

Лекція № 14

Тема: Моделювання біологічних систем. Загальний експериментальний підхід, що застосовується в біохімії

План:

1. Комп'ютерна модель живої клітини
2. Мозкова модель
3. Інші моделі моделей біологічних систем людини
4. Загальний експериментальний підхід, що застосовується в біохімії

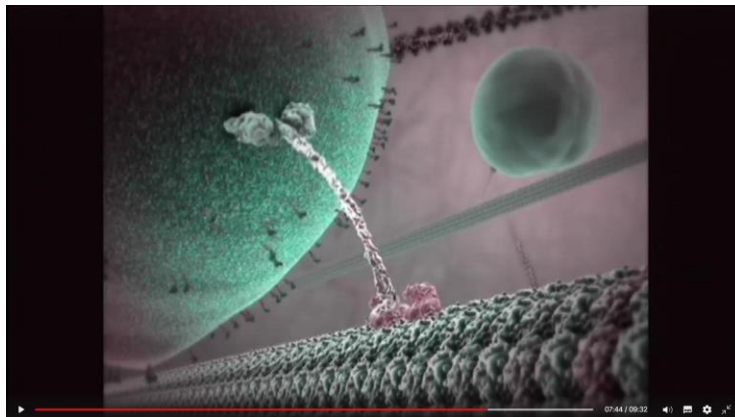
Моделювання біологічних систем є важливим завданням системної та математичної біології. Обчислювальні системи біології націлені на розвиток та використання ефективних алгоритмів, структурних даних, візуалізації та засобів комунікації з метою комп'ютерного моделювання біологічних систем. Це передбачає використання комп'ютерного симулювання біологічних систем, включаючи як клітинні підсистеми (наприклад, мережі метаболітів і ферментів, які містять обмін речовин, сигнальні шляхи і генні регуляторні мережі), так і аналіз та візуалізацію складних з'єднань цих клітинних процесів.

1. Комп'ютерна модель живої клітини

Створення клітинної моделі було особливо складним завданням системної та математичної біології. Це включає в себе використання комп'ютерного моделювання багатьох клітинних підсистем, таких як мережа метаболітів і ферментів, які містять обмін речовин, сигнальних шляхів і генних регуляторних мереж як аналізу, так і візуалізації складних з'єднань цих клітинних процесів. Комплексна мережа біохімічних процесів реакцій транспортування та їх просторової організації складає розвиток прогностичної моделі живої клітини – грандіозний виклик 21-му століттю. У 2006 році Національний науковий фонд (англ. *NSF*) кинув грандіозний виклик системній біології в 21 століття – побудова математичної моделі всієї клітини.

Приклад візуалізації живої клітини медичним аніматором Девідом Болінські та його командою наданий за посиланням:

https://www.ted.com/talks/david_bolinsky_visualizing_the_wonder_of_a_living_cell?language=en (з 6 хв 42 сек).



Вчені в Стенфорді створили повну цифрову модель крихітної бактерії *Mycoplasma genitalium* та всього її життєвого циклу. Для цього потрібно було написати 28 незалежних модулів, що взаємодіють один з одним, що симулюють процеси живої клітини і оперують 1900 параметрами. Для опису їхньої поведінки використовувалися 900 різних наукових звітів. Складність моделі висока: лише для процесу поділу потрібно 10 годин симуляції, а на виході виходить півгігабайта даних.

Mycoplasma genitalium - простий паразит, що мешкає в сечостатевих та дихальних шляхах. У неї всього 525 генів, тоді як у традиційнішої лабораторної *E. coli* їх 4288. Незважаючи на характер мікроорганізму та труднощі у роботі з паразитом, мала кількість генів робить його привабливим для біоінженерів: саме за участю *M. genitalium* у 2008 році вперше була створена штучна хромосома (<https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1151721?sid=7f44b176-e396-4815-af9f-fba419016b4e>).

Метою цього експерименту було не розбір процесів *M. genitalium*, а поліпшення розуміння біології взагалі. У звіті описується робота моделі динаміки зв'язування протеїну з ДНК та визначення функцій нових генів. Вчені помітили, що хоча тривалість індивідуальних стадій розвитку відрізняється від клітини до клітини, загальний період існування організму майже постійний.

