А. Я. Николаев

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Третье издание, переработанное и дополненное

Рекомендовано Учебно-методическим объединением по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебника для студентов медицинских вузов

МЕДИЦИНСКОЕ
ИНФОРМАЦИОННОЕ АГЕНТСТВО
Москва, 2004

УДК 577.1
ББК 28.707.2
Н63

Николаев А. Я.

Н63 Биологическая химия. — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицинское информационное агентство. — 2004. — 566 с.: ил.

ISBN 5-89481-219-4

Учебник профессора А.Я. Николаева «Биологическая химия» (издание третье, переработанное и дополненное) написан на основании многолетнего опыта преподавания одноименной дисциплины в Московской медицинской академии имени И.М. Сеченова. Предыдущие издания за короткий срок заслужили любовь и симпатию студентов в связи с четкостью изложения этой сложной науки и клинической направленности материала. Книга состоит из 23 глав, в которых подробно рассматриваются молекулярные основы физиологических функций организма человека, механизмов патогенеза болезней, а также их лечения и профилактики. Затрагиваются вопросы применения биохимических исследований для диагностики заболеваний и контроля эффективности лечения. Главы написаны с учетом современных сведений о молекулярных механизмах обмена веществ и генетической изменчивости.

Учебник написан в соответствии с программой курса биологической химии для студентов медицинских вузов и рекомендован Учебно-методическим объединением по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России.

Для студентов медицинских вузов и врачей всех специальностей.

УДК 577.1
ББК 28.707.2

© Николаев А. Я., 2004
© Оформление ООО «Медицинское информационное агентство», 2004

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни было форме без письменного разрешения владельцев авторских прав.

ISBN 5-89481-219-4

ПРЕДИСЛОВИЕ

Цель курса биохимии — научить будущих врачей применять при изучении последующих дисциплин и в профессиональной врачебной деятельности сведения о химическом составе и молекулярных процессах организма как о характеристиках нормы и признаках патологии. Исходя из этого, в предлагаемом издании особое внимание уделяется сведениям о непосредственной связи молекулярных процессов с физиологическими (биологическими) функциями клетки и организма. Например, с этой точки зрения один из центральных вопросов общей биохимии — о механизмах ферментативного катализа — представляется нам менее важным, чем вопрос о субстратной специфичности и многообразии ферментов в организме.

Сведения о молекулярных механизмах патогенеза болезней, имеющиеся в каждой главе, выполняют не только информативную, но и мотивационную роль, поскольку подчеркивают значение биохимии для изучения клинических дисциплин и для будущей профессиональной деятельности. Вместе с тем биохимия должна сохранять характер фундаментальной дисциплины, составляя вместе с другими медико-биологическими дисциплинами теоретическую основу медицины.

Как используется знание медико-биологических дисциплин в практической деятельности врача? Установление диагноза болезни и назначение адекватного лечения включают ряд мыслительных операций, начиная с отбора симптомов из многих тысяч диагностических признаков, известных современной медицине. Отобранные симптомы складываются в клиническую картину, на основе которой делают заключение о сущности болезни и, наконец, устанавливают диагноз страдания конкретного больного, служащий базой для определения методов лечения. При этом мысль врача постоянно возвращается от последующего этапа к предыдущему и корректируется путем сопоставления промежуточных заключений. Центральную роль в этом процессе играют образы сущности болезней, имеющиеся в памяти врача. Они служат главным ориентиром и в движении к диагнозу, и в движении от диагноза к способам лечения. А сущности болезней, равно как мишени и механизмы действия лекарств и лечебных мероприятий, описываются в терминах и понятиях морфологии, физиологии и биохимии. При этом клиницисту требуется интегральное описание морфологии, физиологии и биохимии патологических состояний: нет такой функции и нет такой болезни, которые можно было бы описать в рамках одной или двух из этих дисциплин.

При составлении книги мы стремились подбирать такие факты, конкретные явления, частные приложения биохимии, на основе которых проще перейти к

обобщениям, чтобы, исходя из них, можно было понимать и конструировать другие конкретные явления того же класса, составляющие содержание биохимии. Такой подход позволяет решить и проблему, связанную со старением информации. Современный врач вынужден не только знать тонкости своего дела, но и уметь ориентироваться в быстро меняющейся информационной обстановке. Знание основных концепций, закономерностей и методов биохимии помогает студенту (врачу) находить и понимать новую информацию по биохимии и применять ее для решения медицинских проблем.

При написании книги мы исходили из того, что будущие врачи, начинающие изучать биохимию, имеют запас знаний о молекулах и молекулярных процессах, полученный в средней школе и в курсах химических дисциплин, предшествующих или параллельных курсу биохимии. Поэтому мы в ряде случаев нарушали логику изложения химизма биохимических процессов, чтобы сохранить логику изложения их биологического смысла и значения.

Для читателя важно помнить, что в каждом очередном разделе содержится больше информации, чем можно извлечь при первом чтении, основываясь на знании только предшествующих разделов. Это обычная ситуация при описании сложных кооперативных систем, в которых все части образуют единое функциональное целое. Именно к таким системам относятся объекты биологии, в том числе биохимия человека.

Настоящее издание отражает результат многолетней эволюции преподавания биохимии в ММА. При подготовке нового издания учтены многочисленные и существенные изменения содержания биохимии за последние годы. В соответствии с этим внесены значительные изменения и в структуру учебника.

Профессор
А. Я. Николаев

ВВЕДЕНИЕ

МЕСТО БИОХИМИИ СРЕДИ ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Биологическая химия изучает молекулярные процессы, лежащие в основе развития и функционирования организмов. Биохимия использует методы «молекулярных» наук — химии, физической химии, молекулярной физики, и в этом отношении биохимия сама является молекулярной наукой. Однако главные конечные задачи биохимии лежат в области биологии: она изучает закономерности биологической, а не химической формы движения материи. С другой стороны, «молекулярные изобретения» природы, открываемые биохимиками, находят применение в небиологических отраслях знания и в промышленности (молекулярная бионика, биотехнология). В таких случаях биохимия выступает в роли метода, а предметом исследований и разработок являются проблемы, выходящие за пределы биологии.

Место биохимии как молекулярного уровня биологических исследований иллюстрирует рис. В.1. Уровни исследования являются отражением уровней структурной организации биологических систем, образующих иерархический ряд от наиболее простых систем (молекулы организмов, молекулярный уровень) до предельно

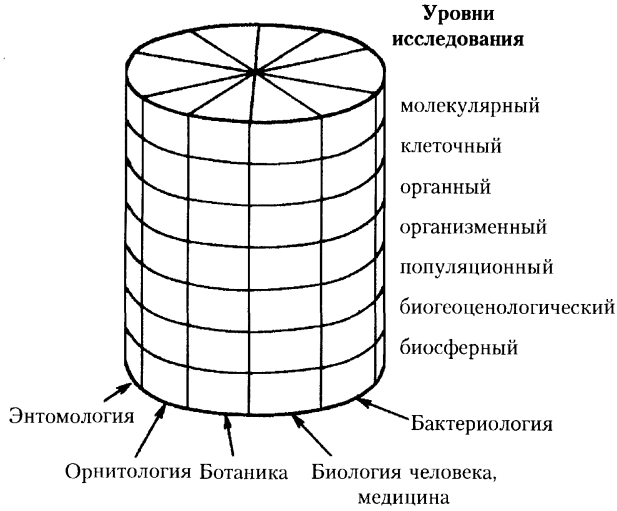


Рис. В.1. «Слоеный пирог» биологии

сложной земной биологической системы (биосферный уровень). Действительные связи между отраслями биологии гораздо сложнее, чем можно представить с помощью таких простых схем, как на рис. В.1. В частности, каждый более простой уровень организации живых систем (и, соответственно, уровень их исследования) является частью более сложных уровней. Самый первый уровень — молекулярный — уникален в том отношении, что он является составной частью систем всех других уровней биологии. Соответственно этому выделяют такие разделы биохимии, как, например, молекулярная генетика, биохимическая экология. Высший уровень — биосферный — включает в себя все другие уровни.

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ БИОХИМИИ

Первоначальные этапы истории биохимии совпадают с историей органической химии. До середины XIX в. органической химией называли науку, которая изучала вещества, входящие в состав животных и растительных организмов, т. е. вещества живого («органического») мира. Позднее, в связи с развитием синтетической химии соединений углерода, смысл термина «органическая химия» изменился — так теперь называют химию соединений углерода, а науку, изучающую химический состав живых организмов и химические процессы, протекающие в них, стали называть физиологической, а затем биологической химией. Биологическая химия изучает не только органические, но и неорганические (минеральные) соединения, содержащиеся в организмах. Разумеется, и после этой дифференциации органической и биологической химии их развитие происходит в тесном взаимодействии, объединяемое множеством общих методов и общих задач.

Историю биохимии (и органической химии) принято отсчитывать с конца XVIII в., когда впервые были выделены из организмов в чистом виде некоторые соединения — мочевина, лимонная кислота, яблочная кислота и др. В то время еще не было представлений о строении этих веществ. Длительный период развития биохимии, вплоть до середины XX в., заполнен открытием все новых веществ в живой природе, исследованием их структуры и химических превращений в организмах. Важнейшими достижениями этого периода явилось установление общего плана строения главных биополимеров — белков и нуклеиновых кислот, и раскрытие основных путей химических превращений веществ в организмах (метаболизм). В этот же период произошла дальнейшая дифференциация биохимии: в ней стали выделять статическую биохимию, изучающую химический состав организмов; динамическую биохимию, изучающую метаболизм; функциональную биохимию, изучающую связь химических процессов с физиологическими (биологическими) функциями.

Середина XX столетия явилась переломным этапом в истории биохимии. Развитие молекулярного уровня исследований в последующее время привело к перестройке структуры не только биохимии, но и всей биологии — ее методов, эмпирической основы, теоретических элементов, форм практического использования, классификации разделов биологии.

Отличительной чертой биохимии этого периода является переход к широкому изучению структуры и свойств индивидуальных представителей белков и нуклеиновых кислот, к выяснению функции каждого индивидуального белка и каждой

функциональной единицы нуклеиновых кислот в живой клетке. Предпосылкой для этого послужило стремительное развитие методов разделения веществ и изучения их структуры, а также специфических для биохимии методов выделения и исследования надмолекулярных структур — клеточных органелл. Если в предшествующий период функциональная биохимия только зарождалась, то теперь она становится ведущим направлением в биохимии. По-прежнему сохраняются и усиливаются связи с органической химией, но одновременно резко возрастает значение связей биохимии с другими биологическими науками — цитологией, физиологией, генетикой. Наиболее ярким выражением этого явилось раскрытие молекулярных механизмов таких фундаментальных свойств жизни, как наследственность и изменчивость.

В 50–60-х годах XX в., когда была установлена структура ДНК, позволившая объяснить механизм репликации генов, возникло новое название для обозначения этого направления исследований — молекулярная биология. Первоначально молекулярной биологией называли область биохимии, изучающую молекулярные основы общебиологических явлений — наследственности, изменчивости, биологической эволюции. Однако очень скоро значение термина изменилось, и его стали применять в более широком смысле, вплоть до того, что некоторые биохимики считают термины «молекулярная биология» и «биохимия» синонимами.

До середины XX в. в биохимии преобладало исследование химических превращений веществ в организме, сопровождающихся изменением ковалентной структуры соединений (метаболизм). Однако со временем выяснилось, что не меньшее значение в обмене веществ и функционировании организма имеют физико-химические процессы, не связанные с изменением ковалентной структуры соединений. Область биохимии, изучающую физико-химические и молекулярно-физические основы жизнедеятельности, называют физико-химической биологией.

Всякое изменение молекул в организме можно изучать в двух направлениях. Одно направление — выяснение роли этого процесса для функционирования живой клетки, органа, организма. В этом случае молекулярные процессы служат для объяснения биологических явлений. Другое направление — выяснение химических и физических основ этого процесса, т. е. объяснение поведения молекул в организме исходя из законов химической и физической форм движения материи. Исследования этого направления составляет содержание биоорганической химии. Биоорганическая химия занимает положение, пограничное с органической химией, в отличие от которой изучает прежде всего те свойства соединения, которые непосредственно связаны с его функцией в организме. Кроме того, биоорганическая химия, исходя из функций отдельных соединений в организме и механизма их действия, разрабатывает принципы создания синтетических биологически активных соединений, т. е. веществ, определенным образом изменяющих функции организма (лекарства, избирательно действующие инсектициды и др.).

Здесь названы основные направления биохимии, имеющие общебиологическое значение. Кроме того, в зависимости от конкретных объектов и задач исследования выделяют и другие разделы биохимии, например: биохимия вирусов, биохимия растений, биохимия животных.

До середины XX в. теоретическую основу медицины составляли главным образом морфологические и физиологические дисциплины. Теперь к ним добавилась и

биохимия, точнее медицинская биохимия (биохимия человека). Она включает в себя все общебиохимические направления, но в той их части, которая имеет отношение к здоровью и болезням человека. Следовательно, медицинская биохимия изучает молекулярные основы развития и функционирования здорового человеческого организма, молекулярные механизмы болезней, биохимические методы диагностики и лечения (клиническая биохимия), биохимическую экологию человека.

Таким образом, биохимия в целом изучает химические и физико-химические процессы, результатом которых являются развитие и функционирование живых систем всех уровней организации. Как видим, современная биохимия представляет собой разветвленную область знаний, разделы которой тесно связаны друг с другом и не могут быть четко разграничены.

Содержание этого учебника в значительной части близко к тому, что называют функциональной биохимией и медицинской биохимией. Сущность всякой болезни, равно как мишени и механизмы действия лечебных мероприятий, описывается в терминах и понятиях морфологии (анатомия, гистология), физиологии и биохимии. Именно этим определяется значение медико-биологических дисциплин в подготовке врача.

В наше время биохимия развивается сверхстремительно, и результаты немедленно находят выход в прикладные области, прежде всего — в практику предупреждения, диагностики и лечения болезней. За последние примерно 15 лет в биохимии произошли существенные изменения, имеющие концептуальный характер. Прежде всего отметим, что главным объектом исследований стал человек. Главным предметом исследований стали процессы взаимодействия макромолекул в сложных системах — механизмы внутриклеточной и межклеточной передачи сигналов, внутриклеточная, межклеточная и межорганная координация молекулярных процессов. Быстро меняется и сам язык биохимии. Из этого следует, что столь же существенных изменений требует и преподавание биохимии.

Часть I

СТРОЕНИЕ ИНФОРМАЦИОННЫХ МОЛЕКУЛ И МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ

Глава 1

СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

Представление о белках как о классе соединений формировалось в XVIII–XIX вв. В этот период из разнообразных объектов живого мира (семена и соки растений, мышцы, хрусталик глаза, кровь, молоко и т. п.) были выделены вещества, обладающие сходными свойствами: они образовывали вязкие, клейкие растворы, свертывались при нагревании, при их высушивании получалась роговидная масса, при «анализе огнем» ощущался запах паленой шерсти или рога и выделялся аммиак. Поскольку все эти свойства ранее были известны для яичного белка, то новый класс веществ получил название белков.

В начале XIX в. появились более совершенные методы элементного анализа веществ и начались исследования элементного состава белков. В последних обнаружили углерод, водород, азот, кислород, серу и фосфор. Голландский химик и врач Г. Я. Мульдер (1802–1880) предложил первую теорию строения белков. Исходя из исследований элементного состава, Мульдер пришел к выводу, что все белки содержат одну или несколько групп (радикалов) $C_{40}H_{62}N_{10}O_2$, соединенных с серой или фосфором или с тем и другим вместе. Он предложил для обозначения этой группы термин «протеин» (от греч. *протейон* — первый), так как считал, что это вещество «без сомнения, важнейшее из всех известных тел органического царства, и без него, как кажется, не может быть жизни на нашей планете»*.

Представление о существовании такой группы скоро было опровергнуто, а значение термина «протеины» изменилось, и сейчас он применяется как синоним термина «белки».

Важную роль в изучении структуры белков сыграло развитие методов их разложения кислотами и пищеварительными соками. В 1820 г. А. Браконно (Франция) подвергал многочасовому действию серной кислоты кожу и другие ткани животных, затем нейтрализовал смесь, получал фильтрат, при выпаривании которого выпадали кристаллы вещества, названного им гликоколом («клеевым сахаром»). Это была первая аминокислота, выделенная из белков. Ее структурная формула установлена в 1846 г.

---

* Цит. по книге: Шамин А. Н. История химии белка. М.: Наука, 1977. С. 80.

К концу XIX в. из белков было выделено свыше десяти аминокислот. Исходя из результатов изучения продуктов гидролиза белков, немецкий химик Э. Фишер (1852–1919) предположил, что белки построены из аминокислот. Это положение послужило основанием для его многолетних исследований химии аминокислот и белков, завершившихся созданием в начале XX в. пептидной теории строения белков. В результате работ Э. Фишера стало ясно, что белки представляют собой линейные полимеры α-аминокислот, соединенных друг с другом амидной (пептидной) связью, а все многообразие представителей этого класса соединений могло быть объяснено различиями аминокислотного состава и порядка чередования разных аминокислот в цепи полимера. Однако эта точка зрения не сразу получила всеобщее признание: еще в течение трех десятилетий появлялись иные теории строения белков, в частности такие, которые основывались на представлении, что аминокислоты не являются структурными элементами белков, а образуются как вторичные продукты при разложении белков в присутствии кислот или щелочей.

Первые исследования белков проводились со сложными белковыми смесями, такими, как яичный белок, сыворотка крови, экстракты из растительных и животных тканей, а подчас и цельные ткани. Лишь в конце XIX в. получили распространение методы разделения белков с помощью осаждения нейтральными солями. В 30-е годы XX в. были получены первые белки в кристаллическом состоянии. Получение вещества в кристаллическом виде служит одним из надежных доказательств чистоты (гомогенности) препарата. В частности, в 1926 г. Д. Самнер выделил из семян канавалии белок (фермент) уреазу в кристаллическом состоянии; Д. Нортроп и М. Кунитц в 1930–1931 гг. получили кристаллы пепсина и трипсина. После этих пионерских работ выделение индивидуальных белков стало частым событием в истории биохимии, особенно после 50-х годов, когда начали применять современные методы фракционирования — хроматографию на гидрофильных ионообменниках, гель-фильтрацию («молекулярное просеивание»), новые методы электрофореза и др.

На современном этапе изучения белков основными направлениями являются следующие:

1) изучение пространственной структуры индивидуальных белков;
2) изучение механизмов функционирования индивидуальных белков (на уровне отдельных атомов и атомных групп молекулы белка);
3) изучение интегративной функции наборов белков, характерных для тех или иных субклеточных структур или типов клеток, а также для интегральных биохимических систем более высокого уровня, вплоть до целого организма и популяции организмов.

ПЕПТИДНЫЙ ОСТОВ БЕЛКОВ

Аминокислоты белков

Мономерами белков служат α-аминокислоты, общим признаком которых является наличие карбоксильной группы и аминогруппы у второго углеродного атома (α-углеродный атом) — рис. 1.1.

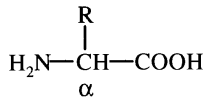


Рис. 1.1. Строение α-аминокислот

Обычно в белках обнаруживают 20 различных аминокислот (табл. 1.1), считая и пролин, который, если говорить точно, является иминокислотой. Все земные организмы используют эти 20 аминокислот для построения своих белков.

В некоторых белках есть и другие, редко встречающиеся аминокислоты. Например, в коллагене содержатся гидроксипролин и гидроксилизин; в протромбине (белок, участвующий в свертывании крови) содержится γ-карбоксиглутаминовая кислота (рис. 1.2). Редкие аминокислоты образуются из обычных уже после их включения в состав белковой молекулы.

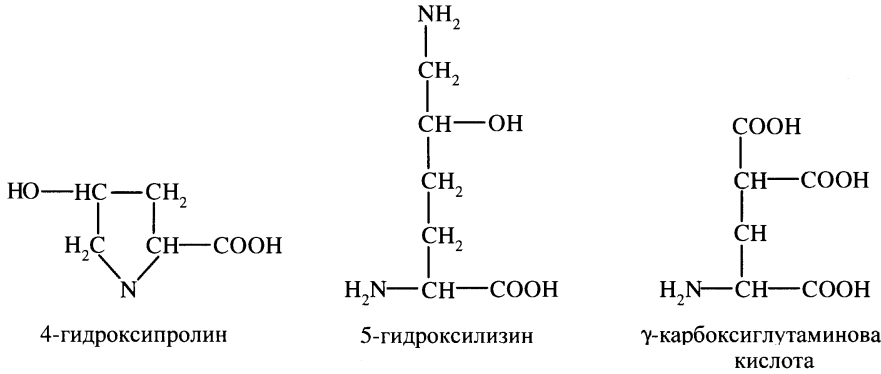


Рис. 1.2. Редко встречающиеся аминокислоты белков

Встречающиеся в живой природе α-аминокислоты, как правило, имеют L-конфигурацию. Однако в клетках многих микроорганизмов есть и D-аминокислоты, в частности в веществе клеточной стенки и в составе некоторых антибиотиков.

В водной среде аминокислоты находятся в ионизированной форме. При pH=7, характерном для жидкостей организма, ионизированы α-аминогруппы и α-карбоксильные группы всех аминокислот, ω-карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот, ε-аминогруппа лизина. Гистидин, аргинин и пролин образуют ионизированные формы, приведенные на рис. 1.3.

Рис. 1.3. Ионизированные формы аргинина, гистидина и пролина

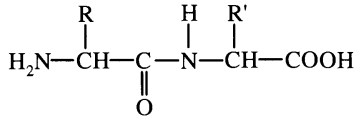
Таблица 1.1. Основные аминокислоты белков

Аминокислоты	Символы*		Строение боковой цепи
	русск.	лат.	
Алифатические			
Глицин	Гли	Gly, G	—H
Аланин	Ала	Ala, A	$—CH_3$
Валин	Вал	Val, V	$—CH(CH_3)_2$
Лейцин	Лей	Leu, L	$—CH_2—CH(CH_3)_2$
Изолейцин	Иле	Ile, I	$—CH(CH_3)—CH_2—CH_3$
Гидроксиаминокислоты			
Серин	Сер	Ser, S	$—CH_2—OH$
Треонин	Тре	Thr, T	$—CH(OH)—CH_3$
Дикарбоксильные			
Аспарагиновая кислота	Асп	Asp, D	$—CH_2—COOH$
Глутаминовая кислота	Глу	Glu, E	$—CH_2—CH_2—COOH$
Амиды дикарбоксильных аминокислот			
Аспарагин	Асн	Asn, N	$—CH_2—CONH_2$
Глутамин	Глн	Gln, Q	$—CH_2—CH_2—CONH_2$
Аминокислоты с катионообразующими группами в боковых цепях			
Гистидин	Гис	His, H	$—CH_2$ (имидазол)
Лизин	Лиз	Lys, K	$—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—NH_2$
Аргинин	Арг	Arg, R	$—CH_2—CH_2—CH_2—NH—C(=NH)—NH_2$
Серосодержащие аминокислоты			
Цистеин	Цис	Cys, C	$—CH_2—SH$
Метионин	Мет	Met, M	$—CH_2—CH_2—S—CH_3$
Ароматические аминокислоты			
Фенилаланин	Фен	Phe, F	$—CH_2$ (фенил)
Тирозин	Тир	Tyr, Y	$—CH_2$ (фенол) —OH
Триптофан	Три	Trp, W	$—CH_2$ (индол)
Иминокислота			
Пролин (формула приведена полностью)	Про	Pro, P	(пирролидин) —COOH

* Трехбуквенные и однобуквенные символы применяются для обозначения аминокислотной последовательности в пептидах и белках.

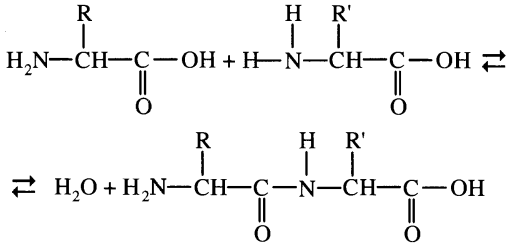
Пептидная связь

α-карбоксильная группа одной аминокислоты и α-аминогруппа другой аминокислоты могут образовать амидную связь, соединяя остатки аминокислот друг с другом:

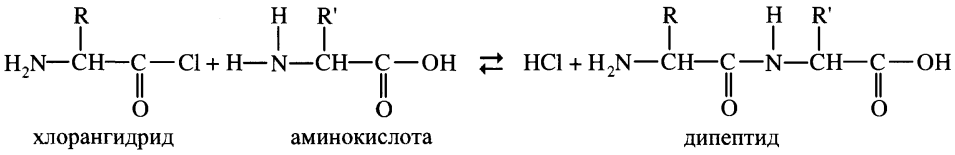


Эта амидная связь называется пептидной связью, а молекулы, в которых аминокислоты соединены пептидными связями, называют пептидами (дипептиды, трипептиды и т. д.; олигопептиды; полипептиды).

Образование пептидной связи можно представить как отщепление воды от взаимодействующих карбоксильной группы и аминогруппы:



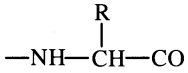
В водной среде равновесие этой реакции сдвинуто в сторону образования свободных аминокислот, т. е. происходит гидролиз пептидов. Синтез пептидов как в химических лабораториях, так и в живой клетке осуществляется непрямым путем. Например, можно аминокислоты сначала превратить в хлорангидриды, а из них уже получить пептиды:



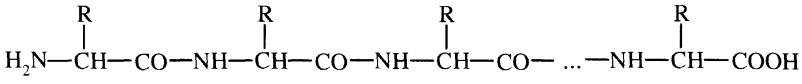
Именно таким путем Э. Фишер синтезировал пептиды, содержащие до 20 аминокислот, последовательно соединенных друг с другом. Эти вещества по свойствам были сходны с белками и с продуктами частичного гидролиза белков, что послужило одним из важнейших доказательств пептидной теории строения белков.

В настоящее время разработаны методы синтеза, в принципе позволяющие получать пептиды любой длины и любой заданной структуры. Синтез белков в живой клетке описан в гл. 4.

В молекулах белков многократно повторяется группа



образуя остов пептидной цепи:



Этот пептидный остов — структура, свойственная всем белкам. В каждом пептиде один из двух концевых аминокислотных остатков имеет свободную α-аминогруппу (N-концевая аминокислота), а другой — свободную α-карбоксильную группу (С-концевая аминокислота). Структуру пептидов принято изображать, начиная с N-концевой аминокислоты; с нее же начинается нумерация аминокислотных остатков. При этом аминокислотные остатки обозначаются символами. Например:

Ala–Tyr–Leu–Ser–Tyr–...–Cys
1 2 3 4 5 *n*

Эта запись изображает пептид, в котором свободная α-аминогруппа принадлежит остатку аланина (N-конец), а свободная α-карбоксильная группа — остатку цистеина (С-конец). При чтении такой записи окончания названий всех аминокислот, за исключением последней, изменяются на *-ил*. Например, название трипептида Ala–Tyr–Leu читается так: аланил-тирозил-лейцин.

Специфические особенности разных пептидов и белков определяются длиной пептидной цепи (соответственно, и молекулярной массой), различиями аминокислотного состава и порядком чередования аминокислотных остатков (т. е. радикалов R пептидного остова).

Длина пептидной цепи в пептидах и белках, встречающихся в организме, колеблется в широких пределах — от двух (дипептиды) до сотен, а иногда и до тысяч аминокислотных остатков. Например, пептидная цепь фибронектина (один из белков базальных мембран) содержит около 1700 аминокислотных остатков. Собственно белками называют полипептиды из двух-трех десятков аминокислот или более.

Аминокислотный состав индивидуальных белков

Даже при одинаковой длине пептиды являются разными веществами, если они различаются по аминокислотному составу. Например, сравним два декапептида: каллидин и ангиотензин I:

Lys–Arg–Pro–Pro–Gly–Phe–Ser–Pro–Phe–Arg	Asp–Arg–Val–Tyr–Ile–His–Pro–Phe–His–Leu
каллидин	ангиотензин I

В первом из них есть остатки лизина, глицина и серина, которых нет во втором. В то же время во втором есть остатки изолейцина, аспарагиновой кислоты и тирозина, которых нет в первом. Эти два вещества существенно различаются по химическим свойствам и разительно — по биологическим свойствам: каллидин — это гормон местного действия, регулирующий тонус кровеносных сосудов и проницаемость капилляров, а ангиотензин I физиологически нейтрален,

но служит предшественником другого пептида — ангиотензина II, регулирующего кровяное давление.

Для определения аминокислотного состава белки (пептиды) подвергают гидролизу:

$$H_2N-\underset{}{\overset{R}{\overset{|}{CH}}}-CO-(NH-\overset{R}{\overset{|}{CH}}-CO)_n-NH-\overset{R}{\overset{|}{CH}}-COOH + (n-1)H_2O = (n)H_2N-\overset{R}{\overset{|}{CH}}-COOH$$

В нейтральной среде эта реакция протекает очень медленно, но ускоряется в присутствии кислот и щелочей. Обычно гидролиз белков проводят в запаянной ампуле в растворе соляной кислоты (6 моль/л) при 105 °С; в таких условиях полный распад происходит примерно за сутки. Затем аминокислоты гидролизата разделяют методом хроматографии на ионообменных смолах, выделяя отдельно каждую аминокислоту.

Для обнаружения аминокислот во фракциях, получаемых при хроматографии, используют реакцию с нингидрином (рис. 1.4).

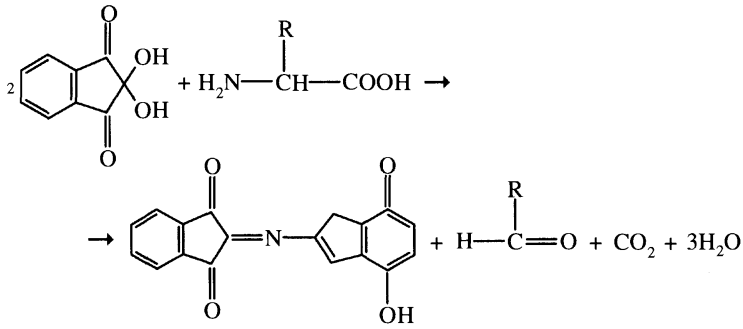


Рис. 1.4. Реакция нингидрина с аминокислотами

В этой реакции бесцветный нингидрин превращается в продукт красно-фиолетового цвета. Измерив интенсивность окрашивания, можно рассчитать концентрацию каждой аминокислоты в гидролизате и число остатков каждой из аминокислот в исследуемом белке. Такой анализ проводят с помощью автоматических приборов — аминокислотных анализаторов (рис. 1.5). В прибор загружают гидролизат белка, и все остальные операции производятся автоматически. Результат анализа прибор выдает в виде графика концентраций отдельных аминокислот.

Частота, с какой разные аминокислоты встречаются в белках, неодинакова. Например, глицин обнаруживается в 10 раз чаще, чем триптофан: из каждой тысячи аминокислотных остатков в белках на долю глицина приходится около 70, на долю триптофана — около 7. Остальные аминокислоты по частоте нахождения в белках занимают промежуточное положение, образуя такой ряд: (аланин ≈ валин ≈ лейцин ≈ серин) > (глутаминовая кислота ≈ глутамин ≈ лизин ≈ аргинин ≈ пролин) > (аспарагиновая кислота ≈ аспарагин ≈ изолейцин ≈ треонин ≈ фенилаланин) > (тирозин ≈ цистеин ≈ метионин ≈ гистидин). В табл. 1.2 приведен аминокислотный состав некоторых белков.

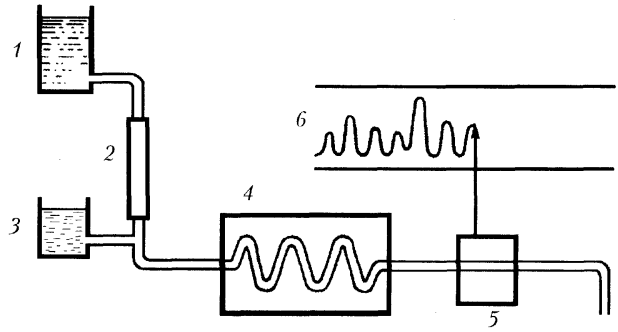


Рис. 1.5. Схема аминокислотного анализатора:

1 — элюирующий раствор (буфер с переменным pH); *2* — хроматографическая колонка (в верхнюю часть колонки вносят гидролизат белка, затем начинают элюирование); *3* — раствор нингидрина; *4* — водяная баня (подогревание необходимо для ускорения реакции нингидрина с аминокислотами); *5* — фотометр и записывающее устройство; *6* — хроматограмма; каждый пик соответствует одной аминокислоте, а площадь пика пропорциональна концентрации этой аминокислоты в гидролизате

Таблица 1.2. Аминокислотный состав некоторых белков (число аминокислотных остатков на молекулу белка)

Аминокислота	Кортикотропин	Цитохром *c*	Миоглобин	Лютеинизирующий гормон	Тромбин	Фосфорилаза гликогена
Глицин	3	13	15	10	24	48
Аланин	3	6	12	11	12	63
Валин	3	3	7	18	19	62
Лейцин	1	6	17	12	20	79
Серин	3	2	7	14	15	29
Глутаминовая кислота	4	8	14	8	12	64
Глутамин	1	3	7	8	8	31
Лизин	4	18	20	9	19	48
Аргинин	3	2	2	13	18	63
Пролин	4	4	5	23	13	36
Аспарагиновая кислота	2	3	3	8	14	51
Аспарагин	0	4	8	5	14	45
Изолейцин	0	8	8	6	15	49
Треонин	0	7	4	15	11	35
Фенилаланин	3	3	7	5	9	38
Тирозин	2	5	2	6	11	36
Цистеин	0	2	0	22	6	9
Метионин	1	3	3	4	7	21
Гистидин	1	3	9	6	5	22
Триптофан	1	1	2	1	7	12
Всего...	39	104	152	205	259	841

Большинство белков по аминокислотному составу различаются не очень резко. Но есть некоторые специализированные белки с особенным аминокислотным составом. Например, основной белок соединительной ткани коллаген на $^1/_3$

построен из остатков глицина, около $^1/_5$ приходится на остатки пролина и оксипролина. В хромосомах содержатся белки гистоны, примерно на $^1/_3$ построенные из остатков лизина и аргинина.

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ

Первичной структурой называют порядок чередования (последовательность) аминокислотных остатков в белке. Даже идентичные по длине и аминокислотному составу пептиды могут быть разными веществами. Например, из двух аминокислот — аланина и тирозина — можно построить два пептида: Ala—Tyr и Tyr—Ala. Из трех аминокислот можно получить шесть различных по первичной структуре трипептидов. Число изомеров полипептида, построенного из n разных аминокислот, равно числу перестановок из n элементов, т. е. $n!$ При $n = 20$ число возможных изомеров равно $2 \cdot 10^{18}$. Если учесть, что в составе пептидной цепи каждая из аминокислот может встречаться больше одного раза, то число изомеров становится невообразимым. Возможность составления разных белков из аминокислот так же неисчерпаема, как возможность составления разных фраз из букв алфавита. Однако в живой природе реализуются не все эти возможности. В организме человека, по приближенным оценкам, имеется около 50 000 разных белков.

Первичную структуру белка можно изучать с помощью фенилтиогидантоинового метода. Он основан на реакции фенилизотиоцианата (ФИТЦ) с α-аминокислотами, в которой образуются фенилтиогидантоины аминокислот (ФТГ-аминокислоты, рис. 1.6).

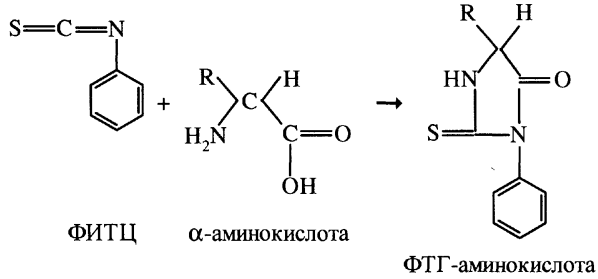


Рис. 1.6. Реакция фенилизотиоцианата с α-аминокислотами

Фенилизотиоцианат реагирует не только со свободными аминокислотами, но и с N-концевой аминокислотой пептидов, отщепляя ее от пептида. Если, например, анализируют тетрапептид k—l—m—n, то реакция проходит следующим образом:

ФИТЦ + k—l—m—n → ФТГ—k + l—m—n.

После реакции выделяют ФТГ—k и идентифицируют его; допустим, он оказался фенилтиогидантоином аланина. Теперь мы можем записать последовательность исследуемого тетрапептида так: Ala—l—m—n. Затем таким же образом исследуют оставшийся после первой реакции трипептид l—m—n и узнают второй аминокислотный остаток, и т. д. Созданы автоматические приборы — секвенаторы, позволяющие с использованием этой реакции изучать первичную структуру

пептидов длиной до нескольких десятков аминокислотных остатков. Более крупные белки сначала фрагментируют, изучают структуру отдельных фрагментов, а затем выясняют последовательность фрагментов в исходной белковой молекуле.

Один из методов фрагментирования основан на применении бромциана (CNBr). Это вещество избирательно расщепляет пептидную связь, образованную

```
                                                                10
Ala - Pro - Pro - Ser - Val - Phe - Ala - Glu - Val - Pro - Gln - Ala - Gln - Pro - Val - Leu - Val -
            20                                                              30
Phe - Lys - Leu - Ile - Ala - Asp - Phe - Arg - Glu - Asp - Pro - Asp - Pro - Arg - Lys - Val - Asn -
                                40                                                          50
Leu - Gly - Val - Gly - Ala - Tyr - Arg - Thr - Asp - Asp - Cys - Gln - Pro - Trp - Val - Leu - Pro -
                                                    60
Val - Val - Arg - Lys - Val - Glu - Gln - Arg - Ile - Ala - Asn - Asn - Ser - Ser - Leu - Asn - His -
        70                                                          80
Glu - Tyr - Leu - Pro - Ile - Leu - Gly - Leu - Ala - Glu - Phe - Arg - Thr - Cys - Ala - Ser - Arg -
                        90                                                          100
Leu - Ala - Leu - Gly - Asp - Asp - Ser - Pro - Ala - Leu - Gln - Glu - Lys - Arg - Val - Gly - Gly -
                                            110
Val - Gln - Ser - Leu - Gly - Gly - Thr - Gly - Ala - Leu - Arg - Ile - Gly - Ala - Glu - Phe - Leu -
120                                                         130
Ala - Arg - Trp - Tyr - Asn - Gly - Thr - Asn - Asn - Lys - Asp - Thr - Pro - Val - Tyr - Val - Ser -
                140                                                         150
Ser - Pro - Thr - Trp - Glu - Asn - His - Asp - Gly - Val - Phe - Thr - Thr - Ala - Gly - Phe - Lys -
                                    160                                                             170
Asp - Ile - Arg - Ser - Tyr - Arg - Tyr - Trp - Asp - Thr - Glu - Lys - Arg - Gly - Leu - Asp - Leu -
                                                        180
Gln - Gly - Phe - Leu - Ser - Asp - Leu - Glu - Asn - Ala - Pro - Glu - Phe - Ser - Ile - Phe - Val -
            190                                                             200
Leu - His - Ala - Cys - Ala - His - Asn - Pro - Thr - Gly - Thr - Asp - Pro - Thr - Pro - Glu - Gln -
                                210                                                         220
Trp - Lys - Gln - Ile - Ala - Ser - Val - Met - Lys - Arg - Arg - Phe - Leu - Phe - Pro - Phe - Phe -
                                                    230
Asp - Ser - Ala - Tyr - Gln - Gly - Phe - Ala - Ser - Gly - Asn - Leu - Glu - Lys - Asp - Ala - Trp -
        240                                                         250
Ala - Ile - Arg - Tyr - Phe - Val - Ser - Glu - Gly - Phe - Glu - Leu - Phe - Cys - Ala - Gln - Val -
                        260                                                         270
Phe - Ser - Lys - Asn - Phe - Gly - Leu - Tyr - Asn - Glu - Arg - Val - Gly - Asn - Leu - Thr - Lys -
                                            280
Val - Ala - Lys - Glu - Pro - Asp - Ser - Ile - Leu - Arg - Val - Leu - Ser - Gln - Met - Gln - Val -
290                                                         300
Ile - Val - Arg - Val - Thr - Trp - Ser - Asn - Pro - Pro - Ala - Gln - Gly - Ala - Arg - Ile - Val -
                310                                                         320
Ala - Arg - Thr - Leu - Ser - Asp - Pro - Glu - Leu - Phe - His - Glu - Trp - Thr - Gly - Asn - Arg -
                                    330                                                             340
Lys - Thr - Met - Ala - Asp - Arg - Ile - Leu - Ser - Met - Arg - Ser - Glu - Leu - Arg - Ala - Arg -
                                                        350
Leu - Glu - Ala - Leu - Lys - Thr - Pro - Gly - Thr - Trp - Asn - His - Ile - Thr - Asp - Gln - Ile -
            360                                                             370
Gly - Met - Phe - Ser - Phe - Thr - Gly - Leu - Asn - Pro - Lys - Gln - Val - Glu - Tyr - Leu - Ile -
                                380                                                         390
Asn - Glu - Lys - His - Ile - Tyr - Leu - Leu - Pro - Ser - Gly - Arg - Ile - Asn - Met - Cys - Gly -
                                                    400
Leu - Thr - Thr - Lys - Asn - Leu - Asp - Tyr - Val - Ala - Thr - Ser - Ile - His - Glu - Ala - Val -
        410
Thr - Lys - Ile - Gln
```

Рис. 1.7. Первичная структура аспартатаминотрансферазы

карбоксильной группой метионина и аминогруппой любой другой аминокислоты. При обработке бромцианом в молекуле белка разрушаются все такие связи и образуется соответствующее число фрагментов. Для фрагментирования применяют также некоторые ферменты, избирательно гидролизующие определенные пептидные связи.

На рис. 1.7 представлена первичная структура белка (фермента) аспартатаминотрансферазы, выясненная в лабораториях Ю. А. Овчинникова и А. Е. Браунштейна.

Даже небольшие изменения первичной структуры могут значительно изменять свойства белка. В эритроцитах здоровых людей содержится гемоглобин А (HbA), в котором есть фрагмент с такой последовательностью аминокислот:

Val–His–Leu–Thr–Pro–Glu–Glu–Lys–Ser– ...
1 2 3 4 5 6 7 8 9

Небольшая часть людей имеет врожденную аномалию структуры гемоглобина: их эритроциты содержат HbS, который в шестом положении вместо глутаминовой кислоты содержит валин. Такой гемоглобин существенно отличается по физико-химическим и биологическим свойствам от нормального; дети, родившиеся с этой аномалией, в раннем возрасте погибают от серповидноклеточной анемии (подробнее об этой болезни см. в гл. 5).

С другой стороны, возможны варианты первичной структуры белка, никак не сказывающиеся на его функциональных свойствах. Например, HbC представляет собой вариант HbA, содержащий в шестом положении лизин вместо глутаминовой кислоты; HbC почти не отличается по свойствам от HbA, и люди, имеющие в эритроцитах HbC, практически здоровы.

КОНФОРМАЦИЯ ПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ В БЕЛКАХ

Пептидная цепь обладает значительной гибкостью. В результате внутрицепочечных взаимодействий она приобретает определенную пространственную структуру (конформацию). Основным методом изучения трехмерной структуры белков служит рентгеноструктурный анализ. Он основан на дифракции и интерференции рентгеновских лучей, проходящих через кристалл изучаемого вещества. Молекулы, а следовательно, и атомы, входящие в эти молекулы, в кристалле занимают фиксированное положение. Рентгеновы лучи при прохождении через кристалл поглощаются электронами, которые сами становятся вторичными излучателями. Вторичные лучи испускаются равномерно по всем направлениям, но в некоторых направлениях происходит их усиление в результате интерференции. На фотопленке, помещенной за кристаллом, после проявления обнаруживается засвеченное пятно в центре от пучка нерассеянных лучей,

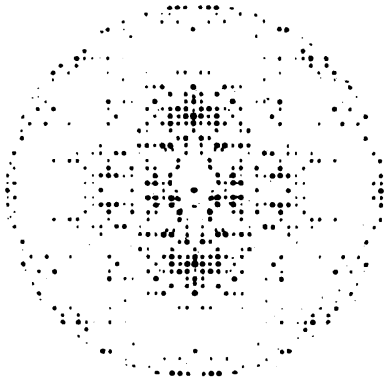


Рис. 1.8. Рентгенограмма аспартатаминотрансферазы

вокруг которого в определенном порядке располагается много других засвеченных пятен разной интенсивности (рис. 1.8). Расположение и интенсивность этих пятен зависят от распределения скоплений электронов в кристалле. Поскольку скопления электронов имеются в атомах, то можно сказать, что расположение пятен определяется расположением атомов в анализируемом кристалле. С помощью серии таких рентгенограмм можно рассчитать положение каждого атома в кристалле, а следовательно, и пространственное расположение аминокислотных остатков в молекуле белка (рис. 1.9).

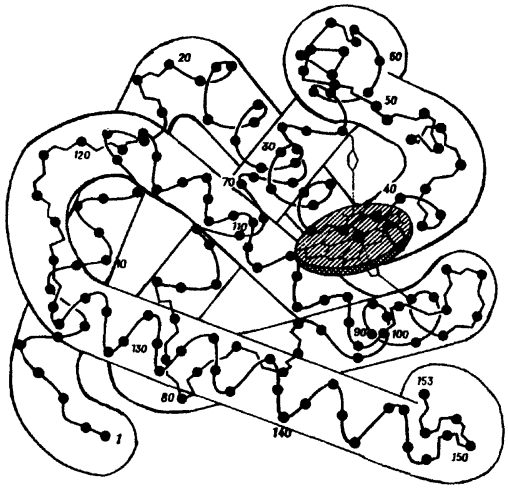
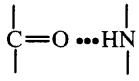


Рис. 1.9. Пространственная структура миоглобина (диск — гем). Указаны номера каждого десятого аминокислотного остатка

В белках различают два уровня конформации пептидных цепей — вторичную и третичную структуры.

Вторичная структура белков

Вторичная структура белков обусловлена прежде всего свойствами пептидного остова. Карбонильная группа и NH-группа способны образовывать водородную связь между собой:



Минимуму свободной энергии соответствует такое состояние пептида, когда все эти группы связаны водородной связью. Иначе говоря, пептид стремится принять конформацию с максимумом водородных связей. С другой стороны, возможности пространственной укладки пептидной цепи ограничиваются тем, что пептидная связь имеет частично двойной характер, и поэтому вращение вокруг нее невозможно. Атомы кислорода и водорода пептидной группы занимают транспоположение. Напротив, вокруг обеих связей группы –CH– пептидного остова возможно свободное вращение (рис. 1.10).

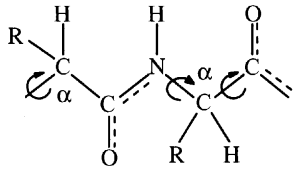


Рис. 1.10. Свойства пептидной группы

Вследствие этих ограничений при образовании водородных связей пептидная цепь принимает не произвольную, а строго определенную конформацию.

Известны три основных типа вторичной структуры пептидных цепей: α-спираль, β-структура (складчатый слой, складчатый листок) и беспорядочный клубок.

α-спираль

В α-спирали NH-группа данного остатка аминокислоты взаимодействует с CO-группой четвертого от него остатка. В результате пептидный остов образует спираль, на каждый виток которой приходится 3,6 аминокислотного остатка. Водородные связи ориентированы вдоль оси спирали, соединяя ее витки (рис. 1.11).

β-структура

В β-структуре (синоним — складчатый слой) сегменты пептидной цепи располагаются параллельно или антипараллельно друг другу в один слой, образуя фигуру, подобную листу, сложенному гармошкой (рис. 1.12). Слой может быть образован двумя или большим количеством пептидных цепей; смежные сегменты цепи в слое могут быть ориентированы N-концами в одну сторону (параллельно) или в противоположные стороны (антипараллельно).

Как уже отмечено, вторичная структура белков определяется прежде всего свойствами пептидного остова. Однако ее образование зависит и от радикалов аминокислот. Аминокислоты различаются по способности участвовать в образовании α-спиралей или β-структур. Пептидная связь, образуемая иминогруппой пролина, отличается от других пептидных связей тем, что у атома азота пептидной группы нет атома водорода (рис. 1.13). Следовательно, не может быть водородной связи, необходимой для образования вторичной структуры.

Редко встречаются в составе α-спиралей аспарагин, тирозин, глицин; в составе β-структур —

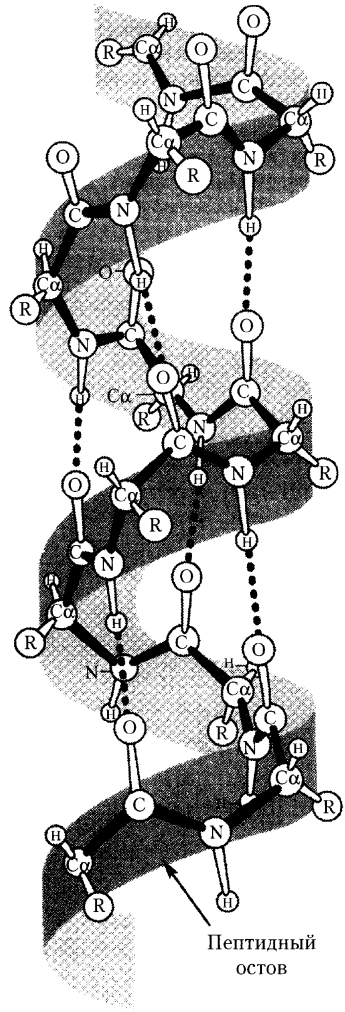


Рис. 1.11. Строение α-спирали

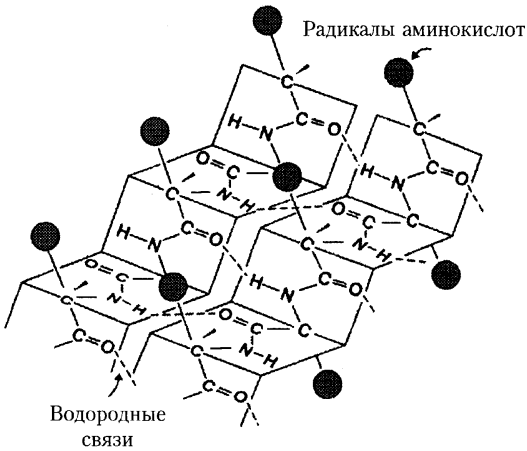


Рис. 1.12. Складчатый слой (β-структура)

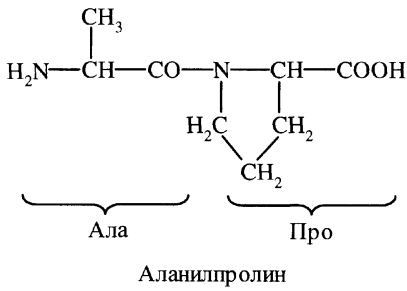


Рис. 1.13. Пептидная связь, образуемая пролином

глутаминовая кислота, аспарагин, гистидин, лизин, серин. Содержание α-спиралей и β-структур в разных белках неодинаково (табл. 1.3). Как можно видеть из таблицы, не вся пептидная цепь уложена в α-спирали или β-структуры.

Таблица 1.3. Встречаемость α-спиралей и β-структур в белках (число аминокислот, входящих в α-спирали и β-структуры, в % от общего числа аминокислот в белке)

Белок	α-спирали	β-структуры
Супероксиддисмутаза	0	70
Химотрипсин	14	45
Карбоангидраза	20	37
Тубулин	22	30
Рибонуклеаза	26	35
Карбоксипептидаза	38	17
Лизоцим	40	12
Лактатдегидрогеназа	45	20
Инсулин	52	6
Миоглобин	80	0
Тропомиозин	100	0

Беспорядочный клубок

Некоторые участки пептидной цепи не имеют какой-либо правильной, периодической пространственной организации: их обозначают как беспорядочный клубок. Однако такие участки в каждом белке имеют свою фиксированную конформацию, которая определяется аминокислотным составом этого участка, а также вторичной и третичной структурами смежных областей, окружающих «беспорядочный клубок». Тем не менее в областях беспорядочного клубка пептидная цепь может сравнительно легко изгибаться, изменять конформацию, в то время как спирали и складчатый слой представляют собой достаточно жесткие структуры.

Еще одна форма вторичной структуры обозначается как β-поворот. Эту структуру образуют 4 (или больше) аминокислотных остатка с водородной связью между первым и четвертым, причем таким образом, что пептидная цепь меняет направление на 180° (рис. 1.14). В результате β-поворота образуются антипараллельные сегменты пептидной цепи. β-поворот часто встречается как элемент β-структуры, а также между α-спиральными участками разной направленности.

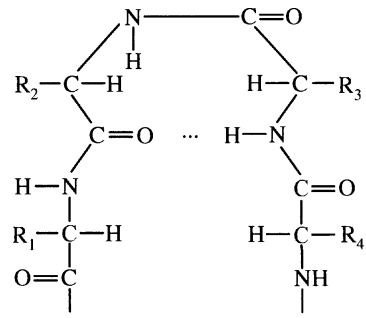


Рис. 1.14. β-поворот

Третичная структура глобулярных белков

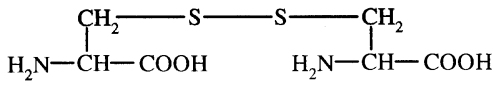
Глобулярные и фибриллярные белки

По форме молекулы и особенностям пространственной структуры белки делятся на две группы: глобулярные и фибриллярные. Форма глобулярных белков близка к сферической или эллипсоидной, с отношением короткой и длинной осей до 1:50. Молекулы фибриллярных белков имеют удлиненную форму и могут образовывать многомолекулярные нитевидные агрегаты — фибриллы. Фибриллярные белки выполняют главным образом опорные функции, обеспечивая прочность тканей; глобулярные белки несравненно более разнообразны по функциям. Существенны различия белков этих групп и по физико-химическим свойствам. Особенности строения и свойств фибриллярных белков подробнее описаны в одном из последующих разделов этой главы.

Третичная структура глобулярных белков образуется путем дополнительного складывания пептидной цепи, содержащей α-спирали, β-структуры и участки без периодической структуры. Это происходит прежде всего в результате взаимодействий между боковыми группами аминокислот.

Дисульфидная связь

Дисульфидная связь возникает за счет сульфгидрильных (тиоловых) групп цистеина. Соединение, получающееся в результате замыкания дисульфидной связи между двумя молекулами свободного цистеина, называют цистином:



Цистеиновые остатки пептидных цепей, связанные дисульфидной связью, называют полуцистиновыми остатками.

Образование дисульфидных связей приводит к тому, что удаленные друг от друга области пептида сближаются и фиксируются. Например, в молекуле рибонуклеазы имеется четыре дисульфидных связи, соединяющих попарно восемь полуцистиновых остатков так, что образуются фиксированные петли (рис. 1.15, *б*).

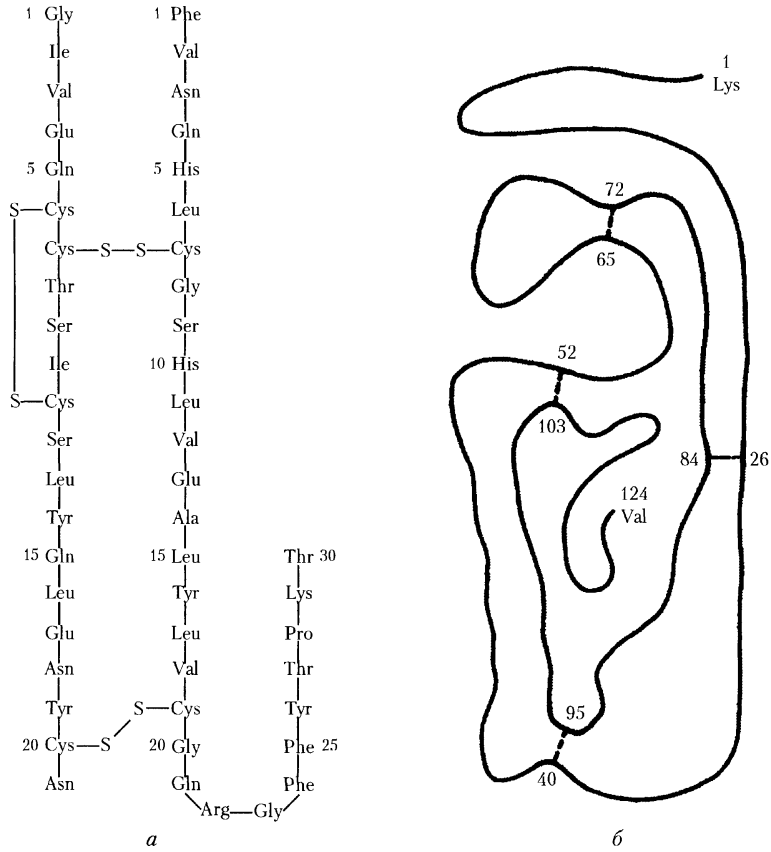


Рис. 1.15. Расположение дисульфидных связей в молекулах инсулина (*а*) и рибонуклеазы (*б*)

Дисульфидные связи могут быть и между разными полипептидными цепями, как, например, в инсулине (рис. 1.15, *а*).

При действии восстановителей дисульфидные связи легко разрушаются с образованием SH-групп. Дисульфидные связи имеются во многих белках, чаще в секретируемых, но не во всех белках. Так, их нет в миоглобине и гемоглобине.

Нековалентные межрадикальные связи в белках

Основную роль в образовании третичной структуры играют нековалентные взаимодействия между радикалами аминокислот — водородные, ионные, гидрофобные связи. Аминокислоты, входящие в белки, различаются по физико-химическим свойствам радикалов. Между аминокислотами с неполярными (гидрофобными) радикалами возможны гидрофобные взаимодействия; между полярными радикалами возникают водородные связи, а между заряженными полярными радикалами — ионные (рис. 1.16). Все эти связи относятся к числу слабых: их энергия в водной среде не слишком сильно превышает энергию теплового движения молекул при комнатной температуре, и поэтому их образование и разрушение — легкообратимые процессы.

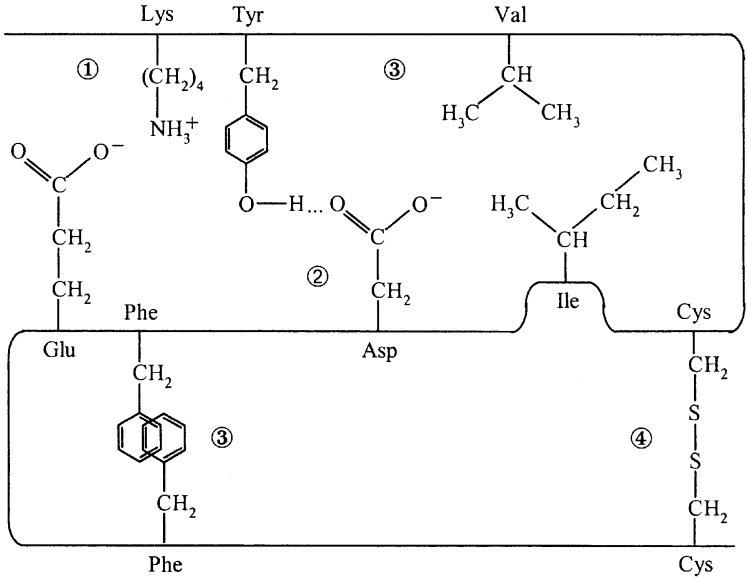


Рис. 1.16. Связи, стабилизирующие третичную структуру белков:
1 — ионные; *2* — водородные; *3* — гидрофобные; *4* — дисульфидные

В результате возникновения множества слабых связей между аминокислотными остатками все части пептидной цепи оказываются фиксированными относительно друг друга, образуя компактную структуру — глобулу. При этом α-спирали и β-структуры располагаются преимущественно внутри глобулы, а β-поворот и участки без периодической структуры — на поверхности глобулы.

Роль воды в образовании белковой глобулы

Значительная часть неполярных (гидрофобных) аминокислот оказывается погруженной во внутренние области глобулы, в то время как полярные (гидрофильные) аминокислоты располагаются преимущественно на поверхности глобулы, контактируя с водной фазой (табл. 1.4).

Таблица 1.4. Локализация разных аминокислот в белковой глобуле (порядок расположения аминокислот примерно соответствует убыванию гидрофобности или нарастанию гидрофильности их радикалов)

Аминокислоты	Доля погруженных аминокислот, %	
С неполярными радикалами	Изолейцин	60
	Фенилаланин	50
	Валин	54
	Лейцин	45
	Триптофан	27
	Метионин	40
	Аланин	38
	Глицин	36
	Пролин	18

Продолжение табл. 1.4

Аминокислоты	Доля погруженных аминокислот, %	
С полярными незаряженными радикалами	Цистеин	48
	Тирозин	15
	Треонин	23
	Серин	22
	Глутамин	12
	Аспарагин	7
С полярными заряженными радикалами	Гистидин	17
	Глутаминовая кислота	18
	Аспарагиновая кислота	15
	Лизин	3
	Аргинин	1

Такое распределение аминокислот объясняется в основном свойствами воды. Молекулы воды полярны и образуют водородные связи как между собой, так и с другими полярными молекулами (гидратация молекул). Неполярные молекулы не гидратируются. С другой стороны, внедрение неполярной молекулы в среду молекул воды требует разрыва водородных связей между молекулами воды. Поэтому возникают силы, стремящиеся уменьшить поверхность раздела между водной и неполярной фазой, что и приводит к объединению неполярных молекул между собой, а в случае белков — к «выжиманию» гидрофобных радикалов из водной среды внутрь глобулы.

Доля погруженных цистеиновых остатков тоже велика, хотя они и гидрофильны; это обусловлено тем, что многие из них участвуют в образовании дисульфидных связей.

Разнообразие свойств аминокислот вместе с различиями первичной структуры пептидных цепей создают возможность неисчерпаемого количества разных конформаций на уровне третичной структуры. Характер пространственной укладки определяется аминокислотным составом и чередованием аминокислот в пептидной цепи. Следовательно, конформация пептидной цепи (пространственная структура) является такой же специфической характеристикой данного белка, как и первичная структура. Некоторые примеры пространственной структуры белков приведены на рис. 1.17.

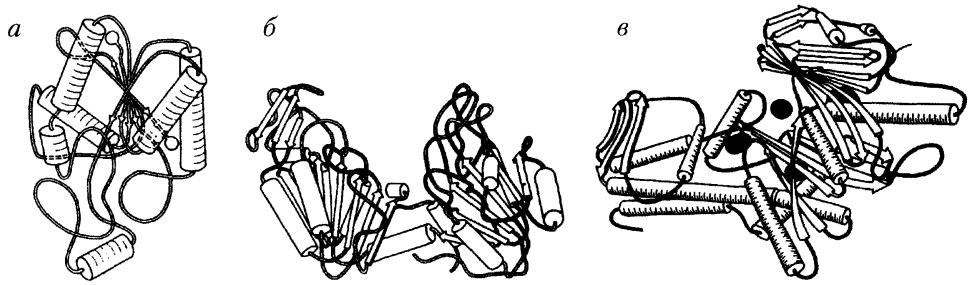


Рис. 1.17. Пространственная структура некоторых белков:

а — фосфоглицератмутаза; *б* — фосфоглицераткиназа; *в* — гексокиназа; цилиндры (*а, б, в*) или спирали (*г*) — α-спирали, стрелки — складчатые слои

Доменная структура белков

Длинные полипептидные цепи (длиной около 200 аминокислотных остатков или больше) обычно имеют доменную пространственную структуру. Доменом называют часть пептидной цепи, образующей как бы самостоятельную глобулу, причем на одной пептидной цепи может быть два или больше доменов. Домены в одном белке могут быть одинаковыми или различными как по структуре, так и по функции. Часто домен по своей структуре и свойствам сходен с отдельным глобулярным белком. На рис. 1.17, *б* представлена молекула, в которой два крупных, четко различимых домена.

Супервторичные структуры белков

Нередко в белках, различающихся по структуре и функции, встречаются однотипные сочетания α- и β-структур (структурные мотивы), обозначаемые как супервторичная структура. На рис. 1.18, *а* представлен домен молекулы фермента пируваткиназы, имеющий супервторичную структуру типа бочонка (она есть и в некоторых других белках). В этом домене 8 α-спиральных участков образуют «бочонок», внутри которого находятся 8 β-структурных участков. Многие ферменты содержат домен, в центре которого расположены β-структурные участки в виде скрученного листа, и α-спирали, расположенные по периферии домена (рис. 1.18, *б*). Характерные супервторичные структуры имеются в белках, связывающихся с ДНК (см. гл. 4).

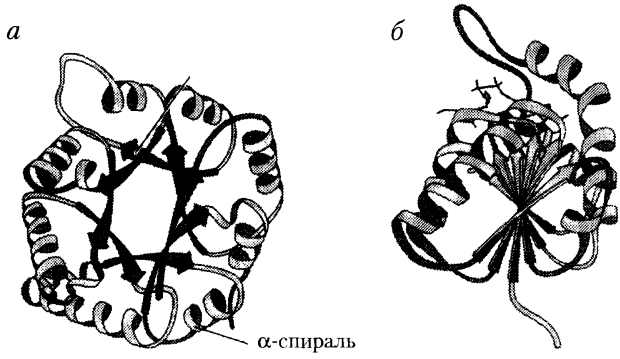


Рис. 1.18. Супервторичная структура:

а — структура типа бочонка в одном из доменов пируваткиназы; *б* — скрученный β-слой и α-спирали, расположенные по периферии

Изменения конформации белковых молекул

Белковая глобула не является абсолютно жесткой структурой: в известных пределах возможны обратимые перемещения частей пептидной цепи относительно друг друга с разрывом небольшого числа слабых связей и образованием новых. Молекула в растворе как бы пульсирует в разных своих частях. Эти изменения можно рассматривать как тепловое (броуновское) движение отдельных участков пептидной цепи. Они не нарушают основного плана конформации молекулы,

подобно тому, как тепловые колебания атомов в кристалле не изменяют структуру кристалла, если температура не настолько велика, что наступает плавление.

Небольшие изменения конформации белковых молекул происходят и при взаимодействии их с другими молекулами. Например, конформация гемоглобина с присоединенным к нему кислородом немного отличается от конформации гемоглобина в отсутствие кислорода. Поскольку в глобуле аминокислоты связаны друг с другом как пептидными связями, так и множеством других связей, белковая молекула обладает кооперативными свойствами, т. е. отвечает на воздействие как единое целое: изменение в одной части молекулы приводит к изменениям во всех других частях. Это можно сравнить с изменением формы резинового мяча при надавливании на него в одном месте (рис. 1.19). Конформационные изменения белков имеют важное значение при их функционировании в живой клетке.

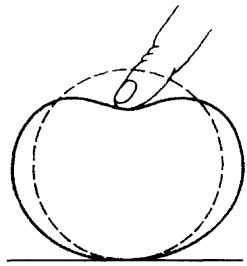


Рис. 1.19. Кооперативное изменение формы мяча

Денатурация белков

При разрыве большого числа связей, стабилизирующих пространственную структуру белковой молекулы, упорядоченная, уникальная для каждого белка конформация пептидной цепи нарушается, и молекула целиком или в значительной части принимает форму случайного беспорядочного клубка (случайного в том смысле, что каждая молекула данного индивидуального белка по конформации может отличаться от всех других молекул).

Такое изменение белка называют денатурацией (рис. 1.20). Денатурацию можно вызвать нагреванием до 60–80 °С или действием других агентов, разрушающих нековалентные связи в белках. Денатурация происходит на поверхности раздела фаз, в кислых или, наоборот, щелочных средах, при действии ряда органических соединений — спиртов, фенолов и др.; часто для денатурации применяют мочевину или гуанидинхлорид. Эти вещества образуют слабые связи (водородные, ионные, гидрофобные) с аминогруппами или карбонильными группами пептидного остова и с некоторыми группами радикалов аминокислот, подменяя собственные внутримолекулярные водородные связи в белке, вследствие чего вторичная и третичная структуры изменяются.

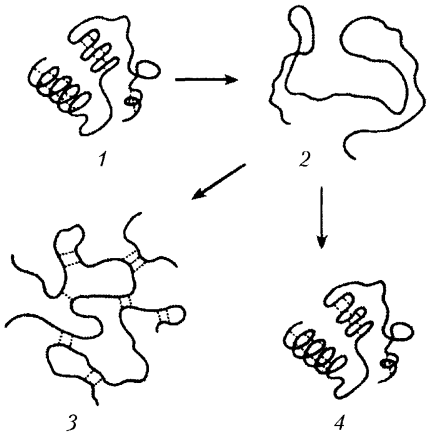


Рис. 1.20. Денатурация и ренативация белков:

1 — нативный белок; *2* — при нагревании внутрицепочечные слабые связи разрываются; *3* — при быстром охлаждении образуются в произвольном порядке как внутрицепочечные, так и межцепочечные связи; *4* — при медленном охлаждении возможна ренативация белка

Устойчивость к денатурирующим агентам в большой мере зависит от наличия дисульфидных связей в молекуле белка. В ингибиторе трипсина (панкреатический белок) есть три S — S-связи. Если их восстановить, то происходит денатурация без других денатурирующих воздействий. Если затем белок поместить в окислительные условия, в которых происходит окисление SH-групп цистеина и образование дисульфидных связей, то исходная конформация восстанавливается. Даже единственная дисульфидная связь существенно повышает стабильность пространственной структуры.

Денатурация обычно сопровождается снижением растворимости белка; при этом часто образуется осадок «свернувшегося белка», а если концентрация белков в растворе достаточно велика, то «свертывается» вся масса раствора, как это происходит при варке куриного яйца. При денатурации утрачивается биологическая активность белков. На этом основано применение водного раствора фенола (карболовая кислота) в качестве антисептика.

Лабильность пространственной структуры белков и большая вероятность их денатурации при разнообразных воздействиях создают значительные затруднения при выделении и изучении белков, а также при их использовании в медицине и промышленности.

В определенных условиях при медленном охлаждении раствора денатурированного нагреванием белка происходит ренативация — восстановление исходной (нативной) конформации (см. рис. 1.20, *4*). Это подтверждает, что характер укладки пептидной цепи определяется первичной структурой белка. Процесс образования нативной конформации белка самопроизвольный, т. е. эта конформация отвечает минимуму свободной энергии молекулы. Можно сказать, что пространственная структура белка закодирована в аминокислотной последовательности пептидных цепей. Это означает, что все идентичные по чередованию аминокислот полипептиды (например, пептидные цепи миоглобина) будут принимать идентичную же конформацию. Однако из этого правила есть исключения. Капсид (оболочка) вируса кустистости томатов содержит белок, построенный из субъединиц A, B и C; первичная структура этих субъединиц идентична, а конформация различна. Известны идентичные олигопептидные последовательности (около 5 аминокислотных остатков), которые в одних белках образуют α-спирали, в других — β-структуры. Таким образом, нативная конформация каждого участка пептидной цепи зависит не только от его первичной структуры, но и от ближайшего окружения.

Белки, имеющие одинаковую или почти одинаковую конформацию, могут существенно различаться по первичной структуре. Например, миоглобин, α-протомеры и β-протомеры гемоглобина имеют почти одинаковую конформацию (см. рис. 1.9), но их первичная структура заметно различается: примерно в 70 % позиций аминокислоты не совпадают. Однако в таких случаях несовпадающие аминокислоты, как правило, сходны по физико-химическим свойствам боковых цепей.

Денатурация и ренативация белков *in vivo*

Денатурация белков с небольшой скоростью происходит и в живой клетке. Ренативация денатурированных белков в условиях клетки затруднена вследствие высокой концентрации белков: денатурированные молекулы обнажившимися

гидрофобными участками соединяются с другими молекулами, что препятствует правильной укладке пептидной цепи. Однако существуют специальные белки — шапероны, помогающие восстановить нативную структуру частично денатурированных белков. Шапероны называют также белками теплового шока, поскольку их синтез в клетке увеличивается при повышенной температуре. Это большая группа белков, сходных по структуре и функциям. Известны три семейства шаперонов: шапероны-60, -70 и -90 (число — молекулярная масса белка в кДа). Шапероны-60 образуют шаперониновый комплекс, имеющий форму двух бочонков, соединенных днищами. Стенки бочонков образуют 14 молекул шаперона-60 (рис. 1.21).

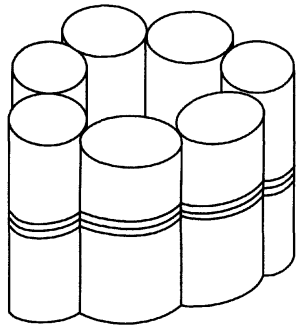


Рис. 1.21. Строение шаперонинового комплекса

На поверхности молекул, обращенной внутрь кольца, имеются участки, обогащенные гидрофобными радикалами аминокислот. К этим участкам могут присоединяться частично денатурированные белки цитозоля с открытыми гидрофобными последовательностями. Таким образом поврежденный белок оказывается в полости шаперонинового комплекса, где нет других молекул цитозоля, мешающих ренативации. Путем перебора разных вариантов создается термодинамически выгодная конформация, и ренативированный белок выходит в цитозоль. Однако следует отметить, что значительная часть денатурированных белков гидролизуется клеточными ферментами.

Шапероны выполняют также ряд других функций, в том числе участвуют в формировании пространственной структуры белков при их синтезе. Эти функции будут рассмотрены в соответствующих разделах.

ПРОСТЫЕ И СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

Многие белки помимо пептидных цепей содержат еще компонент неаминокислотной природы — простетическую группу. Такие белки в отличие от простых, построенных только из аминокислот, называют сложными белками.

Простетическая группа может быть представлена веществами разной природы (табл. 1.5).

Таблица 1.5. Некоторые сложные белки

Белки	Простетическая группа
Металлопротеины	Ионы металлов
Фосфопротеины	H_3PO_4
Гемопротеины	Гемы
Флавопротеины	Флавиннуклеотиды
Гликопротеины	Моносахариды, олигосахариды
Протеогликаны	Гликозамингликаны
Липопротеины	Триацилглицерины и сложные липиды
Нуклеопротеины:	
рибонуклеопротеины (рибосомы и др.)	РНК
дезоксирибонуклеопротеины (хроматин)	ДНК

Три последние группы белков, указанные в табл. 1.5 (липопротеины, нуклеопротеины, некоторые протеогликаны), — это уже скорее не белки, а надмолекулярные структуры, органеллы, имеющие сложный состав и организацию.

Связи между пептидными цепями и простетической группой бывают как ковалентные, так и нековалентные. Например, фосфопротеины содержат фосфатные остатки, соединенные сложноэфирной связью с гидроксильными группами остатков серина или треонина. Простетическая группа миоглобина и гемоглобина (гем) соединена с белковой частью только нековалентными связями.

Сложный белок (холопротеин) может диссоциировать на белковую часть (апопротеин) и простетическую группу:

$$\text{Холопротеин} \rightleftarrows \text{Апопротеин} + \text{Простетическая группа.}$$

Часто равновесие этой реакции сильно смещено влево, особенно при наличии ковалентных связей между пептидом и простетической группой. В других случаях в равновесном состоянии могут преобладать продукты диссоциации холопротеина.

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВ

Многие белки построены из двух или более пептидных цепей, соединенных нековалентными связями. Такие белки могут распадаться на составляющие их пептидные цепи при сравнительно небольших изменениях среды, например при подкислении, подщелачивании, добавлении гидрофобных веществ, охлаждении, а также при действии денатурирующих агентов. Примером может служить основной белок эритроцитов — гемоглобин (Hb). Он построен из четырех пептидных цепей — две цепи α и две цепи β. Строение тетрамерного Hb представляют формулой 2α2β. При указанных выше воздействиях тетрамерный гемоглобин диссоциирует сначала на димеры, а затем и на мономеры (протомеры):

$$2\alpha2\beta \rightleftarrows \alpha\beta + \alpha\beta \rightleftarrows \alpha + \beta + \alpha + \beta$$

Могут образоваться также димеры αα и ββ. Димеры и протомеры называют субъединицами белка; протомеры — это наименьшие субъединицы. Если из раствора удалить агент, вызвавший диссоциацию, субъединицы вновь объединяются в тетрамерную молекулу, т. е. происходит самосборка молекул гемоглобина.

Белки, молекулы которых, подобно гемоглобину, построены из нескольких полипептидных цепей (по существу, из нескольких белков меньшего размера), называют олигомерными белками. Количество протомеров, способ их соединения и пространственной укладки относительно друг друга называют четвертичной структурой белка.

Белки с молекулярной массой больше 50 000 почти всегда являются олигомерными. Число протомеров в олигомерных белках чаще всего лежит в пределах десяти, но может быть и гораздо большим; наиболее часто встречаются димеры и тетрамеры. Протомеры могут быть как идентичными, так и разными (табл. 1.6). Равновесие диссоциации некоторых олигомерных белков в условиях клетки таково, что в клетке существуют олигомер и его субъединицы в сравнимых

количествах. Четвертичная структура является такой же специфичной, уникальной характеристикой данного белка, как и другие уровни структуры.

Таблица 1.6. Число протомеров в некоторых олигомерных белках

Белок	Число протомеров*
Гексокиназа	2
Белок S-100	3
Пируваткиназа	4
Глутаматдегидрогеназа	6
Изоцитратдегидрогеназа	8
Ферритин	24
Серин-треонин-дегидратаза	1 + 1
Фактор свертывания крови XIIIa	2 + 2
Гемоглобин	2 + 2
Миозин	2 + 4
Тропонин	1 + 1 + 1
РНК-полимераза I	1 + 1 + 1 +1 +2 + 2

* В тех случаях, когда протомеры неидентичны, общее число протомеров представлено как сумма протомеров каждого типа.

Комплементарность протомеров

Протомеры соединяются в результате образования гидрофобных, ионных, водородных связей. При этом протомеры взаимодействуют друг с другом не любой частью своей поверхности, а определенным участком (контактная поверхность). Между каждой парой взаимодействующих контактных участков образуются десятки связей.

Процесс самосборки отличается высокой специфичностью. Если в растворе наряду с протомерами гемоглобина есть и протомеры других белков, они не образуют соединений с протомерами гемоглобина. Протомеры данного белка «находят» и «узнают» друг друга, соединяясь только друг с другом. Взаимное узнавание протомеров обусловлено особой структурой контактных поверхностей. Контактные поверхности содержат много гидрофобных аминокислотных остатков, которые при объединении протомеров образуют гидрофобное ядро олигомерного белка. При этом расположение групп, образующих связи, на одном протомере соответствует их расположению на другом протомере (рис. 1.22).

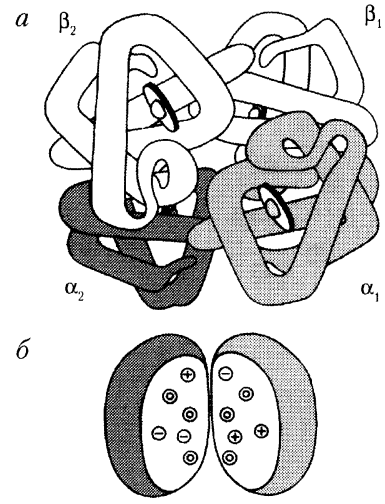


Рис. 1.22. Четвертичная структура гемоглобина:

а — модель молекулы гемоглобина, каждый протомер содержит гем (изображен в форме диска); *б* — схема комплементарности контактных поверхностей протомеров

Если на одной поверхности имеется выступ, то на другой в соответствующем месте — углубление, в которое при контакте входит выступ; соответственно, при контакте оказываются совпадающими разноименно заряженные ионные группы или группы, способные образовать водородные связи, или гидрофобные участки поверхностей. Такого рода поверхности называют комплементарными; они подходят друг к другу, как ключ к замку. Каждый протомер взаимодействует с другим в десятках точек; это означает, что ошибочное соединение (неправильная ориентация в олигомере или соединение с другими белками) практически невозможно.

Комплементарные взаимодействия молекул (не только белковых) лежат в основе всех биохимических процессов в организме.

Самосборка надмолекулярных структур

Олигомерные белки в строгом смысле нельзя назвать молекулами: скорее это надмолекулярные структуры, занимающие промежуточное положение между молекулами и клеточными органеллами, такими, как шаперониновый комплекс, рибосомы, хромосомы, мембраны и др. Таким образом, здесь намечается путь к пониманию того, как на основе химических и физико-химических свойств возникают структуры и свойства, характерные для биологической формы движения материи.

Рассмотрим в качестве примера самосборки клеточных органелл простую структуру — микротрубочки. Эти органеллы представляют собой длинные полые цилиндры с наружным диаметром 24 нм и внутренним — 15 нм; толщина их стенок 5 нм. Длина микротрубочек в большинстве клеток составляет несколько микрометров, однако в аксонах нервных клеток она достигает нескольких сантиметров. Микротрубочки имеются во всех клетках, причем постоянно обновляются: то распадаются, то вновь образуются. Они участвуют в образовании цитоскелета и поддержании формы клетки, во внутриклеточном транспорте веществ, в движении хромосом при делении клетки (митотическое веретено состоит в основном из микротрубочек), в перемещении частей клеточных мембран.

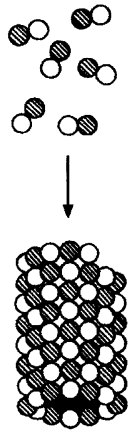


Рис. 1.23. Самосборка микротрубочек из димеров тубулина

Микротрубочки построены из белка тубулина; это димерный белок, состоящий из двух разных протомеров, с молекулярной массой 111 500. Тубулин сравнительно легко удается выделить из некоторых тканей в чистом виде. Если в раствор тубулина добавить соль магния (ионы Mg^{2+}), то начинается образование микротрубочек (рис. 1.23). Трубочка удлиняется в результате присоединения димеров к торцам; каждое кольцо трубочки содержит 13 протомеров, а порядок присоединения определяется наличием соответствующих контактных участков. Рост или, наоборот, распад микротрубочек с помощью специальных приемов удается наблюдать и в живой клетке.

Микротрубочку можно рассматривать и как белок с четвертичной структурой, и как клеточную органеллу.

В последующих главах описана самосборка более сложных структур — полиферментных комплексов, рибосом (гл. 3), мембран (гл. 7).

Кооперативные изменения конформации протомеров

Олигомерные белки обладают особыми свойствами, которых нет у белков, не имеющих четвертичной структуры. Это можно увидеть, сравнивая белок мышц миоглобин и белок эритроцитов гемоглобин. Вторичная и третичная структуры миоглобина и протомеров гемоглобина очень сходны (ср. рис. 1.9 и 1.22). Оба эти белка являются гемопротеинами и выполняют в организме сходные функции, в основе которых лежит способность обратимо связывать кислород. Простетическая группа этих белков — гем — представляет собой плоскую молекулу, содержащую четыре пиррольных цикла и соединенный с ними атом железа (рис. 1.24).

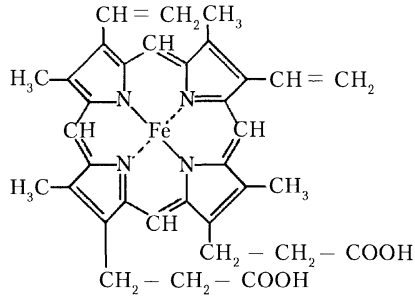


Рис. 1.24. Гем (ферропротопорфирин)

Пептидная цепь миоглобина содержит 153 аминокислотных остатка. Из них примерно три четверти образуют восемь α-спиральных участков, обозначаемых латинскими буквами от A до H. Плоская молекула гема расположена в углублении между спиралями E и F (рис. 1.25). Гем соединяется с белковой частью (глобином) гидрофобными связями между пиррольными циклами и гидрофобными радикалами аминокислот. Атом железа в молекуле гема образует шесть координационных связей: четыре с атомами азота пиррольных колец гема, одну с атомом азота имидазольного кольца гистидина, расположенного в спирали F (проксимальный гистидин), и еще одну — с молекулой O_2. Спираль E содержит также остаток гистидина, не связанный с гемом (дистальный гистидин), но способствующий присоединению кислорода к иону железа.

Пиррольные кольца гема расположены в одной плоскости, в то время как атом железа в дезоксигемоглобине несколько выступает из этой плоскости (на

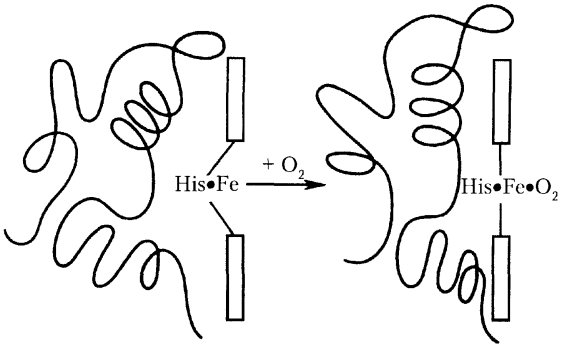


Рис. 1.25. Кислород, связанный с гемом в молекуле миоглобина и протомерах гемоглобина

0,6 ангстрема). Присоединение кислорода «выпрямляет» молекулу гема: железо перемещается в плоскость пиррольных колец. Поскольку железо связано с остатком проксимального гистидина пептидной цепи, то происходит и перемещение участка пептидной цепи, разрыв некоторых слабых связей в молекуле белка, т. е. несколько изменяется конформация белка. Таким образом, присоединение кислорода сопровождается изменением пространственной структуры. В этом отношении миоглобин и гемоглобин одинаковы, но следствия изменения их конформации различны.

Превращение миоглобина (Mb) в оксимиоглобин отражает следующая схема:

$$Mb + O_2 \rightleftarrows MbO_2$$

В гемоглобине имеется четыре протомера, каждый из которых содержит гем и может присоединять кислород:

$$Hb \underset{-O_2}{\overset{+O_2}{\rightleftarrows}} HbO_2 \underset{-O_2}{\overset{+O_2}{\rightleftarrows}} Hb(O_2)_2 \underset{-O_2}{\overset{+O_2}{\rightleftarrows}} Hb(O_2)_3 \underset{-O_2}{\overset{+O_2}{\rightleftarrows}} Hb(O_2)_4$$

Первая молекула O_2 изменяет конформацию протомера, к которому она присоединилась. Поскольку этот протомер соединен многими связями с другими протомерами, изменяется конформация и других протомеров. Это явление называют кооперативностью изменения конформации протомеров. Изменения конформации таковы, что сродство гемоглобина ко второй молекуле O_2 увеличивается в 2–3 раза. В свою очередь, присоединение второй, а затем и третьей молекул O_2 тоже изменяет конформацию, и каждый раз облегчается присоединение очередной молекулы O_2. Сродство гемоглобина к четвертой молекуле O_2 примерно в 300 раз больше, чем к первой. Конформационные изменения при образовании оксигемоглобина подтверждены рентгеноструктурным анализом.

График зависимости насыщения миоглобина кислородом от парциального давления кислорода имеет вид гиперболы; для гемоглобина же эта зависимость отражается S-образной кривой (рис. 1.26). При низком давлении кислорода с ним связаны не все протомеры каждой молекулы гемоглобина; увеличение крутизны кривой при возрастании давления кислорода отражает увеличенное сродство к кислороду частично оксигенированных молекул гемоглобина.

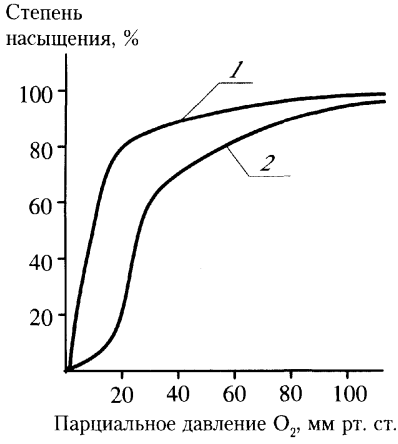


Рис. 1.26. График насыщения миоглобина (*1*) и гемоглобина (*2*) кислородом

Изменение сродства гемоглобина к кислороду способствует быстрому насыщению крови кислородом в легких и полному обеспечению кислородом тканей (см. гл. 21). Функция миоглобина заключается в другом: обладая более высоким сродством к кислороду, он присоединяет кислород, доставляемый гемоглобином, и служит промежуточным звеном транспорта внутри клетки к митохондриям — главному месту потребления кислорода. Кроме того, в форме

оксимиоглобина в мышцах может запасаться некоторое количество кислорода; это свойство имеет значение в основном для ныряющих животных (утки, тюлени, киты и др.). Транспорт кислорода гемоглобином подробнее рассматривается в гл. 21.

Кооперативные изменения конформации олигомерных белков составляют основу механизма регуляции функциональной активности не только гемоглобина, но и большого числа других белков.

Таким образом, в белках различают четыре уровня структурной организации: первичная структура — порядок чередования аминокислотных остатков в пептидных цепях; вторичная и третичная структуры — конформация пептидных цепей; четвертичная структура — число протомеров в олигомерных белках, их пространственное расположение и способ соединения.

Первичная структура имеет особый биологический смысл, поскольку она определяет все другие уровни организации. Если задана первичная структура, то другие уровни структурной организации могут образоваться самопроизвольно. Можно сказать, что, например, первичная структура гемоглобина содержит информацию о его вторичной, третичной и четвертичной структурах, а следовательно, и о биологических функциях гемоглобина. Структура белков — наследуемое свойство. Как мы увидим позднее, в наследственном аппарате содержится информация именно о первичной структуре.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ МАССА, РАЗМЕРЫ И ФОРМА БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ

Один из распространенных методов определения молекулярной массы белков и других высокомолекулярных веществ основан на измерении скорости седиментации (осаждения) веществ при ультрацентрифугировании. Во вращающемся роторе ультрацентрифуги центробежное ускорение достигает 100 000–500 000 g (g — ускорение свободного падения). На поверхность буферного раствора, налитого в кювету ультрацентрифуги, наносят тонкий слой раствора белка и кювету помещают в ротор. При вращении ротора молекулы белка, более плотные, чем растворитель, начинают перемещаться в направлении от оси вращения. Положение белковой зоны в кювете в ходе центрифугирования регистрируется специальной оптической системой по показателю преломления, который больше в зоне белка, чем в буферном растворе.

