

# Современные проблемы биохимии

---

Методы исследований

# Современные проблемы биохимии

Методы исследований

---

*Допущено  
Министерством образования  
Республики Беларусь  
в качестве учебного пособия  
для магистрантов учреждений  
высшего образования,  
по биологическим  
и медицинским специальностям*

Под редакцией профессора А.А. Чиркина



Минск  
«Вышэйшая школа»  
2013

УДК 577.1(075.8)  
ББК 28.072я73  
С56

Авторы: Е.В. Барковский, С.Б. Бокуть, А.Н. Бородинский, В.У. Буко, О.И. Валентюкевич, А.И. Грицук, Е.О. Данченко, Е.М. Дорошенко, И.К. Дремза, А.С. Дроздов, И.Б. Заводник, Л.Б. Заводник, Д.Я. Задорожный, Л.М. Караедова, В.Н. Кипень, Е.И. Коваленко, Е.А. Лапшина, Т.Л. Лебедь, О.Я. Лукивская, Г.В. Ляхнович, А.Ф. Макарчиков, С.Б. Мельнов, Е.В. Морозова, И.М. Морозова, Л.И. Надольник, Е.Е. Нарута, В.Н. Никандров, Л.Н. Николаевич, Н.В. Пивень, Н.С. Пыжова, В.Ю. Смирнов, Э.П. Титовец, Т.А. Толкачева, В.В. Хрусталева, В.Т. Чещевик, А.А. Чиркин

Рецензенты: кафедра биохимии биологического факультета Белорусского государственного университета (заведующий кафедрой доцент *И.В. Семак*); заведующий отделом биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» доктор биологических наук *В.Н. Решетников*

*Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или любой ее части не может быть осуществлено без разрешения издательства*

**Современные проблемы биохимии. Методы исследований** : учеб. пособие / Е. В. Барковский [и др.] ; под ред. проф. А. А. Чиркина. – Минск : Выш. шк., 2013. – 491 с. : ил.

ISBN 978-985-06-2192-4.

Учебное пособие составлено из трудов специалистов-биохимиков Республики Беларусь.

Изложено 190 методик биохимического исследования различных биологических объектов на различных уровнях их организации.

Для магистрантов учреждений высшего образования по биологическим и медицинским специальностям.

Может быть полезно студентам биологических, медицинских, ветеринарных и фармацевтических специальностей, а также исследователям-биохимикам.

УДК 577.1(075.8)  
ББК 28.072я73

ISBN 978-985-06-2192-4

© Оформление. УП «Издательство  
«Вышэйшая школа»», 2013

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебное пособие создано в соответствии с учебным планом и базовой программой подготовки студентов по специальности 1-31 01 01-02 Биология (научно-педагогическая деятельность); специализация 1-31 01 01-02 05 Биохимия. Этот предмет завершает подготовку специалистов в 10-м семестре обучения студентов и предназначен для ознакомления обучающихся с характером биохимических исследований, проводимых в ряде вузов Министерства образования и научно-исследовательских институтах Национальной академии наук Республики Беларусь. Учебное пособие не претендует на исчерпывающую информацию о многогранных биохимических исследованиях белорусских ученых. Данное издание должно продемонстрировать то, что биохимические методы исследования активно внедряются в фундаментальные и прикладные исследования не только в общепризнанных и авторитетных научных и педагогических центрах г. Минска, но и в других городах республики.

Изучение современных проблем биохимии служит для достижения основной цели: подготовить выпускника-биохимика к профессиональной деятельности и сократить время его адаптации к решению научных, производственных и учебных биохимических задач. В соответствии с этим пособие включает материалы по применению биохимических методов *in silico* (компьютерное моделирование), *in vitro* и *in vivo*. В материалах книги содержится более 190 методик биохимического анализа, 50 таблиц, более 90 рисунков, около 200 источников литературы. Потребность в таком издании вызвана тем, что стремительное развитие технологий биохимических исследований сокращает навыки биохимика-исследователя до этапа пробоподготовки, а остальное выполняют приборы.

Наряду с классическими методами выделения и изучения ферментов, оценки обмена белков, углеводов, липидов, нукле-

иновых кислот, состояния энергетического обмена, свободно-радикальных процессов в пособии представлены методы иммунохимического анализа, молекулярно-генетических исследований, анализа данных банков нуклеотидных и аминокислотных последовательностей макромолекул, исследование нанофлюидики. В практическом отношении будут полезными методики изучения фагоцитоза, апоптоза, некроза, биохимических характеристик тканей животного и растительного происхождения.

Глава 1 написана В.В. Хрустальевым, Е.В. Барковским, Д.Я. Задорожным; гл. 2 – А.С. Дроздовым, С.Б. Бокутем; гл. 3 – А.Ф. Макаровичем; гл. 4 – Е.М. Дорошенко, В.Ю. Смирновым; гл. 5 – В.Н. Никандровым, Н.С. Пыжовой; гл. 6 – Л.И. Надольник, О.И. Валентюкевичем; гл. 7 – А.И. Грицуком; гл. 8 – Э.П. Титовцом; гл. 9 – Л.М. Караедовой; гл. 10 – А.Н. Бородинским, И.К. Дремзой; гл. 11 – В.У. Буко, О.Я. Лукивской, Е.Е. Нарутой; гл. 12 – Л.Б. Заводником, Е.А. Лапшиной, В.Т. Чешевиком, И.К. Дремзой, И.Б. Заводником; гл. 13 – Е.И. Коваленко, А.А. Чиркиным; гл. 14 – Е.О. Данченко; гл. 15 – Н.В. Пивень; гл. 16 – С.Б. Мельновым, Т.Л. Лебедь, В.Н. Кипенем; гл. 17 – Т.А. Толкачевой, И.М. Морозовой, Г.В. Ляхновичем; гл. 18 – Е.В. Морозовой, Л.Н. Николаевич, А.А. Чиркиным.

## ГЛАВА 12. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ МИКРОСОМАЛЬНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН

Клеточные мембраны либо ограничивают цитоплазму и органеллы со строго определенными свойствами, либо образуют ретикулярные или везикулярные структуры в цитоплазме. К настоящему времени из животных клеток, имеющих ядро, выделены и биохимически охарактеризованы все основные типы мембран и органелл. Стало очевидным, что мембраны обладают сложной организацией, структурной и функциональной мозаичностью, высокой подвижностью (лабильностью) и устойчивостью.

Многие методы выделения мембран основаны на получении фрагментов, отделяющихся от поверхности клеток либо клеточных органелл в виде везикулярных структур. Каждая клеточная органелла или сеть мембран содержит строго определенные ферменты – *маркеры* и обладает набором физико-химических свойств, обеспечивающих ее уникальность. Так, маркерами внутренней митохондриальной мембраны служат ферменты – переносчики электронов, наружная митохондриальная мембрана, которая при фрагментации образует везикулы, характеризуется моноаминоксидазой.

Данная глава посвящена приемам изучения важнейших клеточных компонентов – микросомальных и митохондриальных мембран.

### 12.1. Микросомальные мембраны и метаболизм ксенобиотиков

Многие ксенобиотики, попав в организм, как и эндогенные соединения, подвергаются биотрансформации и выделяются в виде метаболитов. В основе биотрансформации в основном лежат энзиматические преобразования молекул. *Биологический смысл явления* – превращение химического вещества в форму, удобную для выведения из организма, и тем самым сокращение времени его действия.

**Концепция I, II и III фаз метаболизма ксенобиотиков.**  
*I фаза метаболизма* в широком смысле может быть определена как этап биотрансформации, в ходе которого к молекуле присоединяются полярные функциональные группы либо

осуществляется экспрессия таких групп, находящихся в субстрате в скрытой форме. Это достигается либо путем окисления или (значительно реже) восстановления молекул с помощью оксидоредуктаз, либо путем их гидролиза эстеразами и амидазами.

*Фаза II* – этап биологической конъюгации промежуточных продуктов метаболизма с эндогенными молекулами, такими, как глутатион, глюкуроновая кислота, сульфат и т.д. Специфические системы транспорта конъюгированных дериватов обеспечивают их выведение из организма. В ходе биопревращений липофильный и, следовательно, трудновыводимый ксенобиотик становится гидрофильным продуктом, что обуславливает возможность его быстрой экскреции.

Выделяют также *III фазу* детоксикации ксенобиотиков – экспорт из клетки конъюгатов ксенобиотиков, катализируемый белками суперсемейства ABC-транспортёров (MDR-белки). Далёко не всегда преобразование молекулы представляет собой простое чередование I, II и III фаз метаболизма. Возможна и более сложная последовательность реакций биопревращений.

**Локализация процессов биотрансформации.** Основным органом метаболизма ксенобиотиков в организме человека и млекопитающих является *печень*, главным образом благодаря разнообразию и высокой активности ферментов биотрансформации. Кроме того, *портальная система* обеспечивает прохождение всех веществ, поступивших в желудочно-кишечный тракт, именно через печень, до того, как они проникнут в общий кровоток. Это также определяет функциональное предназначение органа.

Тончайшая сеть печеночных капилляров, огромная площадь контакта между кровью и поверхностью гепатоцитов, обеспечиваемая микроворсинками базальной поверхности печеночных клеток, обуславливают высокую эффективность печеночной элиминации токсиканта на клеточном уровне.