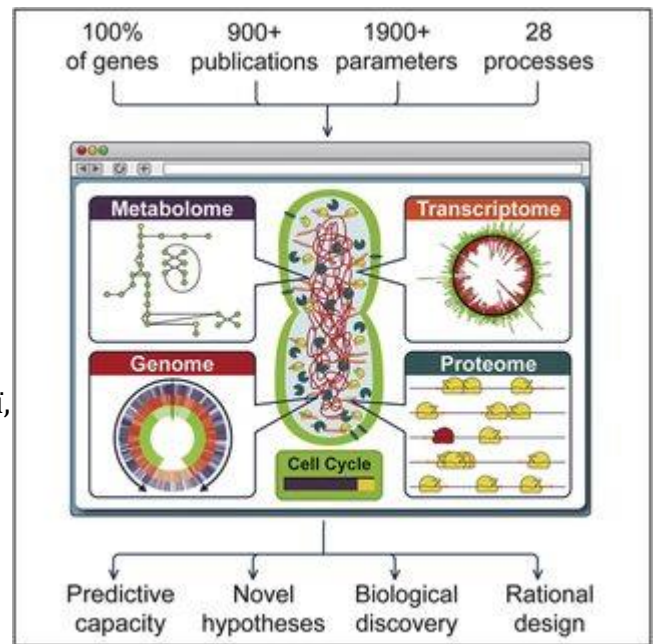
Т.ч., те, що не виходило здійснити з реальним організмом, дозволяє зробити його комп'ютерна модель. Необхідність у подібних цифрових розрахунках обумовлена тим, що кожен ген не просто регулює ознаку, багато ознак є наслідком взаємодії сотень і тисяч генів. Зрозуміти, як щось функціонує, важко, якщо не мати відтвореної схеми його роботи.

Майбутнє подібних досліджень обіцяє появі індивідуальної генної медицини, пакетів біологічного автоматизованого проектування, які допоможуть уникнути методу проб та помилок, який зараз застосовується через те, що ми ще не до кінця розуміємо процеси навіть найпростішого організму.

Протягом багатьох років вчені намагалися змодельювати цілі клітини і точно передбачити їхню біологію, але вони зазнали невдачі, тому що більшість клітин надто складні.

Функції багатьох генів досі невідомі, що робить повне моделювання стану клітин особливо важким. Найбільш повні моделі, розроблені дотепер, були засновані на бактеріях *Mycoplasma genitalium* та *Escherichia coli*.

M. genitalium має найменший з відомих геномів: у ній лише 525 генів (у людській клітині їх понад 20 000). З цього маленького геному в 2019 році дослідникам вдалося створити бактеріальну клітину JCVI-syn3A, що складається всього з 493 генів на одній кільцевій хромосомі, з яких 452 гени кодували білки. Гени, які не увійшли, вчені визначили як такі, що не є необхідними для життя



Мета даних досліджень – змодельовати функціонування цієї мінімальної клітини протягом повного життєвого циклу, включаючи її поділ та розробити систему для прогнозування того, як зміни в геномі, умовах життя або фізичних характеристик живих клітин впливають на їх функціонування. В результаті було розроблено динамічну, тривимірну кінетичну модель мінімальної живої клітини, яка імітує те, що відбувається в реальній клітині.

Незважаючи на простоту, клітина залишається загадковою. Наприклад, ніхто не знає, що роблять 94 із цих генів, крім того, що без них клітина вмирає. Їх присутність передбачає, що може бути «живі завдання чи функції, необхідних життя, про які... наука не знає».

Клітина JCVI-syn3A містить тільки гени, необхідні для реплікації ДНК, зростання, поділу та виконання більшості інших функцій, що визначають життя. Вчені змогли скласти карту розташування та хімічних характеристик тисяч клітинних компонентів на атомному рівні з високою точністю. На основі цієї моделі можна простежити всі хімічні реакції, що відбуваються всередині клітини, і спостерігати, як усі компоненти взаємодіють та змінюються у відповідь на внутрішні та зовнішні сигнали.

Щоб дійти такої моделі, вченим довелося:

1) об'єднати безліч параметрів: фізичні та хімічні характеристики ДНК клітини, її ліпідів, амінокислот, а також весь механізм транскрипції, трансляції та виробництва білка.

2) змодельовати дифузю кожного компонента через клітину (поживних речовин, продуктів, відходів та інших молекул), щоб оцінити енергію, необхідну кожному етапі клітинного циклу.

3) як результат були змодельовані всі хімічні реакції всередині мінімальної клітини, від її народження до поділу через дві години.

Отримані результати:

1. Модель показала, що клітина використовувала більшу частину своєї енергії для перенесення необхідних іонів та молекул через клітинну мембрану. Відомо, що мікоплазми отримують більшість елементів, необхідних для їх виживання, від інших організмів.

2. Розраховано природну тривалість життя матричних РНК, на яких заснований синтез білка.

3. Виявлено взаємозв'язок між швидкістю синтезу ліпідів та мембранних білків та змінами площі поверхні мембран та об'єму клітин.

4. Для швидкого поділу клітині необхідний фермент трансальдолазу, проте не було виявлено жодних доказів його присутності. Виникло припущення, що клітина розробила альтернативний метаболічний шлях, який робить цей фермент непотрібним або існує, але не схожий на звичайну трансальдолазу.