На основании результатов центрифугирования вычисляют коэффициент седиментации S:

$$s = \frac{dx}{dt}\frac{1}{\omega^2 x},$$

где x — расстояние от оси вращения до зоны белка; t — время (dx/dt — скорость седиментации); ω — угловая скорость (рад/с). Коэффициент седиментации имеет размерность времени. За единицу коэффициента седиментации условно принята величина 10^{-13} с, обозначаемая S и называемая сведбергом[1].

[1] По имени шведского ученого Т. Сведберга, построившего в 1925 г. первые ультрацентрифуги. Это были гигантские сооружения, занимавшие помещение, равное двухэтажному дому. Ротор приводился в движение масляными турбинами. Современные ультрацентрифуги имеют размеры небольшого письменного стола.

Коэффициент седиментации большинства белков лежит в пределах 1–20 S, но может достигать и 200 S.

Молекулярная масса белка пропорциональна его коэффициенту седиментации, коэффициенту диффузии и плотности. Измерив в независимых опытах коэффициент диффузии и плотность, можно вычислить молекулярную массу. Поскольку наибольшие трудности вызывает измерение коэффициента диффузии, нередко ограничиваются указанием только коэффициента седиментации белка, а также и других высокомолекулярных веществ и частиц (20S-белок, 60S-частица, 18S-РНК и т. д.). Эти величины позволяют оценить относительные размеры молекул и частиц, однако надо учитывать, что зависимость коэффициента седиментации от молекулярной массы нелинейная.

Более просто молекулярную массу белка можно определить методом гель-фильтрации, или молекулярного просеивания. Этот метод основан на применении специальных полимерных веществ, набухшие зерна (гранулы) которых имеют поры определенного размера. Часто используют сефадекс, гранулы которого построены из трехмерной сети полисахаридных цепей декстрана. Небольшие молекулы растворенных веществ легко диффундируют внутрь зерен сефадекса, в то время как диффузия крупных молекул затруднена. Это явление лежит в основе разделения веществ (молекулярного просеивания) методом гель-фильтрации.

Гелеобразную массу набухшего сефадекса помещают в стеклянную трубку (колонку), на поверхность геля наносят слой белкового раствора и затем через колонку пропускают буферный раствор (рис. 1.27). Белковый раствор вместе с буфером перемещается вдоль колонки между гранулами сефадекса. В результате диффузии молекулы белков могут проникать внутрь гранул и какое-то время удерживаться там. Поэтому белки проходят через колонку медленнее, чем буферный раствор, причем тем медленнее, чем меньше их молекулярная масса, так как молекулы белков с меньшей молекулярной массой легче диффундируют внутрь гранул. В результате в колонке образуются отдельные зоны белков, причем молекулярная

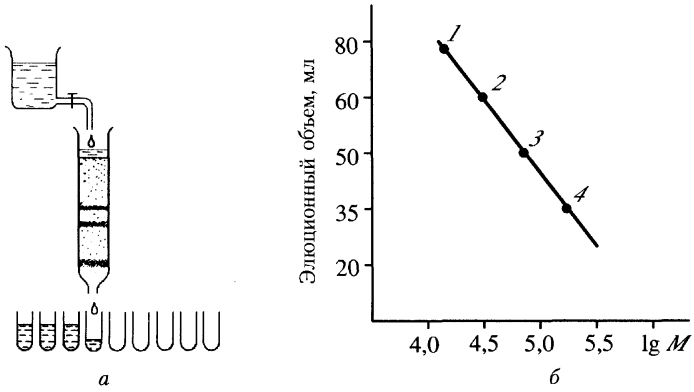


Рис. 1.27. Фракционирование белков по молекулярным массам на колонке с сефадексом:
а — прибор для хроматографии; б — график для расчета молекулярной массы по результатам хроматографии на сефадексе; *1* — РНКаза; *2* — α-химотрипсин; *3* — сывороточный альбумин (мономер); *4* — γ-глобулин

масса белка тем больше, чем ниже расположена зона. Если гель-фильтрации подвергают смесь окрашенных белков (гемоглобин, цитохромы и др.), то разделение смеси можно наблюдать непосредственно.

Продолжая пропускать буферный раствор через колонку и собирая вытекающую из колонки жидкость небольшими порциями в ряд пробирок, получают фракции белков, различающихся молекулярной массой: белки вымываются (элюируются) из колонки в порядке убывания молекулярной массы. На этом основано определение молекулярной массы белков методом гель-фильтрации.

Между элюционным объемом и логарифмом молекулярной массы существует линейная зависимость (см. рис. 1.27). Элюционный объем зависит от размеров колонки, марки сефадекса, плотности его упаковки в колонке и других факторов. Поэтому колонку с сефадексом сначала калибруют. Для этого через нее пропускают растворы белков с известной молекулярной массой и строят калибровочный график, как показано на рис. 1.27. Затем через эту же колонку пропускают белок, молекулярную массу которого нужно узнать; определяют его элюционный объем и по графику находят значение IgM, соответствующее этому объему.

В табл. 1.7 приведены значения молекулярной массы некоторых белков; в табл. 1.8 представлены величины, характеризующие размеры и форму некоторых белков, и, для сравнения, размеры некоторых клеточных органелл и клеток.

Таблица 1.7. Молекулярная масса некоторых белков человека

Белок	M	Белок	M
Соматотропин	21 500	Церулоплазмин	150 000
Интерферон	26 000	Пируваткиназа	240 000
Карбоангидраза эритроцитов	29 000	Фактор XIIIa	320 000
Пепсин	35 500	Фибриноген	340 000
Фактор Касла	44 200	Апоферритин	450 000
Альбумин сыворотки крови	66 500	Пируваткарбоксилаза	600 000
Трансферрин	88 000	α_2-Макроглобулин	720 000
Диоксигеназа *п*-оксифенилпирувата	100 000	Иммуноглобулин IgM	950 000

Таблица 1.8. Размеры некоторых молекул, клеточных органелл и клеток

Частица	Размер, нм	Отношение короткой оси к длинной
Аланин	0,5 (длина)	—
Миоглобин	4,4 × 4,4 × 2,5	1 : 1,7
Фосфоглюкоизомераза	7 × 7 × 10	1 : 1,4
Гемоглобин	6,8 (поперечник)	—
Карбоксипептидаза А	5 × 4,2 × 3,8	1 : 1,6
Трансферрин	4 × 5 × 10	1 :2,5
Пируваткиназа	7,5 × 9,5 × 12,5	1 : 1,7
Глутаматдегидрогеназа	13 (поперечник)	—
Фибриноген	3,8 × 3,8 × 7	1 : 18
Миозин	2 × 2 × 150	1 : 75
Тропоколлаген	1,5 × 1,5 × 300	1 : 200

Продолжение табл. 1.8

Частица	Размер, нм	Отношение короткой оси к длинной
Рибосома (80S)	23 (поперечник)	—
Плазматическая мембрана	8 (толщина)	—
Митохондрия из клеток печени	1500 (длина)	—
Эритроцит*	8000 × 8000 × 1500	—
Гепатоцит	20 000 (поперечник)	—

* В эритроцитах 95 % сухой массы (около 30 % сырой массы) приходится на гемоглобин; каждый эритроцит содержит около 280 млн молекул гемоглобина.

ИОНИЗАЦИЯ, ГИДРАТАЦИЯ И РАСТВОРИМОСТЬ БЕЛКОВ

Радикалы лизина, аргинина, гистидина и дикарбоксильных аминокислот содержат группы, способные к ионизации. Кроме того, на концах пептидных цепей имеются свободные α-аминогруппы и α-карбоксильные группы, которые тоже ионизируются. Ионогенных групп в молекуле белка может быть 15–20 на каждые 100 аминокислотных остатков. Таким образом, белки представляют собой полиэлектролиты. Поскольку белки содержат как положительно, так и отрицательно заряженные группы, они являются амфолитами.

При подкислении раствора белка степень ионизации анионных групп снижается, а катионных — повышается; при подщелачивании происходят противоположные изменения. При определенном значении pH число положительно и отрицательно заряженных групп становится одинаковым; такое состояние называется изоэлектрическим (суммарный заряд молекулы равен нулю). Значение pH, при котором белок находится в изоэлектрическом состоянии, называют изоэлектрической точкой и обозначают pI. Изоэлектрическая точка большинства белков лежит в слабокислой зоне. Это связано с тем, что обычно в белках анионогенных аминокислот больше, чем катионогенных. Однако есть и щелочные белки, например гистоны, входящие в состав хроматина и содержащие много лизина и аргинина.

Если белок не находится в изоэлектрическом состоянии, то в электрическом поле молекулы белка будут перемещаться к катоду или аноду, в зависимости от знака суммарного заряда, и со скоростью, пропорциональной величине суммарного заряда (электрофорез). Этим методом можно разделять белки с различным значением pI.

Полярные группы белков, как ионогенные, так и неионогенные (см. табл. 1.3), способны взаимодействовать с водой, гидратироваться. Количество воды, связанной с белком, достигает 30–50 г на 100 г белка. Гидрофильных полярных групп (а соответственно и связанной с ними воды) значительно больше на поверхности белковой глобулы, чем в глубине, поэтому иногда говорят о «гидратной оболочке» белковой молекулы. Большинство белков имеет гидрофильную поверхность, однако есть и гидрофобные белки, поверхность которых образована преимущественно гидрофобными радикалами аминокислот. Такие белки нерастворимы в воде, но растворяются в липидах: гидрофобные радикалы аминокислот взаимодействуют с молекулами липидов (сольватируются). Гидрофобные белки встречаются преимущественно в клеточных мембранах.

Растворимость белка в воде зависит от количества гидрофильных групп, от размеров и формы молекул, от величины суммарного заряда. В изоэлектрическом состоянии растворимость белков обычно снижена, поскольку отсутствует электростатическое отталкивание между молекулами, и они склонны образовывать многомолекулярные агрегаты, не способные удерживаться в растворе.

Растворимость белков зависит также от наличия других растворенных веществ. Например, некоторые белки не растворяются в дистиллированной воде, но растворяются в присутствии небольших концентраций нейтральных солей. При высоких концентрациях нейтральных солей белки выпадают в осадок, причем для осаждения (высаливания) разных белков требуются разные концентрации соли. Следовательно, этим способом можно фракционировать белки. Чаще всего для разделения белков методом высаливания используют сульфат аммония. После удаления соли (например, путем диализа) осажденный белок вновь растворяется: при этом сохраняются его нативные свойства.

Растворимость белков снижается и при денатурации. Денатурацией нередко пользуются для удаления белков из растворов.

В клетке одни белки находятся в растворенном состоянии в цитозоле, другие входят в состав клеточных структур — мембран, рибосом, микротрубочек, фибрилл и др. Содержание белков в цитозоле равно примерно 20 %, в плазме крови 7–9 %.

ФИБРИЛЛЯРНЫЕ БЕЛКИ

Характерная структурная особенность фибриллярных белков — вытянутая, нитевидная форма молекул. Эти белки нерастворимы в воде и часто образуют многомолекулярные нитевидные комплексы — фибриллы.

Фибриллярный белок коллаген — самый распространенный белок в мире животных; в организме человека с массой тела 70 кг содержится от 12 до 15 кг белков, и половина этого количества приходится на коллаген. Молекула коллагена (тропоколлагена) построена из трех пептидных цепей, каждая из которых содержит около 1000 аминокислотных остатков. Необычен аминокислотный состав коллагена: каждая третья аминокислота — это глицин, 20 % составляют остатки пролина и гидроксипролина, 10 % — аланина, остальные 40 % представлены всеми другими аминокислотами. Коллаген — единственный белок, в котором содержится гидроксипролин. Эта аминокислота получается путем гидроксилирования части остатков пролина уже после образования пептидных цепей. Гидроксилируется также некоторая часть остатков лизина с превращением в гидроксилизин.

Пептидные цепи коллагена представляют собой последовательность триплетов Gly–X–Y, где X и Y могут быть любой аминокислотой; часто положение X занимает пролин, а положение Y — гидроксипролин. Ниже представлен фрагмент пептидной цепи коллагена (Hyp — гидроксипролин):

```
                  |                 |                 |
Gly—Pro—Ser—Gly—Pro—Arg—Gly—Leu—Hyp—Gly—Pro—Hyp—
                  |                 |                 |
                  |                 |                 |
—Gly—Ala—Hyp—Gly—Pro—Gln—Gly—Phe—Gln—Gly—Pro—Hyp—
                  |                 |                 |
```

Каждая из пептидных цепей коллагена имеет конформацию спирали, отличающейся от α-спирали; в молекуле коллагена все три спирали, в свою очередь, перевиты друг с другом, образуя плотный жгут (рис. 1.28). Между спиралями за счет пептидных групп образуются водородные связи (–C=O•••H–N–). Такие же водородные связи имеются и внутри каждой цепи. Все три цепи молекулы коллагена ориентированы параллельно, т. е. на одном конце коллагена имеются N-концы цепей, на другом — C-концы. Коллаген — сложный белок, гликопротеин: содержит моносахаридные (галактозильные) и дисахаридные (галактозилглюкозильные) остатки, соединенные с гидроксильными группами некоторых остатков оксилизина. Молекулы коллагена, соединяясь «бок о бок», образуют микрофибриллы (см. рис. 1.28); из микрофибрилл формируются более толстые фибриллы, а из них — волокна и пучки волокон. Связи между молекулами коллагена в фибриллах ковалентные; они возникают за счет взаимодействия оксилизиновых остатков. В организме человека содержится не менее 19 разных типов коллагена. Коллагеновые волокна вместе с другими полимерными веществами межклеточного матрикса составляют основу соединительной ткани, обеспечивающую ее опорную функцию (гл. 18).

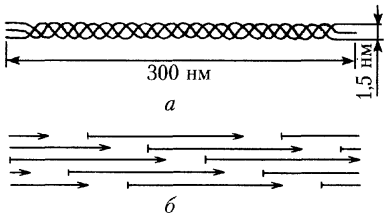


Рис. 1.28. Строение молекулы коллагена (*а*) и схема укладки молекул в коллагеновых фибриллах (*б*), объясняющая видимую в микроскоп поперечную исчерченность коллагеновых волокон

Эпидермис кожи, волосы, ногти содержат фибриллярные белки кератины. Пептидные цепи этих белков имеют конформацию α-спирали. В волосе три такие цепи, скрученные в суперспираль, образуют первичный агрегат (протофибриллу). Спиральный жгут из нескольких протофибрилл представляет собой микрофибриллу, жгут из микрофибрилл — макрофибриллу. В целом получается структура многожильного каната. В одном волосе содержатся сотни макрофибрилл, ориентированных по длине волоса. Молекулы кератина в макрофибрилле соединены друг с другом дисульфидными связями, что придает прочность и жесткость всей структуре.

Фибриллярные белки нерастворимы в воде. Они не перевариваются в пищеварительном тракте большинства животных и человека и поэтому не могут служить пищей (однако некоторые виды членистоногих, например моль и др., приспособились к питанию фибриллярными белками шерсти, кожи, перьев птиц).

ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

Нет сомнений, что белки выполняют в живой клетке наиболее разнообразные и наиболее интересные функции. Как уже было отмечено, в организме человека количество разных белков исчисляется десятками тысяч. Каждый белок имеет уникальную, свойственную лишь ему структуру и в такой же мере уникальную функцию, отличающуюся от функций всех других белков. Некоторые белки можно объединить в группы по признаку сходства их функций:

1. Транспортные белки: гемоглобин, сывороточный альбумин, трансферрин и др.; белки трансмембранного транспорта.
2. Ферменты.
3. Белки-регуляторы: белковые гормоны, белки, регулирующие действие генов, белковые ингибиторы и активаторы ферментов и других белков.
4. Структурные белки: белки нуклеосом, соединительной ткани, фибрин тромбов.
5. Защитные белки (иммуноглобулины).
6. Сократительные белки.
7. Белки, предназначенные для питания развивающегося зародыша (форма запасания аминокислот): казеин молока, овальбумин яиц, запасные белки семян растений.

Взаимодействие с лигандами

В основе функционирования любого белка лежит его способность к избирательному взаимодействию с каким-либо другим веществом — лигандом. Лигандом может быть как низкомолекулярное вещество, так и макромолекула, в том числе другой белок. Лиганд присоединяется к определенному участку на поверхности белковой молекулы — центру связывания (активный центр). Специфичность взаимодействия (узнавания) чаще всего обеспечивается комплементарностью структуры центра связывания структуре лиганда, подобно тому, как это происходит при самосборке гемоглобина из протомеров. Иногда избирательность зависит в основном от реакционной способности атома, к которому непосредственно присоединяется лиганд. Примером может служить присоединение кислорода к атому железа в миоглобине или гемоглобине. Однако и в таких случаях избирательность в значительной мере зависит от белковой части молекулы. Такой же атом железа (в составе гема) в других белках — цитохромах — функционирует совершенно иначе: он служит переносчиком электронов, получая их от одних веществ и передавая другим (при этом железо попеременно становится двух- или трехвалентным).

Связи между белком и лигандом могут быть как ковалентными, так и нековалентными.

Центр связывания иногда занимает небольшой участок поверхности белковой молекулы (в гемоглобине центр связывания кислорода — это только область атома железа), иногда — значительную часть поверхности (например, контактные поверхности протомеров гемоглобина).

На молекуле белка может быть один, два или больше активных центров, имеющих одинаковую или разную специфичность. Например, каждый протомер гемоглобина имеет три центра для связывания с тремя другими протомерами и один центр для связывания гема. Тетрамерная молекула гемоглобина имеет четыре активных центра (атомы железа) для связывания кислорода.

Активный центр формируется из аминокислотных остатков, зачастую отстоящих далеко друг от друга в пептидной цепи. Собранными в одном месте они оказываются в результате образования вторичной и третичной структуры. Поэтому при денатурации белков активные центры разрушаются и биологическая активность утрачивается.

Взаимодействие между белком P и лигандом L описывается уравнениями:

$$P + L \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} PL; \quad K_{диcc} = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[P][L]}{[PL]}.$$

Здесь $K_{диcc}$ представляет собой константу диссоциации комплекса PL: чем меньше $K_{диcc}$, тем больше сродство L к P. Иногда при описании этого процесса пользуются константой связывания (ассоциации) $K_{св}$, которая представляет собой величину, обратную $K_{диcc}$:

$$K_{св} = 1/K_{диcc} = \frac{[PL]}{[P][L]}.$$

Соответственно, между $K_{св}$ и сродством L к P пропорциональность прямая: чем больше $K_{св}$, тем больше сродство.

Образование комплекса можно наблюдать по убыли концентрации свободного лиганда L или по нарастанию концентрации комплекса PL, если его образование сопровождается появлением какого-либо нового свойства, например изменением цвета или поглощения в ультрафиолетовой части спектра. Такой способ используют и для количественного определения индивидуальных белков (см. ниже).

При постоянной концентрации P и возрастающей концентрации L концентрация PL увеличивается по гиперболической кривой, стремясь к максимуму, когда весь белок связан с лигандом (кривая насыщения). Для олигомерных белков кривая насыщения может иметь S-образную форму. Степень насыщения можно выразить в процентах концентрации комплекса [PL] от начальной (до добавления лиганда) концентрации белка $[P]_0$: степень насыщения равна $([PL]/[P]_0) \cdot 100$ (рис. 1.29; см. также рис. 1.26).

Из уравнения равновесия реакции следует, что если [P] = [PL], то $K_{диcc}$ = [L]. Равенство [P] и [PL] означает полунасыщение белка, т. е. состояние, когда 50 % молекул белка связаны с лигандом, а 50 % остаются свободными: $[P] = [PL] = {}^1/_2\,[P]_0$. Следовательно, $K_{диcc}$ численно равна такой концентрации лиганда, при которой достигается полунасыщение белка. На рис. 1.29 показано, как по кривой насыщения можно определить $K_{диcc}$ и, тем самым, оценить сродство лиганда к белку.

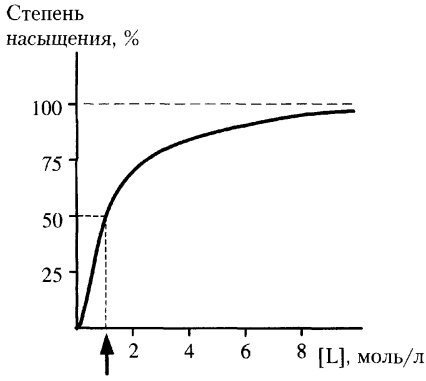


Рис. 1.29. График насыщения белка лигандом

Полунасыщение миоглобина и гемоглобина достигается при давлении кислорода соответственно 2 и 26 мм рт. ст. (0,26 и 3,46 кПа) (см. рис. 1.26).

Константы диссоциации разных белков с их лигандами весьма различны — от таких, что в условиях живой клетки преобладает свободный белок, до таких, что свободный белок совсем не обнаруживается.

Зависимость концентрации комплекса PL от концентрации белка P при большом избытке лиганда имеет линейный вид, поскольку в этих условиях все молекулы белка находятся в составе комплекса PL, т. е. $[PL] = [P]_0$. На этом основано количественное определение

индивидуальных белков. Обычно в эксперименте невозможно измерить непосредственно концентрацию комплекса PL, поэтому измеряют изменение какого-либо свойства, например поглощения света, вызванное образованием комплекса (ΔA). Поглощение пропорционально изменению концентрации комплекса, поэтому график зависимости поглощения света от концентрации белка P в условиях насыщающей концентрации лиганда будет линейным (рис. 1.30). На основании графика можно сравнивать концентрации белка P в разных образцах: если, например, в одном из них поглощение равно 0,1, а в другом 0,3, то и концентрация белка в первом образце в 3 раза меньше, чем во втором. Такой метод позволяет измерить концентрацию определенного белка в сложной смеси, содержащей много других белков, которые не связывают данный лиганд.

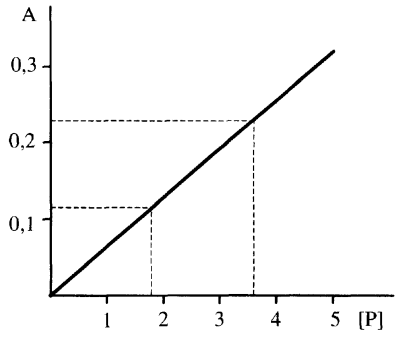


Рис. 1.30. Изменение поглощения света, отражающее концентрацию комплекса PL, в зависимости от концентрации белка P (концентрация лиганда L насыщающая)

Изофункциональные белки

Белок, выполняющий определенную функцию в живой клетке, может быть представлен несколькими формами — изофункциональными белками, или изобелками. Например, в эритроцитах человека обнаружено несколько форм гемоглобина: у взрослого человека преобладающими формами являются HbA, на долю которого приходится 96 % всего гемоглобина, HbF и HbA_2 (примерно по 2 % каждого). Все гемоглобины представляют собой тетрамеры, построенные из разного набора протомеров α, β, γ и δ: формула HbA — 2α2β, HbF — 2αγ, HbA_2 — 2α2δ. Общим для всех гемоглобинов является наличие α-протомеров. Разные протомеры сходны между собой по первичной структуре, и очень большое сходство между протомерами наблюдается по вторичной и третичной структурам. Все формы гемоглобинов выполняют одинаковую функцию — присоединяют кислород в легких и передают его в клетки тканей. Однако в какой-то мере по функциональным свойствам формы гемоглобинов различаются. Например, HbF имеет большее сродство к кислороду, чем HbA, и может отнимать кислород от HbA:

$$HbA{\bullet}O_2 + HbF \rightarrow HbA + HbF{\bullet}O_2$$

HbF характерен для эмбриональной стадии развития человека (фетальный гемоглобин); лишь в последние недели беременности и первые недели после рождения он постепенно заменяется на HbA. Кровь плода и матери не смешивается; снабжение плода кислородом обеспечивается за счет диффузии кислорода из кровеносных сосудов матери в кровеносные сосуды плода в плаценте. Более высокое сродство фетального гемоглобина к кислороду делает возможной диффузию при меньшем градиенте концентраций кислорода между сосудами матери и плода.

Меньшую степень родства с гемоглобинами обнаруживает миоглобин: по строению и свойству связывать кислород он очень сходен с протомерами гемоглобина, однако в отличие от гемоглобинов, циркулирующих в крови и переносящих кислород от легких (или плаценты) к тканям, миоглобин фиксирован в мышечной ткани и служит промежуточным переносчиком кислорода от гемоглобина к митохондриям, а также для создания резерва кислорода в мышцах.

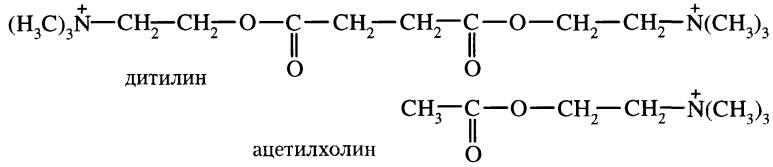
Изофункциональные белки — это семейства белков, выполняющих в общем одинаковую функцию, однако небольшие особенности некоторых членов семейства могут иметь важное физиологическое значение. Изобелками называют множественные молекулярные формы белка, обнаруживаемые в организмах одного вида; белки организмов разных биологических видов, выполняющие в них одинаковые функции (гомологичные белки), не относят к изобелкам. Например, гемоглобин человека и гемоглобин кролика — это не изобелки, несмотря на их одинаковую функцию и общее эволюционное происхождение. Более точное определение изофункциональных белков дано в гл. 5. Известно большое число семейств изобелков; особенно хорошо изучены изофункциональные ферменты (см. гл. 2). Есть основания считать, что значительная часть белков организма (если не все) представлена двумя или бóльшим количеством изофункциональных форм.

Ингибиторы функций белков

Хотя взаимодействие белка с его физиологическим лигандом отличается высокой специфичностью, всегда можно подобрать вещество, природное или синтетическое, которое является структурным аналогом лиганда и тоже комплементарно центру связывания. Если такой аналог ввести в организм, то он будет соединяться с соответствующим белком вместо естественного лиганда, в результате чего функция белка окажется заблокированной. Вещества, взаимодействующие с активным центром белка и блокирующие его функцию, называют ингибиторами (чаще всего этот термин применяют по отношению к веществам, блокирующим функцию ферментов). Например, молекула угарного газа CO достаточно сходна с молекулой кислорода O_2, чтобы присоединяться к гемоглобину. Сродство CO к гемоглобину примерно в 200 раз больше, чем сродство кислорода, и поэтому даже при низкой концентрации угарного газа в воздухе (0,1–0,3 %) значительная часть гемоглобина оказывается блокированной угарным газом и не участвует в транспорте кислорода. В результате может наступить тяжелое отравление, нередко со смертельным исходом. Следовательно, структурные аналоги естественных лигандов могут быть ядами.

В нервно-мышечных синапсах медиатором передачи возбуждения с нерва на мышцу служит ацетилхолин. В процессе передачи возбуждения ацетилхолин соединяется с белком-рецептором (Р): Р + Ацетилхолин → Р • Ацетилхолин.

Дитилин является структурным аналогом ацетилхолина:



Дитилин тоже может соединяться с рецептором ацетилхолина: Р + Дитилин → → Р•Дитилин.

При введении в организм дитилин блокирует рецепторы ацетилхолина; вследствие этого нарушается передача импульса и возникает расслабление мышц (паралич). Дитилин применяют для расслабления мышц (миорелаксант) при кратковременных операциях и эндоскопических обследованиях. Дитилин — представитель группы курареподобных лекарств: их механизм действия сходен с механизмом действия кураре — яда некоторых южно-американских растений, применявшегося индейцами для отравления стрел. Таким образом, аналоги естественных лигандов могут быть лекарственными веществами.

В настоящее время для большого числа лекарств известны белки, с которыми они соединяются в организме (многие примеры приведены в последующих главах). В этом нашла развитие концепция о механизме действия лекарств, предложенная П. Эрлихом еще в начале XX в. Суть концепции состоит в том, что лекарство имеет точный адрес в организме, мишень, «хеморецептор» (термин П. Эрлиха), роль которого выполняет определенное вещество. Эта концепция объясняет, в частности, специфичность действия лекарств, проявляющуюся в том, что разные болезни излечиваются разными лекарствами. Отсюда нетрудно сделать вывод о невозможности панацеи. Сейчас представления о лекарствах как веществах, способных взаимодействовать с центрами связывания белков, служат фундаментальной основой химиотерапии и поисков новых лекарственных веществ. Однако есть и такие лекарства, которые первично взаимодействуют не с белками, а с другими веществами организма.

Способность «узнавать» определенное соединение или группу соединений и избирательно взаимодействовать с ними, «не обращая внимания» на все другие соединения, — главная структурно-функциональная особенность любого индивидуального белка. Для каждого вещества, имеющегося в организме, есть и соответствующий белок, узнающий это вещество. Это свойство белков лежит в основе образования надмолекулярных структур клетки, избирательного и направленного переноса веществ в клетке и между органами сложного организма; оно обеспечивает упорядоченные, направленные химические превращения веществ в организме. В природе нет другого класса соединений, который мог бы сравниться с белками по разнообразию выполняемых ими функций.

Количественное определение белков

Тирозин и триптофан (в незначительной степени также и фенилаланин) поглощают ультрафиолетовое излучение с максимумом поглощения при 280 нм. На этом основан спектрофотометрический метод измерения концентрации белков в растворах. Белки можно определять также колориметрически с помощью цветных реакций. В щелочной среде ионы двухвалентной меди образуют с пептидными группами комплексы, окрашенные в фиолетовый цвет (биуретовая реакция). Но чаще всего применяют более точный метод Лоури. Он основан на комбинации биуретового реактива со специальным реактивом на ароматические аминокислоты.

Указанные методы позволяют определить суммарное количество всех индивидуальных белков изучаемого препарата. Более трудную и гораздо более важную

задачу представляет измерение концентрации какого-либо индивидуального белка в сложной смеси белков. Такого рода методы основаны на специфичности взаимодействия белков с их природными лигандами или природными и синтетическими аналогами лигандов. Один из широко применяемых методов основан на взаимодействии белков со специфическими антителами (см. гл. 20).

ВЫДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Процедура выделения какого-либо белка начинается с переведения белков ткани в раствор. Для этого ткань измельчают и клетки разрушают с помощью специальных приборов — гомогенизаторов, или просто растиранием с песком. Нерастворимые части ткани из гомогената осаждают центрифугированием. В надосадочной жидкости (экстракте) содержатся растворимые белки. Если выделяемый белок прочно связан с какими-либо клеточными структурами, его можно перевести в раствор, обрабатывая гомогенат детергентами. В экстракте наряду с веществами небелковой природы присутствует много разных белков, причем искомый белок часто содержится в очень небольших количествах, составляющих десятые доли процента от всех белков.

Главная трудность выделения индивидуального белка состоит именно в его отделении от остальных белков. Все белки как соединения одного класса обладают сходными свойствами, и их фракционирование основано на небольших различиях в свойствах разных белков. В процессе выделения по возможности избегают денатурирующих воздействий: работу проводят при температуре, близкой к 0 °С, не применяют сильнокислых или сильнощелочных растворов.

Избирательная денатурация. Многие белки денатурируются и выпадают в осадок при нагревании раствора до 50–70 °С или при подкислении примерно до pH 5. Если выделяемый белок выносит эти условия, то часть посторонних белков можно удалить из раствора таким способом.

Различия в растворимости. Чаще всего используют зависимость растворимости белков от концентрации сульфата аммония. Если в раствор белков добавить небольшое количество $(NH_4)_2SO_4$ (например, 10 г на 100 мл раствора), то наименее растворимые белки выпадут в осадок. Осадок отделяют центрифугированием, а к надосадочной жидкости добавляют еще 10 г $(NH_4)_2SO_4$ и получают второй осадок. Продолжая эту процедуру, получают ряд фракций; в одной из них содержание искомого белка больше, чем в других. Сходным образом можно фракционировать белки добавлением возрастающих количеств ацетона или спирта.

Различия в количестве и природе ионогенных групп. Эти свойства позволяют фракционировать белки методами ионообменной хроматографии и электрофореза.

Для хроматографии белков применяют ионообменники на основе целлюлозы или других гидрофильных полимеров, например диэтиламиноэтилцеллюлозу (ДЭАЭ-целлюлоза), содержащую катионные группы, или карбоксиметилцеллюлозу (КМ-целлюлоза), содержащую анионные группы (рис. 1.31).

Прочность связывания белков с ДЭАЭ-целлюлозой тем выше, чем больше в молекуле белка карбоксильных групп. Белки, адсорбированные на ДЭАЭ-целлюлозе, можно смыть (элюировать) растворами с возрастающей концентрацией NaCl: вначале элюируются слабо связывающиеся белки, а по мере увеличения

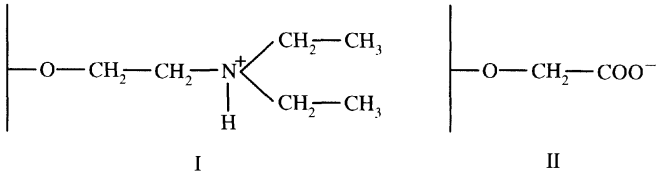


Рис. 1.31. ДЭАЭ-целлюлоза (*а*) и КМ-целлюлоза (*б*)

концентрации NaCl — и другие белки, в порядке возрастания их сродства к ДЭАЭ-целлюлозе. Аналогично применяют и КМ-целлюлозу, но сродство белков к ней прямо пропорционально числу аминогрупп в белке.

Электрофорез для разделения белков применяют во множестве вариантов. На рис. 1.32 представлена принципиальная схема простейшего варианта — электрофорез белков на бумаге. В приборе для электрофореза имеются две вынимающиеся кюветы *1*, разделенные перегородкой *2* на два отделения, которые соединяются между собой полоской фильтровальной бумаги *3* (электропроводящий мостик). В наружные отделения кювет опущены электроды *4*, а во внутренние — концы бумажной полоски *5*; на этих полосках происходит разделение белков.

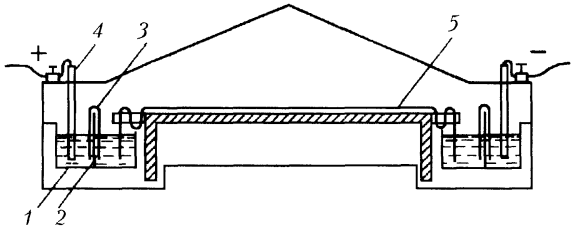


Рис. 1.32. Прибор для электрофореза

На полоску *5* фильтровальной бумаги, пропитанной буферным раствором, наносят раствор белков и включают ее в электрическую цепь с постоянным током. Полоску бумаги, чтобы предотвратить высыхание, помещают в герметически закрытую камеру. Белки на электрофореграмме обнаруживают, обрабатывая полоску красителем, связывающимся с белками, обычно бромфеноловым синим или амидовым черным (рис. 1.33, *а*). Такой метод малопригоден для выделения белков в количествах, достаточных для их дальнейшего изучения. Для получения больших количеств очищенного белка вместо полоски бумаги используют толстый блок какого-либо инертного материала — крахмала, целлюлозного порошка, или полимеры, образующие гели, — агар, полиакриламид.

На рис. 1.33 указаны основные фракции белков, их содержание в плазме (в % от суммарной концентрации белков в плазме) и положение некоторых индивидуальных белков (стрелки): *1* — α_1-антитрипсин; *2* — гаптоглобин и церулоплазмин; *3* — трансферрин; *4* — фибриноген.

В плазме крови человека содержится около 100 индивидуальных белков. Методом электрофореза на бумаге обнаруживается только 5 фракций (на рис. 1.33, *б* — *5* не полностью разделенных, наползающих друг на друга пиков). Каждая из этих

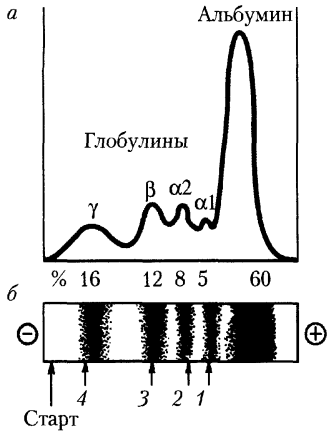


Рис. 1.33. Кривая изменения оптической плотности электрофореграммы (*а*), по которой можно рассчитать концентрацию белков во фракции и проявленная электрофореграмма белков плазмы крови (*б*)

фракций представляет собой смесь многих белков (с преобладанием какого-нибудь одного или нескольких индивидуальных белков), которые в указанных условиях не удается обнаружить. Но существуют варианты электрофореза с более высокой разрешающей способностью. Эффективен вариант, называющийся изоэлектрическое фокусирование. С помощью полимерных амфолитов, содержащих аминогруппы и карбоксильные группы в разных отношениях, создают градиент pH в блоке для электрофореза. При наложении электрического поля каждый белок будет передвигаться в таком блоке до тех пор, пока не достигнет зоны с pH, равным изоэлектрической точке данного белка. В этой зоне перемещение белка прекратится, поскольку суммарный заряд молекул будет нулевым. Каждый белок будет занимать на электрофореграмме позицию, соответствующую его изоэлектрической точке.

Различия по молекулярной массе позволяют разделять белки методами гель-фильтрации и ультрацентрифугирования.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях — еще один метод фракционирования белков по различиям молекулярной массы. Скорость миграции белка в электрическом поле зависит не только от его суммарного заряда, но также и от величины и формы белковой молекулы. Для электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях в анализируемую смесь белков добавляют додецилсульфат натрия (ДДС-Na, $C_{12}H_{25}OSO_3Na$), который представляет собой детергент с выраженными амфифильными свойствами. При этом олигомерные белки распадаются на протомеры, протомеры денатурируются и денатурированные пептидные цепи образуют мицеллы с ДДС-Na, содержащие примерно вдвое больше белка, чем ДДС-Na. Эти мицеллы имеют отрицательный заряд, обусловленный почти полностью ионами ДДС$^-$ ($C_{12}H_{25}OSO^-_3$). Суммарный заряд мицеллы пропорционален содержанию в ней ДДС-Na, а содержание ДДС-Na пропорционально размеру пептидной цепи. Таким образом, в этом случае белки (точнее — пептидные цепи) разделяются не по их заряду (поскольку заряд мицелл определяется почти полностью ДДС-Na), а по молекулярной массе пептидных цепей (рис. 1.34).

Различия по специфичности к лигандам используются в методе, который называется аффинной хроматографией или хроматографией по сродству. В этом варианте хроматографии в качестве сорбента применяют инертный полимер с присоединенным к нему специфическим лигандом того белка, который хотят выделить. Суть метода и пример применения представлены на рис. 1.35 и 1.36.

Через колонку сорбента пропускают раствор белков (см. рис. 1.35); с сорбентом связывается только тот белок, активный центр которого комплементарен лиганду (*а*); другие белки удаляют промыванием колонки. Затем через колонку

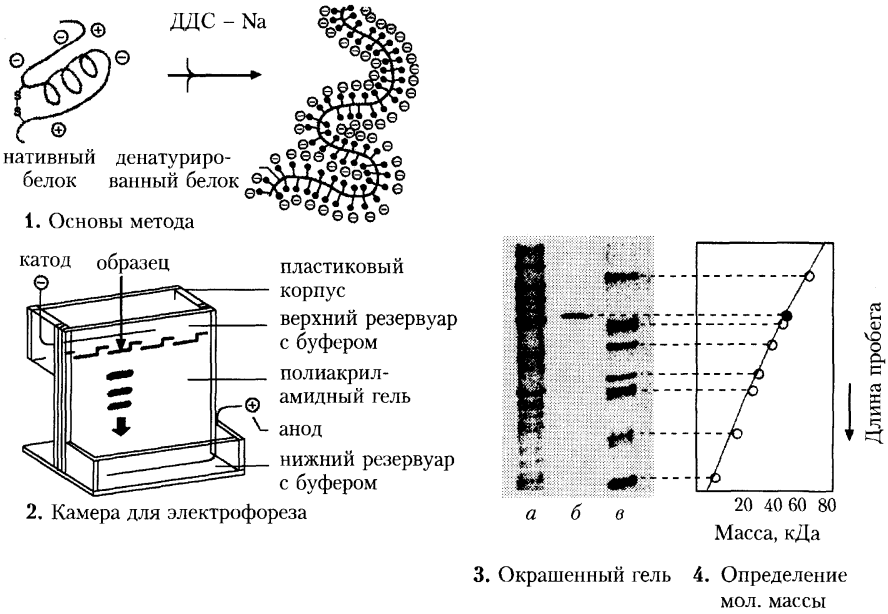


Рис. 1.34. Электрофорез белков в присутствии ДДС-Na:

справа — окрашенная электрофореграмма трех препаратов: *а* — клеточный экстракт (содержит сотни белков); *б* — выделенный из экстракта гомогенный белок; *в* — искусственная (калибровочная) смесь белков с известными молекулярными массами

пропускают раствор с высокой концентрацией свободного лиганда; в этих условиях образуется свободный комплекс белка с лигандом (*б*), который элюируется с колонки.

Сорбент содержит остатки лизина, присоединенные к нерастворимой основе ε-аминогруппой; эти остатки являются специфическими лигандами для плазминогена (см. рис. 1.36). После нанесения сыворотки колонку промывают буферным раствором, pH = 7,5 (*а*), затем 0,5 М раствором NaCl для удаления белков,

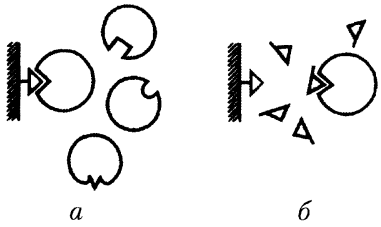


Рис. 1.35. Аффинная хроматография

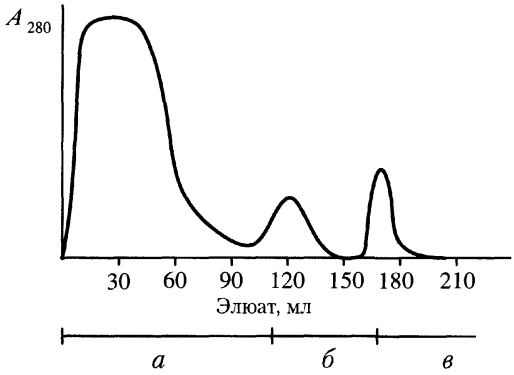


Рис. 1.36. Хроматография плазминогена сыворотки крови на аффинном сорбенте

задержавшихся в результате неспецифической сорбции (*б*), и, наконец, раствором ε-аминокапроновой кислоты, которая тоже является лигандом для плазминогена, причем отличается более высоким сродством, чем лизин; этот раствор элюирует плазминоген с колонки (*в*).

Выделение индивидуального белка требует последовательного применения многих приемов (см. рис. 1.37 и табл. 1.9). Ход выделения контролируют по увеличению содержания выделяемого белка в препарате после каждой стадии. Концентрацию выделяемого белка в препаратах сравнивают по способности этих препаратов связывать специфический лиганд (функциональная активность), как это описано выше. Активность выражают в условных единицах, например в единицах поглощения света (оптической плотности), и рассчитывают на 1 мл препарата. Активность ферментов измеряют по скорости катализируемой ими реакции (см. гл. 2).

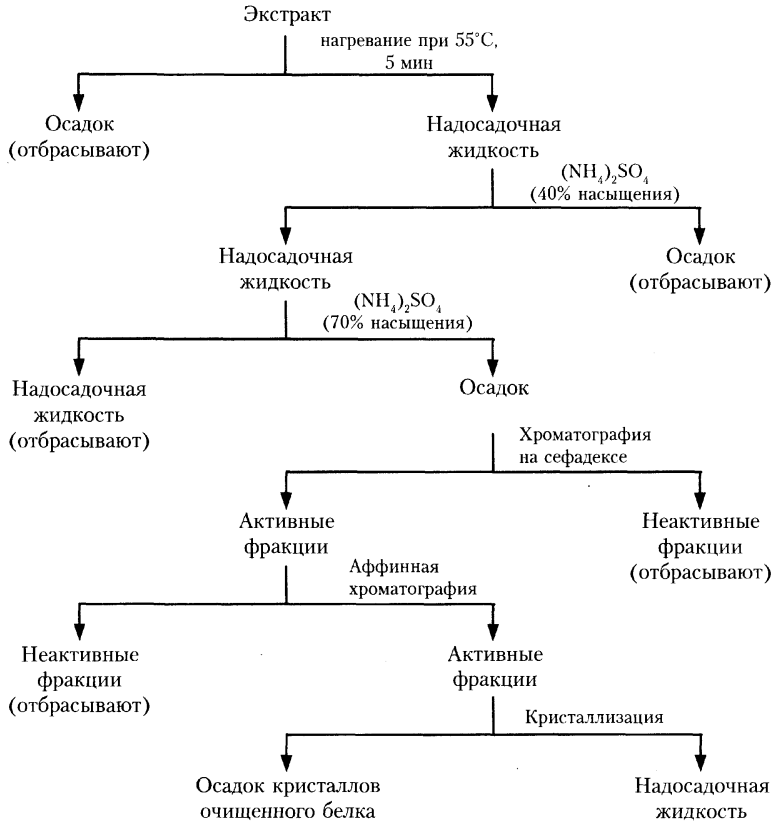


Рис. 1.37. Схема очистки белка

Кроме того, определяют общую концентрацию белков в растворе. Разделив величину активности препарата на концентрацию всех белков, получают его удельную активность. Очевидно, что по мере удаления посторонних белков удельная

активность будет возрастать; по степени возрастания удельной активности можно судить об эффективности каждой стадии очистки. Если начиная с какой-то стадии очистки удельная активность больше не увеличивается, то можно считать, что удалены все посторонние белки, т. е. получен индивидуальный (гомогенный) белок. Величина, показывающая, во сколько раз возросла удельная активность в процессе очистки, называется степенью очистки (см. табл. 1.9).

Стадия очистки	Объем раствора, мл	Общая концентрация белков, мг/мл	Активность, ед/мл	Удельная активность, ед. на 1 мг белков	Выход, %	Степень очистки
Экстракт	440,0	3,00	15	5	100	1,0
Нагревание при 55 °С в течение 5 мин	420,0	1,25	15	24	95	4,8
Осаждение сульфатом аммония (40–70 % насыщения)	3,6	1,00	80	80	45	16,0
Хроматография на сефадексе G-100	1,5	0,45	120	260	28	52,0
Аффинная хроматография	1,5	0,90	110	1200	25	240,0
Кристаллизация	1,0	0,05	130	2600	20	520,0
Перекристаллизация	1,0	0,05	130	2600	20	520,0

В процессе очистки неизбежны потери выделяемого белка: они связаны с денатурацией, а также с частичным попаданием выделяемого белка во фракции, которые отбрасываются.

При очистке каждого белка приемы и их последовательность подбираются эмпирически, методом проб и ошибок. Поэтому разработка процедуры выделения нового белка остается сложной и трудоемкой задачей.

ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ОРГАНИЗМА

Общая концентрация белков в клетке, как правило, близка к 20 %, а в некоторых клетках заметно больше (например, в эритроцитах 35 %). В клеточных органеллах концентрация белков еще больше (например, в матриксе митохондрий около 40 %).

Белковый состав организма взрослого здорового человека более или менее постоянен, однако возможны изменения содержания отдельных белков в зависимости от физиологической активности, состава пищи и режима питания, циклические изменения (биоритмы). В процессе развития организма, особенно на самых ранних стадиях (от зиготы до формирования дифференцированных органов со специализированными функциями), белковый состав изменяется значительно. В основе различий структуры и функции специализированных клеток лежат различия их химического состава, прежде всего белкового. Например, эритроциты содержат гемоглобин, обеспечивающий транспорт кислорода кровью; мышечные

клетки содержат сократительные белки актин и миозин; в клетках сетчатки глаза есть белок родопсин, способный улавливать фотоны, и т. д. Многие белки содержатся во всех или почти во всех клетках, но могут быть в разных количествах. При болезнях белковый состав тканей изменяется. Эти проявления болезней называют протеинопатиями. Различают протеинопатии двух типов — наследственные и приобретенные.

Наследственные протеинопатии — результат первичного повреждения в генетическом аппарате организма. При этом или какой-либо белок не образуется вообще, или синтезируется измененный по структуре, «неправильный» белок. Примером может служить серповидно-клеточная анемия (одна из гемоглобинопатий), при которой вместо HbA образуется HbS, хуже выполняющий функцию транспорта кислорода. Во многих случаях нарушение синтеза даже одного белка является фатальным для организма или приводит к тяжелой болезни. Например, индивиды, гомозиготные по HbS, погибают от малокровия в раннем детском возрасте.

Приобретенные протеинопатии, по-видимому, сопровождают любую из болезней, однако в клинической практике имеют значение лишь достаточно выраженные случаи. При приобретенных протеинопатиях первичная структура белков не изменяется, изменяется количество белка или его распределение в тканях, или нарушается функция белка в связи с изменением условий в клетке. Например, при некоторых формах гастрита в клетках слизистой желудка прекращается образование белка, обеспечивающего всасывание витамина B_{12}. В результате развивается тяжелая форма анемии (злокачественная анемия, см. гл. 7).

Определение содержания в тканях и жидкостях организма того или иного белка нередко служит удобным, а часто, особенно в случае наследственных протеинопатий, и наиболее точным методом диагностики заболевания. Например, наличие HbS в эритроцитах указывает на серповидно-клеточную анемию, а не на какую-либо другую форму анемии.

Глава 2

ФЕРМЕНТЫ

Истоки энзимологии (учения о ферментах, или энзимах) восходят к технологическим процессам, применявшимся человеком еще на заре цивилизации, таким, как спиртовое брожение, вызываемое дрожжами, использование проросших зерен ячменя (солода) для осахаривания крахмалистого сырья, применение заквасок при изготовлении хлеба. Слово *фермент* происходит от латинского *fermentum* — закваска; другое название ферментов — энзимы, происходит от греческого *en zyme* — в дрожжах.

В 1814 г. член Петербургской Академии наук К. С. Кирхгоф обнаружил, что вытяжка из солода вызывает превращение крахмала в более простые сахара. Иначе говоря, впервые был получен препарат фермента в виде раствора, а не в составе живых клеток. В 1897 г. немецкий ученый Э. Бухнер прессованием растертых дрожжей получил сок, который также не содержал клеток, но был способен вызывать спиртовое брожение. Такого рода опыты утвердили представление о том, что в живых клетках содержатся вещества, катализирующие определенные реакции, и что эти вещества можно выделять из клеток и изучать методами химии. В 30-х годах XX в. некоторые ферменты были получены в высокоочищенном кристаллическом состоянии. По химической природе кристаллы оказались белковыми, и это послужило первым надежным доказательством того, что ферменты представляют собой белки.

СУЩНОСТЬ КАТАЛИЗА

История изучения ферментов тесно переплетается с историей изучения катализа вообще. Напомним, что катализом называют ускорение химической реакции, вызванное добавлением малых, нестехиометрических количеств определенного вещества — катализатора. Например, платина ускоряет разложение пероксида водорода на кислород и воду, кислоты ускоряют разложение белков на аминокислоты, крахмала на глюкозу, мочевины на CO_2 и NH_3, и т. д. После завершения реакции катализатор обнаруживается в смеси в том же количестве, в каком был добавлен. Шведский химик Я. Берцелиус в 1835 г. опубликовал работу, в которой сопоставлял такие процессы, как брожение, действие солода на крахмал, переваривающее

действие желудочного сока, с одной стороны, и разложение крахмала под действием кислот, разложение пероксида водорода платиной и т. п. — с другой стороны. Он правильно отметил то общее, что объединяет эти процессы: катализатор участвует в реакции не в стехиометрических количествах; казалось, что катализатор вообще не участвует в реакции, а влияет на нее только своим присутствием. Именно Берцелиус ввел в употребление термин «катализ» в его теперешнем значении (прежде этот термин применялся как синоним термина «разложение»).

Разумеется, катализатор ускоряет реакцию не просто своим присутствием, а взаимодействуя с веществом, подвергающимся превращению. Разберем такой пример. Оксид серы (II) (сернистый ангидрид) при взаимодействии с кислородом окисляется в оксид серы (III) (серный ангидрид):

$$SO_2 + {}^1/_2O_2 = SO_3. \qquad (1)$$

Если к этой реагирующей смеси добавить диоксид азота, то образование SO_3 ускоряется. Это происходит потому, что в присутствии диоксида азота начинается еще одна реакция, ведущая тоже к образованию SO_3:

$$SO_2 + NO_2 = SO_3 + NO. \qquad (2)$$

Образующийся оксид азота, в свою очередь, может окисляться кислородом, снова превращаясь в диоксид:

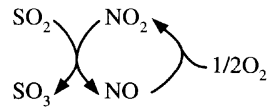
$$NO + {}^1/_2O_2 = NO_2. \qquad (3)$$

Это обстоятельство и позволяет выделить диоксид азота как катализатор среди прочих реагентов. Поскольку диоксид азота не расходуется (точнее, сначала расходуется, но тут же и регенерируется), его можно добавлять в небольших, «каталитических» количествах, в то время как другие реагенты (SO_2 и O_2) требуются в эквимолярных, стехиометрических количествах.

Таким образом, в смеси одновременно протекают реакция (1) и система реакций (2) и (3). Реакции (2) и (3) образуют единый процесс, поскольку это последовательные реакции:

$$NO_2 \xrightarrow{SO_2 \rightarrow SO_3} NO \xrightarrow{1/2O_2} NO_2$$

Начало и конец этой схемы одинаковы, поэтому ее можно представить так:



(4)

Из схемы видно, что катализатор совершает циклические превращения, принимая попеременно формы NO_2 и NO, и в ходе этих превращений осуществляет перенос атома кислорода на молекулу SO_2. Следовательно, одна молекула катализатора может превратить в SO_3 сколько угодно большое количество молекул SO_2.

В реакции (1) и в системе реакций (4) исходные вещества и конечные продукты одинаковы, различны лишь пути. Иначе говоря, катализатор открывает новый, дополнительный путь превращения исходных веществ в продукты реакции, и тем самым увеличивает скорость образования продукта. Если скорость

каталитического процесса такая же, как скорость некаталитической реакции, то после добавления катализатора общая скорость образования продукта возрастает вдвое. Следовательно, можно сказать, что суть каталитических реакций не столько в том, что скорость их велика (она может быть и небольшой), сколько в том, что они заключают в себе циклический процесс, в котором один из реагентов (катализатор) претерпевает попеременные превращения из одной формы в другую, затем снова в первую и т. д., перерабатывая в каждом цикле по одной молекуле исходного вещества в продукт.

Скорость катализируемых реакций

В организмах в процессе биологической эволюции, а также в технике при разработке химических технологических процессов отбирались в качестве катализаторов такие вещества, реакции с которыми протекают очень быстро — в тысячи, в миллионы, даже в 10^{10} раз быстрее, чем соответствующие некаталитические реакции. Такое различие скоростей позволяет вообще пренебречь некатализируемым процессом и считать, что все вещество подвергается превращению при участии катализатора. Рассмотренный выше каталитический процесс (4) составляет основу нитрозного метода получения серной кислоты; скорость этого процесса настолько выше скорости некаталитической реакции (1), что практически все молекулы SO_2 превращаются в молекулы SO_3 при участии NO_2, т. е. вкладом реакции (1) в образование продукта можно пренебречь. В организме человека ежесуточно распадается около 0,5 кг глюкозы до CO_2 и H_2O; в отсутствие катализаторов для этого при тех же физических условиях потребовалось бы около 10 000 лет. Таким образом, и в этом случае можно считать, что практически вся глюкоза в организме распадается в катализируемых реакциях.

Рассмотренный выше пример катализа (синтез SO_3) представляет собой ковалентный катализ: катализатор образует ковалентное соединение с исходным веществом. Существует и нековалентный катализ: в этом случае катализатор соединяется с реагентами за счет слабых взаимодействий, например адсорбционных. Однако во всех случаях общим для катализа является то, что катализатор открывает новый путь превращения вещества через новые промежуточные состояния в те же продукты, которые могут образоваться и без катализатора. В реакциях, катализируемых ферментами, в промежуточных продуктах возникают как ковалентные, так и нековалентные связи.

Катализ и энергия активации реакций

Скорость реакции чаще всего определяется ее энергией активации, т. е. той энергией, которую нужно сообщить молекулам, чтобы началось химическое превращение (рис. 2.1).

Чем больше энергия активации, тем меньше скорость реакции. Энергия активации зависит от природы реагирующих молекул, от их внутреннего строения. Например, энергия активации реакции SO_2 с кислородом больше, чем энергия активации реакции SO_2 с NO_2. Источником энергии активации обычно служит тепловое движение молекул (поэтому при повышении температуры скорость реакций увеличивается).

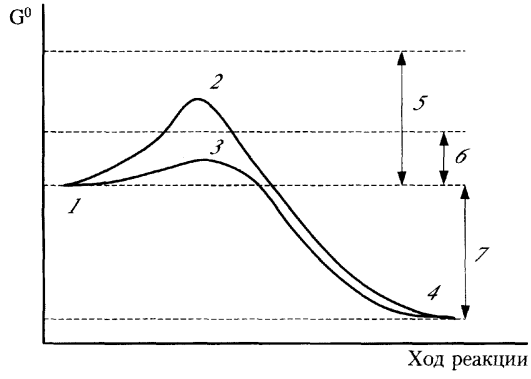


Рис. 2.1. Изменения энергии Гиббса в процессе реакции:

1 — исходное состояние; переходное состояние некатализируемой (*2*) и катализируемой (*3*) реакций; *4* — конечное состояние обеих систем; энергия активации некатализируемой (*5*) и катализируемой (*6*) реакций; *7* — конечное изменение свободной энергии обеих систем

Энергия активации быстро протекающих катализируемых реакций ниже, чем энергия активации соответствующих некатализируемых реакций. На этом основании часто говорят, что катализатор снижает энергию активации реакции. Однако надо помнить, что катализируемая реакция — это другая реакция, и было бы точнее говорить, что в присутствии катализатора реакцию с высокой энергией активации заменяет реакция с низкой энергией активации.

Ферменты — это белки, и, подобно всем белкам, они могут избирательно присоединять определенные вещества — лиганды. Однако в отличие от прочих белков фермент катализирует химическое превращение лиганда. Лиганд, подвергающийся химическому превращению, называют субстратом фермента; продукты реакции освобождаются в раствор. Учение о ферментах (энзимология) традиционно занимает одно из ведущих мест в биохимии. Это объясняется той важной ролью, которую играют ферменты: любые химические превращения веществ в организме происходят при их участии. Однако есть и другая причина особого внимания к ферментам, не связанная с их биологической ролью. Дело в том, что ферменты, в отличие от большинства других белков, сравнительно легко обнаруживать и измерять их количество по катализируемой ими реакции. Многие свойства, характерные для всех белков, вначале были изучены на ферментах. Такие понятия, как активный центр, ингибиторы, изоферменты (изобелки), аллостерическая регуляция, возникли и сложились в энзимологии, и лишь позднее они распространились на другие белки.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Наиболее характерная черта, отличающая ферменты от других катализаторов — высокая специфичность их действия. Активный центр ферментов, как и других белков, образован боковыми группами аминокислотных остатков пептидной цепи. Строение активных центров ферментов, катализирующих разные реакции, различно. Структура активного центра фермента комплементарна структуре его субстрата, вследствие чего данный фермент из множества веществ, имеющихся в

живой клетке, присоединяет только свой субстрат. Эту особенность называют субстратной специфичностью фермента. Например, структура активного центра фермента гистидазы комплементарна структуре аминокислоты гистидина, поэтому возможно образование фермент-субстратного комплекса гистидаза—гистидин; другие вещества, в том числе аминокислоты, не связываются гистидазой.

Кроме того, часть функциональных групп активного центра ферментов имеет такое строение и реакционную способность, что обеспечивается химическое превращение субстрата в новые вещества — продукты ферментативной реакции. Каждый фермент катализирует не любое из всех возможных химических превращений субстрата, а какое-либо одно. Назовем это свойство специфичностью пути превращения. Например, гистидаза и гистидиндекарбоксилаза имеют одинаковую субстратную специфичность, но катализируют разные превращения гистидина (рис. 2.2). При действии гистидазы отщепляется аминогруппа (в форме NH_3), а при действии гистидиндекарбоксилазы — карбоксильная группа (в форме CO_2).

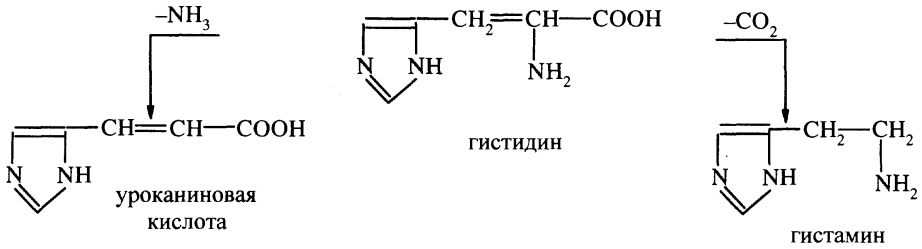
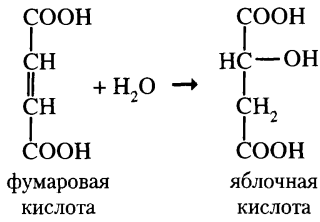
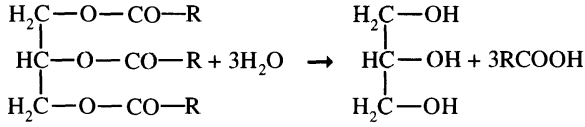


Рис. 2.2. Реакции, катализируемые гистидазой и гистидиндекарбоксилазой

Различают абсолютную и групповую специфичность ферментов. Фермент с абсолютной специфичностью катализирует превращение какого-либо одного субстрата. Например, фумараза катализирует только реакцию фумаровой кислоты с водой:



Ферменты с групповой специфичностью катализируют однотипные превращения сходных по строению веществ. Например, липаза ускоряет гидролиз жиров (триацилглицеринов) на глицерин и жирные кислоты:



Жиры — это группа соединений, отдельные представители которых различаются природой жирно-кислотных остатков (радикалов R). Липаза расщепляет жиры, включающие разные жирно-кислотные остатки. Другой пример групповой

специфичности — действие ферментов, гидролизующих пептиды и белки: многие из этих ферментов расщепляют пептидные связи, образованные разными аминокислотами.

Пространственная структура стереоизомеров вещества различна, поэтому активный центр фермента, комплементарный одному стереоизомеру, не обязательно будет комплементарен и другим стереоизомерам. В связи с этим многие ферменты катализируют превращение лишь одного из стереоизомеров — стереоспецифичность. Например, малеиновая кислота, являющаяся *цис*-изомером фумаровой кислоты (рис. 2.3), не может быть субстратом фумаразы.

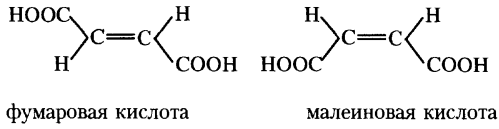


Рис. 2.3. Строение фумаровой (*а*) и малеиновой (*б*) кислот

Большинство ферментов, участвующих в превращениях аминокислот, действует лишь на L-изомеры аминокислот, а ферменты, катализирующие превращения углеводов, — на D-изомеры углеводов.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИ СОПРЯЖЕННЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ

Ферменты, как и другие катализаторы, не изменяют состояния равновесия, а лишь ускоряют его достижение. Например, если внести фумаразу в раствор фумаровой кислоты, то можно зарегистрировать реакцию фумарат → малат*; если же внести тот же фермент в раствор яблочной кислоты (малат), то можно наблюдать реакцию малат → фумарат. И в том и в другом случае достигается равновесное состояние, при котором отношение [фумарат]/[малат] = $^1/_4$. Напомним, что химические реакции самопроизвольно протекают в направлении, которое связано с уменьшением в системе свободной энергии ΔG (энергии Гиббса) – экзергонические реакции. Реакции, связанные с увеличением свободной энергии (эндергонические реакции), не могут протекать самопроизвольно. Но все же они возможны, если имеются внешний источник и механизм использования энергии; при этом общая энергия Гиббса системы эндергонической реакции и системы, поставляющей энергию, уменьшается.

В качестве меры возможности и направления реакции обычно используют *изменение стандартной свободной энергии реакции* ΔG^0 — термин, применяемый для описания изменений в условиях, когда концентрации исходных веществ и продуктов реакции поддерживаются на уровне 1 моль/л (ΔG без надстрочного индекса ^{0} — изменение свободной энергии при любых условиях). Если известна константа равновесия реакции $K_{равн}$, то можно вычислить и ΔG^0:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{равн}.$$

* Кислоты в тканях находятся главным образом в ионизированной форме, поэтому в биохимии для их обозначения часто пользуются названиями ионов (к тому же более короткими): глутамат (глутаминовая кислота), аспартат (аспарагиновая кислота), фумарат (фумаровая кислота), 2-оксоглутарат (2-оксоглутаровая кислота) и т. д.

Рассмотрим реакцию А → В. Для этой реакции $K_{равн}$ = [В] / [А], где [А] и [В] — концентрации веществ А и В в состоянии равновесия. Это уравнение позволяет предсказать направление, в котором будет протекать реакция:

- если $K_{равн} > 1$, то $\Delta G^0 < 0$, и реакция будет протекать самопроизвольно (А → В) с освобождением энергии, которая может быть трансформирована в работу (экзергоническая реакция);
- если $K_{равн} = 1$, то $\Delta G^0 = 0$, и реакция будет в равновесии (А ⇆ В);
- если $K_{равн} < 1$, то $\Delta G^0 > 0$, прямая реакция А → В невозможна без внешнего источника энергии (эндергоническая реакция), но будет протекать обратная реакция В → А.

В цепи последовательных реакций (например А → Б → В → Г → Д) величины ΔG^0 суммируются, и даже если для некоторых реакций $\Delta G^0 > 0$ (эндергонические реакции), но суммарная величина < 0, то исходный субстрат пройдет всю цепочку превращений.

АТФ — источник энергии для эндергонических реакций

В живой клетке источником энергии для эндергонических реакций чаще всего служит экзергоническая реакция гидролиза аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). АТФ представляет собой производное аденина, рибозы и фосфорной кислоты (рис. 2.4).

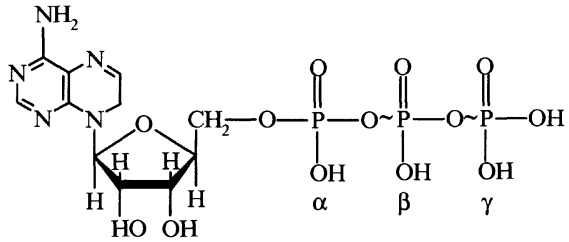


Рис. 2.4. Строение АТФ

При гидролитическом отщеплении γ-фосфатного остатка или пирофосфатного остатка (гидролизуется связь между α- и β-фосфатными остатками) освобождается значительное количество энергии, около 50 кДж/моль:

$$АТФ + H_2O \rightarrow АДФ + H_3PO_4 + энергия\ (\Delta G^0 = -50 кДж/моль).$$

$$АТФ + H_2O \rightarrow АМФ + H_4P_2O_7 + энергия\ (\Delta G^0 = -50 кДж/моль).$$

(здесь АДФ — аденозиндифосфорная кислота; АМФ — аденозинмонофосфорная кислота). Гидролизуемые в этих реакциях связи называют высокоэнергетическими (макроэргическими) и обозначают знаком ~ (тильда). Отметим, что энергия освобождается при любых реакциях гидролиза, но в меньших количествах, чем при гидролизе макроэргических связей (подробнее об этих связях см. в гл. 8).

Рассмотрим следующий пример. Глутамин в водном растворе самопроизвольно гидролизуется с образованием глутамата и аммиака (рис. 2.5). ΔG^0 этой реакции составляет −15 кДж/моль; равновесие сильно смещено вправо (реакция

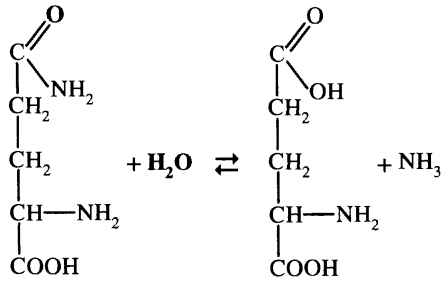


Рис. 2.5. Гидролиз глутамина

практически необратима). Скорость гидролиза в отсутствие катализатора невелика; в живой клетке реакция катализируется ферментом глутаминазой.

Обратное направление реакции — несамопроизвольный процесс: для того чтобы происходил синтез глутамина, нужен внешний источник энергии, а также механизм использования этой энергии; кроме того, чтобы реакция протекала достаточно быстро, нужен катализатор. Источником энергии в таких реакциях служит АТФ, а две другие функции выполняют ферменты лигазы (синтетазы).

Синтез глутамина происходит при участии глутаминсинтетазы:

$$\text{Глутамат} + NH_3 + \text{АТФ} \rightarrow \text{Глутамин} + \text{АДФ} + H_3PO_4$$

Эту реакцию можно представить как две сопряженно протекающие реакции:

$$\text{АТФ} + H_2O \rightarrow \text{АДФ} + H_3PO_4 \qquad \Delta G^0 = -50 \text{ кДж/моль}$$

$$\text{Глутамат} + NH_3 \rightarrow \text{Глутамин} + H_2O \qquad \Delta G^0 = +15 \text{ кДж/моль}$$

$$\text{Глутамат} + NH_3 + \text{АТФ} \rightarrow \text{Глутамин} + \text{АДФ} + H_3PO_4 \qquad \Delta G^0 = -35 \text{ кДж/моль}$$

Первая реакция — самопроизвольная ($\Delta G^0 < 0$), экзергоническая; вторая — несамопроизвольная ($\Delta G^0 > 0$), эндергоническая. Часть энергии, освобождающейся в первой реакции, поглощается во второй реакции. Другая же часть рассеивается в виде теплоты, так что энергия Гиббса системы в целом уменьшается. Вследствие этого весь сопряженный процесс в целом является самопроизвольным ($\Delta G^0 < 0$), экзергоническим.

Сопряжение двух реакций достигается в активном центре фермента в результате образования промежуточного соединения АТФ с глутаматом: концевой фосфатный остаток АТФ соединяется с γ-карбоксильной группой глутамата. С этим высокоэнергетическим промежуточным соединением реагирует аммиак.

Многочисленные реакции, катализируемые синтетазами, — один из основных путей использования энергии АТФ в организме.

КОФАКТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

Многие ферменты для проявления каталитической активности нуждаются в присутствии некоторых веществ непептидной природы — кофакторов. Различают две группы кофакторов: ионы металлов (а также некоторые неорганические анионы) и коферменты, которые представляют собой органические вещества.

Металлозависимые ферменты

Примерно треть всех известных ферментов содержит ион металла или активируется ионами металла. Прочность связи металлов с белковой частью фермента колеблется в широких пределах. Некоторые ферменты в процессе их выделения утрачивают ион металла вследствие диссоциации, так что при измерении активности фермента приходится эти ионы добавлять — это ферменты, активируемые металлами. Другие ферменты сохраняют ион металла при очистке — это металлоферменты (металлопротеины). Деление на эти группы условно, поскольку между крайними формами существует ряд промежуточных форм.

В роли кофактора могут выступать ионы различных металлов (табл. 2.1). Ион металла может участвовать в присоединении субстрата, собственно в катализе, в стабилизации оптимальной конформации молекулы фермента, в стабилизации четвертичной структуры. Активность металлозависимых ферментов после удаления металла либо утрачивается полностью, либо заметно снижается.

Таблица 2.1. Некоторые металлозависимые фермены

Фермент	Ион металла	Функция иона металла
Аденилатдезаминаза	K^+	Стабилизация третичной структуры
Гексокиназа	Mg^{2+}	Связывание субстрата
Енолаза	$3Mg^{2+}$	Связывание субстрата и катализ
Пируваткиназа	Mg^{2+}, K^+	То же
Лейцинаминопептидаза	Mn^{2+} или Mg^{2+}	Связывания субстрата
Аргиназа	$4Mn^{2+}$	Связывание субстрата и катализ
Пируваткарбоксилаза	$4Mn^{2+}$	Катализ
α-Амилаза	Ca^{2+} (и анион Cl^-)	Стабилизация третичной структуры
Транскетолаза	Ca^{2+}	Стабилизация четвертичной структуры
Карбоксипептидаза А	Zn^{2+}	Катализ
Фосфатаза (щелочная)	$2Zn^{2+}$	Связывание субстрата и катализ
Аспартаттранскарбамоилаза	$6Zn^{2+}$	Стабилизация четвертичной структуры
Супероксиддисмутаза	$2Zn^{2+}$, $2Cu^{2+}$	Катализ
Тирозиназа	$2Cu^{2+}$	»
Моноаминоксидаза	$4Cu^{2+}$	»
Церулоплазмин	$8Cu^{2+}$	»
Оксигеназа *п*-оксифенилпирувата	$2Fe^{2+}$	»
Ксантиноксидаза (ФАД)	$2Mo^{6+}$, $2Fe_4S_4$	»

Коферменты

Коферменты — это органические вещества, как правило, неаминокислотной природы, непосредственно участвующие в катализе в составе фермента.

В табл. 2.2 приведены некоторые наиболее распространенные коферменты. Многие коферменты являются производными витаминов — незаменимых пищевых факторов (см. гл. 7). Отметим, что в числе коферментов есть такие, которые содержат металл: кобальт в кобаламидах, железо в геме.

Таблица 2.2. Важнейшие коферменты и витамины, входящие в их состав

Кофермент	Основная функция	Витамин
Коферменты дегидрогеназ:	Перенос водорода	
НАД, НАДФ		Никотиновая кислота
ФАД, ФМН		Витамин B_2 (рибофлавин)
KoQ (кофермент Q)		—
Тиаминпирофосфат	Декарбоксилирование α-кетокислот	Витамин B_1 (тиамин)
Коферемнт ацилирования (KoA)	Перенос ацильных групп	Пантотеновая кислота
Тетрагидрофолиевая кислота	Перенос одноуглеродных групп	Фолиевая кислота
Пиридоксальфосфат	Перенос аминогрупп	Витамин B_6 (пиридоксин)
Биотин	Перенос CO_2	Биотин
Гем	Перенос электронов	—
Кобаламины	Перенос алкильных групп	Витамин B_{12}

Фермент, содержащий кофермент, называют холоферментом, а белковую часть такого фермента — апоферментом. Реакция образования холофермента обратима:

$$\text{Кофермент} + \text{Апофермент} \rightleftarrows \text{Холофермент}$$

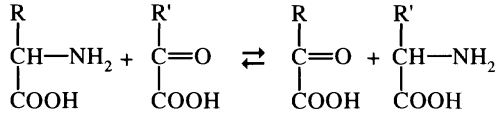
В некоторых случаях в условиях живой клетки равновесие сильно сдвинуто влево, и кофермент присоединяется к апоферменту вместе с субстратом в момент реакции. Другой крайний случай — стабильные холоферменты, содержащие прочно связанный кофермент. Такие ферменты представляют собой сложные белки.

Взаимодействие кофермента с апоферментом отличается высокой специфичностью. Это объясняется, как и в случае субстратной специфичности, наличием в апоферменте центра связывания, комплементарного коферменту.

Ниже описаны некоторые важные типы реакций, катализируемых ферментами с участием коферментов.

Аминотрансферазы

Эти ферменты катализируют реакции трансаминирования, переноса аминогруппы с α-аминокислоты на α-кетокислоту:



Реакции трансаминирования открыты и подробно изучены А. Е. Браунштейном с сотр. (1937).

Коферментом аминотрансфераз служит пиридоксальфосфат — производное пиридоксина (витамина B_6). Пиридоксальфосфат в ходе реакции трансаминирования образует пиридоксаминфосфат (рис. 2.6).

Пиридоксальфосфат присоединяется к центру связывания на молекуле белка за счет образования альдиминной связи с ε-аминогруппой одного из остатков лизина (Lys258) пептидной цепи (рис. 2.7; см. также рис. 1.7). Кроме того, между белком и пиридоксальфосфатом образуются ионные связи с участием фосфатного остатка и заряженного атома азота в пиридиновом цикле.

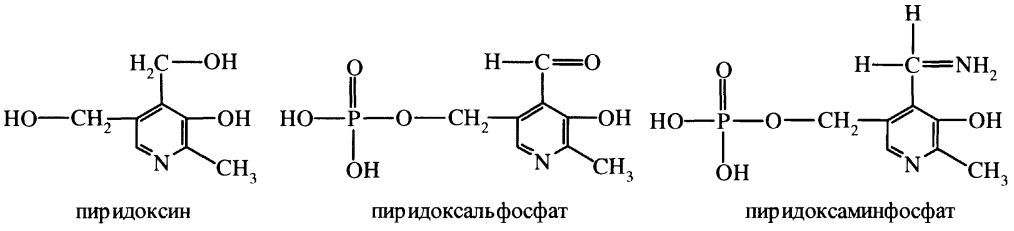


Рис. 2.6. Пиридоксин и его коферментные формы

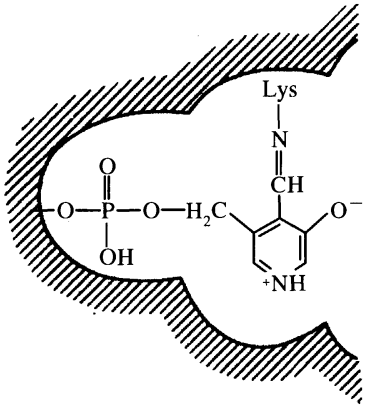
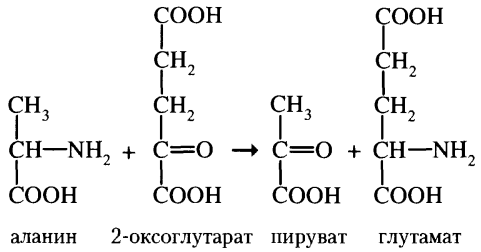


Рис. 2.7. Пиридоксальфосфат в активном центре фермента

В организме человека имеется несколько аминотрансфераз, различающихся субстратной специфичностью. Аланин-2-оксоглутаратаминотрансфераза катализирует перенос аминогруппы с аланина на 2-оксоглутарат (α-кетоглутарат):



Реакции трансаминирования проходят в две стадии (полуреакции). Если к раствору фермента добавить только один из двух субстратов — аланин, то произойдет первая полуреакция (рис. 2.8). Аминогруппа аланина присоединяется к углероду альдиминной группы фермента: альдиминная связь между коферментом и белком заменяется на альдиминную связь между коферментом и аланином. Далее происходит внутримолекулярная перестройка в области альдиминной связи (см. рис. 2.8) и затем гидролиз с образованием аминогруппы на коферменте и кетогруппы на бывшей аминокислоте (теперь это уже α-кетокислота). В целом в результате этой полуреакции пиридоксальфосфат (точнее, пиридоксальдимин-

фосфат) превращается в пиридоксаминфосфат, а аланин — в пировиноградную кислоту:

Пиридоксальдиминфосфат • Фермент + Аланин + H_2O ⇄
⇄ Пиридоксаминфосфат • Фермент + Пируват

При наличии второго субстрата — 2-оксоглутаровой кислоты — произойдет вторая полуреакция:

Пиридоксаминфосфат • Фермент + 2-Оксоглутарат ⇄
⇄ Пиридоксальдиминфосфат • Фермент + Глутамат + H_2O

В этой полуреакции фермент переходит в начальную (альдиминную) форму, и образуется второй продукт реакции — глутамат. Механизм этой полуреакции такой же, как и первой, но протекает она в обратном направлении. Суммарный результат двух полуреакций — перенос аминогруппы с аланина на 2-оксоглутарат.

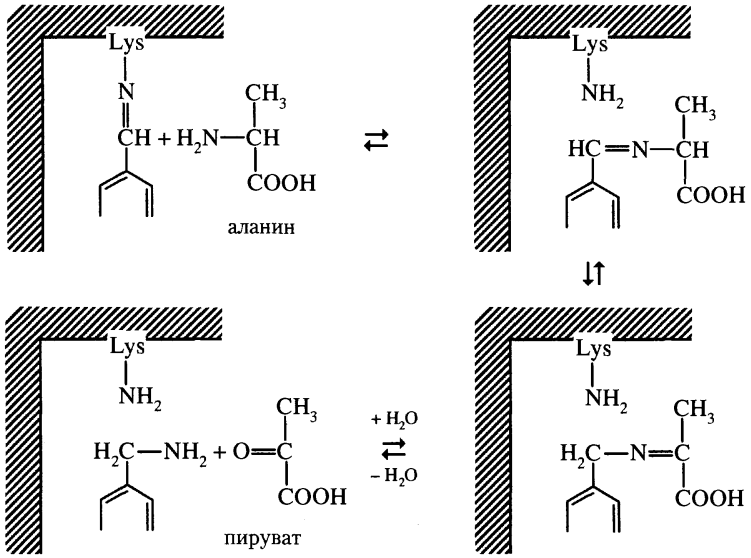


Рис. 2.8. Полуреакция трансаминирования

Конечно, в этом процессе участвуют и функциональные группы белковой части фермента, а не только кофермент. Субстратная специфичность разных аминотрансфераз определяется исключительно белковой частью, поскольку кофермент во всех случаях один и тот же. Специфичность пути превращения также зависит от белковой части, поскольку пиридоксальфосфат функционирует в качестве кофермента не только в реакциях трансаминирования, но и в некоторых реакциях других типов (изомеризация, декарбоксилирование, дегидратация).

НАД-зависимые дегидрогеназы

В реакциях, катализируемых этими ферментами, в качестве кофермента участвует никотинамидадениндинуклеотид (НАД). Две половины молекулы НАД,

объединенные связью между остатками фосфорной кислоты, построены по одинаковому плану (рис. 2.9). Одна половина представляет собой остаток нуклеотида (адениловой кислоты). Другая половина тоже нуклеотид; его азотсодержащая гетероциклическая группа представлена амидом никотиновой кислоты. Никотиновая кислота — это витамин PP.

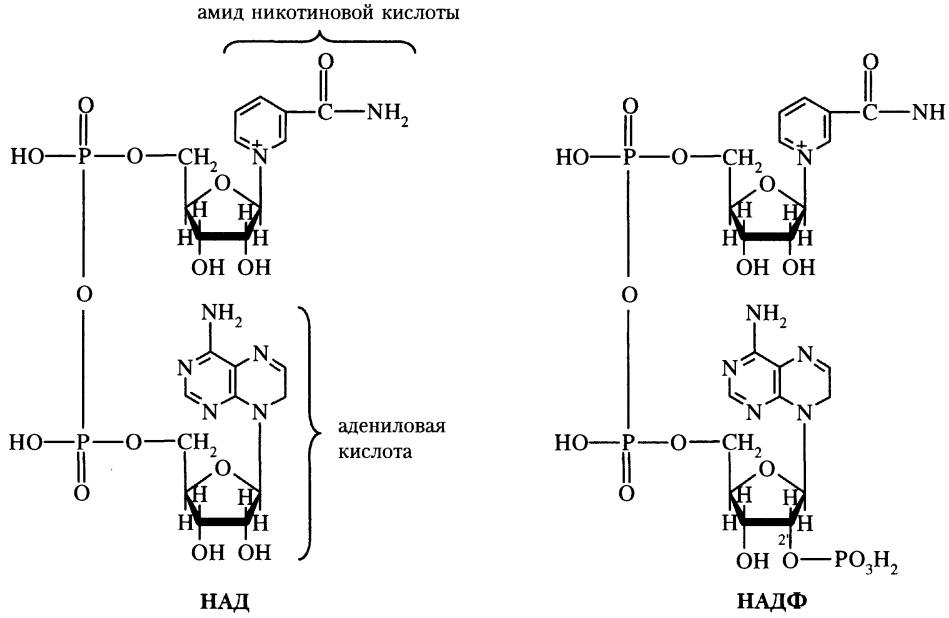


Рис. 2.9. Строение НАД и НАДФ

НАД-зависимые дегидрогеназы катализируют реакции окисления веществ путем дегидрирования; при этом окисляемое вещество служит донором водорода ($ДH_2$), а НАД выполняет роль акцептора водорода, т. е. восстанавливается. Остаток никотинамида в молекуле НАД принимает непосредственное участие в реакции (рис. 2.10).

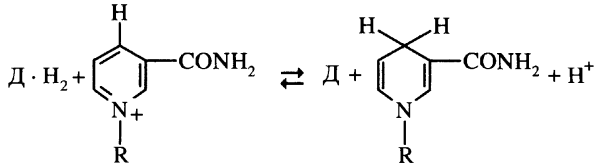


Рис. 2.10. Роль никотинамида в реакциях дегидрирования

Отметим, что из двух атомов водорода (2 протона + 2 электрона), отщепляемых от субстрата, к НАД присоединяются один протон (второй переходит в среду) и два электрона, в результате чего утрачивается положительный заряд пиридинового цикла НАД. Поэтому в уравнениях окисленный и восстановленный НАД изображают следующим образом:

$$Д \cdot H_2 + НАД^+ \rightleftarrows Д + НАДН + H^+.$$

Например, лактатдегидрогеназа катализирует дегидрирование молочной кислоты с образованием пировиноградной кислоты:

$$CH_3{-}CHOH{-}COOH + НАД^+ \rightarrow CH_3{-}CO{-}COOH + НАД{\bullet}H + H^+$$

Равновесие реакции

$$НАД^+ + апофермент \rightleftarrows Холофермент$$

сильно смещено влево: НАД находится в цитозоле в свободном состоянии и взаимодействует с ферментом в момент реакции; НАДН тоже находится преимущественно в свободном состоянии. Таким образом, кофермент в этих реакциях вполне подобен субстратам ферментов.

НАД-зависимые дегидрогеназы катализируют следующие типы реакций.

1. Дегидрирование гидроксильных групп. Примером может служить приведенная выше реакция, катализируемая лактатдегидрогеназой.
2. Дегидрирование альдегидных групп. Примером может служить дегидрирование глицеральдегид-3-фосфата (рис. 2.11).

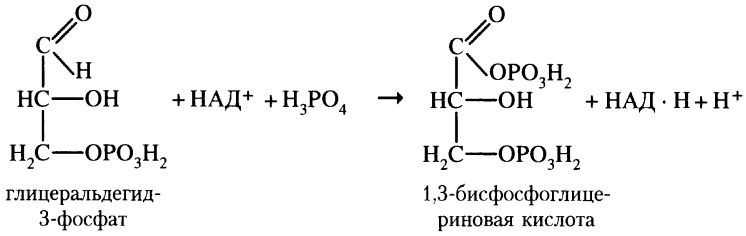
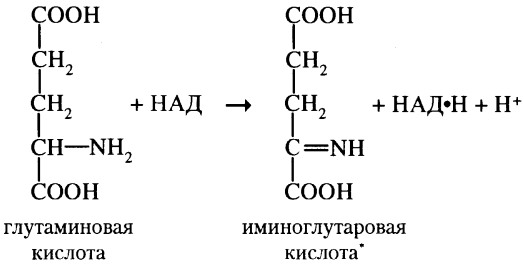


Рис. 2.11. Дегидрирование глицеральдегидфосфата

3. Дегидрирование аминогрупп. Например, глутаматдегидрогеназа катализирует дегидрирование глутаминовой кислоты:



Такого же типа реакции катализируют дегидрогеназы, использующие в качестве кофермента никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ). Этот кофермент отличается от НАД только наличием дополнительного фосфатного остатка в положении 2 остатка рибозы в адениловой части молекулы. Однако биологические функции НАД и НАДФ различны (подробнее об этом см. в гл. 8).

* Иминоглутаровая кислота нестабильна и неферментативно распадается на α-кетоглутаровую кислоту и аммиак (см. гл. 11).

Флавиновые дегидрогеназы

Для этой группы дегидрогеназ коферментами служат флавинадениндинуклеотид (ФАД) или флавинмононуклеотид (ФМН). Эти коферменты являются производными рибофлавина (витамина B_2). Рибофлавин содержит циклическую изоаллоксазиновую группировку и остаток пятиатомного спирта рибитола [7,8-диметил-10(1′-рибитил)-изоаллоксазин]. ФМН представляет собой рибофлавин-5′-фосфат, а ФАД, кроме того, содержит остаток адениловой кислоты (рис. 2.12).