Продукты I фазы метаболизма поступают в общий кровоток и могут оказывать действие на органы и системы. Печень выбрасывает в кровь и продукты II фазы метаболизма. Из крови продукты превращения могут захватываться почками, легкими, другими органами, повторно печенью для экскреции с желчью. С желчью метаболиты поступают в кишечник, где частично реабсорбируются и повторно поступают в печень (*цикл печеночной рециркуляции*).

Несмотря на доминирующую роль печени в метаболизме ксенобиотиков, другие органы также принимают участие в этом процессе. Почки и легкие содержат энзимы I и II фаз метаболизма. Особенно велика роль почек, поскольку в этом органе имеется специфическая система захвата и катаболизма продуктов конъюгации, образующихся в печени. Активность процессов биотрансформации в других органах (кишечнике, селезенке, мышечной ткани, плаценте, мозге) ниже. В ходе внепеченочного метаболизма могут образовываться продукты, как аналогичные продуктам печеночного происхождения, так и отличные от них. Иногда в ходе внепеченочного метаболизма может осуществляться активация метаболитов, образующихся в печени.

**Микросомальные мембраны. Механизм гидроксирования ксенобиотиков.** Ферменты, участвующие в метаболизме ксенобиотиков, локализованы в основном внутриклеточно. Основным местом метаболизма ксенобиотиков в клетке любой ткани является *эндоплазматический ретикулум*. Небольшое их количество определяется в растворимой фракции цитозоля, Мх; большинство же связано с гладким эндоплазматическим ретикулумом. Методом ультрацентрифугирования гладкий эндоплазматический ретикулум выделяется из исследуемых клеток в виде фрагментов мембранных структур, называемых *микросомами*.

Микросомы (от *микро...* и греч. *soma* – тело) – фрагменты *эндоплазматической сети* (пузырьки диаметром около 1000 нм), образующиеся при разрушении клеток в процессе гомогенизации тканей животных и растений. Различают два типа микросом: с гладкой и шероховатой поверхностью (вследствие расположения на последних *рибосом*). Основная группа ферментов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков, получила название *микросомальные ферменты*. Микросомальные мембраны представляют собой обогащенный источник мембраносвязанных ферментов метаболизма ксенобиотиков. Принципиальным является наличие в мембранах эндоплазматического ретикулума суперсемейств окисляющих гемопротеидов (монооксигеназ) – цитохромов Р-450 (СYP) и осуществляющих конъюгацию уридиндифосфоглюкуронозилтрансфераз. Цитохром Р-450 представляет собой сложный белок с ковалентно-связанным гемом (гемопротеид), обеспечивающим присоединение кислорода. Как и другие гемопротеиды (гемоглобин, каталаза), цитохром Р-450 имеет тетра-



пиррольную простетическую группу, содержащую ион железа. Хелатный комплекс протопорфирина с  $Fe^{2+}$  называется *гемом* или *протогемом*. Аналогичный комплекс с  $Fe^{3+}$  носит название *гемина* или *гематина*. В геме четыре лигандные группы порфирина образуют комплекс с железом, имеющий плоское строение; 5-я и 6-я координационные связи расположены перпендикулярно к плоскости порфиринового кольца. Например, в гемоглобине 5-е положение занято имидазольной группой гистидина, а 6-е остается незамещенным либо замещается кислородом. Природа 5-го и 6-го лигандов в цитохроме P-450 окончательно не выяснена. Известно, что системы, где 5-м лигандом является атом серы, а 6-м – азот имидазола, лучше всего моделируют свойства этого гемопротеида. Следует отметить, что в настоящее время, исходя из неполного соответствия гемопротеида классу цитохромов, Номенклатурной Комиссией Международного Союза биохимии и молекулярной биологии (NC-IUBMB) рекомендовано этот фермент называть *гем-тиолатный протеин P-450* вместо цитохром P-450. Число 450 означает, что восстановленный гем, связанный с CO, характеризуется максимумом спектра поглощения при длине волны 450 нм.

Цитохром P-450 – монооксигеназа, так как катализирует реакцию включения одного из атомов молекулярного кислорода в молекулу окисляемого вещества. Цепь реакций микросомального окисления называют также *монооксигеназной цепью*. Конъюгация обычно катализируется семейством фермента уридинглюкуронилтрансферазы (UGTs), имеющее два семейства изоферментов UGT1 и UGT2, в которых идентифицировано 16 подтипов.

Основные закономерности протекания ферментативных процессов с участием микросомального монооксигеназного комплекса, представлены на рис. 12.1. Механизм гидроксирования ксенобиотков цитохромами P-450 включает пять стадий [1–4].

*Первая стадия реакции* – взаимодействие субстрата S с окисленной формой цитохрома P-450. Цитохром P-450 связывает окисляемый субстрат S и активирует молекулярный кислород.

*Вторая стадия* – восстановление фермент-субстратного комплекса  $S-Fe^{3+}$  до  $S-Fe^{2+}$  электроном, который поступает от NADPH посредством флавопротеида (НАДФН-цитохром P-450 редуктазы).

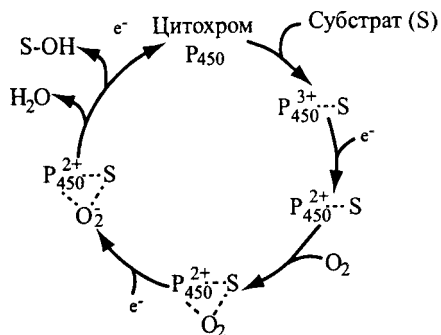


Рис. 12.1. Упрощенная схема превращения субстрата с участием цитохрома P-450

*Третья стадия* – образование тройного комплекса  $S-Fe^{2+}-O_2$ . Кислород присоединяется к восстановленному фермент-субстратному комплексу с высокой скоростью порядка  $10^6 M^{-1} \cdot c^{-1}$ . Ферригем  $Fe^{3+}$  не способен связывать кислород.

*Четвертая стадия* – восстановление вторым электроном тройного комплекса  $S-Fe^{2+}-O_2$  до  $S-Fe^{2+}(O_2^-)$ . В зависимости от субстрата и изоформы гемопротеида поставка второго электрона может происходить или посредством НАДФН-цитохром P-450 редуктазы или НАДН-специфичной цепи переноса электронов.

*Пятая стадия* – сложный процесс, который состоит из нескольких ступеней. Она характеризуется внутримолекулярными превращениями восстановленного тройного комплекса и его распадом с освобождением молекулы воды и гидроксильированного субстрата. В ферродиоксикомплексе происходит активация молекулярного кислорода, обеспечивающая возможность окисления в физиологических условиях многих соединений с высокими скоростями.

**Вторая фаза метаболизма. Конъюгация.** Превращение молекул в первой фазе биотрансформации усиливает их полярность, уменьшает способность растворяться в липидах. Только благодаря этому целый ряд чужеродных соединений лучше выделяется с мочой. Эффект еще более усиливается, когда к образовавшимся в ходе I фазы метаболизма продуктам присоединяются такие эндогенные вещества, как ацетат, сульфат, глюкуроновая кислота, глутатион и т.д. Как и ферменты I фазы метаболизма ксенобиотиков, ферменты II фазы обладают

слабой субстратной специфичностью и участвуют в превращениях большой группы химических веществ.

## 12.2. Выделение микросом.

### Количественное определение цитохромов

**Выделение постмитохондриального супернатанта печени крыс.** Перед декапитацией животных лишают корма в течение 20 ч. В этих условиях в гепатоцитах наблюдается почти полное исчезновение депо гликогена, что позволяет избежать значительных потерь эндоплазматического ретикулаума (соосаждения с митохондриями комплекса эндоплазматической ретикулум–гликоген) в процессе центрифугирования гомогената. Гемоглобин и другие белки крови удаляют из печени путем перфузирования органа через нижнюю полую вену охлажденным до температуры  $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$  1,15 %-ным раствором KCl под давлением 100 мм рт. ст. в течение 2 мин. После этого печень быстро извлекают, промывают в ледяном растворе KCl, просушивают на фильтровальной бумаге, взвешивают, измельчают и гомогенизируют в таком же растворе (масса ткани : раствор = 1 : 3) в гомогенизаторе типа Поттера – Эльвегейма с тефлоновым пестиком (скорость вращения – 400 об/мин, 7–8 разовых движений вверх – вниз). Все процедуры проводят при температуре  $0\text{--}4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Выделение микросомальной фракции печени крыс.** Микросомальную фракцию печени выделяют дифференциальным центрифугированием постмитохондриального супернатанта по методу И.И. Карузиной и А.И. Арчакова [1]. Полученный гомогенат центрифугируют при 9000 g ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) в течение 15 мин для осаждения неразрушенных клеток, клеточных мембран, ядер, Мх. Супернатант повторно центрифугируют при 105 000 g в течение 1 ч. Осадок ресуспендируют в 0,1 M Tris-HCl-буфере, pH 7,4, и разводят в зависимости от целей опыта до концентрации 0,5, 2 или 4 мг белка в 1 мл