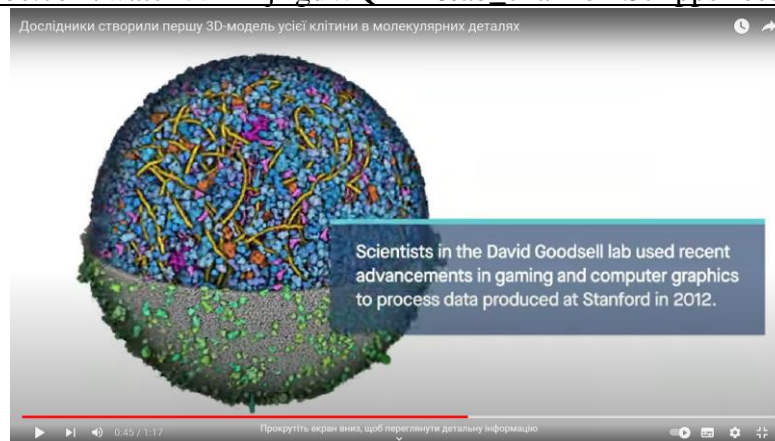
5. Вводячи додаткові молекули або змінюючи умови довкілля клітини, дослідники зможуть точніше визначити, які елементи необхідні її виживання

Відтворюючи відомі біохімічні процеси, що відбуваються всередині цієї дуже простої клітини, і відстежуючи всі поживні речовини, відходи, генні продукти та інші молекули, що проходять через неї у трьох вимірах, моделювання наближає вчених до розуміння того, як найпростіша форма життя підтримує себе, і розкриває деякі із елементарних вимог життя.

Отримані дані є відправною точкою для побудови складніших і значущих моделей природних клітин.

Структурні та обчислювальні біологи з Scripps Research об'єдналися з талановитими молекулярними художниками, щоб створити першу 3-D модель цілої клітини. Нова візуалізація бактеріальної клітини *Mycoplasma genitalium* включає детальний знімок її внутрішніх складових і представляє новий спосіб візуалізації клітинного середовища в охороні здоров'я та медицині. На моделі зображена зовнішня клітинна мембрана (сіра/зелена), що складається з шару ліпідів і білків, які захищають внутрішню частину клітини від зовнішнього середовища. Всередині мембрани зображено всі білки в цитоплазмі (синім кольором), просторі, де відбувається більшість клітинної діяльності та хімічних реакцій. У цьому просторі розташовані великі комплекси, які називаються рибосомами (пурпуровими), які діють як механізми клітинного виробництва білка. За цим шаром видно згорнуті нитки ДНК (жовті) і мРНК (рожеві), рядок коду месенджера, який містить інструкцію зі створення кожного білка. За наступним посиланням показана перша 3D-модель цілої клітини *Mycoplasma genitalium* в молекулярних деталях

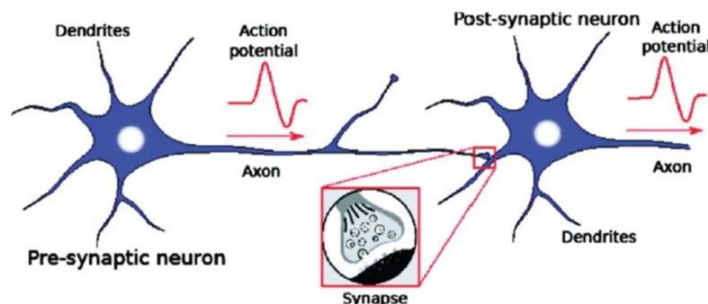
(https://www.youtube.com/watch?v=BnjLgdWQ42A&ab_channel=ScrippsResearch):



2. Мозкова модель

При народженні людський мозок важить приблизно 300 г. Повністю розвинений мозок дорослої людини має вагу приблизно 1,5 кг. У цих 1,5 кг містяться всі розумові здібності, які ми маємо: свідомі, такі як абстрактне мислення, творчість і не свідомі - моторика рухів, контроль кровоносної системи, дихання тощо.

Мозок людини складається приблизно зі 100 мільярдів нейронів, що пов'язані один з одним.



Передача інформації в мозку базується як на електриці (імпульси), так і на хімії (нейромедіатори). Кожен нейрон може бути з'єднаний з іншими за допомогою до десяти тисяч синаптичних зв'язків.

Якщо порахувати кількість усіх можливих зв'язків між нейронами та станів, які вони можуть отримати у кожний конкретний момент (лише один), то виходить їх величезна кількість, що значно перевищує оціночну кількість атомів у всьому спостережуваному Всесвіті. Використовуючи цей підхід, багато вчених, які спеціалізуються на нейробіології, а також мають знання з інформатики, вважають, що, навіть за поточного рівня знань і їх передбачуваного розвитку, повна симуляція такого складного органу є завданням, яке ще довго перевищуватиме наші можливості. Проте є проекти, метою яких є моделювання якщо не всього людського розуму, то, принаймні, його частини.