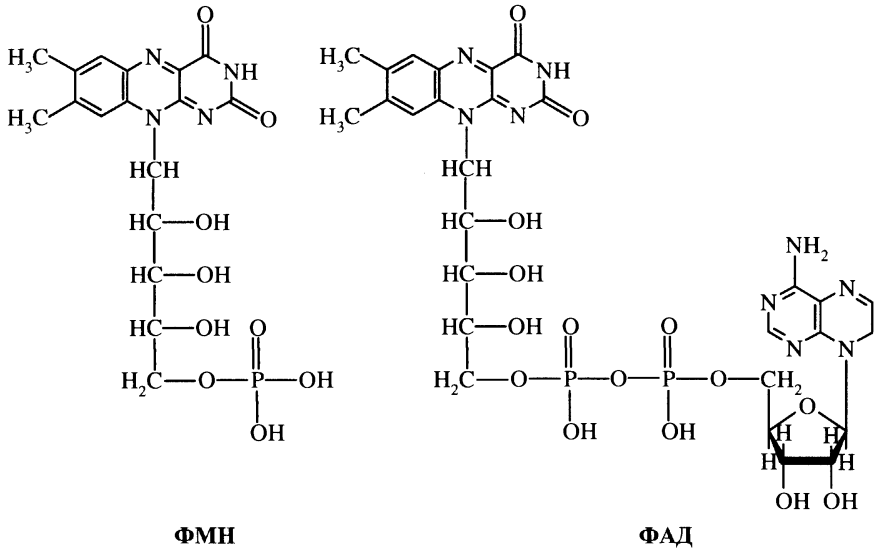


Рис. 2.12. Строение флавиновых коферментов

Флавиновые коферменты прочно связаны с апоферментами, следовательно, флавиновые дегидрогеназы — это сложные белки. В ходе реакции отщепляемые от субстрата атомы водорода присоединяются к изоаллоксазиновой группировке кофермента (рис. 2.13).

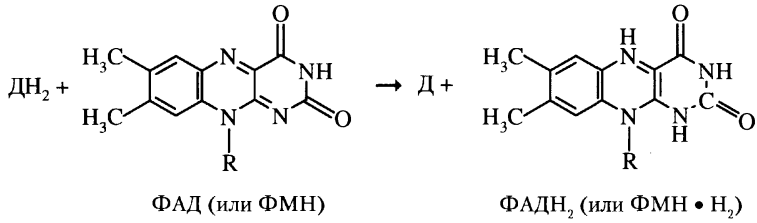
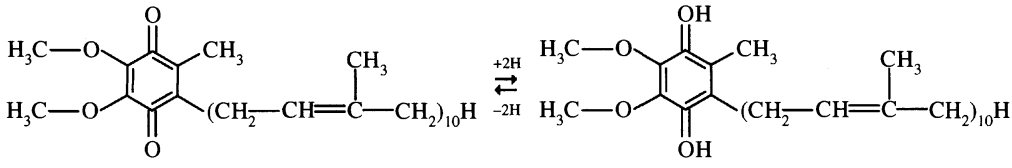


Рис. 2.13. Гидрирование ФАД и ФМН

К флавиновым ферментам, содержащим ФМН, принадлежит НАДН-дегидрогеназа, которая окисляет НАДН. Акцептором водорода в этой реакции служит кофермент Q (убихинон), который в клетке может существовать в окисленной (убихинон, Q) и восстановленной (убихинол, QH_2) формах (рис. 2.14).



убихинон (Q) убихинол (QH_2)

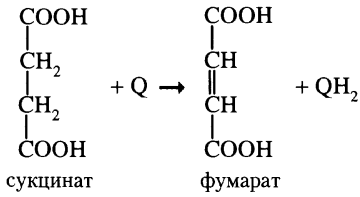
Рис. 2.14. Строение убихинона и убихинола

НАДН-дегидрогеназа переносит водород с НАДН на убихинон:

$$НАДН^+ + H^+ + Q \rightarrow НАД^+ + QH_2$$

При этом атомы водорода сначала присоединяются к ФМН в составе НАДН-дегидрогеназы (первая полуреакция), а затем передаются на убихинон (вторая полуреакция).

Дегидрогеназы, содержащие ФАД, катализируют отщепление водорода от групп $—CH_2—CH_2—$ с образованием двойной связи. Примером может служить сукцинатдегидрогеназа, катализирующая окисление янтарной кислоты (сукцината); акцептором водорода и в этом случае служит убихинон:



Атомы водорода сначала присоединяются к ФАД в составе фермента, а затем передаются на убихинон.

Кофермент ацилирования (кофермент А, коэнзим А, КоА)

Молекула кофермента А построена из аденозин-3′-фосфат-5′-пирофосфата, соединенного сложноэфирной связью с пантотеновой кислотой, которая, в свою очередь, соединена амидной связью с β-меркаптоэтиламином (тиоэтаноламином) — см. рис. 2.15.

Пантотеновая кислота является витамином. Кофермент А участвует во множестве превращений карбоновых кислот в живой клетке. Карбоновые кислоты присоединяются своей карбоксильной группой к SH-группе кофермента А, образуя тиоэфирную связь. Эта связь имеет высокоэнергетический характер. В уравнениях реакций кофермент изображают символом HS-КоА, а ацильные производные — ацил-S-КоА или просто ацил-КоА (ацетил-КоА, пальмитил-КоА, сукцинил-КоА и т. п.).

Ацильные производные КоА чаще всего образуются при действии ферментов, относящихся к группе ацил-КоА-синтетаз. Реакция может иметь следующий вид:

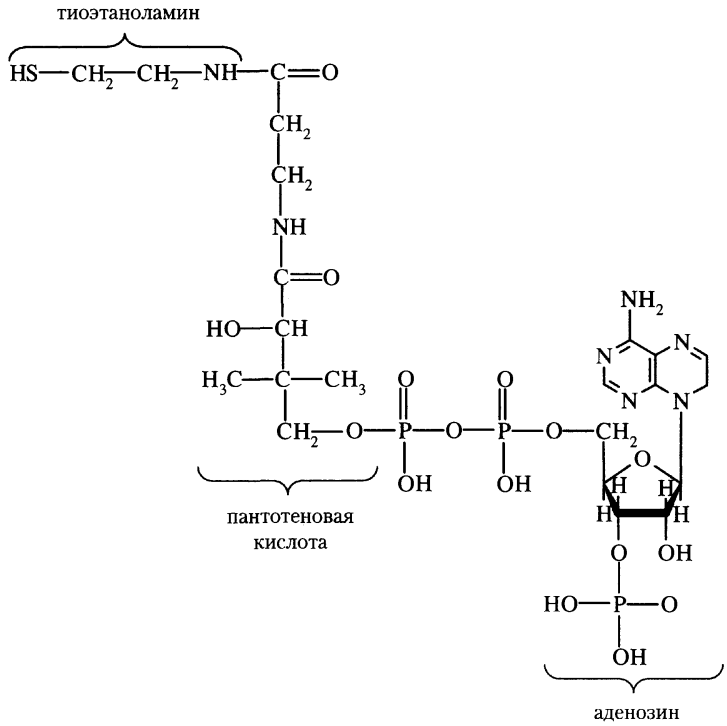
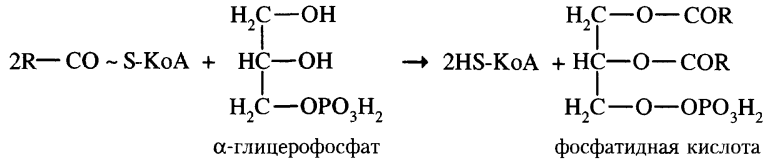


Рис. 2.15. Строение кофермента А

В этой реакции АТФ используется в качестве источника энергии при образовании высокоэнергетической тиоэфирной связи в ацил-КоА. Ацильный остаток в составе ацил-КоА может подвергаться многообразным превращениям или может быть перенесен без изменений на другое вещество. Реакции переноса катализируются ферментами группы ацилтрансфераз. Например, таким путем происходит перенос остатков высших жирных кислот на α-глицерофосфат при синтезе жиров:



КоА и его ацильные производные находятся в клетке в свободном состоянии и взаимодействуют с ферментом в момент реакции вместе с субстратом, являясь, по существу, вторым субстратом фермента.

Из рассмотренных примеров видно, что каждый из коферментов может существовать в двух формах, циклически превращающихся друг в друга: ФАД и ФАД•H_2, КоА и ацил-КоА, и т. д. Некоторые коферменты можно рассматривать как часть активного центра фермента, например пиридоксальфосфат, ФАД, ФМН. Другие же участвуют в ферментативных реакциях скорее как субстраты (регенерирующиеся

субстраты) — НАД, КоА; в этом случае превращение кофермента из одной формы в другую может происходить в результате действия двух разных ферментов. Например, превращение КоА в ацил-КоА катализирует ацил-КоА-синтетаза, а регенерация КоА происходит при действии ацилтрансферазы.

КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

В основе классификации ферментов лежит специфичность их действия. Все ферменты разделены на шесть основных классов по типу катализируемых ими реакций (табл. 2.3). Каждый класс разделен на подклассы и далее — на подподклассы по тому же принципу, т. е. по типу реакций.

Таблица 2.3. Классы ферментов

Номер класса	Класс	Катализируемые реакции
1	Оксидоредуктазы	Окислительно-восстановительные
2	Трансферазы	Перенос групп
3	Гидролазы	Гидролиз
4	Лиазы	Расщепление негидролитическим путем связей С—С, отщепление групп с образованием двойной связи, присоединение по двойной связи
5	Изомеразы	Изомерные превращения
6	Лигазы (синтетазы)	Присоединение друг к другу двух молекул с использованием энергии высокоэнергетических связей АТФ (или других высокоэнергетических соединений)

Оксидоредуктазы. Класс оксидоредуктаз включает ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции разных типов. В частности, в него входят НАД-зависимые и флавиновые дегидрогеназы, рассмотренные выше.

Другой тип оксидоредуктаз — оксидазы. Эти ферменты катализируют окисление субстратов путем присоединения кислорода. Так, аминоксидазы окисляют амины с образованием альдегидов и аммиака. На рис. 2.16 приведена реакция, катализируемая аминоксидазой гистамина.

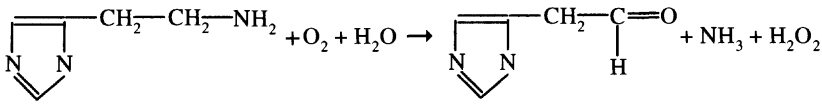


Рис. 2.16. Окисление гистамина аминоксидазой

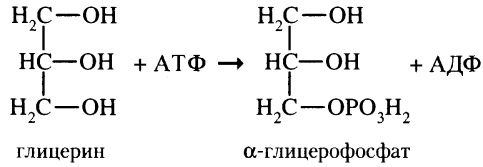
Образующийся в таких реакциях пероксид водорода разлагается тоже оксидоредуктазой — каталазой (гемопротеин):

$$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$$

Трансферазы. К классу трансфераз относятся рассмотренные выше аминотрансферазы и ацилтрансферазы, а также метилтрансферазы, гликозилтрансферазы, фосфотрансферазы и др.

В подкласс фосфотрансфераз входит группа ферментов, называемых киназами: они используют аденозинтрифосфорную кислоту (АТФ) в качестве донора фосфатного остатка.

Киназы катализируют перенос γ-фосфатного остатка на другие вещества; АТФ при этом превращается в АДФ. Например, глицеринкиназа катализирует фосфорилирование глицерина по α-гидроксильной группе:



В результате действия разных киназ в организме синтезируются многочисленные фосфорилированные соединения. В частности, сложные белки фосфопротеины образуются при участии протеинкиназ; остатки фосфорной кислоты присоединяются к гидроксильным группам серина, треонина и тирозина пептидной цепи:

$$\text{Белок} + n\text{АТФ} \rightarrow \text{Белок-}(OPO_3H_2)_n + n\text{АДФ}$$

Все киназы для проявления максимальной активности нуждаются в ионах Mg^{2+} или Mn^{2+}.

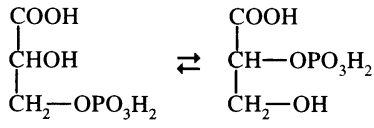
Гидролазы. Эти ферменты катализируют реакции расщепления разнообразных связей с присоединением воды по месту расщепления:

$$A{-}B + H_2O \rightarrow A{-}OH + H{-}B$$

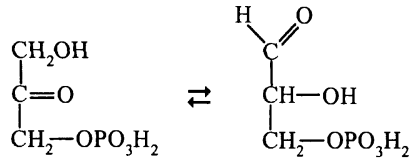
К классу гидролаз относятся эстеразы, расщепляющие сложноэфирные связи, например липаза, холинэстераза; пептидазы, или пептидгидролазы, — пепсин, трипсин, карбоксипептидаза и др.; гликозидазы, гидролизующие гликозидные связи, и т. д.

Лиазы. К лиазам принадлежат декарбоксилазы, отщепляющие карбоксильную группу от органических кислот, например уже упоминавшаяся гистидиндекарбоксилаза; альдолазы, расщепляющие углерод-углеродную связь с образованием альдегида; гидратазы, присоединяющие воду по двойной связи (например, фумараза); дегидратазы, отщепляющие от соединений молекулу воды с образованием двойной связи.

Изомеразы. В организме животных наиболее часто встречаются реакции изомеризации двух типов: внутримолекулярный перенос групп и внутримолекулярные окислительно-восстановительные реакции. Первый тип реакций катализируют изомеразы, называемые внутримолекулярными трансферазами. Например, фосфоглицеромутаза превращает 3-фосфоглицериновую кислоту в 2-фосфоглицериновую кислоту:



Реакции изомеризации второго типа катализируются внутримолекулярными оксидоредуктазами. К числу таких реакций принадлежат взаимопревращения альдоз и кетоз. Например, триозофосфатизомераза катализирует взаимопревращение диоксиацетонфосфата и глицеральдегидфосфата:



Лигазы (синтетазы). Отличительной чертой реакций, катализируемых ферментами этого класса, является использование АТФ в качестве источника энергии.

Номенклатура ферментов. Исторически возникшие (тривиальные) названия ферментов часто строятся по названию субстрата с изменением суффикса на -аза (фумараза, гистидаза, аргиназа и т. п.). Комиссия по ферментам Международного биохимического союза разработала правила рациональной номенклатуры ферментов. Согласно этим правилам в названии фермента указываются его субстраты и основной класс, к которому принадлежит фермент. Каждый фермент обозначается специальным шифром, указывающим номер класса, подкласса, подподкласса и номер фермента в подподклассе. Например, 2.6.1.2 — аланин:оксоглутарат-аминотрансфераза; 4.3.1.3. — гистидин-аммиак-лиаза (гистидаза); 1.1.1.28 — лактат: НАД-оксидоредуктаза (лактатдегидрогеназа). Рациональные названия без дополнительных объяснений позволяют представить реакцию, которую катализирует данный фермент. Однако часто они довольно длинны, поэтому наряду с ними используются и тривиальные названия.

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Уравнение Михаэлиса—Ментен

Скорость ферментативной реакции измеряют по убыли субстрата S или приросту продукта P за единицу времени. В простейшем случае реакцию можно представить как двухстадийный процесс. Первая стадия – образование фермент-субстратного комплекса, т. е. присоединение субстрата к активному центру фермента E:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} ES. \qquad (a)$$

Константу равновесия этой реакции называют *субстратной константой:*

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}.$$

Субстратная константа идентична константе равновесия взаимодействия любого белка с лигандом (см. гл. 1).

В отличие от других белков, фермент не только присоединяет лиганд (субстрат), но и катализирует его химическое превращение — это вторая стадия процесса; образовавшийся продукт отделяется от фермента:

$$ES \xrightarrow{k_2} E + P. \qquad (б)$$

Как видно из реакций (а) и (б), комплекс ES образуется только в одной реакции (с константой k_1), а распадается в двух: на E и S (реакция с константой k_{-1}) и на E и P (реакция с константой k_2):

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} ES \xrightarrow{k_2} E + P.$$

Отношение суммы констант скорости реакций, в которых комплекс ES распадается, к константе скорости реакции, в которой он образуется, называют *константой Михаэлиса* K_M:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}.$$

Легко видеть, что если $k_{-1} >> k_2$, то $K_M \approx K_S$.

График зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата имеет вид гиперболы, т. е. такой же, как кривая насыщения белка лигандом (рис. 2.17, *а*). При высокой концентрации субстрата, когда все молекулы фермента находятся в форме ES (полное насыщение), скорость реакции становится максимальной ($V_{макс}$). Очевидно, что при полунасыщении (т. е. когда половина молекул фермента находится в форме ES) скорость реакции равна $^1/_2\ V_{макс}$. Концентрация субстрата, при которой достигается эта скорость, и дает численную величину константы Михаэлиса (поэтому константу Михаэлиса называют также концентрацией Михаэлиса).

Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата описывается уравнением Михаэлиса—Ментен:

$$v = \frac{V_{макс}[S]}{K_M + [S]}.$$

Решая это уравнение относительно K_M, получим:

$$K_M = [S]\left(\frac{V_{макс}}{v} - 1\right).$$

Отсюда также следует, что если $v = {}^1/_2\ V_{макс}$, то $K_M = [S]$.

В ходе реакции фермент в реакционной смеси существует в двух формах: E и ES; суммарная концентрация этих двух форм равна начальной (до добавления субстрата) концентрации фермента $[E]_0$:

$$[E]_0 = [E] + [ES]. \qquad (1)$$

Скорость образования продукта реакции пропорциональна концентрации фермент-субстратного комплекса:

$$v = k_2[ES]. \qquad (2)$$

При насыщающей концентрации субстрата весь фермент находится в форме ES, т. е. $[ES] = [E]_0$, а скорость становится максимальной:

$$V_{макс} = k_2[E]_0. \qquad (3)$$

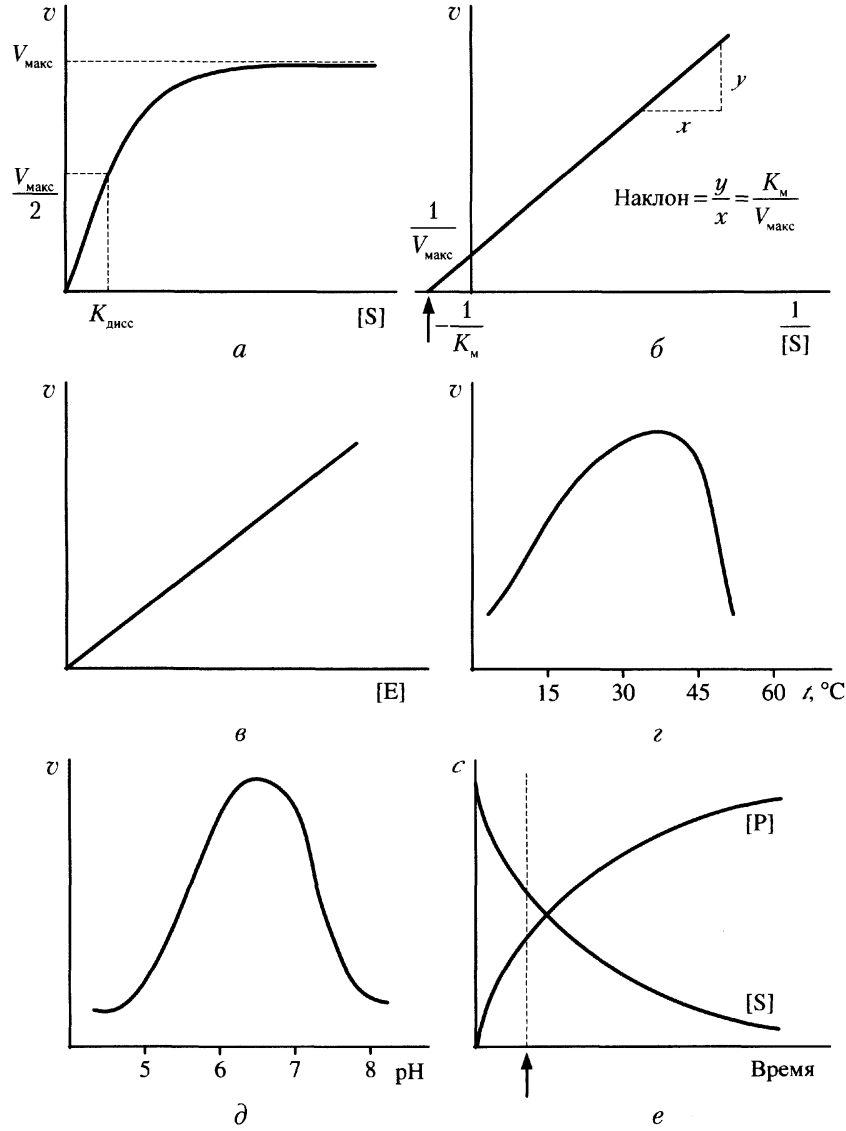


Рис. 2.17. Зависимость скорости ферментативных реакций от концентрации субстрата (*а, б*), концентрации фермента (*в*), от температуры (*г*), pH (*д*); изменения концентрации субстрата и продукта в зависимости от времени реакции (*е*)

Концентрация [ES] определяется балансом скорости его образования в реакции с константой k_1 и скоростей распада в реакциях с константами k_{-1} и k_2:

$$\nu_{обр} = k_1[E][S] = k_1([E]_0 - [ES])[S]; \quad (4)$$

$$\nu_{расп} = k_{-1}[ES] + k_2[ES] = (k_{-1} + k_2)[ES]. \quad (5)$$

Концентрация фермента в реакционной смеси значительно ниже концентрации субстрата. В этих условиях устанавливается стационарная концентрация комплекса ES, т. е. $v_{обр} = v_{расп}$; следовательно,

$$k_1([E]_0 - [ES])[S] = (k_{-1} + k_2)[ES]. \quad (6)$$

После преобразования получаем

$$\frac{[S]([E]_0 - [ES])}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M. \quad (7)$$

Решая относительно [ES], получаем

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_M + [S]}. \quad (8)$$

Подставляя в это уравнение значения [ES] из уравнения (2) и $[E]_0$ из уравнения (3), получаем уравнение Михаэлиса—Ментен:

$$v = \frac{V_{макс}[S]}{K_M + [S]}. \quad (9)$$

В большинстве реакций в организме участвует не один, а два субстрата, например A + B ↔C + D. Взаимодействие фермента с каждым из субстратов характеризуется собственной константой K_M. Ее определяют по зависимости скорости реакции от концентрации данного субстрата при постоянной (обычно насыщающей) концентрации второго субстрата.

Мы рассмотрели простейший случай ферментативной реакции. В действительности промежуточных стадий может быть больше, и все они могут быть обратимыми:

$$E + S \rightleftarrows ES \rightleftarrows EX \rightleftarrows EY \rightleftarrows \ldots \rightleftarrows EP \rightleftarrows E + P$$

Кроме того, возможны и другие, параллельно протекающие реакции образования некоторых промежуточных продуктов. Но и в таких случаях уравнение Михаэлиса—Ментен оказывается справедливым, только K_M представляет собой более сложную функцию констант скорости частных реакций.

K_M и $V_{макс}$ — важные характеристики фермента. Их можно определить по результатам измерения v при разных концентрациях S, как указано на рис. 2.17, *а*. Более точный результат дает метод Лайнуивера—Бэрка. Уравнение Лайнуивера-Бэрка представляет собой обратное уравнение Михаэлиса—Ментен:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{V_{макс}[S]} = \frac{K_M}{V_{макс}}\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{макс}}.$$

График зависимости $1/v$ от $1/[S]$ — это прямая с наклоном $K_M/V_{макс}$, отсекающая на оси ординат отрезок $1/V_{макс}$ (рис. 2.17, *б*).

Единицы ферментативной активности

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента имеет линейный характер (рис. 2.17, *в*). Поскольку в большинстве случаев количество

фермента невозможно измерить в абсолютных величинах (например, в граммах), то приходится пользоваться условными единицами, основанными на линейной зависимости скорости реакции от количества фермента.

За единицу фермента (Е) принимают такое его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль вещества за 1 мин. Число единиц фермента в тканях определяют по формуле

$$\frac{\text{количество превращенного субстрата, мкмоль}}{\text{навеска ткани, г} \times \text{время инкубации, мин}} = nE.$$

Например, для определения лактатдегидрогеназы было взято 100 мг ткани печени, эту навеску инкубировали в течение 15 мин в растворе субстрата и обнаружили, что образовалось 210 мкмоль продукта; следовательно, в печени содержится 210 : (0,1 × 15) = 140 единиц лактатдегидрогеназы на 1 г печени.

Часто находят удельную активность фермента: она равна числу единиц фермента в образце, деленному на массу белка (в мг) в этом образце. Например, если в 1 г ткани печени содержится 140 единиц лактатдегидрогеназы и 200 мг белка, то удельная активность лактатдегидрогеназы в печени равна: 140/200=0,7 (мкмоль/мин)/мг. Удельной активностью особенно часто пользуются при очистке ферментов: по мере удаления посторонних белков доля выделяемого фермента в препарате увеличивается, следовательно, возрастает удельная активность (табл. 2.4; см. также табл. 1.9). По возрастанию удельной активности оценивают эффективность отдельных стадий очистки.

Таблица 2.4. Очистка гистидазы печени

Стадия очистки	Объем раствора, мл	Общая концентрация белков, мг/мл	Активность, Е/мл	Удельная активность, Е/1 мг белка	Выход, %	Степень очистки
Экстракт	795,0	19,5	44,8	2,3	100,0	1
Нагревание при 60 °С 20 мин	680,0	5,6	35,7	6,5	74,0	3
Осаждение сульфатом аммония 35–75% насыщения	50,0	27,0	515,4	19,1	72,0	8
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	180,0	0,8	515,4	160,0	65,0	70
Хроматография на сефарозе 6В-CL	63,5	0,4	238,7	597,0	42,5	260
Хроматография на гидроксилапатите	21,0	0,1	111,6	1116,0	6,6	485

Если имеется очищенный, индивидуальный фермент, то можно измерить его молярную активность: она равна числу единиц фермента в образце, деленному на количество фермента, выраженное в микромолях. Например, если в растворе фумаразы, содержащем 0,002 мкмоль фермента, обнаружено 240 единиц фермента (в мкмоль/мин), то молярная активность фумаразы равна:

$$\frac{240 \text{ мкмоль/мин}}{0{,}002 \text{ мкмоль}} = 12g10^4 \text{ мин}^{-1}.$$

Молярная активность указывает, сколько молекул субстрата превращается одной молекулой фермента за 1 минуту (молярную активность иногда обозначают как «число оборотов»). В табл. 2.5 приведена молярная активность некоторых ферментов.

Таблица 2.5. Молярная активность некоторых ферментов

Фермент	Активность, $мин^{-1}$	Фермент	Активность, $мин^{-1}$
Карбоангидраза С	36 000 000	β-Галактозидаза	12 500
Δ^5-3-кетостероидизомераза	17 100 000	Фосфоглюкомутаза	1 240
Супероксиддисмутаза	4 800 000	Сукцинатдегидрогеназа	1 150
Каталаза	1 200 000	Бифункциональный фермент	6
β-Амилаза	1 100 000		
Фумараза	120 000		

Так называемый бифункциональный фермент имеет наиболее низкую молярную активность среди известных. Однако это не означает, что его физиологическая роль тоже низка (подробнее об этом ферменте см. рис. 9.31).

Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры, pH и времени инкубации

Зависимость скорости реакции от температуры. Скорость ферментативных реакций, как и всяких других, зависит от температуры: при повышении температуры на каждые 10 °С скорость увеличивается примерно вдвое (правило Вант-Гоффа). Однако для ферментативных реакций это правило справедливо лишь в области низких температур — до 50–60 °С. При более высоких температурах ускоряется денатурация фермента, что означает уменьшение его количества; соответственно снижается и скорость реакции (рис. 2.17, *г*). При 80–90 °С большинство ферментов денатурируется практически мгновенно. Количественное определение ферментов рекомендуется проводить при 25 °С.

Зависимость скорости реакции от pH. Изменение pH приводит к изменению степени ионизации ионогенных групп в активном центре, а это влияет на сродство субстрата к активному центру и на каталитический механизм. Кроме того, изменение ионизации белка (не только в области активного центра) вызывает конформационные изменения молекулы фермента. Колоколообразная форма кривой (рис. 2.17, *д*) означает, что существует некоторое оптимальное состояние ионизации фермента, обеспечивающее наилучшее соединение с субстратом и катализ реакции. Оптимум pH для большинства ферментов лежит в пределах от 6 до 8. Однако есть и исключения: например, пепсин наиболее активен при pH 2. Количественное определение ферментов проводят при оптимальном для данного фермента pH.

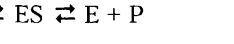
Зависимость скорости реакции от времени. По мере увеличения времени инкубации скорость реакции снижается (рис. 2.17, *е*). Это может происходить

вследствие уменьшения концентрации субстрата, увеличения скорости обратной реакции (в результате накопления продукта прямой реакции), ингибирования фермента продуктом реакции, денатурации фермента. При количественном определении ферментов и кинетических исследованиях измеряют начальную скорость реакции (скорость непосредственно после начала реакции). Время, в течение которого скорость с допустимым приближением можно считать начальной, для каждого фермента и для данных условий подбирается экспериментально, на основе графика, представленного на рис. 2.17, *е*: прямолинейный участок графика, начинающийся от отметки нулевого времени, соответствует интервалу времени, в течение которого скорость реакции равна начальной скорости или близка к ней (на рисунке этот интервал отмечен пунктирной линией).

ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

Ингибиторами ферментов называют вещества, снижающие их активность. Наибольший интерес представляют ингибиторы, взаимодействующие с активным центром фермента. Такие ингибиторы чаще всего являются структурными аналогами субстрата и, следовательно, комплементарны активному центру фермента. Поэтому они подавляют активность только одного фермента или группы ферментов с очень сходным устройством активного центра. Различают ингибиторы конкурентные и неконкурентные, обратимые и необратимые.

Малоновая кислота $HOOC—CH_2—COOH$ является структурным аналогом янтарной кислоты, поэтому она может присоединяться к активному центру сукцинатдегидрогеназы (см. выше). Но дегидрирование малоновой кислоты невозможно. Если в реакционной смеси имеются одновременно и янтарная, и малоновая кислоты, то происходят следующие процессы:

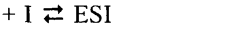


$$E + S \rightleftarrows ES \rightleftarrows E + P$$

$$E + I \rightleftarrows EI$$

Некоторые молекулы фермента оказываются занятыми ингибитором (I) и не участвуют в реакции превращения субстрата: следовательно, скорость образования продукта снижается. Если повышать концентрацию субстрата, то доля комплекса ES увеличивается, а комплекса EI уменьшается: субстрат и ингибитор конкурируют за активный центр фермента. Это пример конкурентного ингибирования. При достаточно высокой концентрации субстрата весь фермент будет в форме комплекса ES и скорость реакции будет максимальной, несмотря на присутствие ингибитора.

Некоторые ингибиторы образуют комплекс не со свободным ферментом, а с фермент-субстратным комплексом:



$$ES + I \rightleftarrows ESI$$

В этом случае повышение концентрации субстрата не уменьшает действие ингибитора; такие ингибиторы называются неконкурентными.

В некоторых случаях ингибитор может подвергаться химическому превращению под действием фермента. Например, *п*-нитрофенилацетат гидролизуется протеолитическим ферментом химотрипсином; гидролиз происходит в две стадии (рис. 2.18).

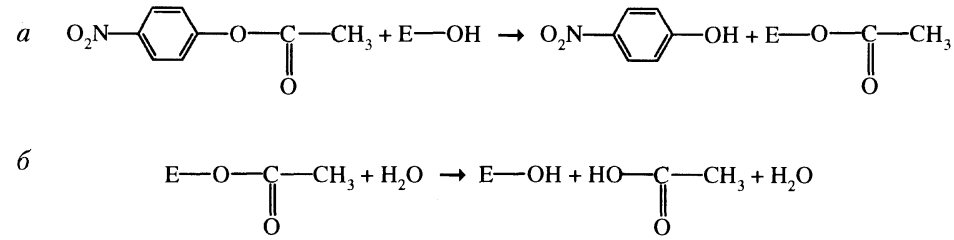


Рис. 2.18. Гидролиз *п*-нитрофенилацетата химотрипсином

Сначала ацетильный остаток присоединяется к гидроксильной группе остатка серина в активном центре фермента (реакция *а*), а затем происходит гидролиз ацетил-фермента (реакция *б*). Первая стадия протекает быстро, а вторая — очень медленно, поэтому даже при небольших концентрациях *п*-нитрофенилацетата значительная часть молекул фермента находится в ацетилированной форме, и скорость гидролиза природного субстрата (пептидов) снижается. Такие ингибиторы называют псевдосубстратами или плохими субстратами.

Иногда химическое превращение ингибитора в активном центре приводит к образованию промежуточного продукта, очень прочно, необратимо связанного с ферментом: такое явление называют суицидным катализом. Например, 3-хлорацетолфосфат необратимо ингибирует триозофосфатизомеразу. Этот ингибитор является структурным аналогом диоксиацетонфосфата: он дехлорируется и необратимо присоединяется к остатку глутаминовой кислоты в активном центре фермента (рис. 2.19).

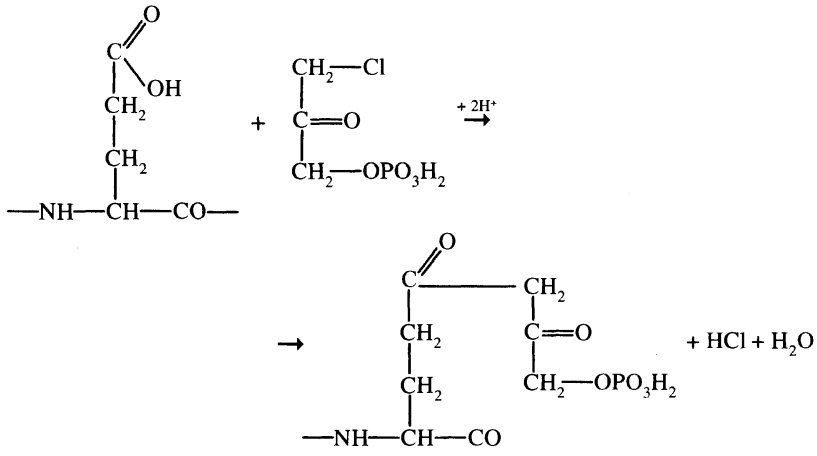


Рис. 2.19. Необратимое ингибирование триозофосфатизомеразы

Ингибиторами могут быть не только аналоги субстратов, но и аналоги коферментов, способные занимать место настоящего кофермента, но не способные выполнять его функцию.

Взаимодействие фермента с ингибитором часто в такой же мере специфично, как и взаимодействие с субстратом или коферментом. На этом основано

применение ингибиторов для избирательного подавления активности того или иного фермента в сложной ферментной системе или в организме. В частности, многие лекарственные вещества являются ингибиторами определенных ферментов.

Есть ингибиторы, действующие менее избирательно. Например, *п*-хлормеркурибензоат является специфическим реагентом на сульфгидрильные группы в белках (рис. 2.20). Поэтому *п*-хлормеркурибензоат ингибирует все ферменты, которые имеют SH-группы, участвующие в катализе.

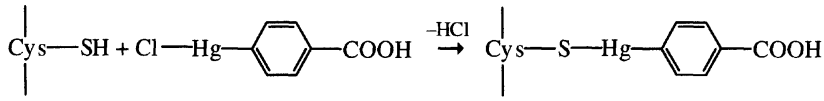


Рис. 2.20. Реакция *п*-хлормеркурибензоата с сульфгидрильными группами белков

Другим примером может служить ингибирование диизопропилфторфосфатом пептидгидролаз и эстераз, имеющих серин в активном центре. Ингибитор необратимо присоединяется к остатку серина (рис. 2.21).

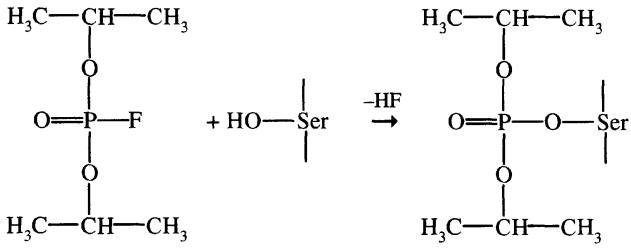


Рис. 2.21. Ингибирование диизопропилфторфосфатом сериновых ферментов

Остатки серина вне активного центра при этом остаются незатронутыми; следовательно, фермент сам катализирует реакцию, которая губит его. Диизопропилфторфосфат — представитель группы фосфорорганических соединений, обладающих чрезвычайно высокой токсичностью. Токсическое действие обусловлено именно ингибированием ферментов, и прежде всего ацетилхолинэстеразы (см. гл. 22).

Пенициллин, одно из самых известных и распространенных лекарств, применяется для лечения ряда инфекционных заболеваний. Пенициллин необратимо ингибирует фермент бактерий гликопептид-трансферазу. Этот фермент участвует в синтезе бактериальной стенки, и поэтому в присутствии пенициллина размножение бактерий невозможно. Гликопептид-трансфераза содержит остаток серина в активном центре (сериновая пептидгидролаза). В молекуле пенициллина есть амидная связь, по свойствам сходная с пептидной связью (рис. 2.22). В результате разрыва этой связи, катализируемого ферментом, остаток пенициллина оказывается необратимо связанным с ферментом.

Ингибиторы — очень эффективные инструменты для исследования строения активного центра ферментов и механизма катализа. Ингибиторы, необратимо

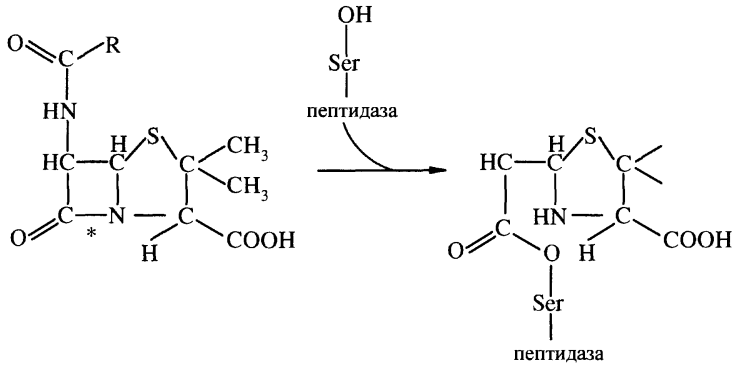


Рис. 2.22. Ингибирование бактериальной гликопептид-трансферазы пенициллином. Звездочкой помечена амидная связь, по свойствам сходная с петидной связью; R — группа, неодинаковая в разных пенициллинах

присоединяющиеся к активному центру фермента, «метят» активный центр: если теперь фермент гидролизовать, то одна из аминокислот в гидролизате остается связанной с ингибитором. Таким способом узнают, какие аминокислоты и функциональные группы формируют активный центр.

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Рассмотрим в качестве примера хорошо изученный фермент карбоксипептидазу А. Механизм действия этого фермента выяснен путем рентгеноструктурного исследования комплексов фермента с разными ингибиторами и псевдосубстратами.

Карбоксипептидаза А построена из одной пептидной цепи, включающей 307 аминокислотных остатков; фермент содержит ион Zn^{2+} в активном центре. Размеры молекулы 5 × 4,2 × 3,8 нм. Активный центр фермента расположен в нише глубиной около 1 нм. Карбоксипептидаза А — пищеварительный фермент, образующийся в поджелудочной железе и в составе сока этой железы поступающий в кишечник. Здесь он участвует в переваривании белков: катализирует отщепление С-концевых аминокислотных остатков от пептидов.

На рис. 2.23 показана С-концевая часть субстрата (два аминокислотных остатка) в активном центре карбоксипептидазы А. В связывании субстрата и катализе участвуют аминокислотные остатки Tyr248, Arg145, Glu270 карбоксипептидазы и ион Zn^{2+}, который соединен с карбоксильной группой Glu72 и, кроме того, двумя координационными связями — с имидазольными циклами His69 и His196. В активном центре имеется углубление, содержащее гидрофобные радикалы аминокислот (гидрофобный карман). В этот карман входит радикал С-концевой аминокислоты субстрата, поэтому наилучшими субстратами карбоксипептидазы А являются пептиды с гидрофобной С-концевой аминокислотой (радикал Rω на рис. 2.23).

Реакция начинается со взаимодействия Rω с гидрофобным карманом и образования ионной связи карбоксильной группы субстрата с гуанидиновой группой Arg145. При этом пептидная цепь в области Arg145 подтягивается в сторону карбоксильной группы субстрата (примерно на 0,2 нм). Это ведет к конформационным

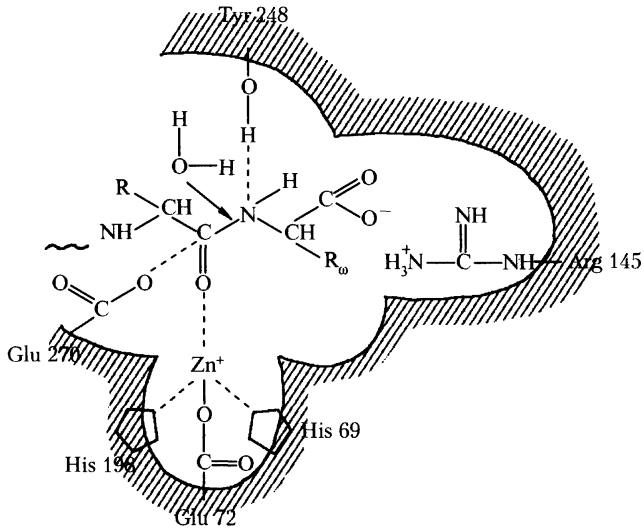


Рис. 2.23. Субстрат в активном центре карбоксипептидазы А

перестройкам и в других частях активного центра: в направлении к субстрату перемещаются Glu270 (на 0,2 нм) и Tyr248 (на 1,2 нм). В результате возникает взаимодействие карбонильной группы субстрата с карбоксилом Glu270 и атомом Zn, а также атома азота пептидной связи с OH-группой Tyr248. Пептидная связь при этом ослабляется, и происходит ее гидролиз, приводящий к образованию карбоксильной группы аминокислотного остатка R и аминогруппы C-концевого остатка. Эти группы не могут взаимодействовать с функциональными группами активного центра, т. е. комплементарность нарушается: продукты гидролиза покидают активный центр, а фермент восстанавливает исходную конформацию.

Конечно, строение активного центра и механизмы действия разных ферментов различны, они соответствуют особенностям строения субстрата и типу реакции. Однако приведенный пример иллюстрирует некоторые общие черты, характерные для ферментативного катализа. Эти черты перечислены ниже.

1. Активный центр фермента формируется из участков пептидной цепи и отдельных аминокислотных остатков, содержащих разные функциональные группы. Субстрат соединяется с активным центром в нескольких точках; это обеспечивает высокую избирательность связывания (комплементарность субстрата и активного центра) и ориентацию субстрата, необходимую для катализа реакции.
2. Активный центр, как правило, располагается в углублении (в нише, в щели) поверхности фермента. В результате субстрат, соединяясь с активным центром, оказывается не в водной среде цитозоля клетки, а в специфическом окружении функциональных групп активного центра.
3. В ходе присоединения субстрата и в ходе катализа происходят конформационные изменения молекулы фермента и субстрата. До взаимодействия пространственная структура субстрата и пространственная структура активного центра лишь приблизительно соответствуют друг другу; строгая

комплементарность возникает в процессе взаимодействия в результате изменений конформации (индуцированное соответствие). Конформационные изменения могут способствовать «растягиванию» разрываемой связи или, наоборот, сближению молекул при реакциях синтеза и тем самым вносят вклад в ускорение реакции. На рис. 2.24 представлена модель фермента гексокиназы, фосфорилирующего глюкозу. Активный центр расположен в щелевидном углублении между двумя доменами; присоединение глюкозы приводит к сужению щели, а после превращения глюкозы в глюкозо-6-фосфат щель вновь раскрывается.

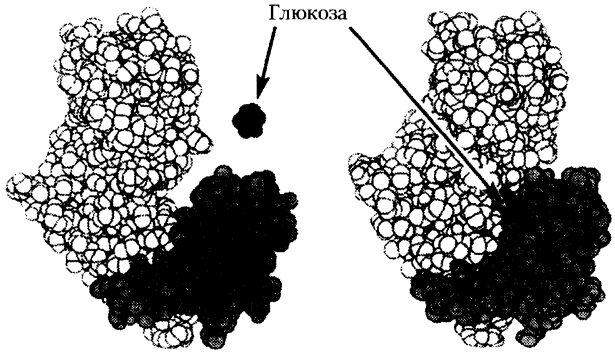


Рис. 2.24. Связывание глюкозы с гексокиназой

ФЕРМЕНТЫ И МЕТАБОЛИЗМ

Метаболизмом называют химические превращения веществ в организме (от греч. *metabole* — изменение, превращение). Вещества, участвующие в метаболизме, называют метаболитами. Метаболизм — результат действия ферментов: все реакции, определяющие баланс веществ в живой клетке, катализируются ферментами.

В живой клетке имеются многие тысячи разных веществ. Каждое из них в принципе может реагировать со многими другими. Однако фактически каждое вещество участвует в немногих реакциях, часто только в одной. Например, в мышечных клетках практически вся глюкоза реагирует только с АТФ, превращаясь в глюкозо-6-фосфат. Это происходит потому, что в этих клетках есть фермент, катализирующий реакцию образования глюкозо-6-фосфата; ферментов, которые катализировали бы другие в принципе возможные реакции глюкозы, в мышцах нет, а некатализируемые реакции протекают настолько медленно, что практически не оказывают влияния на баланс глюкозы. Глюкозо-6-фосфат затем превращается в другой метаболит, тоже при участии специального фермента, и т. д. Таким образом, получается определенная последовательность реакций и метаболитов — метаболический путь глюкозы. Каждый метаболит образуется из предшественника при участии специфического фермента и, в свою очередь, служит субстратом для следующего фермента. Аналогично и другие вещества превращаются по характерным для них метаболическим путям. Метаболические пути всех веществ связаны друг с другом общими метаболитами, образуя единую сетку реакций.

Таким образом, ферментативный катализ в живой клетке служит инструментом отбора определенных реакций из множества возможных. В ходе биологической эволюции возник набор ферментов, катализирующих лишь те реакции, которые оказались полезными для живой системы. В результате в организме существует не хаос реакций, а определенная система реакций — метаболизм.

Говоря о метаболизме, чаще всего имеют в виду превращения низкомолекулярных веществ, и метаболитами обычно называют низкомолекулярные вещества. Однако многие ферменты катализируют химические изменения (модификацию) высокомолекулярных соединений: удаление части мономеров, добавление новых мономеров, присоединение других веществ, например присоединение фосфорной кислоты к белкам при образовании фосфопротеина или присоединение углеводов при образовании гликопротеинов, и т. п. В результате таких перестроек изменяются функциональные свойства полимеров, поэтому многие реакции модификации полимеров играют важную роль в регуляции метаболизма.

Промежуточное место между метаболизмом низкомолекулярных соединений и реакциями модификации макромолекул занимают реакции синтеза полимеров, в том числе белков и самих ферментов, а также реакции распада полимеров на мономеры в тканях и распада полимерных веществ пищи в желудочно-кишечном тракте. Число ферментов, естественными субстратами которых являются полимеры, превышает число ферментов, действующих на *низкомолекулярные субстраты.*

РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Скорости химических реакций, составляющих метаболизм, изменяются (регулируются) в зависимости от условий среды и физиологического состояния. Одним из основных механизмов регуляции метаболизма служит регуляция активности ферментов. Существует несколько способов такой регуляции.

Аллостерическая регуляция

Многие ферменты могут обратимо связывать определенные метаболиты, ингибирующие или активирующие фермент. Такие метаболиты называют эффекторами.

Эффектор присоединяется не к каталитическому активному центру фермента, а к специальному регуляторному центру, который называют также аллостерическим центром («в другом месте расположенный центр»). Аллостерические ферменты построены, как правило, из двух или большего числа субъединиц. На рис. 2.25 представлена схема аллостерического ингибирования фермента. Одна субъединица имеет каталитический центр (каталитическая субъединица), другая — регуляторный центр (регуляторная субъединица). В отсутствие аллостерического ингибитора субстрат присоединяется к каталитическому активному центру и происходит реакция. Если в среде есть аллостерический ингибитор, он присоединяется к регуляторному центру, что ведет к изменению конформации регуляторной субъединицы; вследствие этого изменяется конформация и каталитической субъединицы, в том числе каталитического активного центра. В результате активность фермента снижается. Чем выше концентрация аллостерического ингибитора, тем больше молекул фермента блокируется им и тем меньше скорость превращения

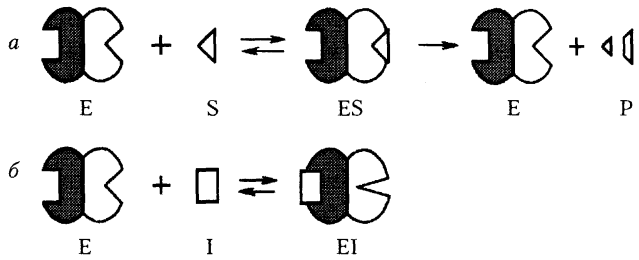


Рис. 2.25. Механизм аллостерического ингибирования ферментов: реакция в отсутствие ингибитора (*а*) и при его наличии (*б*)

субстрата. Аналогично происходит и активация ферментов при действии аллостерических активаторов.

Рассмотрим в качестве примера регуляцию синтеза уридинтрифосфата (УТФ) (рис. 2.26). По строению УТФ сходен с АТФ (подробнее о строении и синтезе УТФ см. гл. 3 и 12).

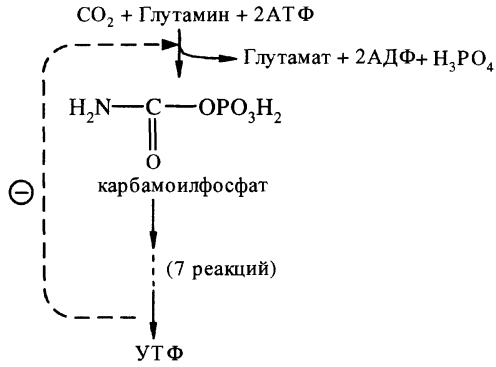


Рис. 2.26. Метаболический путь синтеза УТФ

Метаболический путь синтеза УТФ включает восемь реакций. Первая реакция катализируется ферментом карбамоилфосфатсинтетазой II. Продукт реакции — карбамоилфосфат — образуется из диоксида углерода, амидной группы глутамина и фосфатного остатка АТФ; АТФ служит также источником энергии. Карбамоилфосфатсинтетаза II — это аллостерический фермент; конечный продукт метаболического пути (УТФ) является его аллостерическим ингибитором. Чем больше концентрация УТФ, тем меньше скорость первой реакции, а значит, и всех остальных реакций, поскольку для них образуется мало субстратов. Таким способом скорость синтеза УТФ уравнивается со скоростью его расходования, т. е. с потребностью клетки в этом веществе. Здесь мы имеем дело с регуляцией по механизму отрицательной обратной связи. В последующих главах описаны многие другие примеры аллостерической регуляции.

В приведенном примере регуляция действия фермента осуществляется эффектором, по химической природе отличающимся от субстрата: это гетеротропные аллостерические ингибиторы и активаторы. Если фермент построен из

идентичных протомеров, т. е. каждый протомер имеет каталитический активный центр, то аллостерическая регуляция может осуществляться самим субстратом: присоединение субстрата к одному протомеру изменяет конформацию всего белка, и активность других протомеров может изменяться (гомотропная аллостерическая регуляция).

Аллостерические механизмы регуляции характерны не только для ферментов, но и для белков, выполняющих другие функции. Например, транспорт кислорода гемоглобином регулируется по механизму гомотропной аллостерической активации: молекула кислорода, присоединившаяся к одному протомеру, увеличивает сродство к кислороду других протомеров.

Регуляция ферментов путем их фосфорилирования — дефосфорилирования

Протеинкиназы катализируют фосфорилирование белков по гидроксильным группам серина, треонина и тирозина. Если фосфорилируемые белки это тоже ферменты, то их активность в результате фосфорилирования в одних случаях уменьшается, в других — увеличивается. Например, в клетках жировой ткани есть липаза, существующая в двух формах — фосфопротеина и простого белка. Эти формы могут превращаться друг в друга. Фосфопротеин образуется в результате действия протеинкиназы и может вновь превращаться в простой белок при действии фосфопротеинфосфатазы — фермента, гидролитически отщепляющего фосфорную кислоту от фосфопротеинов (рис. 2.27).

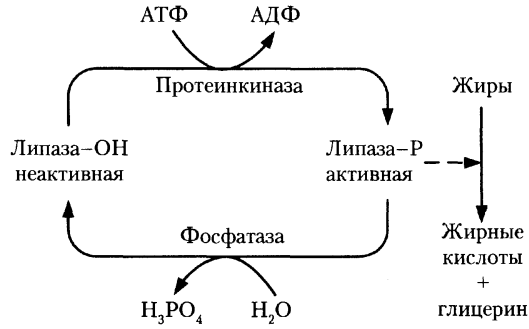


Рис. 2.27. Фосфорилирование и дефосфорилирование липазы жировой ткани

Фосфорилированная липаза обладает значительно более высокой активностью, чем нефосфорилированная.

Протеинкиназы — это группа ферментов, различающихся специфичностью: разные протеинкиназы фосфорилируют разные белки. То же можно сказать и о протеинфосфатазах. Такой механизм регулирует активность очень многих ферментов.

Регуляция ферментов белками-модуляторами

Одним из важных примеров такой регуляции является регуляция протеинкиназы А. Протеинкиназа А в активной форме представляет собой белок, построенный из одной пептидной цепи (субъединица С, каталитическая). В клетке имеется другой

белок (субъединица R, регуляторная), способный соединяться с белком C, причем образуется тетрамерный комплекс R_2C_2. Этот комплекс не обладает ферментативной активностью: субъединица R выступает в роли белка-модулятора — ингибирует фермент (субъединицу C). Активация фермента происходит при участии циклоаденозинмонофосфата (3′,5′-цикло-АМФ, или цАМФ). Циклоаденозинмонофосфат образуется из АТФ при действии аденилатциклазы (рис. 2.28).

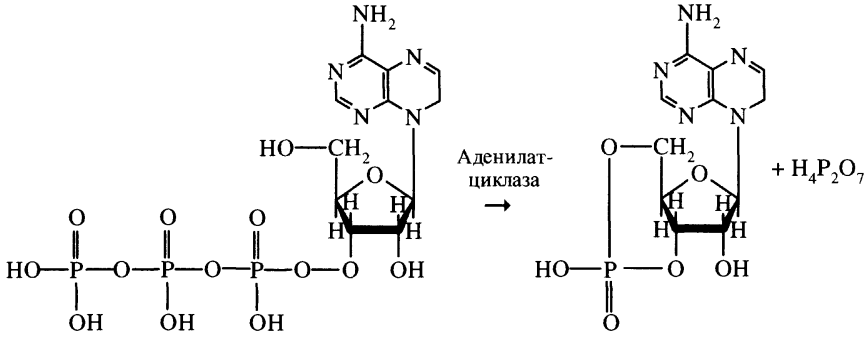


Рис. 2.28. Образование цАМФ

На поверхности субъединицы R есть два центра связывания цАМФ; после присоединения цАМФ изменяется конформация белка, при этом сродство субъединиц R к субъединицам C уменьшается, и происходит диссоциация комплекса с образованием двух молекул активной протеинкиназы A (рис. 2.29). Этот процесс обратимый, его направление зависит от концентрации цАМФ в клетке: повышение концентрации ведет к активации протеинкиназы, а снижение — к образованию неактивного тетрамера R_2цАМФ$_4$ + 2C ⇄ R_2C_2 + 4цАМФ.

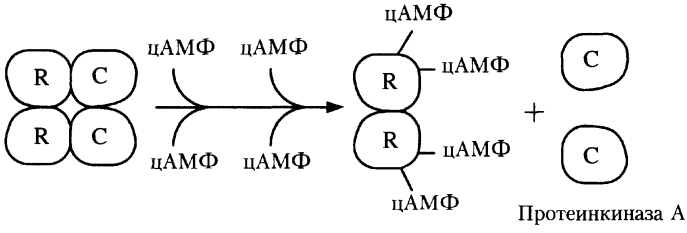


Рис. 2.29. Активация протеинкиназы A

В свою очередь, концентрация цАМФ зависит от активности аденилатциклазы. Как регулируется аденилатциклаза, мы рассмотрим позднее, а сейчас обратим внимание на то, что здесь мы впервые (но далеко не в последний раз) встретились с каскадом ферментативных реакций (рис. 2.30). Физиологическое значение этого каскада заключается в том, что при потребности клеток, особенно мышечных, в источниках энергии начинается использование запасов жира жировой ткани. Как приводится в действие этот механизм (а также и другие подобные механизмы), будет описано в последующих главах.

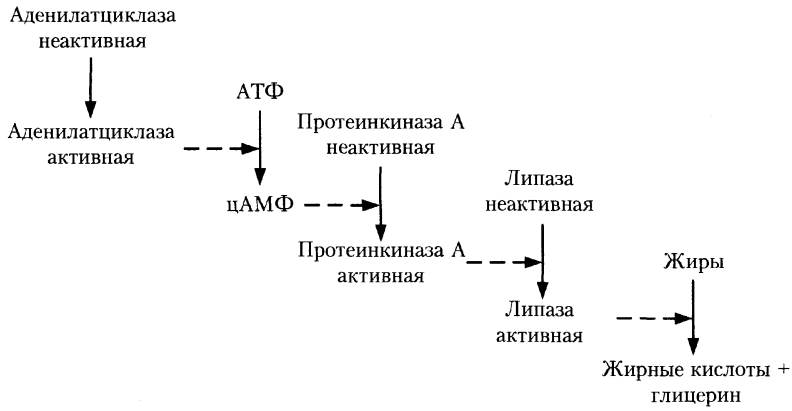


Рис. 2.30. Каскад реакций, активирующих липазу жировой ткани

Другой пример белка-модулятора — кальмодулин; он участвует в регуляции активности многих ферментов. Кальмодулин — небольшой белок (148 аминокислотных остатков), содержит два глобулярных домена, соединенных α-спиральным доменом. Каждый глобулярный домен имеет два центра связывания ионов кальция (рис. 2.31).

$4Ca^{2+}$-кальмодулин — активная форма белка, образуется при повышении концентрации Ca^{2+} в клетке:

$$4Ca^{2+} + \text{кальмодулин} \rightleftarrows 4Ca^{2+}\text{-кальмодулин}$$

$4Ca^{2+}$-кальмодулин способен связываться с определенными ферментами и активировать их. В частности, он активирует Са-зависимые протеинкиназы.

Широко распространены белковые ингибиторы протеолитических ферментов. Функция этих ингибиторов — предотвращение несвоевременного разрушения белков в тканях и жидкостях организма. В частности, в плазме крови белковые ингибиторы протеиназ участвуют в регуляции таких процессов, как образование и разрушение физиологически активных пептидов, свертывание крови, растворение кровяных сгустков (подробнее см. гл. 21).

Механизм действия белковых эффекторов может быть связан с прямым блокированием активного центра или изменением конформации фермента, как и при аллостерической регуляции метаболитами.

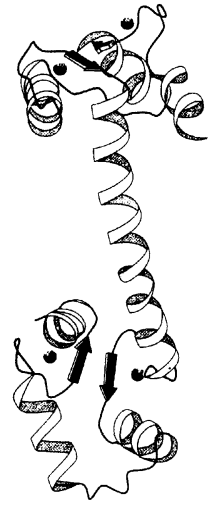


Рис. 2.31. Строение $4Ca^{2+}$-кальмодулина. Кружочки — ионы Ca^{2+}

Активация частичным протеолизом

Многие ферменты образуются из неактивных белков-предшественников (проферментов) путем отщепления части пептидной цепи. В результате отщепления части пептидной цепи происходит перестройка пространственной структуры и формируется активный центр.

Механизм активации частичным протеолизом наиболее характерен для протеолитических ферментов (пептидгидролаз). Это связано с тем, что белки, являющиеся субстратами пептидгидролаз, составляют основу структурно-функционального аппарата клетки; нерегулируемое действие пептидгидролаз могло бы быть опасным для клетки. Поэтому в ходе эволюции выработался механизм, заключающийся в том, что протеолитические ферменты образуются и хранятся в неактивной и безопасной форме проферментов и активируются в должном месте и в должный момент. Например, проферменты пищеварительных протеаз активируются не в клетках, где они синтезируются, а в полости желудка и кишечника (см. главу 11). Ферменты, участвующие в свертывании крови, активируются лишь в месте повреждения кровеносных сосудов (глава 21).

Метаболические и регуляторные ферменты

В предыдущем разделе мы отметили роль ферментов в образовании метаболических путей и метаболизма в целом. Теперь, немного познакомившись с механизмами регуляции, мы можем выделить (с некоторой долей условности) две группы ферментов: метаболические и регуляторные. В рассмотренном выше примере с активацией липазы именно липаза участвует в образовании метаболического пути жиров. Протеинкиназа и протеинфосфатаза — регуляторные ферменты: они не участвуют непосредственно в образовании метаболического пути жиров, а лишь ускоряют (протеинкиназа) или замедляют (протеинфосфатаза) его протекание. Как мы увидим в дальнейшем, множество механизмов регуляции метаболизма, а также и других функций клетки связано с регуляторными ферментами.

ИЗОФЕРМЕНТЫ

Изоферменты, как и другие изофункциональные белки, выполняют одинаковую функцию, т. е. катализируют одну и ту же реакцию. Однако по ряду свойств изоферменты могут различаться, например по молекулярной активности, по кинетике реакции, по способам регуляции, по стабильности. В основе особенностей изоферментов лежат генетически обусловленные различия их первичной структуры, обычно небольшие. Формы ферментов, образующиеся в результате модификации их молекул уже после синтеза, не называют изоферментами. Например, не являются изоферментами фосфорилированная и дефосфорилированная липазы жировой ткани.

Приведем в качестве примера изоферментов глюкокиназу и гексокиназу. Обе эти киназы катализируют превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат, но различаются по значению константы Михаэлиса, а также по локализации в организме: глюкокиназа — это фермент печени, а гексокиназа обнаруживается в печени, мышцах и многих других тканях. Физиологическое значение этих различий глюкокиназы и гексокиназы описано в гл. 9.

Если фермент имеет олигомерную структуру и построен из неидентичных протомеров, то изоферменты могут получаться в результате различных комбинаций протомеров, подобно тому, как это имеет место в случае неферментного белка гемоглобина (гемоглобины A, F, A_2). Например, лактатдегидрогеназа представляет

собой тетрамер, в котором могут быть протомеры двух типов: Н и М. Возможны пять комбинаций этих протомеров в тетрамерной молекуле: M_4, M_3H_1, M_2H_2, M_1H_3 и H_4. Все пять комбинаций реализуются в организме. Протомеры М и Н различаются по электрофоретической подвижности, поэтому изоферменты лактатдегидрогеназы легко разделить методом электрофореза.

Не всегда просто решить, являются ли сходные ферменты изоферментами, или их следует отнести к разным ферментам. В качестве примера укажем на карбамоилфосфатсинтетазы I и II. Оба эти фермента синтезируют карбамоилфосфат (см. рис. 2. 26), но реакции различаются тем, что первый из них образует аминогруппу за счет аммиака, а второй — за счет амидной группы глутамина. Таким образом, продукт реакций в обоих случаях один и тот же, а субстраты фермента, хотя и сходны, но не идентичны. Карбамоилфосфатсинтетазы I и II различаются и по локализации в клетке, и по физиологической роли. Первый фермент находится в митохондриях, участвует в метаболическом пути синтеза мочевины, а второй — в цитозоле, участвует в синтезе пиримидиновых нуклеотидов. По-видимому, есть равные основания рассматривать эти ферменты и как изоферменты, и как разные ферменты.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В ОРГАНИЗМЕ

Многие ферменты обнаруживаются практически во всех клетках организма. Это ферменты, которые участвуют в процессах жизнеобеспечения самой клетки, таких, как синтез нуклеиновых кислот и белков, образование мембран и других основных клеточных органелл, энергетический обмен. С другой стороны, дифференцированные клетки, выполняющие различные специализированные функции, различаются и по ферментному составу. Например, клетки печени содержат набор ферментов, необходимых для синтеза мочевины, клетки коры надпочечников – ферменты, синтезирующие стероидные гормоны, в мышечных клетках много креатинфосфокиназы. Некоторые ферменты обнаруживаются лишь в одном-двух органах (так называемые органоспецифичные ферменты). Например, уроканиназа есть только в печени, гистидаза — в печени и коже, кислая фосфатаза — преимущественно в предстательной железе.

Внутри клеток ферменты также распределены неравномерно. Одни ферменты находятся в коллоидно-растворенном состоянии в составе цитозоля, другие — фиксированы в клеточных органеллах. Разные органеллы — ядро, митохондрии, лизосомы, мембраны — имеют специфический набор ферментов. Ферменты, фиксированные в органеллах, помимо каталитического активного центра имеют еще специфические центры связывания с определенными компонентами органелл, поэтому они сами находят и занимают отсеки (компартменты), различающиеся по набору ферментов, а следовательно, и по метаболизму (компартментализация метаболизма).

Изменения ферментного состава организма

При нормальных физиологических изменениях организма, например при онтогенезе или адаптации к переменным условиям среды, может изменяться не толь-

ко каталитическая активность ферментов (в результате действия регуляторных механизмов), но и их количество (подробнее см. гл. 4 и 5). Активность ферментов, их количество, а также компартментализация изменяются и при болезнях. Эти проявления болезней называют энзимопатиями; они являются частным случаем протеинопатий.

Энзимопатии, как и вообще протеинопатии, бывают наследственные (первичные) и приобретенные (вторичные). Например, врожденное отсутствие фермента гистидазы проявляется как наследственная болезнь гистидинемия. Вследствие нарушения метаболизма гистидина его концентрация в крови и моче больных значительно больше, чем у здоровых людей. Это, в свою очередь, ведет к нарушению обмена и других веществ и, как следствие, к нарушению физического и умственного развития, обычно настолько резкому, что больные не доживают до взрослого состояния. Таким образом, недостаточность даже одного фермента может оказаться несовместимой с жизнью.

Приобретенные энзимопатии, как и вообще протеинопатии, по-видимому, сопровождают любую болезнь. Например, при воспалении, характерном для очень многих болезней, из поврежденных клеток в очаге воспаления освобождаются протеолитические и другие ферменты, которые могут разрушать окружающие ткани. В этом случае имеет место нарушение компартментализации ферментов.

Причины и проявления ряда других энзимопатий подробнее рассматриваются в последующих разделах.

В плазме крови здоровых людей имеется небольшой по сравнению с клетками набор ферментов, и их концентрация значительно ниже, чем в клетках. При повреждении и нарушении компартментализации ферменты из клеток могут попадать в кровь. Изменения ферментного состава крови при разных заболеваниях различны, поэтому определение ферментов в сыворотке крови используется как метод диагностики болезней и метод контроля эффективности лечения (рис. 2.32).

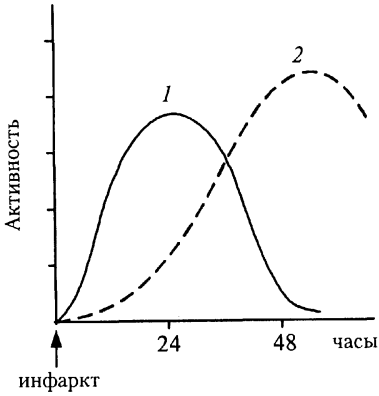


Рис. 2.32. Изменение содержания в крови креатинкинзы (*1*) и лактатдегидрогеназы (*2*) при инфаркте миокарда

С целью диагностики определяют активность ферментов и в биоптатах — кусочках тканей (печени, мышц, слизистой оболочки кишечника и др.), взятых из органа с помощью специальных инструментов.

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ

Применение ферментов в качестве лекарств

Некоторые ферменты нашли применение как лечебные средства. Например, при желудочных заболеваниях, сопровождающихся снижением содержания пепсина в желудочном соке, для улучшения пищеварения назначают препараты пепсина

(заместительная терапия). Разные протеолитические препараты применяют при первичной обработке ран: гидролизуя белки разрушенных клеток, ферменты способствуют очищению раны и уменьшению воспалительных явлений. Нуклеазы (ферменты, разрушающие нуклеиновые кислоты) используют при лечении некоторых вирусных заболеваний. Например, при лечении вирусного конъюнктивита успешно применяют глазные капли, содержащие ДНКазу: фермент, разрушая ДНК вируса, излечивает болезнь. Некоторые протеолитические ферменты применяют для предотвращения или лечения тромбозов, т. е. закупорки кровеносных сосудов сгустками крови (подробнее см. гл. 21).

Аспарагиназу применяют для лечения некоторых форм лейкозов (рак белой крови). Лечение основано на том, что аспарагин (одна из аминокислот, необходимых для синтеза белков) в лейкозных клетках не синтезируется, и клетки получают его из плазмы крови. Если ввести в кровь больного аспарагиназу, то аспарагин в плазме крови разрушается и синтез белков в лейкозных клетках прекращается — клетки погибают.

Применение ферментов как аналитических реактивов

Высокая субстратная специфичность ферментов делает их совершенно уникальными аналитическими реактивами: с помощью фермента можно определить его субстрат в смеси, содержащей множество других веществ. Ферментные методы определения концентрации метаболитов в крови и других жидкостях организма широко используются в практике клинического лабораторного анализа. Этими методами измеряют содержание глюкозы, мочевины, мочевой кислоты, молочной кислоты, креатинина, холестерина, триацилглицеринов и других веществ.

Глава 3

СТРОЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В 1869 г. швейцарский биолог Ф. Мишер выделил из ядер клеток вещество, по свойствам отличавшееся от известных в то время компонентов клетки. Он назвал его нуклеином. В следующем столетии, когда стало известно строение этого вещества, за ним закрепилось название дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), в отличие от рибонуклеиновой кислоты (РНК), открытой позднее в ходе исследований ДНК. Всего через несколько лет после работы Мишера появились экспериментальные данные, позволившие предположить участие нуклеина (т. е. ДНК) в передаче признаков организма по наследству. Однако твердое обоснование и развитие эта идея нашла лишь в 50-е годы XX в.; тогда же были выяснены и функции РНК.

Знания о строении нуклеиновых кислот необходимы для понимания процесса биосинтеза белков, механизмов наследственности и генетической изменчивости организмов, происхождения и механизмов развития наследственных болезней.

Нуклеиновые кислоты — высокомолекулярные соединения. Молекулы ДНК имеют нитевидную форму (рис. 3.1). Длина молекул ДНК в клетках человека достигает нескольких сантиметров (от 2 до 6 см). ДНК каждой хромосомы представляет собой единую гигантскую молекулу. Вирусы и клетки бактерий часто содержат единственную молекулу ДНК. Молекулы РНК короче: их длина обычно не превышает 0,01 мм.

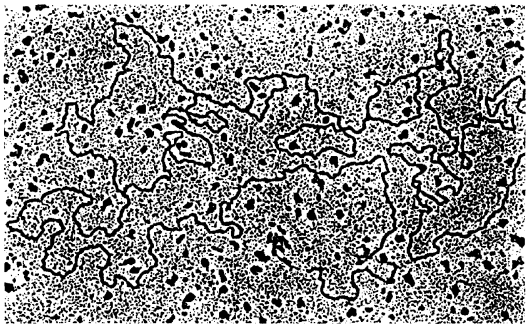
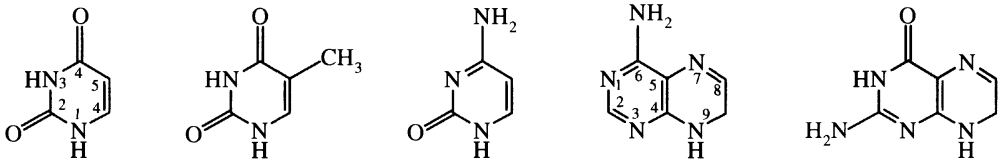


Рис. 3.1. Электронная микрофотография молекулы ДНК

Основная часть ДНК находится в ядре клетки, в составе хроматина; небольшое количество ДНК имеется в митохондриях (около 0,2 % от всей клеточной ДНК). РНК обнаруживается во всех частях клетки.

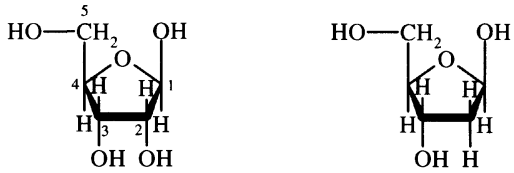
НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫЕ НУКЛЕОТИДЫ КЛЕТКИ

Нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры нуклеотидов. В свою очередь, нуклеотиды построены из трех компонентов: пиримидинового или пуринового основания, пентозы и фосфорной кислоты. Строение оснований представлено на рис. 3.2, строение пентоз – на рис. 3.3.



урацил (2,4-диокси-пиримидин) | тимин (5-метил-2,4-диокси-пиримидин) | цитозин (2-окси-4-амино-пиримидин) | аденин (6-аминопурин) | гуанин (2-амино-6-оксипурин)

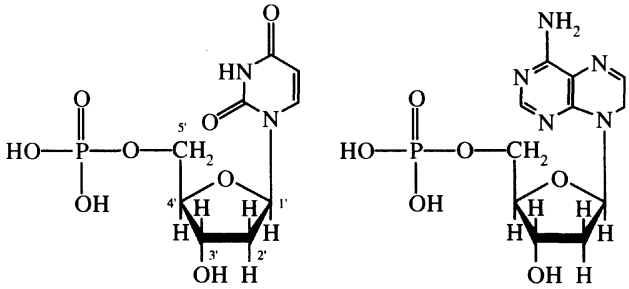
Рис. 3.2. Азотистые основания нуклеотидов



D-рибоза (β-D-рибофураноза) | D-2-дезоксирибоза (β-D-2-дезоксирибофураноза)

Рис. 3.3. Пентозы нуклеотидов

Соединение основания и пентозы называют нуклеозидом. Связь (β-гликозидная) образована первым атомом углерода пентозы с первым атомом азота в пиримидиновых нуклеозидах и девятым атомом азота — в пуриновых нуклеозидах.



уридиловая кислота (УМФ) | дезоксиадениловая кислота (дАМФ)

Рис. 3.4. Строение нуклеозидмонофосфатов

Нуклеотиды представляют собой нуклеозидфосфаты, например уридиловая кислота (УМФ), дезоксиадениловая кислота (дАМФ) (рис. 3.4).

В клетках имеются также нуклеозиддифосфаты и нуклеозидтрифосфаты (рис. 3.5).

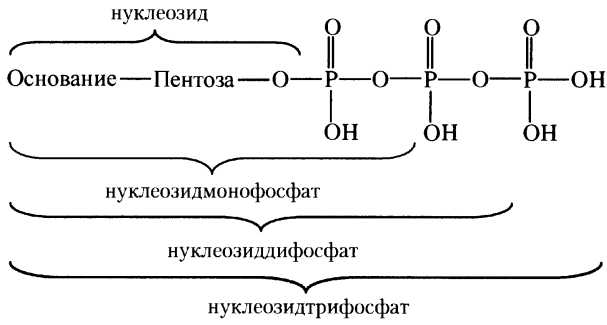


Рис. 3.5. Схема строения нуклеотидов

В зависимости от природы пентозного остатка нуклеотиды делят на два типа: рибонуклеотиды и дезоксирибонуклеотиды. Наиболее распространенные нуклеозиды и нуклеозидфосфаты приведены в табл. 3.1.

Таблица 3.1. Номенклатура наиболее распространенных нуклеозидов и нуклеозидфосфатов

Нуклеозиды	Нуклеозидмонофосфаты	Сокращенные обозначения моно-, ди- и трифосфатов нуклеозидов
Рибонуклеозиды	Рибонуклеозидмонофосфаты	
Аденозин	Аденозин-5′-монофосфат (адениловая кислота)	АМФ, АДФ, АТФ
Гуанозин	Гуанозин-5′-монофосфат (гуаниловая кислота)	ГМФ, ГДФ, ГТФ
Цитидин	Цитидин-5′-монофосфат (цитидиловая кислота)	ЦМФ, ЦДФ, ЦТФ
Уридин	Уридин-5′-монофосфат (уридиловая кислота)	УМФ, УДФ, УТФ
Дезоксирибонуклеозиды	Дезоксирибонуклеозидмонофосфаты	
Дезоксиаденозин	Дезоксиаденозин-5′-монофосфат (дезоксиадениловая кислота)	дАМФ, дАДФ, дАТФ
Дезоксигуанозин	Дезоксигуанозин-5′-монофосфат (дезоксигуаниловая кислота)	дГМФ, дГДФ, дГТФ
Дезоксицитидин	Дезоксицитидин-5′-монофосфат (дезоксицитидиловая кислота)	дЦМФ, дЦДФ, дЦТФ
Тимидин*	Тимидин-5′-монофосфат* (тимидиловая кислота)	дТМФ, дТДФ, дТТФ

* Отсутствие приставки «дезокси-» связано с тем, что тимин встречается почти исключительно в дезоксирибонуклеотидах (однако в сокращенных обозначениях приставка «д-» сохраняется).

Дезоксирибонуклеотиды в организме используются для образования ДНК. Функции рибонуклеотидов более разнообразны. Основная их масса расходуется на образование РНК. Кроме того, рибонуклеотиды выполняют роль коферментов в некоторых трансферазных реакциях (в частности, при синтезе полисахаридов). Адениловые рибонуклеотиды входят в состав коферментов НАД, НАДФ, ФАД, КоА. Уникальную роль в превращениях энергии в организме выполняет АТФ (гл. 8). Все нуклеозидтрифосфаты, подобно АТФ, содержат две высокоэнергетические связи, т. е. связи, при гидролизе которых освобождается значительное количество энергии (около 50 кДж/моль); это связи между фосфатными остатками.

Пурины и пиримидины поглощают ультрафиолетовое излучение с длиной волны около 260 нм. На этом основан метод определения концентрации нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Мономеры в молекулах нуклеиновых кислот соединены сложноэфирной связью, образованной фосфатным остатком одного мононуклеотида и 3′-гидроксильной группой пентозного остатка другого мононуклеотида (3′,5′-фосфодиэфирная связь) — рис. 3.6.

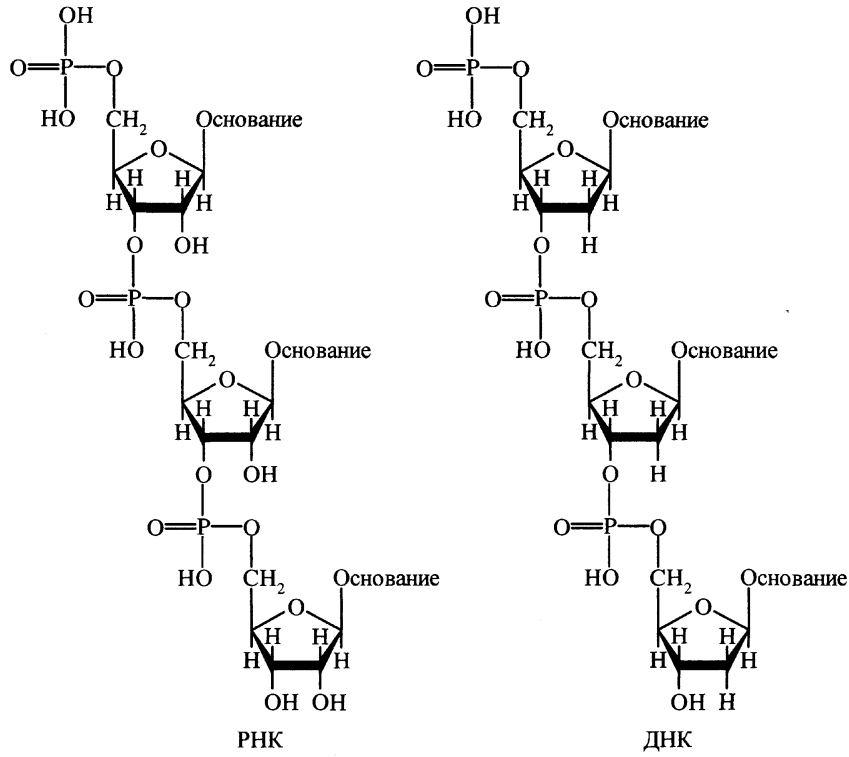


Рис. 3.6. Межнуклеотидные связи в РНК и ДНК

Межнуклеотидная 3′,5′-фосфодиэфирная связь гидролитически расщепляется нуклеазами. Это большая группа ферментов, различающихся по специфичности. Есть нуклеазы, гидролизующие как РНК, так и ДНК, есть такие, которые расщепляют только РНК (РНКазы) или только ДНК (ДНКазы). Одни из них отщепляют только концевые нуклеотиды (экзонуклеазы), другие гидролизуют внутренние связи (эндонуклеазы). Используя определенный набор нуклеаз, можно гидролизовать нуклеиновые кислоты до нуклеозидмонофосфатов — мономеров нуклеиновых кислот. При этом в гидролизате РНК обнаруживается четыре типа рибонуклеозидмонофосфатов, а в гидролизате ДНК — четыре типа дезоксирибонуклеозидмонофосфатов (см. табл. 3.1). Азотистые основания мономеров РНК и ДНК в трех случаях совпадают, а в одном — различны: УМФ (основание урацил) — в РНК, ТМФ (основание тимин) — в ДНК.

Таким образом, нуклеиновые кислоты представляют собой линейные полимеры нуклеозидмонофосфатов, полинуклеотиды. Концы полинуклеотида различаются по структуре: на одном конце имеется свободная 5′-фосфатная группа (5′-конец), на другом — свободная 3′-ОН-группа (3′-конец).

Разные ДНК отличаются друг от друга числом мононуклеотидных остатков в молекуле, нуклеотидным составом и порядком чередования нуклеотидных остатков (фактически оснований, поскольку пентозофосфатные части у всех мономеров одинаковы). Так же отличаются друг от друга разные РНК. Для краткого изображения первичной структуры нуклеиновых кислот пользуются однобуквенными символами нуклеозидов: A — аденозин, G — гуанозин, C — цитидин, U — уридин, T — тимидин. Первичная структура РНК может быть представлена, например, такой записью:

AUAAGUCCUA...

Запись структуры ДНК отмечается приставкой «д» (дезокси-):

д(GGGATATTGA...)

Эти две записи, помимо символа «д», различаются еще тем, что в первой (РНК) не встречается символ T, а во второй (ДНК) не встречается символ U.

При такой записи предполагается, что слева находится 5′-конец, справа — 3′-конец. Иногда приходится писать полинуклеотиды противоположным образом; в этом случае во избежание путаницы вводят дополнительные приставки: (5′–3′) AUAAG... — здесь 5′-конец слева; или (3′–5′) GAAUA..., 5′-конец справа.

Из четырех разных нуклеотидов можно построить огромное количество нуклеиновых кислот, различающихся по первичной структуре. В этом отношении нуклеиновые кислоты сходны с белками.

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК

Особенностью нуклеотидного состава ДНК является то, что число адениловых нуклеотидов равно числу тимидиловых, а число гуаниловых нуклеотидов равно числу цитидиловых: A = T, G = C; следовательно, A + G = T + C, т. е. число пуриновых нуклеотидов равно числу пиримидиновых (правила Чаргаффа). Такие соотношения не свойственны РНК.

Исходя из правил Чаргаффа о нуклеотидном составе ДНК и из рентгеноструктурных исследований, Дж. Уотсон и Ф. Крик (Великобритания) предложили модель строения ДНК (1953 г.). Ниже сформулированы основные черты этой модели.

1. Молекула ДНК построена из двух полинуклеотидных цепей, ориентированных антипараллельно и на всем протяжении связанных друг с другом водородными связями (каждый из мононуклеотидов участвует в образовании водородных связей) — рис. 3.7.

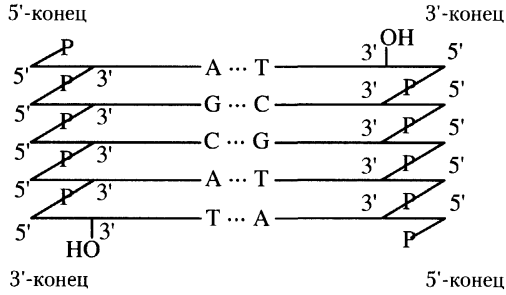


Рис. 3.7. Схема фрагмента молекулы ДНК. Горизонтальные линии обозначают дезоксирибозные остатки, косые линии — 3′,5′-фосфодиэфирные связи

2. Водородные связи между цепями образуются за счет специфического взаимодействия аденинового остатка одной цепи с тиминовым остатком другой цепи (пара A•••T) и гуанинового остатка одной цепи с цитозиновым остатком другой цепи (пара G•••C) — рис. 3.8.

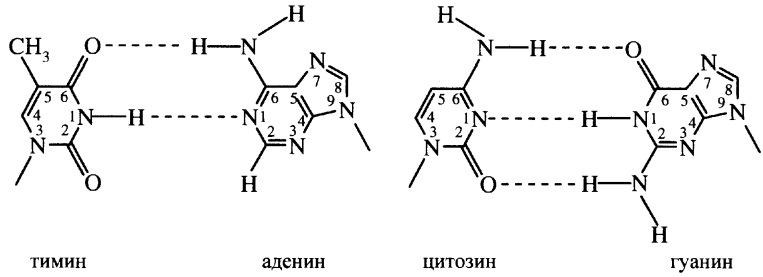


Рис. 3.8. Комплементарные пары нуклеотидов

Основания, образующие пару, комплементарны друг другу в том смысле, что между ними легче возникают водородные связи, чем при других сочетаниях (например, A и G, A и C и др.); это объясняется геометрией расположения групп, участвующих в образовании водородных связей между парами оснований, и геометрией молекулы ДНК в целом.

3. Первичная структура одной цепи молекулы ДНК комплементарна первичной структуре другой цепи. Это легко понять, рассматривая следующую схему:

$$\begin{array}{ll} (5' \to 3') & A—T—T—C—T—C—G—T—C—G—G \\ & \vdots\ \vdots\ \vdots\ \vdots\ \vdots\ \vdots\ \vdots\ \vdots\ \vdots\ \vdots\ \vdots \\ (3' \to 5') & T—A—A—G—A—G—C—A—G—C—C \end{array}$$

Если в положении n (считая с 5′-конца) первой цепи находится остаток дезоксиадениловой кислоты (А), то в положении n (считая с 3′-конца) второй цепи находится комплементарный ему остаток тимидиловой кислоты (Т), а не какой-либо иной мономер. Таким образом, если известна первичная структура одной цепи молекулы ДНК, то первичная структура другой цепи легко может быть написана исходя из правил комплементарности оснований и комплементарности цепей.

Следует отметить, что комплементарность цепей не означает идентичности их первичных структур: например, в приведенной выше молекуле первая цепь содержит три остатка тимидиловой кислоты, а вторая — только два; в первой цепи есть тройка нуклеотидов с последовательностью С–Т–С, а во второй цепи такой тройки нет.

4. Обе цепи закручены в спираль, имеющую общую ось; цепи могут быть разделены только путем раскручивания (такие спирали называют плектонемическими). Пуриновые и пиримидиновые основания нуклеотидов обращены внутрь спирали (см. рис. 3.7 и 3.9). Плоскости оснований перпендикулярны к оси спирали и параллельны друг другу, так что получается стопка оснований. Между основаниями в этой стопке возникают гидрофобные взаимодействия, вносящие основной вклад в стабилизацию двойной спирали, больший, чем водородные связи между цепями. Рибозофосфатные части располагаются по периферии, образуя ковалентный остов спирали.

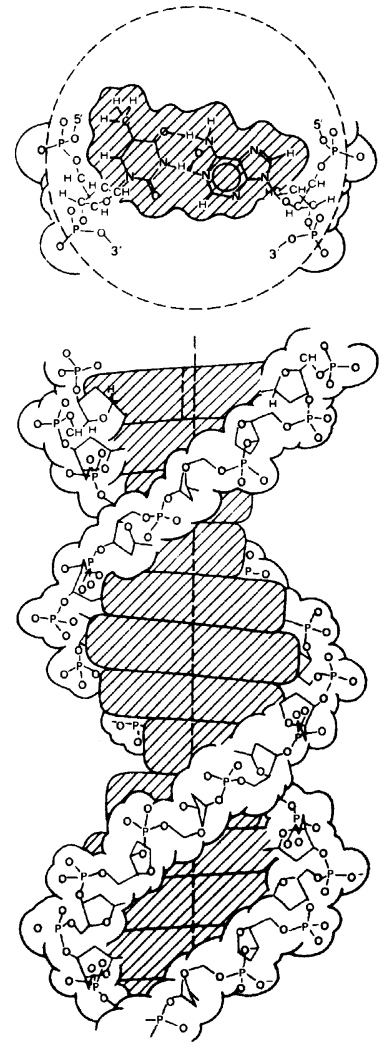


Рис. 3.9. Двойная спираль ДНК

Структура ДНК позволяет объяснить молекулярный механизм фундаментальных биологических явлений, таких, как самовоспроизведение организмов, наследственность, изменчивость. Поэтому 1953 год, когда Ф. Крик и Дж. Уотсон разработали модель строения ДНК (статья в английском журнале Nature заняла одну страницу), принято считать годом рождения молекулярной биологии.

Методы изучения ДНК

Для выделения ДНК из экстракта тканей белки экстракта разрушают протеазами, ДНК осаждают этанолом и осадок растворяют в буферном растворе. Как уже

отмечалось, молекулы ДНК имеют очень большие размеры: молекула среднего размера из клеток человека содержит примерно 150 млн нуклеотидных пар, ее длина равна 4 см, отношение длины к толщине равно 3106 (толщина двойной спирали ДНК 20 нм). Такие молекулы очень чувствительны к сдвиговым усилиям, возникающим в растворе, поэтому в процессе выделения из тканей ДНК фрагментируется, и получаются молекулы размером в тысячи-десятки тысяч нуклеотидных пар. Таким образом, каждая молекула среднего размера распадается на 15 000–150 000 фрагментов. Но и такого размера молекулы неудобны для исследования, и их приходится фрагментировать дополнительно.

