приготавливаются из лимонной кислоты и натрия-гидрофосфата.

2 Ионизация аминокислот и белков в растворах

Аминокислоты и белки – это наиболее важные в биологическом отношении соединения, поэтому необходимо знать, в какой степени изменение кислотности среды влияет на их физические свойства. При низких значениях рН аминокислота находится в катионной форме, а при высоких – в анионной. При некотором промежуточном значении рН аминокислота оказывается незаряженной и называется *цвиттерионом* (рис.1). Величина рН, при которой в водном растворе преобладает цвиттерион, называется *изоионной точкой*.



Увеличение pH

Рис. 1 Влияние показателя кислотности среды на суммарный заряд аминокислоты

Ионизация молекул белка качественно соответствует ионизации аминокислот, но в количественном отношении отличается от нее из-за наличия большого числа способных к ионизации групп. Белки образуются путем образования пептидной связи между α -аминогруппой одной аминокислоты и α -карбоксильной группой соседней аминокислоты, поэтому, за исключением двух концевых аминокислот, все α -амино- и карбоксильные группы, участвующие в образовании пептидных связей, в белке не ионизируются. Однако, в боковых цепях присутствуют сотни аминных и карбоксильных групп, которые могут легко ионизоваться. Естественно, что относительное число положительно и отрицательно заряженных групп в молекуле белка определяет те или иные ее физические свойства. У гистонов преобладают катионные группы, в то время как в других белках количество анионных и катионных групп либо одинаково, либо, напротив, преобладают анионные группы.

В отличие от аминокислот у белков изоионная точка обычно не совпадает с изоэлектрической. По определению изоионная точка – это такая величина pH, при которой молекула белка содержит равное число положительно и отрицательно заряженных групп, а изоэлектрическая точка – это значение pH, при котором белок электрофоретически неподвижен.

3 Особенности биохимических исследований на разных уровнях организации

Все клетки в организме находятся в состоянии динамической активности и подвергаются действию внутренних и внешних факторов, которые в свою очередь также постоянно изменяются. В процессе жизнедеятельности любая отдельно взятая клетка взаимодействует с другими клетками, находящимися

как в непосредственной близости от нее (межклеточные взаимодействия), так и на некотором расстоянии (гормональные эффекты). Функционирование органеллы внутри клетки также в значительной степени зависит от активности других органелл и окружающей цитоплазмы. Именно поэтому нельзя достаточно полно изучить живую клетку, если делать это в отрыве от целого организма. В свою очередь изучение любой последовательности взаимосвязанных процессов, протекающих в какой-либо биологической системе, начинают, как правило, с изучения ее компонентов.

С целью получения полной и достоверной картины клеточного обмена, необходимо провести исследование

- на целом организме,
- изолированном органе,
- на уровне клетки,
- клеточной органеллы,
- на молекулярном и атомном уровнях.

Исследования на уровне целого организма. Биохимические эксперименты на животных могут быть предприняты с различными целями. Применяя в течение длительного времени специальную диету, лишенную определенных витаминов или микроэлементов, и одновременно регистрируя возникающие при этом физиологические и клинические изменения, можно исследовать *метаболическую роль данного витамина или микроэлемента*. Вместе с тем, вводя животному какое-либо экзогенное соединение, можно изучать как *влияние этого соединения на организм животного* (фармакологическая или патологическая ответная реакция), так и влияние *организма на введенное соединение*, т. е. его превращения и выведение.

В последнее время, все большее внимание стали уделять вопросам о том, каким образом различные лекарственные вещества, пищевые добавки и красители, накапливаются в пище и метаболизируются, где они локализуются, какое разрушающее действие оказывают на органы, ткани и какие канцерогенные побочные эффекты могут вызывать. Если эксперименты проводятся на лабораторных животных, то через некоторое время после введения экзогенных соединений их умерщвляют, а затем исследуют их органы. Единственным способом исследовать пути превращения введенных соединений у человека является определение содержания этих соединений и их метаболитов в крови, моче, фекалиях, желчи, выдыхаемом воздухе, поте и слюне. О поражении органа судят по изменению содержания в сыворотке крови таких ферментов, как аспартат-аминотрансфераза и лактатдегидрогеназа.

