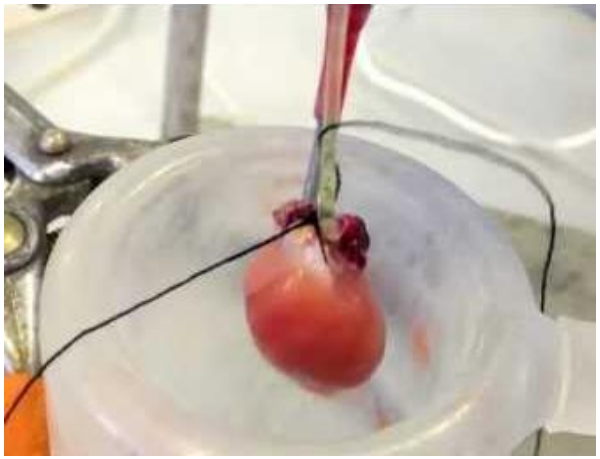
Тема: Методи клітинної біоенергетики

План

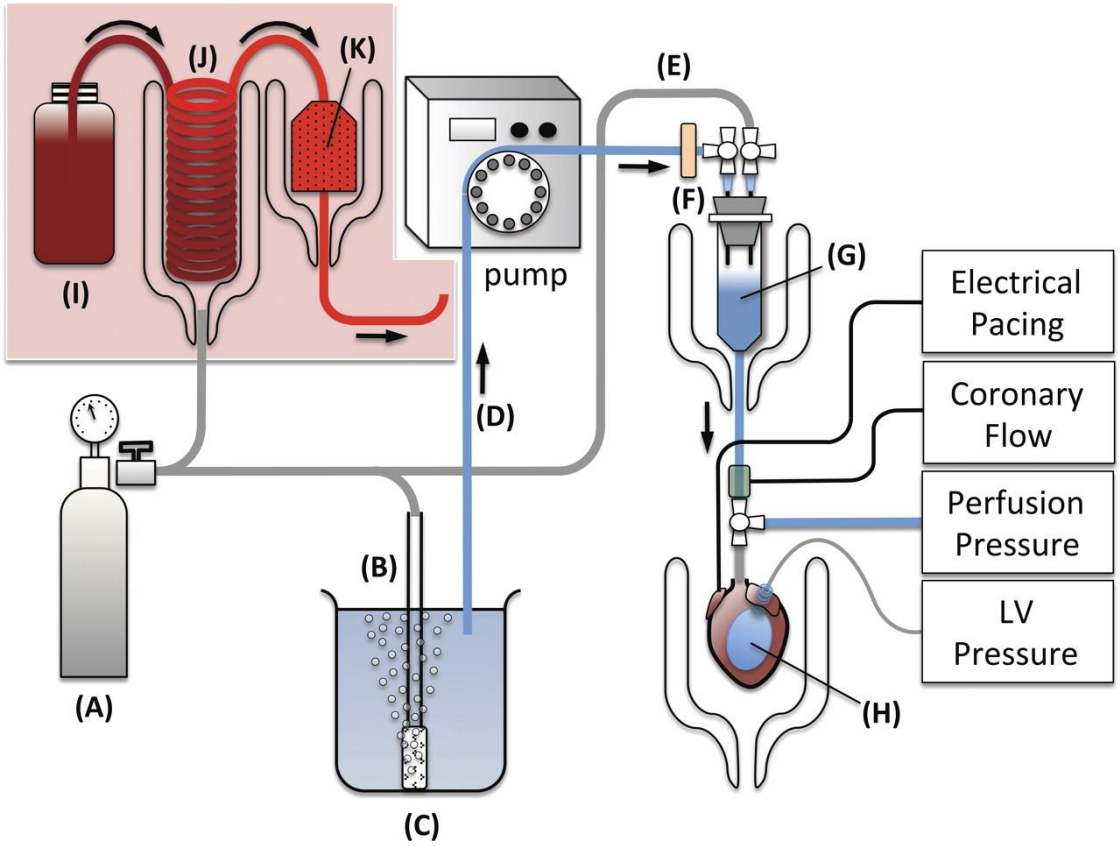
1. Виділення мітохондрій та клітин
2. Визначення активності ферментів
3. Полярографія
4. Потенціометрія
5. Ядерний магнітний резонанс (ЯМР)
6. Позитронно-емісійна томографія (ПЕТ)

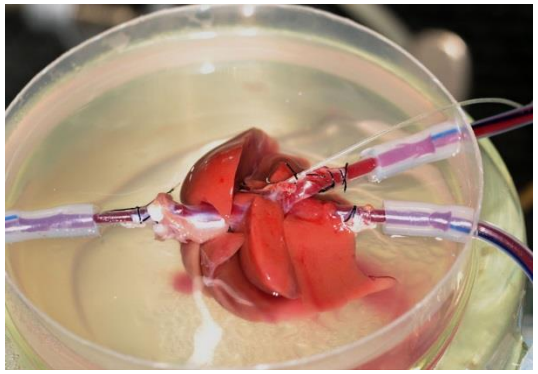
- «Метод – найперша, основна річ… Від методу, від способу дії залежить уся серйозність дослідження. Метод тримає у руках долю дослідження»

(Іван Павлов)