**Определение содержания цитохромов  $b_5$  и P-450 в микросомах.** Содержание цитохромов  $b_5$  и P-450 в микросомальной фракции печени определяют методом, предложенным Т. Омура и Р. Сато [2], путем регистрации разницы в поглощении окисленной и восстановленной форм цитохрома  $b_5$  и величины поглощения комплекса восстановленного цитохрома P-450 [К.Ф. 1.14.14.1] с оксидом углерода при 450 нм. Измере-

ния проводят в 100 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7,4, с содержанием белка микросом 0,4–0,5 мг/мл. Восстановление гемопротеида осуществляют добавлением в одну из кювет избыточного количества (несколько кристаллов) дитионита натрия (опытная кювета и кювета сравнения содержат одинаковое количество микросомального белка). Разница в оптической плотности между минимумом (408 нм) и максимумом (428 нм) спектра поглощения в расчете на 1 мг белка служит показателем, характеризующим содержание цитохрома  $b_5$ . При измерении содержания цитохрома P-450 после записи нулевой линии в обе кюветы добавляют несколько кристаллов дитионита натрия, затем через 1 мин в одну из кювет в течение 2 мин пропускают СО и записывают дифференциальный спектр (угарный газ собирают в аппарате Киппа при взаимодействии концентрированной муравьиной кислоты с концентрированной серной кислотой). Разница между максимумом при 450 нм и минимумом при 490 нм спектра поглощения в расчете на 1 мг белка является показателем содержания цитохрома P-450. Расчет содержания цитохромов  $b_5$  и P-450 в микросомальной фракции производят с использованием коэффициента поглощения по формуле (12.1):

$$A = \Delta E(\lambda_1 - \lambda_2) \cdot 1000/c \cdot l \cdot \epsilon, \quad (12.1)$$

где  $A$  – содержание цитохромов  $b_5$  и P-450, нмоль/мг белка;  $\Delta E(\lambda_1 - \lambda_2)$  – разница оптической плотности между длинами волн 428 и 408 нм (цитохром  $b_5$ ) или между длинами волн 450 и 490 нм (цитохром P-450);  $c$  – количество белка в микросомах, мг/мл;  $l$  – длина оптического пути, см;  $\epsilon$  – коэффициенты поглощения:  $185 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  (для цитохрома  $b_5$ ) и  $91 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$  (для цитохрома P-450) [5–6].

### 12.3. Определение активности некоторых ферментов лекарственного метаболизма

**Определение оксидоредуктазной активности (определение НАДФН (НАДН) – цитохром  $c$  и  $K_2[Fe(CN)_6]$ -редуктазных активностей) микросом печени.** Электрон-транспортную активность флавопротеидов редокс-цепей микросомальной фракции печени исследуют с помощью вводимых в среду инкубации акцепторов электронов: цитохрома  $c$  и феррициа-

нида калия. Принцип метода основан на определении скорости изменения поглощения акцепторов электронов при переходе из окисленной в восстановленную форму [3].

НАДФН-специфический флавопротеид [К.Ф.1.6.2.4] содержит в своем составе ФАД и ФМН и может быть источником двух электронов для последовательного восстановления фермент-субстратного комплекса. Исходя из этого, для оценки его электрон-транспортной активности используют искусственные акцепторы электронов [4].

Для измерения НАДФН (НАДН) – цитохром *c*-редуктазной активности используют инкубационную смесь следующего состава: 100 мкМ НАДФН (НАДН), 50 мкМ цитохрома *c*, 330 мкМ NaCN, 40 мкг белка микросом (для НАДФН) или 15 мкг (для НАДН). Измерение скорости восстановления цитохрома *c* проводят при 550 нм. Коэффициент поглощения цитохрома *c* (восстановленный минус окисленный) –  $18,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

НАДФН (НАДН) –  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -оксидоредуктазные активности регистрируют с использованием инкубационной смеси следующего состава: 100 мкМ НАДФН (НАДН), 330 мкМ  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ; белок микросом: 500 мкг (для НАДФН) и 20 мкг (для НАДН). Измерение скорости восстановления  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  проводят при 420 нм с использованием коэффициента поглощения окисленного феррицианида калия, равно  $1,02 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Измерение скорости окисления НАДФН и НАДН проводят в инкубационной смеси, содержащей 0,6–0,8 мг микросомального белка и 33 мкМ НАДФН (НАДН). Об активности оксидаз судят по скорости убыли восстановленных коферментов, регистрируемой при 320 нм. Коэффициент поглощения для НАДФН (НАДН) –  $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

При определении активности оксидоредуктаз используют 100 мМ Tris-HCl-буфер, pH 7,4. Измерения проводят в термостатируемой кювете с длиной оптического пути 1 см в течение 1–3 мин при температуре 30 °С. Реакцию начинают внесением НАДФН (НАДН).

Активность ферментов рассчитывают по формуле (12.2):

$$A = \Delta E \cdot 1000 / (\Delta t \cdot C \cdot l \cdot \epsilon), \quad (12.2)$$

где  $A$  – активность ферментов ( $\text{нмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$ );  $\Delta E$  – изменение оптической плотности за время  $\Delta t$ , мин;  $C$  –

содержание белка в микросомах, мг/мл;  $l$  – длина оптического пути, см;  $\epsilon$  – коэффициент поглощения.

**Определение скорости реакций окислительного деалкилирования и гидроксילирования субстратов в микросомах.** Скорости реакций окислительного гидроксילирования ксенобиотиков в микросомальной фракции печени определяют по скорости образования продуктов гидроксילирования.

Типичный гомолог ароматических углеводородов *анилин* гидроксилируется исключительно в *p*-положении (90% всего продукта). Скорость его *p*-гидроксילирования определяют по количеству образовавшегося *p*-аминофенола. Основной путь метаболизма амидопирина и этилморфина – отщепление от молекулы формальдегида.

Обе реакции протекают в молекуле цитохрома P-450 в присутствии НАДН в аэробных условиях.

Инкубационная смесь объемом 1 мл содержит 100 мМ Tris-HCl-буфера, pH 7,4, 5 и 16 мМ MgCl<sub>2</sub> (соответственно для анилина и амидопирина или этилморфина), 3 мМ НАДФН и 2–4 мг белка микросом. Реакцию начинают внесением амидопирина, анилина или этилморфина в конечной концентрации соответственно 8, 1 и 3 мМ. В контрольной пробе субстраты вносят после остановки реакции. Пробы инкубируют при температуре 37 °С в течение 5 мин (амидопирин и этилморфин) и 10 мин (анилин) при постоянном встряхивании. В течение этого промежутка времени реакции протекают линейно.

Реакции гидроксילирования амидопирина или этилморфина останавливают добавлением 250 мкл смеси равных объемов раствора ZnSO<sub>4</sub> и насыщенного раствора Ba(OH)<sub>2</sub>, а анилина – 500 мкл 15%-ного раствора ТХУ. Для осаждения белков пробы центрифугируют при 3500 г в течение 10 мин. Содержание образовавшихся аминофенола и формальдегида определяют в 1 мл надосадочной жидкости с помощью цветных реакций, вызываемых добавлением 500 мкл реактива Nash (5 г солянокислого аммония и 0,1 мл ацетилацетона в 6 мл 3%-ной уксусной кислоты) (для формальдегида) или 500 мкл 10%-ного NaCO<sub>3</sub> и 1,5 мл 2%-ного раствора фенола (для аминофенола). Пробы выдерживают в водяной бане при температуре 37 °С в течение 45 мин (для формальдегида) или 30 мин (для аминофенола).

Интенсивность образовавшейся окраски измеряют при 412 нм (для формальдегида) или 630 нм (для аминофенола).

Количество наномолей образовавшихся формальдегида и аминокетофенола определяют по калибровочным кривым.

Активность ферментных систем рассчитывают по формуле (12.3):

$$A = m / C, \quad (12.3)$$

где  $A$  – активность ферментов;  $m$  – содержание аминокетофенола или формальдегида в наномолях, образовавшееся за 1 мин в расчете на 1 мг белка и определяемых по калибровочным кривым;  $C$  – содержание белка в пробе.

**Определение активности глутатион-S-трансферазы.** Активность глутатион-S-трансферазы определяют по скорости образования окрашенного продукта (конъюгата) при помещении микросом или цитозоля клеток печени в инкубационную смесь, содержащую восстановленный глутатион и 1-хлор-2,4-динитробензол (ХДНБ) по методу Хабига. [5]. Принцип метода основан на катализируемой глутатион-S-трансферазой ферментативной реакции образования конъюгата 1-хлор-2,4-динитробензола в присутствии восстановленного глутатиона, имеющего максимум спектра поглощения при длине волны 340 нм. Реакционная смесь содержит 3,6 мМ ХДНБ, 10 мМ восстановленного глутатиона в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 6,65. Реакцию запускают внесением в среду 50 мкл суспензии микросом. В контрольную пробу вносят аналогичное количество буферного раствора. Измерение поглощения проводят в течение 3 мин при комнатной температуре. Расчет активности глутатион-S-трансферазы осуществляют с использованием коэффициента поглощения для образующегося продукта конъюгации  $\epsilon = 9600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Активность выражают в микромолях на минуту на миллиграмм белка.