Результаты, получаемые при анализе содержания каких-либо соединений и их метаболитов в биологических жидкостях и экскрементах живых

организмов, в том числе и организма человека, зависят от многих взаимосвязанных факторов:

- способ введения соединения (перорально или путем внутривенной, внутримышечной, подкожной или внутривентриальной инъекции);
 - скорость всасывания соединения в кровоток; если соединение вводят не внутривенно, то оно должно проникнуть (обычно путем пассивной диффузии) по крайней мере, через одну мембрану (если соединение представляет собой слабый электролит, то оно должно пройти через мембрану в неионизованной форме);
 - степень связывания соединения с сывороточным альбумином;
 - кровоснабжение исследуемых тканей;
 - способность данного соединения проходить через мембраны и распределяться в межклеточных и внутриклеточных жидкостях;
 - накопление соединения в жировой ткани и характер его связывания с нуклеиновыми кислотами и меланином;
 - скорость метаболизма соединения (главным образом ферментной системой микросом печени);
- скорость выведения (с мочой и желчью).

*В практике описан случай, когда превращение введенного соединения у животных, содержащихся в клетках с мягкими опилками, происходит быстрее, чем у животных, помещенных в клетки с жесткими опилками.

Помимо всего перечисленного, имеют значение также возраст, пол, режим питания, физические нагрузки, генетическое строение животного, а также время дня, когда животному было введено соединение. Совокупность вышеперечисленных факторов создает характерную для данного соединения «фармако-кинетическую» картину.

Именно благодаря огромному многообразию переменных эксперименты всегда следует проводить не на одном животном, а на целых группах. Исследования нужно проводить на животных чистых линий, а получаемые экспериментальные данные подвергать тщательной статистической обработке. Результаты анализа фармакологического действия введенных экспериментальным животным соединений необходимо сопоставлять с данными, получаемыми в группе контрольных животных, которым было введено плацебо, т. е. совершенно нейтральное вещество, например лактоза.

Одной из основных проблем, стоящих перед биохимиками и фармакологами, является ***экстраполяция результатов, полученных на лабораторных животных, к человеку***. Многочисленные сравнительные исследования показали, что метаболические процессы у человека и всех исследованных видов животных, существенно различаются. Именно по этой причине новые лекарственные препараты, предназначенные для введения человеку, предварительно проходят испытание не на одном животном, а на

целом ряде различных лабораторных животных. Только после тщательного сравнительного анализа полученных результатов клинические испытания можно проводить на человеке.

При изучении метаболизма ксенобиотиков удобнее всего вводить их в виде изотопных меток. Экскрецию у мелких лабораторных животных целесообразно изучать с помощью специальной метаболической стеклянной камеры, в которую животное помещают на все время опыта. Благодаря особой конструкции камеры моча и фекалии собираются отдельно, а выдыхаемый углекислый газ поступает в специальную ловушку. При изучении меченных по углероду соединений в клетку подается воздух, не содержащий углекислого газа, а выдыхаемый углекислый газ поглощается раствором гидроксида натрия; анализ выдыхаемого углекислого газа, меченного по углероду, позволяет установить степень распада изучаемого соединения.

Для изучения распределения введенного соединения животное спустя некоторое время после инъекции умерщвляют с помощью анестезии. Затем проводят исследования либо трупа животного, либо отдельных органов, которые для этой цели изолируют, выявляют морфологические изменения, происшедшие в них, изучают их составные части.