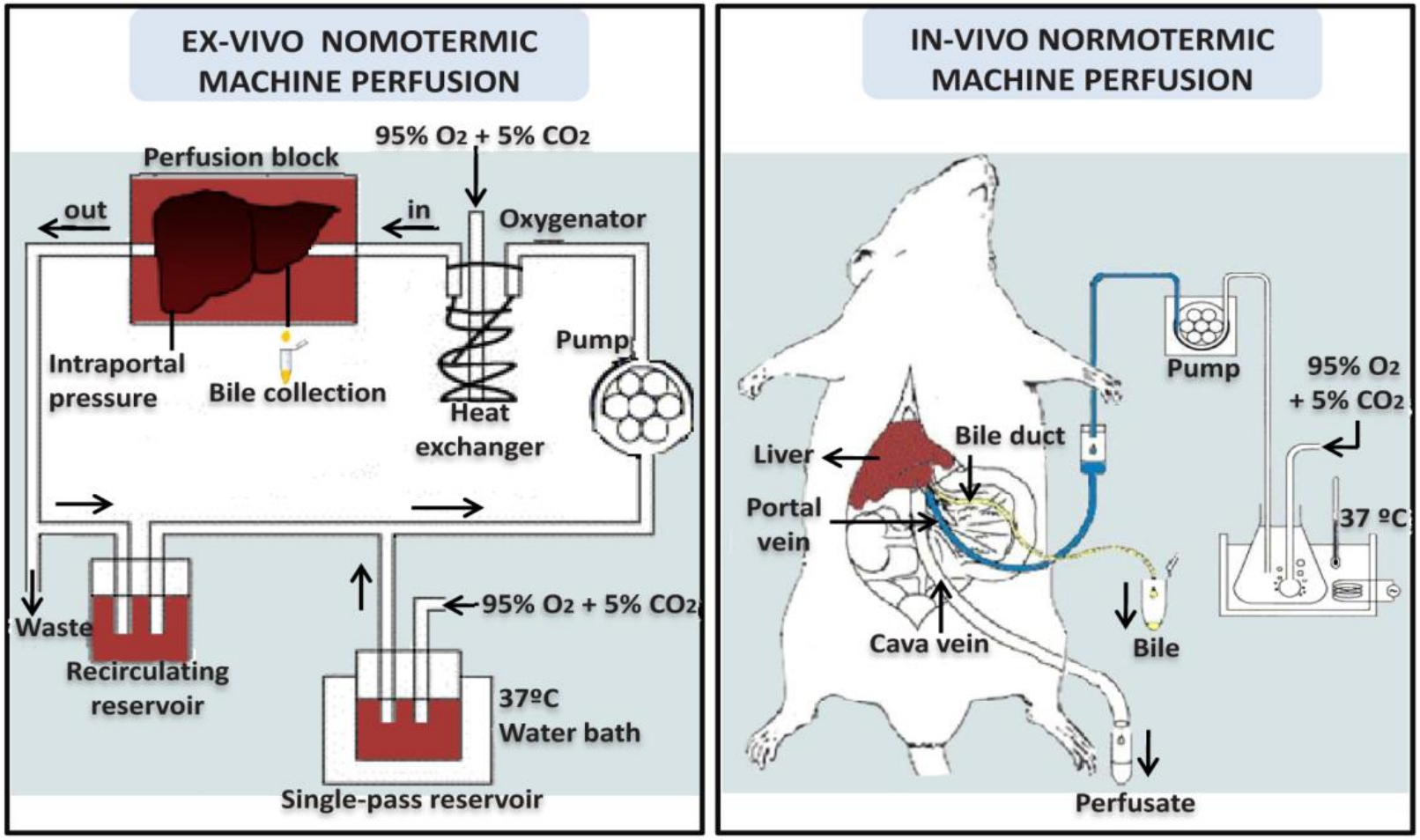


Перфузія серця за О. Лангендорфом

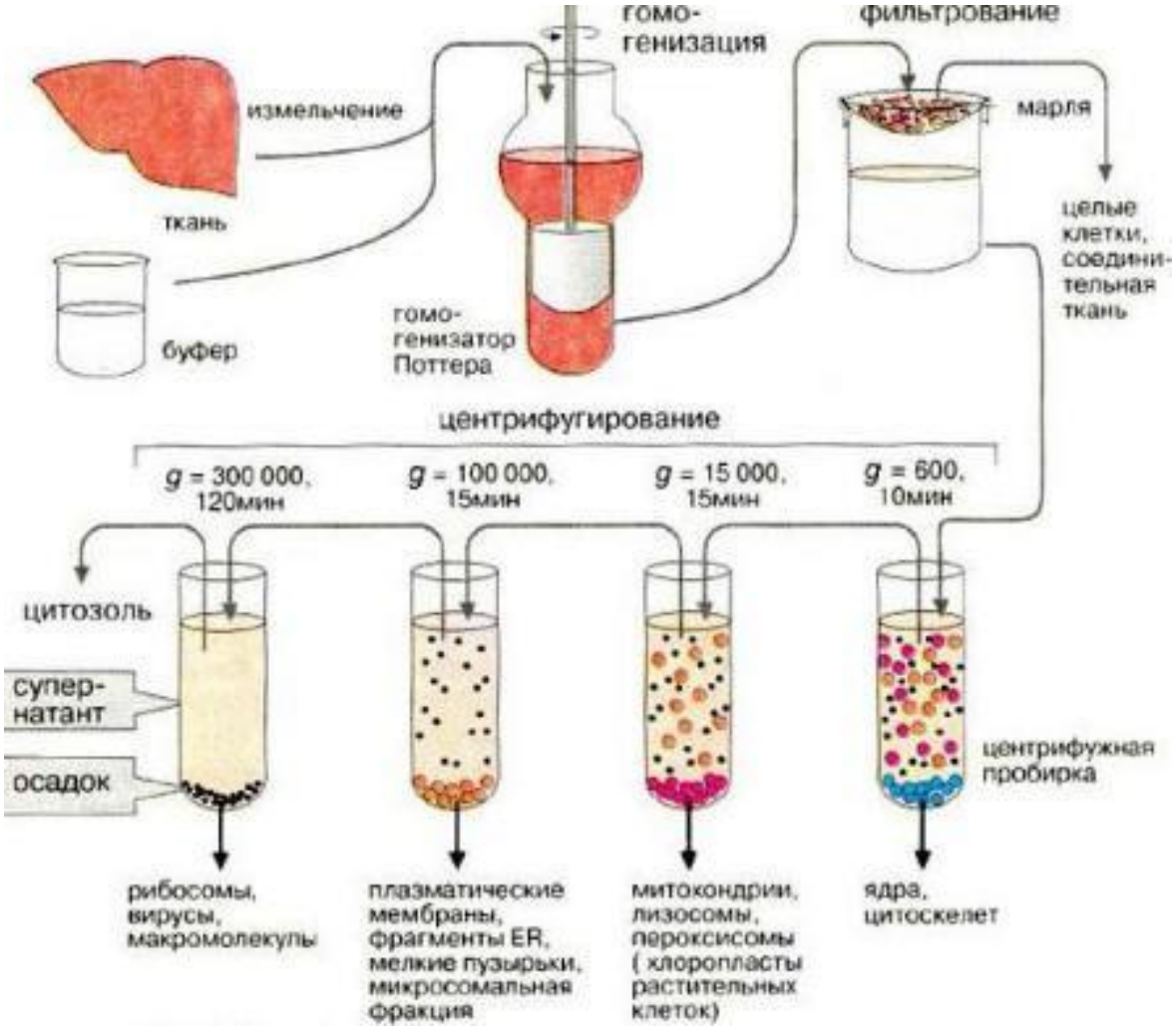




Перфузія печінки



Диференціальне центрифугування

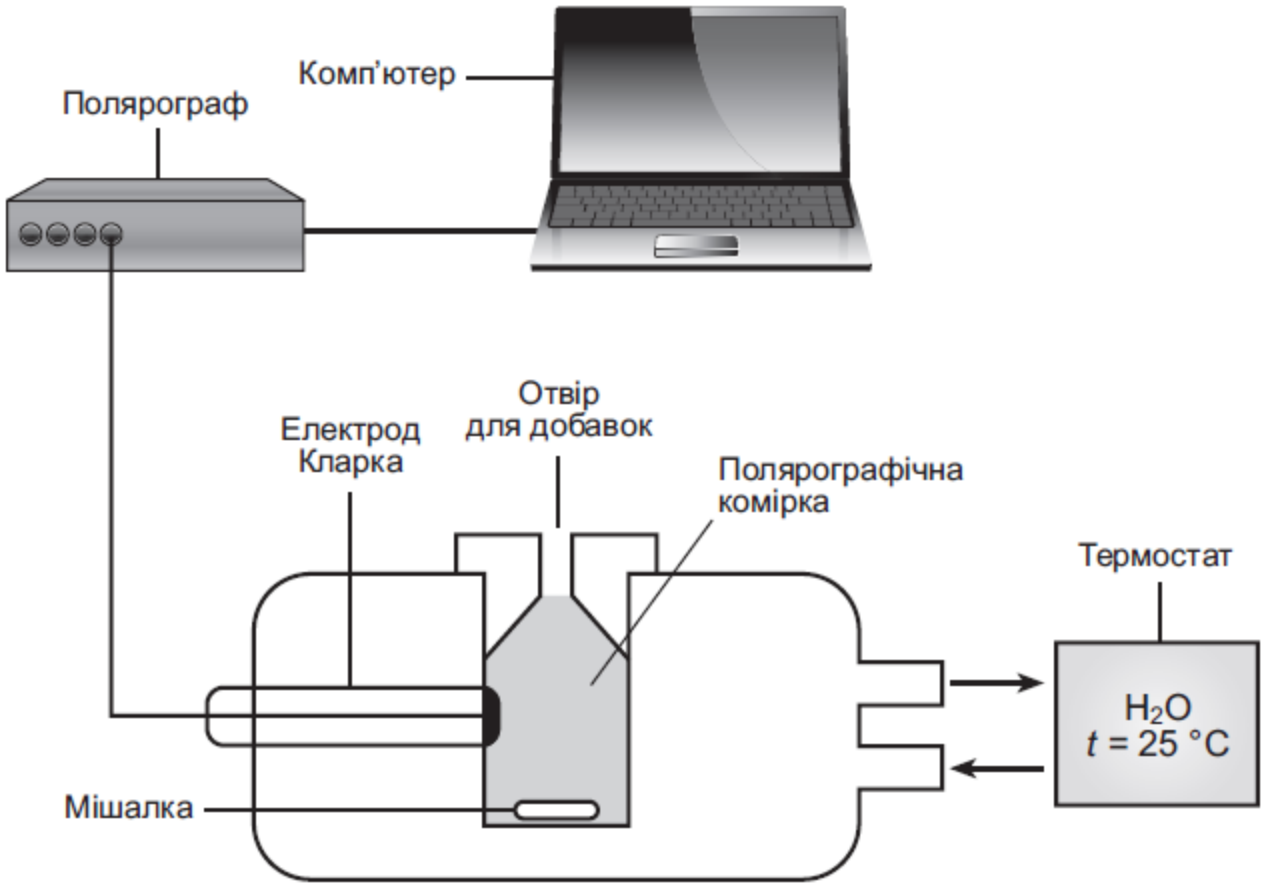


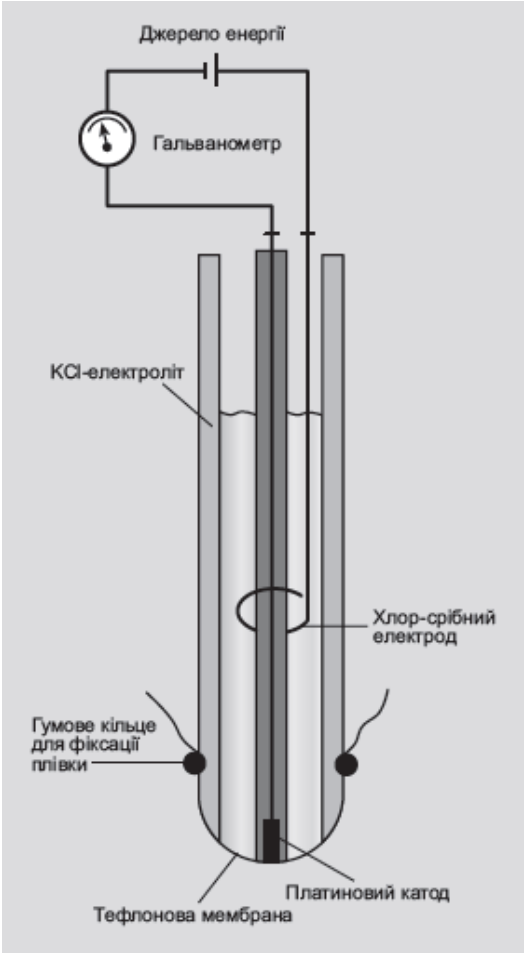
Локалізація мітохондріальних ферментів

Зовнішня мембрана:	**Простір між мембранами:**
Моноамінооксидаза*	Аденілатциклаза
Тіокінази жирних кислот	Нуклеозиддифосфокіназа
Редуктаза цитохрома с	Цитохром с
Ацил-СоА-синтаза	
Фосфоліпаза А2	
Внутрішня мембрана:	**Матрикс:**
Ферменти дихального ланцюга (в т.ч. цитохромоксидаза*)	Цитрат-синтаза
Ферменти синезу АТФ	Ізоцитратдегідрогеназа
Дегідрогенази α-кетокислот	Фумараза
Сукцинатдегідрогеназа	Малатдегідрогеназа*
D-β-оксибутиратдегідрогеназа	Аконітаза
Карнітин – ацилтранфераза	Глутаматдегідрогеназа*
	Ферменти окиснення жирних кислот

* - маркери для виявлення мітохондріальних структур.

Схема полярографічної установки





Типова полярограма дихання мітохондрій (А) та її діаграмне зображення (Б)

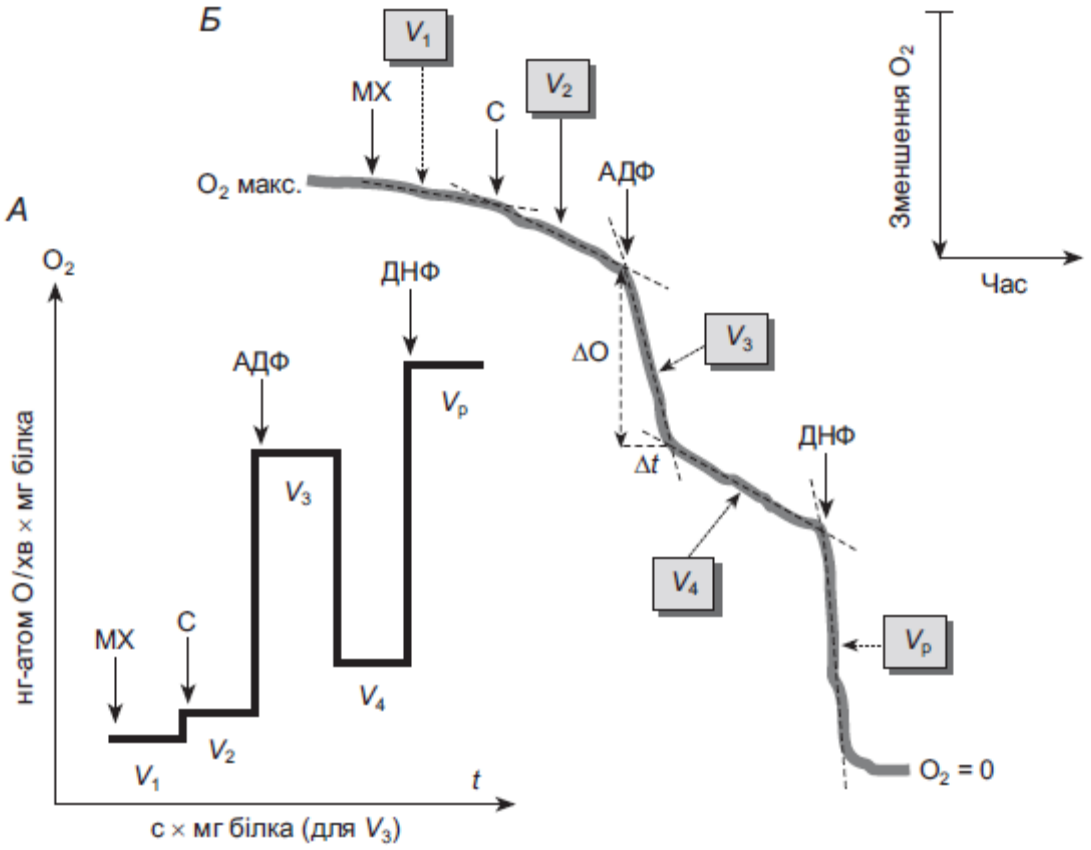


Рис. 18.2. Типова полярограма дихання мітохондрій (*А*) та її діаграмне зображення (*Б*), що дає змогу ідентифікувати метаболічні стани мітохондрій. Суцільними вертикальними стрілками (↓) показані додавання у полярографічну комірку. С – субстрат; МХ – мітохондрії