#### 12.4. Определение активности системы метаболизма ксенобиотиков в целом организме

**Определение скорости элиминации тест-субстрата монооксигеназной системы – антипирина из крови (для крыс) или слюны (для людей).** Концентрацию антипирина в плазме крови крыс определяют по методу Brodie [6]. Крысам антипирин вводят в бедренную вену (50 мг/кг) под легким эфирным наркозом; 2 мл плазмы смешивают с 2 мл воды, 2 мл

цинкового раствора (10 г  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  + + 40 мл 6 н  $H_2SO_4$  + вода до 1 л) и 2 мл 0,75 н раствора NaOH. После встряхивания в течение 30 с пробы оставляют на 10 мин. Затем их центрифугируют при 3500 об/мин в течение 15 мин; к 3 мл супернатанта добавляют по 50 мкл 4 н раствора  $H_2SO_4$ . Поглощение раствора измеряют при 350 нм. Затем вносят по 100 мкл 0,2%-ного раствора  $NaNO_2$  и снова спектрофотометрируют через 20 мин. Разница значений во втором и первом случае служит показателем концентрации антипирина в пробе. Калибровочную кривую строят по стандартным растворам антипирина в 0,07 н растворе  $H_2SO_4$ .

Учитывая литературные данные о том, что концентрация антипирина в слюне человека коррелирует с его содержанием в крови, можно использовать этот тест для изучения гидроксиглизирующей функции печени человека. Антипирин назначают внутрь в дозе 1 г в крахмальных облатках и через 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 6; 8; 24; 36 и 48 ч собирают слюну. Концентрацию антипирина в образцах слюны, очищенной от примесей центрифугированием, определяют так, как описано выше.

**Расчет параметров фармакокинетики антипирина.** Определяют параметры фармакокинетики антипирина, используя график зависимости «концентрация – время». Период полуэлиминации  $T_{1/2}$  – время элиминации из организма половины введенной и всосавшейся дозы – соответствует времени уменьшения в 2 раза его концентрации в плазме крови на участке моноэкспоненциального снижения уровня. Константу скорости элиминации антипирина  $K_{эл}$  – параметр, характеризующий скорость исчезновения (элиминации) препарата из организма путем его биотрансформации и экскреции, рассчитывают по (12.4):

$$K_{эл} = \ln 2 / T_{1/2}, \quad (12.4)$$

где  $K_{эл}$  – константа элиминации;  $T_{1/2}$  – период полувыведения.

Общий клиренс ( $Cl$ ) характеризует скорость «очищения» организма от антипирина. Он соответствует (условно) той части объема распределения, которая очищается от препарата в единицу времени (12.5):

$$Cl = K_{эл} \cdot (D/C_0), \quad (12.5)$$

где  $D$  – введенная доза;  $C_0$  – начальная концентрация препарата в плазме крови.



Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время»  $S$  – площадь фигуры, ограниченной фармакокинетической кривой и осями координат, рассчитывают по (12.6):

$$S = C_0/K_{эл} \quad (12.6)$$

**Определение скорости элиминации антипирина и его окисленных метаболитов с мочой.** Антипирин является типичным субстратом цитохрома Р-450. В организме он метаболизирует до 3-гидроксиметил-, нор-, 4-гидрокси-, 3-карбоксиметил- и 4,4'-дигидрокси-антипирин с последующим образованием соответствующих конъюгатов преимущественно сульфатов у крыс или глюкуронидов у людей.

**Определение в моче крыс содержания антипирина и его первичных метаболитов** [7]. Крысам вводят антипирин внутривентрикулярно в дозе 20 мг/кг в виде 0,08%-ного водного раствора и помещают в обменные клетки для сбора мочи. Мочу собирают в течение 1,5 и 24 ч. Образцы мочи инкубируют в присутствии 50 мкл глюкуронидазы (сульфатаза – 2,5 U/мл, глюкуронидаза – 5 U/мл) в течение 3 ч при температуре 37 °С. Содержание антипирина и его первичных метаболитов определяют жидкостно-хроматографическим методом.

В пробы добавляют 80 мг фенацетина (внутренний стандарт) в 50 мкл 96%-ного этанола. По 1 мл раствора вносят в две пробирки (компоненты 1 и 2).

**Ход анализа компонента 1:** к 1 мл раствора добавляют 200 мг  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 100 мкл 4 М NaOH и 10 мл хлороформа. После встряхивания (15 с) и центрифугирования (3000 об/мин, 5 мин) с помощью шприца с длинной иглой отбирают 5 мл средней части органической фазы и выпаривают в токе азота при температуре +50 °С. Сухой остаток, содержащий антипирин, 3-гидроксиметил- и 3-карбоксиметил-антипирин, растворяют в 100 мкл элюента (смесь вода – метанол – 60 : 40) и 25 мкл смеси вносят на колонку хроматографа.

**Ход анализа компонента 2:** к 1 мл раствора добавляют 5 мл смеси хлороформ – пентан (30 : 70). Экстракцию проводят в течение 15 с при энергичном встряхивании. После центрифугирования (3000 об/мин, 5 мин) водную фазу извлекают и процедуру экстракции повторяют. Полученные органические фазы объединяют, и 5 мл средней части раствора выпаривают досуха в медленной струе азота (+40 °С). Сухой остаток,

содержащий нор- и 4-гидрокси-антипирин, растворяют в 100 мкл элюента и 50 мкл наносят на колонку.

В работе можно использовать высокоэффективный жидкостный хроматограф с колонкой размером  $10 \times 0,8$  см, наполнитель *Bondapak* –  $C_{18}$ . Скорость движения элюента – 1,5 мл/мин при давлении 70 атм. Детекцию выходящих фаз проводят с помощью ультрафиолетового детектора при 254 нм.

Установлено, что в течение первых 14 мин с момента помещения образца в колонку хроматографа определяются антипирин – время удержания 4,25 мин, 3-гидроксиметил-антипирин – 8,15, 3-карбоксиметил-антипирин – 8,15, нор-антипирин – 9,5 и 4-гидрокси-антипирин – 11 мин. Расчет содержания метаболитов производят по калибровочным графикам.

**Определение в моче человека содержания антипирина и его первичных метаболитов.** Антипирин назначают внутрь в дозе 10 мг/кг массы (в облатках). Мочу собирают за периоды 0–4 ч, 4–8, 8–12, 12–24 ч после приема антипирина. Образцы мочи инкубируют в присутствии  $\beta$ -глюкуронидазы в течение 3 ч при температуре 37 °С [6]. Дальнейший ход анализа осуществляют так, как описано выше.

**Определение продолжительности фармакологического действия тест-субстрата гексенала у крыс.** Гексенал метаболизируется преимущественно в печени цитохром-Р-450-зависимой микросомальной системой эндоплазматического ретикулаума с образованием фармакологически неактивных полярных метаболитов. Следовательно, по длительности сна, вызванного введением гексенала, можно косвенно судить (с учетом состояния ЦНС) об активности гидроксилирующей функции печени. Гексенал вводят крысам внутривентрально в дозе 100 мг/кг. Длительность сна крыс оценивают по продолжительности бокового положения животных.

## 12.5. Митохондриальные мембраны.

### Электрон-транспортная цепь митохондрий

Пять мембранных ферментов составляют систему окислительного фосфорилирования (ОХРНОС), локализованную во внутренней митохондриальной мембране. Четыре из пяти белковых комплекса составляют «дыхательную цепь» и участвуют в переносе электронов, который в трех пунктах сопряжен с транслокацией протонов через внутреннюю митохон-

дриальную мембрану. Результирующий протонный градиент используется АТФ-синтазным комплексом (пятым ферментным комплексом) для фосфорилирования АДФ. *Комплекс I*, или *NADH-дегидрогеназа*, является основной точкой входа электронов в дыхательную цепь. *Комплекс II*, или *сукцинат-дегидрогеназа*, представляет другую точку входа электронов в дыхательную цепь, которая передает электроны с сукцината на убихинон и непосредственно связывает цикл Кребса с дыхательной цепью. Этот электронный перенос не связан с транслокацией протонов через мембрану. Центральным компонентом системы ОХРНOS является *цитохром с-редуктаза*, или *комплекс III*, функционирующий в виде димера. Он транспортирует электроны с восстановленного убихинона (убихинола) на цитохром с, малый мобильный переносчик электронов, связанный с внешней поверхностью внутренней мембраны. *Комплекс IV*, или *цитохром с-оксидаза*, представляет собой конечный комплекс дыхательной цепи. Цитохром с-оксидаза катализирует перенос электронов от цитохрома с на молекулярный кислород, восстанавливая последний до воды. *АТФ-синтаза, комплекс V*, использует полученный протонный градиент для синтеза АТФ.

В течение долгого времени свободно-диффузионная модель (fluid-state) использовалась для описания организации системы ОХРНOS. Согласно данной модели, комплексы респираторной цепи свободно диффундируют в мембране и перенос электронов происходит в результате случайных хаотических соударений. Эта модель основана на том, что все индивидуальные белковые комплексы системы ОХРНOS могут быть изолированы с сохранением ферментативной активности.