Рестриктазы

Для фрагментирования ДНК обычно используют ферменты рестриктазы, выделяемые из бактерий. В отличие от других ДНКаз, рестриктазы узнают определенную нуклеотидную последовательность в двухцепочечной молекуле ДНК, часто из четырех или шести нуклеотидных пар, присоединяются к ней и гидролизуют по одной 3′,5′-фосфодиэфирной связи в каждой из цепей в области этих последовательностей. Разные рестриктазы узнают разные последовательности (рис. 3.10), и с помощью набора рестриктаз можно разрезать молекулу ДНК на фрагменты желаемой длины и в местах, выбранных экспериментатором.

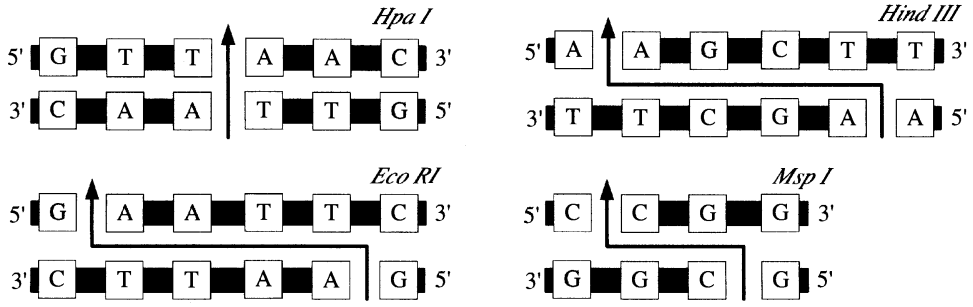


Рис. 3.10. Последовательности нуклеотидов в ДНК, узнаваемые некоторыми рестриктазами

Для изучения первичной структуры удобны фрагменты размером около 300 нуклеотидных пар, и, следовательно, молекулу ДНК длиной в 150 000 000 нуклеотидных пар нужно разрезать на 500 000 фрагментов, и каждый из них изучать отдельно. Для многих других исследований требуются и гораздо более короткие, и гораздо более длинные фрагменты.

Разделение фрагментов ДНК

Разделение фрагментов проводят методом электрофореза в полиакриламидном или агарозном геле. ДНК содержит отрицательно заряженные фосфатные группы, и поэтому в электрическом поле фрагменты перемещаются в направлении положительного электрода. Скорость перемещения зависит от размера фрагмента: чем

меньше размер, тем быстрее движется фрагмент. При определенных условиях удается разделять фрагменты, различающиеся по длине только на один нуклеотид. Специальные методы окрашивания позволяют сделать видимыми зоны (полосы) разделенных фрагментов (рис. 3.11).

Устройство прибора для электрофореза — см. рис. 1.34.

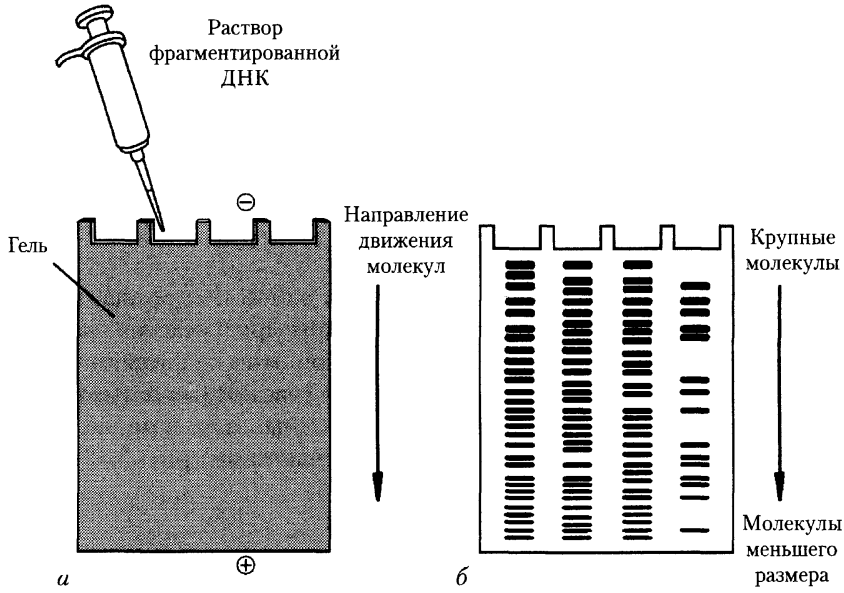


Рис. 3.11. Электрофорез в полиакриламидном геле смеси фрагментов ДНК:

а — раствор образцов ДНК вносят в выемки («колодцы»), расположенные у края пластины геля, со стороны отрицательного электрода, и включают ток. Фрагменты ДНК каждой пробы движутся в сторону положительного электрода с тем большей скоростью, чем меньше размер фрагмента; *б* — через определенное время гель извлекают из прибора для электрофореза и обрабатывают красителем, реагирующим с ДНК: зоны фрагментов ДНК становятся видимыми

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ РНК

Как уже упоминалось, каждая клетка содержит небольшое число молекул ДНК, по одной гигантской молекуле на каждую хромосому. Размеры молекул РНК гораздо меньше, от нескольких десятков до нескольких тысяч нуклеотидов. РНК отличаются большим разнообразием молекул. Содержание РНК в клетках в 5–10 раз больше, чем ДНК. По особенностям структуры и функций различают три основные типа РНК:

1. Рибосомные РНК (рРНК) — компоненты рибосом (см. ниже). На долю рРНК приходится около 80 % всей РНК клетки. Имеется три вида рРНК: 28S-рРНК (молекулярная масса около 1,5 млн, примерно 4000 нуклеотидных остатков); 18S-рРНК (молекулярная масса около 700 000; 5S-рРНК (молекулярная масса около 30 000, примерно 100 нуклеотидных остатков).

2. Транспортные РНК (тРНК) составляют около 15 % всей РНК клетки. Имеется несколько десятков видов тРНК, различающихся первичной структурой. Молекулярная масса тРНК около 25 000. Характерной особенностью первичной структуры тРНК является наличие в их молекулах кроме обычных мономеров еще т. н. минорных нуклеотидов (нуклеотидов, содержащихся в малых количествах). Минорные нуклеотиды содержат необычные основания (например, метилированные); в псевдоуридиловой кислоте необычна связь между основанием и рибозным остатком: не N—C, а C—C.
3. Матричные РНК (мРНК) составляют около 2 % всей РНК клетки. Число мРНК, различающихся по первичной структуре, так же велико, как число разных белков в организме. Матричные РНК иначе называют информационными РНК (иРНК).

Вторичная структура РНК

Молекулы РНК в отличие от ДНК построены из одной полинуклеотидной цепи. Однако в этой цепи имеются комплементарные друг другу участки, которые могут взаимодействовать, образуя двойные спирали. При этом соединяются нуклеотидные пары A•••U и G•••C. Такие спирализованные участки (их называют шпильками) обычно содержат небольшое число нуклеотидных пар, в пределах двух-трех десятков, и чередуются с неспирализованными участками (рис. 3.12).

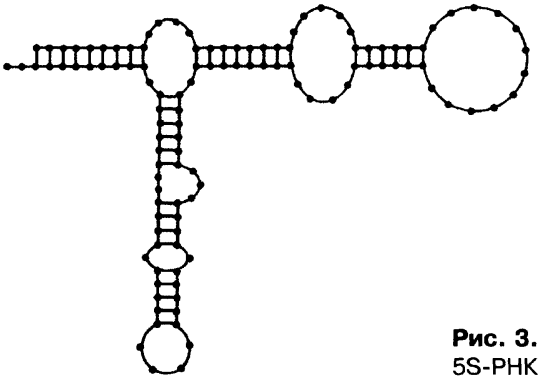


Рис. 3.12. Вторичная структура рибосомной 5S-РНК человека

Характерную вторичную структуру имеют тРНК. Они содержат четыре спирализованных участка и три (иногда четыре) одноцепочечные петли. При изображении такой структуры на плоскости получается фигура, называемая «клеверным листом» (рис. 3.13, *а*). Все несколько десятков разных тРНК клетки имеют общий план пространственной структуры, но различаются в деталях.

ГИБРИДИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Денатурация и ренативация ДНК

Вторичная структура нуклеиновых кислот образуется за счет возникновения водородных и гидрофобных связей между основаниями, т. е. слабых взаимодействий.

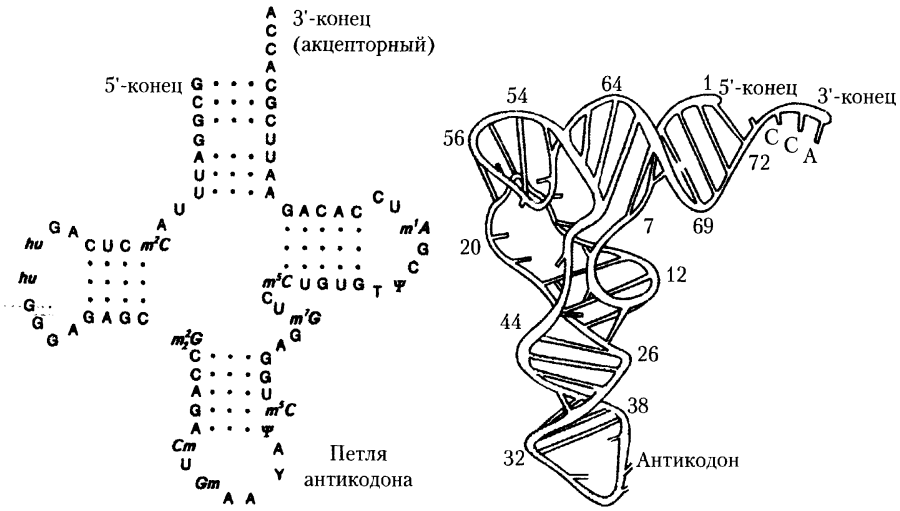


Рис. 3.13. Вторичная структура тРНК:

а — схема (минорные нуклеотиды выделены курсивом); *б* — пространственная модель (указаны номера некоторых нуклеотидов)

Поэтому, как и в случае белков, возможна денатурация нуклеиновых кислот при умеренных воздействиях.

Денатурация ДНК происходит при нагревании раствора до 70–100 °С, а также в сильнокислой или щелочной средах, или в растворе мочевины. В результате разрушения водородных и гидрофобных связей цепи расходятся и принимают конформацию беспорядочного клубка. Температура денатурации зависит от состава ДНК: чем больше в ДНК нуклеотидных пар ГЦ, тем выше температура денатурации.

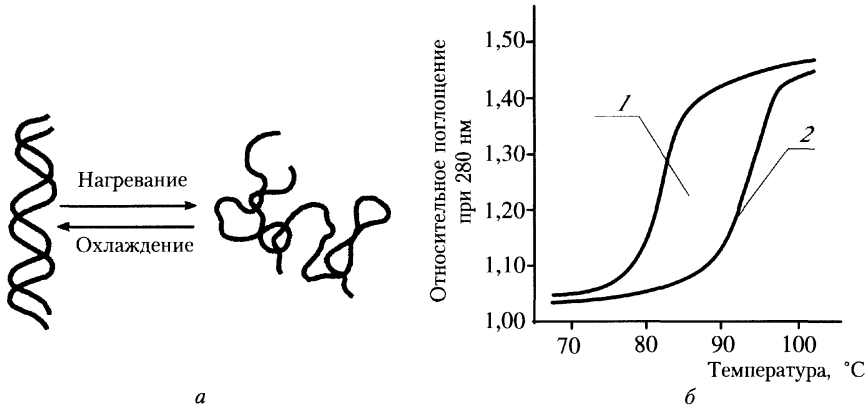


Рис. 3.14. Денатурация ДНК:

а — схема изменения вторичной структуры; *б* — графики денатурации (плавления) двух образцов ДНК: образец *2*, имеющий более высокую температуру плавления, содержит больше пар GC, чем образец *1*

Денатурация данного образца ДНК происходит в довольно узком интервале температур, поэтому ее часто называют плавлением. Денатурация сопровождается увеличением поглощения при 260 нм (т. н. гиперхромный эффект). Поглощение может увеличиться примерно в 1,5 раза. Это дает удобный метод наблюдения за ходом денатурации (см. рис. 3.14). Денатурацию можно обнаружить также по уменьшению вязкости раствора.

Относительное поглощение — это отношение поглощения УФ-излучения раствором ДНК при комнатной температуре к поглощению при температурах, указанных на графике.

Если раствор ДНК, денатурированной нагреванием, охлаждать, то вновь возникают слабые связи, и при определенных условиях могут получиться двуспиральные структуры, идентичные структурам исходного (до денатурации) препарата; т. е. произойдет ренативация (отжиг ДНК). На явлениях денатурации и ренативации основан метод молекулярной гибридизации, который применяют для изучения строения нуклеиновых кислот, а также для их фракционирования.

Гибридизация ДНК–ДНК

Если смешать растворы ДНК, выделенных из организмов разных видов (например, лягушки и кролика), нагреть эту смесь (т. е. денатурировать ДНК), а затем охладить, то вновь будут возникать двуспиральные структуры. При этом наряду с двуспиральными молекулами, идентичными исходным молекулам ДНК, могут образовываться гибридные молекулы, содержащие одну нуклеотидную цепь из ДНК лягушки, а другую — из ДНК кролика (рис. 3.15). Такие гибридные молекулы бывают несовершенными: спирализованные участки чередуются в них с неспирализованными; очевидно, в неспирализующихся участках полинуклеотидные цепи не комплементарны друг другу. Несовершенство гибридов ДНК–ДНК можно обнаружить с помощью электронного микроскопа. Изучение гибридизации ДНК–ДНК позволило сделать следующие важные для биологии выводы:

1. ДНК клеток всех органов и тканей одного и того же организма идентичны.
2. ДНК, выделенные из тканей разных особей одного биологического вида, идентичны (точнее — почти идентичны).
3. ДНК, полученные от особей разных биологических видов, неидентичны, образуют несовершенные гибридные молекулы. Степень несовершенства гибридов ДНК–ДНК тем больше, чем отдаленнее филогенетическое родство между видами. Иначе говоря, первичная структура ДНК характеризуется видовой специфичностью. В связи с этим метод гибридизации ДНК–ДНК оказалось возможным применять для уточнения систематики организмов.

Гибридизация ДНК–РНК

Сходным образом может происходить и гибридизация ДНК–РНК: в этом случае гибридная молекула содержит одну дезоксирибонуклеотидную цепь и одну рибонуклеотидную (см. рис. 3.15, *б*). Из результатов гибридизации следует, что каждая

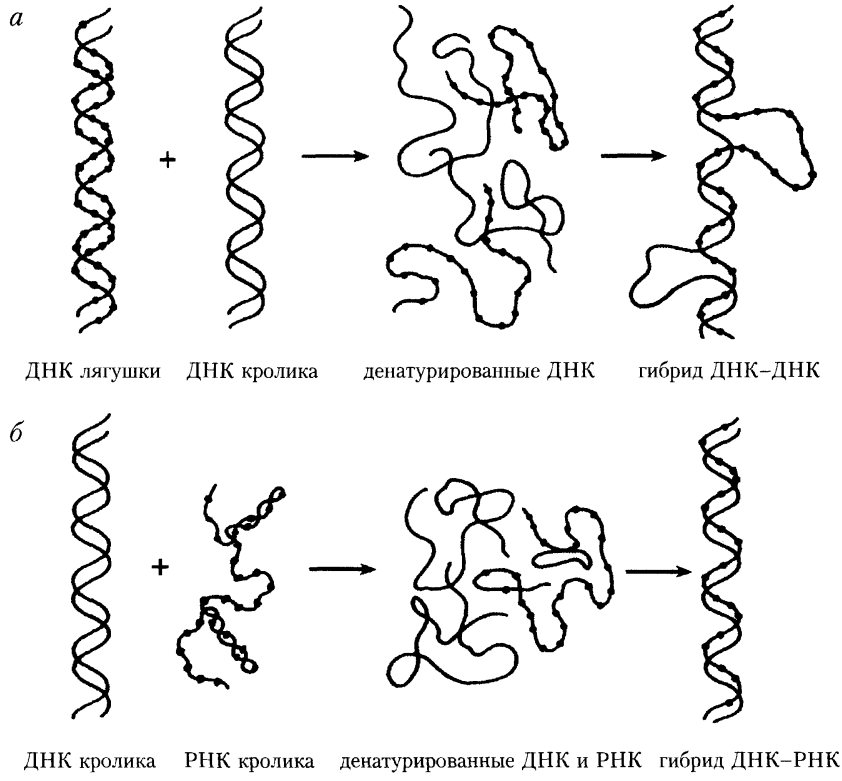


Рис. 3.15. Гибридизация нуклеиновых кислот:
а — гибридизация ДНК–ДНК; *б* — гибридизация ДНК–РНК

молекуда РНК (точнее — первичный транскрипт, см. гл. 4) комплементарна определенному участку ДНК того же организма. Это означает, что все соображения относительно видовой специфичности ДНК в равной мере применимы и к РНК.

ДНК-зонды

Если ДНК человека разрезать с помощью рестриктаз на фрагменты длиной 4000 нуклеотидов, то получится около 1 млн фрагментов. Как в такой груде найти и извлечь из нее искомый фрагмент? Это можно сделать, используя ДНК-зонды. Зонды представляют собой фрагменты одноцепочечной ДНК длиной около 20 нуклеотидов, содержащие радиоактивную (например, ^{32}P) или другую метку. Нуклеотидная последовательность зонда должна быть комплементарна какой-то части искомого фрагмента ДНК. Зонд вносят в раствор фрагментов ДНК, смесь нагревают для денатурации ДНК, затем охлаждают для ренативации ДНК. При этом часть искомых фрагментов соединится с зондом, таким образом искомый ген окажется меченым (рис. 3.16). Затем смесь разделяют электрофорезом и по наличию радиоактивной метки находят нужный фрагмент. РНК тоже можно использовать в качестве зонда.

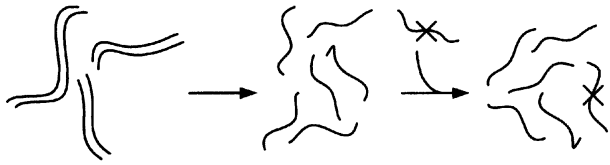


Рис. 3.16. Идентификация определенной последовательности ДНК с использованием ДНК-зонда

СТРОЕНИЕ ХРОМАТИНА

Нуклеиновые кислоты в живой клетке находятся в форме нуклеопротеинов — соединений с белками. Лишь тРНК обнаруживается преимущественно в свободно растворенном состоянии в цитозоле. Основные нуклеопротеиновые структуры — это хроматин (дезоксирибонуклеопротеин) и рибосомы (рибонуклеопротеин).

Структурная организация хроматина сложна и изучена далеко не полностью. Состояние хроматина изменяется в зависимости от клеточного цикла. В фазе покоя (время интерфазы) хроматин равномерно распределен по всему объему ядра и не обнаруживается обычными микроскопическими методами. В фазе деления клетки хроматин образует компактные частицы, хромосомы*, которые видны в обычный микроскоп.

Примерно $^2/_3$ массы хроматина составляют белки, $^1/_3$ — ДНК. Хроматин содержит также РНК (до 10 %). Половина всех белков хроматина — это гистоны, другая половина — негистоновые белки.

Нуклеосомы

Гистоны представляют собой белки с молекулами сравнительно небольшого размера (молекулярная масса 11 000–22 000). Различают нуклеосомные гистоны (их четыре типа – H2A, H2B, H3, H4) и линкерный гистон H1. Характерная особенность гистонов – высокое содержание лизина и (или) аргинина; это придает им щелочной характер и способность взаимодействовать с кислотными группами ДНК.

На электронно-микроскопических фотографиях хроматина видны образования, напоминающие бусины, нанизанные на нитку (рис. 3.17). Каждая бусина содержит 8 молекул нуклеосомных гистонов и прилегающую к ним петлю ДНК длиной около 150 нуклеотидных пар (примерно полтора витка вокруг гистонов). Такую структуру называют нуклеосома (рис. 3.18). В межнуклеосомных (линкерных) участках к ДНК присоединена молекула гистона H1.

При такой укладке (компактизации) молекулы ДНК занимают места (в длину) примерно в 7 раз меньше по сравнению с вытянутой молекулой. Кроме того, гистоны защищают ДНК от действия нуклеаз.

* Следует иметь в виду, что термин «хромосомы» часто употребляют в более широком смысле, для обозначения генетического материала вообще. В этом смысле хроматин покоящейся клетки — тоже хромосомы; у прокариот нет ядра и не бывает хромосом в узком смысле слова, однако их генетический материал тоже называют хромосомами, в расширительном толковании этого слова.

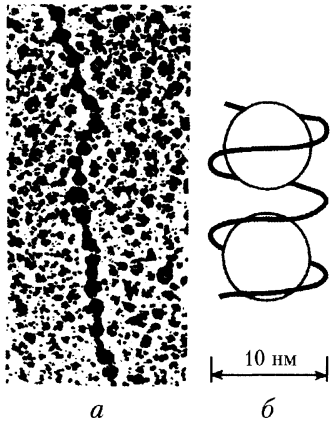


Рис. 3.17. Электронная микрофотография хроматиновой цепи с нуклеосомами (ув. 225 000 раз)

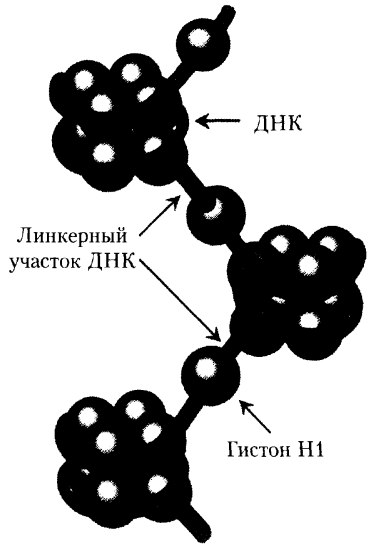


Рис. 3.18. Строение нуклеосом

Нуклеосомная структура — это лишь первый уровень укладки ДНК. Длина молекул ДНК человека измеряется сантиметрами (от 2 до 6 см), а длина хромосом — всего несколько микрометров. Следовательно, степень укорочения (компактизации) ДНК при укладке в хромосомы должна достигать нескольких тысяч. Это происходит в результате дополнительного скручивания нуклеосомной нитки бус. Высшие уровни укладки ДНК изучены недостаточно.

Негистоновые белки хромосом

Негистоновые белки хромосом очень разнообразны и включают структурные белки, наряду с гистонами обеспечивающие компактизацию ДНК, а главное — множество ферментов и неферментных белков, участвующих в синтезе ДНК и РНК и в регуляции действия генов. Подробнее эти белки будут описаны в следующей главе.

Для многих белков хроматина характерны особые структурные мотивы, обеспечивающие их связывание с ДНК (рис. 3.19). Мотив α-спираль-поворот-α-спираль содержит две α-спирали, соединенные поворотом пептидной цепи. Лейциновая застежка-«молния» также содержит два α-спиральных участка, в пептидной цепи которых у каждого второго витка α-спирали (около 6 аминокислотных остатков) находится лейцин. При таком распределении радикалы всех остатков лейцина оказываются расположенными на одной стороне α-спирали. Две такие α-спирали соединяются друг с другом в результате гидрофобного взаимодействия радикалов лейцина.

«Цинковый палец» включает около 20 аминокислотных остатков, образующих петлю при участии цинка: цинк соединен с двумя остатками цистеина и двумя остатками гистидина (могут быть также все четыре связи с цистеином). Эти элементы супервторичной структуры придают белкам геометрическую форму,

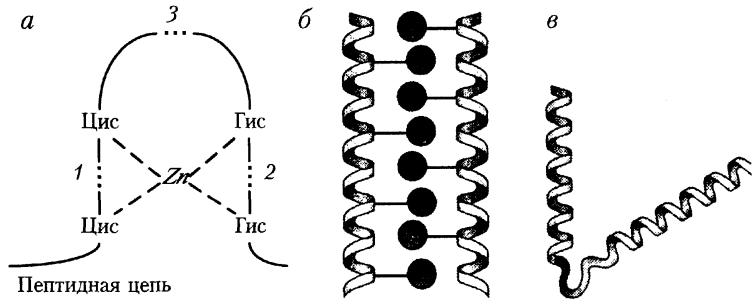


Рис. 3.19. Формы супервторичной структуры некоторых белков хроматина:

а — цинковый палец; участки *1* и *2* пептидной цепи содержат 2–3 аминокислотных остатка, участок *3* — около 10 остатков; *б* — лейциновая застежка-«молния»; *в* — α-спираль-поворот-α-спираль

соответствующую (комплементарную) форме поверхности молекул ДНК, имеющей две борозды — большую и малую.

СТРОЕНИЕ РИБОСОМ

Рибосомы эукариот представляют собой субклеточные частицы с коэффициентом седиментации 80 S и молекулярной массой 4,5 млн. Они состоят из двух субъединиц: большой (60S) и малой (40S); при снижении концентрации ионов Mg^{2+} в растворе до 0,1 мм 80S-частица распадается на субъединицы. Каждая из субъединиц содержит РНК и белки. Субъединицы распадаются на составные части в растворах с низким значением pH и в присутствии детергентов (рис. 3.20).

Нуклеиновые кислоты субъединиц выполняют, в частности, роль каркаса для объединения белков в определенном порядке. Рибосома в целом функционирует как устройство для синтеза белков (см. гл. 4).

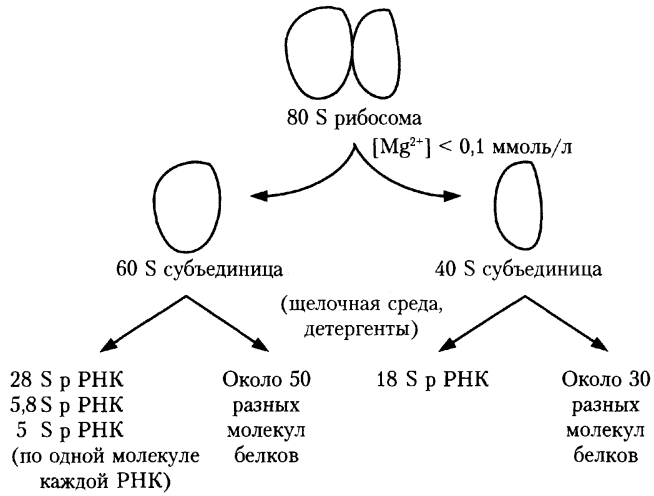


Рис. 3.20. Компоненты рибосом эукариот

Глава 4

БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ (МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ)

Первичную структуру важнейших биополимеров — белков и нуклеиновых кислот — можно сравнить с буквенной записью: и в том и в другом случае имеется не произвольное, а строго определенное, «имеющее смысл» чередование элементов — мономеров или букв. На этом основании нуклеиновые кислоты и белки называют информационными молекулами. Чтобы получить такие молекулы, недостаточно смешать мономеры и обеспечить условия образования пептидной или фосфодиэфирной связи: необходима еще программа, определяющая последовательность присоединения разных мономеров к растущей цепи полимера. При биосинтезе новых молекул нуклеиновых кислот и белков носителями такой программы являются нуклеиновые кислоты; в этой роли их называют матрицами. Матрица в ходе матричного синтеза не расходуется и может использоваться многократно; в этом отношении она сходна с катализатором.

Различают три основных типа матричных биосинтезов (рис. 4.1):

1) биосинтез ДНК (репликация ДНК) с использованием в качестве матрицы уже существующих молекул ДНК;
2) биосинтез РНК на матрице ДНК (транскрипция);
3) биосинтез белков с использованием мРНК в качестве матрицы (трансляция).

Возможен также биосинтез ДНК на матрице РНК (обратная транскрипция) и синтез РНК на матрице РНК (репликация РНК) (см. раздел «Особенности репликации вирусного генома»).

Рис. 4.1. Матричные биосинтезы:

1 — репликация; *2* — транскрипция; *3* — трансляция; дНТФ — дезоксирибонуклеозидтрифосфаты; НТФ — рибонуклеозидтрифосфаты

БИОСИНТЕЗ ДНК (РЕПЛИКАЦИЯ)

ДНК и наследственность

История изучения строения, биосинтеза и функций ДНК связана с возникновением и решением общебиологической проблемы наследственности.

На рубеже XIX и XX вв. генетические и цитологические исследования привели к выводу, что ответственными за передачу признаков по наследству являются хромосомы. При этом можно выделить некоторый наследственный признак, который передается с определенным участком хромосомы — геном. Всему набору признаков организма соответствует набор генов всех хромосом — генотип. Объяснение механизма передачи признаков включало представление о самовоспроизведении (репликации) генотипа; в результате самовоспроизведения генотип клетки удваивается, и при последующем делении дочерние клетки получают по полному набору генов. Это представление обосновывалось картиной удвоения и расхождения хромосом в процессе митоза.

Поскольку хромосомы содержат белок и ДНК, возник вопрос, какое из этих веществ участвует в передаче наследственных признаков. В 40–50-е годы XX в. появилось много экспериментальных указаний на то, что передача наследственной информации осуществляется молекулами ДНК. Одним из наглядных доказательств этого послужило изучение размножения бактериофагов — вирусов, паразитирующих на бактериях. Бактериофаг Т4, размножающийся в клетках кишечной палочки, состоит из ДНК и белковой оболочки с довольно сложной морфологией (рис. 4.2). Фаг имеет головку икосаэдрической формы, в которой тесно упакована одна молекула ДНК, и полый цилиндрический хвост, от конца которого отходят шесть тонких нитей. Хвост имеет двойные стенки и представляет собой как бы трубку, вставленную в трубку большего диаметра.

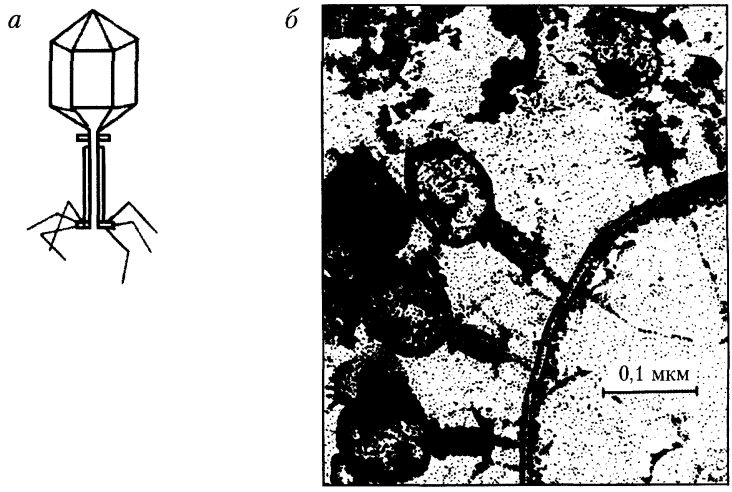


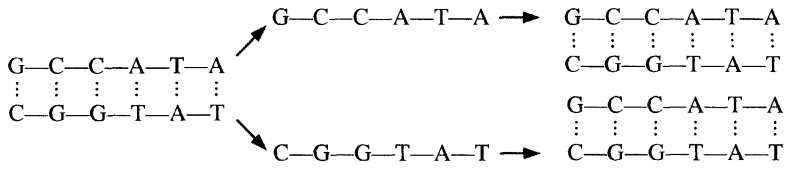
Рис. 4.2. Строение бактериофага Т4 (*а*) и электронная микрофотография фагов, прикрепленных к стенке E. coli (*б*)

Процесс заражения бактерии фагом представляет собой сложную последовательность молекулярных событий. Фаг присоединяется к ее поверхности с помощью хвостовых нитей, и конец хвоста фиксируется на оболочке бактерии. Прикрепление фага к бактерии основано на комплементарном взаимодействии белков хвостовых нитей и конца хвоста с веществами бактериальной стенки. Затем наружная трубка хвоста сокращается, внутренняя трубка проникает через оболочку бактерии, и через нее из головки внутрь бактерии «впрыскивается» ДНК фага, тогда как белковая оболочка фага остается на поверхности. Через некоторое время, измеряемое десятками минут, в бактерии обнаруживается уже несколько сот фаговых частиц, имеющих и белковую оболочку, и ДНК внутри нее. Из этого следует, что вся информация о структуре фага содержится в его ДНК.

Такого рода работами завершилась линия исследований, посвященных выяснению материальной основы наследственности; начало этой линии восходит к первым наблюдениям и осознанию явления наследственности, роль которой стала вполне ясной после появления теории биологической эволюции.

Механизм репликации

После установления химической природы наследственного материала проблема самовоспроизведения (репликации) хромосом, а точнее – генотипа превратилась в проблему репликации ДНК. Первостепенное значение для решения этой проблемы имела разработка модели строения ДНК Ф. Криком и Дж. Уотсоном в 1953 г. Структура двойной спирали позволяла представить простой механизм репликации ДНК: двойная спираль сначала раскручивается, цепи расходятся, а затем каждая одноцепочечная половина молекулы ДНК достраивается до целой, двухцепочечной молекулы:



Последовательность нуклеотидов вновь синтезирующихся цепей определяется правилом комплементарности оснований и последовательностью нуклеотидов имеющейся цепи. Иначе говоря, имеющиеся нуклеотидные цепи служат матрицей для синтеза новых цепей; в результате получаются две двухцепочечные молекулы ДНК, идентичные исходной молекуле.

Такой способ репликации получил название полуконсервативного (в принципе возможен и другой механизм — консервативный, при котором вновь синтезируемая нуклеотидная цепь образуется прямо на двойной спирали ДНК, без ее раскручивания). Полуконсервативный механизм репликации ДНК нашел подтверждение в экспериментах с клетками кишечной палочки. Культуру E. coli на протяжении нескольких поколений выращивали на среде, содержащей в качестве единственного источника азота $^{15}NH_4Cl$. После этого все вещества клеток E. coli, в которые входит азот, содержали не обычный изотоп азота ^{14}N, а

тяжелый ^{15}N. ДНК с ^{15}N имеет большую плотность, чем ДНК с ^{14}N, и это можно обнаружить методом центрифугирования (рис. 4.3). Если культуру, содержащую ^{15}N-ДНК, пересеять на среду с немеченым азотом ($^{14}NH_4Cl$), то ДНК клеток первого поколения имеет плотность, промежуточную между плотностями ^{15}N-ДНК и ^{14}N-ДНК; в клетках второго поколения обнаруживается два типа ДНК: с промежуточной плотностью и легкая (^{14}N-ДНК). Эти результаты легко объясняются, если исходить из полуконсервативного механизма репликации ДНК (см. рис. 4.3). Позднее было установлено, что в клетках эукариот репликация ДНК происходит также полуконсервативным способом.

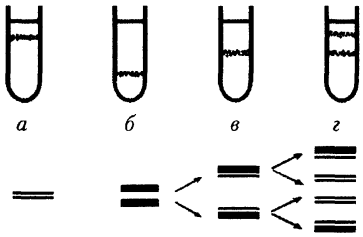


Рис. 4.3. Эксперимент, доказывающий полуконсервативный механизм репликации ДНК. Заштрихованные зоны в пробирках указывают положение ДНК после центрифугирования:

а и *б* — ДНК из клеток E. coli, выращенных на среде с $^{14}NH_4Cl$ (а) и $^{15}NH_4Cl$ (б); в и г — ДНК из клеток первого (в) и второго (г) поколений после пересева со среды с $^{15}NH_4Cl$ на среду с $^{14}NH_4Cl$. Внизу — схема, объясняющая результаты центрифугирования. Каждая пара горизонтальных линий изображает двухцепочечную ДНК: тонкая линия — легкая нуклеотидная цепь, толстая — тяжелая цепь (содержащая ^{15}N)

ДНК-полимераза

Синтез новых полинуклеотидных цепей при репликации катализирует фермент ДНК-полимераза. Реакцию удается осуществить и изучать *in vitro*, используя ферменты, выделенные из организма. Ее можно представить такой схемой:

$$m\,(\text{дАТФ} + \text{дТТФ}) + n\,(\text{дГТФ} + \text{дЦТФ}) \xrightarrow[\text{затравка}]{\text{ДНК матрица}} \text{ДНК} + (m + n)\,H_4P_2O_7$$

Отметим важнейшие особенности реакции.

1. Субстратами служат трифосфаты дезоксирибонуклеозидов. В ходе реакции от каждого из них отщепляется пирофосфатный остаток; таким образом, включение каждого мономера в молекулу ДНК требует расхода энергии высокоэнергетических связей.
2. Реакция идет только в присутствии уже готовой ДНК, выполняющей роль матрицы. Все вновь синтезируемые молекулы ДНК имеют первичную структуру, идентичную первичной структуре ДНК-матрицы.
3. Поскольку в молекуле ДНК нуклеотидные остатки образуют пары A—T и G—C, в реакции расходуются одинаковые количества дАТФ и дТТФ (стехиометрический коэффициент *m*) и одинаковые количества дГТФ и дЦТФ (стехиометрический коэффициент *n*).

ДНК-полимераза не способна начинать синтез новой цепи с ее первого нуклеотида; она может лишь удлинять уже имеющуюся цепь, присоединяя к ее 3′-концу новые нуклеотиды. Поэтому для начала реакции требуется затравка (праймер; рис. 4.4).

При проведении реакции *in vitro* в качестве затравки обычно используют короткий олигонуклеотид (5–10 нуклеотидных остатков), комплементарный матричной цепи ДНК; в живой клетке затравками служат короткие РНК (см. ниже).

Фермент присоединяется к ДНК-матрице и к затравке в области 3′-концевого нуклеотида затравки (рис 4.4). Перемещаясь по матрице в направлении ее 5′-конца, ДНК-полимераза удлиняет затравку, присоединяя к ней один за другим нуклеотидные остатки. Очередной нуклеотид растущей цепи должен быть комплементарен очередному нуклеотиду матрицы. К активному центру ДНК-полимеразы может присоединяться любой из четырех дНТФ. Но фосфодиэфирная связь образуется лишь в том случае, если предыдущий нуклеотид растущей цепи комплементарен соответствующему нуклеотиду матрицы и соединен с ним водородными связями. Иногда случается ошибка, и фосфодиэфирная связь образуется с нуклеотидом, некомплементарным очередному нуклеотиду матрицы (например, в той фазе, которая представлена на рис. 4.4, вместо дГТФ используется дАТФ). В этом случае дальнейший рост новой цепи возобновляется лишь после того, как неправильный нуклеотид отщепляется той же ДНК-полимеразой. Таким образом, точность копирования проверяется дважды и поэтому очень высока: на миллиард нуклеотидов только один ошибочный.

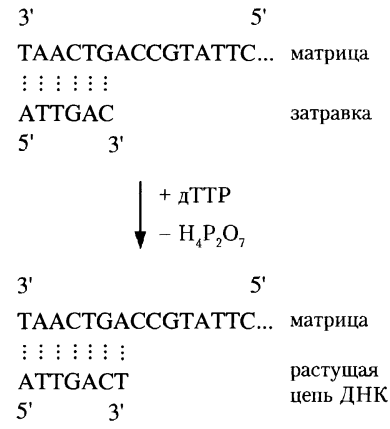


Рис. 4.4. Реакция, катализируемая ДНК-полимеразой

Репликация ДНК *in vivo*

В живой клетке репликация ДНК представляет собой весьма сложный процесс. В частности, в нем участвует несколько ДНК-полимераз, заметно различающихся по свойствам и функциям. Кроме ДНК-полимераз в нем участвует еще около двух десятков белков. Репликация начинается в участках ДНК, имеющих определенную нуклеотидную последовательность и называемых ориджинами (англ. origin — начало). Этот участок узнают и присоединяются к нему ДНК-топоизомераза и ДНК-хеликаза (рис. 4.5). ДНК-топоизомераза (на рис. 4.5 не показана) разрывает одну из цепей ДНК (гидролизует одну 3′,5′-фосфодиэфирную связь), и тем самым делает возможным раскручивание двойной спирали. Это временные разрывы, чуть позднее они ликвидируются: та же ДНК-топоизомераза восстанавливает 3′,5′-фосфодиэфирную связь в месте разрыва. Для раскручивания, кроме образования разрывов, еще необходимо разделить цепи, т. е. разорвать водородные связи между комплементарными нуклеотидами. Это делает ДНК-хеликаза. Разделение цепей – процесс не самопроизвольный, на разделение каждой пары нуклеотидов расходуется одна молекула АТФ. Обратный процесс — соединение цепей — происходит самопроизвольно, но во время репликации он заторможен специальными белками SSB (англ. *single strand binding* — соединяющиеся с одинарными цепями).

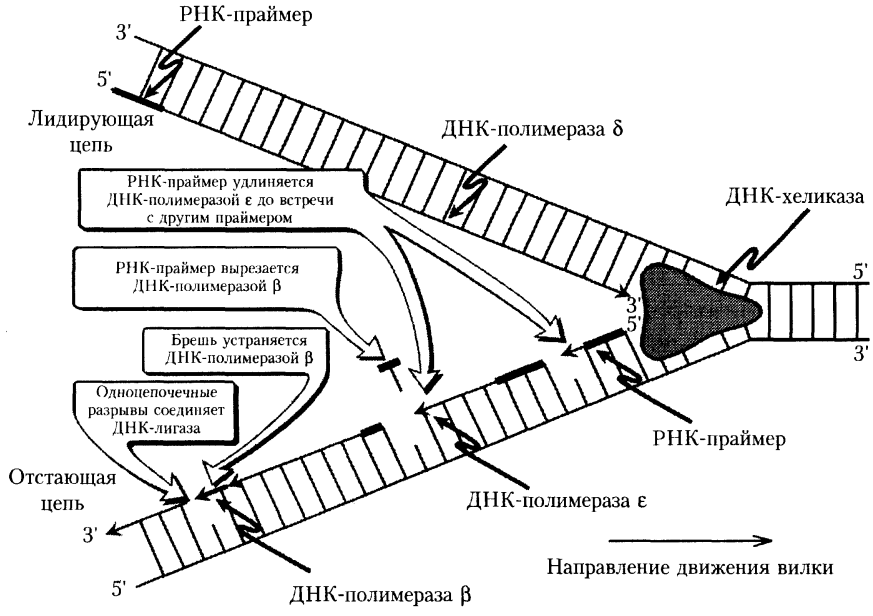


Рис. 4.5. Репликация

а — на одной ветви репликативной вилки синтезируется непрерывная нуклеотидная цепь, на другой — фрагменты Оказаки; б — фрагменты Оказаки соединены между собой в результате действия ДНК-лигазы; по мере роста новых цепей репликативная вилка перемещается по ДНК. В молекуле ДНК, изображенной на рис. 3.1, можно видеть четыре места, где ДНК удвоилась

ДНК-топоизомераза ликвидирует разрывы цепей еще до того, как произойдет их разделение с участием ДНК-хеликазы и SSB.

Область, где двухцепочечная ДНК граничит с одноцепочечной, называют репликативной вилкой. Репликативная вилка и белки, участвующие в репликации, образуют репликативный комплекс.

На каждой из одноцепочечных цепей репликативной вилки происходит синтез новых цепей, но не одинаково. Различия связаны с тем, что матричные цепи расположены антипараллельно, а синтез новых цепей возможен только с их 3′-конца. Рассмотрим сначала синтез той цепи, которую называют лидирующей (см. рис. 4.5). Прежде всего, в месте расхождения цепей образуется затравка (праймер), которая представляет собой короткий (около 10 нуклеотидов) полирибонуклеотид (РНК, не полидезоксирибонуклеотид), комплементарный матричной цепи. Синтез затравки осуществляет фермент праймаза (ДНК-полимераза α). Затем 3′-конец затравки начинает расти уже за счет присоединения дезоксирибонуклеотидных остатков при участии ДНК-полимеразы δ. Удлинение ведущей цепи происходит непрерывно по мере перемещения репликативного комплекса вдоль матричной цепи ДНК.

Другая растущая цепь (отстающая) образуется прерывисто. В этом случае 3′-конец матричной цепи ориентирован не в сторону движения репликативной вилки, а в противоположную сторону. Поэтому синтез затравки и последующее наращивание ее 3′-конца ДНК-полимеразой ε (другая ДНК-полимераза, не та,

которая действует в лидирующей цепи) начинаются не в точке расхождения цепей, а тогда, когда освободится участок матрицы длиной около 200 нуклеотидов. При этом образуются короткие цепи ДНК, содержащие праймер. По имени первооткрывателя их называют фрагментами Оказаки. Затем при участии ДНК-полимеразы β (еще одна ДНК-полимераза!) удаляется РНК-праймер, и на его месте образуется дезоксирибонуклеотидная последовательность. В результате получаются фрагменты цепи длиной около 200 нуклеотидов (у эукариот), не соединенные между собой. Соединение этих фрагментов 3′,5′-фосфодиэфирной связью осуществляет еще один фермент репликативного комплекса — ДНК-лигаза.

Расхождение цепей, начавшись в области ориджина, распространяется в обе стороны; таким образом, в каждом ориджине образуются две репликативные вилки, движущиеся в противоположных направлениях.

Репликация начинается одновременно во многих местах молекулы ДНК. Ориджины расположены в молекуле ДНК примерно через каждые 100 000 н. п. Участок ДНК между соседними ориджинами называют репликоном. Каждый репликон реплицируется двумя репликативными комплексами, движущимися навстречу друг другу (рис. 4.6).

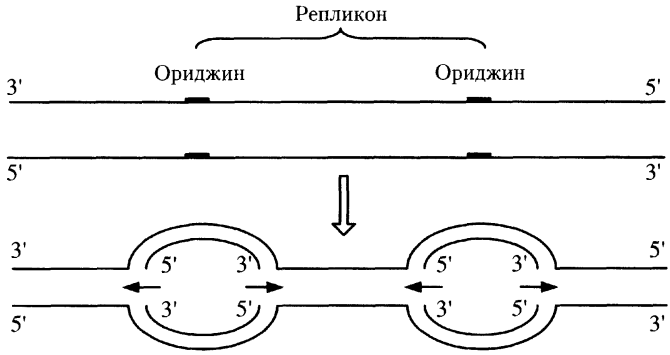


Рис. 4.6. Ориджины и репликоны ДНК. Стрелки в репликативных вилках указывают направление их перемещения

Репликация начинается сразу во многих местах длинной молекулы ДНК, в каждом репликоне. Из результатов изучения репликации в экспериментах *in vitro* следует, что один репликон реплицируется за 2 ч. И столько же времени потребуется для репликации молекулы ДНК любой длины, поскольку чем длиннее ДНК, тем больше в ней ориджинов и репликонов. Фактически репликация генома человека *in vivo* продолжается 6–8 ч. Если бы молекула ДНК длиной в 150 000 000 н. п. реплицировалась от начала до конца одним репликативным комплексом, то потребовалось бы 10 дней.

Репликация и фазы клеточного цикла

Митотический клеточный цикл описывает изменения клеток в процессе их размножения (пролиферации). При этом выделяют фазы, которые можно различить и морфологически, и по особенностям биохимических процессов (рис. 4.7, *а*).

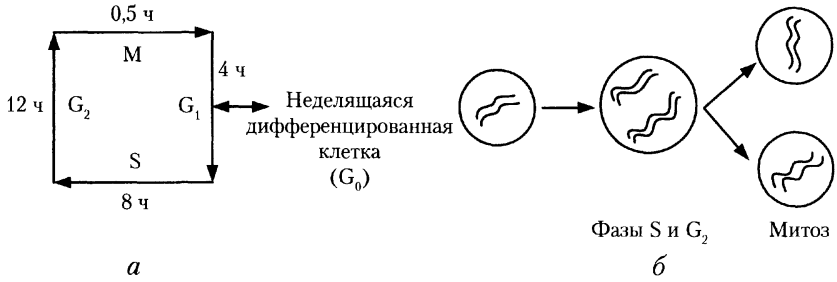


Рис. 4.7. Синтез ДНК и фазы клеточного цикла:

а — клеточный цикл (указана продолжительность фаз цикла); *б* — передача информации от поколения к поколению

Зрелые соматические клетки человека диплоидны, т. е. содержат две копии генома (фазы G_1 и G_0). Во время фазы S происходит репликация ДНК: каждая из копий генома удваивается, и клетка становится тетраплоидной.

Во время митоза (M) происходит конденсация хроматина и образование хромосом (тетраплоидного набора), а при последующем делении клетки образуются диплоидные дочерние клетки. Во время фазы G_1 синтезируются РНК и белки, обеспечивающие рост клетки. Клетки, подвергшиеся дифференцировке, уже не участвуют в клеточном цикле и могут долго оставаться в таком состоянии (фаза покоя G_0). Однако определенные агенты, стимулирующие клеточный цикл (митогенные сигналы), могут вернуть такие клетки в фазу G_1 и в клеточный цикл. Например, клетки печени в норме находятся в фазе G_0. После удаления части печени оставшиеся клетки стимулируются митогенами и вступают в клеточный цикл: масса печени увеличивается до нормальной.

В переключении фаз клеточного цикла участвуют белки циклины и циклинзависимые протеинкиназы. Переход каждой фазы цикла в следующую фазу регулируется специфическими для данной фазы циклинами и протеинкиназами. При подготовке к очередной фазе количество соответствующего циклина в клетке нарастает, а после завершения фазы резко падает до нуля. Например, в часы, предшествующие митозу, в клетке нарастает концентрация циклина B. Циклин B соединяется с неактивной формой циклин B зависимой протеинкиназы и активирует ее. В свою очередь, активная протеинкиназа фосфорилирует и тем самым активирует ряд ферментов и других белков, необходимых для митоза (в частности, белки, участвующие в образовании митотического веретена и в расхождении хромосом).

Каждый ориджин и, соответственно, каждый репликон должен сработать один раз за один клеточный цикл. Полная картина механизма, который регулирует периодичность репликации ДНК, совпадающую с периодичностью митотического цикла, пока остается неизвестной. Исследование этого вопроса составляет одну из важных задач современной биохимии, поскольку здесь может открыться путь для управления скоростью размножения клеток при заживлении ран или регенерации тканей.

Если молекулу ДНК можно рассматривать как форму записи информации, то репликация ДНК в материнской клетке и последующее распределение копий

поровну между дочерними клетками — это передача информации от поколения к поколению (рис. 4.7, *б*).

ПУТЬ ИНФОРМАЦИИ ОТ ГЕНОТИПА К ФЕНОТИПУ

Как мы видели, репликация служит для передачи информации новым поколениям. С другой стороны, информация, записанная в ДНК (в генотипе), обеспечивает образование фенотипических признаков организма, трансформируется в фенотип. Это направление потока информации имеет гораздо более сложную природу и включает два других типа матричных биосинтезов — транскрипцию и трансляцию.

Классическая генетика пользуется такими фенотипическими признаками, как окраска цветка, форма крыльев у дрозофилы, длина шерсти у овец и т. п. Такие признаки не позволяют анализировать механизм трансформации генотипа в фенотип в терминах молекулярных процессов. Но вот в 1902 г. английский врач Гаррод опубликовал исследования по алкаптонурии у человека. Для этой болезни характерно выделение с мочой значительных количеств гомогентизиновой кислоты, которая, окисляясь кислородом воздуха, образует черный пигмент. Болезнь врожденная, и ее обычно обнаруживают по появлению черных пятен на пеленках.

Гаррод установил, что алкаптонурия наследуется как рецессивный единичный, не сцепленный с другими признак. Отсюда следовал вывод, что гены контролируют простые биохимические реакции. Значительно позднее (1958 г.) выяснилась причина накопления гомогентизиновой кислоты: это вещество оказалось промежуточным продуктом распада тирозина (рис. 4.8).

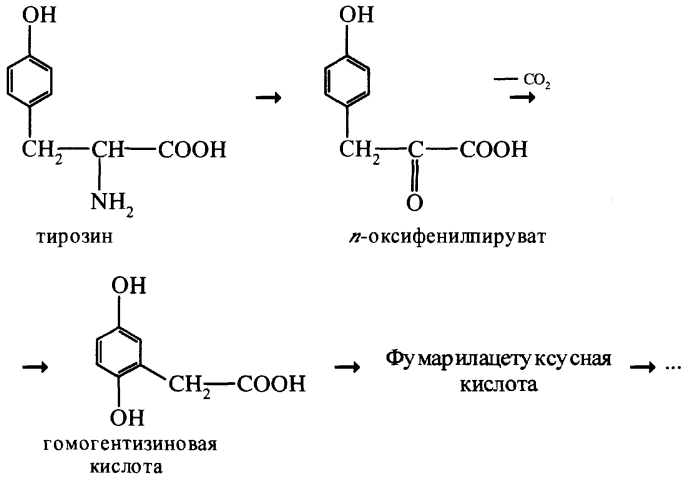


Рис. 4.8. Образование гомогентизиновой кислоты

Гомогентизиновая кислота у здоровых людей превращается в фумарилацетоуксусную кислоту при действии оксидазы гомогентизиновой кислоты. У больных алкаптонурией этот фермент отсутствует или его активность очень низка, поэтому превращения тирозина останавливаются на этой стадии. Теперь можно было

заключить, что гены контролируют синтез ферментов, и связь между геном и фенотипическим признаком представить следующим образом:

Ген → Фермент → Продукт реакции

Некоторые продукты реакции проявляются как непосредственно видимые фенотипические признаки классического типа, например пигмент цветка. Однако первым продуктом гена может быть не обязательно фермент, а любой белок, свойства которого определяют тот или иной фенотипический признак. Например, от зрительного пурпура (родопсина) сетчатки глаза зависит способность воспринимать свет, от синтеза фибриллярных белков кератинов зависит образование шерсти или рогового покрова, и т. д.

В 40–50-е годы XX в. это представление о связи между генотипом и фенотипом было экспериментально подтверждено на многих ферментах и других белках разных организмов; результаты нашли отражение в афористической формуле: один ген — один белок.

Но каким образом гены контролируют синтез белков? Можно представить два механизма: а) ген просто включает и выключает синтез белка; б) ген содержит инструкцию о строении белка.

В решении этого вопроса помогло исследование другой наследственной болезни человека — серповидно-клеточной анемии. Л. Полинг (США) в 1949 г. обнаружил, что гемоглобин таких больных отличается от гемоглобина здоровых людей по электрофоретической подвижности. Как стало ясно позднее, это различие обусловлено заменой 6Glu → Val в β-цепи гемоглобина. Отсюда следовал вывод, что ген определяет первичную структуру белков. При этом информация, записанная с помощью определенного чередования нуклеотидных остатков, переводится в информацию, записанную чередованием аминокислотных остатков. Это можно сравнить с переводом записи, сделанной азбукой Морзе, на буквенную запись.

ДНК в клетках эукариот сосредоточена главным образом в ядре, а синтез белков обнаруживается и в частях клетки, не содержащих ДНК. Роль промежуточного переносчика информации от ДНК к местам синтеза белка выполняют рибонуклеиновые кислоты. Направление потока информации в клетке от генотипа к фенотипу представляют так: ДНК → РНК → белки. Иначе говоря, ДНК служит матрицей для синтеза РНК, а РНК — матрицей для синтеза белков (см. рис. 4.1). Это положение называют основным постулатом молекулярной биологии.

БИОСИНТЕЗ РНК (ТРАНСКРИПЦИЯ)

Синтез РНК можно представить следующей схемой:

$$k\text{АТФ} + l\text{УТФ} + m\text{ГТФ} + n\text{ЦТФ} \xrightarrow{\text{ДНК}} \text{РНК} + (k + l + m + n)\ H_4P_2O_7.$$

Субстратами реакции служат трифосфаты рибонуклеозидов. Реакция идет только в присутствии ДНК, выполняющей роль матрицы. Матрицей служит одна из цепей ДНК, называемая матричной (а также кодирующей, значащей) цепью. Все синтезированные молекулы РНК имеют структуру, комплементарную матрице, т. е. одной из цепей ДНК. Поскольку РНК представляет собой одноцепочечную

молекулу (спирализованные участки составляют лишь часть молекулы), стехиометрические коэффициенты для всех четырех субстратов различны.

Транскрипцию катализируют РНК-полимеразы I, II и III. Первый из этих ферментов участвует в синтезе рибосомных РНК, второй — матричных и третий — транспортных РНК. В процессе транскрипции различают стадии инициации, элонгации и терминации. В результате транскрипции образуются предшественники тРНК, рРНК и мРНК — первичные транскрипты. Затем в ядре и в цитоплазме происходит посттранскрипционная доработка (созревание) этих предшественников, и получаются функционально активные рибонуклеиновые кислоты.

Синтез матричных РНК

Инициация. РНК-полимераза II присоединяется к матрице не в любом ее месте, а в специальных участках, которые называются промоторами (рис. 4.9).

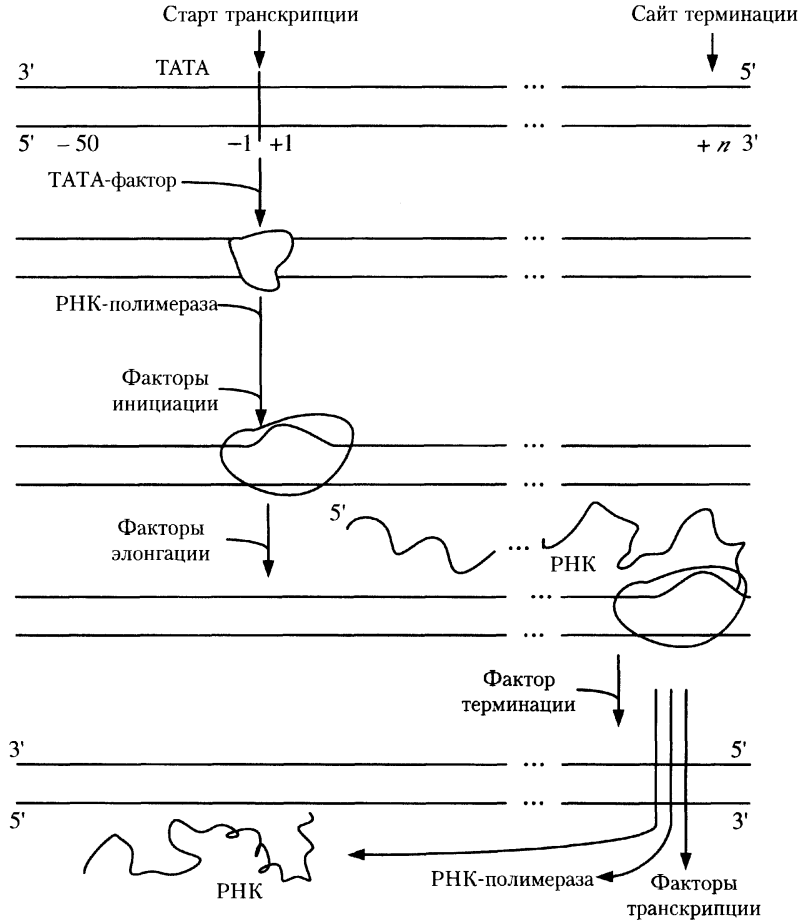


Рис. 4.9. Транскрипция РНК-полимеразой II:

+1 и +n — первый и последний нуклеотиды гена; –1 — первый нуклеотид промоторной области

Промотор содержит последовательность, обогащенную нуклеотидами Т и А (ТАТА-последовательность), узнаваемую белком ТАТА-фактором. РНК-полимераза присоединяется к промотору, если ТАТА-последовательность связана с ТАТА-фактором. Матрицей для синтеза РНК служит одна из цепей ДНК; промотор с ТАТА-фактором обеспечивают узнавание РНК-полимеразой транскрибируемой цепи ДНК и первого нуклеотида транскрибируемого гена. Связывание РНК-полимеразы с промотором и вызванные этим конформационные изменения повышают сродство РНК-полимеразы к факторам инициации. Присоединение этих факторов приводит к локальному расхождению нуклеотидных цепей ДНК; расхождение включает около 10 нуклеотидных пар, т. е. примерно один виток спирали.

Элонгация. Наращивание молекулы РНК происходит путем присоединения очередного рибонуклеотида, комплементарного тому дезоксирибонуклеотиду ДНК, который в данный момент находится в области активного центра РНК-полимеразы. В активном центре фермента находится 3′-конец растущей цепи РНК, и к нему присоединяется очередной нуклеотид. По мере перемещения РНК-полимеразы вдоль ДНК к освободившемуся промотору могут присоединяться новые молекулы РНК-полимеразы, так что ген может транскрибироваться одновременно большим количеством молекул фермента (рис. 4.10).

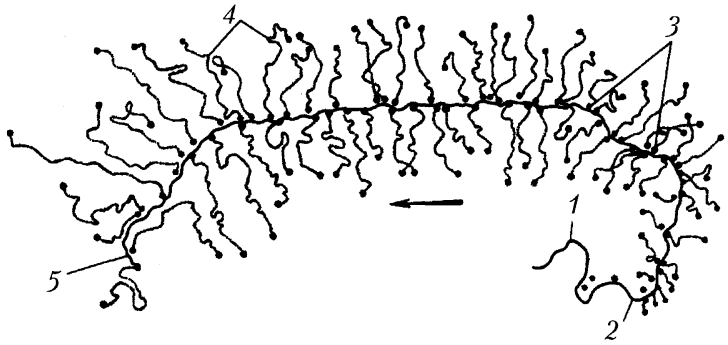


Рис. 4.10. Синтез РНК:

1 — ДНК; *2* — область инициации; *3* — РНК-полимераза; *4* — растущие цепи РНК; *5* — область терминации. Стрелка указывает направление перемещения РНК-полимеразы

Терминация. В участке ДНК, где заканчивается ген, имеется последовательность нуклеотидов (сайт терминации), узнаваемый фактором терминации в том случае, когда цепи ДНК разделены. Следовательно, достигнув сайта терминации, РНК-полимераза стимулирует присоединение фактора терминации к ДНК, и синтезированная РНК (первичный транскрипт), а также РНК-полимераза и факторы транскрипции отделяются от ДНК. Таким образом получаются отдельные молекулы мРНК, каждая из которых содержит информацию одного гена.

Полинуклеотидфосфорилаза

Помимо РНК-полимеразы в клетках есть другой фермент, с помощью которого *in vitro* может синтезироваться РНК, — это полинуклеотидфосфорилаза. В живой

клетке фермент катализирует фосфоролиз (не гидролиз) 3′,5′-фосфодиэфирных связей в молекуле РНК, причем продуктами реакции являются нуклеозиддифосфаты:

$$\text{РНК} + (k + l + m + n)\ H_3PO_4 \rightarrow k\text{АДФ} + l\text{УДФ} + m\text{ГДФ} + n\text{ЦДФ}$$

Реакция обратима: при проведении *in vitro* в условиях избытка нуклеозиддифосфатов идет в направлении синтеза РНК. При этом не требуется никакой матрицы. В результате последовательность присоединения очередных нуклеотидных остатков к растущей цепи РНК определяется случайностью, и среди синтезировавшихся молекул РНК вряд ли можно найти хотя бы две, идентичные по структуре, в то время как при матричном синтезе все молекулы РНК, синтезируемые на одной и той же матрице, комплементарны этой матрице и идентичны друг другу. В этом состоит принципиальное отличие матричных синтезов от безматричных.

Созревание мРНК

Первичные транскрипты, образуемые РНК-полимеразами, еще не являются функционально активными молекулами и нуждаются в посттранскрипционной достройке. Созревание пре-мРНК включает три процесса: образование колпачка на 5′-конце, образование полиА-последовательности на 3′-конце и удаление интронов (сплайсинг). Все эти процессы происходят в ядре.

Модификация начинается на стадии элонгации с образования «колпачка» (кэпа). Когда цепь РНК достигает 30–40 нуклеотидов, к ее 5′-концу присоединяется ГТФ своим 5′-концом. Образуется 5′,5′-фосфодиэфирная связь. Затем гуанин в составе ГТФ метилируется. «Колпачок» представляет собой 7-метилгуанозинтрифосфат в составе мРНК, присоединенный «не тем концом», т. е. не 3′, а 5′-концом к 5′-концу следующего нуклеотида (X) через три остатка фосфорной кислоты (p):

7-метил-G (5′) ppp (5′) X—...

«Колпачок» участвует в инициации трансляции мРНК.

На 3′-конце у большей части молекул пре-мРНК образуются полиадениловые последовательности длиной 100–200 нуклеотидных остатков при участии специального фермента полиА-полимеразы. Возможно, что полиА-последовательности защищают мРНК от гидролиза клеточными РНКазами.

Сплайсинг — сложный процесс, связанный с тем, что в генах эукариот есть участки ДНК, интроны, не несущие структурной информации, т. е. информации о последовательности аминокислот, и вклинивающиеся в разных местах в гены, кодирующие белки. Ген, таким образом, оказывается разбитым на ряд кусков. При транскрипции получается РНК (первичный транскрипт), включающая участки, комплементарные как структурным частям, так и интронам (рис. 4.11). Длина такой РНК может быть в несколько раз больше, чем длина зрелой мРНК. В ходе созревания интроны удаляются, а экзоны соединяются. Это происходит при участии малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП, или сплайсосомы), которые содержат малую ядерную РНК (мяРНК) и олигомерный белок. Сплайсосомы имеют центр связывания, узнающий специфические последовательности нуклеотидов интрона, гидролизуют 3′,5′-фосфодиэфирные связи на границах между интроном и двумя экзонами и соединяют экзоны друг с другом (рис. 4.12).

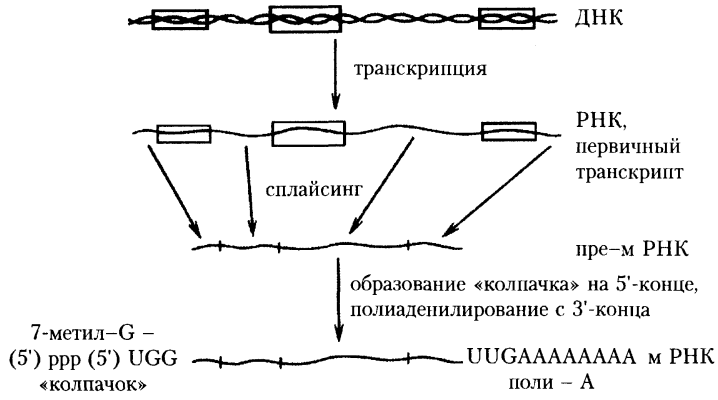


Рис. 4.11. Созревание мРНК (в рамках — интроны ДНК и РНК (первичного транскрипта)

Каталитической активностью обладает не белковая часть сплайсосомы, а мяРНК; такие РНК называют рибозимами. Интроны вырезаются один за другим, и лишь после завершения сплайсинга мРНК поступает в цитозоль.

В некоторых случаях в результате сплайсинга из одинаковых первичных транскриптов образуются разные мРНК: некоторые интроны в некоторых молекулах

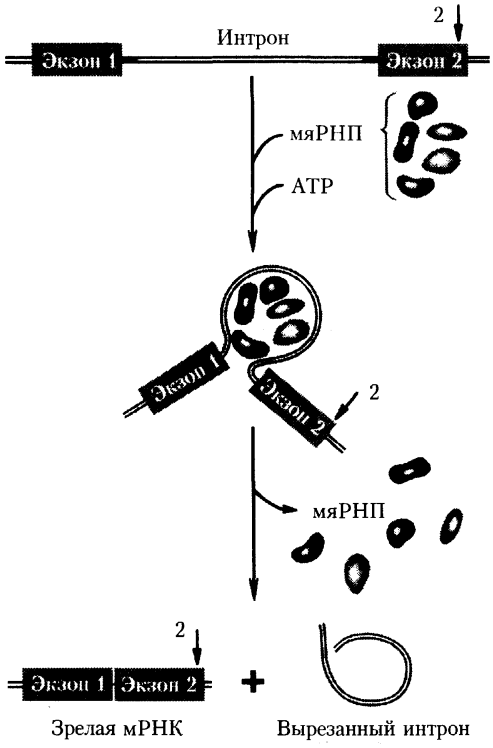


Рис. 4.12. Роль мяРНП в сплайсинге

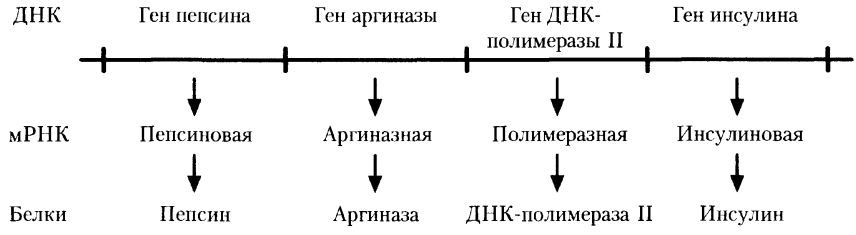
первичного транскрипта не вырезаются, а сохраняются в зрелой мРНК (альтернативный сплайсинг). Таким путем в результате действия одного гена может образоваться несколько разных зрелых мРНК, а затем и белков.

Гены некоторых белков не содержат интронов (например, гены гистонов), многие содержат небольшое количество, но есть и такие, в которых интронов очень много. Например, ген α-цепи коллагена содержит 50 интронов. Биологическое значение прерывистой структуры генов неизвестно.

Синтез и созревание рРНК и тРНК

Синтез предшественников рРНК и тРНК сходен с синтезом пре-мРНК. Первичный транскрипт рибосомных РНК не содержит интронов, и при действии специфических РНКаз расщепляется с образованием 28S-, 18S- и 5,8S-рРНК; 5S-рРНК синтезируется при участии РНК-полимеразы III. Первичные транскрипты тРНК превращаются в зрелые формы также путем частичного гидролиза.

Все типы РНК участвуют в биосинтезе белков, но их функции в этом процессе различны. Роль матрицы, определяющей первичную структуру белков, выполняют матричные РНК (мРНК). Основной постулат молекулярной биологии теперь можно представить так, как это изображено ниже:



БИОСИНТЕЗ БЕЛКОВ (ТРАНСЛЯЦИЯ)

Важное значение для изучения механизмов трансляции имеет использование бесклеточных систем биосинтеза белков. Если инкубировать гомогенаты тканей со смесью аминокислот, из которых хотя бы одна меченая, то по включению метки в белки можно регистрировать биосинтез белков. В результате исследования таким методом разных фракций гомогената было установлено, что для биосинтеза белков необходимы следующие компоненты:

аминокислоты	факторы инициации, элонгации, терминации
транспортные РНК	аминоацил-тРНК-синтетазы
матричная РНК	АТФ, ГТФ
рибосомы	ионы Mg2+

Первичная структура синтезируемого белка определяется первичной структурой мРНК, добавленной в систему. Если бесклеточная система составлена с глобиновой мРНК (ее можно выделить из ретикулоцитов), синтезируется глобин (α- и β-цепи глобина); если с альбуминовой мРНК, выделяемой из гепатоцитов, синтезируется альбумин, и т. д.

Биологический код

Биосинтез белков (трансляция) отличается от других типов матричных биосинтезов — репликации и транскрипции — двумя принципиальными особенностями:

1) нет соответствия между числом знаков (мономеров) в матрице и в продукте реакции (в мРНК 4 разных нуклеотида, в белке 20 разных аминокислот);
2) структура рибонуклеотидов (мономеров матрицы) и аминокислот (мономеров продукта) такова, что избирательные взаимодействия между ними, подобные образованию пар A•••T или G•••C, невозможны; иначе говоря, между мРНК (матрицей) и пептидной цепью белка (продуктом) нет комплементарности.

Из этого следует, что механизм использования матрицы при биосинтезе белков должен быть иным, чем в случае синтеза ДНК или РНК. Если репликацию и транскрипцию можно сравнить просто с переписыванием текста, то трансляция — это дешифровка, декодирование информации об аминокислотной последовательности, записанной (закодированной) с помощью нуклеотидной последовательности. Способ шифровки в нуклеиновых кислотах информации о первичной структуре белков получил название биологического кода (его называют также генетическим, нуклеотидным, аминокислотным кодом).

Кодовое число

Один из первых вопросов, который возникает при выяснении структуры биологического кода, это вопрос о кодовом числе, т. е. о числе нуклеотидных остатков, кодирующих включение в белок одной аминокислоты. Очевидно, что кодовое число не может быть равным 1, так как в этом случае с помощью четырех нуклеотидов можно было бы закодировать только четыре аминокислоты. При кодовом числе 2 количество разных нуклеотидных пар будет равно числу перестановок из четырех элементов по 2, т. е. равно $4^2 = 16$, что тоже недостаточно для кодирования всех аминокислот. Число разных троек нуклеотидов равно $4^3 = 64$. Это в три с лишним раза превышает минимальное число, необходимое для кодирования 20 аминокислот. Экспериментально доказано, что в биологическом коде кодовое число равно 3: тройку нуклеотидных остатков (триплет), кодирующих включение одной аминокислоты, называют кодоном.

Смысл кодонов

Для выяснения смысла кодонов, т. е. вопроса, какой аминокислоте соответствует каждый из кодонов, были использованы бесклеточные системы синтеза белков. В такой системе матрицей могут служить синтетические рибонуклеиновые кислоты с известной нуклеотидной последовательностью, например поли(U). В этой РНК имеются триплеты только одного типа — UUU:

UUU—UUU—UUU—...

В бесклеточной системе с поли(U) в качестве матрицы синтезируется полифенилаланин —Фен—Фен—Фен—... Из этого следует, что триплет UUU служит

кодоном фенилаланина. Если в качестве матрицы используется поли(С), то синтезируется полипролин; следовательно, триплет ССС кодирует аминокислоту пролин. Для выяснения смысла других кодонов применялись смешанные синтетические полимеры рибонуклеотидов с известными триплетами; результаты представлены в табл. 4.1. Такие опыты одновременно послужили доказательством того, что кодовое число равно трем.

Таблица 4.1. Биологический код

Первый нуклеотид	Второй нуклеотид				Третий нуклеотид
	U	C	A	G	
U	UUU, UUC — Phe UUA, UUG — Leu	UCU, UCC, UCA, UCG — Ser	UAU, UAC — Tyr UAA, UAG — Терм.	UGU, UGC — Cys UGA — Терм UGG — Try	U C A G
C	CUU, CUC, CUA, CUG — Leu	CCU, CCC, CCA, CCG — Pro	CAU, CAC — His CAA, CAG — Gln	CGU, CGC, CGA, CGG — Arg	U C A G
A	AUU, AUC, AUA — Ile AUG — Met	ACU, ACC, ACA, ACG — Thr	AAU, AAC — Asn AAA, AAG — Lys	AGU, AGC — Ser AGA, AGG — Arg	U C A G
G	GUU, GUC, GUA, GUG — Val	GCU, GCC, GCA, GCG — Ala	GAU, GAC — Asp GAA, GAG — Glu	GGU, GGC, GGA, GGG — Gly	U C A G

Из 64 триплетов 61 используется для кодирования аминокислот, а 3 — UAA, UAG и UGA — обозначают конец матрицы (терминирующие триплеты): на этих триплетах обрывается дальнейшее наращивание пептидной цепи.

Отметим, что каждый триплет кодирует только какую-нибудь одну аминокислоту. Это свойство кода называют специфичностью или однозначностью. С другой стороны, одна аминокислота может кодироваться двумя или большим числом (до шести) разных триплетов, т. е. код вырожденный. Путь информации от ДНК к белку представлен на рис. 4.13.

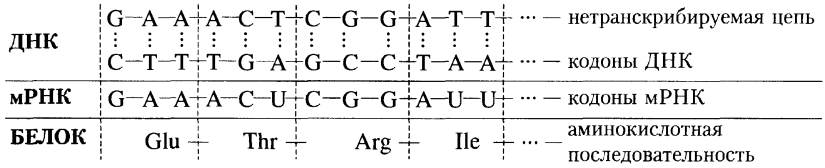


Рис. 4.13. Путь информации от ДНК к белку

К настоящему времени биологический код изучен у большого количества разных организмов — от вирусов и бактерий до высших животных. Во всех случаях он оказался одинаковым; известны лишь очень редкие исключения, когда у некоторых

видов организмов смысл одного-двух кодонов не совпадает с тем, который указан в табл. 4.1. Эта универсальность кода лишний раз свидетельствует о единстве происхождения всех форм жизни на Земле.

Адапторная функция тРНК

Между аминокислотами и нуклеотидами (или триплетами нуклеотидов) невозможны специфические, комплементарные взаимодействия по типу образования нуклеотидных пар A•••T (или A•••U) и G•••C. Поэтому было сделано предположение о существовании молекул-адапторов, каждая из которых может взаимодействовать с определенным кодоном — с одной стороны, и с определенной аминокислотой — с другой стороны. В 1957 г. такие молекулы обнаружены, ими оказались транспортные РНК (тРНК). Очевидно, что для адаптирования 20 разных аминокислот нужно не менее 20 разных тРНК: для каждой аминокислоты своя. Эти тРНК обозначают следующим образом: $тРНК^{Ala}$, $тРНК^{His}$, $тРНК^{Val}$ и т. д. (аланиновая тРНК, гистидиновая тРНК и т. д.). Однако, поскольку код вырожденный, число разных тРНК больше 20.

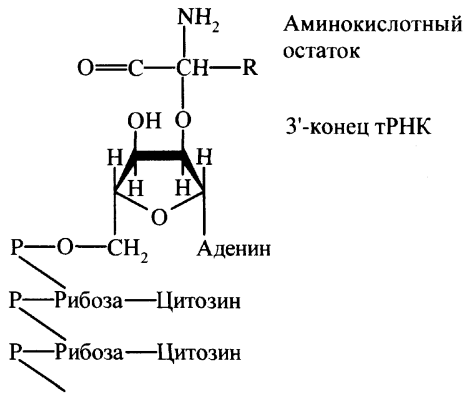


Рис. 4.14. Аминоацил-тРНК

Аминоацил-тРНК-синтетазы. Взаимодействие тРНК с аминокислотами — ферментативный процесс, приводящий к образованию ковалентной связи между аминокислотой и тРНК. Такие соединения называют аминоацил-тРНК (аа-тРНК). Аминокислота присоединяется к 3′-концу нуклеотидной цепи тРНК, где имеется последовательность A–C–C–, общая для всех тРНК; при этом образуется сложноэфирная связь за счет карбоксильной группы аминокислоты и 3′-гидроксильной группы концевого остатка адениловой кислоты в тРНК (рис. 4.14).

Эта связь имеет высокоэнергетический характер, так что образование аа-тРНК можно рассматривать как активацию аминокислоты. Реакции аминокислот с тРНК нуждаются в энергии (используется АТФ) и катализируются аминоацил-тРНК-синтетазами:

$$\text{Аминокислота} + \text{тРНК} + \text{АТФ} \rightarrow \text{аа-тРНК} + \text{АМФ} + H_4P_2O_7$$

Для каждой аминокислоты имеется по крайней мере одна аминоацил-тРНК-синтетаза, хотя для некоторых аминокислот существуют изоферменты, так что общее количество аминоацил-тРНК-синтетаз больше 20. Каждый из этих ферментов катализирует реакцию только одной из 20 аминокислот с тРНК, соответствующей этой аминокислоте. Например, аланил-тРНК-синтетаза катализирует реакцию аланина с аланиновой тРНК:

$$\text{Аланин} + тРНК^{Ala} + \text{АТФ} \rightarrow \text{Ala-}тРНК^{Ala} + \text{АМФ} + H_4P_2O_7$$

Таким образом, аминоацил-тРНК-синтетазы должны иметь в активном центре участок, комплементарный одной из аминокислот, и участок, комплементарный какой-то части молекулы одной из тРНК. Именно вследствие такой субстратной специфичности каждая аминоацил-тРНК-синтетаза «узнает» и «выбирает» из смеси двадцати аминокислот и нескольких десятков тРНК определенную пару — аминокислоту и соответствующую ей тРНК, и соединяет эту пару.

Взаимодействие аа-тРНК с мРНК. Взаимодействие аа-тРНК с кодоном мРНК обеспечивается тем, что в одной из петель молекулы тРНК имеется триплет нуклеотидов, комплементарный какому-нибудь кодону. Такой триплет называют антикодоном. Образование аа-тРНК можно сравнить с изготовлением двойного шрифта, например, для перевода знаков азбуки Морзе в знаки буквенного алфавита (рис. 4.15). Располагая двойным шрифтом, легко прочитать текст, записанный азбукой Морзе: достаточно расставить шрифт на телеграфной ленте соответственно знакам азбуки Морзе.

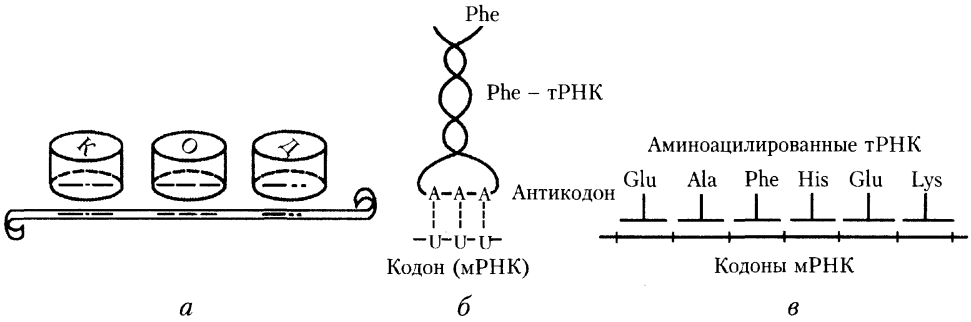


Рис. 4.15. Роль мРНК и тРНК в процессе трансляции:

а — чтение телеграфной ленты с помощью двойного шрифта; *б* — взаимодействие кодон-антикодон; *в* — перевод последовательности кодонов мРНК в аминокислотную последовательность

Роль матричной РНК

Роль мРНК в трансляции аналогична роли телеграфной ленты в этом примере: аа-тРНК присоединяются антикодонами к соответствующим кодонам мРНК, в результате чего аминокислотные остатки оказываются расположенными в той последовательности, в которой расположены кодоны в мРНК (см. рис. 4.15, в). Теперь остается лишь соединить аминокислотные остатки пептидной связью, чтобы получилась пептидная цепь (белок) с определенной первичной структурой. Таким образом, последовательность кодонов мРНК коллинеарна последовательности аминокислотных остатков в соответствующем белке. Эта схема отражает лишь принципиальный механизм перевода нуклеотидной последовательности (точнее, последовательности кодонов) в аминокислотную последовательность.

Функционирование рибосом

Реальный процесс синтеза белков совершается при участии рибосом и ряда других факторов. Рибосомы содержат ферменты и другие белки, обеспечивающие

взаимодействие между мРНК и аа-тРНК, образование пептидной связи и отделение готового белка. Весь процесс образования пептидной цепи можно разделить на три стадии: инициация, элонгация и терминация.

Инициация. Синтез белка начинается с образования инициирующего комплекса (рис. 4.16). Поступившая из ядра в цитоплазму мРНК соединяется с малой (40S) субъединицей рибосомы и инициирующей аа-тРНК, роль которой при синтезе любого белка выполняет Met-тРНК^{Мет}. Met-тРНК^{Мет} взаимодействует своим антикодоном с кодоном AUG на мРНК. Этот кодон называют инициирующим, с него начинается синтез любого белка (однако если этот кодон находится не в начале мРНК, то он кодирует включение в белок метионина). Затем к этому комплексу присоединяется большая (60S) субъединица рибосом (формируется полная рибосома). Met-тРНК^{Мет} взаимодействует с пептидильным центром большой субъединицы рибосомы (центр П на рис. 4.16). В образовании инициирующего комплекса участвуют внерибосомные белки — факторы инициации (около десятка разных белков); после образования комплекса они вновь переходят в цитозоль.

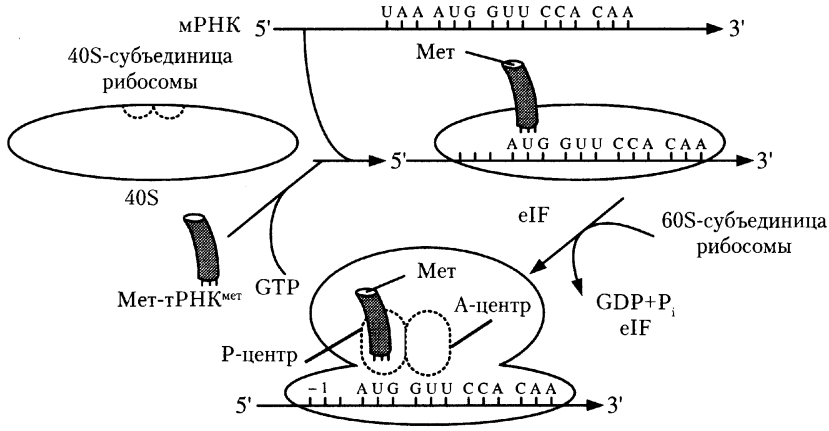


Рис. 4.16. Образование инициирующего комплекса трансляции

Элонгация. Этот сложный процесс удобнее рассматривать, выделив в нем отдельные фазы: связывание очередной аминоацил-тРНК, образование пептидной связи и транслокация (рис. 4.17):

а) Связывание аа-тРНК1. К инициирующему комплексу присоединяется аа-тРНК, соответствующая первому кодону мРНК (следующему за инициирующим кодоном). В нашем примере это кодон валина. Вал-тРНК^{Вал} взаимодействует с мРНК (своим антикодоном) и с аминоацильным центром рибосомы (центр А). Связывание аа-тРНК сопряжено с расходованием энергии — используется одна молекула ГТФ. В этой реакции участвует внерибосомный белок, фактор элонгации EFI.

б) Образование пептидной связи. Остаток метионина с Met-тРНК^{Мет} переносится на аминогруппу остатка валина в Вал-тРНК^{Вал}. При этом получается дипептидил-тРНК^{Вал} (Мет-Вал-тРНК^{Вал}), связанный с кодоном валина (GUU) и с центром А рибосомы.

в) Транслокация. Рибосома перемещается на один кодон в сторону 3′-конца мРНК. При этом тРНК^{Мет} освобождается из комплекса, а дипептидил-тРНК оказывается в области пептидильного центра рибосомы, но по-прежнему связана с кодоном Вал. Центр А после транслокации оказывается свободным, расположенным в области третьего кодона, и может принимать новую аминоацил-тРНК, соответствующую этому кодону. При транслокации расходуется энергия, источником которой служит ГТФ (две молекулы). Здесь также участвует внерибосомный белок — фактор элонгации EF2.

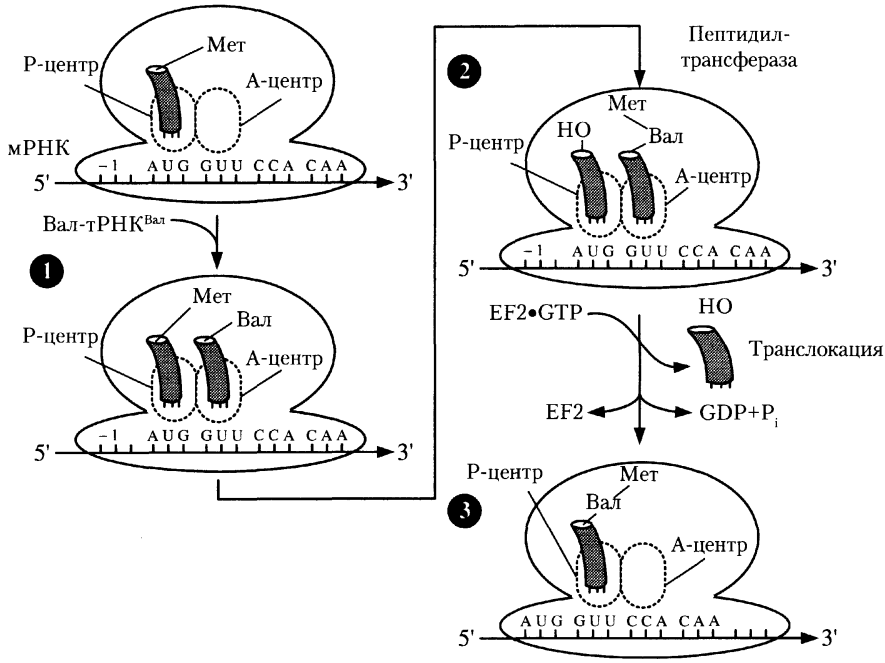


Рис. 4.17. Элонгация полипептидной цепи

Дальнейшее удлинение пептидной цепи происходит путем повторения этих фаз: к освободившемуся при транслокации центру А присоединяется Про-тРНК^{Про} (в нашем примере), соответствующая следующему кодону мРНК (ССА в нашем примере, кодон пролина). Затем дипептидильный остаток с тРНК^{Вал} переносится на аминогруппу пролина, т. е. образуется вторая пептидная связь (получается трипептидил-тРНК), и т. д.

Скорость элонгации значительна: синтез пептида из 100 аминокислот занимает примерно 2 мин.

Остаток метионина, участвующий в инициации и занимающий в растущей пептидной цепи N-концевое положение, отщепляется при участии специфической пептидгидролазы еще во время элонгации (однако в некоторых белках сохраняется).

Терминация. Удлинение пептидной цепи продолжается до тех пор, пока на пути рибосомы не встретится один из терминирующих триплетов РНК — UAA,

UAG или UGA. В области этих триплетов при участии внерибосомных белков — факторов терминации — происходит гидролитическое расщепление связи между пептидом и последней тРНК, и освобождается готовый белок.

Полирибосомы

При образовании инициирующего комплекса рибосома присоединяется к 5′-концу мРНК и в ходе трансляции перемещается в направлении 3′-конца. По мере освобождения 5′-конца к мРНК присоединяются новые рибосомы, на которых тоже начинается рост пептидной цепи. Каждая рибосома занимает участок РНК длиной примерно в 30 кодонов. На молекуле мРНК может поместиться несколько рибосом; такие структуры называют полирибосомами (рис. 4.18). Чем длиннее пептидная цепь кодируемого белка, тем длиннее молекула РНК и тем больше рибосом в полирибосоме.