У 2013 році японські вчені з Окінавського технологічного інституту та німецькі дослідники з науково-дослідного центру Forschungszentrum Jülich об'єднали зусилля та використали один із найпотужніших на той час суперкомп'ютерів на нашій планеті (так званий K Computer) з обчислювальною потужністю 8,16 PFLOPS (або 8,16 квадрильйонів операцій з плаваючою комою на секунду), щоб спробувати змоделювати лише фрагмент мозку. Загалом, симуляція полягала в картографуванні роботи 1,73 мільярда нейронів, які разом створили мережу з 10,4 трильйона синаптичних зв'язків. Це трохи більше ніж 1 відсоток потенціалу нашого мозку. Для моделювання використовувалася повна потужність 82944 процесорів Sparc64 V8fx (одна система має тактову частоту 2 ГГц і 8 ядер).

Приблизно 40 хвилин роботи цього суперкомп'ютера тривала симуляція всього 1 секунди роботи згаданого фрагменту нейронної мережі мозку.

На даний момент американський суперкомп'ютер Frontier, що працює в Національній лабораторії Ок-Рідж і має обчислювальну потужність в 135 разів більшу, ніж японський K Computer, дану симуляцію виконує за менше ніж 18 секунд, проте це більше, ніж в реальному часі роботи мозку.

Проект «Блакитного Гена» є спробою створити синтетичний мозок за допомогою реверсивної інженерії мозку ссавців аж до молекулярного рівня. Мета проекту, заснованого у травні 2005 року у Політехнічній школі Інституту мозку в Лозанні, Швейцарія є вивчення архітектурних і функціональних принципів мозку. Моделювання мозку складається не просто зі штучної нейронної мережі, але й частково включає в себе біологічно реалістичну модель нейронів. Його прихильники сподіваються, що в кінцевому підсумку вона проллє світло на природу свідомості.

Проект «Людський мозок» ґрунтується на проекті «Блакитного мозку».

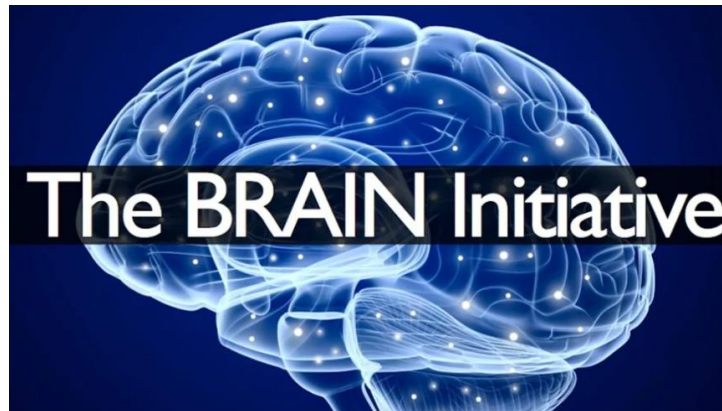
Проект людського мозку (HBP – Human Brain Project) за своїм масштабом і коштами, виділеними на цей науковий проект, можна порівняти з іншим проектом, пов'язаним з людиною – знаменитим проектом «Геном людини», який тривав з 1990 по 2003 рік. Щоб повністю зрозуміти геном людини, проект «Людський мозок» має на меті допомогти вченим краще зрозуміти наш мозок. Однак проект «Людський мозок», який триває з 2013 року і спочатку мав завершитися після десятиліття досліджень (тобто в 2023), навіть близько не моделює весь мозок.



Основною метою НБР є не симуляція всього мозку, а щоб хоча б частково опанувати складність мозку. Це допоможе в розвитку таких наук, як медицина, інформатика, неврологія. Одним із результатів проекту НБР є створення цифрової платформи для дослідження мозку EBRAINS, яка надає вченим інструменти для моделювання та аналізу функціонування окремих ділянок мозку.

Одним із таких інструментів є програма моделювання віртуального мозку, створена в рамках НБР та EBRAINS. Цей інструмент абсолютно не в змозі змоделювати роботу всього мозку, але він дозволяє, наприклад, дослідникам нових ліків змоделювати їх вплив на групи нейронів. Це, у свою чергу, дозволить вченим розробляти нові методи лікування, корисні при таких складних захворюваннях, як хвороба Альцгеймера, депресія, хвороба Паркінсона тощо.

Проект, ініційований американськими дослідницькими установами, **US BRAIN Initiative**. Його мета – картографування людського коннектому (сукупність нервових зв'язків даного організму).