В последнее десятилетие появляется все больше доказательств, указывающих на стабильные взаимодействия комплексов ОХРНOS в форме суперкомплексов. Предполагают, что суперкомплексы ОХРНOS и единичные комплексы ОХРНOS сосуществуют во внутренней митохондриальной мембране. Более того, ассоциация комплексов ОХРНOS в суперкомплексы и диссоциация суперкомплексов на комплексы ОХРНOS, как считают, является динамическим процессом, который зависит от физиологического состояния клетки. Последние исследования Мх быка и крысы показывают, что АТФ-синтаза в митохондриальных мембранах организована в длинные ленты димеров и кристы Мх действуют как ловушки (*traps*) протонов, и АТФ-синтаза может оптимизировать свою активность при недостатке протонов.

Перенос электронов через комплекс III осуществляется с участием цитохрома *c*. Цитохромы *c* – это водорастворимые белки малой молекулярной массы (около 12 000 Да), первичная структура которых содержит около 100 аминокислот. Цитохромы *c* найдены у различных видов (растений, животных, бактерий). Цитохром *c* может катализировать реакции гидроксигидрирования, ароматического окисления и обладает пероксидазной активностью, окисляя различные доноры электронов. Цитохромы *c* являются металлопротеидами, которые функционируют в реакциях переноса электронов и содержат в качестве простетической группы гем *c* (или несколько гемов), ковалентно связанный с молекулой белка через одну или две тиоэфирные связи между кофактором и сульфгидрильной группой цистеина белка. Лигандом в 5-м координационном положении иона железа всегда является гистидин. Цитохромы *c* локализованы в межмембранном пространстве. Согласно Р. Амблеру [8], все цитохромы *c* можно разделить на четыре класса.

I класс – низкоспиновая форма растворимого цитохрома *c* митохондрий и бактерий, в которой гистидин, связанный с гемом, находится в N-концевой части молекулы белка, а лиганд в 6-м координационном положении – метионин расположен через 40 остатков по направлению к C-концу молекулы;

II – высокоспиновая форма цитохрома *c* и ряд низкоспиновых форм (например, цитохром *c* 556), которые имеют центры связывания гема в C-концевой области молекулы белка. Белок содержит четыре спиральных участка полипептидной цепи;

III – включает цитохромы, содержащие несколько гемов и имеющие низкий редокс-потенциал (цитохром *c*7 (три гема), *c*3 (четыре гема) и высокомолекулярный цитохром *c* (*hexadeca-haem*)), в котором на одну молекулу гема приходится 30–40 остатков. Гемы *c*, координированные двумя гистидинами, являются структурно и функционально неэквивалентными и характеризуются различными редокс-потенциалами от 0 до 400 мВ;

IV – белки данного класса нужны для поддержания сложных белков, имеющих гем и другие простетические группы, например флавоцитохром *c*, цитохромы *cd*. Цитохромы этого класса являются белками, содержащими четыре гема, которые в 5-м и 6-м координационных положениях имеют или два гистидина, или гистидин и метионин. Примером пространственной структуры таких белков служит цитохром *c* фотосинтетического реакционного центра (PRC).

Ковалентное связывание гема с белком происходит на положительно заряженной стороне всех мембран, продуцирующих энергию (периплазма бактерий, межмембранное пространство Мх, люмены тилакоидов), и требует: 1) синтеза и транслокации апоцитохрома *c* и гема через одну митохондриальную мембрану; 2) восстановления апоцитохрома *c* и гема и поддержания в восстановленной форме; 3) катализа реакции связывания гема. Только две формы митохондриальных цитохромов *c* функционируют в дыхательной цепи. Помимо хорошо известной роли цитохромов *c* в биоэнергетической редокс-химии С-типы цитохромов участвуют в функционировании антиоксидантных метаболических путей, в процессах клеточной сигнализации и регуляции.

Митохондриальный цитохром *c1* является одной из трех редокс-субъединиц третьего комплекса дыхательной цепи (комплекс цитохром *bc1*).

Митохондриальный цитохром *c1* «заякорен» в мембране одним мембранным сегментом вблизи С-конца. Препарат водорастворимого цитохрома *c1* может быть получен удалением гидрофобного С-концевого участка. Водорастворимый цитохром *c1* не может участвовать в сборке комплекса *bc1*.

Цитохром *c* является компонентом электрон-транспортной цепи, функция которого заключается в переносе электронов между комплексом III (убихинон-цитохром *c*-редуктаза или комплекс цитохром *bc1*) и комплексом IV (цитохром *c*-оксидаза). Цитохром *c* помимо функции переносчика электронов в дыхательной цепи обладает способностью отделяться от внутренней митохондриальной мембраны, транспортироваться в цитоплазму клетки и запускать цепь событий в цитозоле, которая ускоряет апоптоз [9]. Окислительный стресс и потеря мембранного митохондриального потенциала,  $Ca^{2+}$ -индуцированный митохондриальный переход с образованием пор высокой проницаемости (МРТ), истечение цитохрома *c* являются известными индукторами апоптоза [10]. Способность цитохрома *c* проявлять различные функции внутри Мх и в цитозоле связана с клеточной локализацией гемопротеида. Это единственный периферический белок, который взаимодействует с внешней стороной внутренней митохондриальной мембраны.

Выброс нескольких белков, которые в норме локализируются в межмембранном пространстве, наблюдается на ранних стадиях апоптоза. Только холоцитохром *c*, но не апоцитохром *c* способен стимулировать активацию прокаспазы-9, когда он

выбрасывается в цитозоль и взаимодействует с Araf-1 (*apoptotic protease activating factor*) и прокаспазой-9 в присутствии dATP с образованием апоптосомного комплекса. Причем продемонстрировано, что восстановленная и окисленные формы цитохрома *c* могут активировать прокаспазу-9 с одинаковой эффективностью. Истечение цитохрома *c* из Мх происходит через специальный канал MAC (*mitochondrial apoptosis-induced channel*), пору, которая образуется во внешней митохондриальной мембране на ранней стадии апоптоза и Bcl регулируется Bcl-2 семейством белков.

Цитохромы являются важным классом металлобелков, участвующих в процессах электронного переноса и окислительно-восстановительного катализа. Можно отметить, что окислительно-восстановительные ферменты и металлобелки составляют более 40 % всех классифицированных Международным Союзом биохимии и молекулярной биологии белков. Они играют важную роль в сигнальных процессах, ответственны за регуляцию генов и их экспрессию, обеспечивают конверсию энергии в процессах дыхания и фотосинтеза.

Изменяя структуру и природу белкового окружения металла в активном центре, живые системы эффективно регулируют физико-химические свойства этих белков. Одной из важнейших функциональных характеристик металлобелков является их окислительно-восстановительный потенциал. Его значение зависит от множества факторов, в том числе от координационной геометрии активного центра металлобелка, природы лигандов железа, доступности активного центра белка для молекул растворителя.

Таким образом, цитохром *c* в электрон-транспортной цепи Мх выступает акцептором электронов для комплекса III (цитохром *c*-редуктазы) и донором электронов для комплекса IV (цитохромоксидазы).

Активность этих ферментных систем представляется важнейшим параметром, характеризующим работу электрон-транспортной цепи Мх и биоэнергетический статус клетки.

## **12.6. Биохимический анализ мембран митохондрий**

**Спектрофотометрический метод измерения активности ротенон-нечувствительной НАДН: цитохром *c*-редуктазы.** Измерения проводят в среде, содержащий 0,02 М фосфатного

буфера, рН 7,4, 1 мМ KCN, 1 мкМ ротенона, 1,5 мМ НАДН (донор электронов) и 20 мкМ цитохрома *c*. Реакцию в среде, содержащей окисленную форму цитохрома *c*, начинают внесением нейтрализованного раствора (рН 7,4) аскорбиновой кислоты, конечная концентрация в кювете – 10 мкМ. На длине волны 550 нм регистрируют процесс быстрого восстановления цитохрома *c* (восстановление цитохрома *c* сопровождается изменением цвета раствора от красновато-оранжевого до ярко-розового). Максимальное значение оптической плотности раствора на длине волны 550 нм соответствует полному восстановлению цитохрома *c*. Измерение активности ротенон-нечувствительной НАДН: цитохром *c*-редуктазы начинают внесением исследуемых препаратов Мх в кювету, содержащую окисленный цитохром *c*, и регистрируют увеличение оптической плотности на длине волны 550 нм. Рассчитывают удельную активность Мх, измеряемую в наномолях восстановленного цитохрома *c* за 1 мин в расчете на 1 мг белка Мх. Коэффициент молярной экстинкции цитохрома *c* равен  $\epsilon_{\text{red}} - \epsilon_{\text{ox}}(550 \text{ нм}) = 18\,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [11].

**Полярографический метод измерения активности цитохромоксидазы.** В этом методе оценивают активность цитохромоксидазы по скорости потребления кислорода Мх. Следует отметить, что все процедуры при выделении, работе и хранении Мх надо проводить, соблюдая температурный режим: пробы необходимо хранить во льду, предварительно охлаждать среды и инструмент до температуры 0–4 °С. В ячейку полярографа, содержащую среду следующего состава: 0,125 М сахарозы, 60 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl, 0,1 мМ 2,4-динитрофенола, 40 мкМ цитохрома *c*, вносят суспензию интактных Мх либо Мх, разрушенных детергентом. Содержание митохондриального белка в полярографической ячейке составляет 0,5–1,0 мг/мл. (Митохондрии, разрушенные детергентом, готовят, смешивая равные объемы суспензии Мх и 2%-ного раствора детергента Твин 80. Смесь встряхивают в течение 2–3 мин и помещают на лед.)