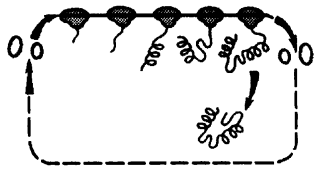


Рис. 4.18. Образование полирибосом

Образование пространственной структуры белков

Вторичная и третичная структуры белков формируются в процессе трансляции по мере удлинения пептидной цепи. Пространственная структура белка, конечно, определяется его первичной структурой, однако в условиях живой клетки, и особенно по причине высокой концентрации белков, возникают помехи для правильной укладки пептидной цепи. В процессе трансляции отдельные сегменты уже синтезированной части пептидной цепи могут взаимодействовать друг с другом, не испытывая влияния еще не готовой части пептидной цепи, поэтому могут образоваться неправильные пространственные структуры. Кроме того, синтезирующаяся пептидная цепь может взаимодействовать с другими белками цитозоля. Выбор правильной пространственной структуры происходит при участии белков шаперонов. Шапероны-70 имеют на поверхности глобулы гидрофобные участки, которые взаимодействуют с гидрофобными участками растущей пептидной цепи, защищая ее от неправильных взаимодействий. Кроме того, неправильно свернутая пептидная цепь может быть исправлена при участии шаперонинового комплекса, построенного из шаперонов-60 (см. гл. 1).

Таким образом, конформация пептидной цепи определяется ее первичной структурой. С другой стороны, в результате формирования вторичной и третичной структур образуются активные центры белков. Следовательно, можно сказать, что в генах закодирована информация о строении активных центров белков.

Транскрипция и трансляция происходят во все фазы клеточного цикла; лишь во время митоза резко замедляется синтез многих белков, но ускоряется синтез тех белков, которые участвуют в процессе митоза.

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ ДОСТРОЙКА БЕКОВ

В результате трансляции не всегда сразу образуется функционально активный белок. Во многих случаях необходимы дополнительные посттрансляционные изменения.

Например, молекула инсулина построена из двух пептидных цепей, соединенных между собой двумя дисульфидными мостиками (см. рис. 1.15). В геноме человека содержится ген препроинсулина; в результате действия этого гена образуется препроинсулин — предшественник инсулина. Синтез препроинсулина происходит на полирибосомах, связанных с эндоплазматическим ретикулумом. Препроинсулин проникает в люмен ретикулума, где от него отщепляется лидирующая последовательность — N-концевой фрагмент, содержащий 24 аминокислотных остатка. Образовавшийся проинсулин (86 остатков) перемещается в люмене к аппарату Гольджи, где упаковывается в секреторные гранулы. В пластинчатом комплексе и секреторных гранулах происходит превращение проинсулина в инсулин (рис. 4.19). В этом участвуют две эндопептидазы: они расщепляют связи Arg32–Glu33 и Arg65–Gly66. Затем С-концевые остатки Arg и Lys отщепляются карбоксипептидазой; этот фермент есть во многих других органах, где участвует в процессинге ряда гормонов и нейромедиаторов.

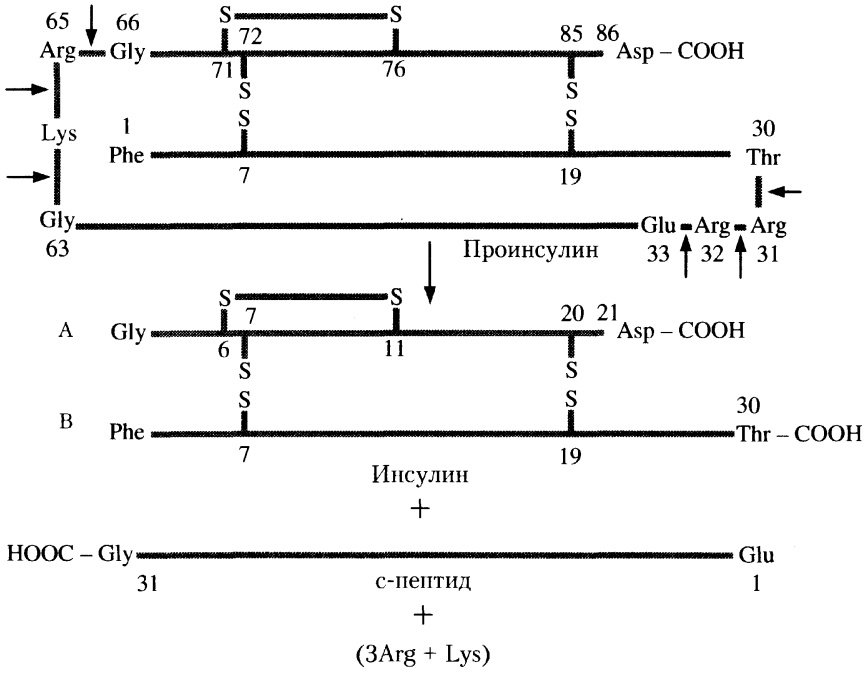


Рис. 4.19. Образование инсулина из проинсулина. Короткие стрелки указывают на гидролизуемые пептидные связи

Сходным образом, т. е. путем частичного протеолиза, активируются многие белки.

Присоединение простетической группы с образованием сложных белков и объединение протомеров олигомерных белков также относятся к посттрансляционным изменениям. В некоторых белках после завершения синтеза пептидной цепи происходит модификация аминокислотных остатков, например превращение

пролина и лизина в гидроксипролин и гидроксилизин в коллагенах, метилирование аргинина и лизина в гистонах, йодирование тирозина в тироглобулине.

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

Кругооборот белков

Белки, как и другие компоненты клетки, находятся в динамическом состоянии, т. е. непрерывно обновляются. Это можно обнаружить в простом эксперименте. Если животному давать корм, содержащий меченые аминокислоты (^{14}C-аминокислоты), то они включаются во вновь синтезируемые белки, и с течением времени все белки становятся мечеными. Если теперь животное перевести на обычный корм, то количество меченых белков в тканях начинает убывать. Таким способом можно определить время полужизни белка: оно равно времени, в течение которого количество метки в белке снизилось наполовину. Среднее время полужизни белков — это время, за которое белки всего организма обновляются наполовину. Можно измерить время полужизни и отдельных белков. Например, время полужизни растворимых белков печени колеблется в пределах от 12 мин до 25 дней. В табл. 4.2 приведена скорость обновления некоторых быстрообменивающихся белков печени.

Таблица 4.2. Скорость обновления некоторых быстрообменивающихся белков печени крыс

Белок	Время полужизни, ч	Белок	Время полужизни, ч
Орнитиндекарбоксилаза	0,2	Серин-треонин-дегидратаза	4,0
РНК-полимераза I	1,3	Фосфоенолпируват-карбоксикиназа	5,0
Тирозинамино-трансфераза	1,5	Глюкокиназа	12
Тимидинкиназа	2,6	Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа	15

Печень – орган с интенсивным обменом веществ. В костях и сухожилиях полуобновление белков занимает месяцы, а то и годы. Особенно медленно обновляются фибриллярные белки — коллаген, эластин. К быстрообменивающимся белкам относятся гемоглобин, белки мышц, пищеварительные ферменты. У человека белки всего тела обновляются наполовину за 12 недель. Если скорость синтеза и скорость распада белка одинаковы, то его концентрация сохраняется постоянной (стационарное состояние).

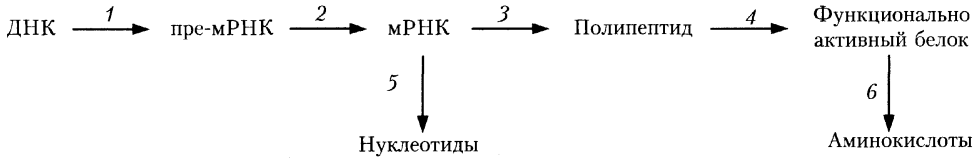


Рис. 4.20. Основные процессы, от скорости которых зависит концентрация белка в живой клетке:

1 — транскрипция; *2* — созревание и транспорт мРНК из ядра в цитоплазму; *3* — трансляция; *4* — посттрансляционные модификации; *5* —распад мРНК; *6* — распад белка

Концентрация многих белков в клетке непостоянна и изменяется в зависимости от условий, например в зависимости от количества и состава пищи, в процессе онтогенеза, при введении некоторых лекарственных веществ. Это происходит в результате регуляции скоростей синтеза и распада белков. На рис. 4.20 указаны процессы, от которых зависит концентрация белков в клетке и которые могут быть точками приложения регуляторных механизмов.

Регуляция действия генов

Регуляция на уровне транскрипции (образование первичного транскрипта) — наиболее распространенный механизм регуляции синтеза белков. Этот процесс иначе называют регуляцией действия генов или регуляцией экспрессии белков. Различают две формы регуляции: индукция синтеза (положительная регуляция) и репрессия синтеза (отрицательная регуляция). Понятия индукции и репрессии предполагают изменение скорости синтеза по отношению к некоторому исходному, базальному уровню (рис. 4.21). Синтез в базальном состоянии называют конститутивным синтезом. Если скорость конститутивного синтеза некоторого белка высока, то такой белок обычно регулируется по механизму репрессии синтеза, и наоборот — при низкой базальной скорости обычно бывает индукция синтеза. При промежуточной базальной скорости синтез белка может регулироваться и путем индукции, и путем репрессии.

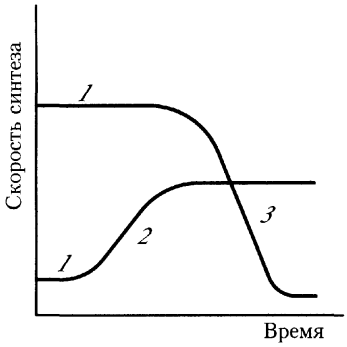


Рис. 4.21. Регуляция синтеза белков. Конститутивный синтез (базальный уровень) (*1*), индукция (*2*) и репрессия (*3*) синтеза белков

Понятия «положительная регуляция» и «отрицательная регуляция» относятся также и к регуляции активности белка — ингибированию или активации уже имеющегося белка.

Регуляция транскрипции у бактерий

Механизмы регуляции транскрипции у бактерий изучены достаточно хорошо. Эти примеры важны и для изучения биохимии животных, поскольку дают представление об общих молекулярных основах регуляции действия генов.

Рассмотрим пример индукции синтеза белков. Кишечная палочка в качестве пищевого вещества может использовать дисахарид лактозу. Превращения лактозы в клетках E. coli начинаются с гидролиза при участии β-галактозидазы (лактазы):

$$\text{Лактоза} + H_2O \rightarrow \text{Галактоза} + \text{Глюкоза}$$

При выращивании E. coli на среде без лактозы β-галактозидаза в клетках обнаруживается в очень малых количествах. Если же в среду добавить лактозу, количество фермента увеличивается в сотни раз за несколько минут, т. е. происходит индукция синтеза фермента.

Изучение молекулярных механизмов этого явления привело к созданию теории оперона. Опероном называют отрезок ДНК, содержащий структурные гены определенных белков и регуляторные участки. На рис. 4.22 приведена схема лактозного оперона.

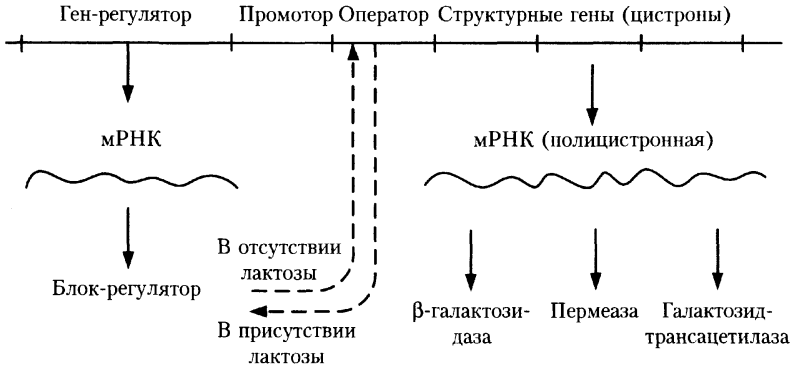


Рис. 4.22. Лактозный оперон E. coli

С участком оперона, называемым промотор, связывается РНК-полимераза. При ее движении по оперону происходит транскрипция структурных генов β-галактозидазы, пермеазы, необходимой для транспорта лактозы в клетку, и галактозидтрансацетилазы. При этом получается одна молекула мРНК, содержащая матрицы для всех трех белков. Последующая трансляция этой мРНК ведет к образованию указанных белков.

В результате транскрипции гена-регулятора образуется мРНК, служащая матрицей для синтеза белка-регулятора. Этот белок может присоединяться к оператору и тем самым блокировать транскрипцию структурных генов. Белок-регулятор может также соединяться с лактозой, при этом утрачивается его сродство к оператору.

Если в среде есть лактоза, то белок-регулятор связан с ней, оператор свободен и возможна транскрипция — синтезируются белки, необходимые для усвоения лактозы. Если лактозы в среде нет, то белок-регулятор соединяется с оператором, транскрипции нет и белки, ненужные в этих условиях, не синтезируются. Биологическая целесообразность такой регуляции очевидна: достигается экономия веществ и энергии.

Обязательным условием этого механизма регуляции является нестабильность мРНК: после исчерпания лактозы в среде мРНК должна быть быстро разрушена, чтобы прекратился синтез ставших ненужными белков. Это происходит путем гидролиза мРНК под действием РНКаз. Время полужизни мРНК в клетках бактерий измеряется немногими минутами.

Примером регуляции путем репрессии синтеза может служить гистидиновый оперон бактерий *Salmonella typhimurium*. Этот оперон содержит 10 структурных генов, кодирующих 10 ферментов, необходимых для синтеза гистидина. Ферменты образуются только в том случае, когда в среде нет готового гистидина и клетки вынуждены сами синтезировать его из других веществ; добавление гистидина в среду прекращает синтез ферментов. Несмотря на противоположный результат индукции и репрессии синтеза белков, их молекулярные механизмы очень сходны. В действии гистидинового оперона легко разобраться, если на рис. 4.22 вместо «в присутствии лактозы» поставить «в отсутствие гистидина», вместо «в отсутствие лактозы» — «в присутствии гистидина» и вместо 3 структурных генов лактозного оперона — 10 структурных генов, кодирующих ферменты для синтеза гистидина.

Регуляция действия генов у эукариот

В клетках эукариот от ДНК исходят сигналы, которые в конечном счете передаются РНК-полимеразе: стимулируют или подавляют инициацию синтеза РНК. Источником сигналов служат определенные локусы ДНК — регуляторные элементы. Эти участки имеют небольшие размеры, порядка 10 н. п. Регуляторные элементы, стимулирующие транскрипцию, называют энхансерами (англ. enhancer — усилитель), а подавляющие транскрипцию — сайленсерами (англ. *silencer* — глушитель, успокоитель).

Регуляторные элементы могут избирательно соединяться с белками-регуляторами.

Белки, соединяющиеся с энхансерами, называют индукторами, а соединяющиеся с сайленсерами — репрессорами. Энхансеры, сайленсеры и белки-регуляторы вместе называют цис-элементами:

- Цис-элементы:
  - Регуляторные элементы (локусы ДНК):
    - Энхансеры;
    - Сайленсеры.
  - Белки-регуляторы:
    - Индукторы (белки, узнающие энхансеры);
    - Репрессоры (белки, узнающие сайленсеры).
- Трансэлементы:
  - Гормоны, метаболиты, ионы металлов, повышенная температура.

Цис-элементы действуют на гены только той молекулы ДНК, в которой они сами находятся. Энхансеры и сайленсеры могут располагаться вблизи от промотора и от стартовой точки транскрипции регулируемого гена, но могут быть и удалены от него, даже на тысячи нуклеотидных пар, как в сторону 5′-конца, так и в сторону 3′-конца. Однако они могут быть сближены в результате изгибания молекулы ДНК.

Белки-регуляторы (индукторы и репрессоры) содержат по крайней мере три домена:

1) домен, узнающий определенную нуклеотидную последовательность ДНК; эти домены часто имеют супервторичную структуру типов α-спираль-поворот-α-спираль, лейциновая застежка-«молния», цинковый палец;
2) домен, узнающий трансэлементы;
3) домен, взаимодействующий с факторами транскрипции в области ТАТА-последовательности; в результате этого белки-регуляторы влияют на транскрипцию, а именно увеличивают (индукторы) или уменьшают (репрессоры) частоту инициации транскрипции.

Каждый ген регулируется независимо от других. Следовательно, для каждого гена существуют специфические регуляторные элементы (локусы ДНК) и специфические регуляторные белки, узнающие эти элементы. Уже известно много регуляторных белков и регуляторных элементов разных генов, и постоянно обнаруживаются все новые и новые.

Присоединение регуляторных белков к энхансерам или сайленсерам зависит от других веществ — трансэлементов, сигнальных молекул, приносимых в клетку с кровью или образующихся в самой клетке. К числу таких молекул относятся гормоны, некоторые метаболиты, ионы металлов. Есть регуляторные белки, реагирующие на изменение температуры. Все эти сигналы стимулируют присоединение индукторов к соответствующим энхансерам или репрессоров к соответствующим сайленсерам. Трансэлементами их называют потому, что они могут действовать на любую молекулу ДНК (любую хромосому), если только в ней есть подходящий цис-элемент.

Чтобы разобраться в этой сложной системе и пока неустоявшейся терминологии, рассмотрим конкретный пример — регуляцию синтеза металлотионеина. Металлотионеин — небольшой белок, содержащий много остатков цистеина, примерно $^1/_3$ от всех аминокислот, и поэтому способный связывать ионы тяжелых металлов — Zn, Cu, Cd, Hg, Ag. Одна молекула металлотионеина связывает несколько ионов. Эти ионы токсичны для организма, и при избыточной концентрации выводятся в комплексе с металлотионеином. Металлотионеин постоянно синтезируется в печени и секретируется в кровь, что важно для регуляции концентраций ионов Zn и Cu, поскольку они являются нормальными и обязательными компонентами организма. Но при повышенном поступлении в организм ионов тяжелых металлов синтез металлотионеина стимулируется (положительная регуляция).

Промоторная область гена металлотионеина представлена на рис. 4.23. Неподалеку от старта транскрипции и промотора ТАТА имеются энхансеры (девятинуклеотидные последовательности), узнаваемые специфическими регуляторными белками (индукторами), и GC-мотив — тоже короткая последовательность, узнаваемая регуляторными белками. Белки-индукторы взаимодействуют с энхансерами при повышении концентрации ионов металлов (на рисунке два таких энхансера) или кортизола. В результате конформационных изменений индукторы приобретают сродство к белкам, инициирующим транскрипцию, расположенным в ТАТА-области, и активируют инициацию транскрипции. Для контакта индукторов с белками области ТАТА необходимо изгибание молекулы ДНК (рис. 4.23, б).

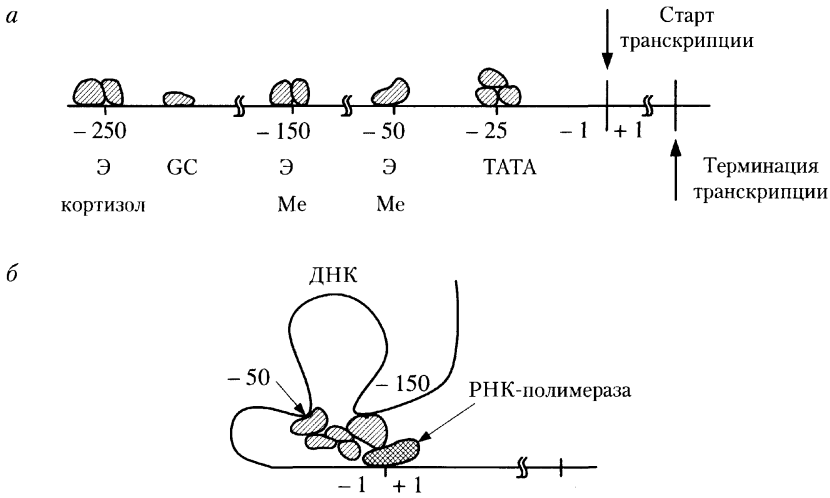


Рис. 4.23. Промоторная область гена металлотионеина:

а) Э— энхансеры с присоединенными к ним регуляторными белками; числа со знаком «минус» указывают примерное расстояние (в количестве пар нуклеотидов) от стартовой позиции транскрипции; +1 — первый нуклеотид гена металлотионеина; кортизол и Me (ионы металлов) — регуляторные трансэлементы; б) изгибание молекулы ДНК при индукции транскрипции

Энхансеры промоторной области металлотионеина содержат девятинуклеотидные последовательности TGCGCTCGG (или варианты этой последовательности). Если такую последовательность включить в молекулу ДНК, содержащую ген β-глобина, то синтез β-глобина становится зависимым от ионов металлов.

Матричные РНК клеток животных — более долгоживущие молекулы, чем бактериальные: время их жизни измеряется часами, днями, в некоторых случаях даже неделями. Поэтому большее значение приобретают механизмы регуляции на уровне трансляции, при постоянной концентрации мРНК. Регуляция синтеза глобина на уровне трансляции описана в гл. 20.

Регуляция действия генов и клеточная дифференцировка

В геноме человека имеется около 50 000 белковых генов. На протяжении жизненного цикла человека, от гамет до завершения жизненного пути, все они используются, экспрессируются, но не все одновременно, а в определенном порядке и поразному в разных типах клеток. Многоклеточные организмы построены из дифференцированных клеток, специализированных для выполнения определенных функций. В организме человека различают сотни типов дифференцированных клеток, идентичных генотипически, но различающихся фенотипически. Фенотип клетки определяется набором белков, синтезирующихся в ней: белки можно рассматривать как первичные фенотипические признаки. В дифференцированной клетке экспрессируется 5 000–15 000 генов (белков), а все остальные гены «молчат». Основная часть белков дифференцированной клетки — это белки «домашнего хозяйства», т. е. те, которые обеспечивают само существование живой клет-

ки. К ним относятся белки, участвующие в матричных синтезах, в синтезе АТФ, мембран и др. Белки «домашнего хозяйства» составляют около 80 % всех белков дифференцированной клетки. Меньшая часть приходится на белки, не обязательные для жизнеобеспечения самой клетки, но выполняющие в организме (не в отдельной клетке!) интегральные функции. Например, альбумин, синтезируемый и секретируемый гепатоцитами, пищеварительные ферменты, белки-гормоны, гемоглобин и др. Отметим, что «молчащих» генов в дифференцированной клетке существенно больше, чем действующих.

Таким образом, можно выделить два типа регуляции действия генов в клетках животных.

1. В дифференцированной клетке большая часть генов — около 80 % — полностью выключена, репрессирована, и это состояние сохраняется длительно, часто на протяжении всей жизни клетки или даже многих генераций клетки.
2. Интенсивность действия невыключенных генов регулируется путем индукции или репрессии. Сигналом для увеличения или уменьшения скорости синтеза белков служит изменение концентрации определенного вещества — гормона, некоторых метаболитов и др. Такие изменения обычно непродолжительны, и клетка возвращается в базальное состояние после прекращения действия сигнала.

Набор действующих и выключенных генов различен в дифференцированных клетках разных типов; различия возникают в ходе клеточной дифференцировки и определяют фенотип клетки. Молекулярные механизмы регуляции такого типа пока неизвестны. Изучение биохимии клеточной дифференцировки составляет одно из основных направлений современной биохимии; оно имеет важное значение для медицины, поскольку может открыть средства управления процессами регенерации поврежденных или даже утраченных органов.

ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА

Размеры генома человека

Напомним, что соматические клетки человека содержат диплоидный набор хромосом — 22 пары аутосомных и одну пару половых: XX — у женщин и XY — у мужчин, всего 46 хромосом. В яйцеклетках и сперматозоидах содержится гаплоидный набор — 23 хромосомы. Из них 22 хромосомы одинаковые у мужчин и женщин (аутосомные хромосомы), а 23-я хромосома X — у женщин и Y — у мужчин. Аутосомные хромосомы нумеруются от 1 до 22 в порядке уменьшения размера.

Общая длина всех молекул ДНК гаплоидного набора составляет $3 \cdot 10^9$ н. п., или 1 м. Полная запись генома человека с использованием однобуквенных символов (AGCAAT...) заняла бы около 1000 томов по 1000 страниц каждый и 3000 знаков на странице. В каждой хромосоме содержится одна молекула ДНК. В хромосоме 21 (самая маленькая хромосома в геноме человека) молекула ДНК содержит 50 000 000 н. п., длина ее равна 1,5 см. Длина молекулы ДНК в хромосоме среднего размера равна примерно 130 000 000 н. п., или 4 см (в записи однобуквенными символами — 45 томов).

Небольшое количество ДНК содержится в митохондриях — меньше 1 % от всей ДНК. Митохондриальная ДНК наследуется по материнской линии, поскольку митохондрии сперматозоидов не проникают в яйцеклетку.

Геном E. coli в 1000 раз меньше генома человека (один том однобуквенной записи).

Генами называют участки ДНК, кодирующие синтез тРНК, рРНК и мРНК. Гены, кодирующие синтез мРНК, называют также генами белков. На их долю приходится лишь около 10 % всей ДНК клетки (100 томов однобуквенной записи). Регуляторные последовательности занимают не много места. Функции остальной ДНК (почти 90 %) большей частью неизвестны; значительная часть ее представлена многократно повторяющимися, тандемно расположенными нуклеотидными последовательностями.

Для каждой из 60-ти индивидуальных тРНК имеется от 10 до 20 копий гена. Гены рРНК образуют тандемы повторяющихся звеньев, каждое из которых содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие 28S-, 18S- и 5,8S- рРНК. Число таких повторов в геноме человека равно примерно 160-ти. Располагаются они в области ядрышковых организаторов пяти пар хромосом — 13, 14, 15, 21 и 22. Гены 5S-рРНК находятся на хромосоме 1, образуя тандем примерно из 2000 генов.

Число разных генов мРНК, т. е. генов, кодирующих разные белки, в клетках человека около 50 000. В гаплоидном наборе некоторые из индивидуальных генов мРНК представлены единственной копией, другие — двумя или несколькими копиями, и есть такие, число копий которых исчисляется сотнями (например, гены гистонов). Гены мРНК обычно имеют размеры в пределах 1000–1 000 000 н. п.

Библиотека ДНК человека

Одной из задач изучения генома является создание библиотеки ДНК человека. Под библиотекой ДНК подразумевают коллекцию клонированных (размноженных) фрагментов ДНК организма. Такими фрагментами могут быть гены, промоторы, энхансеры, сайленсеры и др. Одновременно создаются две формы библиотеки: 1) геномная библиотека, содержащая копии всех без исключения участков (нуклеотидных последовательностей) генома; 2) библиотека комплементарной ДНК, содержащая только те последовательности, которые комплементарны какой-либо из мРНК. Следовательно, эта библиотека не содержит регуляторных и других нетранскрибируемых последовательностей (напомним, что на их долю приходится около 90 % всей ДНК); кДНК не содержит также интронов. Полная библиотека генома человека является необходимой базой как для изучения функционирования генов, так и для решения прикладных проблем, прежде всего медицинских.

Амплификация (клонирование) фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции

Содержание ДНК в клетках невелико, а на долю одного фрагмента размером со средний ген приходится всего лишь около одной миллионной части всей ДНК клетки, и это создает значительные трудности для изучения генома. Полимеразная

цепная реакция (ПЦР) позволяет *in vitro* накопить необходимое количество исследуемого фрагмента ДНК. Метод основан на реакции синтеза ДНК при действии ДНК-полимеразы, но эта реакция организована особым образом.

Инкубационная смесь для ПЦР

Инкубационная смесь содержит буферный раствор, препарат фрагментированной ДНК, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, ДНК-полимеразу и две разные затравки.

В ПЦР используется ДНК-полимераза из термофильной бактерии Thermus aquaticus (Taq-полимераза), обитающей в природных горячих источниках. Этот фермент отличается высокой устойчивостью к повышенной температуре.

Если ДНК человека разрезать с помощью рестриктаз на фрагменты длиной 2000 нуклеотидов (это близко к среднему размеру генов), то получится около 2 млн фрагментов. Найти в такой груде изучаемый ген можно, используя специальные затравки. Затравки представляют собой фрагменты одноцепочечной ДНК длиной около 20 нуклеотидов. Нуклеотидная последовательность одной затравки должна быть комплементарна 3′-концу одной цепи искомой последовательности ДНК, а второй затравки — 3′-концу другой цепи этой последовательности (рис. 4.24, цикл 1). Затравки в ПЦР функционируют как собственно затравки (см. рис. 4.4), а главное — как зонды, обнаруживающие и метящие изучаемую последовательность в молекуле ДНК. Если ставится задача поиска гена белка, то такие затравки можно

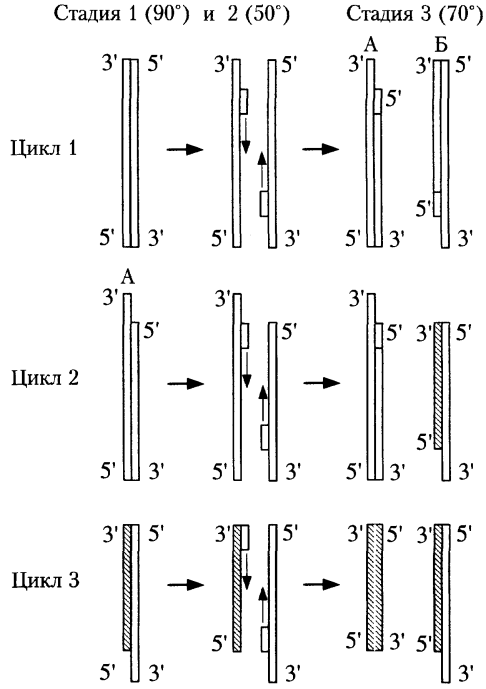


Рис. 4.24. Полимеразная цепная реакция

синтезировать, исходя из генетического кода и аминокислотной последовательности N- и C-концов белка. Эти затравки найдут в массе фрагментов суммарной ДНК тот фрагмент, который содержит искомый ген, а ДНК-полимераза синтезирует новые копии гена.

Проведение полимеразной цепной реакции

Реакция проходит в три стадии (рис. 4.24).

1. Инкубационную смесь нагревают до 90 °С. При этом происходит денатурация ДНК, из одной двухцепочечной молекулы образуются две одноцепочечные.
2. Инкубационную смесь охлаждают до 50 °С. При этом происходит гибридизация цепей с затравками.
3. Инкубационную смесь нагревают до 70 °С. При этой температуре гибридные молекулы не денатурируются, а ДНК-полимераза удлиняет обе затравки с их 3′-концов до 5′-концов матричных цепей. В результате образуются две новые цепи ДНК, укороченные с 5′-концов; при этом затравка оказывается включенной в эти укороченные цепи молекул ДНК.

Концентрация каждой затравки должна значительно превышать концентрацию ДНК. В противном случае во время стадии 2 высока вероятность того, что разделенные цепи ДНК будут соединяться не с затравкой, а друг с другом. Кроме того, как уже отмечено, затравки остаются в составе вновь синтезированной ДНК, т. е. расходуются во время реакции.

Затем цикл смены температур повторяют. Во втором цикле происходят те же события, что и в первом, но кроме того используются в качестве матриц укороченные цепи, образовавшиеся в первом цикле: эти цепи еще раз укорачиваются (с 3′-концов), и образуются цепи, содержащие только последовательность нуклеотидов искомого гена (см. рис. 4.24, цикл 2, цепь, выделенная штриховкой). В цикле 2 показаны превращения молекулы А, образовавшейся в цикле 1; аналогичным превращениям подвергается и молекула Б.

В следующем (третьем) цикле смены температур снова происходят те же события, что и в первых двух циклах, но кроме того используются в качестве матрицы цепи, содержащие только последовательность нуклеотидов искомого гена; в результате получается двухцепочечная молекула (выделена штриховкой), содержащая только ген данного белка.

Далее цикл смены температур повторяют многократно, и в каждом цикле (начиная с четвертого) происходит репликация гена, т. е. удвоение его количества в инкубационной смеси. Реакция протекает быстро, каждый трехстадийный цикл занимает около трех минут, за один час можно провести 20 циклов. Количество ДНК нарастает в геометрической прогрессии со множителем 2: за n циклов оно будет равно 2n; за 20 циклов увеличится примерно в миллион раз.

Поскольку матрица при матричном синтезе не расходуется, то исходная ДНК, внесенная в инкубационную смесь, в каждом цикле используется для синтеза укороченных с 5′-конца цепей (см. рис. 4.24, цикл 1). Количество этих матриц нарастает, однако не в геометрической, а в арифметической прогрессии, и через

20 циклов увеличивается примерно в 20 раз, что ничтожно мало по сравнению с миллионнократным увеличением количества гена.

Высокая эффективность ПЦР позволяет накопить необходимое количество ДНК при очень малых исходных количествах — достаточно одной капли крови, одного волоса, даже одной клетки или одной молекулы ДНК. Метод ПЦР резко ускорил изучение генома человека, и нашел практическое применение для диагностики болезней (ДНК-диагностика), а также для идентификации личности.

В частности, ПЦР применяют для диагностики инфекционных болезней. Традиционная диагностика таких болезней основана на использовании микробиологических методов, которые часто требуют гораздо больше времени и менее надежны, чем ДНК-диагностика. Метод основан на том, что первичная структура ДНК разных видов организмов различна. Следовательно, можно подобрать такие затравки, которые будут гибридизоваться с ДНК возбудителя, но не с ДНК человека. Если, используя эти затравки, провести ПЦР с материалом (кровь, биопсийный материал), полученным от больного, то нарастание количества ДНК в пробе будет указывать на наличие возбудителя в организме пациента: в ПЦР будет синтезироваться только ДНК возбудителя, а не пациента.

Вирусы, для которых характерен длительный латентный период (например, вирус иммунодефицита человека), трудно обнаружить на ранних стадиях развития инфекции. С помощью ПЦР это удается сделать даже тогда, когда вирус содержится лишь в незначительной части клеток организма.

ОСОБЕННОСТИ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСНОГО ГЕНОМА

Отличие вирусов от других организмов заключается в двух особенностях: 1) вирусная частица (вирион) содержит только один вид нуклеиновых кислот — или ДНК, или РНК; 2) вирионы отличаются необычной для живых существ простотой организации — они не имеют собственного метаболизма, не содержат клеточных органелл, в том числе рибосом, и очень часто состоят только из нуклеиновой кислоты, заключенной в белковую оболочку. В связи с этим вирусы способны размножаться исключительно за счет использования метаболического аппарата другой клетки, т. е. они являются внутриклеточными паразитами.

Цикл размножения вируса начинается с его прикрепления к поверхности клетки. Вирион содержит специальные белки, узнающие определенные вещества мембраны клетки-хозяина; эти вещества называют рецепторами вируса. Например, бактериофаг Т4 прикрепляется только к клеткам E. coli, полиовирус — к определенным клеткам человека, а также обезьян, вирус гриппа — к клеткам слизистой оболочки дыхательных путей. После прикрепления вирион проникает через мембрану внутрь клетки; иногда в клетку попадает только нуклеиновая кислота вириона. Затем с использованием аппарата клетки-хозяина начинается репликация вирусного генома и синтез вирусных белков; из них путем самосборки образуются новые вирионы, которые освобождаются из клетки, либо разрушая ее (лизис клеток), либо проходя через мембрану без разрушения клетки.

Многие вирусы в качестве генетического материала содержат ДНК, но есть группа вирусов, геном которых представлен рибонуклеиновой кислотой. Размеры генома вирусов невелики. Например, в ДНК бактериофага Т4 обнаружено

135 генов; из них 36 генов кодируют синтез разных белков, входящих в оболочку фага, а остальные — гены белков, обеспечивающих переключение аппарата клетки-хозяина на синтез компонентов вируса, а также гены белков, выполняющих вспомогательную роль при самосборке вирионов. Геном маленького бактериофага jX174, также паразитирующего на E. coli, содержит всего 9 генов. Размеры нуклеиновых кислот некоторых вирусов указаны в табл. 4.3.

Таблица 4.3. Размеры нуклеиновых кислот некоторых вирусов

Вирус	Число нуклеотидов	Вирус	Число нуклеотидов
РНК-содержащие вирусы		ДНК-содержащие вирусы	
Полиовирус	6 000	Бактериофаг φX174	5 400
Вирус бешенства	16 000	Вирус SV40	5 000
Вирус везикулярного	16 000	Вирус папилломы	8 000
стоматита	23 000	(бородавки)	
Реовирус	6 100	Аденовирус	36 000
Вирус гриппа	7 600	Бактериофаг T4	120 000
Риновирусы		Вирус герпеса	156 000
		Вирус оспы	240 000

Механизм репликации генома ДНК-содержащих вирусов принципиально не отличается от репликации ДНК других организмов. РНК-содержащие вирусы по механизму репликации генома делятся на две группы. В одну группу входят полиовирус, вирусы гриппа, бешенства, везикулярного стоматита, реовирусы, вирусы свинки, кори и др. Репликация РНК этих вирусов происходит при участии РНК-репликазы (РНК-зависимой РНК-полимеразы); фермент катализирует синтез РНК, используя в качестве матрицы тоже РНК:

$$\text{Рибонуклеозидтрифосфаты} \xrightarrow[\text{РНК-репликаза}]{\text{РНК (матрица)}} \text{НК} + H_4P_2O_7.$$

Такого фермента нет в клетках организма-хозяина: он содержится в самих вирусных частицах и вместе с ними попадает в инфицируемую клетку. В результате действия РНК-полимеразы увеличивается количество молекул вирусной РНК. Одновременно происходит трансляция этих РНК и образуются вирусные белки, в том числе РНК-репликаза. Цикл размножения завершается самосборкой вирионов.

Репликация генома другой группы РНК-содержащих вирусов происходит через промежуточное образование ДНК. Эти вирусы содержат обратную транскриптазу (РНК-зависимую ДНК-полимеразу). Обратная транскриптаза катализирует синтез ДНК, используя в качестве матрицы РНК; при этом сначала образуется гибридная молекула РНК-ДНК:

$$\text{Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты} + \text{РНК} \rightarrow \text{РНК} \bullet \text{ДНК} + H_4P_2O_7,$$

а затем на цепи ДНК синтезируется комплементарная ей вторая цепь. В результате получается двунитевая молекула ДНК:

$$\text{Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты} + \text{РНК} \bullet \text{ДНК} \rightarrow \text{РНК} + \text{ДНК (двунитевая)} + H_4P_2O_7.$$

Вирусная ДНК затем интегрируется с геномом клетки-хозяина, т. е. целиком включается в ДНК клетки, образуя в ней группу вирусных генов в ряду собственных генов клетки. В составе генома происходит транскрипция вирусной ДНК и образуется большое количество вирусной РНК, которая используется для синтеза вирусных белков. Затем из этих белков и РНК происходит самосборка вирионов. Некоторые вирусы с таким механизмом размножения индуцируют развитие опухолей у животных (онкогенные вирусы).

ИНГИБИТОРЫ МАТРИЧНЫХ БИОСИНТЕЗОВ

Прекращение матричных биосинтезов ведет к гибели клетки. На этом основано применение ингибиторов матричных биосинтезов для лечения инфекционных болезней и злокачественных опухолей. К таким ингибиторам, в частности, относятся многие антибиотики — вещества, выделяемые из микроорганизмов, главным образом из микроскопических грибов. Некоторые примеры указаны в табл. 4.4.

Антибиотики, взаимодействующие с ДНК, нарушают ее матричную функцию и подавляют репликацию или транскрипцию, или оба эти процесса. Их применяют для лечения опухолей. Противоопухолевые антибиотики практически одинаково взаимодействуют с ДНК, выделенной из любых клеток, как нормальных, так и опухолевых, т. е. они не отличаются избирательностью. Избирательность в их действии на клетки определяется не ДНК, а другими факторами, например различной проницаемостью клеточных мембран или особенностями метаболизма. Но эта избирательность не абсолютна, при лечении могут повреждаться и здоро-

Таблица 4.4. Антибиотики, ингибирующие матричные биосинтезы

Антибиотик	Механизм действия
Противоопухолевые препараты	
Актиномицин D (дактиномицин)	Внедряется (интеркалирует) между основаниями ДНК, образуя с ней нековалентные соединения. Ингибирует синтез РНК и, в меньшей мере, синтез ДНК
С (дауномицин)	Действует аналогично актиномицину
Митомицин С	Образует ковалентные сшивки между цепями ДНК. Ингибирует синтез ДНК
Противобактериальные препараты	
Тетрациклин	Блокирует центр связывания аа-тРНК на малой субъединице рибосом. Ингибирует элонгацию
Рубомицин	Соединяется с большой субъединицей рибосом. Ингибирует пептидилтрансферазную активность
Левомицетин (хлорамфеникол)	Соединяется с большой субъединицей рибосом. Ингибирует транслокацию
Эритромицин	Соединяется с малой субъединицей рибосом, нарушая ее функции
Стрептомицин	Соединяется с большой субъединицей рибосом. Ингибирует трансляцию, препятствуя отделению ГДФ от рибосом
Фузидиевая кислота	

вые клетки, что требует осторожности при клиническом использовании противоопухолевых антибиотиков.

Антибиотики, взаимодействующие с белками рибосом, ингибируют трансляцию. Они применяются главным образом как противобактериальные средства, отличаются достаточно высокой избирательностью и часто сравнительно мало токсичны для человека. Это объясняется тем, что у бактерий рибосомы в целом, а также отдельные белки, входящие в состав рибосом, несколько отличаются по строению от рибосом и соответствующих белков эукариот.

ИНГИБИРОВАНИЕ СИНТЕЗА БЕЛКОВ ДИФТЕРИЙНЫМ ТОКСИНОМ

Некоторые механизмы развития бактериальных инфекций связаны с ингибированием матричных биосинтезов. Примером может служить патогенез дифтерии. Возбудитель этой болезни *Corinebacterium diphteriae* размножается в поверхностном слое слизистой зева и смежных областей. Клетки бациллы выделяют токсин белковой природы. Этот белок построен из одной полипептидной цепи с молекуляр-

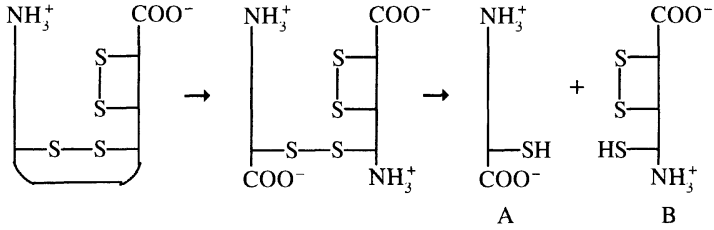


Рис. 4.25. Токсин возбудителя дифтерии

ной массой около 60 000. Под действием протеолитических ферментов клеток хозяина белок распадается на два фрагмента (рис. 4.25).

Фрагмент А представляет собой фермент АДФ-рибозилтрансферазу, переносящий АДФ-рибозильный остаток с НАД на фактор элонгации EF2:

НАД + EF2 → АДФ-рибозил-EF2 + Никотинамид + H^+

Модифицированный таким образом фактор элонгации утрачивает свою способность участвовать в транслокации рибосомы, и трансляция прекращается. С действием токсина связаны опасные симптомы дифтерии. Бациллы размножаются в слизистой зева, выделяют токсин, вследствие чего ближайшие клетки погибают в течение нескольких часов. Это улучшает условия размножения бацилл, а также вызывает воспалительную реакцию. Из лейкоцитов, экссудата и погибших клеток образуется пленка. Если она образуется в гортани или опускается туда из зева, то возникает асфиксия — наиболее опасное проявление дифтерии. Кроме того, дифтерийный токсин вызывает поражение сердца, что является частым осложнением заболевания.

Развитие многих вирусных инфекций также связано с ингибированием матричных синтезов: вскоре после проникновения вирионов в клетки выключается

синтез РНК и белков клетки-хозяина, аппарат переключается на синтез вирусных нуклеиновых кислот и белков.

ИНТЕРФЕРОНЫ

Интерферонами называют группу белков, регулирующих некоторые функции клетки, в частности реакцию клетки на вирусную инфекцию. Интерферон I представлен двумя формами — α и β. Синтез интерферонов индуцируется некоторыми компонентами вирусных частиц, в том числе двуспиральной РНК, имеющейся во многих вирусах. Интерферон, в свою очередь, индуцирует синтез фермента, который синтезирует олигонуклеотид (2′,5′-олигоА), при этом последний активирует РНКазу. В результате разрушаются мРНК и подавляется образование вирусных белков.

Кроме того, интерферон индуцирует синтез протеинкиназы, которая катализирует фосфорилирование одного из факторов инициации — фактора eIF2:

$$eIF2 + АТФ \rightarrow eIF2{-}OPO_3H_2 + АДФ.$$

Глава 5

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

В предыдущей главе матричные биосинтезы рассматривались как механизм копирования, точного воспроизведения генотипа и, соответственно, фенотипа. Копирование создает молекулярную основу одного из фундаментальных свойств жизни — наследственности. Противоположное свойство — изменчивость — столь же существенно, поскольку наряду с наследственностью обеспечивает возможность естественного отбора и биологической эволюции.

С изменчивостью связаны такие важные для медицины явления, как гетерогенность популяций человека, существование наследственных болезней и предрасположенность к болезням.

Молекулярную основу изменчивости организмов составляют наследуемые изменения первичной структуры ДНК — мутации. Мутации возникают в результате ошибок синтеза ДНК в процессе репликации или при репарации повреждений ДНК, вызванных разного рода внешними факторами. Другой механизм изменчивости составляют рекомбинации — обмен участками ДНК между гомологичными хромосомами при половом размножении.

ПОВРЕЖДЕНИЯ И РЕПАРАЦИЯ ДНК

Ряд экзогенных факторов — УФ-, ионизирующие излучения, многие химические соединения — вызывают в ДНК разнообразные изменения. Например, для действия УФ-излучения характерно образование димеров тимидиловой кислоты (рис. 5.1).

Ионизирующие излучения вызывают разрывы нуклеотидных цепей и разнообразные изменения азотистых оснований. Этим объясняется летальное действие ионизирующей радиации. Многочисленные повреждения возникают при действии разных химических соединений — образование ковалентных связей между цепями ДНК, дезаминирование оснований, отщепление оснований и др.

Такие изменения могут происходить в живой клетке спонтанно, т. е. в результате локальных флюктуаций тепловой энергии, а также под действием фонового излучения (в том числе космического) и некоторых веществ, попадающих в организм из среды. Наиболее часто при этом происходит гидролитическое отщепление пуриновых оснований (депуринизация ДНК). В результате депуринизации из

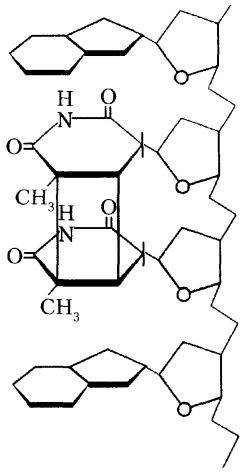


Рис. 5.1. Димер тимидиловой кислоты в молекуле ДНК

ДНК диплоидных клеток человека за сутки теряется около $5 \cdot 10^4$ нуклеотидов. В пересчете на 70 лет жизни это означает утрату примерно 40 % всех пуриновых оснований организма. С меньшей скоростью (на 2–3 порядка) происходят дезаминирование цитозина и депиримидинизация.

В целом в каждой клетке человека за каждый день происходят тысячи повреждений ДНК. Очевидны фатальные последствия таких повреждений, если бы они не устранялись. В клетке существуют системы репарации ДНК — ферментные механизмы, которые обнаруживают и исправляют повреждения. В общих чертах репарация происходит следующим образом. Если повреждены азотистые основания (например, произошло их дезаминирование), то они обнаруживаются и удаляются ДНК-гликозидазами. Эти ферменты гидролитически расщепляют связь между поврежденным основанием и дезоксирибозным остатком, в результате чего на молекуле ДНК образуется апуриновый или апиримидиновый участок, т. е. пентозофосфатная цепь без азотистых оснований. Специфические эндонуклеазы узнают такие участки и гидролизуют в них 3′,5′-фосфодиэфирную связь (рис. 5.2). Если депуринизация или депиримидинизация вызваны самим повреждающим агентом, то репарация начинается сразу с действия эндонуклеаз. Известно несколько систем репарации, устраняющих повреждения разного типа.

АПОПТОЗ

Апоптозом называют механизм программируемой и регулируемой гибели клеток. Механизм апоптоза включается, в частности, при повреждениях систем репарации ДНК и накоплении повреждений ДНК. Эти изменения активируют ряд специфических протеаз в клетке, которые, в свою очередь, активируют эндонуклеазы. Эндонуклеазы гидролизуют ДНК сначала на крупные фрагменты (размером около 50 000 н. п.), а затем происходит гидролиз по межнуклеосомным областям ДНК, и образуются фрагменты размером около 180 н. п. (размер участка ДНК в одной нуклеосоме) или кратных по величине фрагментов. Далее клетка распадается на мембранные везикулы (апоптозные тельца), содержащие фрагментированную ДНК и другие компоненты клетки; везикулы поглощаются и разрушаются фагоцитирующими клетками. Таким путем устраняются клетки, размножение которых может быть опасным для организма, например привести к развитию раковой опухоли (см. гл. 19).

Другая функция апоптоза — уничтожение клеток, завершивших свою роль (слово «апоптоз» происходит от греческого «листопад»). Наглядный пример — исчезновение хвоста у головастика при превращении его в лягушку. Множество подобных явлений происходит при онтогенезе всех многоклеточных организмов. Еще один пример: у новорожденных крыс наблюдается преходящая волна апоптоза β-клеток панкреатических островков в поджелудочной железе в течение 1–2 недель после рождения. При этом общая масса β-клеток не изменяется: потери, вызванные апоптозом, компенсируются новой популяцией клеток. Вероятно,

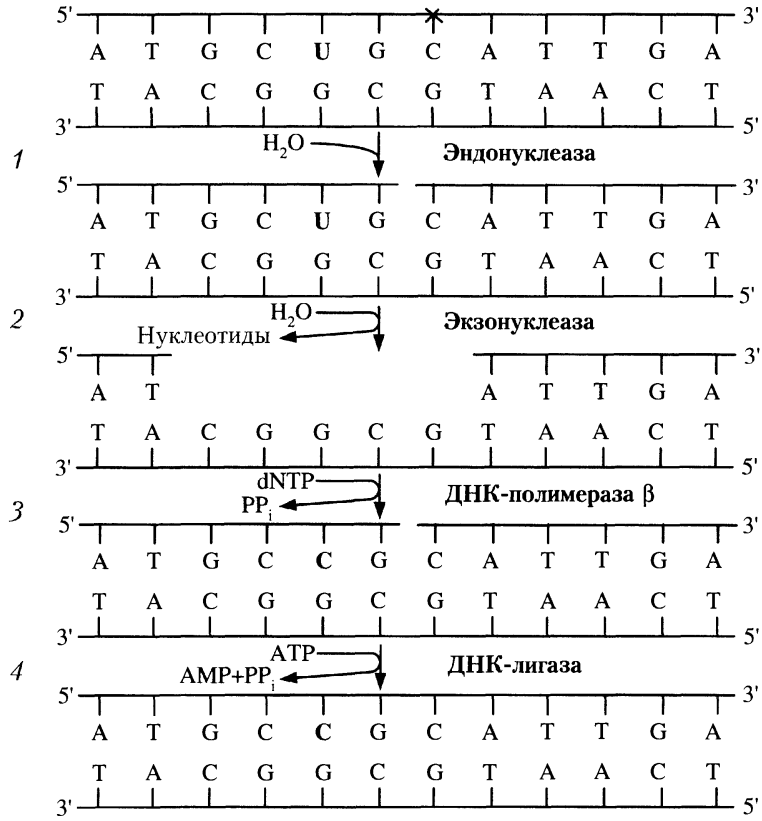


Рис. 5.2. Репарация повреждений ДНК:

1 — эндонуклеаза гидролизует 3′,5′-фосфодиэфирную связь в поврежденной цепи; *2* — экзонуклеазы удаляют некоторое число нуклеотидных остатков по обе стороны от места разрыва; *3* — ДНК-полимераза достраивает поврежденную нуклеотидную цепь, используя в качестве матрицы сохранившуюся цепь; *4* — ДНК-лигаза соединяет концы достроенной цепи

апоптоз нужен для смены популяции β-клеток, приспособленных к условиям *in utero*, на β-клетки, функционирующие после рождения. Сходный эпизод апоптоза β-клеток наблюдается и в поджелудочной железе плода человека.

Существует и другая форма гибели клеток — некроз. Некроз равивается при таком повреждении клетки, когда нарушаются и функции аппарата апоптоза. Клетка набухает, мембраны разрушаются, в том числе — мебраны лизосом. Содержимое клетки оказывается в межклеточном пространстве. Освободившиеся ферменты лизосом гидролизуют полимеры поврежденной клетки, а также соседних клеток и межклеточного матрикса. Продукты распадающихся клеток вызывают воспалительную реакцию.

МУТАГЕНЕЗ

Мутациями в широком смысле называют весьма разнообразные изменения генома. Эти изменения могут затрагивать один-единственный нуклеотид ДНК (точечные

мутации) или более протяженный фрагмент, целые гены, хромосомы (хромосомные аномалии) и даже весь геном (полиплоидия). Нередко мутациями называют только те изменения ДНК, которые проявляются фенотипически; иногда к мутациям относят любые наследуемые изменения ДНК. Мутацией обозначают как процесс возникновения изменений в геноме (мутагенез), так и результат этого процесса.

В этом разделе мы рассмотрим только генные мутации — точечные или захватывающие сравнительно небольшие отрезки гена.

Генные мутации

Сущность генных мутаций составляют нерепарированные наследуемые изменения первичной структуры ДНК, которые ведут либо к прекращению синтеза белка, кодируемого поврежденным геном, либо к синтезу измененного, «неправильного» белка. Мутации в регуляторных участках оперона ведут к нарушению регуляции или прекращению синтеза белка. Механизмы мутагенеза сложны и недостаточно изучены. Сравнительно простой пример дает мутагенное превращение цитозина в урацил (окислительное дезаминирование), которое можно вызвать, действуя на клетки азотистой кислотой (рис. 5.3).

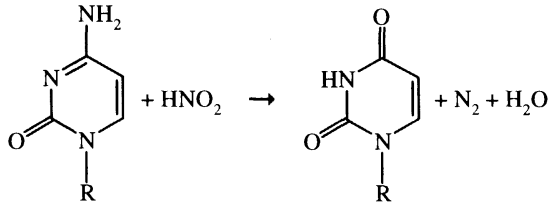


Рис. 5.3. Дезаминирование цитозина азотистой кислотой

Такое изменение может остаться «незамеченным» репарирующими системами, поскольку урацил тоже нормальное азотистое основание (в РНК). В результате возникает наследуемое изменение гена (рис. 5.4). Это пример так называемых точечных мутаций, когда в ДНК изменяется один мономер.

Замена нуклеотида может привести к изменению смысла кодона (миссенс-мутация) и, следовательно, к синтезу измененного белка. Так возникла, например,

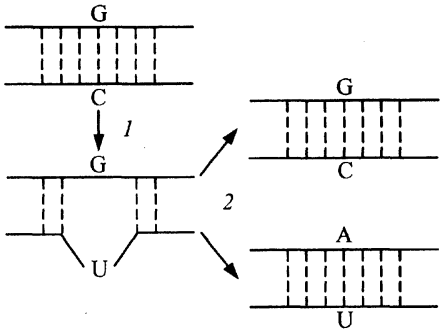


Рис. 5.4. Мутация, вызванная дезаминированием цитозина:

1 — превращение цитозина в урацил; *2* — расхождение цепей материнской ДНК и синтез на них комплементарных цепей. Одна из дочерних клеток получает ДНК с парой A—U, в отличие от другой дочерней клетки, которая, как и материнская, содержит в этом месте ДНК пару G—C

мутация, проявляющаяся как серповидноклеточная анемия: кодон, ответственный за включение глутаминовой кислоты в шестом положении β-цепи гемоглобина, превратился в кодон валина.

Точечные мутации можно обнаружить с помощью ДНК-зондов (см. рис. 3.16) или ПЦР, и это применяется для диагностики некоторых наследственных болезней. На рис. 5.5 представлена схема диагностики серповидноклеточной анемии с применением ДНК-зонда. Зонд комплементарен области ДНК, содержащей шестой кодон гена β-глобина S. К раствору ДНК, выделенной из лейкоцитов пациента, добавляют раствор зонда, денатурируют ДНК нагреванием, и при охлаждении образуется гибрид зонда с геном глобина S. Гибрид обнаруживают на электрофореграмме по радиоактивности зонда. В контрольной пробе с ДНК здорового человека гибрид не образуется, поскольку нет комплементарности между шестым кодоном β-глобина А и соответствующим кодоном зонда. Зонды не должны быть слишком длинными: при большой длине зонд образует гибрид и с нормальным геном глобина, но с локальной деформацией двойной спирали в области некомплементарной пары Т–Т.

... 4	5	6	7	8	9	10	
... Тре	Про	Вал	Глу	Лиз	Сер	Ала ...	β-глобин S
... GA	GGA	CAC	CTC	TTC	AGA	CG ...	ген β-глобина S
... CT	CCT	GTG	GAG	AAG	TCT	GC ...	зонд
		⇑					
		⇓					
... GA	GGA	CTC	CTC	TTC	AGA	CG ...	ген β-глобина А
... Тре	Про	Вал	Глу	Лиз	Сер	Ала ...	β-глобин А

Рис. 5.5. Диагностика серповидноклеточной анемии с применением ДНК-зонда. Стрелки указывают некомплементарную пару Т—Т зонда и гена β-глобина А

Если в результате замены образуется один из терминирующих кодонов — UAA, UAG или UGA (нонсенс-мутация), то синтез пептидной цепи обрывается на этом кодоне, получается незавершенный белок. Поскольку код вырожденный, то замена нуклеотида не всегда изменяет смысл кодона, может получиться другой кодон той же аминокислоты; такое изменение ДНК фенотипически не проявляется.

Мутация может быть связана с утратой мономеров (делеция) или, наоборот, со вставкой дополнительных мономеров. В случае делеции одного мономера изменяется считывание всех последующих кодонов — это мутация со «сдвигом рамки» (рис. 5.6). В результате такой мутации синтезируется белок с «бессмысленной» последовательностью аминокислот, не приспособленный для выполнения какой-либо функции. При делеции двух мономеров также происходит сдвиг рамки. Если же утрачены три мономера (или количество, кратное трем), то сдвига рамки нет, но синтезируется белок, укороченный на одну аминокислоту или несколько аминокислот. Вставки дополнительных нуклеотидов (в количестве, не кратном трем) также приводят к сдвигу рамки.

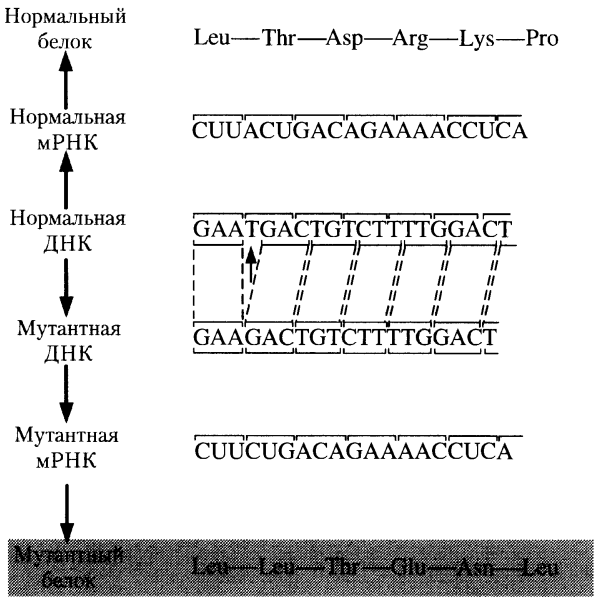


Рис. 5.6. Мутация со сдвигом рамки (стрелкой отмечен нуклеотид, утрачиваемый при мутации)

Биологические последствия мутаций

Мутации могут быть нейтральными, полезными или вредными. К нейтральным относятся, в частности, такие мутации, когда замена аминокислотного остатка в белке не сказывается на его функции. Так может быть при замене одной аминокислоты на другую, сходную по свойствам — по размерам боковой группы, по заряду, по гидрофобности (эквивалентная замена). Если в результате мутации свойства белка изменяются таким образом, что особь получает преимущества для выживания, то мутация биологически полезна. Чаще всего, однако, мутации бывают вредными. Это обусловлено случайным характером мутаций: изменения ДНК случайны в том смысле, что с одинаковой (или почти одинаковой) вероятностью могут возникать в любом месте молекулы. Случаен также и характер изменения – замена, делеция или вставка любого из четырех нуклеотидов. Маловероятно, чтобы случайное вмешательство в сложноорганизованную, отлаженную эволюцией систему оказалось полезным для нее, и наоборот — велика вероятность вредных последствий.

Мутации могут происходить как в соматических клетках, так и в половых. При половом размножении наследуются только мутации половых клеток. Однако соматические мутации могут быть причиной таких тяжелых и распространенных болезней, как злокачественные опухоли.

Частота мутаций

Мутации в отличие от репарируемых повреждений ДНК — сравнительно редкие события. При расчете на единичный ген одна из каждых 100 000–1 000 000 гамет

содержит вновь возникшую мутацию. Однако для генотипа в целом мутация — явление совсем не редкое: если принять число генов у человека равным 50 000, то получается, что значительная часть гамет имеет новую мутацию. Большая часть мутаций резко нарушает жизнеспособность клетки: в результате мутаций гибнет до 80 % гамет на самых ранних стадиях развития.

Частоту мутаций, сохранившихся в процессе эволюции, можно оценить по различиям первичной структуры какого-либо белка у разных животных. Например, известна первичная структура цитохрома *c* примерно 100 разных видов организмов. Сравнивая число аминокислотных замен в цитохроме *c* некоторых видов по сравнению с цитохромом *c* человека (табл. 5.1), легко видеть, что различия тем больше, чем меньше филогенетическое родство. Зная время, потребовавшееся для эволюции, например от земноводных до млекопитающих, можно рассчитать частоту замен. Для цитохрома *c* она оказалась равной трем заменам за 100 млн лет; для других белков получены величины от 0,2 до 60 замен за 100 млн лет. Конечно, эти величины отражают лишь незначительную часть всех мутаций, поскольку большинство из них являются вредными и элиминируются в ходе естественного отбора. Отметим также, что при таком методе определяется частота мутаций одного гена, а не всего генома.

Таблица 5.1. Число аминокислотных замен в цитохроме *c* разных организмов по сравнению с цитохромом *c* человека

Вид	Количество замен	Вид	Количество замен
Шимпанзе	0	Лягушка	18
Обезьяна резус	1	Карп	18
Кролик	9	Шелковичная бабочка	31
Собака	11	Пшеница	43
Курица	13	Дрожжи (Saccharomyces)	45

Сохраняющиеся в поколениях изменения одного и того же гена отражают филетическую эволюцию этого гена и соответствующего белка. В результате филетической эволюции общее число генов в геноме индивида не изменяется. Однако в генофонде популяции разнообразие генов при этом увеличивается.

УДВОЕНИЕ И ДИВЕРГЕНЦИЯ ГЕНОВ В ФИЛОГЕНЕЗЕ

Филогенез характеризуется усложнением генома, которое проявляется в увеличении количества и разнообразия генов и, соответственно, белков. Геном кишечной палочки содержит $3{,}8 \cdot 10^6$ н. п. Средний белок построен примерно из 500 аминокислотных остатков; следовательно, размер среднего гена — около 1500 н. п. Таким образом, в клетке кишечной палочки ДНК хватило бы для кодирования примерно 4000 белков. Однако часть ДНК не входит в состав структурных генов, а выполняет регуляторные функции в оперонах, поэтому число разных белков в клетке кишечной палочки равно примерно 3000.

В процессе эволюции по мере усложнения организмов содержание ДНК в них увеличивается, однако нет строгой зависимости между содержанием ДНК и местом на филогенетическом древе (табл. 5.2). Более точно усложнению организмов соответствует увеличение количества и разнообразия генов и, соответственно, белков.

Таблица 5.2. Размер генома (млн н. п.) у разных организмов (для эукариот — в расчете на гаплоидный набор)

Организм	Размер генома	Организм	Размер генома
Бактерии	5	Человек	4 000
Дрозофила	155	Кукуруза	15 000
Мышь	3 000	Саламандра	90 000

ДНК гаплоидного набора хромосом клетки человека содержит $3{,}8 \cdot 10^9$ нуклеотидных пар, т. е. на три порядка больше, чем E. coli. Такого количества ДНК хватило бы для кодирования 2,5 млн белков. В клетках человека (и других эукариот) доля ДНК, занятая структурными генами, значительно меньше, чем у прокариот. По примерным оценкам, в организме человека синтезируется около 50 000 разных белков (в 20 раз больше, чем у E. coli). В это число не входят иммуноглобулины, разнообразие которых обеспечивается механизмами, отличающимися от синтеза всех других белков (см. гл. 20).

Усложнение генома при филогенезе достигается в результате двух процессов: удвоения генов и их независимых мутаций. В результате удвоения возникают две копии гена в одной молекуле ДНК (в одной хромосоме), т. е. в геноме образуется дополнительный локус. Многократное удвоение приводит к образованию большего количества копий. Многие гены человека в гаплоидном наборе представлены двумя или большим числом копий. В некоторых (редких) случаях число копий значительно; например, имеется до 1000 копий гистоновых генов, которые в молекуле ДНК расположены последовательно (тандемно).

При наличии двух копий гена мутации одной из них, ведущие к синтезу «неправильного» белка, не будут гибельными для клетки, поскольку другая копия обеспечит синтез «правильного» белка. Следовательно, мутантный ген не будет элиминироваться естественным отбором, и через ряд поколений в результате накопления мутаций кодируемый им мутантный белок может оказаться полезным для организма. Это означает появление нового гена. Такие родственные гены сходны по последовательности кодонов, а соответствующие белки — по последовательности аминокислот. Например, подобное семейство белков составляют миоглобин и протомеры гемоглобинов. В организме взрослого человека имеются три основные формы гемоглобинов, и все они тетрамеры, все содержат α-протомеры, но различаются по другой паре протомеров:

- HbA – 2α2β, 96 % от всего гемоглобина крови у взрослых;
- HbA_2 – 2a2d, 2 %;
- HbF – 2α2γ, 2 %.

Первичная структура миоглобина и протомеров гемоглобина сходна, но не идентична. Учитывая число различий в их первичной структуре, а также сравнивая первичные структуры гемоглобинов разных животных, можно считать, что миоглобин и протомеры гемоглобинов возникли из общего предшественника в результате удвоения генов и независимых мутаций (рис. 5.7). На это указывает также и то, что гены глобинов β-семейства (глобины β, δ, γ, ε) расположены в одной молекуле ДНК (11-я хромосома), в непосредственном соседстве друг с другом,

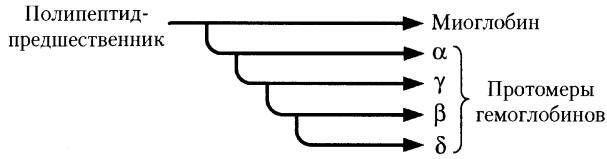


Рис. 5.7. Происхождение миоглобина и протомеров гемоглобина

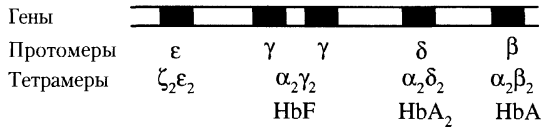


Рис. 5.8. Гены семейства β-глобинов человека:

в гемоглобине $\xi_2\varepsilon_2$ протомер ξ — аналог протомера α (ген находится в 16-й хромосоме, как и ген протомера α); гемоглобин $\xi_2\varepsilon_2$ синтезируется в раннем эмбриональном периоде, а HbF (фетальный гемоглобин) — в более позднем периоде

при этом ген γ представлен двумя копиями (рис. 5.8). Гены протомера α (две копии) находятся в хромосоме 16.

Основная функция всех гемоглобинов одинакова, поэтому их можно рассматривать как изобелки. Следовательно, удвоение генов и последующие независимые мутации копий — это один из механизмов образования изобелков, в том числе изоферментов. Дальнейшее накопление мутаций в родственных генах ведет к еще большей дивергенции (расхождению) свойств соответствующих белков. Например, семейство родственных белков составляет группа протеолитических ферментов, включающая трипсин, химотрипсин, эластазу, тромбин, плазмин; их называют сериновыми протеазами, поскольку они содержат в активном центре остаток серина, непосредственно участвующий в катализе. Механизм действия этих ферментов сходен, однако они различаются по субстратной специфичности и роли, которую выполняют в организме, поэтому название «изоферменты» к ним уже вряд ли применимо. Существуют и другие семейства протеаз: аспартатные, цистеиновые и металлопротеиназы (содержат в активном центре аспарагиновую кислоту, или цистеин, или ион цинка соответственно). Все семейства вместе образуют суперсемейство протеаз. Продолжающееся накопление мутаций в конечном счете приводит к тому, что гены, возникшие в результате удвоения их общего предшественника, утрачивают признаки родства, а кодируемые ими белки имеют совершенно различные первичную структуру и функцию. Этот путь и ведет к увеличению количества и разнообразия генов при филогенезе. Удвоение генов и их дивергенция путем независимых мутаций составляют механизм дихотомической эволюции генов и соответствующих белков.

Организм должен реплицировать ДНК с высокой точностью, чтобы поддерживать свою генетическую идентичность. На это направлено действие механизмов, обеспечивающих точность репликации, и действие репарирующих систем, устраняющих повреждения. И все же он должен допускать некоторое количество ошибок при репликации ДНК или репарации повреждений, чтобы была возможна эволюция. Мутации — это первичная причина появления разнообразия феноти-

пов, необходимого для действия естественного отбора. Другая причина — вторичная — это рекомбинации генов при половом размножении.

ПОЛИМОРФИЗМ БЕЛКОВ

У разных особей возникают варианты (мутации) разных генов или варианты одного и того же гена. Варианты генов, образующиеся у отдельных особей, могут постепенно распространяться в популяции в результате наследования, если они не летальны. Так формируется генотипическая неоднородность популяции, которая ведет и к фенотипической неоднородности. На молекулярном уровне фенотипическая неоднородность проявляется как полиморфизм белков — существование разных форм белка, выполняющих одинаковые или очень сходные функции (изобелки). Чаще всего изучают полиморфизм ферментов (т. е. наличие изоферментов), поскольку их гораздо легче обнаружить, чем другие белки, по катализируемой ими реакции.

Как известно, место, занимаемое геном в хромосоме (или молекуле ДНК), называют *генным локусом*. Варианты одного гена в гомологичных хромосомах, занимающие в них гомологичные же локусы (т. е. одинаковое место в одномерном пространстве нитей ДНК), называют *аллелями* (рис. 5.9). В популяции может быть множество разных аллелей одного гена, в то время как у отдельного индивида — только два, поскольку клетки человека диплоидны (в гаплоидных половых клетках — только один аллель). Гомологичные хромосомы половых клеток в процессе мейоза (профаза I) могут обмениваться аллелями или их частями (рекомбинация). Если при рекомбинации обмениваются не целиком аллельные гены, а участки ДНК меньшей длины, то такой обмен может приводить к появлению новых, прежде не существовавших в популяции аллелей, а не просто новых сочетаний прежних аллелей. После слияния гамет в диплоидном наборе зиготы получаются различные сочетания аллелей, как уже существовавших в популяции, так и вновь возникших в процессе мейоза в паре гамет, образовавших данную зиготу. Рекомбинации — гораздо более частые события, чем мутации, поэтому разнообразие форм внутри вида обусловлено главным образом именно рекомбинациями.

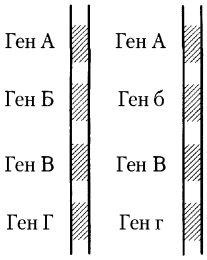


Рис. 5.9. ДНК гомологичных хромосом:

показаны четыре пары генов в ДНК двух гомологичных хромосом индивида: четыре гена — в одной молекуле ДНК одной хромосомы и четыре гена, занимающие такие же локусы, — в другой молекуле ДНК другой хромосомы (аллельные гены). Аллельные гены А и а идентичны (гомозиготное состояние). Аллельные гены В и b неидентичны (гетерозиготное состояние)

Существование в популяции двух или большего числа аллелей одного гена и соответствующих белков называют аллеломорфизмом (частный случай полиморфизма). Аллеломорфизм возникает в процессе филетической эволюции генов. Распространенность (частота) разных аллелей в популяции неодинакова. Принято считать, что аллели с частотой больше 1 % являются полиморфами; если

частота меньше, то существование измененного локуса можно объяснить за счет одних только повторных мутаций.

При дихотомической эволюции происходит удвоение генов, т. е. образуются новые генные локусы: сначала копии исходного гена, но последующие независимые, неодинаковые мутации копий приводят к появлению в организме изобелков. В этом случае варианты белка являются продуктами разных генных локусов, а не аллельных генов. На практике не всегда легко доказать, являются ли варианты белка продуктами одного локуса, т. е. аллеломорфами, или разных локусов.

Таким образом, изобелки — это множественные молекулярные формы белка, обнаруживаемые в пределах организмов одного биологического вида, как результат наличия более чем одного структурного гена в генофонде вида. Множественные гены могут быть представлены как множественные аллели или как множественные генные локусы.

Рассмотрим некоторые примеры полиморфизма белков.

Гемоглобин

Гемоглобины A ($2\alpha2\beta$), F ($2\alpha2\gamma$), A2 ($2\alpha2\delta$) есть в эритроцитах почти всех людей. Гены этих белков не аллельны, они занимают разные локусы (см. рис. 5.9). Эти гены возникли в результате дупликации гена-предшественника и мутационной дивергенции копий. Но в крови некоторых людей обнаруживаются (обычно редко) другие гемоглобины, являющиеся продуктами аллельных генов. В частности, известно много аллельных вариантов гемоглобина A. Один из вариантов – это HbS, который отличается от HbA лишь одной аминокислотой в шестом положении β-цепи (замена β6Glu → Val).

По аллелям HbA и HbS все люди делятся на три группы: с генотипами AA, AS и SS. У людей первой группы эритроциты содержат HbA, у второй — HbA и HbS, у третьей — HbS. Распространенность аллеля S (т. е. суммарное количество людей с генотипами AS и SS) географически неравномерна: у некоторых народностей Азии и Африки — до 35 %; у европейцев встречается редко.

Существует еще вариант гемоглобина: HbC (β6Glu → Lys). По этой паре аллелей существуют генотипы AA, AC и CC. Теперь всех людей можно разделить на пять генотипически и фенотипически разных групп: AA, AS, SS, AC и CC. Известно около 300 разных вариантов HbA; некоторые из них приведены в табл. 5.3. Следовательно, по всем аллелям гемоглобина A люди образуют около 600 генотипически

Таблица 5.3. Некоторые варианты гемоглобина A человека

Название	Мутация	Аномальное свойство
Замены аминокислот		
HbI	16Lys→Glu	Нет
Torino	43Phe→Val	Нарушен контакт с гемом; нестабилен
Nasharon	47Asp→His	Нестабилен
Buda	61Lys→Asn	Снижено сродство к O_2
Iwate	87His→Tyr	Снижено сродство к O_2; легко окисляется в MetHb
Denmark Hill	α95Pro→Ala	Нарушен αβ-контакт; сродство к O_2 повышено
HbC	β6Glu→Lys	Нет

Продолжение табл. 5.3

Название	Мутация	Аномальное свойство
Замены аминокислот		
HbS	β6Glu→Val	Снижены растворимость и сродство к O_2
Baltimore	β16Gly→Asn	Нет
Genova	β28Leu→Pro	Повышено сродство к O_2
Zurich	β63His→Arg	Повышено сродство к O_2; нестабилен
Kóln	β98Val→Met	То же
Kansas	β102Asn→Thr	Нарушен αβ-контакт; сродство к O_2 повышено
San Diego	β109Val→Met	Нарушен αβ-контакт; сродство к O_2 снижено
Hiroshima	β146His→Asp	Сильно повышено сродство к O_2
Делеции аминокислот		
Leiden	β6 или β7→0	Нестабилен
Tochigri	β(56-59) →0	Нестабилен
Green Hill	αβв(91-95) →0	Нестабилен; повышено сродство к O_2
Вставки аминокислот		
Tak	Цепь удлинена на 10 остатков с С-конца	Повышено сродство к O_2

различающихся групп (если не считать очень редко встречающиеся гетерозиготы по вариантам, например SC).

Ингибитор протеиназ α1-антитрипсин

Другой пример полиморфизма белков дает α1-антитрипсин — ингибитор некоторых протеолитических ферментов. Физиологическая роль этого белка состоит в регуляции активности протеолитических ферментов, выделяемых лейкоцитами в очаге воспаления. Найдены четыре аллельных варианта α1-антитрипсина с распространенностью 94, 2,3, 2 и 1,3 % и еще около десятка редких вариантов. Варианты легко обнаруживаются по различиям в электрофоретической подвижности.

Группы крови

Хорошо изучены различия людей по групповой принадлежности крови. Наиболее известна система AB0, имеющая важное значение для практики переливания крови. На наружной поверхности плазматической мембраны созревающих эритроцитов имеется олигосахарид, начинающийся с такой последовательности моносахаридов: фукоза–галактоза–N-ацетилглюкозамин–R (рис. 5.10). Олигосахарид ковалентно связан с липидом, входящим в структуру мембраны. При созревании эритроцита олигосахарид увеличивается на один моносахаридный остаток.

Присоединение дополнительного моносахарида катализирует фермент гликозилтрансфераза. В популяциях человека встречаются три аллельных гена этого фермента (A, B и O) и, соответственно, три аллельных варианта фермента, которые обозначаются теми же буквами. Варианты фермента A и B различаются по субстратной специфичности: вариант A присоединяет к олигосахариду N-ацетилгалактозамин, а вариант B — галактозу.

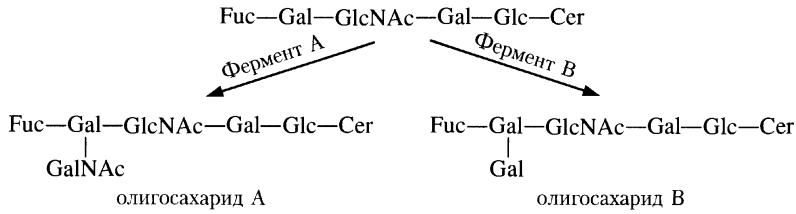


Рис. 5.10. Варианты олигосахарида в мембране эритроцитов, определяющие группу крови

Аллельный ген O кодирует синтез белка, не имеющего ферментативной активности. Таким образом, разные аллели обусловливают разные цепочки событий в организме:

Аллель A → Фермент A → Олигосахарид A

Аллель B → Фермент B → Олигосахарид B

Аллель O → Неактивный белок; олигосахарид остается недостроенным

Разветвленные олигосахариды A и B являются антигенами (точнее, антигенными детерминантами): к каждому из них могут образоваться антитела (анти-A и анти-B). При смешивании раствора анти-A с кровью, эритроциты которой содержат антиген A, происходит агглютинация эритроцитов. То же произойдет при встрече анти-B с эритроцитами, содержащими антиген B.

По трем аллелям A, B и O возможно шесть диплоидных генотипов (табл. 5.4). По наличию того или иного антигена эти генотипы делятся на четыре группы.

Таблица 5.4. Группы крови

Генотипы		Антигены в эритроцитах	Антитела (агглютинины) в плазме крови	Группа крови	Частота, %
гомозиготы	гетерозиготы				
OO		Нет	Анти-A, анти-B	0 (I)	40
AA	AO	A	Анти-B	A (II)	44
BB	BO	B	Анти-A	B (III)	12
	AB	A, B	Нет	AB (IV)	4

В крови людей имеются и антитела к антигенам эритроцитов, но они распространены в популяции так, что не встречаются вместе с соответствующим антигеном у одного и того же индивида. При переливании крови руководствуются тем же правилом: кровь донора и реципиента не должна содержать антиген и антитело, реагирующие между собой, иначе произойдет агглютинация эритроцитов и гемолиз.

Кроме системы AB0 известны группы крови по аллельным вариантам и других белков; общее число разных групп крови — свыше 30.

Биохимическая индивидуальность

В настоящее время известно множество белков, для которых найдены аллельные формы. Для их обнаружения требуются массовые обследования, поэтому

применяют несложные методы, позволяющие быстро провести анализ большого числа образцов. Наиболее часто используют электрофорез. Применение других методов (ДНК-зонды, полимеразная цепная реакция и др.) открывает все новые варианты, не обнаруживаемые методом электрофореза. Есть основания думать, что для значительной части из десятков тысяч структурных локусов генома человека имеются аллели. Это значит, что число разных генотипов может быть практически неисчерпаемым.

Полиморфизм белков, а следовательно, и других биохимических структур и процессов настолько велик, что можно говорить о биохимической индивидуальности. О каждом человеке можно сказать, что нет в мире такого же, не было никогда прежде и не будет после того, как он умрет. С биохимической индивидуальностью связаны и индивидуальные особенности развития и здоровья.

НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ

Причиной наследственных болезней являются изменения (мутации) ДНК. В результате появляются аллельные варианты белков, которые могут различаться по функциональной способности. Например, HbS хуже выполняет функцию транспорта кислорода, чем HbA. Если функция белка нарушена существенно, то «плохой» аллель проявляется как наследственная болезнь (наследственная протеинопатия). По механизму возникновения наследственные болезни можно разделить на две группы. Наследственная болезнь может возникнуть в результате мутации, которая произошла в гаметах или зиготе, давших начало данной особи. Это первая группа наследственных болезней, первичные мутации. Если первичная мутация нелетальна до репродуктивного возраста, то мутантный аллель может передаваться последующим поколениям и тоже проявляется как болезнь. Это вторая группа наследственных болезней.

В результате первичной генной мутации возникает гетерозиготность по данному локусу, поскольку одновременное повреждение сразу двух гомологичных локусов диплоидной клетки маловероятно. В гетерозиготном состоянии «плохой» аллель часто (но не всегда) не проявляется как болезнь или бывает причиной болезни, не слишком существенно снижающей жизнеспособность. Поэтому такие аллели могут сохраняться и распространяться в популяции. У родителей, каждый из которых является носителем мутантного аллеля в гетерозиготном состоянии, могут родиться дети, гомозиготные по такому аллелю: в этом случае развивается болезнь, нередко тяжелая.

Вернемся еще раз к серповидноклеточной анемии. В крови гомозигот SS имеется только HbS. Поскольку эритроциты, содержащие HbS, менее стабильны, чем эритроциты с HbA, у таких гомозигот скорость разрушения эритроцитов больше, и наступает анемия. Серповидноклеточная анемия проявляется в общей слабости, отставании развития, желтухе; больные обычно умирают в раннем детском возрасте. Как же такой вредный для отдельных индивидов аллель сохраняется в популяции, не элиминируется отбором? Дело в том, что для популяции в целом его нельзя назвать вредным. Гетерозиготы AS имеют в эритроцитах и HbA, и HbS; они практически здоровы или у них обнаруживаются слабые признаки болезни. С другой стороны, в эритроцитах гетерозигот хуже развивается малярийный

плазмодий, и они не заболевают малярией или легко переносят ее. Вот почему в местностях, где распространена малярия, частота аллеля S велика — до 35 %. Таким образом, ген серповидноклеточности, когда-то возникший в результате мутации, приводит к гибели части людей (гомозигот) от серповидно-клеточной анемии (до миллиона детей ежегодно), но популяция в целом приспособлена к среде, где важным фактором отбора является малярийный плазмодий. После ликвидации малярии аллель S начнет исчезать из генофонда людей.

Тяжесть наследственной болезни зависит от степени повреждения функции мутантного белка по сравнению с нормальным. Например, HbC (β6Glu→Lys) по свойствам мало отличается от HbA; даже гомозиготы CC практически здоровы или страдают легкими формами анемии. Конечно, тяжесть болезни зависит и от важности функции, выполняемой данным белком. Частота каждой в отдельности наследственной болезни невелика, однако общая частота существенна и достигает 2–4 %. В настоящее время известны тысячи разных наследственных болезней; биохимическая природа многих из них остается неизученной.

Выше речь шла о болезнях, наследственная природа которых ясно выражена: они являются моногенными и наследуются в соответствии с правилами Менделя. Кроме того, возможна полигенная наследственная (семейная) предрасположенность к болезням. Такие распространенные болезни, как атеросклероз, сахарный диабет, подагра, язва желудка, шизофрения, эпилепсия, имеют полигенную природу. Между наследственными болезнями и болезнями, вызванными факторами среды, нет резкой границы. Например, появление анемии при наследовании гемоглобина S практически не зависит от среды; таким болезням соответствует колонка *1* на рис. 5.11. С другой стороны, болезни вследствие травм, отравлений, инфекционные болезни и т. д. мало зависят от наследственности — им соответствует колонка *7* на рис. 5.11. Здесь речь идет о восприимчивости к повреждающим агентам среды. Однако дальнейшее развитие болезни всегда зависит от индивидуальных особенностей генотипа. Например, раны у одних людей заживают быстрее, у других — медленнее.

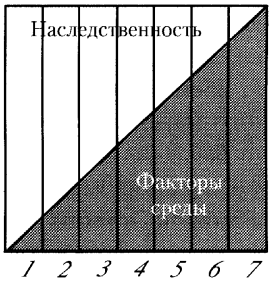


Рис. 5.11. Значение наследственности и факторов среды в развитии болезней

Между крайними формами болезней — наследственными и вызванными факторами среды — имеется непрерывный ряд промежуточных форм.

Примером такой промежуточной формы может быть эмфизема легких, связанная с недостаточностью α1-антитрипсина. Белок сыворотки крови α1-антитрипсин является ингибитором некоторых протеолитических ферментов. Он участвует в регуляции воспалительной реакции. Некоторые аллельные варианты этого белка обладают сниженной ингибиторной способностью. Индивиды, гомозиготные по таким аллелям, предрасположены к возникновению эмфиземы легких, которая обычно развивается в возрасте 40–50 лет. Если эти индивиды подвергаются раздражающим ингаляциям (производственные или бытовые загрязнения воздуха, курение), то эмфизема развивается раньше. Больше того, при этих условиях эмфизема возникает и у гетерозигот по данному аллелю, в то время как при обитании в условиях чистого воздуха они остаются здоровыми.

Таким образом, «плохой» аллель может существовать в скрытом состоянии и обнаруживает себя лишь при определенных условиях. Особенно выразительно это проявляется в случаях индивидуальной непереносимости некоторых лекарственных веществ. Рассмотрим реакцию на дитилин людей с разными аллеломорфами холинэстеразы плазмы крови. Этот фермент сходен с ацетилхолинэстеразой нервной ткани (гл. 23), но отличается от нее более широкой субстратной специфичностью: он гидролизует не только ацетилхолин, но и некоторые другие эфиры, в том числе дитилин (см. гл. 1). Напомним, что дитилин применяется как миорелаксант при некоторых хирургических операциях и эндоскопических обследованиях, например при бронхоскопии. Действие дитилина в применяемых дозах обычно непродолжительно — несколько минут. Это связано с тем, что он быстро разрушается холинэстеразой плазмы. Однако в редких случаях (примерно у одного пациента из 2000) паралич мышц продолжается часами: чтобы спасти жизнь больного, его приходится все это время держать на искусственном дыхании. Оказалось, что у таких людей активность холинэстеразы плазмы крови значительно ниже, чем обычно; низкая активность обнаруживается и у родственников этих людей. Следовательно, имеются аллельные формы фермента; они различаются не только по активности, но и по другим свойствам, в частности по электрофоретической подвижности. Индивиды с низкой активностью холинэстеразы плазмы совершенно здоровы, аллельный ген обнаруживает себя лишь при введении дитилина.

Непереносимость дитилина — это следствие ясно выраженного наследственного дефекта. С этой точки зрения болезнь, вызванную введением дитилина, можно было бы поместить в колонку *1* на рис. 5.11. С другой стороны, непереносимость обнаруживается только при действии фактора среды — дитилина, и, значит, ее можно отнести к типу болезней, помещенных в колонку *7*. В целом непереносимость дитилина в равной мере зависит от генетического дефекта и внешнего фактора, поэтому правильнее отнести ее к группе болезней, приведенных в колонке *4* на рис. 5.11. Большее значение имеют генетические дефекты, проявляющиеся как непереносимость некоторых пищевых веществ, поскольку пищевые вещества, в отличие от лекарств, потребляются всеми людьми и постоянно.

У некоторых взрослых людей наблюдается постоянная непереносимость лактозы: молоко и молочные продукты вызывают у них газообразование в кишечнике, боли в животе и понос. Непереносимость обусловлена отсутствием в кишечнике фермента лактазы.

Лактаза содержится в кишечнике новорожденных и обеспечивает усвоение лактозы грудного молока, расщепляя ее на глюкозу и галактозу. Ко времени прекращения грудного вскармливания или немного позднее активность лактазы в кишечнике заметно снижается, а у некоторых детей исчезает полностью. Лактаза отсутствует примерно у 15 % взрослых людей европейских народностей и у 80 % восточных народностей, негров, индейцев Америки. Непереносимость наследуется как простой доминантный признак. Генетический дефект не связан с повреждением гена лактазы, поскольку в грудном возрасте фермент синтезируется. Очевидно, имеются аллеломорфы какого-то белка, участвующего во включении и выключении гена лактазы в ходе онтогенеза. Отметим, что молоко стало обычной пищей для взрослых лишь с того времени, когда человек научился разводить

молочный скот; с этого времени и могло начаться распространение в популяциях аллеля, который обеспечивал сохранение лактазы у взрослых людей.