Знання всіх типів клітин мозку, того, як вони з'єднуються один з одним і як вони взаємодіють, відкриває новий набір терапій. В даний час створюється і систематично розвивається найбільший у світі каталог типів нервових клітин. Цей каталог під назвою BRAIN Initiative Cell Census Network (BICCN) описує, скільки різних типів клітин є у мозку, в яких пропорціях вони зустрічаються, як вони просторово розподілені, та які взаємодії відбуваються між ними.

BRAIN і каталог BICCN (<https://biccn.org/>) є відправними точками для розуміння структури та роботи кожного нейронного кола, а, отже, для розуміння складної поведінки.

3. Інші моделі біологічних систем людини

Модель імунної системи

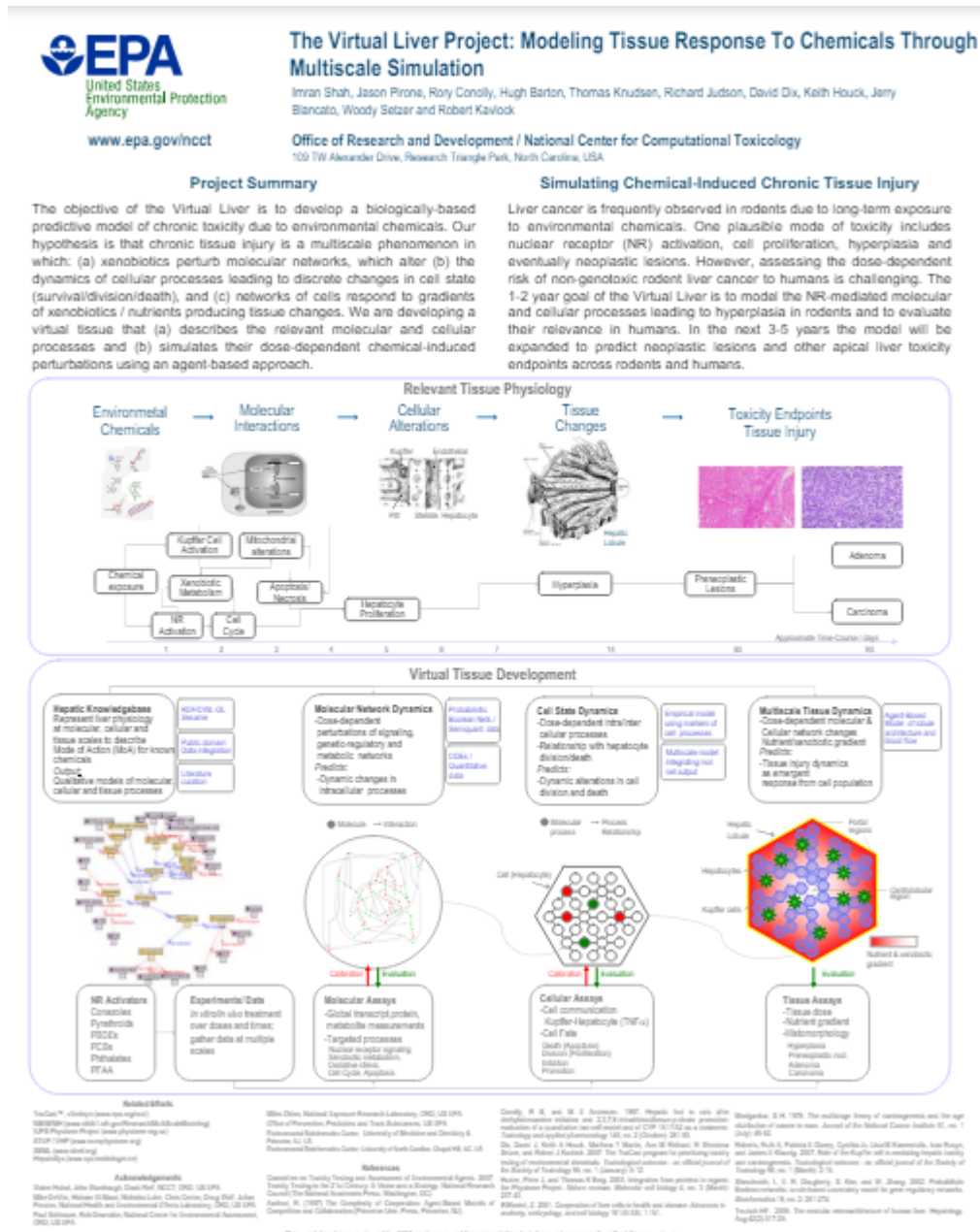
В останнє десятиліття зростає число симуляцій імунної системи. Приклад: https://www.youtube.com/watch?v=1KdlU1sQcyc&ab_channel=UKRISStories

Віртуальна печінка

Проект «Віртуальна печінка» - це дослідницька програма заснована урядом Німеччини, що складається з сімдесяти дослідницьких груп розподілених по всій Німеччині. Мета полягає в створенні віртуальної печінки, динамічної математичної моделі, яка відтворює фізіологію печінки людини, морфологію та її функції.