pH-метрія

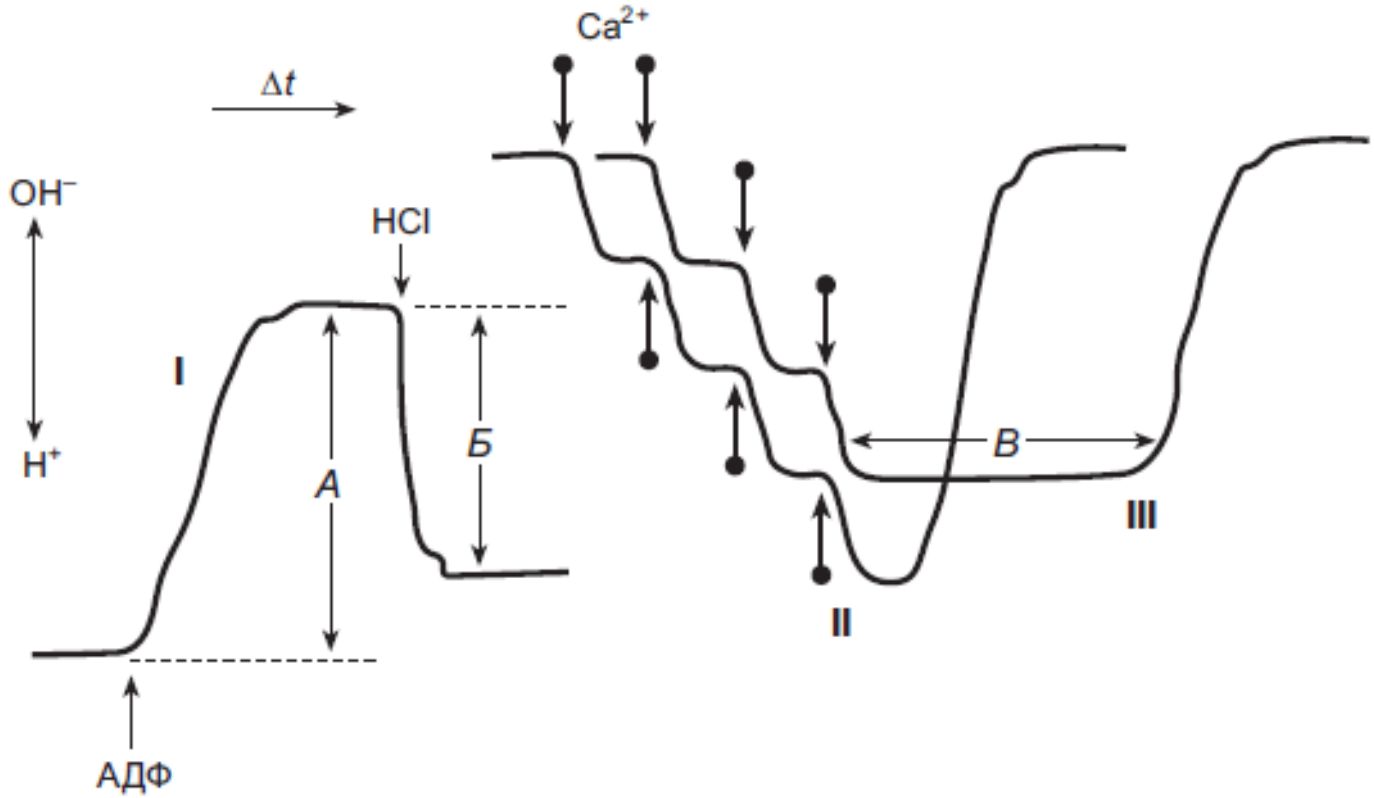
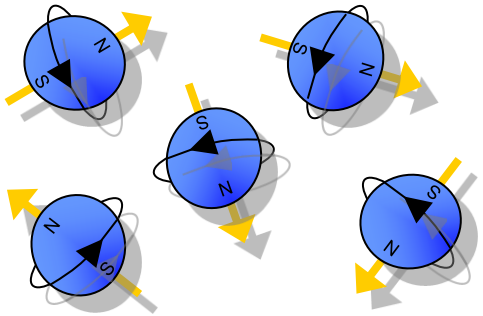


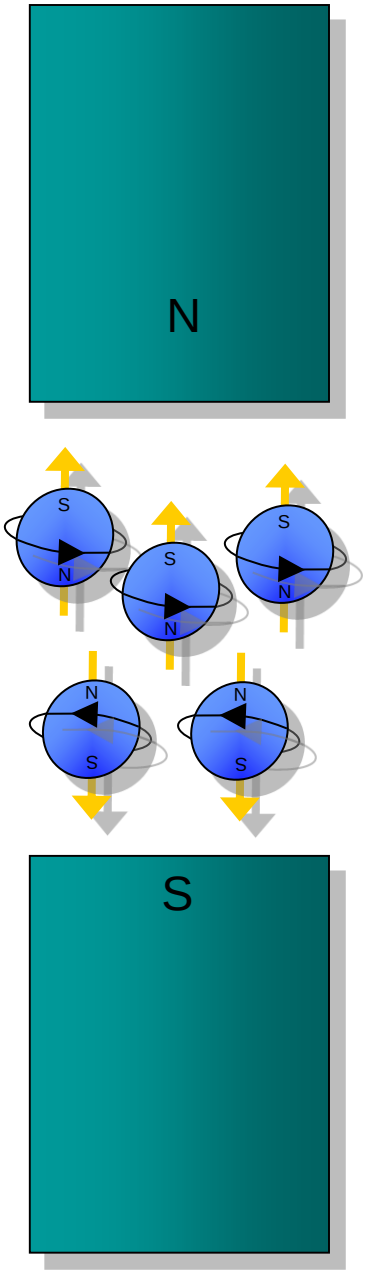
Рис. 18.3. pH-метричний запис окисного фосфорилювання (I), кальцієвої ємності (II) та часу утримання Ca^{2+} (III) у мітохондріях

Ядерно-магнітний резонанс (NMR)

Protons Align With An External Magnetic Field

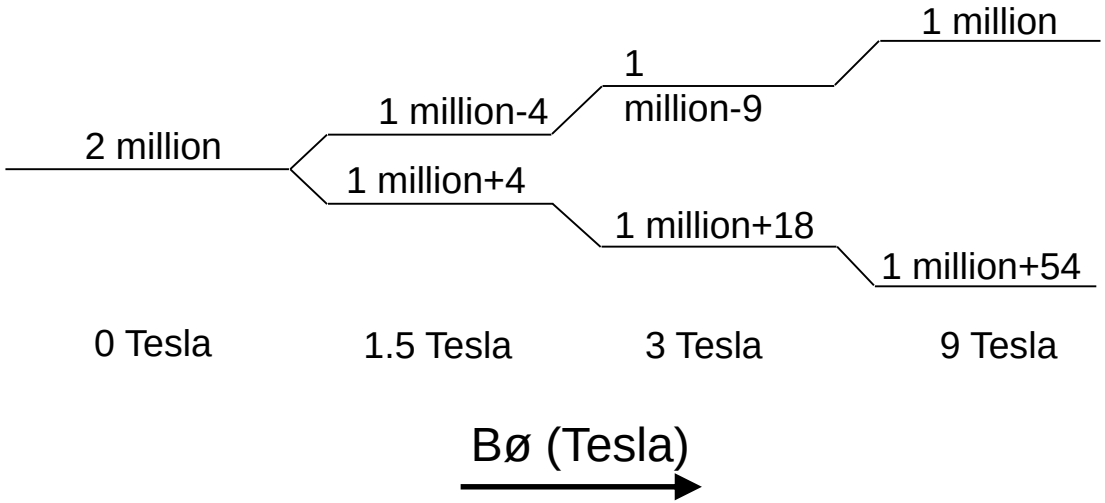


Spinning protons act like magnets



Protons, or spins, posses a positive charge and are constantly turning around an axis. A moving electrical charge is an electric current, which is accompanied by a magnetic field.

A slight excess number of protons align parallel with the external magnetic field. The other protons align anti-parallel to it.



Boltzmann's Equation

$$\frac{n_i}{n_j} = e^{\frac{-\left(E_i - E_j\right)}{kT}}$$

K= 1.38066 x 10^{23}: Boltzmann's constant

n_i = the number of particles in energy level one

Boltzmann's equation can be used to calculate the ratio of the particles in one energy state to that of another.

Larmor Equation

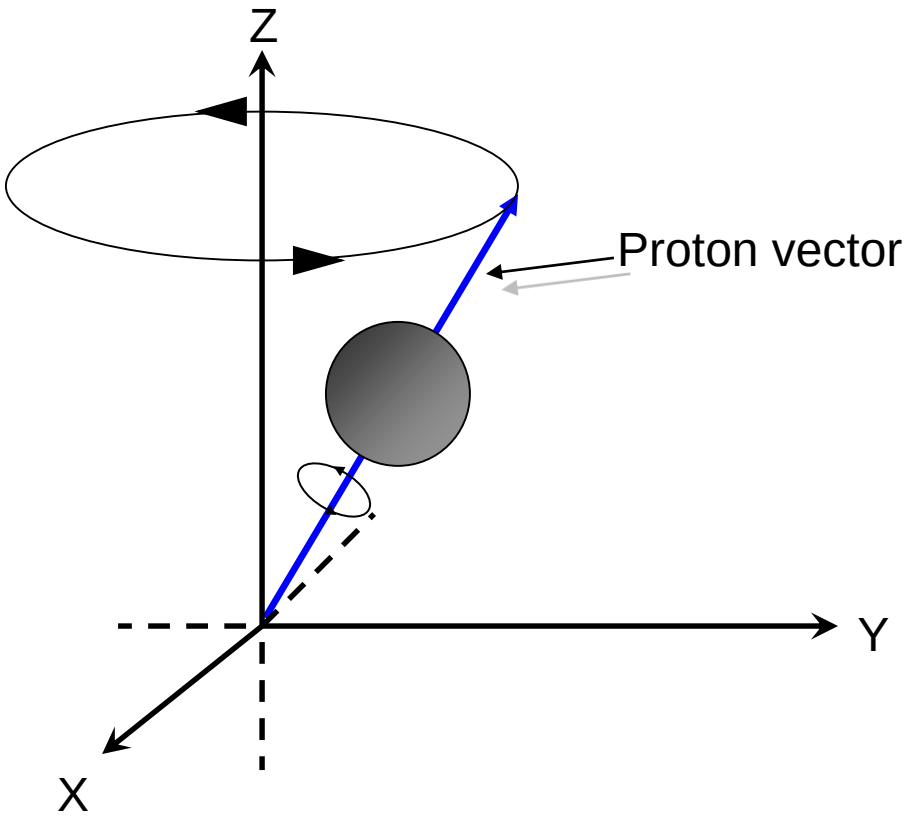
$$\omega_0 = \gamma B_0$$

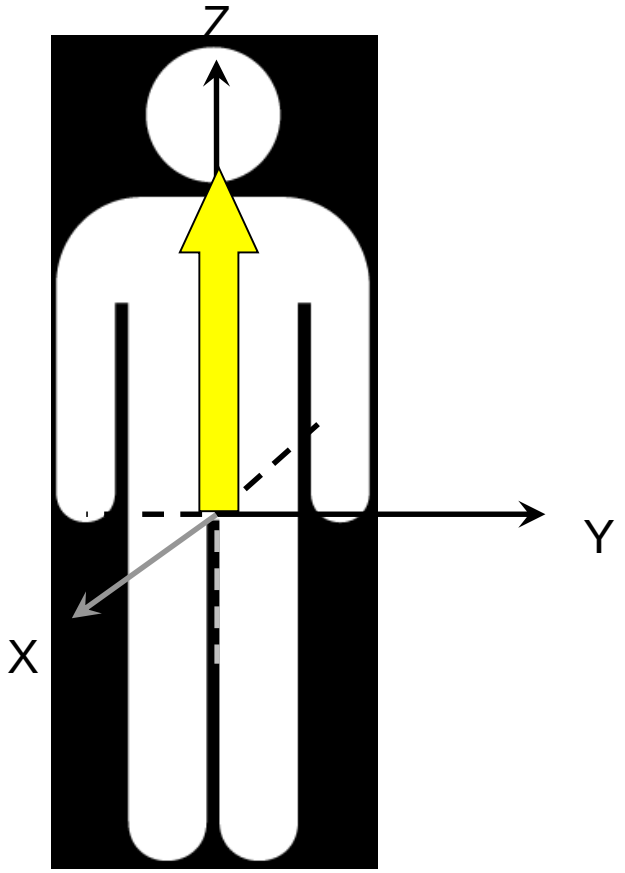
- ω_0 = precession frequency (in Hz or MHz)
- B_0 = strength of external magnetic field (in Tesla, T)
- γ = gyromagnetic ratio (42,5 MHz/T for protons)

* Higher magnetic field = faster precession

Spinning protons wobble or precess. This precession is directly proportional to the magnetic field strength. The stronger the magnetic field, the faster the protons precess.