Цитохромоксидазную реакцию начинают, внося нейтрализованный до рН 7,4 раствор аскорбиновой кислоты, создавая в пробе ее концентрацию 10 мМ. Измеряют скорость поглощения кислорода и рассчитывают активность цитохромоксидазы в наномолях поглощенного O<sub>2</sub> за 1 мин в расчете на 1 мг белка.

**Экстрагирование цитохрома *c* из митохондриальной мембраны и реконструкция дыхательной цепи.** Принцип метода состоит в разрушении внешней мембраны Мх с помощью детергентов или гипотонической обработки и экстракции белков солевыми растворами.

**Цель работы** – экстрагировать цитохром *c* из Мх, убедиться в снижении оксидазной активности препаратов Мх и активировать дыхание добавлением цитохрома *c*.

В качестве объекта исследования используются митохондрии печени крыс.

**Реактивы для выделения Мх печени крыс:**

- сахараза – 0,25 М раствор;
- КСl – 0,15 и 0,015 М растворы;
- сукцинат калия – 5 мМ раствор, рН 7,4;
- глутамат калия – 5 мМ раствор, рН 7,4;
- 2,4 динитрофенол – 0,005 М раствор, рН 7,4;
- среда инкубации: 0,15 М сахараза, 0,075 М КСl, 0,01 М фосфат калия, рН 7,4;

• раствор цитохрома *c* – 1 мг/мл; готовится непосредственно перед опытом;

• реактивы для определения белка.

Все растворы готовят на бидистиллированной воде.

**Ход анализа:** изолированные митохондрии печени крыс суспендируют в 3 мл 0,25 М раствора сахаразы. Три конические колбы заполняют 40 мл растворов: 1) 0,25 М сахаразы; 2) 0,15 М КСl и 3) 0,015 М КСl. В каждую колбу добавляют по 1 мл густой суспензии Мх. Содержимое всех колб осторожно перемешивают в течение 10 мин при температуре 0 °С и затем переносят в три центрифужных стакана на 50 мл. Митохондрии отделяют центрифугированием при 10 000 g, суспендируют в 0,5 мл 0,15 М КСl и переносят в три колбы, содержащие по 40 мл 0,15 М КСl. Содержимое колб вновь перемешивают на холоде в течение 10 мин и центрифугируют повторно в тех же условиях для отделения Мх. Полученные осадки Мх суспендируют в 0,3–0,5 мл 0,3 М раствора сахаразы и используют в опытах. Скорости потребления кислорода определяют полярографически, используя в качестве субстратов сукцинат и глутамат (5 мМ), а через 1–2 мин вносят динитрофенол (50–100 мкМ).

Для препарата, промытого гипотоническим раствором КСl, определяют зависимость скорости окисления сукцината от ко-



личества добавленного в среду инкубации цитохрома *c* (концентрации от 0 до 100 мкг/2 мл, 5–6 точек).

**Определение активности комплекса III: убихинон-цитохром *c*-оксидоредуктазы.** Активность комплекса III определяют спектрофотометрически при длине волны 550 нм по антимицин А-чувствительному восстановлению ферри- и ферроцитохрома *c* децилубихиноном в присутствии Твин 20, альбумина и азида натрия.

Для измерения активности комплекса III суспензию Мх разбавляют до концентрации 0,05 мг/мл белка в среде, содержащей 35 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 мМ  $\text{NaCN}$ , 0,5 мМ ЭДТА, pH 7,25, и разрушают 0,05%-ным Triton X-100. Образцы затем обрабатывают ультразвуком на водяной бане в течение 30 с. Активность комплекса определяют по скорости антимицин А-чувствительного восстановления цитохрома *c* (550 нм, коэффициент молярной экстинкции  $18\,500\text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ) при добавлении 60 мкМ децилубихинола, 50 мкМ цитохрома *c* и 5 мМ  $\text{MgCl}_2$  к суспензии Мх, подвергнутых действию ультразвука (содержание митохондриального белка в пробе – 0,01 мг/мл).

**Спектрофотометрическое определение концентраций цитохромов *c*, *c*<sub>1</sub> и *b* в водных растворах.** Коэффициенты молярной экстинкции для цитохрома *c*  $A_{\text{восст-окисл}}^{550} = 18\,500\text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  при 550 нм и для цитохрома *c*<sub>1</sub>  $A_{\text{восст}}^{552,5} - A_{\text{восст}}^{540} = 17\,500\text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . Восстановление производят аскорбатом или дитионитом. В присутствии цитохрома *b* содержание цитохрома *c*<sub>1</sub> определяли по дифференциальным спектрам форм, восстановленных аскорбатом, минус окисленные феррицианидом формы. Цитохром *b* определяли из дифференциальных спектров форм, восстановленных дитионитом, минус спектры форм, восстановленных аскорбатом (коэффициент молярной экстинкции  $28\,500\text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  для  $A^{562} - A^{577}$ ).

**Кинетическая модель  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированного открытия пор высокой проницаемости в энергизованных Мх печени крыс.** Цитотоксичность, обусловленная такими патологиями, как ишемия-реперфузия сердца и эксайтотоксичность, как известно, включает в себя как патофизиологическое возрастание внутриклеточной концентрации кальция, так и митохондриопосредованные процессы. Эти механизмы, как предполагают, связаны биохимически, поскольку Мх являются основным местом накопления ионов кальция. Посредством кальциевого унипортера происходит аккумуляирование в Мх избыточного

цитозольного кальция, а высвобождение кальция происходит посредством натрий/кальциевого и кальций/протонного антипортеров, что обуславливает тем самым медленный и продолжительный обмен кальция через внутреннюю митохондриальную мембрану. В свою очередь избыточное накопление кальция в Мх приводит к формированию пор высокой проницаемости (МРТ), которые играют важную роль в гибели клеток при многих патологиях.

Поры высокой проницаемости в изолированных Мх определяются как циклоспорин А-чувствительное  $\text{Ca}^{2+}$ -опосредованное формирование пор во внутренней митохондриальной мембране, обеспечивающее свободную диффузию воды и других молекул, молекулярная масса которых не превышает 1500 Да, и приводящее к последующему набуханию Мх и высвобождению аккумулированного кальция. С кинетической точки зрения в индукции МРТ можно выделить три различные фазы: 1) фазу инициации, которая связана с аккумулярованием избытка кальция посредством кальциевого унипортера; 2) лаг-фазу, при которой накопленный в Мх кальций запускает механизмы формирования МРТ; 3) фазу терминации. Последняя фаза связана с уменьшением мембранного потенциала, высвобождением митохондриального кальция, который повторно аккумулируется оставшимися интактными Мх. Это приводит к снижению целостности внутренней митохондриальной мембраны, разобщению окислительного фосфорилирования и набуханию Мх.

В литературе предложено несколько кинетических моделей процесса формирования МРТ. Поскольку при низких концентрациях кальция длительность фазы терминации незначительна по отношению к лаг-фазе, то далее фаза терминации не рассматривается в этой кинетической модели. Модель основана на данных, полученных из экспериментов на изолированных Мх печени крыс, и определяет скорости, с которыми происходят изменения концентрации кальция в среде измерения, и набухание Мх. Модель формулируется как система дифференциальных уравнений, которые решаются численно на основе экспериментальных кривых.

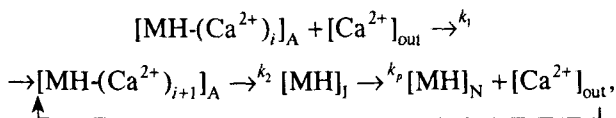
**Кинетическая модель  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемого формирования пор высокой проницаемости в Мх печени крыс.** Эксперименты с изолированными Мх печени крыс проводят с использованием среды следующего состава: 0,25 М сахарозы, 0,02 М Tris-HCl, 0,001 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,005 М сукцинат в каче-

стве субстрата дыхания, рН 7,4. Концентрация белка в пробе составляет 0,25 мг/мл.

Измерение концентрации внешнего кальция проводят с использованием флуоресцентного зонда FURA-2 (2 мкМ). Флуоресценция зонда FURA-2 обусловлена формированием комплекса зонда с экстрамитохондриальным кальцием, интенсивность флуоресценции измеряется на длинах волн: возбуждения – 340 нм и эмиссии – 500 нм [12]. Для определения точной концентрации ионов кальция в среде осуществляют построение калибровочной кривой посредством внесения известных количеств хлорида кальция в среду измерения, содержащую зонд FURA-2 и все компоненты, которые используются в эксперименте, в том числе и набухшие посредством добавления аламетицина Мх. Калибровочную кривую строят как зависимость изменения интенсивности флуоресценции зонда от концентрации добавленного кальция.