Отримані моделі сприятимуть кращому розумінню печінки як найважливішого метаболічного органу організму та того, як на її функцію впливає захворювання, допомагаючи знайти нові методи лікування.

Печінка є унікальним органом: це центральний метаболічний орган хребетних і має вирішальне значення для детоксикації, травлення, поглинання заліза та синтезу життєво важливих білків. Печінковий метаболізм є головним фактором, який необхідно врахувати при розробці ліків, оскільки він має центральне значення для токсичності та ефективності ліків. Тому дослідження печінки та її функцій мережею має найбільше значення для медицини та фармацевтичної промисловості (<https://www.h-its.org/projects/virtual-liver/>).



Наприклад, дослідниками з Інституту молекулярної клітинної біології та генетики Макса Планка (MPI-CBG) у Дрездені розроблена багатомасштабна модель, яка може імітувати динамічні властивості рідини жовчі в печінці. Ця модель може допомогти охарактеризувати захворювання печінки, а також ушкодження печінки, викликані ліками, і, отже, є багатообіцяючим інструментом для розробки ліків для тестування та прогнозування впливу

фармакологічних сполук на печінку. Зараз дослідницька група працює над стратегією калібрування цієї моделі відповідно до динаміки жовчної рідини людини.

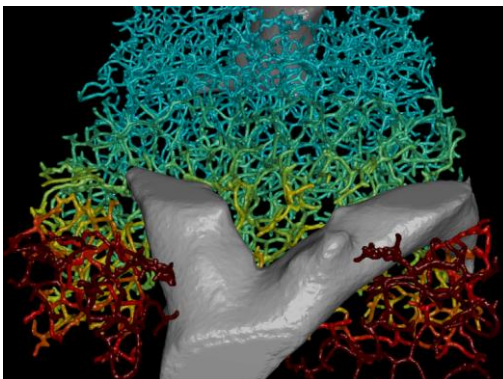


Рис. Тривимірне представлення геометрії біліарної мережі з накладеним профілем швидкості жовчі, показаним у вигляді кольорового коду (синій: низька швидкість; червоний: висока швидкість)

Дослідницька група на чолі з професором Маріно Зеріалом, директором MPI-SVG, об'єднала зображення високої роздільної здатності мережі жовчних каналців у печінці миші з 3D-аналізом її геометрії з різною роздільною здатністю, щоб розробити прогностичну 3D-багатомасштабну модель, яка може моделювати рідинну динаміку жовчі на кількох рівнях – від субклітинного до тканинного. Це надає інструмент для аналізу та розуміння холестатичної хвороби печінки та перевірки впливу фармакологічних сполук на транспорт жовчі.

Поки що модель застосована лише до миші, але дослідники очікують, що її можна буде перекласти на печінку людини

Моделі в екотоксикології

Метою моделей в екотоксикології є розуміння, моделювання та прогнозування ефектів, викликаних токсикантами у навколишньому середовищі. Більшість сучасних моделей описують вплив на один з багатьох різних рівнів біологічної організації (наприклад, організм або популяцію). Завдання полягає в розробці моделей, які здатні передбачити наслідки у біологічних масштабах. «Екотоксикологія та моделі» розглядає деякі типи екотоксикологічних моделей і надає посилання на багато інших.

Моделювання інфекційного захворювання

Можна моделювати прогрес більшості інфекційних захворювань, математично виявити ймовірні наслідки епідемії або допомогти управляти ними за допомогою вакцинації. Ця область намагається знайти параметри для різних інфекційних захворювань і використовувати ці параметри, щоб зробити корисні розрахунки впливу програми масової вакцинації.

4. Загальний експериментальний підхід, що застосовується в біохімії

Експериментальний підхід складається із трьох частин:

- 1) виділення біомолекул і органел, що перебувають у клітині;
- 2) визначення структури біомолекул;
- 3) використання різних препаратів для аналізу функцій біомолекул і їх метаболізму (тобто процесів синтезу й розпаду).

На сьогодні існує багато методів, придатних для аналізу компонентів, які перебувають у клітинних екстрактах і інших препаратах, а саме:

- фракціонування солями (наприклад, осадження із сульфатом амонію);
- хроматографія (паперова, іонообмінна (аніоно- і катіонообмінна), афінна, тонкошарова, газо-рідинна, рідинна під високим тиском, гель- фільтрація);
- електрофорез (високовольтний, на папері, в агарозі, ацетатцелюлозі, крохмальному гелі, поліакриламіді, поліакриламіді в присутності додецилсульфата натрію);
- ультрацентрифугування.