Рассмотренные здесь примеры непереносимости лекарственных или пищевых веществ представляют группу явлений того же рода, что и наследственная предрасположенность к болезням. Для диагностики наследственных болезней, обусловленных генными мутациями, часто используют ДНК-зонды, аналогично ДНК-диагностике серповидно-клеточной анемии, описанной в начале этой главы.

Мутации и лекарственная устойчивость возбудителей болезней

Важное значение в терапии инфекционных болезней имеет изменчивость бактерий и вирусов. Длительное, в течение нескольких месяцев, применение определенного лекарства нередко приводит к появлению в организме больного мутантного штамма возбудителя, устойчивого к этому лекарству. Например, при лечении СПИД, вызываемого вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), используют азидотимидин — аналог тимидина, содержащий азидную группу у 3′-углеродного атома рибозного цикла (рис. 5.12). Азидотимидин в организме фосфорилируется и включается в растущую цепь ДНК вируса с 3′-конца. Но дальнейшее удлинение цепи ДНК невозможно, поскольку у азидотимидина нет гидроксильной группы в 3′-положении (на ее месте — азидная группа). Однако через несколько месяцев у некоторых пациентов эффективность действия азидотимидина снижается: появился штамм вируса, умеющий отличать тимидин от азидотимидина.

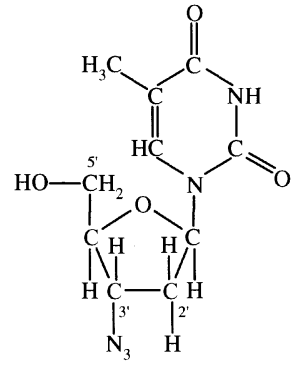


Рис. 5.12. Строение азидотимидина

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Успехи биохимии привели к разработке методов, позволяющих манипулировать генами с целью изменения генотипа, а следовательно, и фенотипических признаков организма. Это направление исследований получило название генной инженерии. Основная цель таких исследований — научиться исправлять наследственные дефекты генома, т. е. лечить наследственные болезни, а также создавать этим методом новые фенотипы путем прямой пересадки генов из одного организма в геном другого. Первые успехи генной инженерии связаны с получением новых форм микроорганизмов, синтезирующих полезные для человека продукты, в том числе лекарственные вещества.

Процедура пересадки гена включает следующие операции:

1) выделение гена;
2) получение рекомбинантной (гибридной) ДНК;
3) введение рекомбинантной ДНК в клетку (получается рекомбинантная клетка);
4) клонирование (размножение) рекомбинантной ДНК (рекомбинантных клеток).

Выделение гена

Для выделения и клонирования (размножения) гена чаще всего применяют полимеразную цепную реакцию (см. гл. 4). Еще один метод — синтез ДНК (гена) с использованием обратной транскриптазы. Напомним, что этот фермент есть в частицах некоторых РНК-содержащих вирусов. Обратная транскриптаза катализирует синтез ДНК, используя в качестве матрицы РНК:

$$\text{Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты} \xrightarrow{\text{РНК}} \text{ДНК} + H_4P_2O_7$$

Если при реакции *in vitro* с этим ферментом добавить в инкубационную смесь определенную мРНК (например, мРНК интерферона), то синтезируется ген, комплементарный этой мРНК, в котором закодирована структура соответствующего белка (например, интерферона). Многие индивидуальные РНК удается выделить из сложной смеси разных мРНК клетки и использовать для синтеза генов. Однако при этом методе получается, собственно, не ген, а так называемая комплементарная ДНК (кДНК): она отличается от гена тем, что не содержит интронов, поскольку при созревании мРНК участки, соответствующие интронам, удаляются.

ДНК, синтезированную с применением обратной транскриптазы, можно амплифицировать методом ПЦР.

Получение рекомбинантной ДНК

Ген нужно ввести в клетку таким образом, чтобы он не был разрушен клеточными нуклеазами, а интегрировался с геномом клетки. Для этого *in vitro* ген соединяют с определенной ДНК, выполняющей роль проводника (вектора). Часто в качестве вектора используют плазмиды — небольшие кольцевые молекулы ДНК, содержащие несколько генов. В исследованиях по генной инженерии часто используют

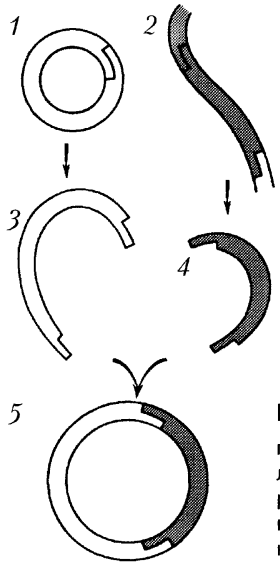


Рис. 5.13. Получение рекомбинантной ДНК:

плазмида (*1*) и ДНК (*2*), содержащая ген, выбранный для пересадки; ломаной линией отмечены места разрезания рестриктазами. После обработки рестриктазами образуются плазмидная ДНК (*3*) и ген (*4*) с «липкими» концами. При смешивании они соединяются, образуя рекомбинантную ДНК (*5*)

кишечную палочку E. coli. Геном этой бактерии представлен одной хромосомой (молекулой ДНК), прикрепленной к мембране, и плазмидами, «плавающими» в цитозоле. Плазмида представляет собой кольцевую ДНК; она примерно в 1000 раз меньше основной молекулы ДНК. В клетке может быть несколько разных плазмид, и каждая из них может быть представлена большим числом копий (до нескольких сотен). Репликация плазмид происходит независимо от репликации основного генетического материала. Некоторые плазмиды могут включаться в хромосому и снова отделяться от нее. Плазмиды могут переходить из одной бактериальной клетки в другую при конъюгации клеток.

Для получения рекомбинантной ДНК плазмиды выделяют из E. coli и удаляют из них часть кольцевой молекулы ДНК (рис. 5.13). Для этого применяют рестриктазы. Комплементарные цепи молекулы ДНК разрезаются в разных местах, в результате чего образуются «липкие» концы — неспаренные участки цепей, способные присоединять комплементарные им полинуклеотиды. На фрагменте ДНК, выбранном для пересадки, тоже создают «липкие» концы, используя ту же рестриктазу, и, следовательно, на фрагменте ДНК образуются «липкие» концы, комплементарные «липким» концам рестриктированной плазмиды. Если теперь смешать фрагмент ДНК (ген) и плазмиду, то они соединятся «липкими» концами (см. рис. 5.13). Затем с помощью фермента лигазы образуют фосфодиэфирную связь между концевыми нуклеотидами обеих молекул, и вновь получают кольцевую молекулу ДНК, но теперь она вместе с плазмидной ДНК содержит ген, выбранный для пересадки. Это и есть рекомбинантная ДНК, т. е. ДНК, содержащая новую комбинацию последовательностей (или генов), такую, какой прежде в природе не было.

Клонирование рекомбинантной ДНК

Описанная выше процедура сложна и позволяет получать лишь очень небольшие количества рекомбинантной ДНК (рекомбинантных плазмид). Клонирование — это способ накопления, амплификации рекомбинантной ДНК.

Если к культуре E. coli добавить рекомбинантные плазмиды, то они при определенных условиях включаются в бактериальные клетки — получаются рекомбинантные бактерии (рис. 5.14). Плазмиды в клетке начинают реплицироваться. При размножении бактерий вновь образующиеся бактериальные клетки тоже содержат эти плазмиды. Из рекомбинантных бактерий можно выделить клонированные рекомбинантные плазмиды, а из них — исследуемый фрагмент ДНК: для этого рекомбинантные плазмиды обрабатывают той же рестриктазой, с помощью которой они были созданы (см. рис. 5.13). Таким путем можно выделить ген или любой другой фрагмент ДНК в количествах, достаточных для исследовательских целей. Отметим, что этот результат вполне подобен результату, получаемому при использовании ПЦР: и в том и в другом случае происходит накопление исследуемой ДНК; по этой причине ПЦР часто называют молекулярным клонированием ДНК.

Применение рекомбинантных клеток для синтеза лекарственных веществ

Микроорганизмы — очень удобный объект для промышленного получения многих природных продуктов: они быстро размножаются (биомасса может удваиваться

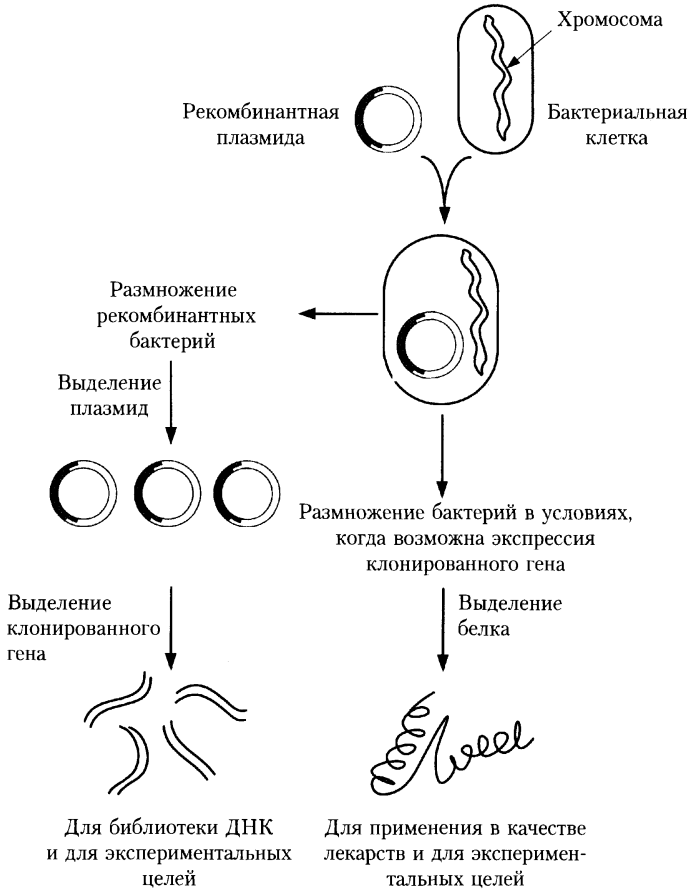


Рис. 5.14. Клонирование ДНК в бактериальных клетках

всего за полчаса), процессы выращивания и обработки биомассы технологичны, поддаются автоматизации. С развитием генной инженерии и техники рекомбинантных микроорганизмов появилась возможность заставить микроорганизмы синтезировать нужные человеку вещества, которые получить другими методами сложно (см. рис. 5.14). Например, интерферон для применения в качестве лекарства прежде получали либо из лейкоцитов крови человека, либо из культуральной жидкости, в которой выращивают клетки человека, синтезирующие этот белок. Такие методы очень дороги и не позволяют получать достаточные количества лекарства.

Если ввести в клетки E. coli плазмиду, содержащую ген интерферона человека, то они начинают продуцировать интерферон — белок, который природные штаммы бактерии не синтезируют. В настоящее время методами генной инженерии созданы также микроорганизмы, синтезирующие человеческие гормоны инсулин (рис. 5.15), соматостатин, соматотропин, фермент урокиназу, некоторые факторы свертывания крови и др. Все эти белки применяются для лечения болезней.

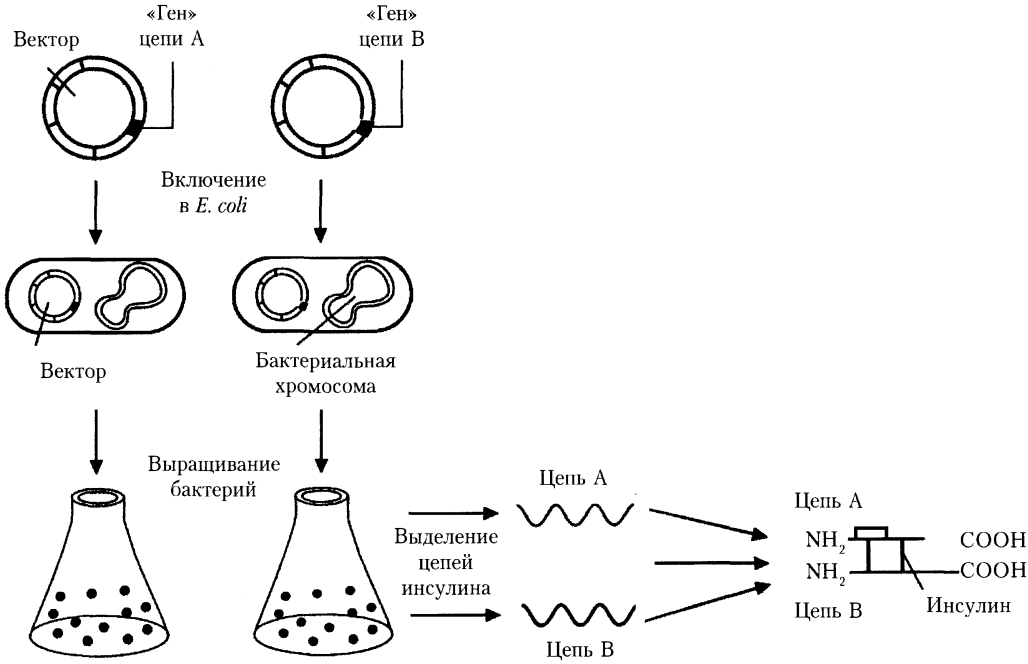


Рис. 5.15. Получение рекомбинантного человеческого инсулина

Трансгенные животные

Плазмиды можно ввести не только в бактериальные клетки, но и в клетки эукариот. При этом плазмиды могут включаться в геном (в хромосомы) клетки и функционировать в качестве матрицы; следовательно, клетки будут синтезировать белки, закодированные в генах плазмиды. Клетка, содержащая рекомбинантную ДНК, называется трансформированной, если речь идет о бактериальной клетке, или трансфектной — в случае эукариотических клеток.

В одном из вариантов подобной процедуры использовали рекомбинантную ДНК, содержащую промотор β-лактальбумина (рис. 5.16). Этот промотор обеспечивает транскрипцию гена β-лактальбумина — одного из белков молока. Но если

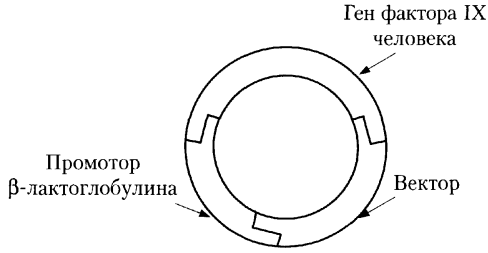


Рис. 5.16. Рекомбинантная плазмида с промотором β-лактальбумина и геном фактора IX человека

его соединить с другим геном (например, с геном фактора IX — белка, участвующего в свертывании крови), то промотор будет включать транскрипцию этого гена и синтез соответствующего белка. Рекомбинантную плазмиду с промотором β-лактальбумина и геном человека вводят в яйцеклетку овцы (путем инъекции), и яйцеклетку имплантируют в матку овцы; некоторые особи из ее потомства будут содержать в своем геноме ген человека (трансгенные животные). Трансгенные животные синтезируют белок, кодируемый геном человека; поскольку промотор β-лактальбумина функционирует только в молочной железе, а в других органах он неактивен, то белок, кодируемый геном человека (например, фактор IX), синтезируется в молочной железе и секретируется с молоком. Синтезированный белок выделяют из молока трансгенных овец.

Часть II

ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ

Глава 6

ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ

Существует непрерывный поток веществ через организм, и прекращение этого потока означает прекращение жизни. Однако из этого не следует, что обмен веществ характерен только для живых существ. Системы, которые обмениваются веществами и энергией со средой, называют термодинамически открытыми системами, в отличие от закрытых систем, обменивающихся со средой только энергией. К открытым системам относится, например, любое озеро или река, поскольку вода в них постоянно обновляется.

Обмен веществ живых организмов включает поступление веществ из среды в организм (в результате питания и дыхания), перемещения и превращения веществ в организме (промежуточный обмен) и выделение конечных продуктов обмена.

Поступление веществ в организм и выделение продуктов метаболизма в совокупности составляют обмен веществами между средой и организмом. Некоторые величины, характеризующие эту сторону обмена веществ у человека, приведены в табл. 6.1.

Таблица 6.1. Суточный обмен человека (округленные величины; взрослый человек с массой тела около 70 кг)

Вещества	Содержание в организме, г	Суточное потребление, г	Суточное выделение , г
O_2	—	850 (~ 600л)	—
CO_2	—	—	1 000 (~ 500л)
Вода	42 000	2 200	2 600
Органические вещества:			
белки	15 000	80	—
липиды	10 000	100	—
углеводы	700	400	—
нуклеиновые кислоты	700	—	—
мочевина	—	—	30
Минеральные соли	3 500	20	20
Всего...	71 900	3 650	3 650

Организм взрослого здорового человека находится в стационарном состоянии в том смысле, что его масса сохраняется постоянной. Это значит, что масса потребляемых веществ равна массе выделяемых за то же время веществ.

Общая масса органических веществ в теле человека составляет около 25 кг (отметим, что больше половины из них приходится на белки). Ежедневное потребление органических веществ с пищей равно примерно 0,6 кг; следовательно, человек потребляет такую же массу органических веществ, какая имеется в его теле, за 40–50 дней.

Между содержанием разных веществ в организме и величиной их суточного потребления нет соответствия. Например, для белков отношение содержание/потребление равно примерно 180, а для углеводов оно менее 2, т. е. различие по этому коэффициенту между белками и углеводами почти стократное. Это связано с тем, что подавляющая часть пищевых углеводов используется именно как источник энергии и распадается до конечных продуктов обмена, минуя стадию включения в структурно-функциональные компоненты клетки. То же в значительной мере относится и к жирам.

Основную массу элементов, из которых построены пищевые вещества, а также и тело человека, составляют углерод, водород, кислород и азот. Эти же элементы входят в состав главных конечных продуктов обмена веществ — CO_2, H_2O и мочевины $H_2N—CO—NH_2$. В форме H_2O выводится водород органических веществ, причем организм выделяет воды больше, чем потребляет (см. табл. 6.1): примерно 400 г воды образуется за сутки в организме из водорода органических веществ и кислорода вдыхаемого воздуха (метаболическая вода). В форме CO_2 выводятся углерод и кислород органических веществ, а в форме мочевины — азот.

Человек выделяет с мочой, калом, потом, выдыхаемым воздухом много и других веществ, но в незначительных количествах, так что их вклад в общий баланс обмена веществами между организмом и средой невелик. Однако надо отметить, что физиологическое значение выделения таких веществ может быть существенным. Например, нарушение выделения продуктов распада гема или продуктов метаболизма чужеродных соединений, в том числе лекарств, может быть причиной тяжелых нарушений обмена веществ и функций организма.

Наиболее сложную часть обмена веществ составляет промежуточный обмен. Он включает следующие молекулярные процессы:

1. Взаимодействие молекул без изменения их ковалентной структуры: образование олигомерных белков из протомеров; самосборка клеточных органелл, включая мембраны; образование двойной спирали ДНК; присоединение аминоацил-тРНК к мРНК и рибосомам; присоединение аллостерических эффекторов к регуляторным центрам ферментов; присоединение кислорода к гемоглобину и др. Все эти взаимодействия представляют собой физико-химические процессы. Наиболее характерной чертой молекулярных физико-химических процессов в живых организмах является соединение молекул за счет комплементарных поверхностей центров связывания (узнавание).
2. Взаимодействия молекул, завершающиеся изменением их ковалентной структуры, т. е. собственно химические процессы. Именно совокупность

этих процессов обычно называют метаболизмом (*metabole* — изменение, превращение). Как мы уже знаем, все химические реакции в организме катализируются ферментами. В ходе ферментативной реакции, конечно, имеют место и физико-химические процессы, например образование нековалентных связей между ферментом и субстратом, изменение конформации и др.

3. Перенос веществ. Существуют разные механизмы и маршруты транспорта веществ в организме, а именно:
   а) транспорт с циркулирующей жидкостью по кровеносным и лимфатическим сосудам. Это механический процесс. Однако многие вещества транспортируются в форме соединений со специальными транспортными белками, подобно переносу кислорода в соединении с гемоглобином. В крови имеются транспортные белки для переноса многих соединений — гормонов, витаминов, липидов, ионов металлов и др. Образование и распад комплекса транспортного белка с переносимым веществом — это обычно физико-химические процессы, не связанные с изменением ковалентной структуры веществ;
   б) трансмембранный перенос, который может быть межклеточным и внутриклеточным. Основные формы межклеточного переноса следующие:
      – из кишечника в кровь через мембраны клеток кишечного эпителия и стенок капилляров;
      – из крови и межклеточного пространства в клетки разных органов через мембраны этих клеток;
      – из клеток в межклеточное вещество или в кровь через те же мембраны;
      – в почечных клубочках — из крови в первичную мочу, а в почечных канальцах — из первичной мочи в кровь через мембраны соответствующих клеток.

Примером внутриклеточного трансмембранного переноса является транспорт мРНК из ядра в цитоплазму. Ряд других примеров трансмембранного переноса подробно рассмотрен в гл. 8.

БИОХИМИЯ ПИТАНИЯ

Пища человека содержит множество химических соединений, как органических, так и минеральных (табл. 6.2). Главную долю органических веществ пищи составляют углеводы, жиры, белки — основные пищевые вещества. Часть органических веществ — это минорные пищевые вещества, требующиеся в малых количествах; к ним принадлежат, в частности, витамины.

Основные пищевые вещества большей частью представляют собой полимеры. В желудочно-кишечном тракте они гидролизуются при участии ферментов класса гидролаз на мономеры: в этом заключается суть пищеварения. В процессе пищеварения происходит уменьшение разнообразия веществ: из бесчисленного количества белков разного строения, полисахаридов, жиров получается 20 разных аминокислот, небольшое число моносахаридов (главным образом глюкоза, фруктоза, галактоза), глицерин, жирные кислоты (главным образом олеиновая, стеариновая,

Таблица 6.2. Средняя потребность взрослого человека в пищевых веществах

Пищевые вещества	Суточная потребность	Пищевые вещества	Суточная потребность
Углеводы	400–500 г	Биотин	0,15–0,3 мг
Жиры	80–100 г	D (холекальциферол)	0,04 мг
Полиненасыщенные жирные кислоты	3–6 г	P(рутин)	25 мг
Белки	80–100 г	B_9 (фолиевая кислота)	0,1–0,5 мг
Аминокислоты:		E (токоферол)	2–6 мг
триптофан	1 г	K (2-метил-3-фитил-1,4-нафтохинон)	2 мг
глутаминовая кислота	16 г	Минеральные вещества:	
прочие (каждая из них)	От 2 до 6 г	NaCl	~ 10 г
Витамины:		Кальций	0,8–1 г
C (аскорбиновая кислота)	70–100 мг	Фосфор	1–1,5 г
B_1 (тиамин)	1,5–2,0 мг	Калий	2,5–5 г
B_2 (рибофлавин)	2,0–2,5 мг	Магний	0,3–0,5 г
PP (никотиновая кислота)	15–25 мг	Железо	15 мг
B_3 (пантотеновая кислота)	5–10 мг	Цинк	10–15 мг
A (ретинол)	1,5–2,5 мг	Марганец	5–10 мг
B_6 (пиридоксин)	2–3 мг	Медь	2 мг
B_{12} (кобаламин)	0,005–0,080 мг	Молибден	0,5 мг
		Селен	0,5 мг
		Йод	0,1–0,2 мг

пальмитиновая). Мономеры как низкомолекулярные вещества значительно легче проникают через клеточные мембраны кишечного эпителия (полимеры практически не всасываются). С кровью мономеры транспортируются во все органы и ткани и используются клетками.

Пищевые вещества могут быть заменимыми и незаменимыми. Заменимые — это те, которые могут образоваться в организме из других веществ. Например, клетки человека могут синтезировать любой необходимый им моносахарид из аминокислот, жиры могут образоваться из углеводов, некоторые аминокислоты образуются из других аминокислот или из углеводов.

Незаменимые пищевые вещества не синтезируются из других веществ и поэтому должны содержаться в пище в готовом виде. К незаменимым относятся все минеральные компоненты, а также витамины, некоторые аминокислоты (гл. 11) и некоторые жирные кислоты (гл. 10).

Витамины

Витамины — важнейшая группа незаменимых пищевых факторов. Концентрация витаминов в тканях и суточная потребность в них невелики, но при недостаточном поступлении витаминов в организм наступают характерные и опасные патологические изменения. Витамины были открыты при изучении таких заболеваний, как бери-бери, цинга и другие, о которых теперь известно, что они возникают вследствие недостаточности витаминов. По выражению академика В. А. Энгельгардта, «витамины обнаружили себя не своим присутствием в организме, а своим отсутствием».

Недостаточность витамина B_{12}

Разберем такой пример. Больной В., 50 лет, поступил в клинику с жалобами на потерю аппетита, потерю веса, слабость, боли в области желудка. При лабораторном исследовании обнаружены следующие отклонения от нормы:

- эритроцитов в крови $1{,}7 \cdot 10^{12}$/л (норма $5 \cdot 10^{12}$/л);
- желудочная секреция 0,4 л за сутки (норма 2,5 л за сутки);
- pH желудочного сока 7,0 (норма 1,5).

Эритроциты больного имели необычную форму и большие размеры: диаметр 12–14 мкм (норма 7–8 мкм). Поставлен диагноз — болезнь Аддисона—Бирмера. Болезнь Аддисона—Бирмера (злокачественная анемия, пернициозная анемия) описана более 100 лет назад и долго считалась неизлечимой. Первые случаи выздоровления отмечены в 1926 г., когда для лечения применили сырую печень. Сразу же начались поиски вещества, содержащегося в печени и оказывающего лечебное действие. В 1948 г. это вещество — витамин B_{12} — было выделено. Его содержание в печени оказалось очень небольшим, около 1 мкг в 1 г печени, т. е. 1/1 000 000 часть массы печени. Семь лет спустя было выяснено строение витамина B_{12} (кобаламина) — рис. 6.1.

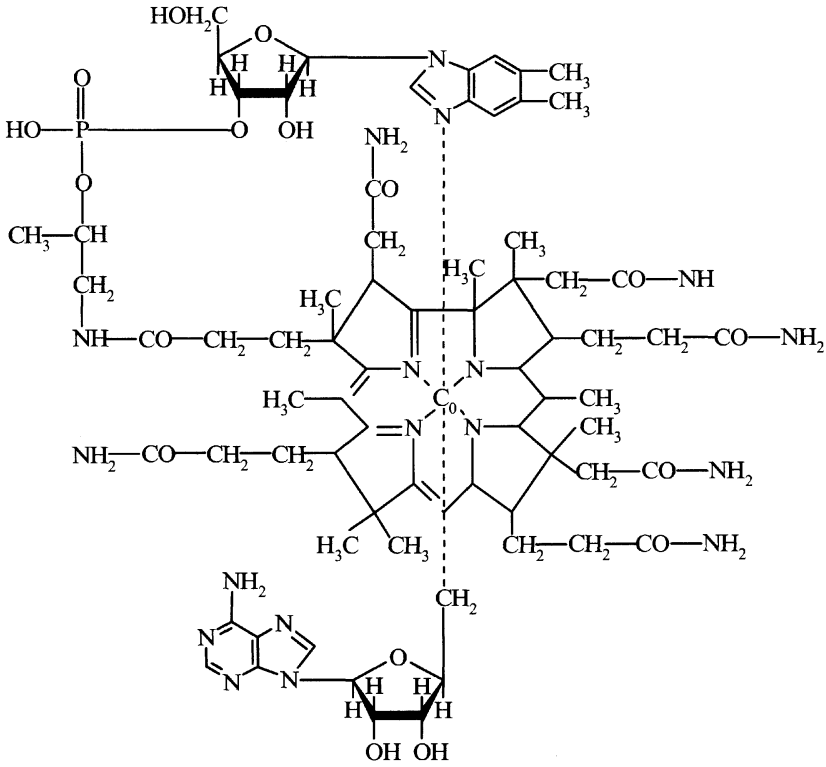


Рис. 6.1. Витамин B_{12} (аденозилкобаламин)

Введение витамина B_{12} быстро излечивает злокачественную анемию. Однако при этом выяснилось, что имеет значение способ введения: внутримышечные инъекции излечивают анемию, а прием витамина через рот не излечивает. Если же витамин B_{12} принимать перорально вместе с желудочным соком, тоже наступает излечение. Отсюда следует, что в желудочном соке содержится какое-то вещество, необходимое для усвоения витамина B_{12} при его введении через рот. Это вещество (внутренний фактор, фактор Касла) сейчас выделено: им оказался гликопротеин, который у здоровых людей синтезируется в клетках желудка и секретируется в желудочный сок. Внутренний фактор избирательно связывает витамин B_{12} (одна молекула витамина на одну молекулу белка); затем, уже в кишечнике, этот комплекс присоединяется к специфическим рецепторам мембраны энтероцитов, и происходит перенос витамина через их мембрану, т. е. всасывание.

Злокачественная анемия обычно развивается как осложнение гастрита, причем таких его форм, при которых резко снижается образование желудочного сока. Отсюда такие симптомы, как боли в области желудка, отсутствие аппетита. В желудке при этом нет внутреннего фактора и, следовательно, невозможно всасывание витамина B_{12}: витамин, содержащийся в пище, выводится с калом. Развитие анемии — это уже следствие недостатка витамина B_{12} в тканях.

Витамин B_{12} выполняет коферментные функции. В организме человека есть две коферментные формы витамина B_{12} (кобаламина): метилкобаламин — в цитоплазме и дезоксиаденозилкобаламин — в митохондриях. В метилкобаламине вместо аденозильной группы, связанной с атомом кобальта (см. рис. 6.1), имеется метильная группа. В развитии анемии основная роль принадлежит дефициту метилкобаламина, который служит коферментом в реакциях трансметилирования (подробнее об этих реакциях см. в гл. 11). Реакции траснметилирования происходят, в частности, при синтезе нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Поэтому при недостатке метилкобаламина синтез нуклеиновых кислот нарушается. Это проявляется прежде всего в тканях с интенсивной клеточной пролиферацией. К их числу относится и кроветворная ткань. Деление и созревание клеток эритроцитарного ряда нарушаются, размеры клеток превышают нормальные, значительная часть клеток — предшественников эритроцитов разрушается еще в костном мозге. В циркулирующей крови количество эритроцитов резко уменьшено, размеры их увеличены. При отсутствии лечения наступают изменения и в других тканях, и болезнь заканчивается гибелью больного. Введение 100–200 мкг витамина B_{12} ежедневно в течение примерно двух недель излечивает болезнь.

Другая коферментная форма витамина B_{12} — дезоксиаденозилкобаламин, участвует в метаболизме метилмалоновой кислоты, которая получается в организме из жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов, а также из аминокислот с разветвленной углеродной цепью (подробнее об этом см. в гл. 10). При дефиците витамина B_{12} метилмалоновая кислота накапливается в организме и в больших количествах выводится с мочой; ее определение в моче используется для диагностики злокачественной анемии.

Метилмалоновая кислота токсична для нервной ткани и при отсутствии лечения вызывает дегенерацию заднебоковых столбов спинного мозга.

Единственным источником витамина B_{12} в природе являются микроорганизмы, синтезирующие его из других веществ; через почву он попадает в растения, а

с растениями — в организмы животных. Для человека основным источником витамина B_{12} служит животная пища. Наиболее богата витамином печень — около 100 мкг на 100 г печени; в говяжьем мясе содержится около 5 мкг витамина на 100 г мяса. Суточная потребность человека в этом витамине составляет 2,5–5 мкг.

Общая характеристика витаминов

Известно около полутора десятков витаминов (см. табл. 6.2). Исходя из растворимости, витамины делят на две группы: жирорастворимые — витамины A, D, E, K и водорастворимые — все остальные. Водорастворимые витамины включают аскорбиновую кислоту (витамин C) и витамины группы B:

- Тиамин (витамин B_1);
- Рибофлавин (витамин B_2);
- Никотиновая кислота (ниацин, витамин PP);
- Биотин;
- Пантотеновая кислота (витамин B_3);
- Фолиевая кислота;
- Кобаламин (витамин B_{12});
- Пиридоксин (витамин B_6).

Большинство витаминов входит в состав коферментов, и именно по этой причине они необходимы организму. Витамин A служит кофактором белка неферментной природы — родопсина, или зрительного пурпура; этот белок сетчатки глаза участвует в восприятии света. Витамин D (точнее, его производное — кальцитриол) регулирует обмен кальция; по механизму действия он сходен с гормонами — регуляторами обмена и функций организма. Витамин E (токоферол) выполняет роль антиоксиданта. Подробнее функции каждого из витаминов рассматриваются в других разделах.

Гиповитаминозы

Состояния, при которых снижена концентрация витаминов в тканях организма, называют гиповитаминозами. Они возникают вследствие недостатка витаминов в пище или нарушения их всасывания в желудочно-кишечном тракте.

Гиповитаминозы клинически могут проявляться весьма характерным образом: при недостатке витамина B_{12} развивается злокачественная анемия, витамина D — рахит, витамина C — цинга, витамина B_1 — бери-бери и т. д. Лечение гиповитаминоза сводится к введению витаминов (в составе пищи или лекарственных препаратов). При отсутствии лечения углубляющийся гиповитаминоз неизбежно приводит к летальному исходу.

Наиболее часто возникают легкие формы гиповитаминозов, не проявляющиеся как ясно выраженная болезнь. Их причиной обычно бывает общее нарушение питания, при этом возникает нехватка сразу многих витаминов. Такого рода гиповитаминозы нередки у городских жителей в конце зимы, вследствие недостаточного потребления овощей и сниженного количества витаминов в долго хранившихся продуктах.

Многие витамины синтезируются микроорганизмами, населяющими кишечник человека, и за счет этого источника удовлетворяется часть потребности организма человека в витаминах. При лечении антибиотиками, сульфаниламидами и другими лекарствами, угнетающими кишечную флору, может возникать гиповитаминоз. Поэтому при таком лечении одновременно назначают и витамины.

Бывают и наследственные формы гиповитаминозов. Как уже отмечено, большинство витаминов входит в состав коферментов. Синтез коферментов осуществляется при участии ферментов, как и все химические превращения в организме. Если имеется наследственный дефект фермента, участвующего в превращении какого-либо витамина в кофермент, то возникает недостаточность этого кофермента. Она проявляется как недостаточность соответствующего витамина (гиповитаминоз), хотя концентрация витамина в тканях при этом может быть и высокой.

Гипервитаминозы

Избыточное потребление витаминов приводит к нарушениям обмена и функций организма, которые отчасти связаны со специфической ролью витамина в обмене веществ, отчасти носят характер неспецифического отравления. Гипервитаминозы возникают сравнительно редко, поскольку существуют механизмы устранения избытка витаминов из тканей, и лишь потребление больших количеств витамина может оказаться опасным. Более других витаминов токсичны жирорастворимые витамины, особенно A и D. Известен, например, гипервитаминоз у новичков в Арктике, которые по неведению употребляют в пищу печень белого медведя (местные жители ее не едят): после небольшой порции возникают головная боль, рвота, расстройство зрения и даже может наступить смерть. Это связано с высоким содержанием витамина A в печени белого медведя: несколько граммов печени могут удовлетворить годовую потребность человека в этом витамине.

Происхождение витаминов

В растениях синтезируются все органические вещества, составляющие их ткани, в том числе витамины (за исключением витамина B_{12}). Многие микроорганизмы также не нуждаются во внешних источниках этих веществ. В организмы животных витамины поступают главным образом из растений, у травоядных — непосредственно, у хищников — в результате питания травоядными. Витамин B_{12} синтезируется только микроорганизмами. Особенно активно образуют витамин B_{12} микроорганизмы, населяющие рубец жвачных животных и размножающиеся также и в навозе: в сточных водах скотных дворов концентрация витамина B_{12} может быть в 1000 раз больше, чем в печени животных.

При эволюции гетеротрофных организмов, пища которых содержала готовые витамины, отпала необходимость синтезировать собственные ферменты для синтеза многих из этих веществ, и соответствующие гены были утрачены. При этом достигаются упрощение метаболической системы и экономия ресурсов клетки. Одновременно возникает зависимость организма от внешних источников этих веществ, которые становятся незаменимыми пищевыми факторами.

Набор незаменимых пищевых факторов для разных видов животных различен. Например, аскорбиновая кислота (витамин С) является витамином для человека, обезьян, морской свинки, а собаки, крысы и многие другие животные не нуждаются в ней: аскорбиновая кислота синтезируется в их организме из глюкозы. Синтез витамина РР происходит почти у всех организмов, начиная от растений и до человека; его предшественником служит триптофан. Однако у человека скорость синтеза недостаточна, чтобы удовлетворить полностью потребность организма в этом витамине. У кошек витамин РР совсем не синтезируется.

Минеральные вещества

Ряд элементов, содержащихся в пище главным образом в форме минеральных солей или ионов, также относится к незаменимым пищевым веществам. По массе основную часть минеральных веществ пищи составляют хлориды, фосфаты и карбонаты натрия, калия, кальция и магния. Кроме того, абсолютно необходимы микроэлементы, называемые так потому, что они требуются в малых количествах: это железо, цинк, медь, марганец, молибден, йод, селен (см. табл. 6.2). Кобальт поступает в организм человека не в форме минеральных солей, а в составе готового витамина B_{12}.

Микроэлементы поступают в организм главным образом с водой и растительной пищей. Недостаточность микроэлементов у человека возникает сравнительно редко. Исключение составляют недостаточность железа, проявляющаяся в форме железодефицитной анемии (см. гл. 21), и недостаточность йода в местностях, где почва и вода содержат мало этого элемента (см. гл. 18).

МЕТАБОЛИЗМ

Напомним, что вещества в организме последовательно превращаются сначала в один метаболит, из которого образуется другой, и т. д. Такие последовательности превращений называют метаболическими путями. Метаболизм — это совокупность всех метаболических путей; она может быть представлена в форме карты метаболизма.

Катаболизм и анаболизм

В метаболизме выделяют два основных направления превращений веществ: *катаболизм* и *анаболизм* (рис. 6.2). При катаболизме органические вещества распадаются в конечном счете до диоксида углерода и воды. Процесс катаболизма экзергонический. У взрослого человека при распаде веществ до конечных продуктов обмена освобождается энергия в количестве 8000–12 000 кДж (2000–3000 ккал) в сутки. Эта энергия используется клетками организма для совершения разного рода работы, а также для поддержания температуры тела на постоянном уровне.

Анаболизм — это превращение более простых веществ в более сложные, служащие структурно-функциональными компонентами клетки, такие, как коферменты, гормоны, белки, нуклеиновые кислоты и др. Многие реакции анаболизма относятся к числу эндергонических; источником энергии для них служит процесс

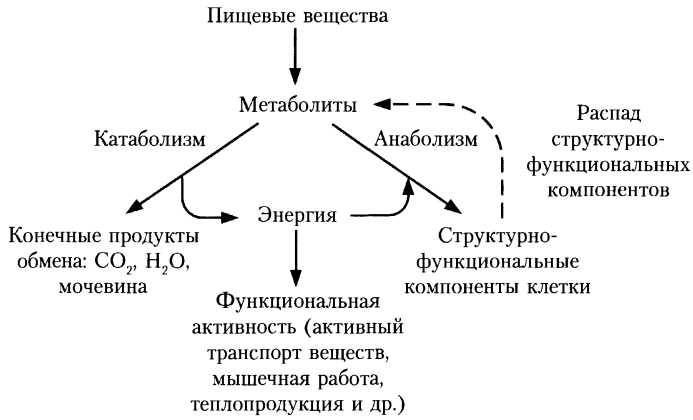


Рис. 6.2. Схема катаболизма и анаболизма

катаболизма. Кроме того, энергия катаболизма используется для обеспечения функциональной активности клетки (двигательной, секреторной и др.).

Промежуточным звеном в превращениях энергии при катаболизме и анаболизме служит АТФ. Энергия окисления пищевых веществ обеспечивает синтез АТФ из АДФ и H_3PO_4 , а энергия гидролиза АТФ, в свою очередь, используется клеткой для совершения разного рода работы. Реакции фосфорилирования АДФ и последующего использования АТФ в качестве источника энергии образуют циклический процесс (цикл АДФ–АТФ, рис. 6.3).

Рис. 6.3. Схема энергетического обмена

В клетках организма происходит непрерывный распад ее структурно-функциональных компонентов, и за счет этого образуются аминокислоты, моносахариды, жирные кислоты, нуклеотиды и другие вещества. Они смешиваются с такими

же веществами, образующимися из пищи, составляя общий фонд метаболитов организма. Этот фонд расходуется по двум направлениям: анаболическому (возобновление распавшихся структурно-функциональных компонентов) и катаболическому. В растущем организме скорость образования структурно-функциональных компонентов превышает скорость распада, и общая их масса увеличивается. У взрослого человека скорости этих процессов одинаковы.

Самовоспроизведение организмов

Уникальной особенностью организмов как открытых систем является их способность к самовоспроизведению, т. е. к созданию копий самих себя.

Реакцию синтеза ДНК с участием ДНК-полимеразы (например в ПЦР) часто называют самовоспроизведением ДНК, а молекулу ДНК — единственной самовоспроизводящейся молекулой. В действительности самовоспроизведение — свойство гораздо более сложных систем. В самом деле, в репликации ДНК обязательно участие ДНК-полимеразы, причем этот фермент не только катализирует образование 3′,5′-фосфодиэфирной связи, но и определяет, наряду с ДНК-матрицей, правильный выбор очередного нуклеотида. Иначе говоря, ДНК не сама воспроизводится, а синтезируется аппаратом, содержащим ДНК-матрицу и белок ДНК-полимеразу. И эта двухкомпонетная система не самовоспроизводится, поскольку количество ДНК-полимеразы не увеличивается (наоборот — уменьшается в результате денатурации; соответственно убывает скорость репликации). Для того, чтобы эта система самовоспроизводилась, нужен механизм синтеза ДНК-полимеразы. А для этого требуется наличие гена ДНК-полимеразы в ДНК-матрице, и еще множества генов, кодирующих белки, необходимые для экспрессии (транскрипции и трансляции) всех этих генов. Колоссальное усложнение системы! Однако и это далеко не все. Многие вещества, необходимые для самовоспроизведения, нестабильны, и в пище практически отсутствуют, например нуклеозидтрифосфаты), следовательно должны быть механизмы их образования в самой системе, т. е. нужен метаболизм. А это значит, что требуется еще много генов и соответствующих белков.

На рис. 6.4 представлена схема организма как открытой самовоспроизводящейся системы. В системе можно выделить несколько модулей (подсистем), обязательных для всех организмов, в том числе самых простых — бактерий.

1. Модуль самовоспроизведения, или зародышевый путь; главные процессы этого пути — репликация ДНК и деление клетки.
2. Модуль передачи информации ДНК → белки. Главными процессами этого пути являются транскрипция и трансляция, в результате образуется набор белков, обеспечивающих метаболизм и другие функции клетки, включая и функции модуля самовоспроизведения. Это справедливо как для одноклеточных организмов, так и для клеток многоклеточных организмов. Однако у многоклеточных в отдельной клетке во время митотического цикла действует и модуль самовоспроизведения. Таким образом, отдельные клетки многоклеточных организмов являются самовоспроизводящимися системами, а целый многоклеточный организм — самовоспроизводящаяся система более высокого уровня. Популяция, вид, биогеоценоз, биосфера — самовоспроизводящиеся системы возрастающей сложности.

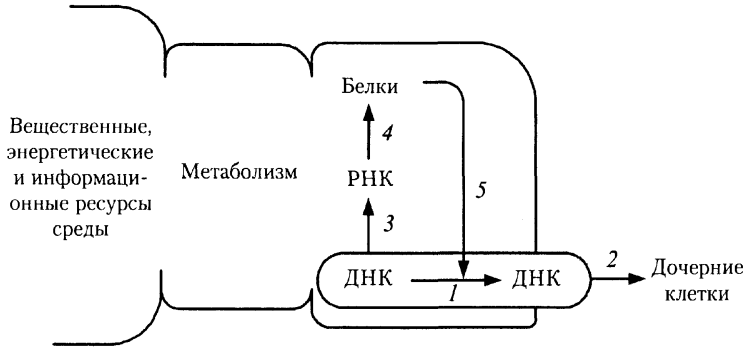


Рис. 6.4. Самовоспроизводящаяся открытая система:

1, 2 — зародышевый путь; *3, 4* — модуль ДНК → белки; *3, 4, 5* — петля взаимозависимости ДНК и белков

3. Модуль метаболизма обеспечивает синтез веществ, необходимых для всех других модулей, в том числе синтез нуклеозидтрифосфатов.

В число ресурсов среды, потребляемых гетеротрофными организмами, входят и вещества, образуемые другими живыми организмами. Автотрофные организмы (это прежде всего растения) не нуждаются в других живых системах.

Назовем еще один модуль, не указанный на схеме, но обязательный для самовоспроизведения. Это модуль защиты от повреждающих агентов — механизмы обезвреживания токсических веществ (см. гл. 19) и механизмы репарации повреждений — от репарации повреждений ДНК и «ремонта» пространственной структуры белков (шапероны) до заживления ран.

Группа модулей, начиная с третьего, составляет фенотипический путь информации.

Важнейший элемент клетки как самовоспроизводящейся системы – петля взаимозависимости между ДНК и белками: синтез белков невозможен без ДНК, а синтез ДНК невозможен без белков (реакции 1, 3, 4, 5 на рис. 6.4).

Наиболее простыми самовоспроизводящимися системами на Земле являются бактерии: их геном часто содержит около 5000 генов (напомним, что в геноме человека 50 000 генов). Надо полагать, что жизнь на Земле начиналась с более простых систем, но они пока остаются неизвестными.

Таким образом, в результате обмена веществ потребляемые с пищей вещества превращаются в собственные вещества и структуры клетки и, кроме того, организм обеспечивается энергией для совершения внешней работы. Самовоспроизведение, т. е. создание копий самих себя — фундаментальная особенность обмена веществ в живых организмах, отличающая их от обмена веществ в неживой природе.

Регуляция обмена веществ

Обычно в метаболическом пути есть реакция, протекающая значительно медленнее, чем все другие реакции данного пути, — это лимитирующая стадия. Лимитирующая стадия определяет общую скорость превращения исходного вещества в конечный

продукт метаболической цепи. Часто фермент, катализирующий лимитирующую реакцию, является регуляторным ферментом: его активность может изменяться при действии клеточных ингибиторов и активаторов, или может изменяться количество фермента в результате индукции или репрессии его синтеза.

В разветвленных метаболических системах регуляторные ферменты обычно катализируют первую реакцию в месте разветвления, например реакции b → c или b → i на рис. 6.5. Этим обеспечивается возможность независимой регуляции каждой ветви метаболической системы.

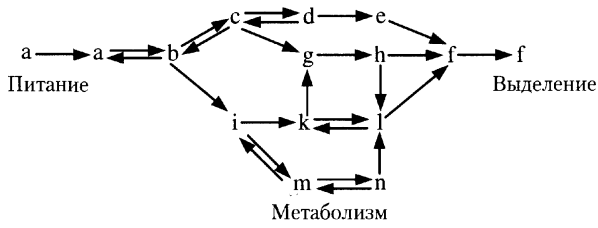


Рис. 6.5. Схема обмена веществ

Многие реакции метаболизма обратимы; направление их протекания в живой клетке определяется расходованием продукта в последующей реакции или удалением продукта из сферы реакции, например, путем экскреции (рис. 6.5). При изменениях состояния организма (прием пищи, переход от покоя к двигательной активности и др.) концентрации метаболитов в организме изменяются, т. е. устанавливается новое стационарное состояние.

При постоянных условиях среды многие характеристики организма сохраняются неизменными. В частности, это относится к концентрации ряда метаболитов в клетках и внеклеточных жидкостях. Например, измеряя у одного и того же человека концентрацию глюкозы в крови в одинаковых условиях (после ночного сна, до завтрака), мы обнаружим, что она день за днем, месяц за месяцем остается практически постоянной (или изменяется в узких пределах). Средние значения этих концентраций (с указанием пределов колебаний) служат одной из характеристик нормы. При болезнях стационарные концентрации метаболитов изменяются, причем эти изменения часто бывают специфичными для той или иной болезни. На этом основаны многие биохимические методы лабораторной диагностики болезней.

Такое постоянство многих свойств организма называют гомеостазом. Гомеостаз поддерживается действием специальных регуляторных механизмов.

Однако еще более, чем гомеостаз, характерны для организма изменения ряда параметров, происходящие в определенном направлении и имеющие определенную величину.

1. *Онтогенез.* В процессе онтогенеза происходит включение действия одних генов и выключение действия других генов в определенной последовательности, изменения метаболических процессов, белкового состава, морфологии и функционального состояния органов. Закономерный, одинаковый

для всех особей вида ход онтогенеза свидетельствует о наличии механизмов управления этим процессом.

2. *Циклические изменения (биоритмы).* К числу изменений такого рода относится, например, месячный половой цикл у женщин. Известны циклические колебания активности ферментов, концентраций гормонов, ряда метаболитов (например, суточные и сезонные изменения концентрации холестерина в крови).
3. *Изменения физиологической активности.* Наиболее обычные формы — изменения двигательной активности, функционального состояния нервной системы, органов чувств, органов пищеварения. В их основе лежат регулируемые изменения биохимических процессов.
4. *Адаптивные изменения организма,* вызванные внешними факторами, например: увеличение теплопродукции на холоде, увеличение концентрации гемоглобина в крови при низком содержании кислорода в воздухе, увеличение выделения солей аммония, если пища имеет кислый зольный остаток.
5. *Реакция на повреждающие агенты* внешней среды: индукция синтеза антител антигенами, индукция синтеза микросомальных гидроксилаз чужеродными веществами, образование тромба при повреждении кровеносных сосудов, воспалительная реакция, заживление ран.

ИЕРАРХИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ СИСТЕМ

Внутриклеточные механизмы регуляции

В механизмах регуляции, обеспечивающих гомеостаз, а также время, направление и величину изменений, можно выделить три уровня.

Первый уровень — внутриклеточные механизмы регуляции. Сигналами для изменения состояния клетки служат вещества, образующиеся в самой клетке или поступающие в нее извне. Эти вещества могут действовать тремя способами:

а) изменять активность ферментов путем ингибирования или активации;
б) изменять количество ферментов и других белков путем индукции или репрессии их синтеза или путем изменения скорости их распада;
в) изменять скорость трансмембранного переноса вещества, взаимодействуя с мембраной (см. гл. 7).

Многие примеры внутриклеточных механизмов регуляции описаны в предшествующих разделах.

Молекулы межклеточной коммуникации

Внутриклеточные механизмы регуляции действуют как у одноклеточных организмов, так и в клетках многоклеточных организмов. Но у сложно устроенных многоклеточных организмов с дифференцированными клетками (и органами), выполняющими специальные функции, возникает необходимость межклеточной (и межорганной) координации обмена веществ и функций. Например, интенсивная и продолжительная работа мышц требует включения процессов мобилизации гликогена в клетках печени или мобилизации жиров в жировых клетках. Межклеточная

коммуникация (второй уровень регуляции) обеспечивается передачей сигналов с помощью специальных сигнальных молекул — эндокринных гормонов, паракринных гормонов и нейромедиаторов нервных синапсов.

Эндокринная система представлена железами, синтезирующими гормоны — химические сигналы (рис. 6.6). Гормоны освобождаются в кровь в ответ на специфический стимул. Этим стимулом может быть нервный импульс или изменение концентрации определенного вещества в крови, протекающей через эндокринную железу (например, снижение концентрации глюкозы). Гормон транспортируется с кровью и соединяется с определенными клетками (клетками-мишенями). Избирательность взаимодействия с клетками зависит от наличия рецепторов данного гормона на поверхности или внутри клетки, содержащих комплементарный центр связывания гормона. Присоединение гормона к рецептору включает внутриклеточные механизмы регуляции — изменения активности или количества ферментов и др. В результате изменения обмена веществ устраняется стимул, вызвавший освобождение гормона (например, повышается концентрация глюкозы в крови). Выполнивший свою функцию гормон разрушается специальными ферментами.

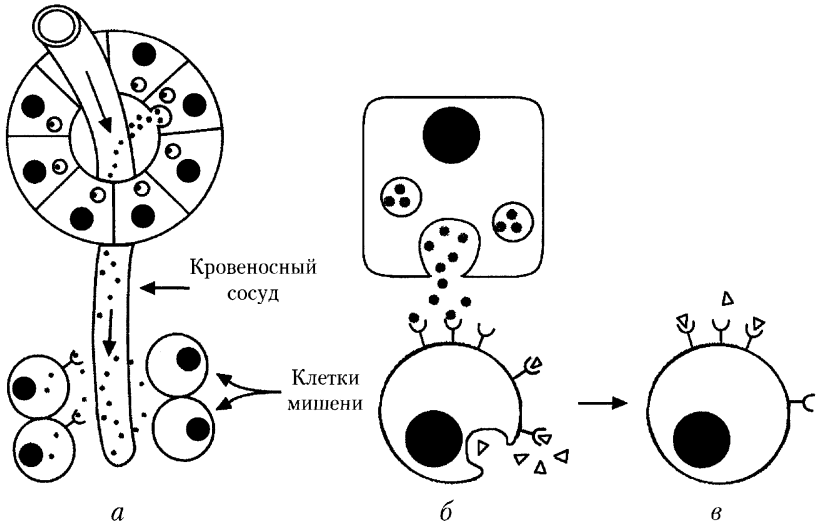


Рис. 6.6. Эндокринный (*а*), паракринный (*б*) и аутокринный (*в*) механизмы межклеточной коммуникации

При паракринном и аутокринном механизмах сигнальные молекулы (паракринные гормоны, гормоны местного действия) синтезируются не в специализированных железах, а практически во всех дифференцированных клетках, но неодинаковые в клетках разных типов. Этими молекулами могут быть цитокины (белки, обычно небольшого размера), эйкозаноиды (производные арахидоновой кислоты), гистамин, гормоны желудочно-кишечного тракта и др. Эти молекулы секретируются в межклеточное пространство и взаимодействуют с рецепторами близлежащих клеток другого фенотипа (паракринная регуляция) или

того же фенотипа (аутокринная регуляция). При аутокринной регуляции мишенью может быть та же клетка, из которой секретировался гормон. В крови цитокины обычно не обнаруживаются (подробнее о гормонах см. гл. 13).

Роль нервной системы

Третий уровень регуляции — нервная система с рецепторами сигналов как внешней среды, так и внутренней. В мозг поступают сигналы (информация) от органов чувств, а также от внутренних органов. На основе этой информации в мозге формируются управляющие импульсы, трансформируются в волну деполяризации нервного волокна (нервный импульс), который в синапсе с клеткой-эффектором вызывает освобождение медиатора — химического сигнала. Медиатор через внутриклеточные механизмы регуляции вызывает изменения обмена веществ и функционального состояния клетки. Клетками-эффекторами могут быть и некоторые эндокринные клетки, отвечающие на нервный импульс синтезом и выделением гормона.

Все три уровня регуляции теснейшим образом взаимосвязаны и функционируют как единая система.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Обмен веществ можно изучать на целом живом организме (эксперименты *in vivo*) или используя изолированные части организма — органы, клетки, субклеточные структуры (эксперименты *in vitro*, т. е. вне организма; буквально — «в стекле», в пробирке).

Исследования на целом организме

Классический пример исследований на целом организме, проведенных еще в начале прошлого века, составляют эксперименты Кноопа. Он изучал способ распада жирных кислот в организме. Для этого Кнооп скармливал собакам различные жирные кислоты с четным (I) и нечетным (II) числом атомов углерода, в которых один атом водорода в метильной группе был замещен на фенильный радикал C_6H_5:

I

$C_6H_5—CH_2—CH_2—CH_2—COOH$

фенилмасляная кислота

$C_6H_5—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—COOH$

фенилкапроновая кислота

II

$C_6H_5—CH_2—CH_2—COOH$

фенилпропионовая кислота

$C_6H_5—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—COOH$

фенилвалериановая кислота

В первом случае с мочой собак всегда выводилась фенилуксусная кислота $C_6H_5—CH_2—COOH$, а во втором — бензойная кислота $C_6H_5—COOH$. На основании этих результатов Кнооп сделал вывод, что распад жирных кислот в организме происходит путем последовательного отщепления двуглеродных фрагментов, начиная с карбоксильного конца:

$$CH_3—CH_2 \mid CH_2—CH_2 \mid CH_2—CH_2 \mid CH_2—CH_2 \mid CH_2—COOH$$

Позднее этот вывод был подтвержден другими методами (см. гл. 10).

По существу, в этих исследованиях Кноопп применил метод мечения молекул: он использовал в качестве метки фенильный радикал, не подвергающийся изменениям в организме. Начиная примерно с 40-х годов XX в. получило распространение применение веществ, молекулы которых содержат радиоактивные или тяжелые изотопы элементов. Например, скармливая экспериментальным животным разные соединения, содержащие радиоактивный углерод (^{14}C), установили, что все атомы углерода в молекуле холестерина происходят из углеродных атомов ацетата (рис. 6.7) — подробнее о синтезе холестерина см. гл. 10. С помощью изотопной метки изучают также время полужизни белков и других соединений, т. е. скорость обновления тканей.

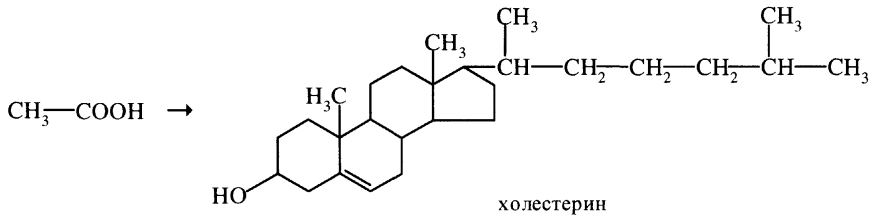


Рис. 6.7. Происхождение атомов углерода молекулы холестерина

В исследованиях на целых организмах изучают и потребности организма в пищевых веществах: если устранение из рациона какого-либо вещества приводит к нарушению роста и развития или физиологических функций организма, значит, это вещество является незаменимым пищевым фактором. Сходным образом определяются и необходимые количества пищевых веществ.

Исследования in vitro

В экспериментах *in vitro* объектами исследования являются изолированные части организма — отдельные органы, срезы тканей, субклеточные фракции, вплоть до очень простых биохимических систем, например таких, как система, содержащая индивидуальный фермент и его субстрат, или система из фермента, субстрата и аллостерического ингибитора. Разумеется, эти методы имеют ценность только как этап, необходимый для решения конечной цели — понимания функционирования целого организма.

Изолированные органы. Если в артерию изолированного органа вводить раствор какого-либо вещества и анализировать вещества в жидкости, вытекающей из вены, то можно установить, каким превращениям подвергается это вещество в органе. Например, таким путем было найдено, что в печени за счет азота аминокислот образуется мочевина. Сходные опыты можно проводить на органах без их выделения из организма (метод артериовенозной разницы): в этих случаях кровь для анализа отбирают с помощью канюль, вставленных в артерию и вену органа, или с помощью шприца. Таким путем, например, можно установить, что в крови, оттекающей от работающих мышц, увеличена концентрация молочной кислоты, а протекая через печень, кровь освобождается от молочной кислоты.

Срезы тканей. Срезы — это тонкие кусочки тканей, которые изготовляются с помощью микротома или просто бритвенного лезвия. Срезы инкубируют в растворе, содержащем питательные вещества (глюкозу или другие) и вещество, превращения которого в клетках данного типа хотят выяснить. После инкубации анализируют продукты метаболизма исследуемого вещества в инкубационной жидкости. Применение срезов ограничивается тем, что клеточные мембраны непроницаемы для многих веществ.

Гомогенаты тканей. Гомогенаты — это бесклеточные препараты. Их получают путем разрушения клеточных мембран растиранием ткани с песком или в специальных приборах — гомогенизаторах (рис. 6.8).

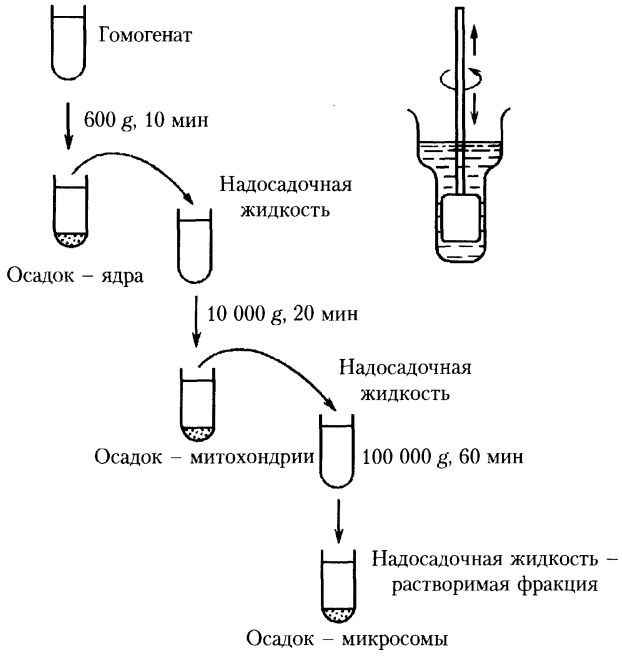


Рис. 6.8. Фракционирование гомогената методом ультрацентрифугирования. Вверху справа — гомогенизатор

Фракционирование гомогенатов. Из гомогената можно выделить субклеточные частицы, как надмолекулярные (клеточные органеллы), так и отдельные соединения (ферменты и другие белки, нуклеиновые кислоты, метаболиты) (см. рис. 6.8). Например, с помощью дифференциального центрифугирования можно получить фракции ядер, митохондрий, микросом (микросомы — это фрагменты эндоплазматического ретикулума). Эти органеллы различаются размерами и плотностью и поэтому осаждаются при разных скоростях центрифугирования. После осаждения микросом в надосадочной жидкости остаются растворимые компоненты клетки — растворимые белки, метаболиты. Каждую из этих фракций можно разными методами фракционировать дальше, выделяя составляющие их компоненты. Из выделенных компонентов можно реконструировать биохимические

системы, например простую систему «фермент + субстрат», и такие сложные, как системы синтеза белков и нуклеиновых кислот, описанные в гл. 4.

Особенности изучения биохимии человека

В молекулярных процессах разных организмов, населяющих Землю, имеется далеко идущее сходство. Такие фундаментальные процессы, как матричные биосинтезы, механизмы трансформации энергии, основные пути метаболических превращений веществ, примерно одинаковы у организмов – от бактерий до высших животных. Поэтому многие результаты исследований, проведенных с кишечной палочкой, оказываются применимыми и к человеку. Чем больше филогенетическое родство видов, тем больше общего в их молекулярных процессах. Подавляющую часть знаний о биохимии человека получают таким путем: исходя из известных биохимических процессов у других животных, строят гипотезу о наиболее вероятном варианте данного процесса в организме человека, а затем проверяют гипотезу прямыми исследованиями клеток и тканей человека. Такой подход позволяет проводить исследования на небольшом количестве биологического материала, получаемого от человека. Чаще всего используют ткани, удаляемые при хирургических операциях, клетки крови (эритроциты и лейкоциты), а также клетки тканей человека, выращиваемые в культуре *in vitro*.

Изучение наследственных болезней человека, необходимое для разработки эффективных методов их лечения, одновременно дает много информации о биохимических процессах в организме человека. В частности, врожденный дефект фермента приводит к тому, что в организме накапливается его субстрат; при изучении таких нарушений обмена иногда открывают новые ферменты и реакции, количественно незначительные (поэтому они и не были замечены при изучении нормы), которые имеют, однако, витальное значение.

Глава 7

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Мембраны — наиболее распространенные клеточные органеллы. Основными мембранными структурами клетки являются плазматическая мембрана, отделяющая клетку от соседних клеток или межклеточного вещества, эндоплазматический ретикулум, пластинчатый комплекс, митохондриальная и ядерная мембраны (рис. 7.1). Каждая из этих мембран имеет существенные структурные особенности и выполняет специфические функции в клетке, но все они построены по единому типу.

Изучение биологических мембран необходимо для понимания таких процессов, как взаимодействие клеток при образовании тканей, питание клеток, фагоцитоз, секреция, трансформация энергии в клетке, координация функций разных клеток. Структура и функции мембран нарушаются при ряде заболеваний и нередко составляют существенный этап патогенеза болезни.

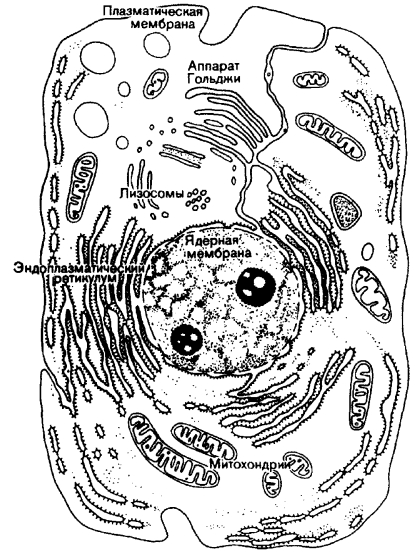


Рис. 7.1. Основные мембранные структуры клетки

СТРОЕНИЕ МЕМБРАН

Главные структурные компоненты мембран — это белки и липиды. В большинстве мембран содержится 50–75 % белков; остальная часть приходится в основном на долю липидов. В плазматических мембранах обнаруживается до 10 % углеводов, которые составляют углеводную часть гликопротеинов и гликолипидов; в других мембранах углеводов значительно меньше (в 5–10 раз).

Следует отметить, что разнообразие мембран не исчерпывается перечисленными основными типами. Мембраны одного типа в клетках разной специализации неодинаковы. Например, плазматическая мембрана эритроцитов отличается

от плазматической мембраны мышечных клеток. Более того, мембрана одного и того же типа в разных частях одной и той же клетки может быть неодинаковой. Например, плазматическая мембрана секретирующего (апикального) конца клеток кишечного эпителия отличается от мембраны противоположного (базального) конца. Все мембраны имеют общий план строения, но различаются в деталях химического состава и структуры. В табл. 7.1 указан состав некоторых мембран.

Таблица 7.1. Состав некоторых клеточных мембран (%)

Мембраны	Белки	Фосфолипиды	Холестерин	Углеводы
Миелиновые мембраны (мозг человека)	18	60	19	3
Плазматическая мембрана эритроцитов человека	49	32	11	8
Внутренняя мембрана митохондрий печени	76	22	2	–
Эндоплазматический ретикулум клеток печени	55	42	3	–

Липиды мембран

Липидам принадлежит главная роль в образовании мембран как клеточных структур: пластинчатая, «мембранная» форма и основные физико-химические свойства мембран определяются именно липидами. Основная часть липидов (до 90 %) в мембранах представлена фосфолипидами, гликолипидами и холестерином.

Фосфолипиды

В мембранах имеются фосфолипиды двух типов — глицерофосфолипиды и сфингофосфолипиды.

Глицерофосфолипиды. Эти липиды являются производными фосфатидной кислоты (диацилглицеринфосфата) — рис. 7.2.

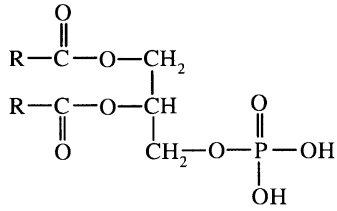
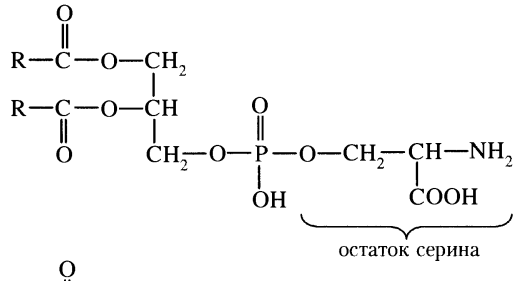


Рис. 7.2. Фосфатидная кислота: R — углеводородные радикалы жирных кислот

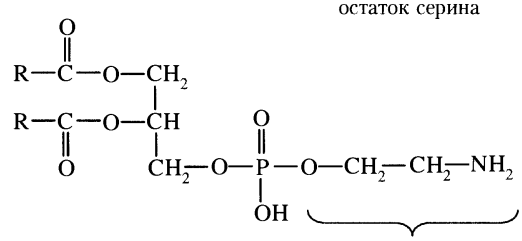
В состав фосфолипидов входят жирные кислоты, как насыщенные, так и ненасыщенные, с длиной углеродной цепи чаще всего от 16 до 20 углеродных атомов. Наиболее распространенные глицерофосфолипиды — это фосфатидилхолины. Их отличительной чертой является наличие в молекуле остатка холина, связанного с фосфорной кислотой (рис. 7.3). Фосфатидилхолинами называют группу соединений, отличающихся друг от друга природой жирно-кислотных остатков (радика-

лов R). По такому же типу построены и другие глицерофосфолипиды — фосфатидилэтаноламины и фосфатидилсерины, содержащие соответственно этаноламин и серин.

Фосфатидилсерин



Фосфатидилэтаноламин



Фосфатидилхолин

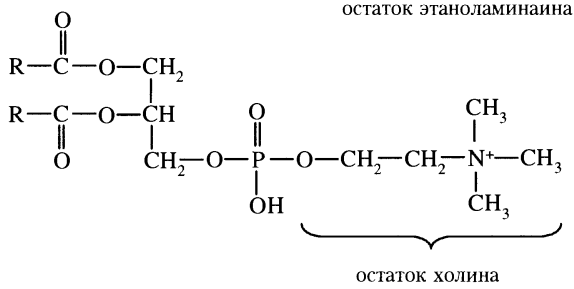


Рис. 7.3. Строение гицерофосфолипидов мембран

Специальные функции в мембранах выполняет фосфатидилинозитол, в состав которого входит шестиатомный циклический спирт инозитол (рис. 7.4). Этот фосфолипид участвует в одном из механизмов передачи внешних регуляторных сигналов через клеточную мембрану в клетку (см. ниже).

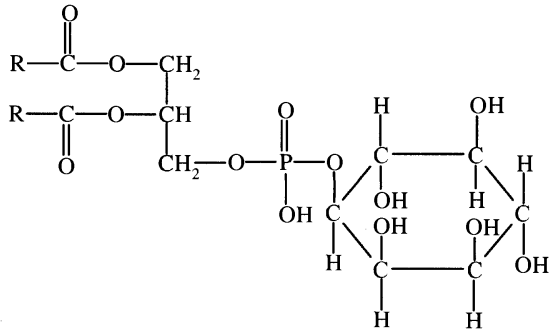


Рис. 7.4
Строение фосфатидилинозитолов

Сфингофосфолипиды (сфингомиелины). В эту группу входят липиды, содержащие аминоспирт сфингозин (рис. 7.5). Сфингофосфолипиды являются производными церамидов (N-ацилсфингозинов); в остальном сфингофосфолипиды построены сходно с глицерофосфолипидами.

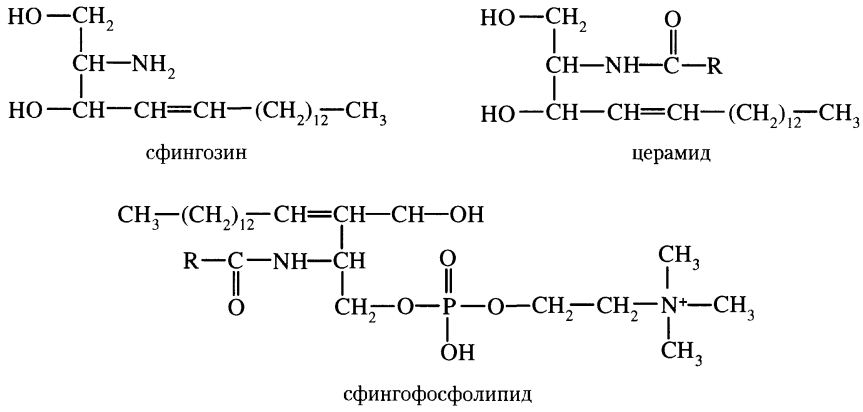


Рис. 7.5. Строение сфингофосфолипидов: R — углеводородный радикал жирной кислоты, которая связана с аминогруппой сфингозина амидной связью

Церамиды — это группа соединений, различающихся по остатку жирной кислоты. В сфингофосфолипидах водород гидроксильной группы у первого углеродного атома церамида замещен на фосфохолин, фосфоэтаноламин или фосфосерин.

Гликолипиды

Гликолипиды представляют собой углеводсодержащие соединения, в которых углеводная часть ковалентно связана с липидной.

В мембранах содержатся главным образом углеводные производные церамида (N-ацилсфингозина). Общее название таких гликолипидов — гликозилцерамиды, гликосфинголипиды (их называют также цереброзидами).

Напомним, что приставки *глюко-* или *глюкозил-* означают глюкозный остаток, а *глико-* и *гликозил-* — любой углеводный остаток. Углеводная часть в гликозилцерамидах может быть представлена моносахаридами или олигосахаридами, например остатком лактозы (дисахарид) в лактозилцерамиде (рис. 7.6).

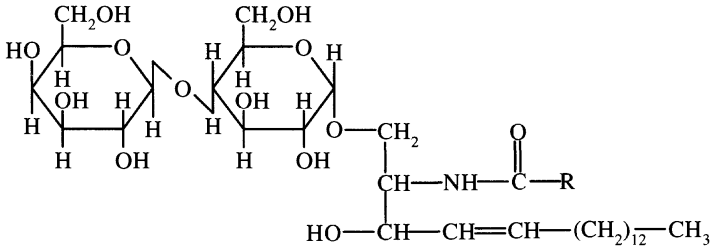


Рис. 7.6. Лактозилцерамид

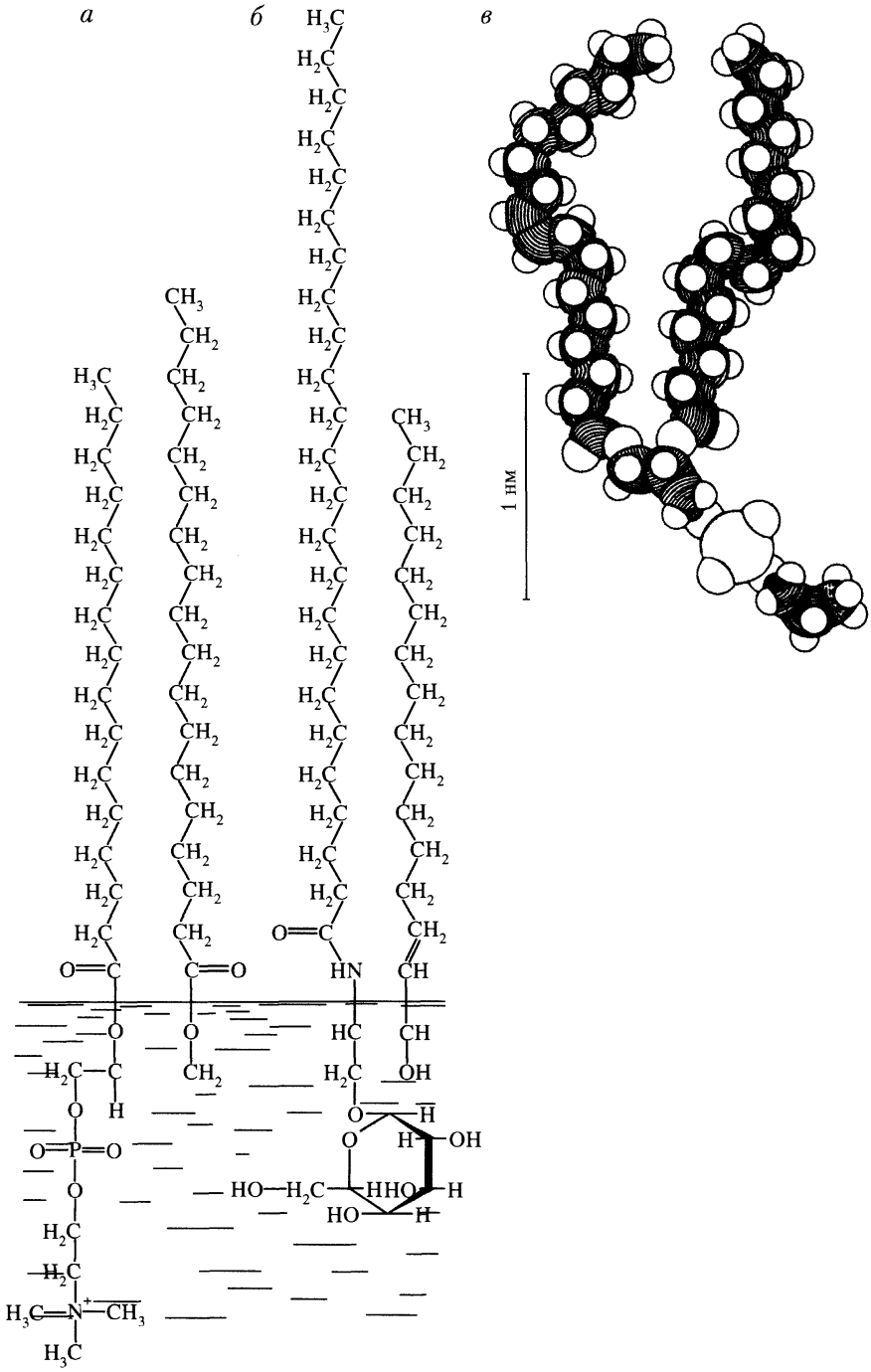


Рис. 7.7. Амфифильные свойства мембранных липидов:
а — фосфатидилхолин; *б* — глюкозилцерамид; *в* — молекулярная модель фосфолипида

В организме человека существует множество гликолипидов, различающихся по углеводной части. В плазматической мембране эритроцитов большую часть всех гликолипидов составляют следующие:

Glc–Cer	Gal–Gal–Glc–Cer
Gal–Glc–Cer	GalNAc–Gal–Gal–Glc–Cer

(здесь Cer — символ остатка церамида, Glc — глюкозы, Gal — галактозы, GalNAc — N-ацетилгалактозамина).

В меньших количествах в гликолипидах обнаруживаются углеводы более сложного строения, образующие разветвленные цепи. Они содержат до 20–30 моносахаридов. Концевые остатки углеводных цепей часто представлены N-ацетилнейраминовой кислотой (девятиуглеродный моносахарид, см. гл. 9); гликолипиды, содержащие N-ацетилнейраминовую кислоту, называют ганглиозидами.

Холестерин

Холестерин — это представитель группы липидов, называемых стероидами. Характерные черты структуры холестерина — наличие тетрациклической группировки и углеводородной разветвленной цепи с восемью углеродными атомами; в третьем положении полициклической части имеется спиртовая группа (формула холестерина приведена на рис. 6.7).

Двойной липидный слой мембран

Характерной особенностью молекул фосфолипидов и гликолипидов является их амфифильность: один конец молекулы гидрофобный, другой — гидрофильный (см. рис. 7.7). Гидрофобный конец составляют углеводородные радикалы жирных кислот и сфингозина; он занимает большую часть длины молекулы, до $^3/_4$. В гликолипидах гидрофильный конец образован углеводной частью, в фосфолипидах — фосфатным остатком с присоединенным к нему холином, этаноламином или серином. Вследствие амфифильности эти липиды в водной среде образуют многомолекулярные структуры с упорядоченным расположением молекул (рис. 7.8): гидрофобные части вытесняются из водной среды и взаимодействуют друг с другом

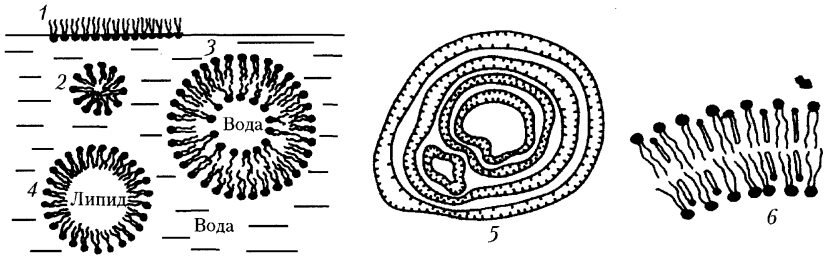


Рис. 7.8. Структуры, образуемые амфифильными липидами в водной среде:

1 — монослой молекул на поверхности воды; *2* — мицелла; *3* — бимолекулярный слой, окружающий каплю воды (липосома); *4* — монослой амфифильных липидов на поверхности капли неамфифильного липида; *5* — строение сложной липосомы; *6* — локализация холестерина в липидном бислое

(как бы растворяются друг в друге), а гидрофильные части контактируют с водой и гидратируются (как бы растворяются в воде). Именно эта особенность строения и физико-химических свойств определяет роль фосфолипидов и гликолипидов в построении биологических мембран: основу мембран составляет бимолекулярный липидный слой (рис. 7.9).

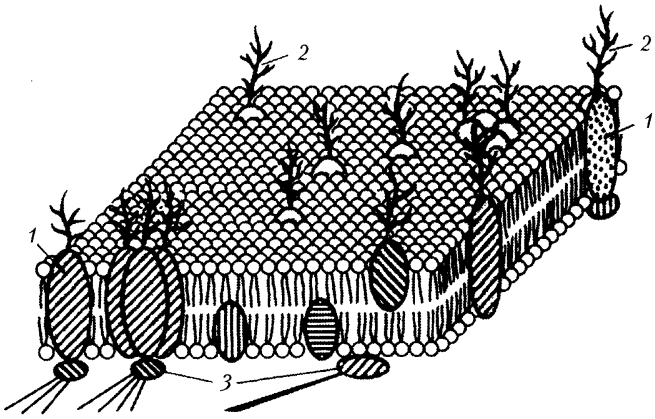


Рис. 7.9. Строение биологических мембран:

белки (*1*) и липиды наружной поверхности содержат углеводные компоненты (*2*), обычно разветвленные олигосахариды. С внутренней поверхностью мембраны контактируют белки (*3*), соединенные со скелетными и сократительными структурами клетки — микрофибриллами и микротрубочками

Холестерин, хотя и содержит небольшую гидрофильную группу (гидроксил в положении 3), в основном является гидрофобным, его амфифильность выражена слабо. Молекула холестерина имеет вытянутую форму (рис. 7.10).

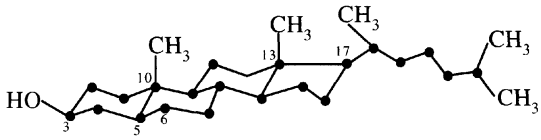


Рис. 7.10. Форма молекулы холестерина

В мембранах молекулы холестерина находятся практически целиком в гидрофобной части бимолекулярного липидного слоя. При этом гидроксильная группа примыкает к гидрофильным головкам фосфолипидных молекул, а молекула холестерина в целом ориентирована параллельно гидрофобным цепям фосфолипидов (см. рис. 7.8). Холестерин в значительных количествах содержится в плазматических мембранах (в некоторых клетках до 50 % от всех липидов); во внутриклеточных мембранах его гораздо меньше (см. табл. 7.1).

Белки мембран

Белки могут быть частично или полностью погружены в мембрану (интегральные белки) либо располагаться на ее поверхности (периферические белки).

Погруженная часть интегральных белков гидрофобна, содержит большое количество аминокислот с гидрофобными радикалами. Гидрофобные взаимодействия обеспечивают удерживание белков в липидном слое мембраны и их определенную ориентацию: белок с гидрофильной выступающей частью не может повернуться этой частью в гидрофобный слой.

Часть мембранных белков представлена углеводсодержащими белками гликопротеинами. Гликопротеины обнаруживаются преимущественно в плазматических мембранах. Углеводную часть (простетическую группу) этих белков составляют ковалентно присоединенные моносахаридные остатки или олигосахаридные цепи.

Многие интегральные белки прошивают мембрану насквозь, выступая за ее пределы по обе стороны. Примером может служить углеводсодержащий белок гликофорин, входящий в состав плазматической мембраны эритроцитов (рис. 7.11). На его долю в этой мембране приходится около 10 % от всех белков. Пептидная цепь гликофорина содержит примерно 200 аминокислотных остатков; к пептиду присоединено около 20 олигосахаридных цепей длиной по 12 моносахаридов. Углеводы составляют примерно половину всей массы гликопротеина. Все углеводные цепи сосредоточены на N-концевой части молекулы, захватывающей несколько меньше половины пептидной цепи гликофорина. Далее следует гидрофобный участок цепи (примерно из 30 аминокислот), имеющий конформацию α-спирали; именно этот участок прошивает насквозь мембрану. При этом гидрофильная концевая часть с углеводами оказывается на наружной поверхности мембраны, а С-концевая часть, тоже гидрофильная, но без углеводных цепей — на внутренней поверхности. Мембрана каждого эритроцита содержит около 300 тысяч молекул гликофорина.

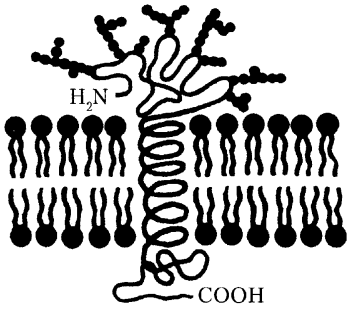


Рис. 7.11. Гликофорин в мембране эритроцита

Белковый состав разных мембран различен. Например, плазматическая мембрана клеток печени содержит сотни разных белков, а мембраны наружных сегментов палочек сетчатки глаза — лишь несколько белков, в основном родопсин (зрительный пурпур).

В мембране эритроцитов белки занимают 25 % поверхности мембраны; остальные 75 % приходятся на липиды. В некоторых других мембранах площадь, занимаемая белками, больше, до $^2/_3$ всей поверхности.

Белки мембран выполняют разные функции: это могут быть и структурные белки, и ферменты, и белки, осуществляющие трансмембранный перенос веществ, и рецепторы гормонов или других сигнальных молекул. Упомянутый выше родопсин зрительных палочек улавливает свет: это первый акт в цепочке молекулярных событий, ведущих к зрительному ощущению.

Асимметрия мембран

Мембраны всегда существуют в форме замкнутых структур. Это объясняется тем, что на открытом краю мембраны поверхностное натяжение больше, чем в других

местах, и края стягиваются вплоть до слияния в одной точке (подобно тому, как стягивается шнурком рюкзак). В живой клетке все мембраны тоже замкнуты, но их форма часто отличается от сферической. Все мембранные структуры клетки отграничивают некоторый объем (полость мембраны) от среды или других частей клетки. Это очевидно в тех случаях, когда мембранная структура имеет простую геометрическую форму, приближающуюся к сферической, например такую, как форма плазматической мембраны. Но это справедливо и для мембран со сложной конфигурацией, таких, как мембраны митохондрий, и особенно эндоплазматического ретикулума, пластинчатый комплекс. Следовательно, каждая мембрана имеет внутреннюю и внешнюю поверхности.

Поверхности одной и той же мембраны различаются по составу липидов, белков и углеводов (поперечная асимметрия). Например, в плазматической мембране эритроцитов в наружном монослое двойного липидного слоя преобладают фосфатидилхолины, а во внутреннем — фосфатидилэтаноламины и фосфатидилсерины. Углеводные части гликолипидов и гликопротеинов выходят на наружную поверхность, иногда образуя сплошное покрытие клетки, так называемый гликокаликс; на внутренней поверхности углеводы отсутствуют. Белки, являющиеся рецепторами гормонов и других внешних сигнальных молекул, располагаются на наружной поверхности плазматической мембраны, а внутрь клетки сигнал передается при участии белков внутренней поверхности мембраны.

Жидкостность мембран

Двойной липидный слой имеет жидкокристаллическую структуру: положение молекул липидов упорядочено, однако они сохраняют способность к диффузии в пределах слоя параллельно поверхности мембраны (латеральная диффузия). Иначе говоря, липидный слой ведет себя как двумерная жидкость. Молекулы белков также способны к латеральной диффузии: они как бы плавают в липидном слое. Однако размеры молекул белков ограничивают скорость их диффузии; кроме того, во многих мембранах белки расположены достаточно тесно (занимают половину, а то и $^2/_3$ всей площади поверхности мембраны). Что касается поперечной диффузии в мембранах, то она возможна лишь в ограниченных размерах.

Самосборка мембран

Существуют методы выделения клеточных мембран, позволяющие изучать их в упрощенных условиях. Удобным объектом для исследований оказались мембраны эритроцитов. Если эритроциты поместить в гипотонический раствор, они набухают в результате осмотического переноса воды внутрь клетки, мембрана лопается, содержимое выходит в раствор и остаются пустые мембраны — «тени» эритроцитов. Методом центрифугирования в определенных условиях из такой смеси можно выделить чистые мембраны.

Если тени эритроцитов поместить в раствор детергента, то мембраны разрушаются; при достаточной концентрации детергента все молекулы мембраны включаются в мицеллы детергента (рис. 7.12). Если теперь каким-либо способом,

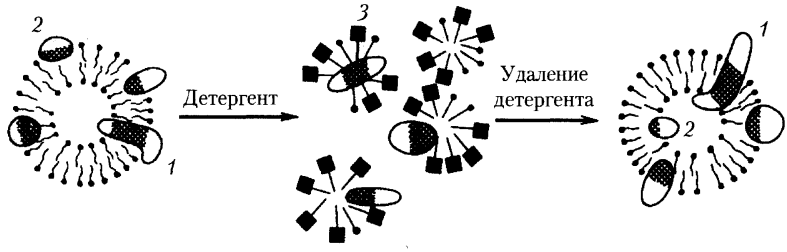


Рис. 7.12. Разрушение и самосборка мембран:

в центре — мицеллы, образованные детергентом (*3*) и компонентами мембраны. После самосборки (справа) ориентация белка *1* изменилась, а белок *2* оказался на внутренней поверхности мембраны

например диализом, удалить детергент, то компоненты мембран вновь объединяются и образуются мембранные пузырьки.