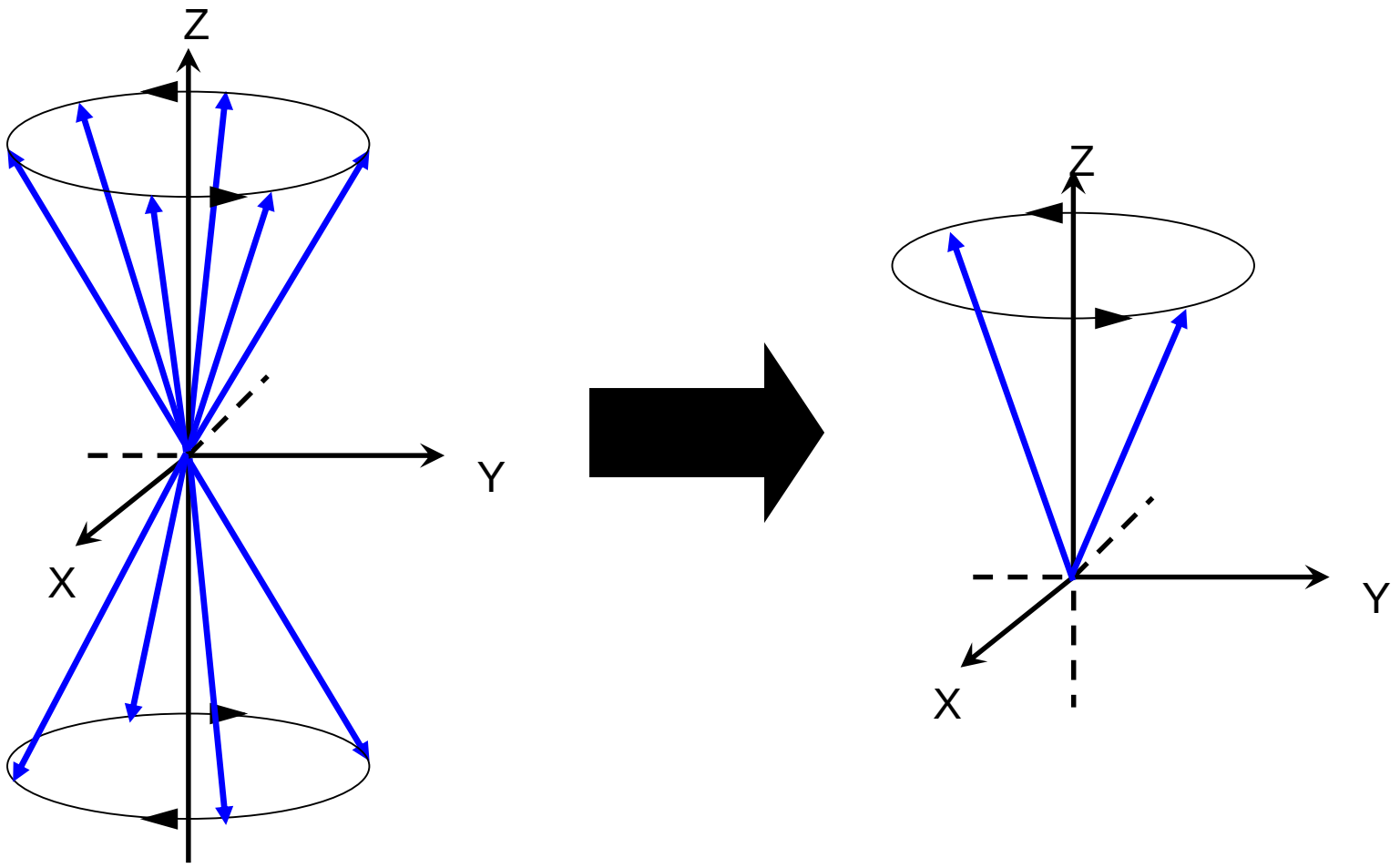
The Coordinate System





- Z is the direction of the magnetic field, B_0
- A vector represents both direction and magnitude (magnetic force)

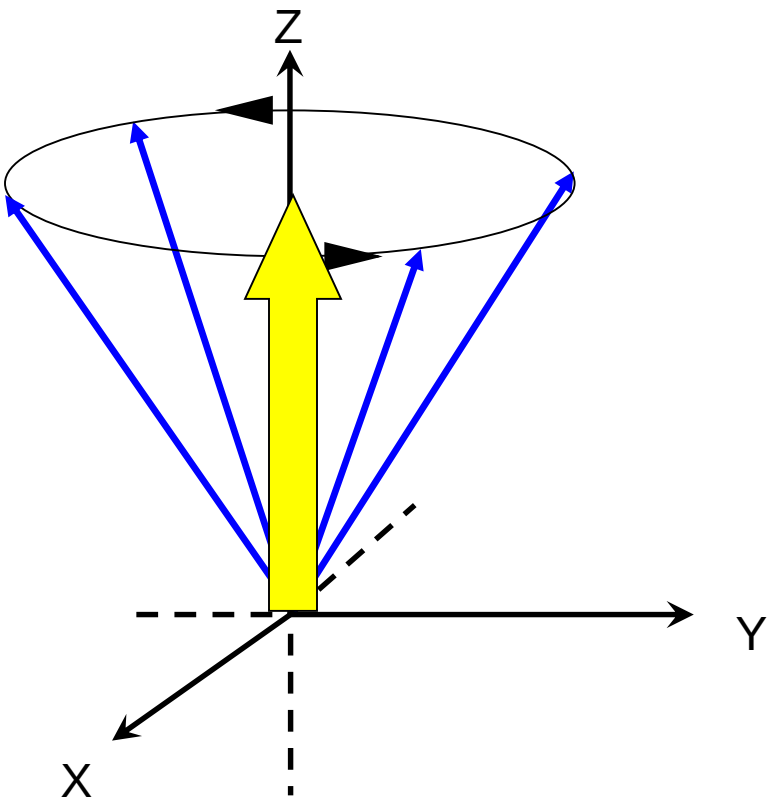
Opposing protons cancel each other out



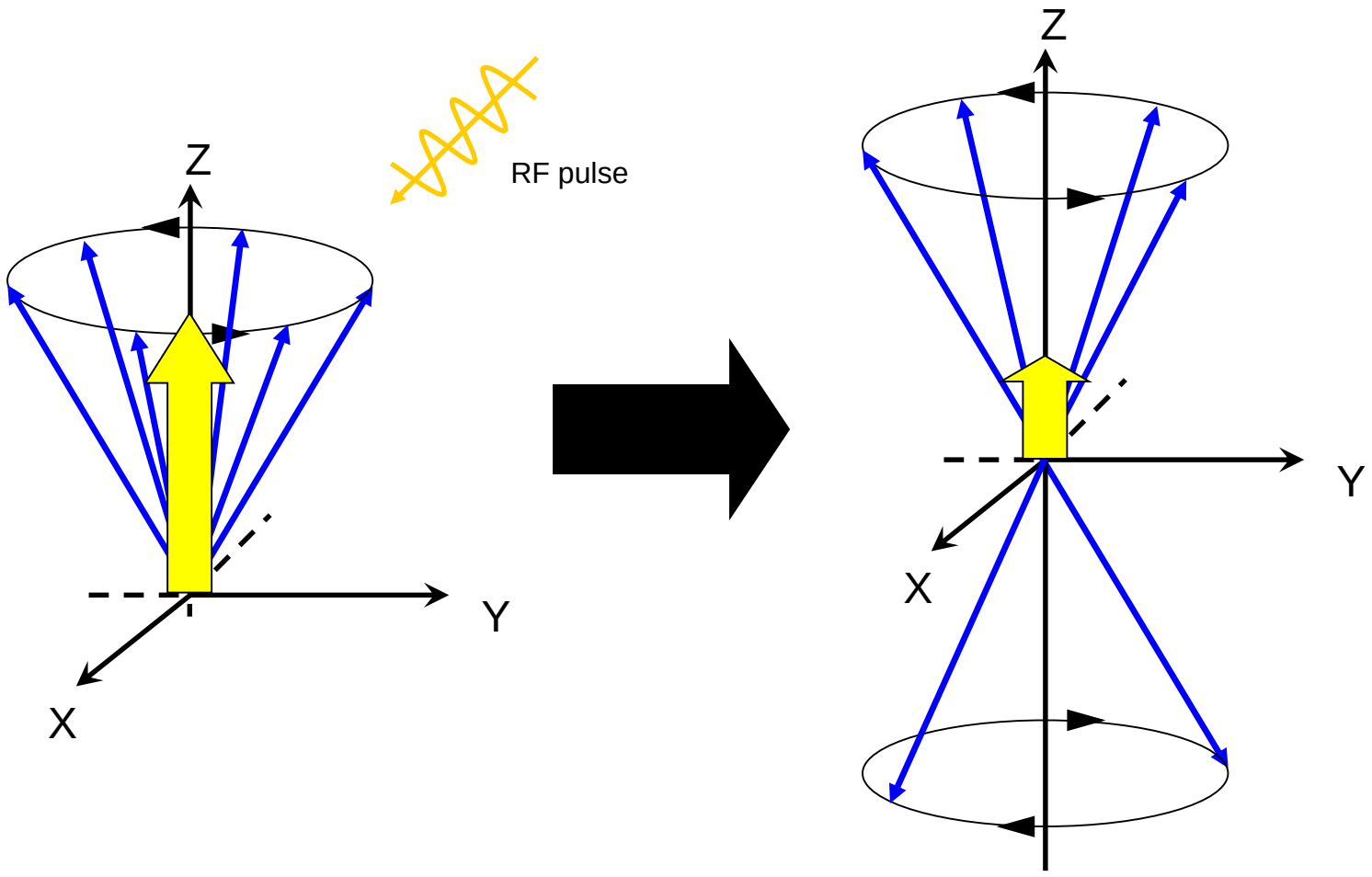
Because more protons align with the magnetic field than against it, there is a net magnetic force in the direction of the magnetic field called **longitudinal magnetization**

Longitudinal magnetization cannot be measured directly because it is in the same direction as the external magnetic field.

In order to measure magnetization, a new magnetization transversal to the external magnetic field must be introduced.