Для одержання більшості біомолекул у чистому вигляді, як правило, необхідно послідовно застосовувати кілька методів. Подробиці про застосування кожного з методів можна знайти у відповідних посібниках.

Важливо мати на увазі, що прогрес у біохімії залежить від розробки нових методів аналізу, очищення й визначення структури. Наприклад, у галузі біохімії ліпідів відбувся дійсний переворот після введення в практику газо-рідинної й тонкошарової хроматографії. Аналіз мембранних і багатьох інших білків був у край утруднений доти, доки не з'явився метод електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфата натрію (ДСН-ПААГ): застосування додецилсульфата натрію приводить до солюбілізації ряду білків, які раніше не вдавалося перевести в розчинний стан. Після цього вже можна проводити електрофорез.

Розробка методів клонування й секвенування (визначення послідовності мономерів) ДНК зробила справжню революцію у вивченні нуклеїнових кислот і взагалі в біології.

Визначення структури біомолекул

Після очищення біомолекул можна визначити їх структуру – необхідна умова успішного детального вивчення кореляції між структурою й функцією. Основні методи, використовувані для аналізу структури біомолекул:

- елементний аналіз;
- спектроскопія в УФ, видимій і інфрачервоній областях, ЯМР- спектроскопія;
- використання кислотного або лужного гідролізу для розщеплення досліджуваних молекул на компоненти;
- використання набору ферментів з відомою специфічністю для розщеплення досліджуваних молекул (наприклад, використання протеаз, нуклеаз, глікозидаз);
- мас-спектрометрія;
- специфічні методи секвенування (наприклад, білків або нуклеїнових кислот);
- рентгенівська кристалографія.

Специфічність дії ряду ферментів дозволяє використати їх як потужні інструменти для з'ясування структурних особливостей деяких біомолекул. Теоретичний і технічний прогрес, що дозволив підвищити роздільну здатність мас-спектрометрії і ЯМР-спектроскопії, сприяв тому, що ці методи стали широко застосовуватися для визначення структури молекул. Наприклад, у край складну структуру вуглеводних ланцюгів, що входять до складу деяких біомолекул, зокрема глікопротеїнів, у багатьох випадках удалося встановити за допомогою ЯМР-спектроскопії високого розділення. Найбільш детальну інформацію про структуру біомолекул дають методи рентгенівської кристалографії. Саме завдяки їх використанню була встановлена детальна структура різних білків і ферментів, а також відкрита подвійна спіраль ДНК.

Вивчення функцій і метаболізму біомолекул з використанням різних препаратів

Перші біохімічні дослідження людини й тварин проводилися на рівні цілого організму. Як приклад можна привести вивчення подиху й частки речовин, що потрапили в організм.

Незабаром стало ясно, однак, що цілий організм занадто складний, щоб можна було одержати чіткі відповіді на різні питання. Багато проблем, що виникали у ході роботи з організмом, були усунуті після готування більше простих препаратів і вивчення їх *in vitro*.

Ієрархічна послідовність препаратів, використовуваних для вивчення біохімічних процесів

Дослідження на рівні **цілого організму** (*in vivo*) включають:

- 1) видалення органа (наприклад, гепатектомія);
- 2) зміна дієти (голодування, посилене харчування);
- 3) прийом ліків (наприклад, фенобарбіталу);
- 4) введення токсичних речовин (наприклад, чотирихлористого вуглецю);
- 5) спостереження за твариною зі специфічними захворюваннями (наприклад, цукровим діабетом);
- б) використання складних методів, таких, як ЯМР-спектроскопія йпозитронно-емісійна томографія.

Дослідження **ізолюваного перфузованого органу** (*in situ*) проводяться з застосуванням будь-якого органу.

Використання **тканинних зрізів** (*in situ, in vitro*) можливе також під час дослідження всіх органів та тканин.

Використання **цілих клітин** (*in vitro*) в культурах є незамінним об'єктом у багатьох галузях біології та медицини. Особливо це стосується клітин крові, які відносно легко виділяються.

Використання **гомогенату** (*in vitro*):

- дозволяє працювати з безклітинними препаратами;
- дає можливість додавати або видаляти (шляхом діалізу) різні сполуки й спостерігати за наслідками;
- шляхом центрифугування уможливорює подальше субфракціонування, що дозволяє одержати індивідуальні клітинні органели.

Дослідження **ізолюваних клітинних органел** широко застосовується для вивчення функцій мітохондрій, ендоплазматичного ретикулула, рибосом і т.д.

Субфракціонування органел широко застосовується, наприклад, у ході вивчення функцій мітохондрій. Отримані фракції подальше застосовуються для **виділення й характеристики метаболітів і ферментів**, що є найважливішою частиною аналізу будь-якої хімічної реакції або метаболічного шляху

Клонування генів, що кодуєть ферменти й інші білки, на сьогодні стало звичайною процедурою. Виділення клонованого гена необхідно для вивчення деталей його структури й регуляції; дозволяє встановити амінокислотну послідовність білка, що ним кодується.