Процесс самосборки мембран, по существу, мало отличается от самосборки других клеточных структур, таких, как олигомерные белки, микротрубочки, рибосомы и др. И в том и в другом случае молекулы, участвующие в самосборке, имеют такое строение, что минимуму свободной энергии отвечает не произвольное их размещение, а определенное, упорядоченное расположение в соединении друг с другом. Иначе говоря, и информация о структуре, и энергия, необходимая для построения этой структуры, содержатся в самих строительных блоках. Однако физические силы, участвующие в самосборке белковых структур, более разнообразны, чем при самосборке мембран: в последнем случае преобладающее значение имеют гидрофобные взаимодействия между компонентами мембраны и гидрофильные взаимодействия этих компонентов с окружающей водной средой.

Надо отметить, что при самосборке мембран *in vitro* может утрачиваться поперечная асимметрия (см. рис. 7.12). Асимметричность мембран в живой клетке является результатом компартментализации ферментов и метаболических процессов, которая создается теми же мембранами и, кроме того, специальными механизмами переноса веществ из мест их синтеза в места, где они функционируют.

Процесс, аналогичный описанной выше самосборке мембран, используют для создания искусственных мембранных пузырьков — протеолипосом — с заданным составом. Для этого выбранные липиды и белки растворяют в растворе детергента, а затем детергент удаляют диализом. При этом можно получить и асимметричные мембраны: если белок, имеющий гидрофильную и гидрофобную части, добавить к суспензии уже готовых липосом, то он будет включаться только в наружную поверхность липосомы. Липосомы широко используют для моделирования и изучения свойств мембран. Изучается возможность применения липосом в качестве капсул для введения в организм лекарств. Липосомы, введенные через желудочно-кишечный тракт, попадают в кровь, а затем улавливаются органами (главным образом печенью и селезенкой) и разрушаются в их клетках. Путем подбора мембранных компонентов можно получить липосомы, избирательно задерживающиеся в том или ином органе; с помощью таких липосом можно направить лекарство точно по адресу — в пораженный орган.

ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ПЕРЕНОС ВЕЩЕСТВ

Клеточные мембраны создают существенные ограничения для перемещения веществ, причем основным препятствием является гидрофобная зона мембраны. Однако мембраны не являются наглухо закрытыми перегородками. Одна из главных функций мембран — регуляция переноса веществ. Например, плазматическая мембрана должна впустить в клетку и удержать вещества, которые нужны клетке, и освободиться от ненужных. Через мембраны клетки в одно и то же время в обоих направлениях проходят сотни разных веществ. Различают три способа переноса веществ через мембраны: простая диффузия, облегченная диффузия и активный транспорт.

Простая диффузия

Небольшие нейтральные молекулы типа H_2O, CO_2, O_2, NH_3 (но не NH_4^+), мочевина, этанол, а также гидрофобные низкомолекулярные органические вещества могут диффундировать через мембрану без участия каких-либо специальных механизмов (рис. 7.13, *а*). Если существует трансмембранный градиент концентраций вещества (концентрация по одну сторону мембраны больше, чем по другую), то скорость диффузии в сторону меньшей концентрации будет больше, чем в обратном направлении, и перенос веществ будет происходить, пока сохраняется градиент концентрации.

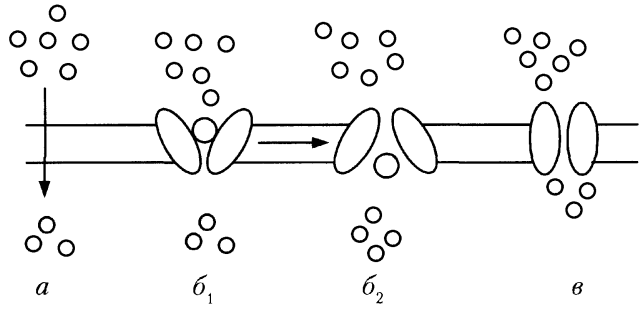


Рис. 7.13. Механизмы переноса веществ через мембраны:

а — простая диффузия; *б*$_1$ → *б*$_2$ — облегченная диффузия; *в* — гидрофильный канал

Облегченная диффузия

При облегченной диффузии вещества переносятся через мембрану также по градиенту концентрации, но с помощью специальных трансмембранных белков-переносчиков (транслоказ). Белок-переносчик имеет центр связывания, комплементарный переносимому веществу, поэтому для облегченной диффузии, в отличие от простой, характерна высокая избирательность: для каждого вещества или группы сходных веществ имеется свой переносчик. Переносимое вещество присоединяется к транслоказе, в результате чего изменяется ее конформация, в мембране открывается канал, и вещество освобождается с другой стороны мембраны. Поскольку в канале нет гидрофобного препятствия, то этот механизм называют облегченной диффузией.

Ионные каналы

Перенос ионов через ионные каналы представляет собой вариант облегченной диффузии. Для ионизированных атомов и молекул гидрофобный слой мембраны трудно преодолим. Трансмембранный перенос ряда ионов (Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}) происходит через ионные каналы. Ионные каналы представляют собой олигомерные белковые структуры, пронизывающие мембрану от наружной до внутренней поверхности и образующие трансмембранный гидрофильный (заполненный водой) канал, проходимый для определенных ионов (рис. 7.13, *в*). Избирательность каналов к ионам определяется наличием в белках канала специфического центра связывания иона. Проницаемость таких каналов в большинстве случаев регулируется: они могут быть или закрыты, или открыты (см. ниже). Сигналом для изменения состояния канала может быть гормон или иная сигнальная молекула, для которой данный канал имеет центр связывания. Есть каналы, реагирующие на изменение трансмембранного потенциала.

Перемещение ионов по каналам происходит путем диффузии по градиенту их концентрации. Ионы имеют электрический заряд, поэтому образование разности концентраций ионов по разным сторонам мембраны одновременно означает и образование разности электрического заряда, который тоже влияет на направление переноса ионов. Разность электрического потенциала и разность концентраций вместе называют электрохимическим потенциалом. Следовательно, ионы перемещаются через ионные каналы по градиенту мембранного электрохимического потенциала.

Направленные потоки веществ путем простой и облегченной диффузии в живой клетке никогда не прекращаются, поскольку выравнивание концентраций никогда не достигается: вещества, поступающие в клетку, например кислород, глюкоза, используются в метаболических процессах, а их убыль постоянно восполняется в результате трансмембранного переноса.

Перенос веществ путем простой и облегченной диффузии называют *пассивным транспортом*, поскольку перенос происходит по градиенту концентрации.

Активный транспорт

В этом процессе, в отличие от простой и облегченной диффузии, перенос вещества совершается против градиента концентрации. Таким способом происходит перенос многих минеральных ионов из межклеточной жидкости в клетку или в обратном направлении, перенос аминокислот из просвета кишечника в клетки кишечника, перенос глюкозы из первичной мочи через клетки канальцев почки в кровь. Транспорт против градиента концентрации — несамопроизвольный процесс: он связан с расходованием энергии. Источником энергии может быть или гидролиз АТФ (первично-активный транспорт), или одновременный перенос другого вещества, которое движется по градиенту своей концентрации (вторично-активный транспорт).

Активный транспорт некоторых минеральных ионов происходит за счет энергии АТФ при участии транспортных АТФаз (ионных насосов). Ионные насосы — это белковые устройства, способные избирательно присоединять переносимый

ион и гидролизовать АТФ; при этом энергия гидролиза АТФ трансформируется в энергию разности концентраций ионов по сторонам мембраны.

Na,К-АТФаза. На рис. 7.14 представлен механизм действия Na,К-АТФазы (натриевого насоса). Присоединение к АТФазе трех ионов Na^+ (стадии 1 и 2) активирует фермент, и он катализирует расщепление АТФ, причем фосфатный остаток присоединяется к АТФазе. В результате фосфорилирования фермента происходит изменение его конформации: ионный канал закрывается с внутренней стороны мембраны и открывается с наружной (стадия 3); одновременно уменьшается (примерно в 10 раз) сродство центров связывания к иону Na^+. Ионы Na^+ покидают фермент, а к нему (к специальным центрам связывания) присоединяются ионы K^+ (стадия 4). Ионы K^+ так изменяют фермент, что происходит гидролитическое отщепление фосфатного остатка от фермента. В результате вновь изменяется конформация фермента: ионный канал закрывается с наружной стороны и открывается с внутренней, сродство к ионам K^+ снижается, и они освобождаются в цитозоль (стадия 5). Энергия гидролиза АТФ нужна именно для того, чтобы изменять сродство к ионам по разные стороны мембраны.

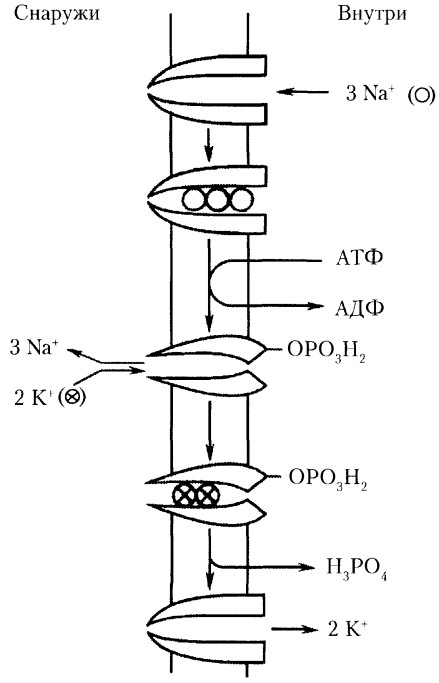


Рис. 7.14. Механизм действия Na, К-АТФазы

За полный цикл работы насоса из клетки в межклеточное пространство переносятся три иона Na^+, а в обратном направлении — два иона K^+. Поскольку перенос катионов неэквивалентен, одновременно с разностью их концентраций возникает и разность электрических потенциалов, т. е. натриевый насос работает в электрогенном режиме. Разность потенциалов совсем небольшая, меньше 0,1 В. Однако расстояние между заряженными областями тоже очень мало, поэтому напряженность электрического поля получается значительной — порядка 100.000 В/см. Так образуется *трансмембранный электрохимический потенциал* $\Delta\mu$, который складывается из энергии разности электрических потенциалов $\Delta\psi$ и энергии разности концентраций веществ Δc по сторонам мембраны:

$$\Delta\mu = F\,\Delta\psi + RT\,\Delta\ln c$$

(F — число Фарадея; R — газовая постоянная; T — температура).

Натриевый насос локализован в плазматической мембране клеток и имеется во всех клетках. В результате его действия создается разность концентраций ионов между цитозолем и межклеточной жидкостью. Например, концентрация ионов в мышечной ткани (ммоль/л):

- внутриклеточная: Na^+ — 13; K^+ — 150;
- внеклеточная: Na^+ — 120; K^+ — 5.

Концентрация органических веществ внутри клетки обычно больше, чем в межклеточной жидкости. Многие из этих веществ, включая все макромолекулы, не могут свободно проходить через мембрану, и поэтому вследствие осмоса вода стремится проникнуть внутрь клетки. Если для этого нет препятствий, то клетка набухает, внутриклеточное давление увеличивается и происходит разрыв мембраны (осмотический шок). Одна из важных функций натриевого насоса как раз и заключается в создании препятствия для набухания клетки: его работа приводит к такому распределению ионов, что по обе стороны мембраны образуется разность потенциалов, которая уравновешивает избыток концентрации веществ внутри клетки (равновесие Доннана).

При наследственной микросфероцитарной гемолитической анемии имеется врожденный дефект эритроцитов: их мембрана более проницаема для ионов, чем в норме. В эритроцитах этих больных Na,K-АТФаза работает с большей интенсивностью, расходуется значительное количество АТФ, и все же в результате высокой скорости простой диффузии внутриклеточная концентрация ионов Na^+ выше, чем в норме; соответственно, в эритроциты проникает больше воды, т. е. они набухают и принимают характерную для этой болезни сферическую форму. Такие эритроциты менее стабильны, они с большей скоростью, чем нормальные, разрушаются в селезенке, что и является непосредственной причиной малокровия.

Натриевый насос участвует и в создании градиента концентрации ионов, необходимого для передачи нервного импульса, а также в переносе через мембрану ряда веществ путем вторично-активного транспорта (см. ниже).

В условиях эксперимента ионные насосы могут работать в обратном направлении, т. е. синтезировать АТФ из АДФ и H_3PO_4 за счет энергии градиента концентраций ионов. Например, в опытах с выделенными плазматическими мембранами (мембранными пузырьками) можно искусственно создать высокий градиент концентраций ионов между содержимым пузырька и внешним раствором. В этом случае ионы начинают перемещаться через Na,K-АТФазу по градиенту концентрации, и все стадии процесса, изображенного на рис. 7.14, протекают в обратном направлении. В результате энергия (электрохимический потенциал) искусственно созданного градиента ионов трансформируется в энергию высокоэнергетических связей АТФ.

Кальциевый насос (Ca-АТФаза). Ca-АТФаза за счет энергии АТФ переносит через мембрану ионы Ca^{2+} против градиента концентрации, два иона на одну молекулу гидролизуемой АТФ.

Ca-АТФаза есть в плазматической мембране клеток и в мембране эндоплазматического ретикулума. Ca-АТФаза плазматической мембраны переносит Ca^{2+} из цитозоля клетки в межклеточное пространство.

Ca-АТФаза эндоплазматического ретикулума переносит ионы кальция из цитозоля в полость ретикулума, создавая внутриклеточное депо Ca^{2+}. В саркоплазматическом ретикулуме Ca-АТФаза составляет больше половины всех белков мембраны; она является частью механизма, регулирующего цикл сокращения—расслабления мышечного волокна (см. гл. 21).

Концентрация кальция во внеклеточной жидкости и в цистернах эндоплазматического ретикулума значительно больше, чем в цитозоле: например, в плазме

крови 3 ммоль/л, а в эритроцитах меньше 0,001 ммоль/л. Более чем тысячекратная разница в концентрации поддерживается действием кальциевых насосов.

H^+-АТФазы. В некоторых внутриклеточных мембранах есть транспортные АТФазы, функционирующие как протонные насосы: они перекачивают через мембрану ионы водорода. При этом возникает и разность концентраций протонов (разность pH), и разность электрических потенциалов, в совокупности образующих протонный электрохимический потенциал ΔmH^+:

$$\Delta\mu H^+ = F\Delta\psi + RT\Delta\ln[H^+] = F\Delta\psi - 2{,}3RT\Delta pH.$$

За счет действия H^+-АТФазы создается кислая среда в некоторых отсеках клетки (например, в лизосомах, в секреторных гранулах хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников).

В мембране митохондрий есть белок, который в экспериментах in vitro может создавать трансмембранный градиент концентраций H^+ за счет энергии гидролиза АТФ, т. е. действует как протонный насос. Однако в живой клетке функция этого белка противоположна: за счет градиента концентрации H^+ он синтезирует АТФ, поэтому его называют H^+-АТФ-синтетаза (см. гл. 8).

Вторично-активный транспорт. Активный перенос вещества через мембрану может осуществляться за счет энергии градиента концентрации другого вещества. Переносчик в этом случае имеет специфические центры связывания для обоих веществ (рис. 7.15). Присоединение и отделение переносимого вещества вызывает изменения конформации переносчика, и соответственно — изменения сродства к переносимым веществам. Если концентрация вещества X снаружи больше, чем внутри, оно может перемещаться путем облегченной диффузии. Переносчик имеет центр связывания и для вещества Y, которое транспортируется попутно с веществом X (симпорт), причем вещество Y может транспортироваться против градиента своей концентрации. Сходным образом происходит и антипорт — перемещение вещества против градиента своей концентрации в направлении, противоположном перемещению другого вещества по его градиенту концентрации (см. рис. 7.15, *б*).

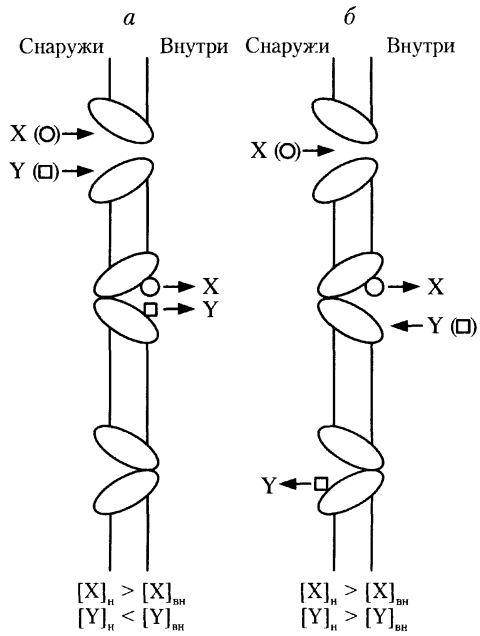


Рис. 7.15. Симпорт (*а*) и антипорт (*б*)

Симпорт и антипорт могут происходить за счет энергии градиента концентрации ионов Na^+, создаваемого Na,K-АТФазой. Таким способом происходит, например, всасывание аминокислот из кишечника и глюкозы из первичной мочи и кишечника (рис. 7.16). Следовательно, в этих случаях первичным источником энергии служит АТФ: сначала энергия гидролиза АТФ трансформируется в энергию трансмембранного градиента концентрации

Na^+, а затем энергия этого градиента используется для переноса аминокислот или глюкозы.

В хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников в специальных секреторных гранулах накапливаются гормоны адреналин и норадреналин. Мемб-

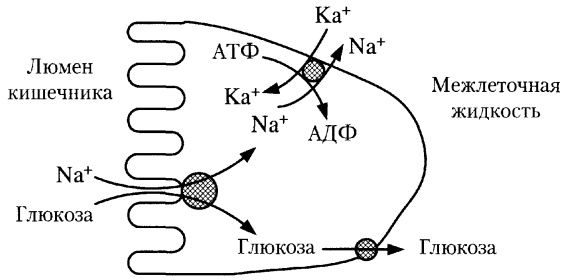


Рис. 7.16. Вторично-активный транспорт глюкозы из люмена кишечника в клетки

рана гранул содержит H^+-АТФазу, переносящую протоны из цитозоля внутрь гранулы, в результате чего создается протонный электрохимический потенциал ΔmH^+. Затем за счет энергии электрохимического потенциала происходит перенос гормонов: в обмен на два протона, выходящих из гранулы по градиенту своей концентрации, из цитозоля внутрь гранулы транспортируется одна молекула гормона против градиента своей концентрации.

Для переноса углеводов, аминокислот и других метаболитов вторично-активный транспорт имеет, по-видимому, наибольшее значение по сравнению с другими механизмами.

Кинетика трансмембранного переноса

Скорость простой диффузии через мембрану линейно зависит от градиента концентрации диффундирующего вещества.

Для транспорта веществ с участием переносчиков (облегченная диффузия, активный перенос) характерна кинетика насыщения: при определенной (насыщающей) концентрации переносимого вещества в переносе принимают участие все имеющиеся молекулы переносчика, и скорость транспорта достигает предельной величины ($V_{макс}$). Например, для переносчика глюкозы, обеспечивающего реабсорбцию глюкозы из первичной мочи, насыщающая концентрация глюкозы равна 180 мг/дл (почечный порог). Если концентрация глюкозы в крови больше 180 мг/дл, то часть ее остается в окончательной моче и выводится из организма (глюкозурия). При наследственной почечной глюкозурии почечный порог снижен, и глюкозурия начинается уже при концентрации глюкозы в крови около 150 мг/дл. По-видимому, это связано с дефектом переносчика глюкозы.

Известны ингибиторы трансмембранных переносчиков. Некоторые сердечные гликозиды ингибируют Na,K-АТФазу. Сердечные гликозиды — это группа лекарственных веществ, применяемых для лечения ряда заболеваний сердца. Один из них — уабаин (строфантин G) — широко используется в исследованиях натриевого насоса. Уабаин присоединяется к Na,K-АТФазе с наружной стороны

плазматической мембраны. Используя меченый уабаин, можно подсчитать количество молекул Na,K-АТФазы в мембране. В эритроцитах обнаруживается 100– 200 молекул фермента на одну клетку; в других клетках содержится до миллиона молекул этого фермента на одну клетку.

Флоридзин — вещество из группы флавонолов, встречающееся в корнях некоторых растений, при введении в организм вызывает глюкозурию. Это действие флоридзина обусловлено ингибированием переносчика глюкозы в клетках нефронов, вследствие чего замедляется или прекращается реабсорбция глюкозы в почечных канальцах.

Трансмембранная передача сигналов

Гормоны и другие сигнальные (регуляторные) молекулы пептидной природы, а также адреналин и норадреналин не проникают через клеточную мембрану. Первое звено действия гормона на клетку-мишень заключается в его присоединении к рецептору данного гормона — интегральному белку мембраны, имеющему на наружной поверхности мембраны центр связывания гормона; далее сигнал передается внутрь клетки при участии других специальных белков мембраны, а также белков цитозоля.

Аденилатциклазная система

Эта регуляторная система частично описана в гл. 2 (см. рис. 2.28, 2.29, 2.30). Аденилатциклазная система включает рецептор гормона, белок G, аденилатциклазу и протеинкиназу А. Первые три белка — мембранные, четвертый — цитозольный (рис. 7.17).

Рецептор гормона имеет центр связывания гормона (на наружной поверхности мембраны) и центр связывания белка G. Белки G являются олигомерами αβγ; в процессе функционирования тример разделяется на протомер α и димер βγ. Протомер α — фермент, связывает и гидролизует ГТФ; находясь в составе тримера, протомер α связан с ГДФ (рис. 7.17, состояние 1).

Связывание гормона с рецептором приводит к изменению конформации рецептора и увеличению его сродства к G-белку, в результате образуется комплекс гормон–рецептор–G–ГДФ. При этом снижается сродство α-протомера к ГДФ и повышается к ГТФ, поэтому происходит замещение ГДФ на ГТФ (рис. 7.17, состояние 2).

В результате замещения ГДФ на ГТФ и конформационных изменений комплекс α-протомер–ГТФ отделяется от протомеров βγ и от рецептора, но приобретает сродство к аденилатциклазе. Аденилатциклаза имеет центр связывания для комплекса α-протомер–ГТФ, а также для своего субстрата АТФ, из которого образуется цАМФ; цАМФ активирует протеинкиназу А (рис. 7.17, состояние 3).

Контакт α-протомера с аденилатциклазой пробуждает ГТФазную активность α-протомера: происходит гидролиз ГТФ, связанной с α-протомером. Но в результате гидролиза ГТФ тут же утрачивается сродство α-протомера к аденилатциклазе: комплекс α-протомер-ГДФ вновь соединяется с протомерами β и γ (рис. 7.17, состояние 4). Если концентрация гормона в крови остается высокой и рецептор

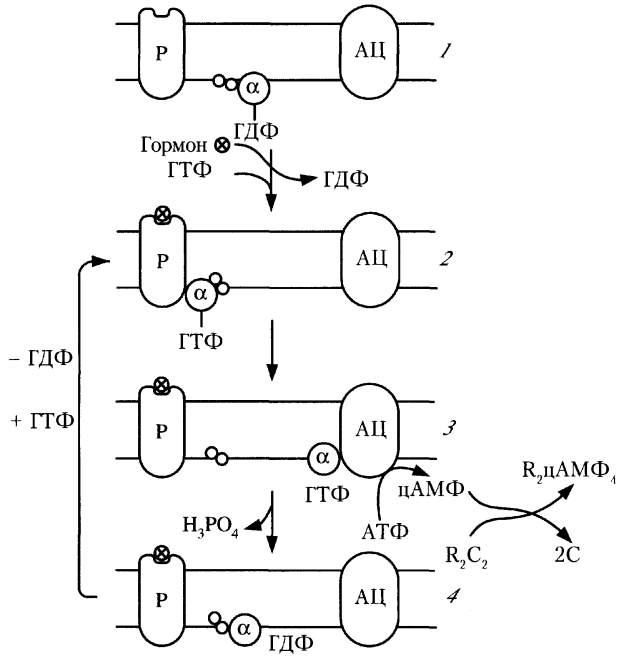


Рис. 7.17. Механизм трансмембранной передачи сигнала в аденилатциклазной системе

остается связанным с гормоном, то система приходит в состояние 2, и далее в состояния 3, и 4, и снова 2, и т. д. Если же гормон исчезает, то состояние 4 переходит в состояние 1. Образование цАМФ прекращается; уже имеющаяся цАМФ разрушается фосфодиэстеразой:

$$\text{цАМФ} + H_2O \rightarrow \text{АМФ}$$

Но система находится в готовности вновь включиться, когда в крови появится соответствующий гормон.

Активный центр аденилатциклазы экспонирован на внутренней поверхности мембраны, цАМФ освобождается в цитозоль. Гормон называют первым, или внеклеточным, вестником сигнала, а цАМФ — вторым (внутриклеточным) вестником.

При участии цАМФ происходит активация протеинкиназы А (см. рис. 2.29 и 7.17). Процесс активации обратимый, следовательно концентрация активной протеинкиназы пропорциональна концентрации цАМФ. Далее протеинкиназы изменяют скорость определенных метаболических процессов путем фосфорилирования ферментов.

Инозитолфосфатная система

Главными мембранными компонентами этой системы служат рецептор гормона, белок G_{plc}, фосфолипаза С, субстрат этого фермента фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат ($ФИФ_2$) и протеинкиназа С. В инозитолфосфатной системе в роли вторых вестников участвуют инозитол-1,4,5-трисфосфат ($ИФ_3$,), диацилглицерин (ДАГ) и ионы Ca^{2+}.

$ФИФ_2$ образуется из фосфатидилинозитола (формула приведена в начале главы, рис. 7.4). $ИФ_3$ и ДАГ образуются из $ФИФ_2$ путем гидролиза фосфолипазой С (рис. 7.18).

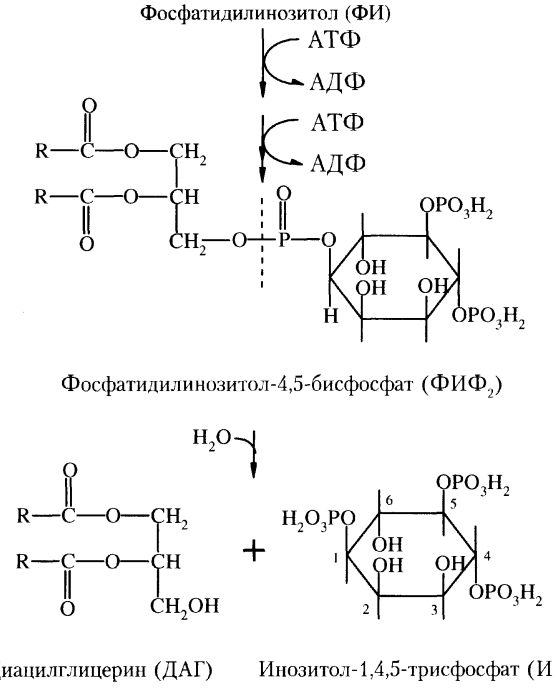


Рис. 7.18. Образование инозитол-1,4,5-трисфосфата и диацилглицерина. Вертикальная пунктирная линия указывает связь, гидролизуемую фосфолипазой С

Начало трансмембранной передачи сигнала в этой системе сходно с тем, что происходит в аденилатциклазной системе на стадиях 1, 2 и 3 (см. рис. 7.17): участвуют гормон, рецептор, белки G (но не те же, а несколько отличающиеся от белков G аденилатциклазной системы). Место аденилатциклазы в инозитолфосфатной системе занимает фосфолипаза С: она активируется α-протомером белка G (рис. 7.19). Далее фосфолипаза С катализирует образование диацилглицерина и $ИФ_3$.

Инозитолтрисфосфат как вещество гидрофильное выходит в цитозоль и участвует в регуляции концентрации Ca^{2+}, а диацилглицерин (гидрофобное вещество), оставаясь в мембране, участвует в активации протеинкиназы С (ПКС). Таким образом, сигнал, принятый рецептором клетки, раздваивается.

Путь инозитолтрисфосфат–Ca^{2+}

Ионы Ca^{2+} регулируют большое число биохимических процессов — от активации или ингибирования ряда ферментов до таких сложных, как нервная и мышечная возбудимость или пролиферация клеток. Регуляция происходит путем изменения концентрции Ca^{2+}, так же, как и в случае гормонов, цАМФ, $ИФ_3$ и других

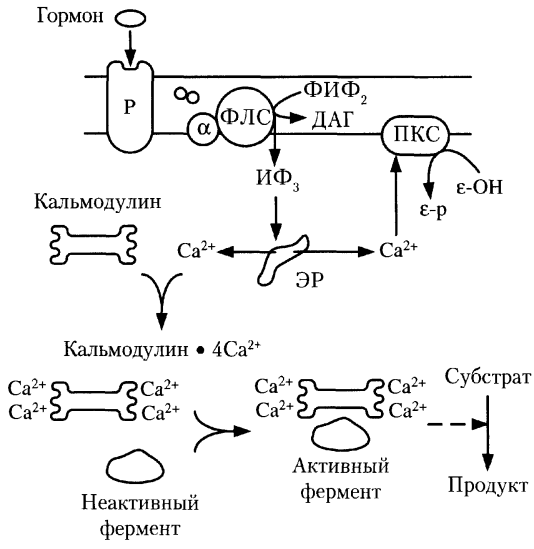


Рис. 7.19. Инозитолфосфатная система

регуляторных молекул органической природы. Изменения концентрации таких молекул связаны с их синтезом или распадом, в то время как в случае Ca^{2+} изменение концентрации возможно только путем перекачки из одного места в другое: из клеток в межклеточное пространство или в обратном направлении, из цистерн эндоплазматического ретикулума в цитозоль и др.

$ИФ_3$ стимулирует пассивный выход Ca^{2+} из полости эндоплазматического ретикулума в цитозоль: кальциевые каналы содержат белок, связывающий Ca^{2+}, и присоединение Ca^{2+} открывает каналы — Ca^{2+} поступает в цитозоль (см. рис 7.19). В цитозоле всех клеток содержится небольшой белок кальмодулин, имеющий четыре центра связывания Ca^{2+} (см. рис. 2.31). При повышении концентрации Ca^{2+} образуется кальмодулин-4Ca^{2+}. Этот комплекс может присоединяться ко многим ферментам и активировать их (в частности, фосфодиэстеразу цАМФ и некоторые протеинкиназы). Сокращение гладких мышц также связано с активацией их ферментов комплексом кальмодулин-4Ca^{2+}. В скелетных и сердечной мышцах ту же роль выполняет аналог кальмодулина — тропонин (см. гл. 23).

Путь ДАГ–протеинкиназа С

В цитозоле клетки находится неактивная форма протеинкиназы С (ПКС), которая при повышении концентрации Ca^{2+} в цитозоле мигрирует к плазматической мембране и соединяется с ней (с фосфолипидами мембраны). Кроме того, Ca^{2+} сильно повышает сродство фермента к диацилглицерину. В результате в мембране формируется четверной комплекс: ПКС–Ca^{2+}–ДАГ–фосфолипид. Это и есть активная форма протеинкиназы С. Протеинкиназа С фосфорилирует многие белки, изменяя их активность.

Возвращение системы в исходное состояние после освобождения рецептора от гормона происходит следующим образом. Повышение концентрации Ca^{2+} в

цитозоле активирует Са-АТФазу плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума: начинается откачка Ca^{2+} из цитозоля в межклеточное пространство и в цистерны эндоплазматического ретикулума. После снижения концентрации Ca^{2+} протеинкиназа С переходит в цитозоль, превращаясь в неактивную форму.

$ИФ_3$ и ДАГ, образовавшиеся в результате действия системы, могут снова превращаться в фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат.

Аденилатциклазная и инозитолфосфатная системы регулируют большое количество разных клеточных процессов, многие из которых будут рассмотрены в последующих главах.

В роли внеклеточных сигналов могут действовать не только гормоны, но и ряд других веществ — цитокины, биогенные амины, нейромедиаторы, ангиотензин и др. Соответственно, существует множество рецепторов. Для зрительных клеток сетчатки глаза внешним сигналом служит свет, а рецептором — белок родопсин (зрительный пурпур, см. гл. 23). Восприятие запахов также происходит с участием мембранных рецепторов.

Белки G образуют семейство белков, сходных по строению и функциям: известно около 20 разных G-белков. В частности, есть белки G_i, которые, в отличие от белков G_S, не стимулируют, а ингибируют аденилатциклазу или фосфолипазу С. Кроме рассмотренных существует ряд других механизмов трансмембранной передачи сигналов с участием G-белков.

Каталитические рецепторы

Ряд систем трансмембранной передачи сигнала содержит рецепторы, обладающие каталитической активностью. Рецептор инсулина (РИ) представляет собой тирозиновую протеинкиназу, т. е. протеинкиназу, фосфорилирующую белки по ОН-группе остатков тирозина. Он построен из двух α-субъединиц и двух β-субъединиц; первые расположены целиком вне клетки, на ее поверхности, а вторые пронизывают плазматическую мембрану (рис. 7.20). Центр связывания инсулина образуют N-концевые домены α-субъединиц. Каталитическая субъединица РИ (β-субъединица) содержит короткий внеклеточный домен, трансмембранный домен и большую внутриклеточную часть. Каталитический Тир-протеинкиназный центр

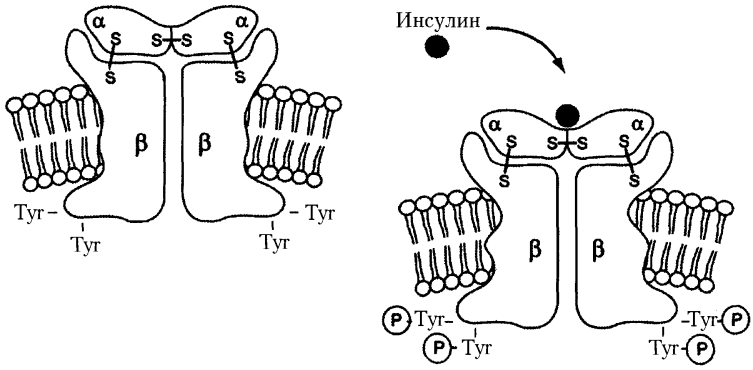


Рис. 7.20. Рецептор инсулина

находится на внутриклеточных доменах β-субъединиц. В этой части имеется ряд остатков тирозина, подверженных фосфорилированию-дефосфорилированию (см. рис. 7.20).

В отсутствие инсулина РИ не проявляет тирозинкиназной активности; присоединение инсулина к центру связывания на α-субъединицах активирует фермент. При этом субстратом служит сам фермент, т. е. происходит аутофосфорилирование: одна β-цепь фосфорилирует другую β-цепь той же молекулы РИ. Фосфорилируется 6–7 тирозиновых остатков.

Фосфорилирование β-субъединиц приводит к изменению субстратной специфичности фермента: теперь он способен фосфорилировать другие внутриклеточные белки — субстраты РИ. Активация и изменение специфичности обусловлены конформационными изменениями РИ после связывания инсулина и после аутофосфорилирования. РИ обнаруживаются в клетках почти всех типов, но в разном количестве. Больше всего их в гепатоцитах (до 250 000 рецепторов на одну клетку) и в адипоцитах (до 50 000); в моноцитах и эритроцитах на порядок меньше. Клетки с разным содержанием рецепторов реагируют по-разному на одну и ту же концентрацию инсулина.

Сигнал, передаваемый через мембранные рецепторы некоторыми эндокринными гормонами (инсулин, гормон роста) и многими цитокинами при участии специальных механизмов, может достигать и ядра — стимулировать или ингибировать транскрипцию определенных генов.

Внутриклеточные рецепторы

Некоторые сигнальные молекулы – стероидные гормоны, витамин D, ретиноевая кислота, тироксин – обладают липофильными свойствами и легко проходят через клеточные мембраны. Рецепторы этих веществ находятся в цитозоле или в ядре клетки; соответственно, комплекс гормона с рецептором может образоваться непосредственно в ядре или образуется в цитозоле, а затем поступает в ядро (рис. 7.21). Комплекс гормон–рецептор связывается с определенной нуклеотидной последовательностью в области энхансера или сайленсера определенного гена. При связывании с энхансером стимулируется транскрипция гена (увеличивается частота инициации транскрипции): количество белка, кодируемого этим геном, в

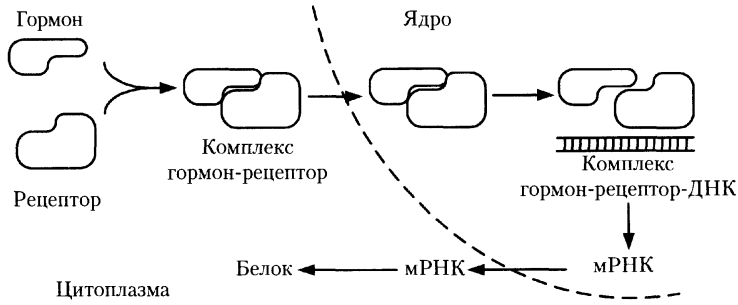


Рис. 7.21. Передача сигнала внутриклеточными рецепторами

клетке увеличивается. При связывании комплекса гормон—рецептор в области сайленсера эффект будет противоположным.

Эндоцитоз

Эндоцитоз — очень распространенная функция клеток, заключающаяся в переносе веществ из среды в клетку вместе с частью плазматической мембраны, путем образования мембраной пузырьков. Таким путем в клетку вводятся как растворенные вещества (вместе с капелькой растворителя — пиноцитоз), так и нерастворимые вещества (частицы) — фагоцитоз. Большинство клеток (если не все) способны к эндоцитозу. Особенно активны в этом отношении лейкоциты, макрофаги, клетки эндотелия капилляров.

Образование эндоцитозного пузырька (рис. 7.22) может начаться без каких либо внешних сигналов: многие клетки образуют эндоцитозные пузырьки ритмично, с постоянной частотой, поглощая внеклеточную жидкость и содержащиеся в ней частицы. В других случаях эндоцитоз индуцируется при контакте мембраны с определенными веществами. Для многих веществ, являющихся нормальными компонентами организма, в мембране имеются специфические рецепторы, улавливающие из крови или межклеточной жидкости комплементарные им лиганды; присоединение лиганда к рецептору индуцирует эндоцитоз. Например, рецепторы плазматической мембраны гепатоцитов улавливают многие гликопротеины плазмы крови, а затем эти белки эндоцитируются (см. гл. 9).

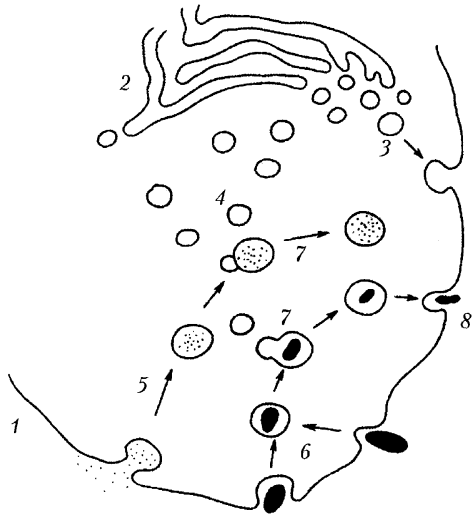


Рис. 7.22. Эндоцитоз и экзоцитоз:

1 — плазматическая мембрана; *2* — пластинчатый комплекс; *3* — включение мембранного пузырька, образованного пластинчатым комплексом, в плазматическую мембрану; *4* — первичные лизосомы; *5* — пиноцитоз; *6* — фагоцитоз; *7* — образование вторичной лизосомы; *8* — экзоцитоз остаточного тельца

В образовании эндоцитозного пузырька участвует ряд специальных белков. Белок клатрин накапливается на мембране с цитозольной стороны в месте эндоцитозного впячивания (получается так называемое окаймленное углубление). Движение мембраны осуществляется сократительными структурами клетки — микрофиламентами. Микрофиламенты содержат сократительные белки актин и

миозин, сходные с актином и миозином мышц. В этом процессе участвуют также микротрубочки, построенные из белка тубулина.

Эндоцитоз — процесс, нуждающийся в энергии; источником последней служит АТФ. Непосредственным потребителем энергии являются сокращающиеся микрофиламенты. Присоединение лиганда к рецепторам изменяет их конформацию, после чего к ним присоединяются микрофибриллы; их сокращение приводит к впячиванию мембраны и отделению пузырька.

В результате эндоцитоза клетка поглощает значительные количества собственной плазматической мембраны. Например, фибробласты «съедают» половину своей мембраны за 1 ч, а макрофаги — даже за 15 мин. Конечно, эти потери компенсируются образованием новой мембраны с такой же скоростью, так что площадь поверхности клетки сохраняется постоянной. Синтез новой мембраны происходит в пластинчатом комплексе. Пластинчатый комплекс — тоже мембранная структура, морфологически представленная цистернами, полостями, трубочками разного размера. Синтез плазматической мембраны — одна из многих функций этого аппарата. В нем образуются компоненты мембраны, затем часть мембраны отшнуровывается от пластинчатого комплекса, образуя пузырек; этот пузырек перемещается к плазматической мембране и сливается с ней (см. рис. 7.22). Липидные компоненты мембраны могут также поставляться транспортными липопротеинами крови (см. гл. 10).

Лизосомы

Лизосомы — это клеточные органеллы, выполняющие роль «уборщиков мусора». Они представляют собой мембранные пузырьки, в которых находятся гидролитические ферменты. Набор гидролаз в лизосомах такой, что они могут деполимеризовать любые полимеры, имеющиеся в организме — белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, липиды. Понятно, что такие ферменты должны быть изолированы от остальной части клетки, чтобы не разрушить ее. Однако эти ферменты лизосом, будучи белками, должны быть и сами каким-то образом защищены от действия протеолитических ферментов. Часто это достигается тем, что ферменты лизосом в высокой степени гликозилированы и поэтому являются плохими субстратами для протеаз.

Лизосомы поглощают и разрушают компоненты, которые поступают в клетку путем эндоцитоза (гетерофагия), а также компоненты клетки после ее гибели (аутофагия). Характерной особенностью содержимого лизосом является кислая реакция среды (pH $\downarrow$ 5), в то время как в других частях клетки реакция близка к нейтральной. Кислая среда в лизосомах создается за счет действия H^+-АТФазы в мембране, перекачивающей протоны внутрь лизосом. Лизосомы, как и плазматическая мембрана, образуются в пластинчатом комплексе (первичные лизосомы).

Гетерофагия. Этот процесс является совокупным результатом эндоцитоза и действия лизосом. Эндоцитозные пузырьки в цитоплазме сливаются с первичными лизосомами, образуя вторичные лизосомы (см. рис. 7.22). Содержимое эндоцитозного пузырька во вторичной лизосоме деполимеризуется, и мономеры утилизируются клеткой. Иногда эндоцитируются вещества, которые не перевариваются ферментами лизосом: они сохраняются в лизосоме, образуя остаточное

тельце. В некоторых случаях остаточные тельца могут удаляться из клетки путем слияния лизосомы с плазматической мембраной (экзоцитоз, см. рис. 7.22).

Наиболее известный пример гетерофагии связан с фагоцитозом бактерий: этот процесс — существенное звено механизмов защиты от инфекций. Некоторые микроорганизмы имеют поверхностную структуру (капсулу), которая препятствует их присоединению к лейкоцитам, и таким образом они избегают фагоцитирования. Однако при иммунном ответе образуются антитела к веществам капсулы бактерий; антитела покрывают поверхность бактерий, и они фагоцитируются лейкоцитами, имеющими рецепторы для антител. Затем эндоцитозный (фагоцитозный) пузырек сливается с первичной лизосомой, и бактерии разрушаются.

Микроорганизмы, паразитирующие внутриклеточно (возбудители проказы, туберкулеза, бруцеллеза и др.), а также некоторые вирусы используют механизм эндоцитоза для проникновения в клетки. Разрушающего действия лизосом они избегают разными способами: одни имеют ингибиторы, препятствующие слиянию эндоцитозных пузырьков с лизосомами; у других есть механизмы защиты от лизосомных ферментов, и они паразитируют внутри лизосом.

Хотя значение фагоцитоза патогенных микроорганизмов очевидно, однако основную массу эндоцитируемого и затем поступающего в лизосомы материала составляют собственные стареющие и погибающие клетки, клеточные фрагменты, растворенные макромолекулы организма. Например, у человека фагоциты каждый день удаляют из кровотока около $3 \cdot 10^{11}$ эритроцитов ($^1/_{120}$ часть всех эритроцитов). Пигментные эпителиальные клетки сетчатки эндоцитируют «состарившиеся» части наружных сегментов палочек. Нарушение этой функции пигментных клеток ведет к пигментозному ретиниту и слепоте. Таким образом, гетерофагия, вместе с пролиферацией клеток, обеспечивает обновление клеточных популяций организма.

Еще одна функция гетерофагии связана с питанием клетки. Всякий акт эндоцитоза и последующей деполимеризации в лизосомах пополняет клеточный фонд веществ. Кроме того, есть формы гетерофагии, специально направленные на доставку в клетки определенных веществ.

Аутофагия. Этим термином обозначают поглощение и переваривание в лизосомах «состарившихся» или поврежденных молекул или органелл собственной клетки. Аутофагия — необходимая часть обновления молекул и органелл клетки (вместе с образованием новых молекул и органелл). Внутриклеточный материал сначала включается в пузырьки, образуемые мембранами эндоплазматического ретикулума, а затем эти пузырьки сливаются с лизосомами. В каждой клетке печени за сутки разрушается около 100 митохондрий ($^1/_{20}$ часть всех митохондрий).

При воспалительных процессах мембранные структуры клеток повреждаются, в том числе и мембраны лизосом. Лизосомные ферменты освобождаются и переваривают клетку; этот процесс может способствовать образованию язв. Разрушение соединительнотканного матрикса при таких заболеваниях, как ревматоидный артрит, миодистрофия, инфаркт миокарда, связано с освобождением лизосомальных ферментов. С другой стороны, гетерофагия и аутофагия участвуют в заживлении ран и воспалительных повреждений тканей, удаляя погибшие клетки или фрагменты клеток.

Регуляция количества мембранных рецепторов

Одна из важных функций эндоцитоза и лизосом связана с регуляцией количества рецепторов, экспонированных на поверхности клетки (рис. 7.23). Например, описанный выше комплекс инсулин–РИ может взаимодействовать с клатрин-окаймленными ямками и интернализоваться. Далее эндоцитозный пузырек сливается с лизосомой, и инсулин во вторичной лизосоме разрушается. Рецептор инсулина тоже может разрушаться, но может и возвращаться в плазматическую мембрану. Во многих типах клеток инсулин стимулирует эндоцитоз и деградацию РИ. Этот процесс можно рассматривать как механизм отрицательной регуляции действия инсулина: уменьшение количества РИ на мембране и, следовательно, ослабление сигналов, инициируемых инсулином, может быть существенным для клетки. Количество множества разных мембранных рецепторов регулируется подобным образом.

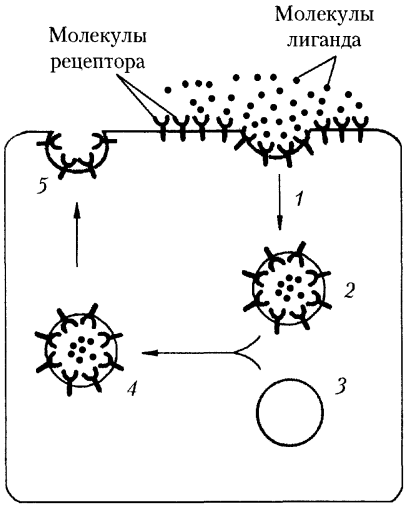


Рис. 7.23. Регуляция количества мембранных рецепторов:

1 — окаймленная ямка; *2* — эндоцитозный пузырек; *3* — первичная лизосома; *4* — вторичная лизосома; *5* — возвращение рецептора в плазматическую мембрану

Внутриклеточный перенос и секреция белков

Многие белки синтезируются на рибосомах, расположенных в цитозоле, и освобождаются в цитозоль. Другие белки, предназначенные для включения в клеточные органеллы или для секреции, синтезируются на рибосомах, связанных с шероховатым эндоплазматическим ретикулумом. Синтез таких белков начинается в цитозоле с образования короткого гидрофобного сигнального пептида. При участии специальных белков рибосома прикрепляется к мембране ретикулума таким образом, что сигнальный пептид своей N-концевой частью оказывается в полости ретикулума (рис. 7.24). Затем трансляция продолжается, сигнальный пептид дорастает примерно до 20 аминокислотных остатков, после чего отщепляется специфической протеазой, а пептидная цепь белка растет и после завершения синтеза оказывается в полости ретикулума. В образовании правильной пространственной структуры в процессе переноса белка через мембрану участвуют шаперо́ны. Затем в пластинчатом комплексе эти белки включаются в везикулы, из

которых могут попадать в конечное место своего назначения: лизосомные белки — в лизосомы, мембранные белки — в плазматическую мембрану; секретируемые белки покидают клетку.

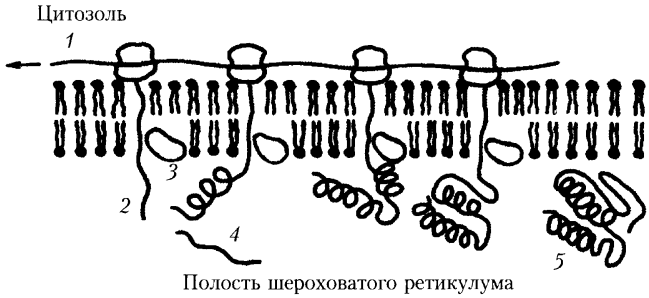


Рис. 7.24. Синтез и трансмембранный перенос белков:

1 — мРНК в составе полирибосомы; *2* — гидрофобная N-концевая часть синтезируемого белка; *3* — пептидгидролаза, отщепляющая гидрофобный конец пептида; *4* — отщепленный гидрофобный пептид; *5–8* — продолжение и завершение синтеза белка

Многие клетки синтезируют макромолекулы «на экспорт», т. е. для использования в других частях организма. К ним относятся белки и гетерополисахариды межклеточного матрикса, белки плазмы крови, пищеварительные ферменты, белковые гормоны, белки и липиды молока. Поскольку мембрана для макромолекул непроницаема, то их секреция происходит путем экзоцитоза, т. е. путем образования внутри клетки мембранных пузырьков, наполненных секретируемым веществом, и их опорожнения во внеклеточную среду. Таким же способом выделяются из клеток и некоторые низкомолекулярные вещества, накапливающиеся и хранящиеся внутри мембранных пузырьков, например адреналин в клетках мозгового вещества надпочечников, нейромедиаторы в синапсах.

Многие секретируемые белки представляют собой гликопротеины; их углеводная часть синтезируется в ходе перемещения белка в полости эндоплазматического ретикулума и пластинчатого комплекса.

В пластинчатом комплексе от мембран отшнуровываются пузырьки, содержащие секретируемый белок (секреторные гранулы). Секреторные гранулы сливаются с плазматической мембраной, освобождая содержимое наружу, т. е. происходит собственно экзоцитоз (конечная стадия секреции).

Есть и другой механизм экзоцитоза, характерный для секреции липидов, например при образовании молока в молочных железах. Жиры в клетках молочной железы образуют капли, свободно взвешенные в цитозоле. Приближаясь к плазматической мембране, жировые капли вызывают образование выпячивания, и в конечном счете от плазматической мембраны отшнуровывается пузырек, содержащий жир. Сходным образом покидают клетку некоторые вирусы; захваченный при этом кусочек плазматической мембраны хозяйской клетки становится оболочкой вириона на время его внеклеточного существования (см. рис. 20.28).

Глава 8

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН

Человек, как и все гетеротрофные организмы, получает энергию за счет разложения органических веществ пищи. Органические вещества в условиях поверхности Земли являются термодинамически нестабильными: они самопроизвольно (необратимо) распадаются. Самопроизвольные процессы — это экзергонические процессы, т. е. они сопровождаются уменьшением свободной энергии ($-\Delta G$), и поэтому могут служить источниками энергии для функционирования живой клетки. В результате самопроизвольного распада в конечном счете образуются термодинамически стабильные продукты. Такими конечными продуктами распада пищевых веществ в организме человека являются диоксид углерода и вода. Еще один из основных конечных продуктов обмена — это мочевина. Она не относится к числу термодинамически стабильных веществ; образование мочевины связано с энергетическим обменом лишь косвенно и служит для выведения избытка азота из организма, поэтому синтез мочевины подробнее рассматривается в связи с обменом аминокислот в гл. 11.

Термодинамически нестабильные вещества могут быть достаточно стабильными кинетически. Например, глюкоза вне организма может сохраняться столетиями, в то время как в организме человека ежесуточно распадается примерно 0,5 кг глюкозы. Кинетическая стабильность в живой клетке преодолевается в результате ферментативного катализа. Основными веществами, за счет которых организм человека обеспечивается энергией, служат углеводы и жиры пищи (табл. 8.1). Меньшее значение имеют белки, однако при преимущественно белковом питании и при голодании их роль значительно возрастает.

Таблица 8.1. Среднее суточное потребление энергии с основными пищевыми веществами у взрослого человека

Вещество	Удельная калорийность		Суточное потребление		
	ккал/г	кДж/г	г	ккал	кДж
Белки	4,1	17	80	328	1 360
Жиры	9,3	39	100	930	3 900
Углеводы	4,1	17	400	1640	6 800
Всего...	–	–	580	2898	12 060

Распад глюкозы до конечных продуктов обмена можно представить следующим уравнением:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = 6CO_2 + 6H_2O + 2850 \text{ кДж/моль}.$$

В углеводах, жирах и белках (аминокислотах) содержание кислорода меньше, чем в конечных продуктах их распада. Иначе говоря, катаболизм этих веществ связан с потреблением кислорода и реакциями окисления. В этом и состоит сущность дыхания, впервые объясненная Лавуазье (1777).

ТКАНЕВОЕ ДЫХАНИЕ

Распад органических веществ в живых тканях, сопровождающийся потреблением кислорода и выделением диоксида углерода, называют тканевым дыханием. Тканевое дыхание можно наблюдать, используя срезы тканей. Если срезы инкубировать в растворе глюкозы в замкнутом сосуде, то в растворе происходит убыль глюкозы, а в воздухе над жидкостью — убыль кислорода и прирост диоксида углерода. Интенсивность тканевого дыхания в разных тканях неодинакова (табл. 8.2).

Таблица 8.2. Потребление кислорода в разных тканях (мкмоль на 1 г ткани за 1 мин)

Ткань	Потребление O_2	Ткань	Потребление O_2
Печень	1,6	Скелетные мышцы:	
Мозг	1,7	в покое	0,08
Сердце	4,5	при беге	6,5
Почки	7,1		

Если этот опыт проводить в присутствии меченого кислорода, то обнаруживается, что весь потребляемый кислород включается в молекулы воды, в то время как в образующемся диоксиде углерода меченый кислород не содержится. Из этого следует, что вдыхаемый кислород используется для синтеза воды за счет водорода окисляемых субстратов (в нашем опыте глюкозы). Процесс можно представить следующим уравнением:

$$DH_2 + {}^1/_2O_2 = D + H_2O + 210 \text{ кДж/моль},$$

здесь DH_2 — дегидрируемые субстраты, которые служат донором водорода (дегидрируются), а кислород выполняет роль акцептора водорода (гидрируется).

Углерод окисляемых веществ превращается в диоксид углерода за счет кислорода самих окисляемых веществ и кислорода воды. Это можно доказать в опытах с применением органических веществ и воды, содержащих меченый кислород. Учитывая результаты приведенных здесь опытов, превращение глюкозы в конечные продукты можно представить уравнениями (а) и (б), которые в сумме дают уравнение (в):

$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + 12A = 6CO_2 + 12AH_2 \quad \text{(а)}$$

$$12AH_2 + 6O_2 = 12H_2O + 12A \quad \text{(б)}$$

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = 6CO_2 + 6H_2O \quad \text{(в)}$$

Уравнение (а) отражает суммарный результат сложного метаболического пути окисления глюкозы, который включает много реакций и промежуточных продуктов. Некоторые промежуточные продукты являются субстратами НАД-зависимых и ФАД-зависимых дегидрогеназ (см. гл. 3): эти продукты (первичные доноры водорода) дегидрируются, причем акцепторами водорода служат коферменты $НАД^+$ и ФАД — переносчики водорода (в уравнениях они обозначены буквой А). Далее происходит перенос водорода с коферментов на кислород — конечный акцептор водорода [уравнение (б)]. Это тоже многостадийный процесс, совершающийся при участии специальной ферментной системы в митохондриях.

Таким же способом — с участием реакций дегидрирования и последующего синтеза воды — окисляются и другие вещества (жиры, аминокислоты) при их использовании клеткой в качестве источников энергии (рис. 8.1).

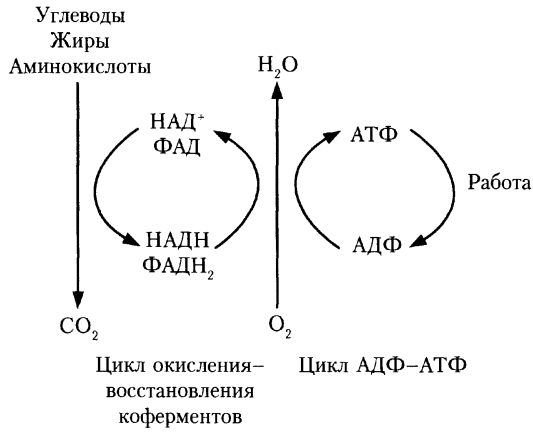
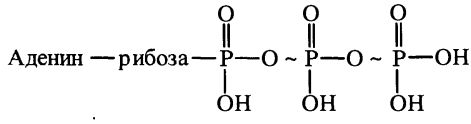


Рис. 8.1. Энергетический обмен

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ АДФ

Энергия окисляющихся веществ используется для синтеза АТФ из АДФ. В молекуле АТФ имеются две высокоэнергетические (макроэргические) связи; в приведенной ниже формуле они изображены знаком ~ (тильда):



В молекуле АДФ только одна высокоэнергетическая связь; в результате синтеза АТФ путем окислительного фосфорилирования добавляется еще одна, т. е. энергия окисления субстрата трансформируется в энергию химических связей в молекуле АТФ (см. рис. 8.1).

Энергия, освобождающаяся при реакциях гидролиза разных веществ, обычно невелика. Если она превышает 30 кДж/моль, то гидролизуемую связь называют высокоэнергетической (макроэргической). Разумеется, эта граница между

высокоэнергетическими и низкоэнергетическими соединениями условна. В табл. 8.3 приведены значения свободной энергии гидролиза некоторых соединений. Величины, приведенные в таблице, рассчитаны для pH 7,0 и стандартных условий, т. е. для концентрации веществ 1 моль/л, температуры 25 °С, давления $1{,}01 \cdot 10^5$Па (1 атм). Условия в живой клетке далеки от стандартных (особенно в отношении концентраций), поэтому свободная энергия гидролиза веществ в клетке может существенно отличаться от приведенных в таблице. Кроме того, в разных отсеках клетки условия неодинаковы. Энергия гидролиза АТФ в зависимости от локализации в клетке может изменяться в пределах примерно от 40 до 60 кДж/моль; в среднем ее принято считать равной 50 кДж/моль.

Таблица 8.3. Энергия Гиббса гидролиза некоторых соединений

Соединение	Продукт реакции	ΔG′, кДж/моль
Фосфоенолпируват	Пируват + H_3PO_4	61,9
1,3-Бисфосфоглицерат	3-Фосфоглицерат + H_3PO_4	54,5
Карбамоилфосфат	Карбамат + H_3PO_4	51,5
Ацетилфосфат	Ацетат + H_3PO_4	47,7
Креатинфосфат	Креатин + H_3PO_4	43,1
АТФ	АМФ + $H_4P_2O_7$	37,4
АТФ	АДФ + H_3PO_4	34,5
АДФ	АМФ + H_3PO_4	36,3
АМФ	Аденозин + H_3PO_4	9,6
$H_4P_2O_7$	$2H_3PO_4$	33,4
Ацетангидрид	2 Ацетат	48,9
Ацетил-КоА	Ацетат + HS-КоА	35,0
Сукцинил-КоА	Сукцинат + HS-КоА	43,5
Глицерофосфат	Глицерин + H_3PO_4	9,2
Глюкозо-6-фосфат	Глюкоза + H_3PO_4	13,8
Глюкозо-1-фосфат	Глюкоза + H_3PO_4	20,9
Мальтоза	2 Глюкоза	16,7
Аланилглицин	Аланин + глицин	16,7
Аспарагин	Аспартат + NH_3	15,1
Лактоза	Глюкоза + галактоза	12,5

Главный путь синтеза АТФ из АДФ — окислительное фосфорилирование; при этом АДФ фосфорилируется неорганическим фосфатом:

$$\text{АДФ} + H_3PO_4 + \text{Энергия} \rightarrow \text{АТФ} + H_2O$$

Реакция энергетически сопряжена с переносом водорода с восстановленных коферментов на кислород. При этом переносе освобождается основная часть энергии окисляемых веществ. Энергия синтеза воды из газообразных H_2 и O_2 составляет 230 кДж/моль; практически столько же получается, если используется водород, входящий в состав органических соединений. Энергетическое сопряжение реакций переноса водорода и синтеза АТФ происходит при участии митохондриальной мембраны и H^+-АТФ-синтетазы (см. ниже).

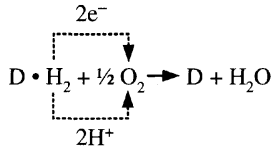
Другой путь синтеза АТФ из АДФ — субстратное фосфорилирование; в этом случае механизм сопряжения не требует участия мембран (см. ниже).

Энергия гидролиза АТФ, в свою очередь, используется для обеспечения разнообразных эндергонических процессов (см. рис. 6.3).

Таким образом, энергия пищевых веществ в клетке трансформируется сначала в энергию АТФ, а затем АТФ служит непосредственным источником энергии для совершения разного рода работы в биохимических и физиологических процессах. Эти превращения энергии и есть то, что обозначают как энергетический обмен. В настоящей главе будет рассмотрена лишь та часть энергетического обмена, которая завершается синтезом АТФ. Что касается процессов использования энергии АТФ, то они рассматриваются во всех разделах учебника.

ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ

Окисление субстратов в процессе дыхания можно представить как перенос электронов и протонов (т. е. в целом — атомов водорода) от органических веществ на кислород:



Этот процесс включает много этапов; в нем участвует ряд промежуточных переносчиков, образующих цепь переноса электронов, или дыхательную цепь. Дыхательная цепь локализована в митохондриях.

СТРОЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ

Митохондрии обычно имеют форму цилиндра с закругленными концами, длиной 1–4 мкм и поперечником 0,3–0,7 мкм (рис. 8.2). Однако в разных клетках размеры и форма митохондрий могут быть существенно различными. Количество митохондрий в разных клетках также различно; гепатоцит содержит около 2000 митохондрий.

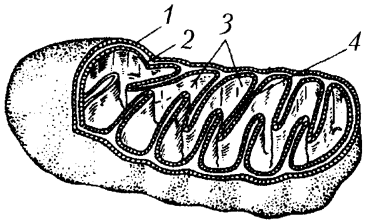


Рис. 8.2. Строение митохондрий:
1 — наружная мембрана; *2* — внутренняя мембрана; *3* — матрикс; *4* — кристы, образованные внутренней мембраной

Митохондрии имеют внешнюю и внутреннюю мембраны, вроде мешка в мешке. Внутренняя мембрана образует многочисленные складки — кристы. Содержимое пространства, ограничиваемого внутренней мембраной, называют матриксом.

Внешняя и внутренняя мембраны сильно различаются по составу, свойствам и функциям. Внешняя мембрана свободно проницаема для молекул с молекулярной массой примерно до 5000, в то время как проницаемость внутренней мембраны ограничена и избирательна: она определяется наличием специфических транспортных систем. Вследствие этого химический состав межмембранного пространства мало отличается от состава цитозоля, тогда как у матрикса он существенно иной.

Компоненты цепи переноса электронов расположены во внутренней мембране митохондрий (рис. 8.3).

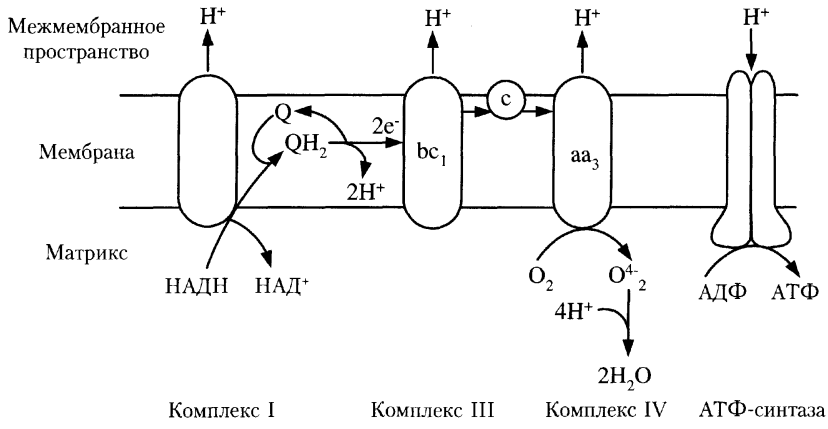


Рис. 8.3. Митохондриальная дыхательная цепь

Водород от первичных доноров вводится в дыхательную цепь с участием НАД-зависимых и ФАД-зависимых дегидрогеназ, описанных в гл. 2. НАД-зависимые дегидрогеназы, имеющиеся в матриксе митохондрий, переносят водород на НАД (образуется НАДН, см. рис. 2.9 и 2.10). Далее НАДН-дегидрогеназа внутренней мембраны митохондрий (комплекс I на рис. 8.3) переносит водород на убихинон (Q), образуется убихинол (QH_2):

$$НАДН + H^+ + Q \rightarrow НАД^+ + QH_2$$

НАДН-дегидрогеназа (комплекс I) представляет собой ФМН-содержащий фермент. В процессе реакции водород сначала присоединяется к ФМН, соединенному с ферментом, а затем передается на убихинон (см. рис. 2.12 и 2.14).

Затем в дыхательной цепи пути электронов и протонов расходятся. Перенос электронов осуществляется с помощью цитохромов. Цитохромы представляют собой гемопротеины (геминовые ферменты). Атом железа в геме цитохромов может менять валентность, присоединяя или отдавая электрон:

$$Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$$

$$Fe^{2+} - e^- \rightarrow Fe^{3+}$$

Цитохромы дыхательной цепи обозначают буквами *b*, c_1, *c*, *a* и a_3.

Комплекс III, включающий цитохромы *b* и c_1, функционирует как QH_2-дегидрогеназа: он осуществляет перенос электронов с QH_2 на цитохром *c:*

$$QH_2 + 2c(Fe^{3+}) \rightarrow Q + 2H^+ + 2c(Fe^{2+})$$

Электроны последовательно проходят через атомы железа цитохромов *b* и c_1, а затем поступают на цитохром *c;* протоны при этом освобождаются в раствор. Стехиометрический коэффициент 2 перед символом цитохрома обусловлен тем, что с QH_2 передаются два электрона, а цитохромы за один цикл переносят по одному электрону.

Комплекс IV, включающий цитохромы *a* и a_3, действует как цитохромоксидаза (цитохром-с-оксидаза). Цитохромоксидаза, помимо гема, содержит ионы меди, которые тоже участвуют в переносе электронов, меняя валентность:

$$Cu^{2+} + e^- \rightarrow Cu^+$$

$$Cu^+ - e^- \rightarrow Cu^{2+}$$

Этот комплекс цитохромов переносит электроны с цитохрома *c* на кислород:

$$4c(Fe^{2+}) + O_2 \rightarrow 4c(Fe^{3+}) + O_2^{4-}$$

Электроны последовательно присоединяются к ионам железа цитохромов *a* и a_3, затем к иону меди и, наконец, попадают на кислород.

Кислород, поступающий в митохондрии из крови, связывается с атомом железа в геме цитохрома a_3 в форме молекулы O_2 (подобно тому, как он связывается с гемоглобином). Затем каждый из атомов молекулы O_2 последовательно присоединяет по два электрона и по два протона, превращаясь в молекулу воды:

$$O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$$

Цитохромоксидаза имеет гораздо более низкую $K_м$ (т. е. высокое сродство) к кислороду, чем гемоглобин, и поэтому клетки «высасывают» кислород из крови.

Таким путем через дыхательную цепь атомы водорода пищевых веществ достигают конечного акцептора — атмосферного кислорода.

НАДН-дегидрогеназа, QH_2-дегидрогеназа и цитохромоксидаза — это крупные малоподвижные комплексы, в то время как убихинон — некрупная липофильная молекула. Перемещаясь в липидном слое мембраны, убихинон обеспечивает передачу электронов между комплексами I–III и II–III. Цитохром *c* — небольшой липофильный белок, локализован на внешней стороне внутренней мембраны (см. рис. 8.3), тоже легко диффундирующий в мембране.

ФАД-зависимые дегидрогеназы (сукцинатдегидрогеназа, дегидрогеназа жирных кислот и др.) переносят водород тоже на убихинон (рис. 8.4; см. также рис. 2.14). Сукцинатдегидрогеназа обозначается как комплекс II.

Комплексы I, II и III содержат так называемое негеминовое железо (железосерные центры, центры FeS). Различают два типа таких центров: Fe_4S_4 и Fe_2S_2.

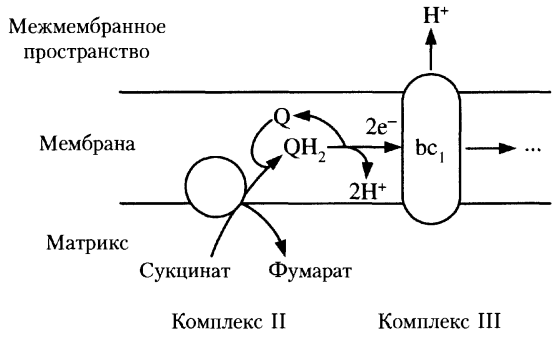


Рис. 8.4. Перенос электронов в дыхательной цепи, начинающийся с ФАД-зависимых дегидрогеназ

В центрах Fe_4S_4 железо соединено с четырьмя атомами свободной серы и с четырьмя атомами серы цистеиновых остатков белков (рис. 8.5). Центры FeS тоже участвуют в переносе электронов: железо в них может быть в восстановленном Fe^{2+} или окисленном Fe^{3+} состоянии.

В организме человека митохондриальная дыхательная цепь образует 300–400 мл воды за сутки (метаболическая вода). Некоторые жуки-чернотелки, обитающие в абсолютно сухих пустынях, получают воду только в результате тканевого дыхания, питаясь сухими пылевидными остатками растений, которые приносит ветер.

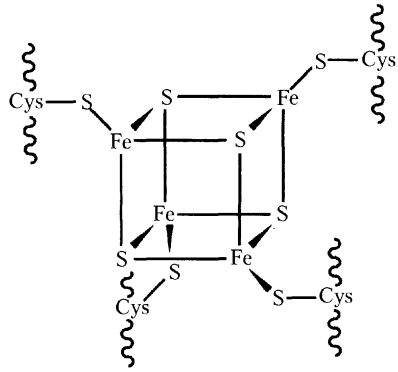


Рис. 8.5. Строение железосерных центров

ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ ПЕРЕНОСЧИКОВ ЭЛЕКТРОНОВ

В окислительно-восстановительных реакциях изменения свободной энергии пропорциональны способности реагентов отдавать или получать электроны. Поэтому описание изменений свободной энергии возможно не только в терминах ΔG^0, но и в численной форме, в величинах окислительно-восстановительных потенциалов (E^0). Отношения между E^0 и G^0 описываются уравнением

$$-\Delta G^0 = nF\Delta E^0,$$

где ΔG^0 — стандартная свободная энергия реакции; n — число электронов, участвующих в реакции; F — постоянная Фарадея; ΔE^0 — разность между значениями окислительно-восстановительных потенциалов исходных веществ и продуктов реакции.

В табл. 8.4 приведены окислительно-восстановительные потенциалы, рассчитанные для стандартных условий. В этом перечне способность отдавать электроны (т. е. окисляться) убывает сверху вниз, а способность присоединять электроны (восстанавливаться) нарастает сверху вниз. Перемещение электронов в дыхательной цепи происходит по градиенту окислительно-восстановительного потенциала. Окислен-

Таблица 8.4. Окислительно-восстановительные потенциалы некоторых компонентов дыхательной цепи

Вещество		E^0, В (pH 7)
восстановленная форма	окисленная форма	
НАД • Н	НАД	– 0,32
Убихинол	Убихинон	+ 0,10
Цитохром *b* (Fe2+)	Цитохром *b* (Fe3+)	+ 0,12
Цитохром *c*1 (Fe2+)	Цитохром *c*1 (Fe3+)	+ 0,21
Цитохром *c* (Fe2+)	Цитохром *c* (Fe3+)	+ 0,25
Цитохром *a*3 (Fe2+)	Цитохром *a*3 (Fe3+)	+ 0,29
$2H_2O$	O_2	+ 0,82

ная форма вещества может окислять восстановленную форму любого вещества, расположенного ниже в таблице, а восстановленная форма может восстанавливать окисленную форму любого вещества, расположенного выше.

Общая разность окислительно-восстановительных потенциалов между НАДН и O_2 равна: 1,14 В [0,82 – (–0,32) = 1,14]; этому соответствует разность свободных энергий ΔG, равная –220 кДж в пересчете на каждую пару переносимых электронов. Такого количества энергии хватило бы на синтез четырех молекул АТФ. Однако в действительности может синтезироваться не более трех молекул АТФ. Отметим, что энергия синтеза воды из молекулярного водорода и молекулярного кислорода равна 230 кДж/моль, т. е. несущественно отличается от энергии синтеза воды при переносе водорода с НАДН на молекулярный кислород в живой клетке.

МЕХАНИЗМ СОПРЯЖЕНИЯ ОКИСЛЕНИЯ С ФОСФОРИЛИРОВАНИЕМ

Ферменты цепи переноса электронов фиксированы в митохондриальной мембране таким образом, что их действие векторно, т. е. характеризуется не только величиной скорости реакции, но и пространственной направленностью, подобно действию транспортных АТФаз. Основным проявлением векторности в дыхательной цепи является перенос ионов водорода с внутренней стороны мембраны (со стороны матрикса) на наружную (в межмембранное простраство).

В дыхательной цепи есть три пункта, связанные с перекачкой протонов: комплексы I, III и IV (см. рис. 8.3).

Кофермент Q при участии НАДН-дегидрогеназы (комплекс I) присоединяет электроны (а также протоны) от компонентов дыхательной цепи с матриксной стороны мембраны, а освобождаются электроны и протоны на противоположной стороне мембраны, причем электроны акцептируются очередным компонентом дыхательной цепи, а протоны уходят в межмембранное пространство. Такой механизм называют Q-циклом. Сходным образом действует и цитохром-с-редуктаза (комплекс III). В области цитохромоксидазы (комплекс IV) в перекачке протонов, возможно, участвуют ионы Cu^{2+}.

Перенос двух электронов через каждый комплекс обеспечивает перекачку четырех протонов. Таким образом, цепь переноса электронов работает как протонный насос, перекачивая ионы водорода из матрикса на наружную сторону мембраны.

В результате по сторонам мембраны возникает разность концентраций протонов и одновременно разность электрических потенциалов со знаком «плюс» на наружной поверхности. Иначе говоря, энергия разности окислительно-восстановительных потенциалов веществ трансформируется в энергию протонного электрохимического потенциала $\Delta\mu H^+$.

Электрохимический потенциал понуждает протоны двигаться в обратном направлении — с наружной поверхности внутрь. Однако мембрана непроницаема для них, за исключением участков, где располагается фермент H^+АТФ-синтетаза (см. рис. 8.3), катализирующий такую реакцию:

$$АДФ + H_3PO_4 \rightarrow АТФ + H_2O$$

АТФ-синтетаза — очень крупный олигомерный белок, в котором выделяют три части: выступающую в матрикс митохондрии часть (F1), построенную из трех пар димеров αβ; трансмембранную часть (F0), образующую гидрофильный канал, и промежуточную область FA. Субъединица F1 содержит активные центры, синтезирующие АТФ. Протоны движутся через канал АТФ-синтазы, и энергия этого движения используется для образования АТФ. Конкретные механизмы сопряжения, т. е. трансформации электрохимического потенциала в энергию макроэргической связи АТФ, все еще не вполне ясны.

Образующаяся АТФ при участии АДФ-АТФ-транслоказы транспортируется из матрикса на наружную сторону мембраны и попадает в цитозоль. Одновременно та же транслоказа переносит АДФ в обратном направлении, из цитозоля в матрикс митохондрии.

В искусственных условиях, в опытах *in vitro* можно создать избыток АТФ со стороны внутренней поверхности внутренней мембраны. В этом случае реакция идет справа налево, т. е. фермент работает как транспортная АТФаза, переносящая протоны (H^+-АТФаза). Мембрана при этом энергизуется: $\Delta\mu H^+$ возникает за счет энергии гидролиза АТФ.

КОЭФФИЦИЕНТ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

В расчете на каждый атом поглощенного кислорода (или на каждую пару переносимых электронов) митохондрии образуют максимум три молекулы АТФ (т. е. связывают три молекулы H_3PO_4 с АДФ). Отношение количества связанной H_3PO_4 к количеству поглощенного кислорода (О) называют коэффициентом фосфорилирования и обозначают Р/О; следовательно, коэффициент Р/О ≤ 3. ФАД-зависимые дегидрогеназы мембраны митохондрий не являются протонными насосами (см. рис. 8.4): в этом случае в цепи переноса электронов действуют только два пункта перекачки протонов — комплексы III и IV, и коэффициент Р/О не может быть больше двух.

Эти величины отражают теоретический максимум синтеза АТФ. Фактически часть энергии электрохимического потенциала используется не для синтеза АТФ, а для переноса веществ через митохондриальную мембрану при участии транслоказ по механизмам симпорта и антипорта.

Человек за сутки потребляет из воздуха около 600 л (~ 27 моль) кислорода. Подавляющая часть кислорода (примерно 90 %) восстанавливается до воды при участии дыхательной цепи. Если считать, что в митохондриях восстанавливается 25 моль O_2 (т. е. 50 моль атомарного кислорода), а коэффициент Р/О = 2,5, то в митохондриях организма синтезируется 50 • 2,5 = 125 моль АТФ, т. е. около 60 кг АТФ в сутки. Конечно, такое же количество АТФ и распадается за сутки: эта величина характеризует не общую массу АТФ в организме, а скорость кругооборота АТФ–АДФ. Общее содержание АТФ в организме невелико, порядка 50 г. Каждая молекула АТФ расщепляется и вновь регенерируется 2500 раз в сутки, так что средняя продолжительность ее жизни меньше 1 мин. На каждое сокращение сердечной мышцы расходуется около 2 % имеющейся в ней АТФ. Вся АТФ израсходовалась бы за 1 мин, если бы не было ее регенерации. При образовании тромба в коронарной артерии поступление кислорода в клетки прекращается, соот-

ветственно прекращается и регенерация АТФ, и клетки погибают (инфаркт миокарда).

ДЫХАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ

Сопряжение окисления с фосфорилированием в митохондриях отличается прочностью: если невозможен синтез АТФ, то прекращается и перенос электронов в дыхательной цепи. Суммарный результат окисления НАДН и фосфорилирования АДФ в дыхательной цепи можно представить следующим образом:

$$НАДН + H^+ + 1/2\ O_2 \rightarrow НАД^+ + H_2O;$$

$$3АДФ + 3\ H_3PO_4 \rightarrow 3АТФ + 3H_2O.$$

Эти реакции можно изучать *in vitro* в суспензии митохондрий. Если в инкубационной смеси есть все исходные вещества, за исключением АДФ, то поглощения O_2 (дыхания) не наблюдается. После внесения АДФ сразу же начинается и дыхание, и синтез АТФ; по мере расходования АДФ скорость дыхания снижается и совсем прекращается, когда вся АДФ превратится в АТФ.

Зависимость дыхания митохондрий от концентрации АДФ называют дыхательным контролем. Этот механизм регуляции имеет очень важное значение, так как в результате его действия скорость синтеза АТФ определяется потребностью клетки в энергии: при увеличении расходования АТФ в клеточных процессах (реакции, катализируемые синтетазами, транспорт ионов и др.) увеличивается концентрация АДФ, а это автоматически ведет к ускорению дыхания и фосфорилирования. Можно сказать, что темп работы митохондриям задается фактическими затратами АТФ.

Механизм дыхательного контроля отличается высокой чувствительностью и точностью, поэтому относительные концентрации АТФ и АДФ в тканях изменяются в узких пределах, в то время как потребление энергии клеткой (т. е. частота оборотов цикла АДФ–АТФ) может изменяться в десятки раз.

РАЗОБЩЕНИЕ ОКИСЛЕНИЯ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Некоторые вещества разобщают окисление и фосфорилирование. Примером может служить 2,4-динитрофенол (рис. 8.6). Это липофильное вещество легко диффундирует через митохондриальную мембрану как в ионизированной, так и в неионизированной форме и, следовательно, может переносить ионы водорода через мембрану в сторону их меньшей концентрации. Поэтому 2,4-динитрофенол уничтожает $\Delta\mu H^+$ митохондриальной мембраны, а энергия рассеивается в форме

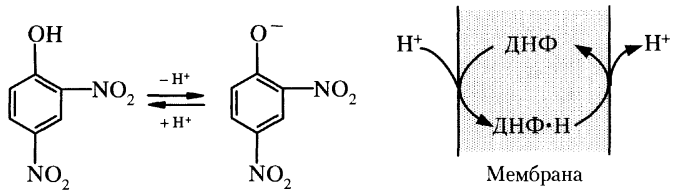


Рис. 8.6. Действие динитрофенола на трансмембранный потенциал

теплоты. Потребление кислорода и окисление субстратов при этом продолжаются, но синтез АТФ, естественно, невозможен.

Поскольку энергия окисления при разобщении рассеивается в форме теплоты, то разобщители повышают температуру тела (пирогенное действие).

ОБЩИЙ ПУТЬ КАТАБОЛИЗМА

В пище человека практически не содержатся готовые первичные доноры водорода, служащие субстратами для дегидрогеназ; они образуются в ходе катаболизма пищевых веществ.

В процессах катаболизма можно выделить два типа путей: специфические пути катаболизма, разные для разных классов веществ, и общий путь катаболизма, который служит единым продолжением специфических путей (рис. 8.7). В результате специфических путей катаболизма продукты переваривания пищевых веществ (моносахариды, глицерин, жирные кислоты, аминокислоты) превращаются всего в два вещества — пировиноградную кислоту и ацетильный остаток в молекуле ацетил-КоА, т. е. происходит значительное уменьшение разнообразия веществ.

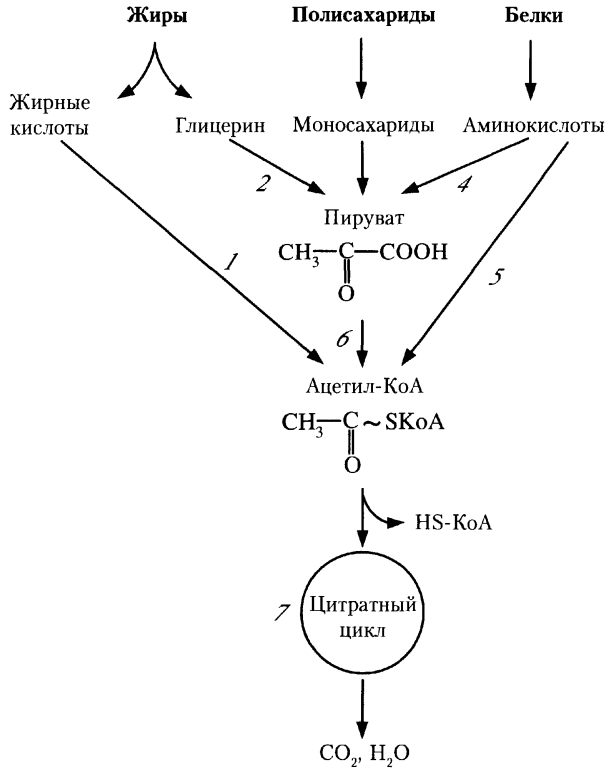


Рис. 8.7. Катаболизм основных пищевых веществ:

1–5 — специфические пути катаболизма; *6, 7* — общий путь катаболизма

К общему пути катаболизма относятся окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты и цитратный цикл. Некоторые специфические пути вливаются в общий путь на стадии пирувата, другие — на стадии ацетил-КоА. Ряд веществ вступает в общий путь катаболизма на промежуточных стадиях цитратного цикла. Именно в общем пути катаболизма образуется основная масса первичных доноров водорода для дыхательной цепи, хотя они образуются и в специфических путях катаболизма.

Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты

В результате окислительного декарбоксилирования пирувата образуются ацетил-КоА, восстановленный НАД и диоксид углерода:

$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH + HS\text{-}KoA + НАД^+ \rightarrow CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-S\text{-}KoA + НАД{\bullet}H + H^+ + CO_2$$

Эта схема представляет собой суммарный результат многостадийного процесса, который катализируется сложной ферментной системой — пируватдегидрогеназным комплексом. Комплекс содержит три фермента: пируватдекарбоксилазу, ацетилтрансферазу и дегидрогеназу дигидролипоевой кислоты. Кроме того, в реакциях участвуют пять коферментов: НАД, ФАД, тиаминдифосфат, липоевая кислота и кофермент А (КоА).

Первую реакцию процесса катализирует пируватдекарбоксилаза (Е1, рис. 8.8). Субстратами этого фермента служат пируват и дигидролипоевая кислота, которая является простетической группой второго фермента — дигидролипоат-ацетилтрансферазы (Е2).

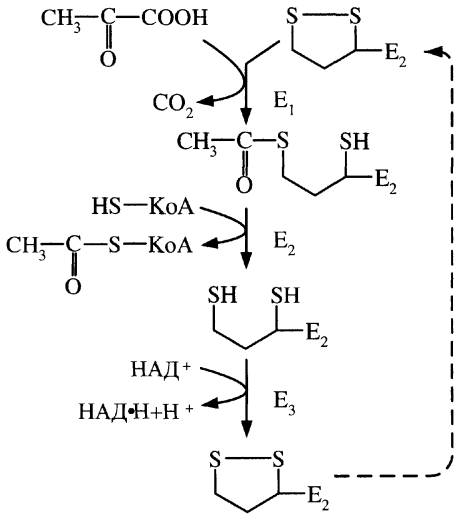


Рис. 8.8. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты

Липоевая кислота (рис. 8.9) содержит дисульфидную группу в составе пятичленного гетероцикла и боковую цепь; своей карбоксильной группой липоевая кислота соединена амидной связью с ε-аминогруппой остатка лизина, входящего в пептидную цепь ацетилтрансферазы.

В результате действия пируватдекарбоксилазы (Е1) от пировиноградной кислоты отщепляется карбоксильная группа, а ацетильный остаток присоединяется к атому серы липоевой кислоты, т. е. получается ацетиллипоат-Е2.

Пируватдекарбоксилаза — сложный белок: он содержит тиаминдифосфат, выполняющий роль кофермента (рис. 8.10). Тиаминдифосфат — это производное витамина B_1 (тиамина) и пирофосфорной кислоты. Декарбоксилирование пирувата происходит при прямом участии тиаминдифосфата: в ходе реакции к атому углерода тиазолового кольца (на рис. 8.10 помечен

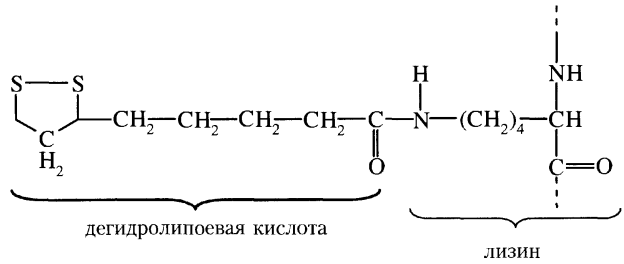


Рис. 8.9. Липоильный остаток в составе ацетилтрансферазы

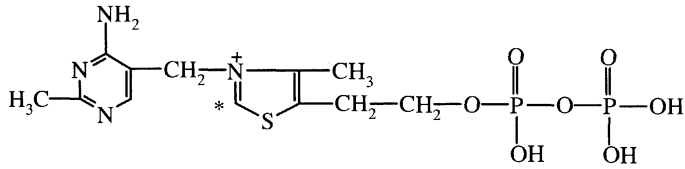


Рис. 8.10. Тиаминдифосфат

звездочкой) присоединяется промежуточный продукт превращения пирувата — оксиэтильный остаток CH_3–CHOH–, который затем переносится на липоевую кислоту, превращаясь при этом в ацетильный остаток CH_3–CO–.

Второй фермент комплекса — дигидролипоат-ацетилтрансфераза — катализирует перенос ацетильного остатка, соединенного с его (фермента 2) собственной простетической группой, на КоА; при этом получаются дигидролипоевая кислота (в составе ацетилтрансферазы) и ацетил-КоА.

Третий фермент — дегидрогеназа дигидролипоевой кислоты (Е3). Акцептором водорода в реакции служит НАД. В результате дегидрирования дигидролипоевая кислота превращается в начальную форму — дегидролипоевую кислоту, и пируватдегидрогеназный комплекс может реагировать с очередной молекулой пирувата. Дигидролипоилдегидрогеназа содержит в качестве кофермента ФАД, который служит промежуточным акцептором водорода.