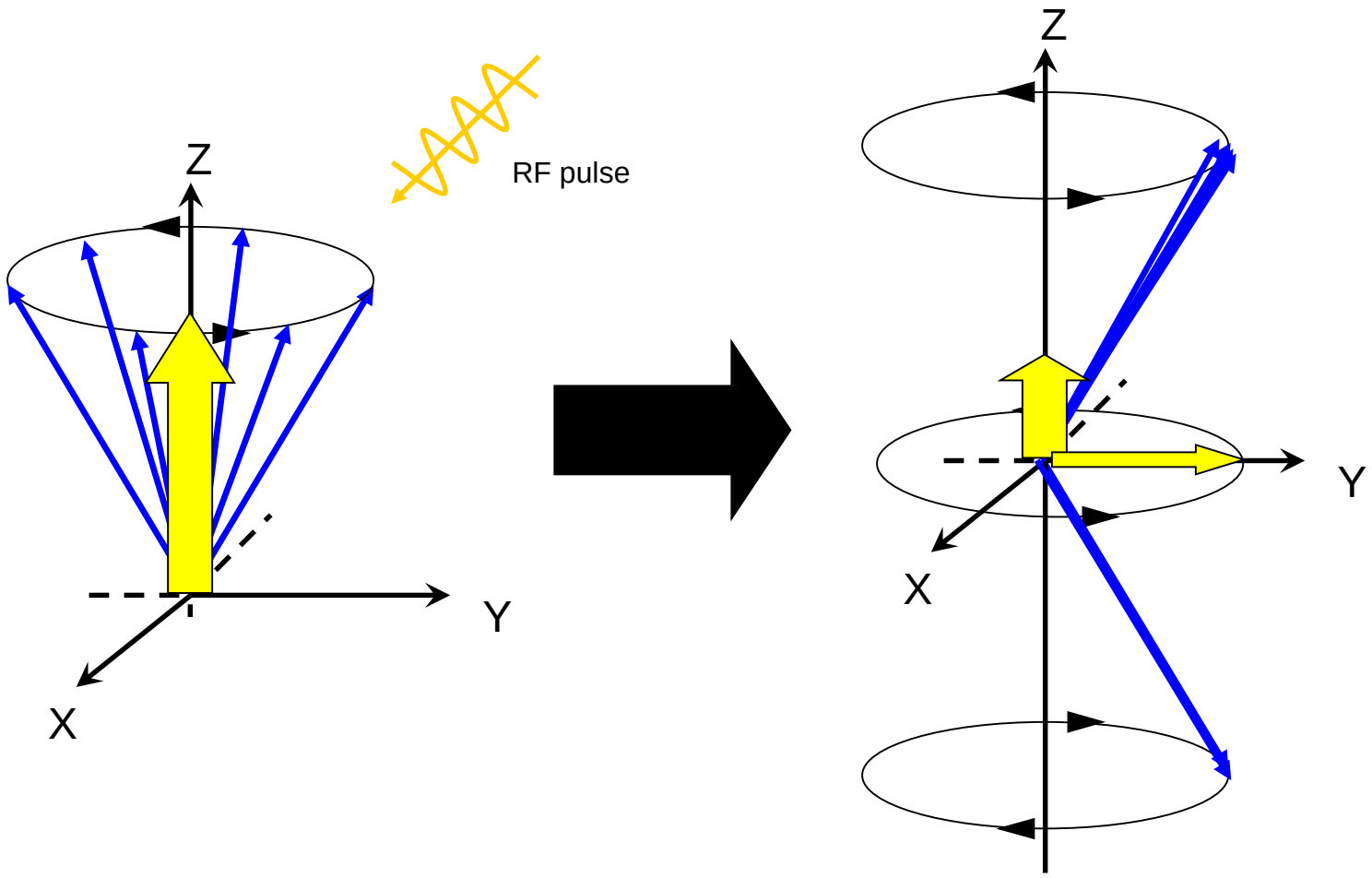


The RF pulse causes some protons to go to a higher energy state.



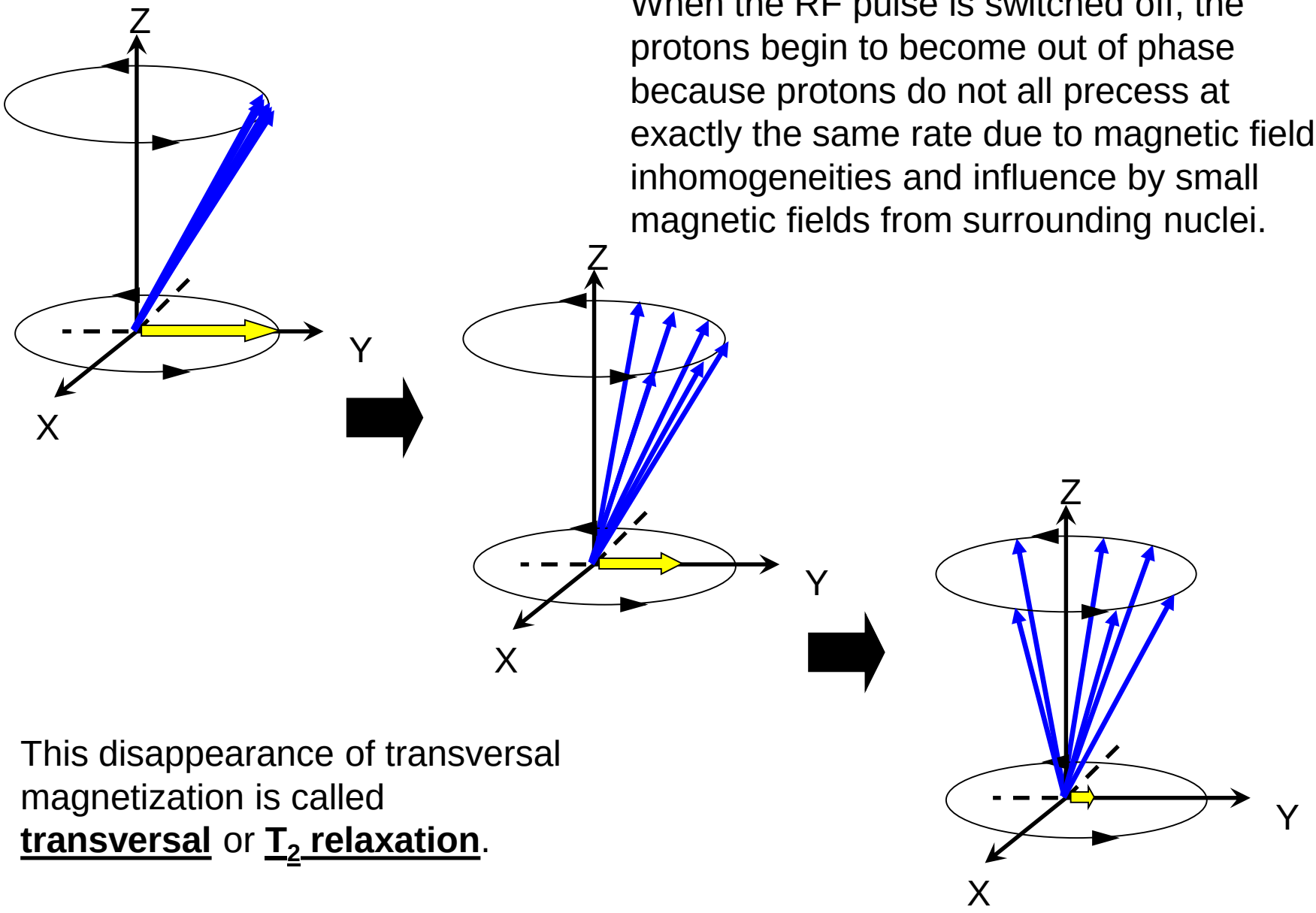
As a result of the new anti-parallel protons canceling out the charge of other parallel protons, the longitudinal magnetization decreases.

The RF pulse also causes the protons to precess together, or be **<u>in phase</u> (resonation)**

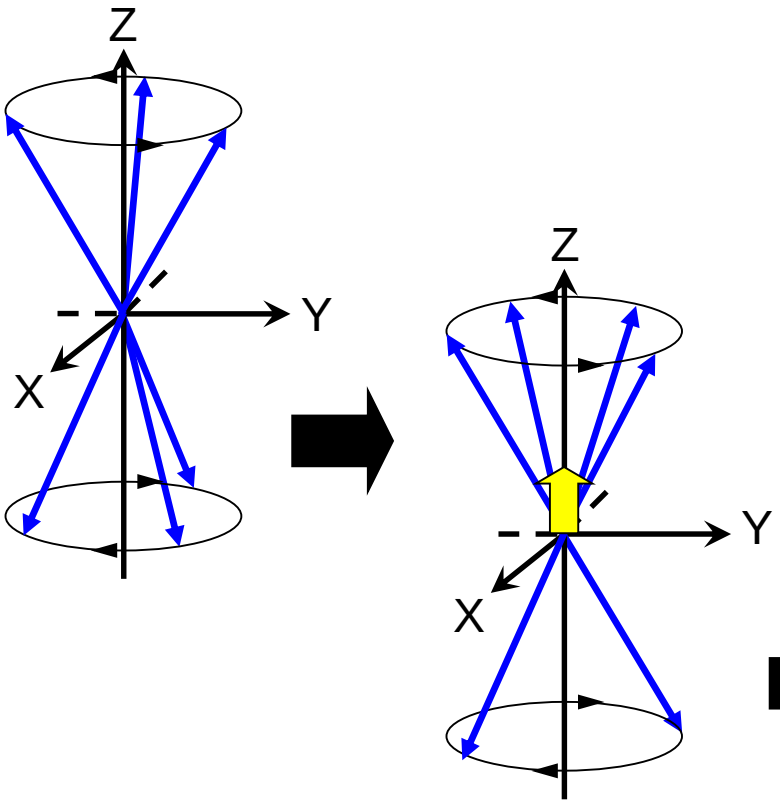


This results in a transversal magnetization in the x-y plane that moves with the precessing protons.

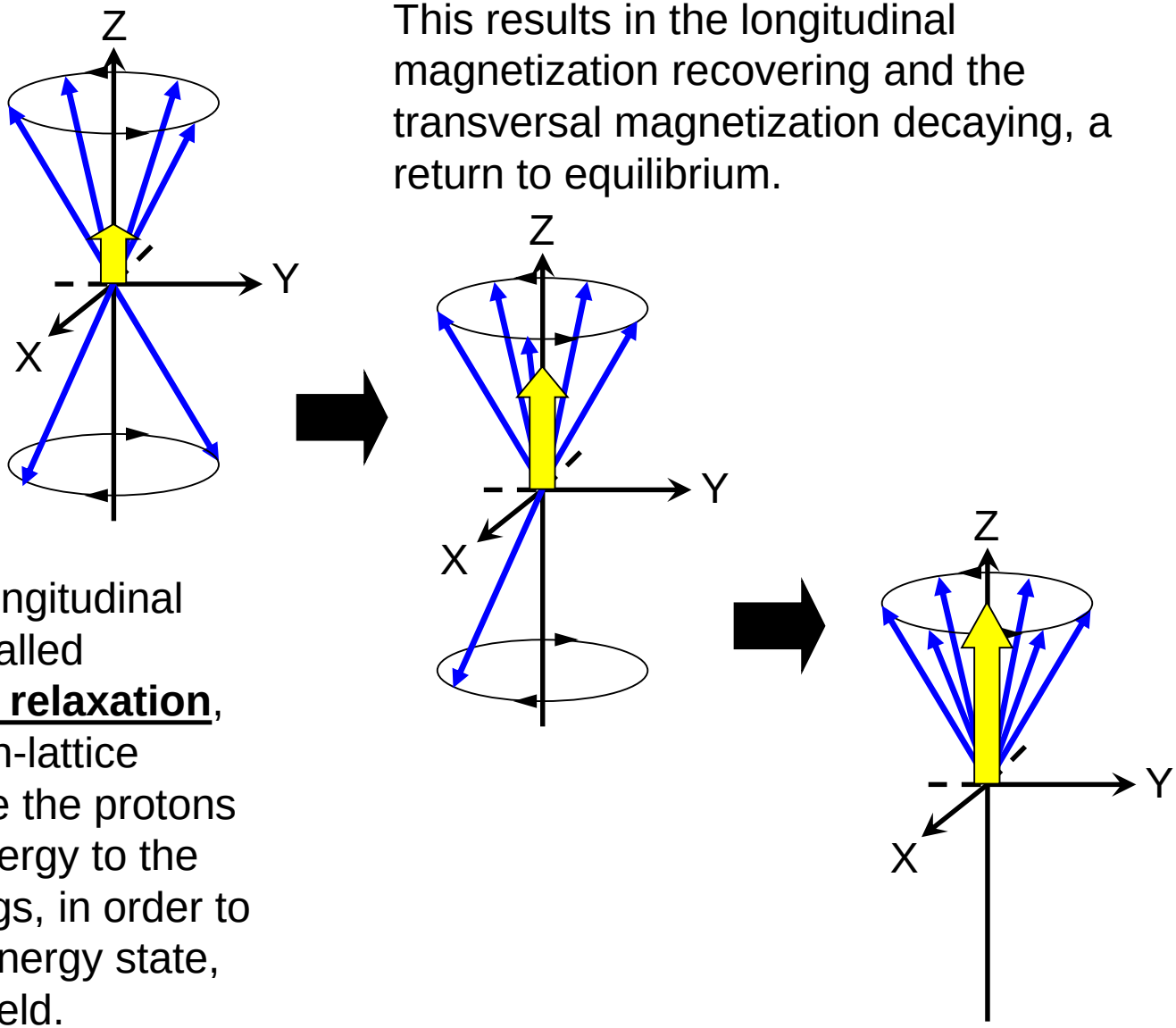
When the RF pulse is switched off, the protons begin to become out of phase because protons do not all precess at exactly the same rate due to magnetic field inhomogeneities and influence by small magnetic fields from surrounding nuclei.