Дуже велику роль відіграло введення в біохімічну практику ізотопів у 1930-х рр. Раніше було дуже важко позначити біомолекули, щоб потім стежити за їх перетвореннями в ході метаболізму. У перших дослідженнях, насамперед Шонхеймера і його колег, для виконання багатьох біохімічних завдань використовувалися стабільні ізотопи (^2D , ^{15}N), за долею яких далі стежили за допомогою мас-спектрометрії. Наприклад, синтезували певні амінокислоти, цукри й жирні кислоти, до складу яких вводили стабільні ізотопи, а потім додавали ці сполуки в їжу тваринам або до препаратів *in vitro*, щоб можна було стежити за їх метаболізмом (визначити час напівжиття, перетворення на інші біомолекули й т.д.). Саме таким способом були з'ясовані багато аспектів метаболізму білків, вуглеводів і ліпідів. Стало ясно, що метаболізм – дуже активний процес: більша частина сполук у клітині постійно синтезується й розпадається, хоча швидкості цих процесів можуть сильно відрізнятися. Підсумовування всіх цих результатів дозволило Шонхеймеру сформулювати уявлення про “динамічну природу метаболізму”.

Дуже важливе значення мало подальше використання радіоактивних ізотопів і приладів, що дозволяють визначати їх кількість. Стабільні й радіоактивні ізотопи, широко застосовувані у ході роботи з біологічними системами, перераховані в табл. 2.

Таблиця 2.

Ізотопи, найбільш широко застосовувані в біологічних дослідженнях

Стабільні ізотопи	Радіоактивні ізотопи
^2D	^{15}N
^{18}O	^3H
^{14}C	^{32}P
^{35}S	^{35}Ca
^{125}I	^{131}I

Їх застосування відіграло вирішальну роль у розвитку ряду галузей біології. Багато досліджень простих і складних біомолекул *in vivo* і *in vitro* значною мірою спираються саме на використання ізотопів. Той прогрес, що був досягнутий останнім часом у секвенуванні нуклеїнових кислот і в розвитку радіоімунних методів для вимірювання дуже малих кількостей сполук у біологічних системах, також був обумовлений значною мірою застосуванням ізотопів.

Загальна стратегія вивчення біохімічних процесів

Метаболічний шлях – це сукупність реакцій, відповідальних за синтез складних сполук з більш простих і за розпад сполуки до кінцевих продуктів. Той або інший складний біохімічний процес або метаболічний шлях іноді проявляється на рівні цілого організму. Прикладом цього може служити скорочення м'язів. Ми знаємо, що глюкоза є джерелом енергії для людини й інших тварин, а це означає, що в організмі людини вона повинна розпадатися (піддаватися метаболізму) з виділенням енергії. Однак для того щоб одержати повне уявлення про специфіку метаболізму глюкози необхідно провести дослідження на різних рівнях.

Можливість артефактів не знімає абсолютної необхідності виділення й ідентифікації кожного компонента, що бере участь у біохімічному процесі, у чистому вигляді; без цього неможливо зрозуміти, як проходить процес на молекулярному рівні. Важливо навчитися реконструювати процес *in vitro* шляхом систематичного підбору індивідуальних компонентів. Якщо після добору всіх компонентів системи процес все-таки не йде, це може означати відсутність якогось важливого компонента, що був пропущений у ході ідентифікації й не додавалася під час збірки. Завдяки досягнутим в останні роки успіхам у галузі технології (наприклад, у ЯМР-спектроскопії й позитронно-емісійній томографії) з'явилася можливість виявляти певні біомолекули на рівні обстеження цілих органів і стежити за зміною їх складу в часі. Це дозволяє аналізувати багато складних біохімічних процесів *in vivo*. Лише після того, як спостереження, виконані на різних рівнях, дадуть результати, що узгодяться між собою, можна з упевненістю говорити про реальні успіхи в розумінні досліджуваного біохімічного процесу. Якщо ж у процесі використання різних підходів виникнуть істотні розбіжності, варто шукати причину цих розбіжностей доти, доки не буде знайдене раціональне пояснення. Описане вище сполучення різних рівнів дослідження й різного роду препаратів може використатися для виявлення біохімічних змін у тварин, пов'язаних зі змінами метаболізму (наприклад, за обмеженого або посиленого харчування) або з певними захворюваннями (цукровий діабет, рак). Більша частина описаних вище методів і підходів застосовна для вивчення клітин або тканин людини в нормі й патології. При цьому необхідно ретельно

стежити за тим, щоб використовувалися тільки свіжоприготовані препарати, а крім того, варто звертати особливу увагу на етичні питання, пов'язані із проведенням експериментів на людині.