Набухание Мх измеряют по изменению оптической плотности (интенсивности светорассеяния) суспензии Мх во времени на длине волны 540 нм [13]. Для количественного определения процентного содержания Мх, подвергшихся набуханию, осуществляют построение калибровочной кривой, представляющей собой зависимость оптической плотности суспензии от содержания полностью набухших Мх в суспензии. Для получения полностью набухших Мх одну пробу Мх инкубируют в течение 15 мин при температуре 30 °С в присутствии высокой концентрации хлорида кальция (50 мкМ). Затем добавлением избытка ЭГТА удаляют свободный кальций. Другую пробу Мх параллельно инкубируют в этой же среде в отсутствие кальция, но с добавлением ЭГТА для ингибирования МРТ. Затем интактные и набухшие Мх смешивают в различных пропорциях и измеряют оптическую плотность суспензии. После каждого измерения добавляют неспецифический порообразующий агент – аламетицин для индукции полного набухания каждой из проб. Таким образом, разница в величине оптической плотности в контрольной пробе в свободной от кальция среде до и после добавления аламетицина отражает максимальное изменение оптической плотности суспензии Мх, связанное с митохондриальным набуханием. Калибровочная кривая представляет собой отношение изменения оптической плотности суспензии Мх к проценту набухших Мх.

Кинетическая модель  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированного МРТ представлена ниже:



где  $[\text{MН-(Ca}^{2+}\text{)}_i\text{]}_A$  – популяция активных ненабухших Мх  $[\text{MН}]_A$ ;  $(\text{Ca}^{2+})_i$  обозначает исходное количество ионов кальция в Мх. Аккумуляция  $(\text{Ca}^{2+})$  происходит в течение *первого этапа* (константа скорости  $k_1$ ), представленного на схеме как формирование  $[\text{MН-(Ca}^{2+}\text{)}_{i+1}\text{]}_A$ , и инициирует процесс МРТ, который описывается здесь как последовательность двух этапов. *Второй этап* (константа скорости  $k_2$ ) является скоростью-лимитирующим этапом МРТ, который приводит к переходу Мх в промежуточное состояние  $[\text{MН}]_I$ . *Следующий этап* ( $k_p$ ) ведет к образованию популяции неактивных (набухших) митохондрий, представленных здесь как  $[\text{MН}]_N$ ; при этом весь  $\text{Ca}^{2+}$  находится в среде измерения.  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  – это концентрация свободного кальция в среде, доступного для аккумуляции Мх. Концентрацию ионов кальция, аккумуляированного Мх  $[\text{Ca}^{2+}]_M$ , можно определить как произведение количества аккумуляированного кальция  $i$  и концентрации активных митохондрий  $[\text{MН}]_A$ :  $([\text{Ca}^{2+}]_M = i \cdot [\text{MН}]_A)$ . Предполагается, что общая концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  постоянна в течение реакции  $([\text{Ca}^{2+}]_T = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} + [\text{Ca}^{2+}]_M)$ . Данная модель содержит ряд допущений, которые отражают специфические характеристики процесса МРТ:

1. Поступление кальция в Мх является бимолекулярной реакцией с константой скорости  $k_1$ . Другими словами, скорость поступления кальция равняется произведению  $k_1 \cdot [\text{MН}]_A \times [\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  и, таким образом, может изменяться пропорционально  $[\text{MН}]_A$  и  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  в течение всей реакции. Данная кажущаяся константа скорости  $k_1$  является сложной функцией, которая включает в себя многие процессы, связанные с аккумулярованием кальция в Мх.

2. Скорость формирования промежуточного состояния  $[\text{MН}]_I$  является сложной функцией количества ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , аккумуляированных митохондриями (12.7):

$$k_2 = k'_2 \cdot ([\text{Ca}^{2+}]_M / [\text{MН}]_A)^n, \quad (12.7)$$

где  $k'_2$  – константа скорости реакции данного этапа; отношение  $[\text{Ca}^{2+}]_M / [\text{MН}]_A$  отражает среднее количество аккумуляиро-

ванных ионов кальция на одну Мх;  $n$  – кажущийся порядок реакции второго этапа по отношению к кальцию.

3. Константа скорости  $k_p$  значительно выше, чем константы скоростей  $k'_2$  или  $k_1$ .

4. Когда в Мх формируются МРТ, кальций высвобождается обратно в среду измерения и становится доступным для аккумулярования другими Мх.

5. Скорость формирования  $[MН]_I$  является действительно скоростью-лимитирующим этапом в последовательности реакций.

Кинетическая модель в соответствии с предложенной схемой может быть сформулирована как система двух дифференциальных уравнений (12.8) – (12.9):

$$d[MН]_A / dt = -k_2 \cdot [MН]_A; \quad (12.8)$$

$$d[Ca^{2+}]_{out} / dt = -k_1 \cdot [MН]_A \cdot [Ca^{2+}]_{out} + k_2 \cdot [MН]_A \cdot ([Ca^{2+}]_M / [MН]_I). \quad (12.9)$$

В уравнении (12.8)  $k_2$  – скорость перехода Мх в промежуточное состояние  $[MН]_I$ , которая, как предполагается, является функцией, отражающей накопление определенного количества ионов кальция Мх. Отношение  $[Ca^{2+}]_M / [MН]_I$  в уравнении (12.9) отражает гипотетическое высвобождение аккумулярованных ионов кальция каждой инактивированной Мх.

Система нелинейных уравнений (12.8) – (12.9) решается методом Рунге – Кутты с фиксированным шагом с помощью программного приложения MathCad. Экспериментальные кинетические кривые набухания Мх и аккумулярования ионов кальция сопоставляются с теоретически рассчитанными кривыми изменения  $[MН]_A$  и  $[Ca^{2+}]_{out}$  с использованием данной системы уравнений, что позволяет определить соответствующие значения  $k_1$ ,  $k_2$  и  $n$ . При расчете этим методом в качестве начальных условий задаются концентрация Мх  $[MН]_A = 0,25$  мг/мл и концентрация общего кальция  $[Ca^{2+}]_T$  в зависимости от количества внесенного в среду кальция. Данная модель применима лишь в диапазоне концентраций кальция 5–20 мкМ, так как при концентрации добавленного кальция ниже 5 мкМ функционирование дыхательной цепи Мх способно препятствовать наступлению набухания в течение дли-

тельного периода времени, а при концентрации кальция выше 20 мкМ МРТ происходит без видимого лаг-периода.

## Литература

1. Карузина, И.И. Выделение микросомальной фракции печени и характеристика ее окислительных систем / И.И. Карузина, А.И. Арчаков // Современные методы в биохимии: под ред. В.Н. Ореховича. М., 1977. С. 49–61.
2. Omura, T. Function of cytochrome P-450 of microsomes / T. Omura [et al.] // Fed. Proc. 1965. Vol. 24, N 5. P. 1181–1189.
3. Roerig, D.L. Microsomal electron transport: tetrazolium reduction by rat liver microsomal NADPH-cytochrome c reductase / D.L. Roerig, L. Jr. Mascaró, S.D. Aust // Arch. Biochem Biophys. 1972. Vol. 153, N 2. P. 475–479.
4. Vermilion, J.L. Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Spectral characterization of oxidation-reduction states / J.L. Vermilion, M.J. Coon // J. Biol. Chem. 1978. Vol. 253. N 253. P. 2694–2704.
5. Habig, W.H. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jacoby // J. Biol. Chemistry. 1974. Vol. 249, N 22. P. 7130–7139.
6. Brodie, B.B. The estimation of antipyrine in biological materials / B.B. Brodie [et al.] // J. Biol Chem. 1949. Vol. 179, N 1. P. 25–29.
7. Заводник, Л.Б. Модифицированный высокоэффективный жидкостно-хроматографический метод определения в моче метаболитов антипиринна / Л.Б. Заводник [и др.] // Химико-фарм. журнал. 1989. № 11. Деп. ВИНТИ.В. 89.
8. Ambler, R.P. Sequence variability in bacterial cytochromes c / R.P. Ambler // Biochim. Biophys. Acta. 1991. Vol. 1058. P. 42–47.
9. Kluck, R.M. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis / R.M. Kluck [et al.] // Science. 1997. Vol. 275. P. 1132–1136.
10. Kowaltowski, A.J. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress / A.J. Kowaltowski, R.F. Castilho, A.E. Vercesi // FEBS Lett. 2001. Vol. 495. P. 12–15.
11. Практикум по биохимии / под ред. С.Е. Северина, Г.Л. Соловьевой. М., 1989.
12. Lukacs, G.L. Measurement of the matrix  $\text{Ca}^{2+}$  free concentration in heart mitochondria by entrapped fura-2 and quin2 / G.L. Lukacs, A. Kapus // Biochem. J. 1987. Vol. 248. P. 609–613.
13. Baranov, S.V. Kinetic model for  $\text{Ca}^{2+}$  induced permeability transition in energized liver mitochondria discriminates between inhibitor mechanisms / S.V. Baranov [et al.] // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283, N 2. P. 665–676.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ПРЕДИЛОВИЕ</b> .....	3
<b>ГЛАВА 1. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ОТБОРА КОМПОНЕНТОВ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН</b> .....	5
1.1. Схема отбора компонентов для синтетических вакцин ....	5
1.2. Определение основных направлений мутационного давления в вирусном гене .....	8
1.3. Выделение наиболее иммуногенных областей вирусного белка .....	14
1.4. Предсказание вторичной структуры для выделенных В-клеточных эпитопов .....	21
1.5. Оценка уровней мутабельности В-клеточных эпитопов вирусного белка .....	23
1.6. Оценка консервативности В-клеточных эпитопов вирусного белка .....	29
<i>Литература</i> .....	34
<b>ГЛАВА 2. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ И ПРИЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ КРИСТАЛЛОВ БЕЛКОВ: КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ МИНОРНОЙ ФОРМЫ ГЕМОГЛОБИНА A<sub>2</sub></b> .....	34
2.1. Обзор методов кристаллизации белковых молекул .....	36
2.2. Стратегии кристаллизации белковых молекул .....	51
2.3. Получение кристаллов гемоглобина A <sub>2</sub> .....	55
<i>Литература</i> .....	64
<b>ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ</b> .....	65
3.1. Количественное определение белка .....	66
3.2. Общие правила работы с ферментами .....	75
3.3. Определение активности ферментов .....	77
3.4. Выделение и очистка ферментов .....	79
3.5. Частичная очистка растворимой НТФазы из почек быка ...	91
3.6. Исследование свойств ферментов .....	99
<i>Литература</i> .....	104