This disappearance of transversal magnetization is called **transversal** or **T_2 relaxation**.

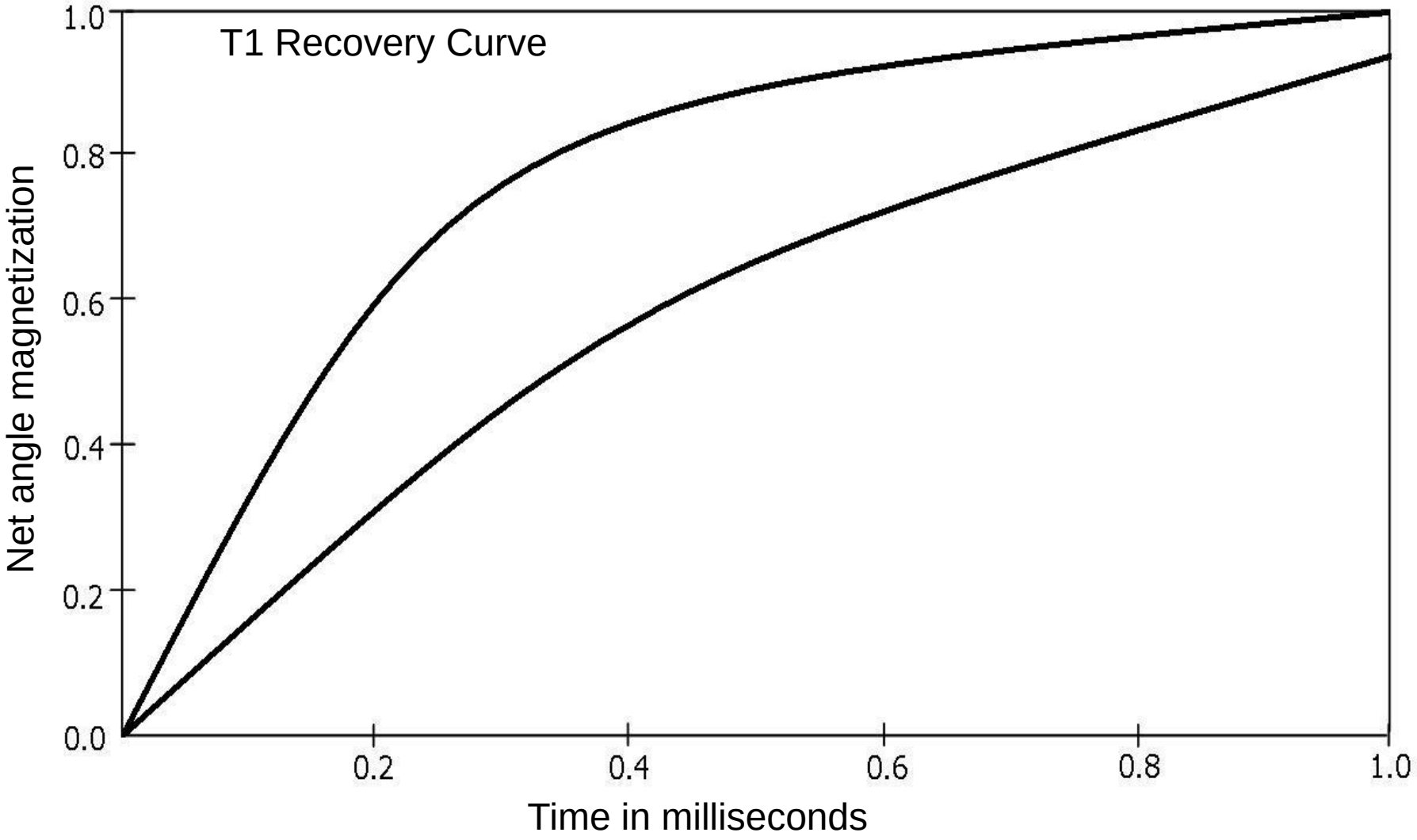


Also after the RF pulse is switched off, the protons return to their original energy state in a continuous process. This results in the longitudinal magnetization recovering and the transversal magnetization decaying, a return to equilibrium.

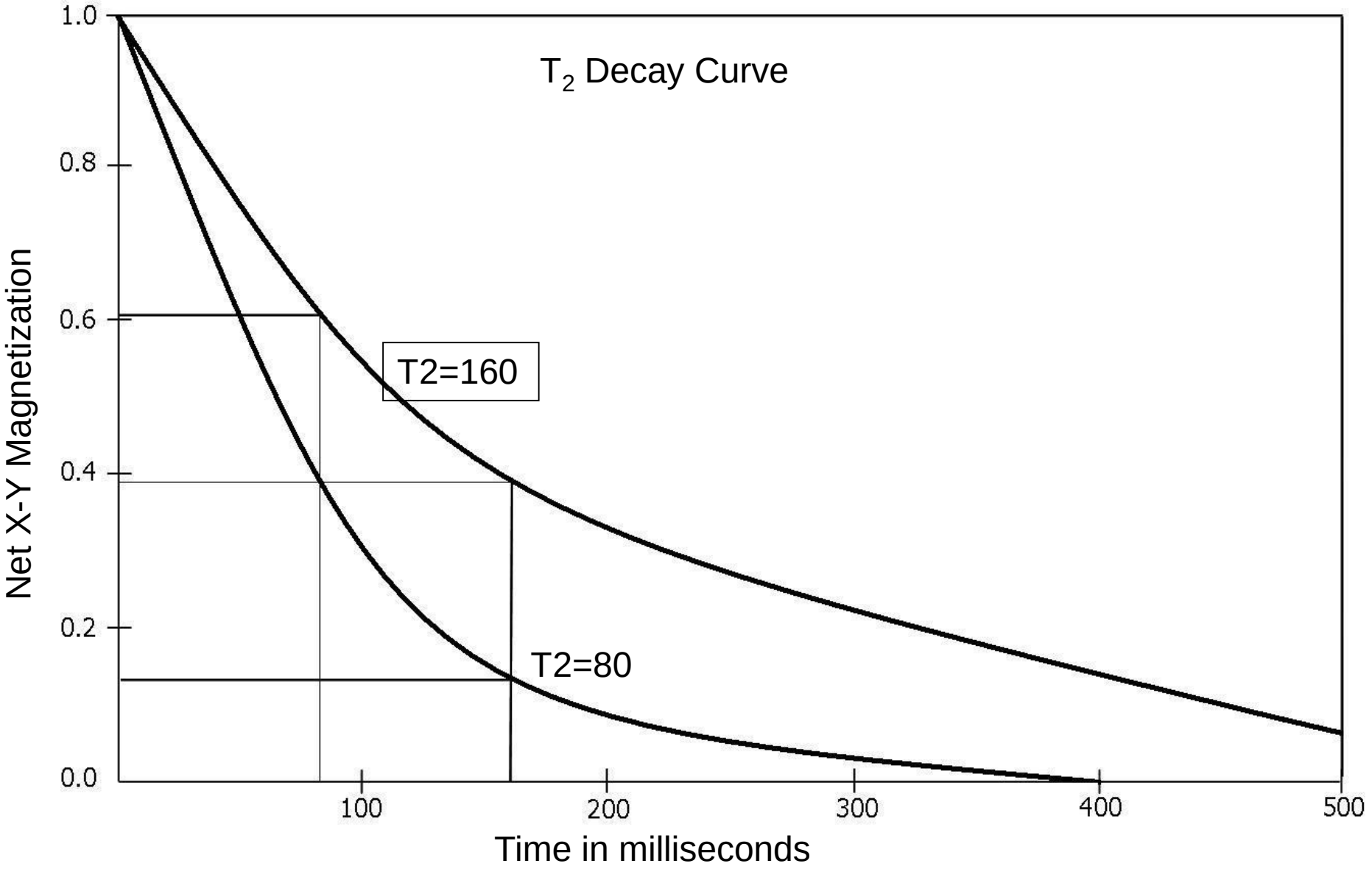


This recovery of longitudinal magnetization is called **longitudinal** or **T_1 relaxation**, also known as spin-lattice relaxation because the protons hand over their energy to the lattice, surroundings, in order to return to a lower energy state, parallel to the $B_ø$ field.

T_1 is described as the time it takes 63% of the original **longitudinal magnetization** to recover. It is mathematically described by an exponential curve. T1 is about 300-2000 milliseconds long. T1 values are usually longer at higher field strengths.



T_2 is described as the time it takes the **transversal magnetization** to decay to 37% of its original intensity. It too is mathematically represented as a exponential curve. T2 is about 30-150 milliseconds long



What Influences T_1

- When the lattice consists of pure liquid/water, it is difficult for the protons to get rid of their energy because the small water molecules move too rapidly. As a result, T_1 takes a long time.

- When the lattice consists of medium-size molecules (fat) that move, and thus have fluctuating magnetic fields near the Larmor Frequency of the precessing protons, energy can be transferred easier so T_1 is short.

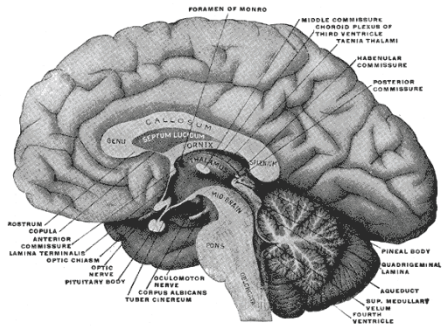
What Influences T_2

- Water molecules have local magnetic fields that fluctuate fast because the molecules move around a lot. So, the fields average each other out, decreasing local magnetic field inhomogeneities, causing T_2 to be long because the protons take longer to dephase since their frequencies are not that different from one another.

- With substances that contain larger molecules, the local magnetic field is more varied because the molecules do not move around as fast. T2 is shorter (the protons dephase faster) as a result of these larger differences in the local magnetic field.