Для получения наглядного представления о распределении введенных мелким лабораторным животным радиоактивных соединений успешно применяется метод *авторадиографии* препаратов целого организма. Этот метод позволяет получить данные о распределении и относительном содержании введенного соединения в тканях животного, скорости его выведения и способности проникать сквозь биологические мембраны. Через определенный промежуток времени после введения соединения животное умерщвляют с помощью анестезии и быстро замораживают смесью ацетона с твердым CO_2 при температуре -78°C или с помощью жидкого азота. Замороженное животное помещают при низкой температуре в водный раствор смолы (аравийская камедь), а после застывания смолы рассекают на соответствующем уровне резцом, или делают секционные срезы с помощью микротомы со специальным лезвием из карбида вольфрама. Полученный срез прикладывают к рентгеновской пленке и оставляют на 1-2 недели при низкой температуре, после чего пленку проявляют. Сопоставляя полученную авторадиограмму с цветным снимком среза, изучают распределение и локализацию введенного животному изотопа в различных его органах и тканях.

Исследование на уровне целых организмов не только не нарушает целостности тканей, но позволяет изучать отдельные органы и ткани, оставляя без изменения снабжение их питательными веществами, нервную и гормональную регуляцию.

Исследования на уровнях органа, тканей. Исследования на этом уровне организации проводят методом *перфузии изолированных органов*. Сущность этого метода заключается в том, что изучаемый орган (печень, почку или сердце) изолируют из организма животного и помещают в специальный термостатируемый прибор. Затем к перфузионной жидкости, которая обычно вводится в орган через артерию, добавляют исследуемое соединение и анализируют жидкость, вытекающую из органа через вену, что позволяет проследить за превращениями введенного соединения. Перфузионную жидкость можно пропускать через орган однократно или несколько раз, самотеком или с помощью небольшого насоса. Насос применяют тогда, когда перфузионную жидкость пропускают через орган многократно. В отдельных случаях жидкость прогоняют не при постоянном давлении, а импульсами, что позволяет приблизить условия опыта к ситуации *in vivo* и имитирует процесс перекачивания крови сердцем.

Для проведения перфузии не обязательно полностью изолировать орган; ее можно проводить и на органе вскрытого анестезированного животного. При этом удастся сохранить интактными нервные волокна и часть сосудистой системы.

Действие какого-либо соединения на ткань или орган (например, гистамина на мышцу) можно изучать по *механической ответной реакции изолированной ткани* на данное соединение. Исследуемое соединение добавляют к омывающей ткань жидкости; в ответ на это ткань, закрепленная с одного конца, а другим концом связанная с пером самописца, начинает двигаться, и любое движение ткани постоянно регистрируется. Данный метод позволяет изучать ответную реакцию изолированных органов на введение очень небольших (порядка нескольких нанोगрам) количеств активных соединений.

Преимущество изучения на уровне органа, тканей заключается в том, что при этом удастся избежать нежелательных эффектов, обусловленных изменением непосредственного тканевого окружения, как это имеет место, например, при фракционировании клеток. Основным недостатком этих методов является отсутствие гормонального и нервного контроля, поэтому при экстраполяции всех полученных результатов к ситуации *in vivo* следует соблюдать осторожность.

Исследования на уровне клетки, клеточных органелл. *Фракционирование* (отделение) клеток состоит из двух последовательных стадий: *гомогенизации* и *разделения*. На стадии гомогенизации структура ткани разрушается, и ткань превращается в так называемый гомогенат. На второй стадии разделения происходит группирование отдельных компонентов гомогената по принципу общности их физических свойств, таких, как размер и плотность.

При фракционировании нормальная активность клетки может в значительной степени нарушаться. Применяют особые приемы, чтобы свести последствия фракционирования до минимума и приблизить условия к естественным. Однако, все побочные явления, возникающие в ходе фракционирования, устранить невозможно, поэтому полученные результаты следует трактовать весьма осторожно, особенно если речь идет о целой клетке, органе или организме.

Выбор *ткани* для фракционирования определяется конкретными условиями эксперимента и объектом исследования. Ткани и клетки различных органов различаются по составу, хрупкости и плотности, что в свою очередь определяет выбор того или иного метода выделения. Печень, например, является идеальным объектом для изучения функционирования митохондрий, поскольку именно в клетках печени митохондрии содержатся в особенно больших количествах. Ткань тимуса (зобной железы) чаще других тканей используется для выделения ядер, так как ядра тимоцитов составляют до 50% клеточной массы. Различные *органы* животных отличаются друг от друга и по содержанию в них крови и соединительной ткани: чем больше соединительной ткани содержится в органе, тем хуже ткань поддается гомогенизации и тем труднее выделить из нее субклеточные компоненты.