<b>ГЛАВА 4. АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТ И РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ</b> .....	104
4.1. Аналитические задачи, требующие аминокислотного анализа .....	104
4.2. Определение свободных аминокислот с помощью ионообменной хроматографии .....	107
4.3. Высокоэффективная ионно-обменная хроматография (ВЭЖХ) .....	117
<i>Литература</i> .....	131
<b>ГЛАВА 5. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТЕОЛИЗА</b> .....	132
5.1. Биологическая роль протеолиза .....	133
5.2. Методы определения активности протеолитических ферментов .....	135
5.3. Препаративные методы при анализе протеолитической активности .....	152
<i>Литература</i> .....	156
<b>ГЛАВА 6. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКАХ И ТКАНЯХ</b> .....	158
6.1. Определение показателей, характеризующих активность свободнорадикальных процессов .....	159
6.2. Определение концентрации диеновых конъюгатов в микросомальной фракции печени крыс .....	163
6.3. Определение концентрации вторичных продуктов ПОЛ и скорости процессов перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот с тиобарбитуровой кислотой .....	164
6.4. Определение скорости ПОЛ в микросомальной фракции печени крыс в присутствии прооксидантов .....	167
6.5. Оценка окислительной модификации белков .....	170
6.6. Определение показателей АОС .....	173
6.7. Метод определения антиоксидантной активности смесей веществ или биологических жидкостей с использованием микросомальной фракции печени крыс в качестве модельной системы окисления .....	193
<i>Литература</i> .....	195



<b>ГЛАВА 7. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ</b> .....	196
7.1. Полярнографический метод .....	197
7.2. Исследование тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования изолированных митохондрий .....	199
7.3. Преимущества изучения митохондриального окисления целой ткани .....	206
<i>Литература</i> .....	212
<b>ГЛАВА 8. БИОХИМИЯ ДЫХАНИЯ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА</b> .....	213
8.1. Тканевой цилиндр Крома .....	213
8.2. Концепция конвективного механизма транспорта кислорода .....	217
8.3. Методы исследования осцилляторного массопереноса воды и кислорода .....	223
8.4. Математическое моделирование дыхания и оксигенации	226
8.5. Диффузионный и осцилляторный механизмы оксигенации	228
<i>Литература</i> .....	231
<b>ГЛАВА 9. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ</b> .....	232
9.1. Роль цикла трикарбонных кислот в обмене веществ .....	232
9.2. Методы определения активности ферментов ЦТК .....	234
9.3. Определение содержания субстратов ЦТК .....	249
<i>Литература</i> .....	254
<b>ГЛАВА 10. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛИКОЛИЗА</b> .....	255
10.1. Биологическое значение гликолиза .....	255
10.2. Определение содержания некоторых субстратов гликолитического пути .....	258
10.3. Определение активности важнейших ферментов гликолитического пути .....	266
<i>Литература</i> .....	272

<b>ГЛАВА 11. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБМЕНА ЛИПИДОВ</b> .....	273
11.1. Экстракция липидов из крови и тканей .....	273
11.2. Исследование состава липидов методом тонкослойной хроматографии .....	274
11.3. Количественное определение триглицеридов сыворотки крови .....	282
11.4. Качественный и количественный анализ высших жирных кислот методом газожидкостной хроматографии .....	284
<i>Литература</i> .....	292
<b>ГЛАВА 12. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ МИКРОСОМАЛЬНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН</b> .....	293
12.1. Микросомальные мембраны и метаболизм ксенобиотиков	293
12.2. Выделение микросом. Количественное определение цитохромов .....	298
12.3. Определение активности некоторых ферментов лекарственного метаболизма .....	299
12.4. Определение активности системы метаболизма ксенобиотиков в целом организме .....	302
12.5. Митохондриальные мембраны. Электрон-транспортная цепь митохондрий .....	305
12.6. Биохимический анализ мембран митохондрий .....	309
<i>Литература</i> .....	317
<b>ГЛАВА 13. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОХИМИИ ФАГОЦИТОЗА</b> .....	318
13.1. Выделение нейтрофилов крови человека .....	320
13.2. Определение жизнеспособности клеток .....	322
13.3. Исследование генерации АФК .....	326
13.4. Изучение процессов активации клеток, связанных с изменением концентрации свободных ионов $Ca^{2+}$ в цитозоле .....	330
13.5. Методы регистрации внутриклеточной концентрации $Ca^{2+}$ .....	333
<i>Литература</i> .....	341

<b>ГЛАВА 14. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ МЕТАБОЛИЗМА В ПЕЧЕНИ</b> .....	341
14.1. Методики воспроизведения повреждения печени .....	342
14.2. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот .....	343
14.3. Определение содержания гликогена в печени по Р. Крисман .....	354
14.4. Определение содержания холестерина в печени .....	356
14.5. Оценка цитотоксичности гепатотропных препаратов <i>in vitro</i> .....	357
14.6. Методы оценки апоптоза гепатоцитов .....	364
14.7. Оценка цитотоксичности с использованием культуры клеток Hep2 (на примере гемолимфы куколок дубового шелкопряда) .....	368
<i>Литература</i> .....	370
<b>ГЛАВА 15. СОВРЕМЕННЫЙ ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ: ПРИНЦИПАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ, РАЗНОВИДНОСТИ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ</b> .....	371
15.1. Иммунохимический анализ: основные термины и понятия	372
15.2. Радиоиммунологический анализ .....	377
15.3. Иммуноферментный анализ .....	387
15.4. Развитие методов ИХА .....	392
15.5. Методы современного экспрессного иммунохимического анализа .....	394
15.6. Иммунохроматографический анализ .....	398
15.7. Перспективы развития средств иммунохимического анализа .....	401
<i>Литература</i> .....	404
<b>ГЛАВА 16. ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА</b> .....	404
16.1. ДНК-матрица .....	405
16.2. Праймеры (олигонуклеотиды) .....	407
16.3. Термостабильные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы ....	415
16.4. Проведение ПЦР .....	417
16.5. Методы ПЦР .....	419

16.6. Секвенирование ДНК .....	432
<i>Литература</i> .....	438

**ГЛАВА 17. ЗАЩИТНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ ПРИ СТРЕССЕ И МЕТОДЫ ИХ ОЦЕНКИ** 438

17.1. Подготовка материала для исследований .....	439
17.2. Воспроизведение стресса у растений .....	442
17.3. Методы исследования продуктов окислительной деградации макромолекул .....	444
17.4. Методы исследования антиоксидантной системы растительного организма .....	446
17.5. Рутинные биохимические параметры растительных объектов .....	457
17.6. Методы исследования растительных фенолов .....	462
17.7. Молекулярно-генетические исследования растительных объектов .....	466
<i>Литература</i> .....	468

**ГЛАВА 18. ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ PPAR** 469

18.1. Структура и механизмы функционирования .....	470
18.2. Экспрессия генов <i>PPAR</i> в организме .....	472
18.3. Выделение и очистка суммарной РНК из животных тканей .....	474
18.4. Синтез кДНК на РНК-матрице .....	479
18.5. Количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени .....	481
<i>Литература</i> .....	485

Учебное издание

**Барковский Евгений Викторович**  
**Бокуть Сергей Борисович**  
**Бородинский Александр Николаевич** и др.

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОХИМИИ.**  
**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Учебное пособие

Редактор *А.В. Новикова*  
Художественный редактор *Т.В. Шабунько*  
Технический редактор *Н.А. Лебедевич*  
Корректоры *Т.К. Хваль, Н.Г. Баранова*  
Компьютерная верстка *А.Н. Бабенковой*

Подписано в печать 11.03.2013. Формат 84×108/32. Бумага офсетная.  
Гарнитура «Times New Roman». Офсетная печать. Усл. печ. л. 26,04.  
Уч.-изд. л. 28,05. Тираж 400 экз. Заказ 541.

Республиканское унитарное предприятие «Издательство «Вышэйшая школа»».  
ЛП № 02330/0494062 от 03.02.2009. Пр. Победителей, 11, 220048, Минск.  
e-mail: market@vshph.com <http://vshph.com>

Филиал № 1 открытого акционерного общества «Красная звезда».  
ЛП № 02330/0494160 от 03.04.2009. Ул. Советская, 80, 225409, Барановичи.