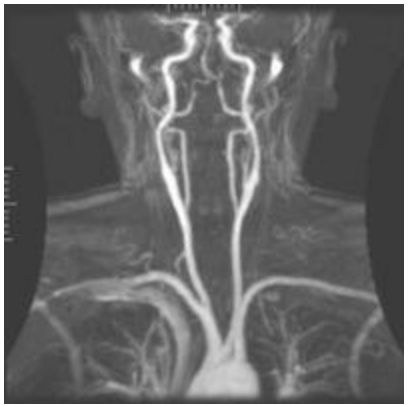
NMR/MRI

Modern 3 T clinical MRI scanner.



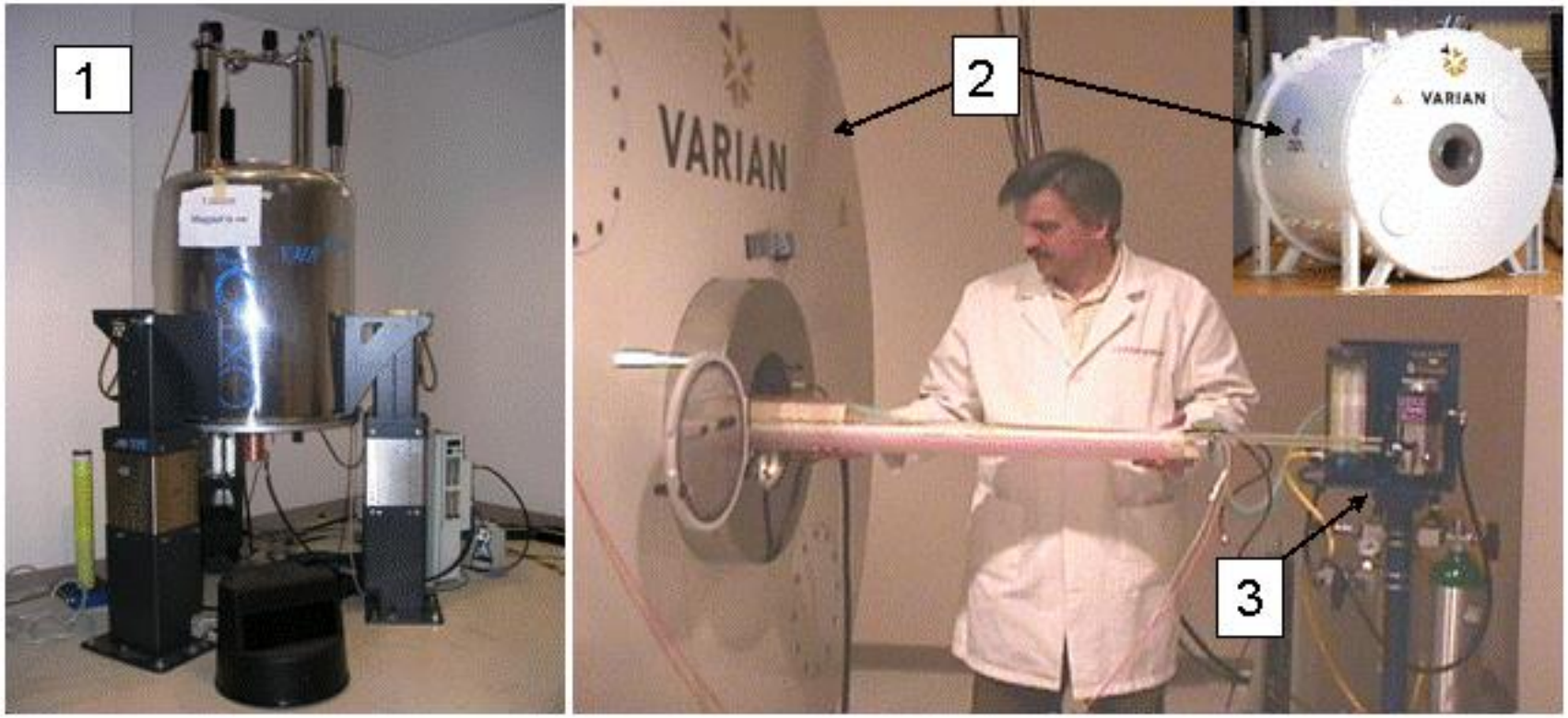
MRI imaging of the human head

1.5 T magnet, occupied be researcher's leg (Dr. Britton Chance)

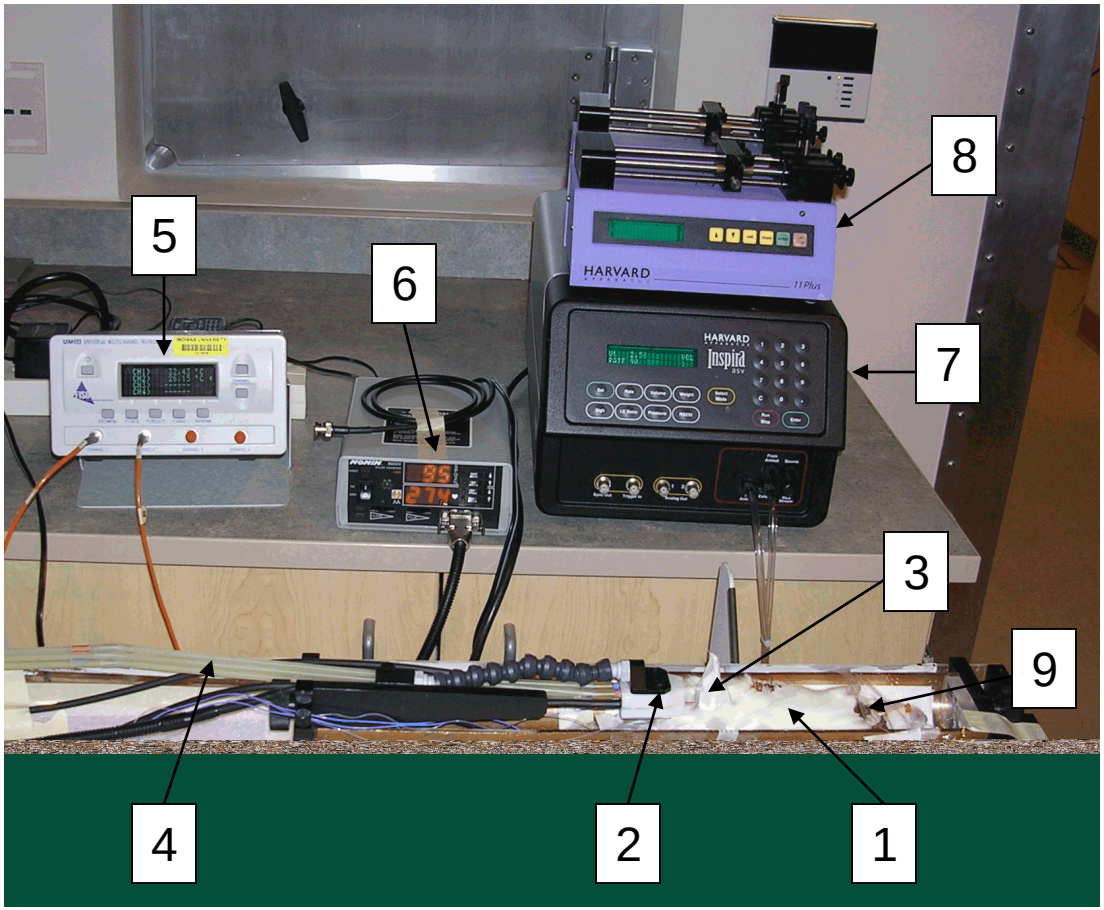


Magnetic Resonance Angiography

9.4 T NMR Scanners in the Imaging Center of Radiology Department, IUPUI



Set-up for NMR *in vivo* experiment with surface coil



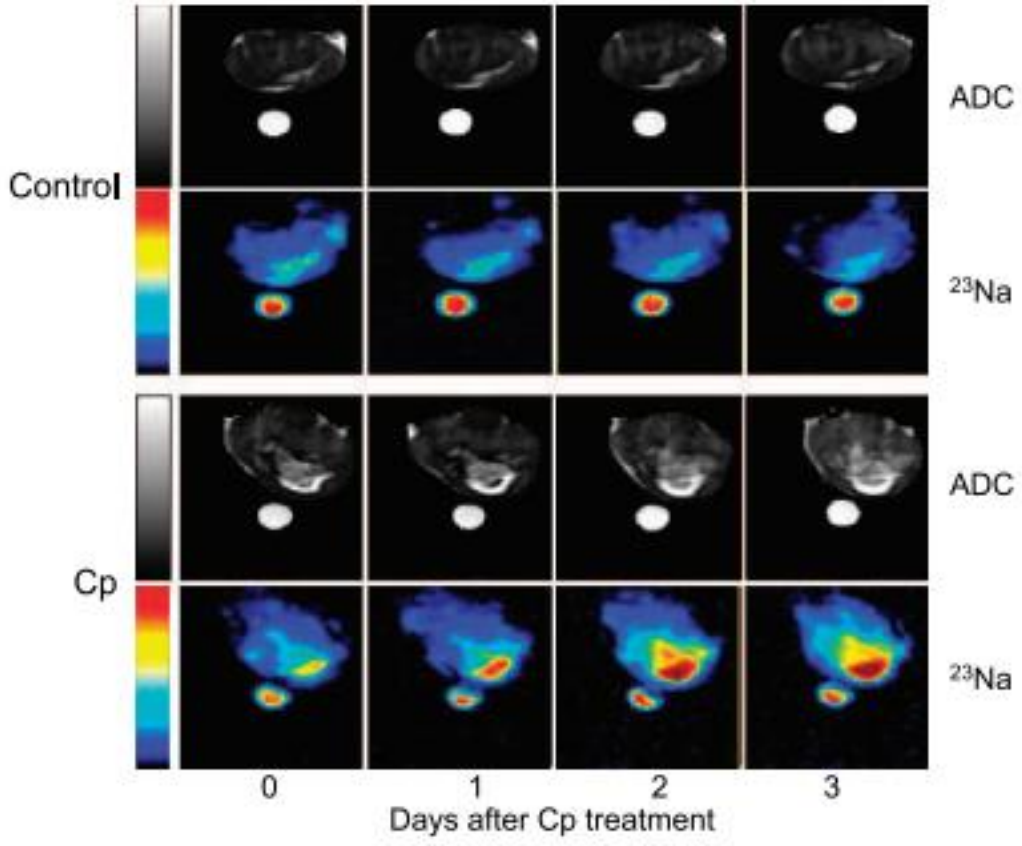
Neoplasia • Vol. 7, No. 7, July 2005, pp. 658–666 658

www.neoplasia.com

Application of ^{23}Na MRI to Monitor Chemotherapeutic Response in RIF-1 Tumors[1]

Andriy M. Babsky, Shahryar K. Hekmatyar*, Hong Zhang*, James L. Solomon† and Navin Bansal**

Departments of *Radiology, and †Cardiology, Indiana University, Indianapolis, IN, USA