Большинство животных клеток разрушается сравнительно легко, однако при разрушении растительных и бактериальных клеток зачастую приходится сталкиваться со значительными трудностями, связанными с наличием клеточных стенок. Для **разрушения клеток** чаще всего применяют физические методы:

- ***Растирание клеток с твердыми материалами.*** В настоящее время благодаря появлению более мягких способов разрушения этот метод применяется для разрушения животных клеток довольно редко, однако им по-прежнему пользуются для разрушения растительных и бактериальных клеток.
- ***Разрушение клеток в жидких средах.*** Разрушение клеток, находящихся в суспензии, происходит либо при вращении лопастей или поршня (блендеры), либо при поступательном движении вверх и вниз поршня или шаров (гомогенизаторы).
- ***Разрушение клеток с помощью высокого давления.*** Этот метод применяется в основном для разрушения микробных клеток. Для этой цели пользуются специальными прессами, например френч-прессом (French Pressure), в котором создается давление до $10,4 \cdot 10^7$ Па.
- ***Разрушение с помощью ультразвука.*** При обработке клеточных суспензий ультразвуком в среде создается высокочастотное изменение давления. Основным недостатком данного метода является то, что в

процессе обработки ультразвуком выделяется значительное количество тепла.

Разрушение клеток еще можно проводить методом осмотического шока, перевариванием клеточных стенок ферментами, например лизоцимом, и сложными ферментными препаратами, содержащими целлюлазу, хитиназу и липазу. Для разрушения клеток некоторых видов успешно применяют замораживание и оттаивание, автолиз и обработку органическими растворителями, такими, как этилацетат и толуол.

Полученный гомогенный биологический материал изучают, пользуясь точными качественными и количественными аналитическими методами (исследования **на молекулярном и атомном уровнях**). При этом применяют целый ряд спектральных методов, радиоизотопные методы, электрохимических методов.

4 Исследование растительного материала

Выбор методов при изучении метаболизма у растений определяется в основном степенью организации растения.

Одноклеточные и многоклеточные водоросли хорошо растут на простых, чаще всего неорганических питательных средах при соответствующих внешних условиях. Такие водоросли можно рассматривать как интактные организмы. Они имеют относительно простое строение и являются удобным экспериментальным материалом для изучения фундаментальных биохимических процессов, которые трудно исследовать на высокоорганизованных растениях. В качестве классического примера можно привести такие растительные организмы, как *Scenedesmus* и *Chlorella*, которые используются для изучения фиксации углекислого газа. Эти системы благодаря удобству контроля за их ростом и простоте поставки экзогенных соединений клеткам особенно удобны для изучения действия на обмен веществ таких факторов, как освещение, температура, питание и т. д.

На более высоких уровнях организации – у высших растений – доставка экзогенных соединений в соответствующий участок внутри растения в значительной степени затруднена. Если растение растет в почве (растворе), исследуемое соединение в виде раствора вносят в эту почву (раствор), откуда оно затем всасывается корнями. Для изучения распределения соединения и его метаболитов внутри растительного организма исследуют отдельные его части – корни, побеги, листья, почки и цветы.

Основная особенность изучения метаболизма у растений, заключается в том, что в отличие от тканей животных растительные ткани не содержат достаточно крупных и сложных структур. Отдельные части растения можно изолировать, помещать в соответствующую среду, а затем изучать их

метаболизм *in vitro*. Приготовление срезов, гомогенатов и выделение клеточных органелл из растительных тканей осуществляют такими же способами, как и из тканей животных.

Подобно другим методам *in vitro*, применение тканевых и клеточных культур ставит перед исследователями проблему ***экстраполяции полученных результатов к целому организму***, особенно в тех случаях, когда при культивировании растительные и животные клетки дифференцируются.