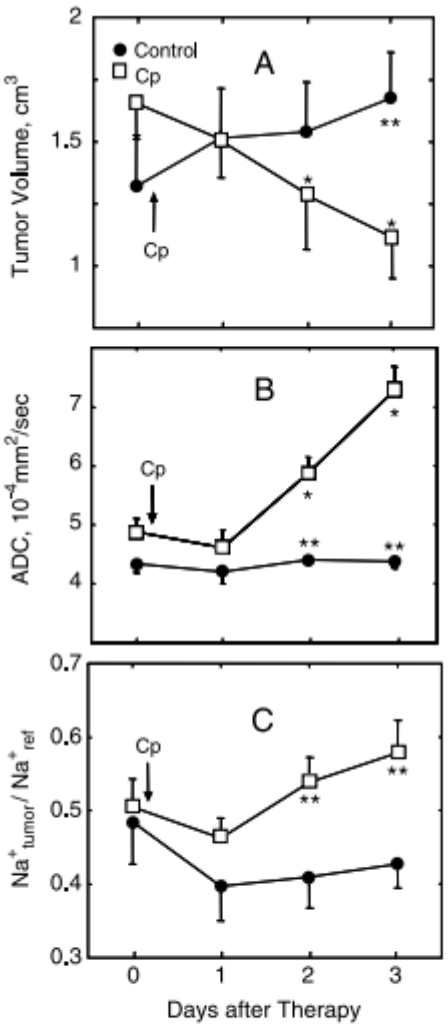


Figure 1. *Effects of Cp therapy (300 mg/kg, ip) on tumor volume (A), water ADC (B), and ^{23}Na SI from the tumor relative to the reference (Na^+_{tumor}/ Na^+_{ref}) (C) in sc implanted RIF-1 tumors. Tumor volumes were measured from ^{1}H MRI. Water ADC and relative ^{23}Na SI changes are the mean from the whole tumor. Cp treatment caused a significant decrease in tumor volume and significant increases in water ADC and ^{23}Na SI 2 and 3 days posttherapy. Significance: P ≤ .05 (* – versus before treatment), P ≤ .01 (** – control versus Cp-treated). Data are presented as mean ± SEM.*

Research Article

NMR IN BIOMEDICINE

Received: 14 December 2010, Revised: 15 April 2011, Accepted: 18 April 2011, Published online in Wiley Online Library: 8 August 2011

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/nbm.1752

Effect of implantation site and growth of hepatocellular carcinoma on apparent diffusion coefficient of water and sodium MRI

Andriy M. Babsky*, Shenghong Ju†, Stacy Bennett†, Beena George and Gordon McLennan† and Navin Bansal*

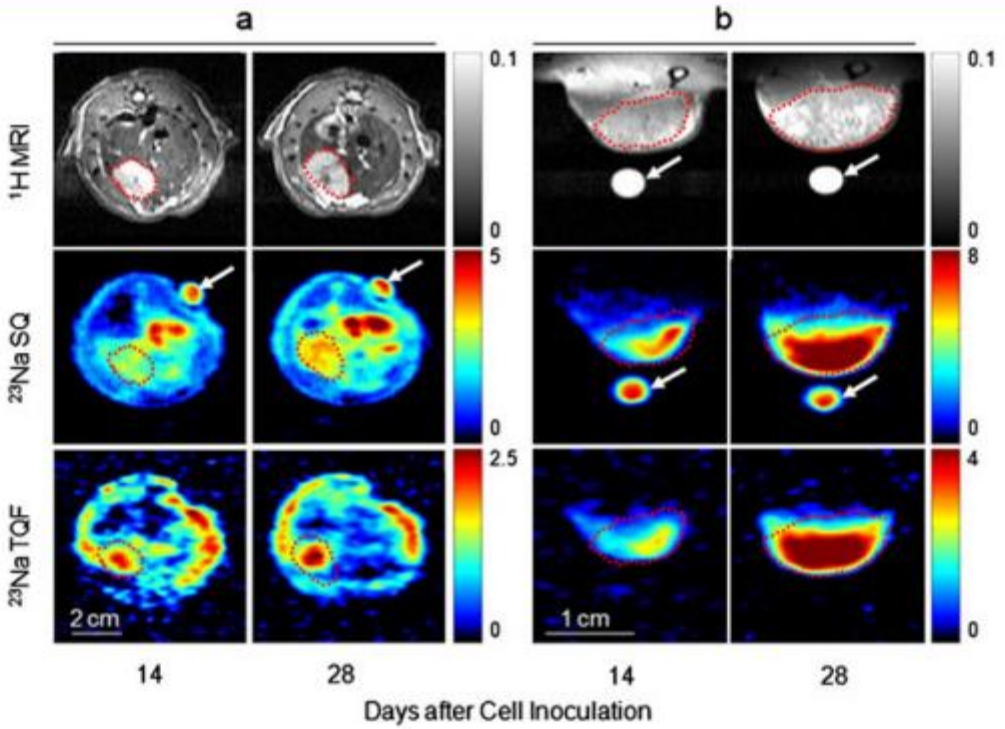
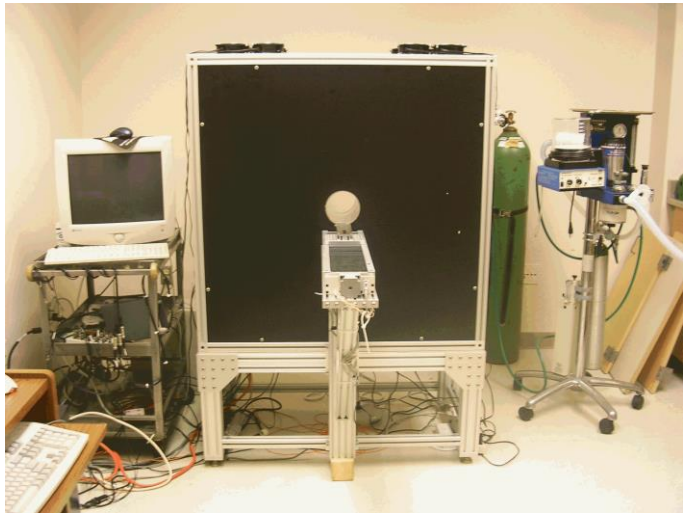
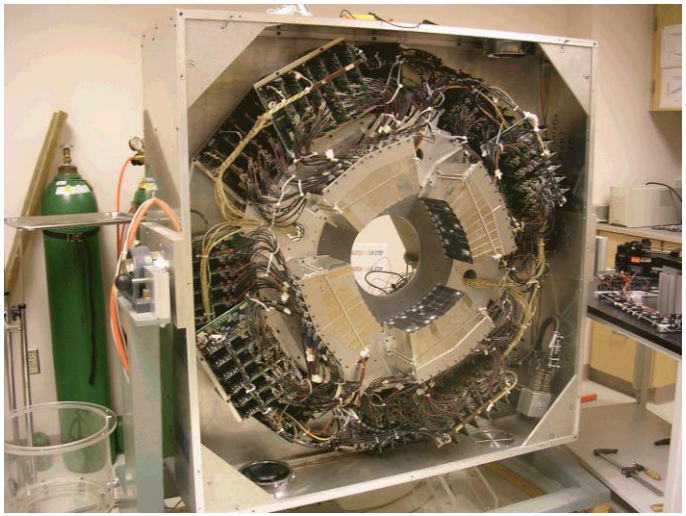


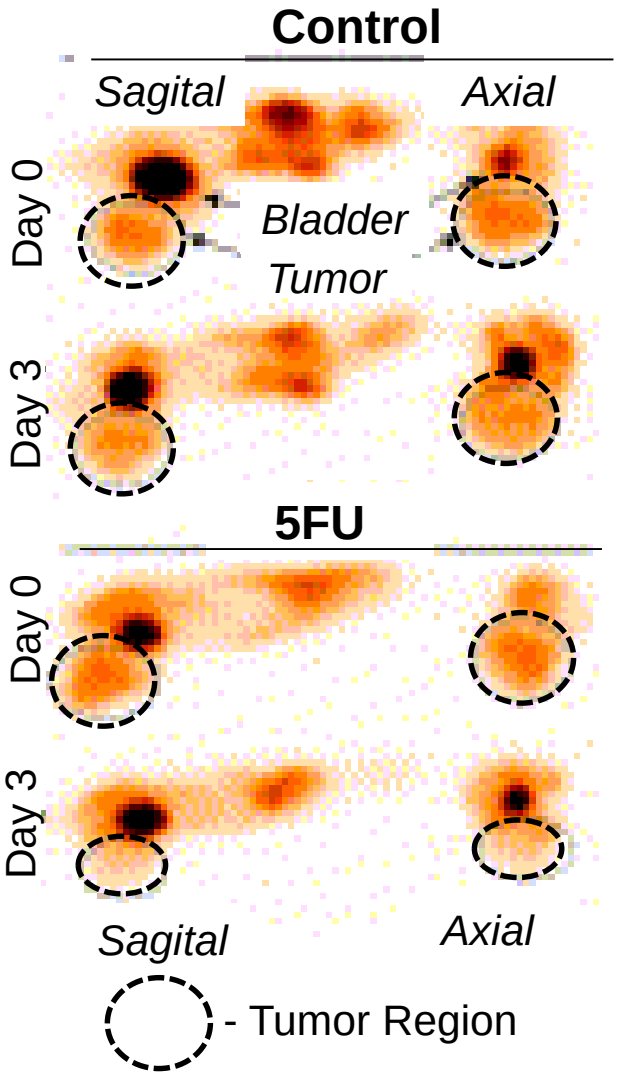
Figure 5. Selected sections from T_2-weighted ^{1}H, and SQ and TQF ^{23}Na MRI of representative intrahepatic (a) and subcutaneous HCCs (b), 14 and 28 days after N1S1 cell inoculation.

Indy I and II Positron Emission Tomography (PET) Scanners





FDG Distribution in RIF-1 Tumor before and 3 Days after 5FU Injection



Додаткова література

Бабський А.М., Верлі С.Л., Доліба М.М. та ін. Активація синтезу та окислення сукцинату у мітохондріях впродовж і після ішемії серця: полярографічні та ЯМР дані // Эксперим. та клін. фізіологія біохімія. – 2003. – № 4. – С. 26–41.

Бабський А.М., Стефанків Ю.С., Коробов В.М. Вплив сублетальних доз нітриту натрію на дихання та окисне фосфорилювання у мітохондріях печінки щура // Укр. біохім. журн. – 1993. – Т. 65, № 6. – С. 106–108.

Бабський АМ. Функціональний стан клітин і вміст Na^+ за гіпоксії та канцерогенезу. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка, 2014. (серія "Біологічні студії"). – 180 с.

Влізло В.В., Федорук Р.С., Ратич І.Б. та ін. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині. – 2012. – Львів: Сполом. – 764 с.

Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. Биология. – 1990. – М.: Мир. – Т. 1–3.

Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы // Методы биохим. исслед. – Л: ЛГУ, 1982.– С. 207–210.

*Захарова, Л.И.*Определение активности глутаматдегидрогеназы в митохондриях тканей животных // Методы биохим. исслед. – Л: ЛГУ, 1982. – С 250 – 252.

Королюк М.А., Иванова Л.И, Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.М. Простой и чувствительной метод определения СОД, основанный на реакции окисления кверцитина // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88–91.

Кривченкова Р.С. Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 47–49.

Личковський Е.І., Тіманюк В.О., Чалий О.В. та ін. Біофізика. Фізичні методи аналізу та метрологія. – Вінниця: Нова книга, 2014. – 464 с.

Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в еритроцитах // Лабор. дело, 1986. – № 2. – С. 724–727.

Додаткова література з ЯМР

1. Schild, H.H.. *MRI Made Easy (…Well Almost).* Wayne, N.J: Berlex Laboratories, 1992.
2. Hornack, Joseph. *The Basics of MRI*. 1996.
3. Keller, Paul. *Basic Principles of MR Imaging*. Milwaukee, Wisconsin: General Electric Company, 1988.
4. Wehrli, Felix. *Advanced MR Imaging Techniques*. Milwaukee, Wisconsin: General Electric Company, 1988.
5. Бабський А.М., Іккерт О.В., Манько В.В. *Основи біоенергетики.* Львів: вид-во ЛНУ імені Івана Франка, 2018. – 312 с.