Таким образом, в окислительном декарбоксилировании пирувата участвует пять коферментов. Три из них — тиаминпирофосфат, липоевая кислота и ФАД — прочно связаны с ферментами комплекса, а два других — КоА и НАД — находятся в свободно растворенном состоянии и служат акцепторами главных конечных продуктов — ацетильного остатка и атомов водорода. Ацетильный остаток затем окисляется в цитратном цикле, а водород с НАДН поступает в цепь переноса электронов и протонов.

Пируватдегидрогеназный комплекс представляет собой крупную частицу с молекулярной массой 7–10 млн. В его состав входит примерно по три десятка молекул Е1 и Е2 и около десятка молекул Е3. Отдельные ферменты соединены друг с другом таким образом, что серосодержащая часть липоевой кислоты, соединенная с Е2 достаточно длинной и гибкой углеводородной цепью, может «наносить визиты» последовательно активному центру Е1, своему собственному активному центру и активному центру Е3. Поэтому комплекс работает подобно конвейеру, в

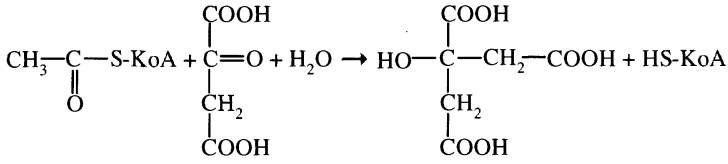
котором полупродукт передается непосредственно от машины к машине. Такая организация пируватдегидрогеназного комплекса делает процесс более эффективным: промежуточные продукты не освобождаются в раствор и, следовательно, устраняется зависимость встречи реагирующих веществ от диффузии и случайности.

Пируватдегидрогеназный комплекс — митохондриальный фермент: он соединен с внутренней мембраной со стороны матрикса; пируват поступает к комплексу из матрикса, и сюда же освобождаются ацетил-КоА и НАДН.

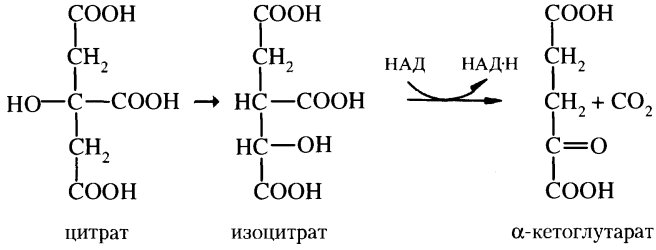
Цитратный цикл

В цикле лимонной кислоты (цитратный цикл, цикл Кребса, цикл трикарбоксильных кислот) ацетильный остаток, входящий в ацетил-КоА, образует ряд первичных доноров водорода. Далее водород при участии дегидрогеназ поступает в дыхательную цепь. В результате сопряженного действия цитратного цикла и дыхательной цепи ацетильный остаток окисляется до CO_2 и H_2O.

Процесс начинается с конденсации ацетильного остатка (из ацетил-КоА) и оксалоацетата (щавелевоуксусной кислоты) при участии цитратсинтазы; в реакции образуется лимонная кислота:



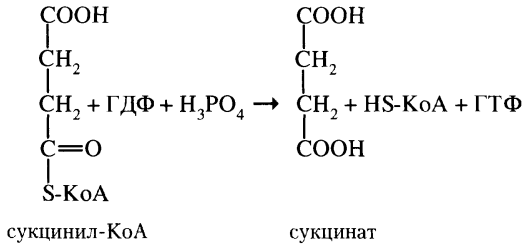
Лимонная кислота изомеризуется в изолимонную кислоту при участии аконитазы (в качестве промежуточного продукта в составе фермент-субстратного комплекса образуется аконитовая кислота). Далее при действии изоцитратдегидрогеназы изолимонная кислота дегидрируется и одновременно декарбоксилируется, превращаясь в α-кетоглутаровую кислоту:



Продукт последней реакции, подобно пирувату, представляет собой α-кетокислоту: общая формула для них R-CO-COOH. Подобно пирувату, α-кетоглутарат подвергается окислительному декарбоксилированию; это превращение катализирует α-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс, сходный по структуре и катализируемым реакциям с пируватдегидрогеназным комплексом. Суммарный результат действия α-кетоглутаратдегидрогеназного комплекса следующий:

$$\alpha\text{-Кетоглутарат} + HS\text{-КоА} + НАД^+ \rightarrow \text{Сукцинил-КоА} + НАДН + H^+ + CO_2.$$

Сукцинил-КоА — это аналог ацетил-КоА. Связь, соединяющая ацильные остатки с КоА, является высокоэнергетической. В случае сукцинил-КоА энергия этой связи используется для образования высокоэнергетической связи ГТФ; реакцию катализирует сукцинаттиокиназа:

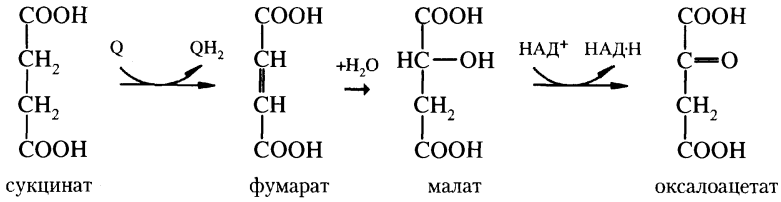


В составе фермент-субстратного комплекса КоА сначала замещается на фосфатный остаток, который затем переносится на ГДФ. Такой путь образования макроэргической связи нуклеозидтрифосфата называют субстратным фосфорилированием; его главное отличие от окислительного фосфорилирования — отсутствие предварительного превращения химической формы энергии в энергию электрохимического потенциала мембраны. Энергия ГТФ может трансформироваться в энергию АТФ при действии нуклеозиддифосфаткиназы:

$$ГТФ + АДФ \rightarrow ГДФ + АТФ.$$

Однако в некоторых процессах в качестве источника энергии используется непосредственно ГТФ.

Последние три реакции цикла, катализируемые сукцинатдегидрогеназой, фумаразой и малатдегидрогеназой, завершаются регенерацией оксалоацетата:



На рис. 8.11 представлена схема цитратного цикла как части общего пути катаболизма.

В общем пути катаболизма распадается трехуглеродное вещество — пировиноградная кислота; соответственно, образуется три молекулы CO_2 (в расчете на 1 молекулу пирувата): одна при окислительном декарбоксилировании пирувата и две за счет окисления ацетильного остатка в цитратном цикле (реакции 3 и 4). Человек за сутки выделяет с выдыхаемым воздухом около 500 л углекислого газа; подавляющая часть его (примерно 90 %) образуется в общем пути катаболизма, в указанных трех реакциях.

Как уже говорилось, пируватдегидрогеназный комплекс фиксирован на внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрий. Сукцинатдегидрогеназа час-

тью своей молекулы выступает в матрикс, а частью — погружена во внутреннюю мембрану: в матриксной части находится центр связывания сукцината, а в погруженной — центр связывания убихинона. Все остальные ферменты цитратного цикла находятся в матриксе митохондрий.

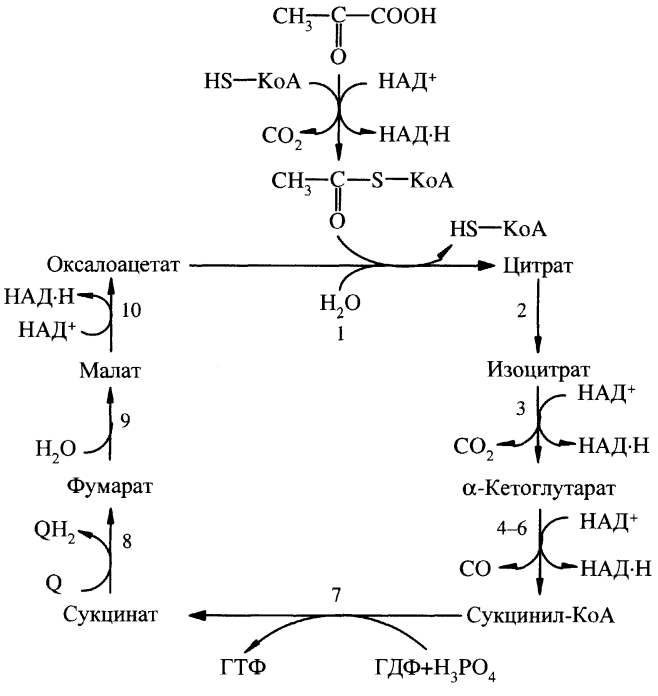


Рис. 8.11. Общий путь катаболизма

Роль общего пути катаболизма в энергетическом обмене

Общий путь катаболизма — это прежде всего путь поставки водорода органических веществ в дыхательную цепь. При сгорании в калориметрической бомбе пируват окисляется в соответствии со следующим уравнением:

$$CH_3{-}CO{-}COOH + 2{,}5\ O_2 = 2H_2O + 3CO_2 + 1200\ \text{кДж/моль}.$$

В живой клетке энергия, заключенная в пирувате, извлекается иным путем — с участием реакций дегидрирования: всего в общем пути катаболизма происходит пять реакций дегидрирования, в которых участвует 10 атомов водорода. Но пировиноградная кислота содержит только 4 атома водорода, т. е. только на две реакции дегидрирования. Еще 6 атомов водорода поступает из двух молекул воды, потребляемых в реакциях цитратного цикла (реакции 1 и 9 на рис. 8.12), и из одной молекулы воды, которая получается в реакции 7 при превращении ГДФ и H_3PO_4 в ГТФ. Следовательно, водород трех молекул воды (в расчете на 1 молекулу пирувата) включается в метаболиты цитратного цикла и в конечном счете попадает в гидрированные коферменты — НАДН или QH_2.

Для непрерывного протекания реакций общего пути катаболизма коферменты, перешедшие в восстановленное состояние, должны снова окислиться. Их окисление происходит путем переноса водорода с коферментов на атмосферный кислород в митохондриальной дыхательной цепи (см. рис. 8.1). Таким образом, общий путь катаболизма и дыхательная цепь представляют собой единый процесс, и эти две его части не могут функционировать отдельно одна от другой.

Энергия переноса водорода с дегидрируемых субстратов общего пути катаболизма на атмосферный кислород используется для синтеза АТФ. При переносе водорода с каждой молекулы НАДН в дыхательной цепи образуется 3 молекулы АТФ. В четырех реакциях дегидрирования в общем пути катаболизма образуется 4 НАДН; следовательно, синтезируется $4 \times 3 = 12$ молекул АТФ. В одной реакции (катализируемой сукцинатдегидрогеназой) водород переносится на убихинон; при дальнейшем переносе в дыхательной цепи в этом случае синтезируется 2 молекулы АТФ. И, наконец, в цитратном цикле происходит одна реакция субстратного фосфорилирования, дающая еще одну молекулу АТФ. Таким образом всего при распаде 1 моль пирувата образуется 15 моль АТФ. Отметим, что 3 из них образуются при окислительном декарбоксилировании пирувата и 12 — в цитратном цикле. Эти величины отражают теоретически возможный максимум синтеза АТФ; фактически АТФ синтезируется меньше, поскольку часть электрохимического потенциала расходуется на перенос разных веществ через мембрану при участии транслоказ.

Регуляция общего пути катаболизма

Как мы видели, скорость дыхания и фосфорилирования в митохондриях зависит от концентрации АДФ и в конечном счете определяется скоростью расходования АТФ (дыхательный контроль). В свою очередь, скорость реакций общего пути катаболизма, поставляющего водород в митохондрии, зависит от скорости дыхания митохондрий и окислительного фосфорилирования. Один из механизмов этой зависимости уже отмечен выше — он связан с необходимостью регенерации $НАД^+$, которая происходит в результате передачи водорода с НАДН в дыхательную цепь митохондрий.

Кроме того, важную роль в регуляции общего пути катаболизма в целом играет регуляция первого звена этого процесса — пируватдегидрогеназного комплекса. Комплекс может быть в двух состояниях — нефосфорилированном (активная форма) и фосфорилированном (неактивная форма). Протеинкиназа, фосфорилирующая комплекс, является одной из его субъединиц. Протеинфосфатаза, дефосфорилирующая комплекс, также связана с комплексом. На рис. 8.12 представлены наиболее существенные регуляторные связи пируватдегидрогеназного комплекса. Главное назначение этого механизма — поддерживать скорости образования пирувата и ацетил-КоА, соответствующие их расходованию. При этом пируват и ацетил-КоА расходуются не только как источники энергии для синтеза АТФ в цитратном цикле, но и в анаболических процессах: при определенных состояниях организма и в определенных органах пируват используется для синтеза глюкозы и аминокислот, а ацетил-КоА — для синтеза жирных кислот (эти процессы подробнее рассматриваются в последующих двух главах). При мышечной работе

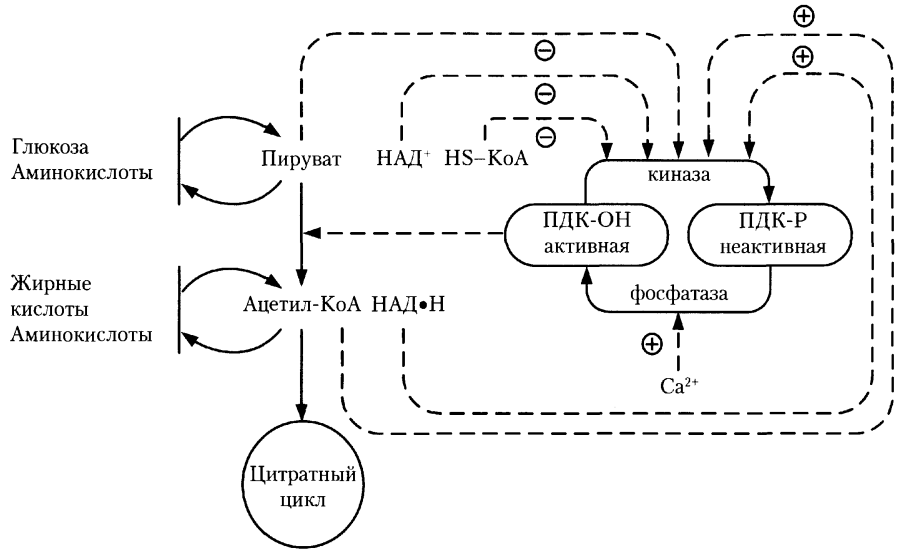


Рис. 8.12. Регуляция пируватдегидрогеназного комплекса

повышается концентрация ионов Ca^{2+} в саркоплазме; ионы Ca^{2+} активируют фосфатазу пируватдегидрогеназного комплекса, в результате фосфорилированный неактивный комплекс превращается в дефосфорилированный активный комплекс.

Избыток ацетил-КоА во всех клетках снижает скорость его синтеза путем стимуляции фосфорилирования ПДК, в результате чего он инактивируется.

Цитратный цикл регулируется по механизму отрицательной обратной связи, с участием аллостерических ферментов. НАДН ингибируют НАД-зависимые дегидрогеназы цикла (рис. 8.13). При уменьшении расхода АТФ активность дыхательной цепи снижается (дыхательный контроль), концентарция НАДН в клетке повышается и ингибирование указанных на рис. 8.13 реакций приводит к снижению активности цитратного цикла в целом.

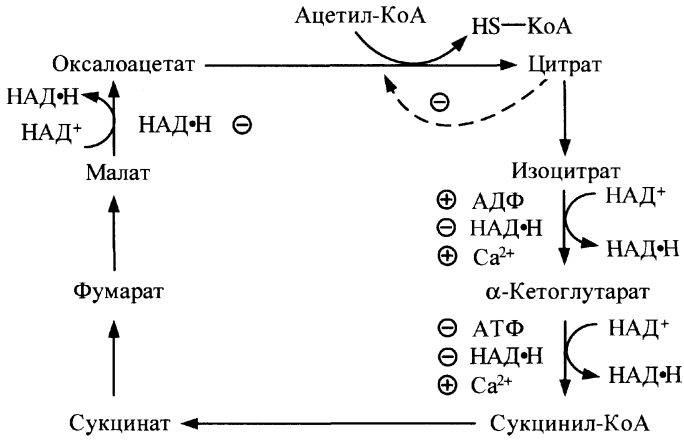


Рис. 8.13. Аллостерические механизмы регуляции цитратного цикла

Энергетический заряд клетки

Ряд реакций общего пути катаболизма зависит от концентрации адениловых нуклеотидов — АТФ, АДФ и АМФ. Суммарная концентрация адениловых нуклеотидов в клетке постоянна, но относительные концентрации могут изменяться вследствие их взаимопревращений. Во многих клетках концентрации АТФ, АДФ и АМФ относятся примерно как 100:10:1 (однако отметим, что это приближенная оценка, в клетках разных типов различия могут быть заметными). Отсюда следует, что небольшие изменения концентрации АТФ могут приводить к значительным изменениям концентрации АДФ и АМФ. Например, если $^1/_{10}$ часть всей АТФ превратится в АДФ, то концентрация АДФ увеличится в 2 раза. Это имеет существенное значение, поскольку изменения активности аллостерических ферментов зависят не от абсолютной концентрации эффекторов, а от амплитуды изменения концентрации.

Для оценки влияния системы адениловых нуклеотидов на метаболические процессы пользуются величиной энергетического заряда клетки:

$$\text{Энергетический заряд} = \frac{[\text{АТФ}] + \frac{1}{2}[\text{АДФ}]}{[\text{АТФ}] + [\text{АДФ}] + [\text{АМФ}]}.$$

Если весь фонд адениловых нуклеотидов представлен только АТФ (максимум высокоэнергетических связей), то энергетический заряд равен единице. Если в клетке имеется только АМФ (высокоэнергетических связей нет), то энергетический заряд равен нулю. В большинстве клеток энергетический заряд равен 0,8–0,9, т. е. адениловая система клетки почти насыщена энергией. При уменьшении энергетического заряда (уменьшение [АТФ], увеличение [АДФ] и [АМФ]) скорость реакций общего пути катаболизма увеличивается, а при увеличении — уменьшается (см. рис. 8.13).

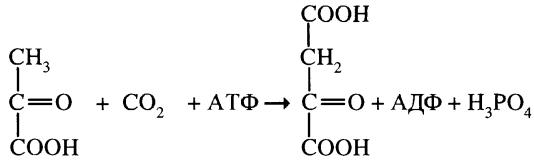
В скелетных мышцах энергетический заряд равен 0,94 как в покое, так и при интенсивной мышечной работе. По-видимому, в мышцах энергетический заряд не выполняет регуляторной функции.

Анаболические функции цитратного цикла и анаплеротические реакции

Общий путь катаболизма выполняет и анаболические функции. Это проявляется в том, что некоторые промежуточные продукты используются для синтеза структурно-функциональных компонентов клетки. Пируват, α-кетоглутарат и оксалоацетат являются кетоаналогами соответственно аланина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты и путем трансаминирования могут превращаться в эти аминокислоты. Ацетил-КоА служит предшественником жирных кислот. Сукцинил-КоА используется для синтеза гема.

В результате каждого оборота цитратного цикла регенерируется щавелевоуксусная кислота, необходимая для начала следующего оборота цикла. Поэтому удаление щавелевоуксусной кислоты или ее предшественников в цикле в другие метаболические процессы привело бы к прерыванию цикла. Это предотвращается тем, что отток метаболитов цитратного цикла компенсируется их образованием в других реакциях. Такие реакции называют анаплеротическими (пополняющими).

Основная анаплеротическая реакция — превращение пировиноградной кислоты в щавелевоуксусную кислоту, главным образом в реакции, катализируемой пируваткарбоксилазой:



Пируваткарбоксилаза содержится только в митохондриях. Фермент построен из четырех субъединиц, каждая из которых содержит прочно связанный ион Mn^{2+} и витамин биотин, выполняющий коферментную функцию (рис. 8.14). Биотин соединен с ферментом амидной связью через ε-аминогруппу остатка лизина.

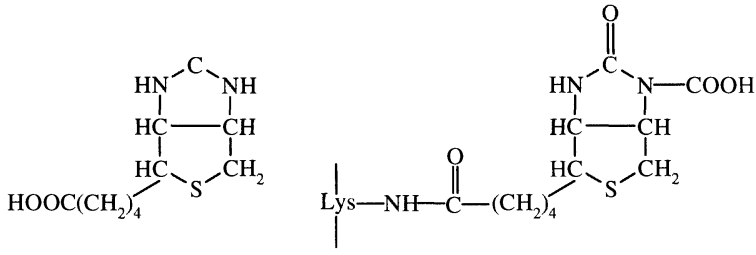


Рис. 8.14. Биотин (слева) и карбоксибиотин в составе фермента

В ходе реакции CO_2 вначале присоединяется к биотину (получается карбоксибиотин), затем переносится на пируват.

Другие анаплеротические реакции связаны с образованием пропионил-КоА из валина, изолейцина и жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов; пропионил-КоА затем превращается в сукцинил-КоА (рис. 8.15). Кроме того, глутаминовая и аспарагиновая кислоты могут превращаться путем трансаминирования в α-кетоглутаровую и щавелевоуксусную кислоты соответственно. При катаболизме тирозина образуется фумаровая кислота.

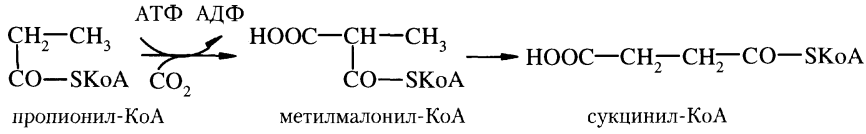


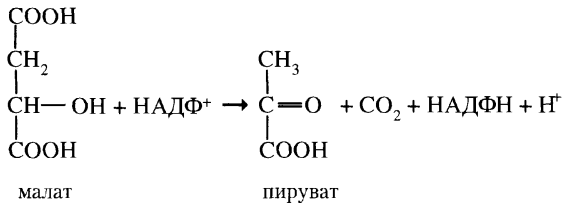
Рис. 8.15. Обмен пропионил-КоА

ОБРАЗОВАНИЕ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ЭКВИВАЛЕНТОВ ДЛЯ АНАБОЛИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

При синтезе многих соединений в живой клетке происходят реакции восстановления путем гидрирования. Источником водорода для восстановительных синтезов служат некоторые метаболиты цитратного цикла, а промежуточным переносчиком

водорода в таких реакциях является НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат). Механизм участия НАДФ в реакциях переноса водорода такой же, как и у НАД: один протон и два электрона присоединяются к пиридиновому циклу остатка никотинамида, один протон остается в растворе. Однако биологические функции НАДФ и НАД различны.

Метаболит цитратного цикла — яблочная кислота, может дегидрироваться с участием НАДФ-зависимой дегидрогеназы. НАДФ-зависимая малатдегидрогеназа (малик-фермент) локализована в цитозоле клетки. В отличие от митохондриальной НАД-зависимой малатдегидрогеназы (см. рис. 8.13, реакция 10), НАДФ-зависимая малатдегидрогеназа катализирует одновременно с дегидрированием и декарбоксилирование малата:



НАДФН, в отличие от НАДН, не может передавать водород в дыхательную цепь: водород НАДФН используется в восстановительных реакциях. Особенно много восстановительных реакций происходит при синтезе жирных кислот и стероидов; в органах с интенсивным синтезом этих веществ (печень, жировая ткань, кора надпочечников) высока и активность НАДФ-зависимых дегидрогеназ. Малат поставляет примерно половину всего водорода, используемого в восстановительных синтезах; другая половина образуется в пентозофосфатном пути распада глюкозы (см. гл. 9).

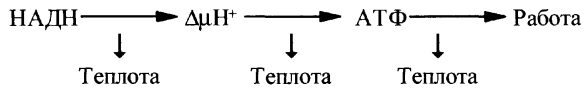
При восстановительных синтезах энергия высокоэнергетического водорода НАДФН не теряется: она сохраняется во вновь синтезированных веществах и во многих случаях может быть использована при их катаболизме. Особенно важное значение имеет такая трансформация энергии при превращении углеводов, поступающих с пищей, в жиры, депонируемые в жировой ткани (см. гл. 9 и 10).

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН И ТЕПЛОПРОДУКЦИЯ

Таким образом, превращения энергии пищевых веществ в организме включают следующие основные этапы:

1) аккумуляция в НАДН или QH_2 — донорах высокоэнергетических электронов;
2) превращение в форму электрохимического потенциала митохондриальной мембраны;
3) аккумуляция в АТФ;
4) использование АТФ для совершения работы.

Разумеется, на всех этапах трансформации часть энергии рассеивается в форме теплоты:



Суммарную реакцию окисления НАДН в дыхательной цепи можно представить следующим образом:

$$НАДН + H^+ + 1/2\ O_2 \rightarrow НАД^+ + H_2O.$$

Свободная энергия этой реакции равна –220 кДж/моль. Если принять, что в АТФ при образовании одной макроэргической связи запасается 50 кДж/моль, а коэффициент фосфорилирования в среднем равен 2,5, то получается, что на этом этапе используется 125 кДж/моль, около половины всей энергии; остальная часть рассеивается. Если же иметь в виду путь не от НАДН, а от пищевых веществ, то оказывается, что эффективность этой машины еще ниже: для синтеза АТФ используется лишь около 25 % энергии пищевых веществ.

При использовании АТФ для совершения работы значительная часть энергии также превращается в теплоту. Именно поэтому при напряженной физической работе, когда синтезируется и расходуется много АТФ, становится жарко: теплоты образуется столько, что включаются специальные физиологические механизмы для удаления ее избытка из организма. Наоборот, при снижении температуры тела включается механизм дрожания (несогласованного сокращения отдельных групп мышечных клеток) для увеличения продукции теплоты.

Основные источники теплоты, поддерживающие температуру тела гомойотермных животных, по-видимому, связаны именно с использованием АТФ. В частности, значительный вклад в образование теплоты вносят транспортные АТФазы. Например, самый распространенный ионный насос Na,K-АТФаза работает непрерывно, обеспечивая вторично-активный перенос веществ и компенсируя диффузию ионов натрия и калия через мембрану. В результате активного переноса и обратной диффузии ионов энергия АТФ в конечном счете превращается в теплоту. В постабсорбтивном периоде и в состоянии покоя, в лежачем или сидячем положении расходование энергии на внешнюю работу минимально, и теплопродукция становится главным путем расхода энергии организмом. Такое состояние энергетического обмена называют основным обменом. В состоянии основного обмена Na,K-АТФаза расходует 20 % (или больше) всей энергии. Интенсивность основного обмена можно оценить количественно по величине теплопродукции. Для взрослого человека она равна примерно 350 кДж/ч (8400 кДж, или 2000 ккал за сутки); это соответствует мощности 100-ваттной лампочки (360 кДж/ч). Однако надо отметить, что расход энергии зависит от размеров тела и примерно линейно пропорционален площади поверхности тела.

В других состояниях энергетические траты складываются из энергии основного обмена и энергии, затрачиваемой на внешнюю работу: при неторопливой пешей прогулке расходуется около 450 кДж/ч, при тяжелой физической работе (например, такой, как работа лесоруба) — до 2000 кДж/ч. Калорийность потребляемой пищи должна быть равна этим тратам; соответственно увеличивается и потребление кислорода.

ГИПОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ

Живая клетка нуждается в АТФ непрерывно, поскольку разнообразные процессы, связанные с использованием АТФ, в клетке никогда не прекращаются. Например, для обновления белков расходуется около 15 % всей энергии основного обмена (т. е. обмена в состоянии покоя), на поддержание трансмембранного градиента концентраций ионов натрия и калия — около 30 %. При переходе к мышечной активности потребность в АТФ многократно увеличивается.

Запасов АТФ в клетке практически не создается. Например, в сердечной мышце АТФ истощается за несколько секунд, если блокирован его синтез. Следовательно, клетка непрерывно должна получать пищевые вещества (доноры водорода) и кислород для поддержания синтеза АТФ. При голодании в качестве источников энергии используются собственные вещества тканей. Энергетический обмен в этих условиях снижен: через две недели голодания потребление кислорода уменьшается на 40 % (алиментарная форма гипоэнергетического состояния). Резервов пищевых веществ в организме хватает на несколько недель полного голодания, запасов же кислорода нет, поэтому при лишении кислорода уже через 2–3 мин наступает смерть. Гипоксия — наиболее частая причина гипоэнергетических состояний (табл. 8.5), а гипоксия мозга — наиболее частая непосредственная (последняя) причина смерти. Поэтому среди реанимационных процедур ведущее место занимают меры, направленные на восстановление снабжения органов кислородом.

Таблица 8.5. Гипоэнергетические состояния

Формы гипоэнергетических состояний	Причины возникновения
I. Алиментарные	Голодание, гиповитаминозы
II. Гипоксические:	
А. Связанные с нарушением поступления кислорода в кровь:	
экзогенная гипоксия	Недостаток O_2 во вдыхаемом воздухе
легочная (дыхательная) гипоксия	Нарушение легочной вентиляции или перехода O_2 из альвеол в кровь
Б. Связанные с нарушением транспорта кислорода в ткани:	
гемодинамическая гипоксия	Нарушения кровообращения (генерализованные — пороки сердца, кровопотеря, шок и др.; локальные — спазм сосудов, тромбоз, артериовенозный шунт)
гемоглобиновая гипоксия	Гипогемоглобинемия, блокирование гемоглобина ядами, патологические варианты гемоглобина
III. Митохондриальные (т. е. связанные с нарушением использования кислорода в клетках)	Нарушение функций митохондрий ингибиторами ферментов дыхательной цепи, разобщителями окисления и фосфорилирования, мембранотропными веществами

Глава 9

ОБМЕН И ФУНКЦИИ УГЛЕВОДОВ

В организме человека имеется несколько десятков разных моносахаридов и очень много (тысячи) разных олиго- и полисахаридов. Функции углеводов в организме заключаются в следующем.

1. Углеводы служат источником энергии: за счет их окисления удовлетворяется примерно половина всей потребности человека в энергии. В энергетическом обмене главная роль принадлежит глюкозе и гликогену.
2. Углеводы входят в состав структурно-функциональных компонентов клеток. К ним относятся пентозы нуклеотидов и нуклеиновых кислот, углеводы гликолипидов и гликопротеинов, гетерополисахариды межклеточного вещества.
3. Из углеводов в организме могут синтезироваться соединения других классов, в частности липиды и некоторые аминокислоты (рис. 9.1).

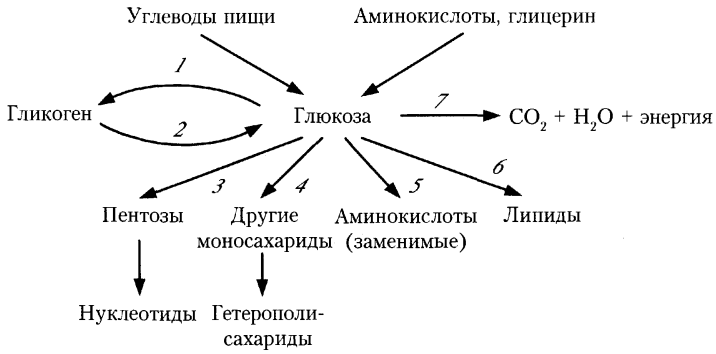


Рис. 9.1. Общая схема метаболизма глюкозы:

1 — запасание углеводов в виде гликогена; *2* — мобилизация гликогена; *3–6* — анаболические превращения глюкозы; *7* — катаболизм глюкозы

Таким образом, углеводы выполняют многообразные функции, и каждая из них жизненно важна для организма. Но если говорить о количественной стороне, то первое место принадлежит использованию углеводов в качестве источника энергии.

Наиболее распространенный углевод животных — глюкоза. Она играет роль связующего звена между энергетическими и пластическими функциями углеводов, поскольку из глюкозы могут образоваться все другие моносахариды, и наоборот — разные моносахариды могут превращаться в глюкозу.

Источником углеводов организма служат углеводы пищи, главным образом крахмал, а также сахароза и лактоза. Кроме того, глюкоза может образоваться в организме из аминокислот, а также из глицерина, входящего в состав жиров (триацилглицеринов).

ПЕРЕВАРИВАНИЕ УГЛЕВОДОВ

Углеводы пищи в пищеварительном тракте распадаются на мономеры при действии гликозидаз — ферментов, катализирующих гидролиз гликозидных связей.

Переваривание крахмала начинается уже в ротовой полости: в слюне содержится фермент *амилаза* (α-1,4-гликозидаза), расщепляющий α-1,4-гликозидные связи (рис. 9.2). Поскольку пища в ротовой полости находится недолго, то крахмал здесь переваривается лишь частично.

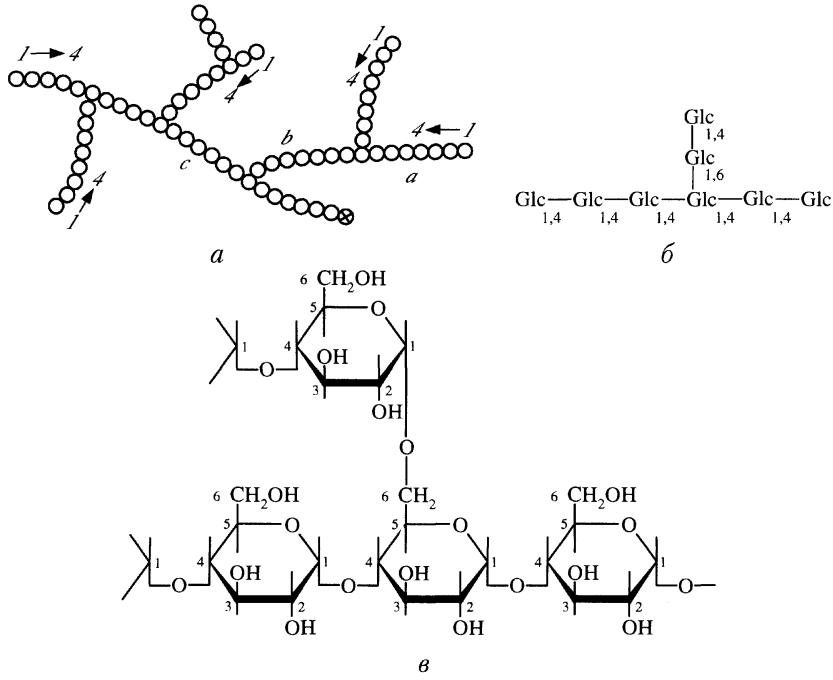


Рис. 9.2. Строение крахмала и гликогена:

а — общая схема: *a* — концевые цепи, *b* — внутренние цепи, *c* — единственная в молекуле цепь, имеющая глюкозный остаток (обозначен крестиком) со свободным гликозидным гидроксилом, редуцирующий конец. Гликоген отличается от крахмала большей ветвистостью: в гликогене цепи между ответвлениями содержат 8–10 мономеров, в крахмале — около 24; *б* — фрагмент молекулы, включающий точку ветвления; *в* — гликозидные связи в молекуле крахмала и гликогена: *1,4* в линейных участках, *1,6* в месте разветвления

Основным местом переваривания крахмала служит тонкий кишечник, куда поступает амилаза в составе сока поджелудочной железы. Амилаза расщепляет гликозидные связи в произвольных местах, в результате образуются олигосахариды и дисахарид мальтоза (амилаза не гидролизует дисахариды). Из тех глюкозных остатков, которые в молекуле крахмала соединены 1,6-гликозидной связью, образуется дисахарид изомальтоза (рис. 9.3). Дисахариды сахароза и лактоза поступают в организм с пищей.

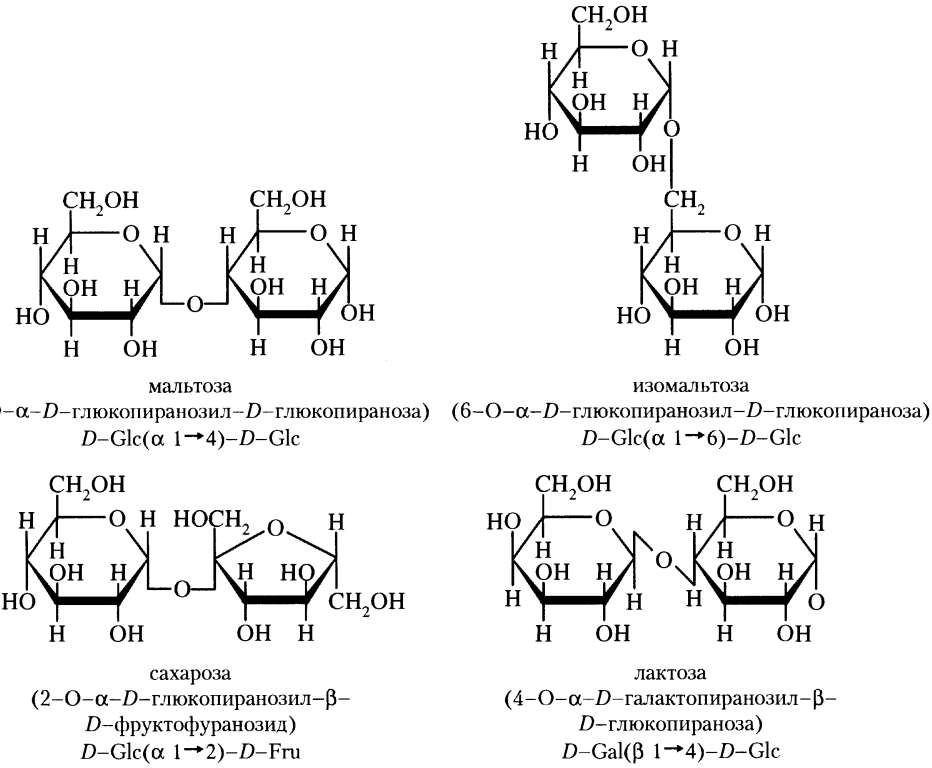


Рис. 9.3. Строение дисахаридов

Олигосахариды и дисахариды гидролизуются специфическими гликозидазами тонкого кишечника. Эти ферменты синтезируются в клетках кишечника, но не секретируются, а образуют на поверхности клеток большие комплексы, различающиеся по субстратной специфичности: комплекс, расщепляющий олигосахариды (а также мальтозу), сахарозо-изомальтазный комплекс и лактазный комплекс. Продукты полного переваривания углеводов — моносахариды глюкоза, галактоза и фруктоза — через клетки кишечника поступают в кровь.

При всасывании из кишечника в кровь моносахариды проникают через клеточные мембраны путем облегченной диффузии, с участием специальных переносчиков. Кроме того, для переноса глюкозы и галактозы существует еще и другой способ — активный транспорт по механизму симпорта за счет градиента концентрации ионов натрия, который создается Na,K-АТФазой (см. рис. 7.16). Этот

механизм обеспечивает перенос моносахаридов против градиента концентрации и поэтому может функционировать тогда, когда концентрация глюкозы или галактозы в кишечнике меньше их концентрации в крови.

ВРЕМЕННАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ ЛАКТАЗЫ

Уже упоминалось о наследственном отсутствии лактазы и непереносимости молока у значительной части взрослых людей (см. гл. 5). Однако чаще непереносимость лактозы бывает приобретенной и временной: она возникает при многих желудочно-кишечных заболеваниях, при некоторых инфекционных заболеваниях, после резекции желудка. Наиболее характерное проявление недостаточности лактазы — это диарея (понос) после приема молока. Негидролизованная лактоза поступает в нижние отделы тонкого кишечника, где сбраживается кишечной флорой с образованием газов (метеоризм) и кислот; последние вследствие осмотического действия привлекают много воды в кишечник, возникает понос. Метеоризм является причиной кишечных колик. После излечения основного заболевания недостаточность лактазы исчезает. Особенно опасна временная недостаточность лактазы у грудных детей, поскольку их основную пищу составляет молоко: если недостаточность своевременно не распознана, может возникнуть тяжелая дистрофия.

ТРАНСПОРТ УГЛЕВОДОВ ИЗ КРОВИ В КЛЕТКИ

Преобладающим моносахаридом, образующимся в результате переваривания пищевых углеводов, является глюкоза, поскольку крахмал представляет собой полимер глюкозы, и пищевые дисахариды — сахароза и лактоза — наполовину построены тоже из глюкозы. Поступающая из просвета кишечника глюкоза с кровью воротной вены попадает в печень, где часть ее задерживается, а часть через общий кровоток попадает в клетки других органов и тканей.

Потребление глюкозы клетками происходит при участии специальных белков-переносчиков (их называют также рецепторами глюкозы), образующих гидрофильные трансмембранные каналы. Существует два основных механизма переноса глюкозы: активный транспорт, зависящий от градиента концентраций Na^+ (см. выше), и облегченная диффузия. Соответственно есть два основных типа рецепторов глюкозы. Рецепторы, зависимые от Na^+, обнаруживаются только в почках и кишечнике и обеспечивают реабсорбцию глюкозы из почечных канальцев и всасывание из люмена кишечника против градиента концентрации. Рецепторы облегченной диффузии (транспортеры глюкозы, ГЛЮТ) есть во всех тканях.

В тканях человека обнаружено пять разных ГЛЮТ:

- ГЛЮТ-1 — в плаценте, мозге, почках, толстом кишечнике, в β-клетках панкреатических островков; меньше – в жировой ткани и мышцах;
- ГЛЮТ-2 — преимущественно в печени, в энтероцитах, в проксимальных тубулярных клетках почек (все эти клетки выделяют глюкозу в кровь); в β-клетках панкреатических островков (возможно, участвует в стимуляции глюкозой секреции инсулина);
- ГЛЮТ-3 — во многих тканях, включая мозг, плаценту, почки;

- ГЛЮТ-4 — единственный переносчик, регулируемый инсулином; содержится только в скелетных и сердечной мышцах и жировой ткани (инсулинозависимые ткани);
- ГЛЮТ-5 — вероятно, главный переносчик глюкозы в базальном состоянии, т. е. при отсутствии стимуляции инсулином.

Все рецепторы могут находиться как в плазматической мембране клетки, так и в мембранных везикулах в цитоплазме. Количество рецепторов 1, 2, 3 и 5 в плазматической мембране изменяется в узких пределах и не зависит от коцентрации инсулина. Напротив, ГЛЮТ-4 (и в гораздо меньшей мере ГЛЮТ-1) в отсутствие инсулина практически полностью находится в цитозольных везикулах. Стимуляция клеток инсулином приводит к перемещению везикул к плазматической мембране и их слиянию, в результате чего рецепторы оказываются встроенными в плазматическую мембрану (рис. 9.4). При этом, как показано в экспериментах с жировыми и мышечными клетками, скорость потребления глюкозы увеличивается в 30–40 раз. При снижении концентрации инсулина в среде рецепторы вновь возвращаются в цитозоль.

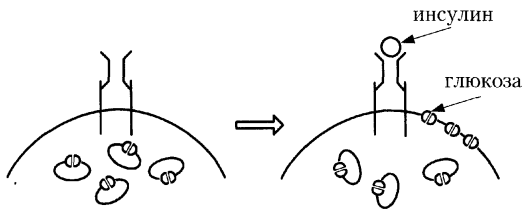


Рис. 9.4. Транслокация ГЛЮТ-4

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ МОНОСАХАРИДОВ

Первым химическим превращением глюкозы в клетках является ее фосфорилирование в результате взаимодействия с АТФ (рис. 9.5).

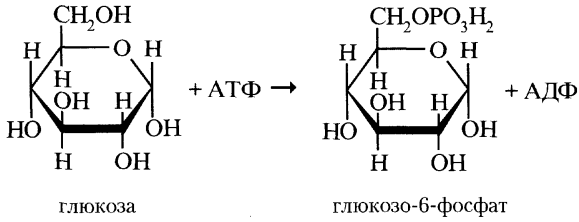


Рис. 9.5. Фосфорилирование глюкозы

Глюкоза способна проходить через клеточные мембраны, в то время как для глюкозо-6-фосфата мембраны непроницаемы. Таким образом, в результате фосфорилирования глюкоза «запирается» в клетке. В паренхиматозных клетках печени есть два фермента (изофермента), катализирующих эту реакцию, — гексокиназа и глюкокиназа (в других органах — только гексокиназа). Гексокиназа обладает

высоким сродством к глюкозе ($K_м$ < 0,1 ммоль/л); следовательно, максимум скорости реакции достигается при низкой концентрации глюкозы (рис. 9.6). Глюкозо-6-фосфат ингибирует гексокиназу.

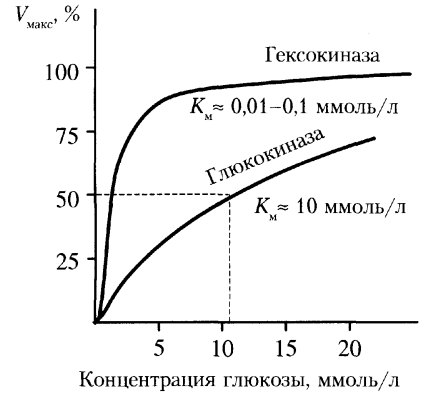


Рис. 9.6. Зависимость активности гексокиназы и глюкокиназы от концентрации глюкозы

Глюкокиназа отличается от гексокиназы высоким значением $K_м$ для глюкозы — около 10 ммоль/л, и не ингибируется глюкозо-6-фосфатом. Эти свойства соответствуют условиям ее функционирования в печени. В постабсорбтивном состоянии концентрация глюкозы в крови — около 5 ммоль/л. При такой концентрации скорость глюкокиназной реакции составляет примерно $^1/_5$ от максимальной скорости, т. е. фермент работает не на полную мощность. Во время пищеварения в воротную вену и далее в печень поступают большие количества глюкозы, и ее концентрация в клетках печени может превышать 10 ммоль/л. Соответственно увеличивается скорость глюкокиназной реакции, и значительная часть глюкозы задерживается в печени. Наряду с другими механизмами (см. гл. 14) это предотвращает чрезмерное повышение концентрации глюкозы в периферической крови при пищеварении.

Возможно и обратное превращение глюкозо-6-фосфата в глюкозу при действии глюкозо-6-фосфатазы:

$$\text{Глюкозо-6-фосфат} + H_2O \rightarrow \text{Глюкоза} + H_3PO_4.$$

Глюкозо-6-фосфатаза есть в печени, в почках, а также в клетках эпителия кишечника. В других органах и тканях, в частности в мышцах, этого фермента нет, и, следовательно, проникновение глюкозы в клетки этих органов необратимо (вследствие фосфорилирования глюкозы в клетках и непроницаемости клеточной мембраны для глюкозо-6-фосфата).

Глюкозо-6-фосфат может превратиться в глюкозо-1-фосфат при участии фосфоглюкомутазы, катализирующей обратимую реакцию (рис. 9.7).

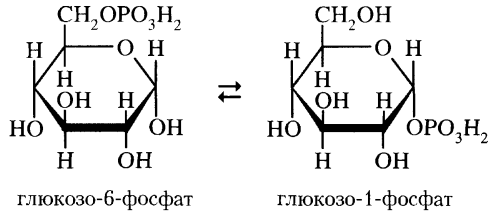


Рис. 9.7 Реакция, катализируемая фосфоглюкомутазой

Глюкозо-1-фосфат получается также при распаде гликогена (см. ниже).

Галактоза и фруктоза, поступающие из кишечного тракта, при участии соответственно галактокиназы и фруктокиназы фосфорилируются по первому углеродному атому:

Галактоза + АТФ → Галактозо-1-фосфат + АДФ

Фруктоза + АТФ → Фруктозо-1-фосфат + АДФ

Фосфорилирование («активация») служит первой стадией любых дальнейших превращений моносахаридов.

КАТАБОЛИЗМ ГЛЮКОЗЫ

Аэробный распад

Основной путь катаболизма глюкозы у аэробных организмов – это аэробный распад. В этом процессе можно выделить три части:

- специфические для глюкозы превращения, завершающиеся образованием пирувата (*аэробный гликолиз*);
- общий путь катаболизма (окислительное декарбоксилирование пирувата и цитратный цикл);
- митохондриальная цепь переноса электронов.

В результате этих процессов глюкоза распадается до CO_2 и H_2O, а освобождающаяся энергия используется для синтеза АТФ. Вторая и третья части рассмотрены в гл. 8, а здесь мы представим превращения, специфические для глюкозы.

Аэробный гликолиз

Распад глюкозы до пирувата, в свою очередь, можно разделить на два этапа: от глюкозы до глицеральдегидфосфата и от глицеральдегидфосфата до пирувата. В реакциях первого этапа происходит включение фосфатных остатков в гексозы и превращение гексозы в триозу (рис. 9.8).

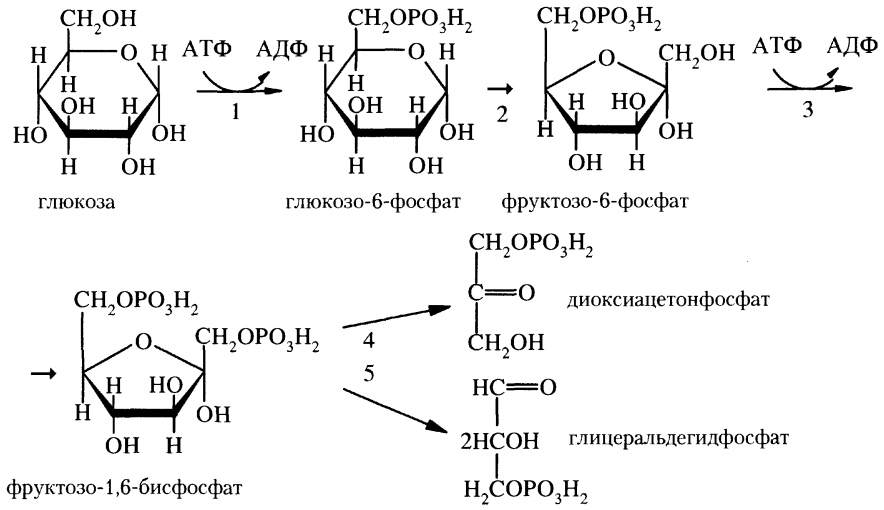


Рис. 9.8. Превращение глюкозы в триозу

Реакции этого этапа катализируют следующие ферменты: гексокиназа или глюкокиназа (*1*); фосфоглюкоизомераза (*2*); фосфофруктокиназа (*3*); альдолаза фруктозо-1,6-бисфосфата (*4*); фосфотриозоизомераза (*5*). В реакции 4 гексоза при действии альдолазы распадается на две триозы (альдольное расщепление). Эту реакцию легче понять, если фруктозо-1,6-бисфосфат представить в линейной (открытой) форме (рис. 9.9).

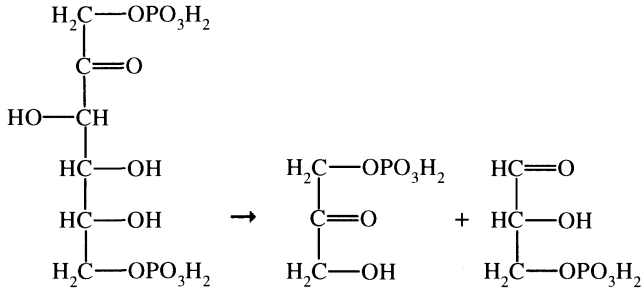


Рис. 9.9. Альдольное расщепление гексозы

Поскольку дигидроксиацетонфосфат тоже превращается в глицеральдегидфосфат (реакция *5*), то в конечном счете этот этап завершается превращением каждой молекулы глюкозы в две молекулы глицеральдегидфосфата.

Второй этап распада глюкозы включает реакции, связанные с синтезом АТФ (рис. 9.10). В этом этапе участвует тоже пять ферментов: дегидрогеназа глицеральдегидфосфата (*6*); фосфоглицераткиназа (*7*); фосфоглицеромутаза (*8*); енолаза (9); пируваткиназа (10).

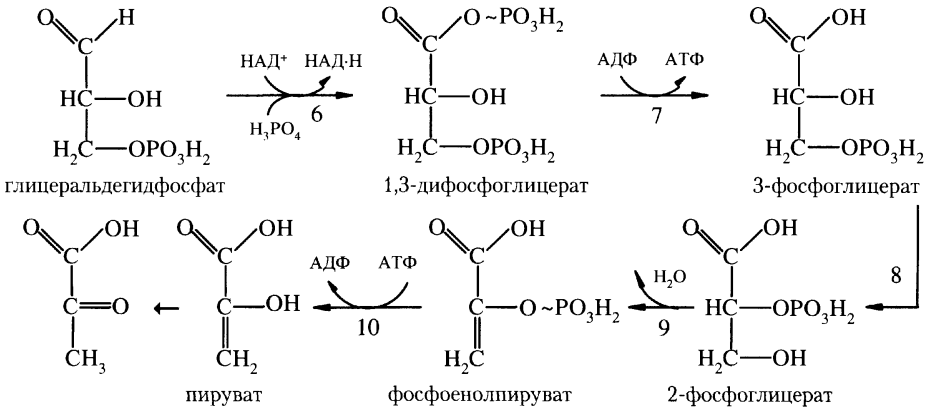


Рис. 9.10. Превращение глицеральдегидфосфата в пируват

В реакции *6* происходит дегидрирование глицеральдегидфосфата, причем акцептором водорода служит НАД; в реакции участвует неорганическая фосфорная кислота, а образующийся 1,3-бисфосфоглицерат содержит высокоэнергетическую

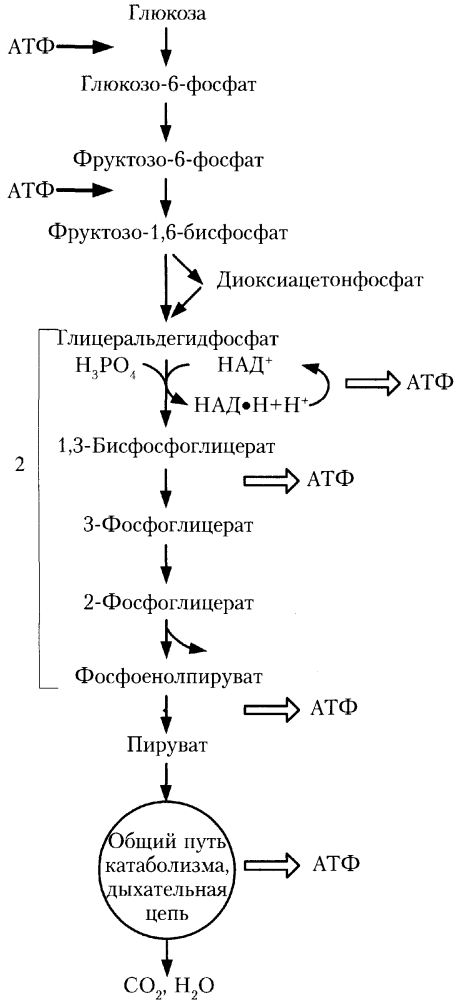


Рис. 9.11. Аэробный распад глюкозы (число 2 слева — стехиометрический коэффициент во всех реакциях, отмеченных квадратнойскобкой)

ангидридную связь. В реакции *7* фосфатный остаток с 1,3-бисфосфоглицерата переносится на АДФ, т. е. происходит синтез АТФ путем субстратного фосфорилирования (фермент, катализирующий эту реакцию, назван фосфоглицераткиназой по обратной реакции). В реакции 9 в результате дегидратации 2-фосфоглицерата образуется фосфоенолпируват, содержащий высокоэнергетическую связь, и становится возможной еще одна реакция субстратного фосфорилирования (реакция *10*). В реакции *10* получается енольная форма пирувата, которая превращается в кетоформу неферментативно.

На рис. 9.11 представлена схема аэробного распада глюкозы. При аэробном распаде происходит шесть реакций дегидрирования: одна — на стадии глицеральдегидфосфата и пять — в общем пути катаболизма. С восстановленных коферментов водород в конечном счете передается на кислород воздуха через митохондриальную дыхательную цепь. Именно поэтому рассматриваемый процесс называется аэробным. В отсутствие кислорода все имеющиеся в клетке запасы окисленных коферментов (НАД и других) превратились бы в восстановленные формы, и дальнейшее окисление глюкозы стало бы невозможным.

Выход АТФ при аэробном распаде глюкозы. Основное физиологическое назначение аэробного распада глюкозы заключается в использовании ее энергии для синтеза АТФ. В этом метаболическом пути имеется ряд стадий, ведущих к синтезу АТФ:

Три реакции субстратного фосфорилирования (7-я, 10-я и одна — в цитратном цикле)	3 АТФ
Пять реакций дегидрирования, акцептор НАД+ (Р/О = 3)	15 АТФ
Одна реакция дегидрирования, акцептор убихинон (Р/О = 2)	2 АТФ
Всего	20 АТФ

Все реакции, связанные с синтезом АТФ, происходят после расщепления гексозы на две триозы. Поэтому, учитывая стехиометрический коэффициент, полученную величину нужно умножить на 2, т. е. в расчете на 1 моль распадающейся глюкозы синтезируется 40 моль АТФ. В начальных стадиях (реакции *1* и *3*) затрачивается 2 моль АТФ; после их вычитания получаем чистый выход — 38 моль АТФ на 1 моль глюкозы.

Полная энергия распада глюкозы составляет 2880 кДж/моль. Свободная энергия гидролиза высокоэнергетической связи АТФ равна 50 кДж/моль. Для синтеза АТФ при окислении глюкозы используется 38 × 50 = 1900 кДж, что составляет около 65 % от всей энергии распада глюкозы. Это максимально возможная эффективность использования энергии глюкозы. Следует иметь в виду, что реальная эффективность может быть существенно ниже; возможно, образуется всего около 25 моль АТФ на 1 моль глюкозы.

Челночные механизмы. Десять ферментов, катализирующих распад глюкозы до стадии пирувата, локализованы в цитозоле; все остальные — в митохондриях. В числе первых десяти реакций есть дегидрирование с участием НАД$^+$ (реакция 6). Образующийся здесь НАДН не может передавать водород непосредственно на дыхательную цепь, поскольку митохондриальная мембрана непроницаема для НАДН. Перенос водорода с цитозольного НАДН в митохондрии происходит при участии специальных механизмов, называющихся челночными. Суть этих механизмов сводится к тому, что НАДН в цитозоле восстанавливает некоторое соединение, способное проникать в митохондрию; в митохондрии это соединение окисляется, восстанавливая внутримитохондриальный НАД, и вновь переходит в цитозоль. На рис. 9.12 и 9.13 представлены два таких механизма: глицерофосфатный и малат-аспартатный челноки.

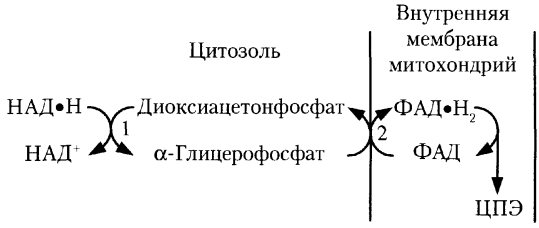


Рис. 9.12. Глицерофосфатный челнок:

1 — редуктаза диоксиацетонфосфата; *2* — ФАД-зависимая дегидрогеназа α-глицерофосфата

Аэробный распад глюкозы в мозге. Аэробный распад глюкозы может происходить во всех органах и тканях. Но многие органы используют и другие источники энергии или другие способы синтеза АТФ. В наибольшей зависимости от аэробного распада глюкозы находится мозг. Он расходует около 100 г глюкозы в сутки. В состоянии основного обмена около 20 % всего поступающего в организм кислорода потребляется мозгом (отметим, что на долю мозга приходится лишь 2 % массы тела). Поэтому как недостаток глюкозы, так и недостаток кислорода проявляются прежде всего симптомами со стороны центральной нервной системы — головокружением, потерей сознания, судорогами.

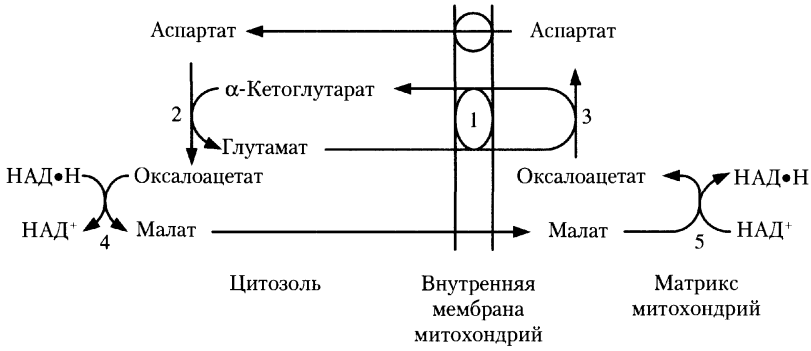


Рис. 9.13. Малат-аспартатный челнок:

1 — глутамат-α-кетоглутараттранслоказа; *2* и *3* — реакция трансаминирования, протекающая в цитозоле и в матриксе митохондрий в противоположных направлениях; *4* и *5* — окислительно-восстановительная реакция, протекающая в цитозоле и в матриксе митохондрий в противоположных направлениях

Анаэробный гликолиз

В клетках животных и человека широко распространен фермент лактатдегидрогеназа, катализирующий обратимое превращение пировиноградной кислоты в молочную:

$$CH_3{-}CO{-}COOH + НАДН + H^+ \leftrightarrow CH_3{-}CHOH{-}COOH + НАД^+.$$

Десять цитозольных ферментов, превращающих глюкозу в пируват, совместно с лактатдегидрогеназой способны обеспечить синтез АТФ в отсутствие кислорода, в анаэробных условиях. При этом акцептором водорода служит пировиноградная кислота, которая превращается в молочную кислоту, выполняющую функцию накопителя, резервуара восстановительных эквивалентов, т. е. водорода (рис. 9.14). В анаэробном процессе, не нуждающемся в митохондриальной дыхательной цепи, АТФ образуется за счет двух реакций субстратного фосфорилирования. В этих реакциях в расчете на 1 моль глюкозы образуется 4 моль АТФ; после вычитания 2 моль АТФ, потребляемых на начальных стадиях, получаем чистый выход АТФ при гликолизе — 2 моль АТФ на 1 моль глюкозы. Суммарный результат гликолиза выражается следующим уравнением:

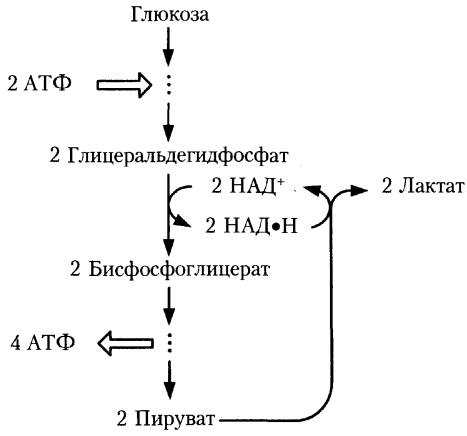


Рис. 9.14. Анаэробный распад глюкозы

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_3PO_4 + 2АДФ = 2C_3H_6O_3 + 2АТФ + 2H_2O.$$

Фигурирующая в этом уравнении неорганическая фосфорная кислота потребляется в реакции, катализируемой дегидрогеназой глицеральдегидфосфата.

Аналогичный процесс у бактерий называют молочнокислым брожением: он лежит в основе приготовления многих кисломолочных продуктов. У дрожжей в анаэробных условиях имеет место сходный процесс — спиртовое брожение: в этом случае пируват сначала декарбоксилируется с образованием уксусного альдегида, который затем восстанавливается в этиловый спирт:

$$CH_3{-}CO{-}COOH \rightarrow CH_3{-}CHO + CO_2;$$

$$CH_3{-}CHO + НАДН + H^+ \rightarrow CH_3{-}CH_2OH + НАД^+.$$

Анаэробный гликолиз у животных и человека может происходить во многих типах клеток, но его значение для разных органов различно. В интенсивно работающих скелетных мышцах мощность механизма транспорта кислорода к митохондриям и мощность митохондриального аппарата синтеза АТФ оказываются недостаточными для обеспечения всей энергетической потребности; в этих условиях резко увеличивается анаэробный путь синтеза АТФ, и в мышцах накапливается молочная кислота: после ночного сна концентрация лактата в крови составляет 1–2 ммоль/л, а после тяжелой мышечной работы может достигать 20 ммоль/л. Особенно большое значение анаэробный гликолиз имеет при кратковременной интенсивной работе. Так, бег в течение примерно 30 с (дистанция около 200 м) полностью обеспечивается анаэробным гликолизом. При этом скорость анаэробного гликолиза довольно быстро уменьшается, а аэробного распада — увеличивается. Через 4–5 мин бега (дистанция около 1,5 км) энергия поставляется поровну аэробным и анаэробным процессами, а через 30 мин (около 10 км) — почти целиком аэробным процессом. В продолжение первой минуты работы благодаря анаэробному процессу достигается гораздо большая мощность, чем при дальнейшей работе. Отметим, что при длительной работе в аэробном процессе все в большей мере используется не глюкоза, а жирные кислоты (см. гл. 10).

Эритроциты вообще не имеют митохондрий, и их потребность в АТФ целиком удовлетворяется за счет анаэробного гликолиза. Интенсивный гликолиз характерен также для клеток злокачественных опухолей. Меньшее значение этот процесс имеет для сердечной мышцы, мозга, почек.

Отметим, что в живых тканях анаэробных условий не бывает. Определение «анаэробный» в термине «анаэробный распад» указывает лишь на то, что кислород в этом процессе не используется.

Изоферменты лактатдегидрогеназы. Лактатдегидрогеназа представляет собой тетрамер, содержащий протомеры двух типов — М (от англ. *muscle* — мышца) и Н (от англ. *heart* — сердце). Известно пять изоферментов, различающихся набором протомеров: M_4, M_3H_1, M_2H_2, M_1H_3, H_4. Изоферментный состав разных органов неодинаков. Например, в скелетных мышцах преобладает изофермент M_4, в сердечной мышце — H_4 (рис. 9.15). Изоферменты имеют разный суммарный заряд молекулы, что позволяет разделять их методом электрофореза и измерять активность (количество) каждого изофермента. При ряде заболеваний лактатдегидрогеназа появляется в крови; определив ее изоферментный состав, можно узнать, какой орган поражен. Этот метод используется в клинической практике для диагностики.

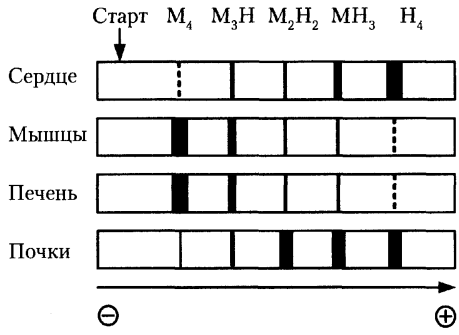


Рис. 9.15. Распределение на электрофореграмме и относительные количества изоферментов ЛДГ в разных органах

ОБМЕН ГЛИКОГЕНА

Биосинтез гликогена

Значительная часть глюкозы, поступающей в клетки при пищеварении, превращается в них в гликоген — запасной полисахарид, используемый в интервалах между приемами пищи.

Гликоген по строению сходен с крахмалом. Непосредственным донором глюкозных остатков при биосинтезе гликогена служит уридиндифосфатглюкоза (УДФ-глюкоза) — продукт взаимодействия глюкозо-1-фосфата и УТФ (рис. 9.16).

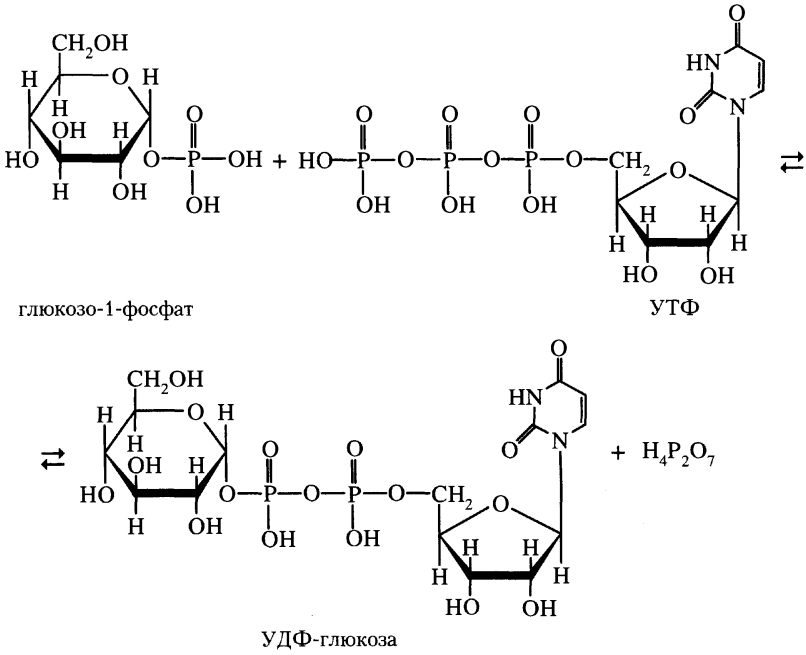


Рис. 9.16. Синтез УДФ-глюкозы

Эта реакция обратима, и фермент по обратной реакции назван УДФ-глюкозопирофосфорилазой. Однако в живой клетке реакция идет в сторону синтеза УДФ-глюкозы, поскольку образующийся пирофосфат ($H_4P_2O_7$) тут же гидролизуется пирофосфатазой до H_3PO_4.

УДФ-глюкоза — субстрат гликогенсинтетазы (глюкозилтрансферазы). Для синтеза гликогена требуется затравка, выполняющая роль акцептора глюкозных остатков с УДФ-глюкозы. Такой затравкой могут быть олигосахариды из трех или более глюкозных остатков, связанных 1,4-гликозидной связью. Однако *in vivo* гликогенсинтетаза большей частью удлиняет нередуцирующие концы уже имеющихся молекул гликогена:

$$\text{УДФ-глюкоза} + (\text{Глюкоза})_n \rightarrow \text{УДФ} + (\text{Глюкоза})_{n+1}$$

При этом образуются 1,4-гликозидные связи в линейных участках молекулы гликогена. Ветвления возникают при участии фермента ветвления (амило-1,4>1,6-гликозилтрансфераза). Когда ветвь, растущая в результате действия гликогенсинтетазы, достигает длины в 11–12 глюкозных остатков, фермент ветвления переносит фрагмент из шести-восьми мономеров с конца этой ветви на другую ветвь с образованием 1,6-гликозидной связи (рис. 9.17). При этом концевая цепь от уже имеющегося ответвления должна быть длиной не менее 11 остатков, чтобы сработал фермент ветвления. Затем обе короткие цепи удлиняются при участии гликогенсинтетазы, и на них вновь возникают ветвления, и т. д.

Таким путем синтезируются огромные молекулы с молекулярной массой от $1 \cdot 10^6$ до $2 \cdot 10^8$, содержащие от 6 тыс. до 1 млн глюкозных остатков. В клетке гликоген находится не в растворенном состоянии, а в виде гранул диаметром 40–200 нм, включающих одну или несколько молекул. Необходимость превращения глюкозы в гликоген при запасании энергетического материала обусловлена тем, что накопление легкорастворимой глюкозы в клетках могло бы привести к осмотическому

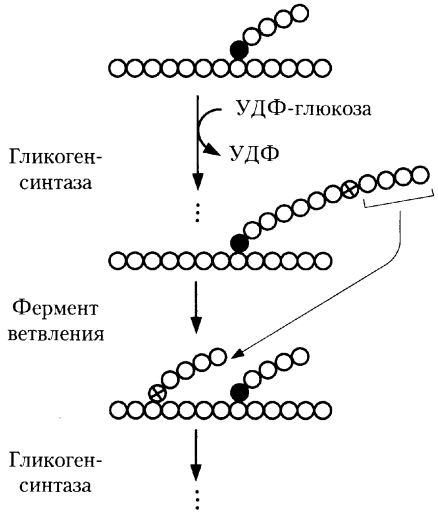


Рис. 9.17. Синтез гликогена

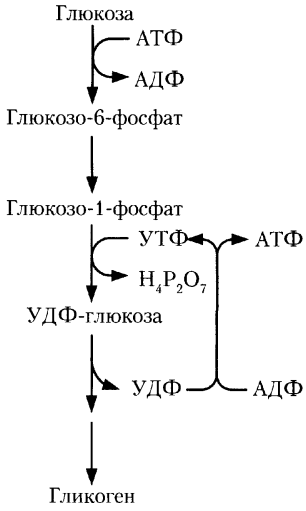


Рис. 9.18. Схема синтеза гликогена

шоку — разрушению клеточной мембраны. Запасание гликогена связано с расходом двух молекул АТФ на каждую молекулу глюкозы, включающуюся в гликоген (рис. 9.18).

Гликоген образуется практически во всех клетках организма, однако наибольшая концентрация обнаруживается в печени — от 2 до 6 %, и в мышцах — от 0,5 до 2 %. Поскольку общая масса мышц велика, большая часть всего гликогена организма содержится в мышцах.

Мобилизация гликогена

Распад гликогена происходит при участии двух ферментов: гликогенфосфорилазы и фермента с двойной специфичностью — 4:4-трансферазы/α-1,6-гликозидазы.

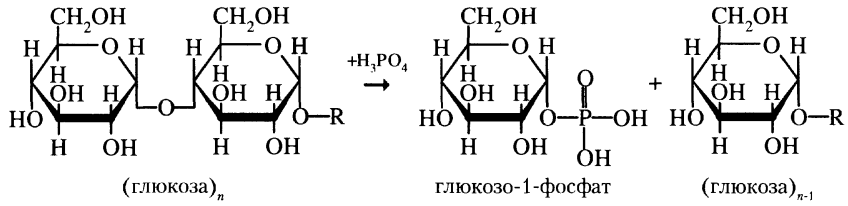


Рис. 9.19. Фосфоролиз гликогена. Представлен дисахаридный фрагмент нередуцирующего конца ветви; R — остальная часть молекулы гликогена

Гликогенфосфорилаза катализирует фосфоролиз 1,4-гликозидной связи нередуцирующих концов гликогена (рис. 9.19): глюкозные остатки отщепляются один за другим в форме глюкозо-1-фосфата. При этом гликогенфосфорилаза не может отщеплять глюкозные остатки от коротких ветвей, содержащих менее пяти глюкозных остатков; такие ветви удаляются 4:4-трансферазой/α-1,6-гликозидазой. Этот фермент катализирует перенос фрагмента из трех остатков короткой ветви на концевой глюкозный остаток более длинной ветви (рис. 9.20); кроме того, он гидролизует 1,6-гликозидную связь и таким образом удаляет последний остаток ветви.

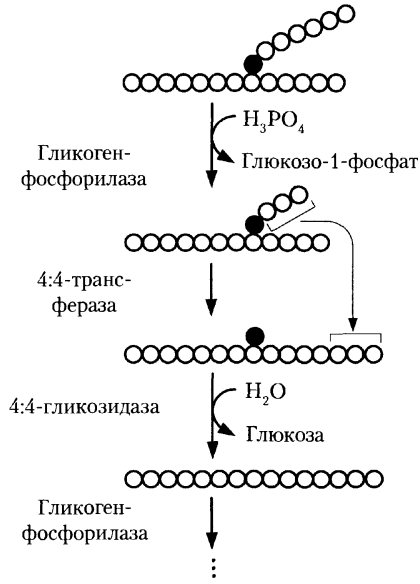


Рис. 9.20. Мобилизация гликогена

Голодание в течение 24 ч приводит практически к полному исчезновению гликогена в клетках печени. Однако при ритмичном питании каждая молекула гликогена может существовать неопределенно долго: при отсутствии пищеварения и поступления в ткани глюкозы молекулы гликогена уменьшаются за счет расщепления периферических ветвей, а после очередного приема пищи вновь вырастают до прежних размеров. Аналогичные

процессы происходят и в мышечной ткани, но здесь они в значительной мере определяются режимом мышечной работы.

Глюкозо-1-фосфат, образующийся из гликогена, при участии фосфоглюкомутазы превращается в глюкозо-6-фосфат, дальнейшая судьба которого в печени и в мышцах различна. В печени глюкозо-6-фосфат превращается в глюкозу при участии глюкозо-6-фосфатазы, глюкоза выходит в кровь и используется в других органах и тканях. В мышцах нет этого фермента, поэтому глюкозо-6-фосфат используется здесь же, в мышечных клетках, распадаясь аэробным или анаэробным путем.

ГЛИКОГЕНОВЫЕ БОЛЕЗНИ

Гликогеновыми болезнями называют наследственные нарушения обмена гликогена, обусловленные недостаточностью какого-либо из ферментов, участвующих в этом процессе. Недостаточность выражается в снижении активности фермента или в его полном отсутствии; она возникает в случае наследования мутантного аллеля соответствующего фермента в гомозиготном состоянии.

Гликогенозы. Если нарушена мобилизация гликогена, то гликоген накапливается в клетках в больших количествах, что может привести к разрушению клеток. Такие гликогеновые болезни называют *гликогенозами.* Известно несколько типов гликогенозов, связанных с недостаточностью разных ферментов или одного и того же фермента в разных органах. В табл. 9.1 перечислены некоторые наиболее изученные типы гликогенозов.

Таблица 9.1. Некоторые формы гликогенозов

Тип гликогеноза	Дефектный фермент	Пораженный орган
I (болезнь Гирке)	Глюкозо-6-фосфатаза	Печень, почки
II (болезнь Помпе)	α-1,4-глюкозидаза (лизосомная)	Все органы
III (болезнь Кори)	Амило-1,6-глюкозидаза	Печень, сердечная и скелетные мышцы, лейкоциты
IV (болезнь Андерсена)	Фермент ветвления	Печень, мышцы, почки, лейкоциты
V (болезнь Мак-Ардля)	Фосфорилаза (мышечная)	Мышцы
VI (болезнь Херса)	Фосфорилаза (печеночная)	Печень

Клинические симптомы гликогенозов характерны для каждого типа болезни. Наиболее часто наблюдаются увеличение печени, мышечная слабость, гипоглюкоземия натощак. Продолжительность жизни больных, как правило, уменьшена, нередко смерть наступает в раннем детстве.

Агликогенозы. Если нарушен синтез гликогена (например, вследствие дефекта гликогенсинтетазы), то содержание гликогена в клетках понижено: эти формы гликогеновых болезней называют *агликогенозами.* Самый характерный симптом агликогенозов — резкая гипоглюкоземия натощак (поскольку нет запасов гликогена), особенно после ночного перерыва в кормлении. В результате гипоглюкоземии могут возникать рвота, судороги, потеря сознания. Постоянное голодание мозга приводит к отставанию умственного развития. Обычно эти больные погибают в раннем детстве; частые кормления могут существенно ослабить проявления болезни.

Частота гликогеновых болезней невелика, примерно 1:40 000.

БИОСИНТЕЗ ГЛЮКОЗЫ (ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ)

В печени, а также в корковом веществе почек и в эпителии тонкого кишечника может происходить синтез глюкозы из пирувата.

Глюконеогенез в основном протекает по тому же пути, что и гликолиз, но в обратном направлении. Однако три реакции гликолиза необратимы, и на этих стадиях реакции глюконеогенеза отличаются от реакций гликолиза (рис. 9.21, стадии I, II, III).

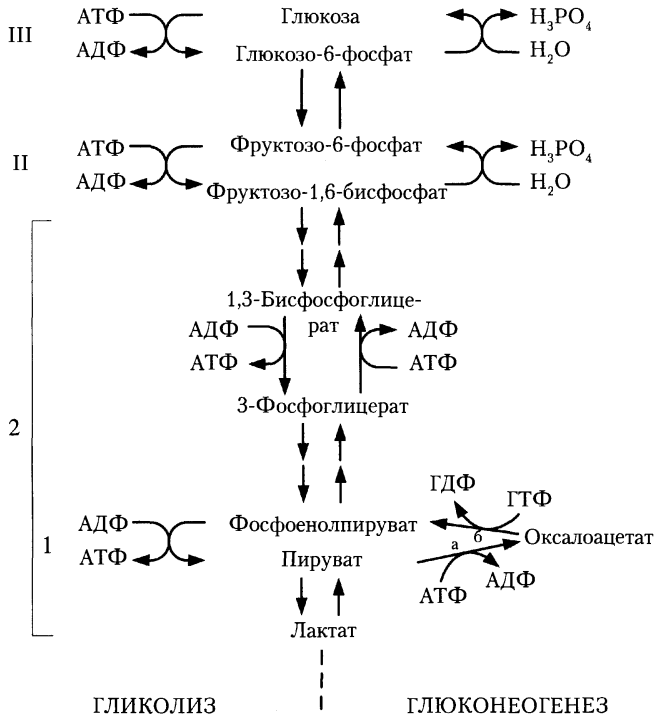


Рис. 9.21. Реакции гликолиза и глюконеогенеза

Превращение пирувата в фосфоенолпируват (необратимая стадия I) осуществляется при участии двух ферментов: пируваткарбоксилазы (рис. 9.22, *а*) и карбоксикиназы фосфоенолпирувата (рис. 9.22, *б*).

Две другие необратимые стадии катализируются фосфатазой фруктозо-1,6-бисфосфата и фосфатазой глюкозо-6-фосфата:

$$\text{Фруктозо-1,6-бисфосфат} + H_2O \rightarrow \text{Фруктозо-6-фосфат} + H_3PO_4.$$

$$\text{Глюкозо-6-фосфат} + H_2O \rightarrow \text{Глюкоза} + H_3PO_4.$$

Суммарно процесс глюконеогенеза описывается так:

$$2\ \text{пируват} + 4\ \text{АТФ} + 2\ \text{ГТФ} + 2\ (\text{НАДН} + H^+) + 4\ H_2O \rightarrow$$

$$\rightarrow \text{глюкоза} + 4\ \text{АДФ} + 2\ \text{ГДФ} + 6\ H_3PO_4 + 2\ \text{НАД}^+$$

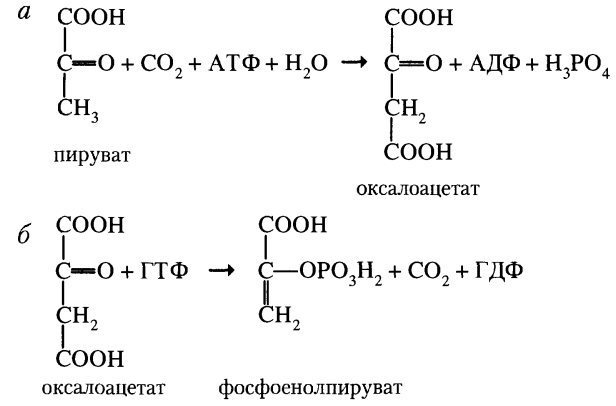


Рис. 9.22. Превращение пирувата в фосфоенолпируват

Каждая из необратимых реакций гликолиза вместе с соответствующей ей реакцией глюконеогенеза образует так называемый субстратный цикл (см. рис. 9.21, циклы I, II, III, считая по направлению глюконеогенеза); эти циклы служат точками приложения регуляторных механизмов, направляющих метаболизм на путь или гликолиза, или глюконеогенеза (см. ниже).

Первичными субстратами, использующимися для синтеза глюкозы, являются такие вещества, которые могут превращаться в пируват или любой другой метаболит на пути от пирувата к глюкозе. В организме человека это главным образом аминокислоты, глицерин и лактат.

Синтез глюкозы из аминокислот и глицерина

При катаболизме многих аминокислот в качестве промежуточных продуктов образуются пируват или оксалоацетат, которые могут включаться в путь глюконеогенеза на стадии первого субстратного цикла.

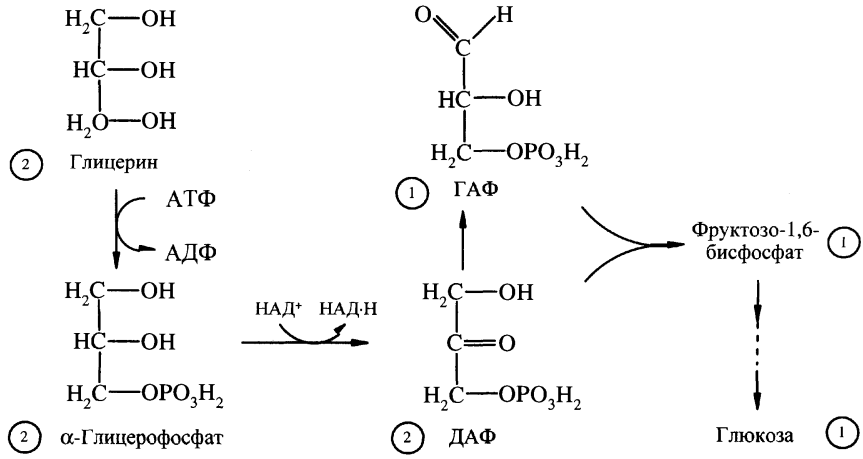


Рис. 9.23. Синтез глюкозы из глицерина

Глицерин образуется при гидролизе жиров и может превращаться в глюкозу по пути, представленному на рис. 9.23.

Аминокислоты и глицерин используются для синтеза глюкозы главным образом при голодании или при низком содержании углеводов в рационе (углеводное голодание). В этих условиях глюконеогенез служит для обеспечения глюкозой мозга, в то время как другие органы обеспечиваются энергией за счет окисления жирных кислот.

Глюконеогенез из лактата

Физиологическая роль глюконеогенеза из лактата существенно иная. Молочная кислота не является конечным продуктом обмена, но ее образование — это тупиковый путь метаболизма: единственный способ использования молочной кислоты связан с ее превращением вновь в пируват при участии той же лактатдегидрогеназы:

$$CH_3{-}CHOH{-}COOH + НАД^+ \rightarrow CH_3{-}CO{-}COOH + НАДН + H^+.$$

Из клеток, в которых происходит гликолиз, образующаяся молочная кислота поступает в кровь и улавливается в основном печенью, где и превращается в пируват. Пируват в печени частично окисляется, частично превращается в глюкозу — *цикл Кори*, или *глюкозо-лактатный цикл* (рис. 9.24). Часть пирувата в мышцах путем трансаминирования превращается в аланин, который транспортируется в печень, и здесь снова образует пируват — *глюкозо-аланиновый цикл.*

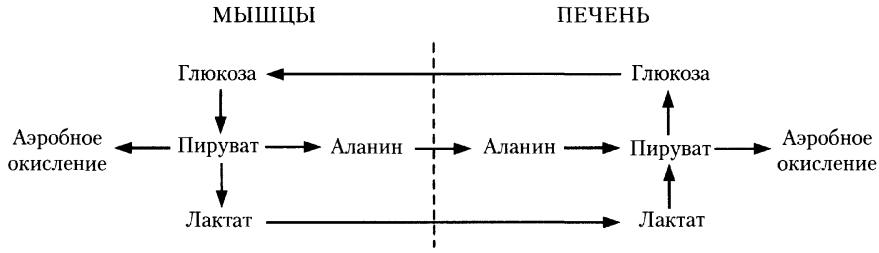


Рис. 9.24. Глюкозолактатный и глюкозоаланиновый циклы

На каждую молекулу лактата при глюконеогенезе расходуется три молекулы АТФ (точнее, две — АТФ и одна — ГТФ, см. рис. 9.21); поскольку для образования глюкозы необходимо две молекулы лактата, суммарный процесс глюконеогенеза описывается так:

$$2Лактат + 6АТФ + 6H_2O \rightarrow Глюкоза + 6АДФ + 6H_3PO_4.$$

Образовавшаяся глюкоза может вновь поступать в мышцы и там превращаться в молочную кислоту. Сопоставим суммарную реакцию глюконеогенеза с суммарной реакцией гликолиза:

$$Глюкоза + 2АДФ + 2H_3PO_4 \rightarrow 2Лактат + 2АТФ + 2H_2O$$

Из этого сопоставления следует, что в результате действия цикла Кори работающие мышцы добывают 2АТФ за счет расходования 6АТФ в печени. Да еще на

стадии образования глицеральдегидфосфата расходуется НАДН, которая могла бы обеспечить синтез трех молекул АТФ.

Из рис. 9.24 видно, что вся имеющаяся в организме глюкоза (как поступающая с пищей, так и синтезирующаяся) в конечном счете окисляется до CO_2 и H_2O аэробным путем. Иначе говоря, анаэробный распад служит вспомогательным путем использования энергии глюкозы, имеющим локальное (например, в эритроцитах) или временное, ситуационное (в работающей мышце) значение; продукт анаэробного распада — молочная кислота — в конечном счете тоже окисляется аэробным путем.

В организме взрослого человека за сутки может синтезироваться около 80 г глюкозы, главным образом в печени, а также в корковом веществе почек и в слизистой оболочке кишечника. Биологическое значение глюконеогенеза заключается не только в возвращении лактата в метаболический фонд углеводов, но и в обеспечении глюкозой мозга при недостатке углеводов в организме, например, при углеводном или полном голодании.

Регуляция обмена глюкозы и гликогена

Скорость превращений глюкозы по разным метаболическим путям зависит от типа клеток, от их физиологического состояния, от внешних условий. Наиболее значительные изменения метаболизма глюкозы происходят в клетках печени и мышц в зависимости от ритма питания и мышечной активности.

Абсорбтивный и постабсорбтивный периоды

Обычный для человека ритм питания — это трехкратный прием пищи в дневное время с двумя 6–7-часовыми перерывами и с ночным перерывом продолжительностью 10–12 ч. После приема смешанной пищи переваривание углеводов заканчивается примерно через 2 ч, переваривание жиров и белков — через 4–5 ч: это — период пищеварения, или абсорбтивный. За ним следует постабсорбтивный период; за типичное постабсорбтивное состояние принимают состояние утром после сна до завтрака.

Важнейшие события абсорбтивного периода заключаются в запасании пищевых веществ: происходит превращение глюкозы в гликоген и накопление последнего в клетках, ускоряется гликолиз и окислительное декарбоксилирование пирувата, образующийся ацетил-КоА используется для синтеза жиров и их накопления в жировых и других клетках, усиливается синтез белков.

В постабсорбтивном состоянии эти процессы меняются на противоположные: гликоген распадается, ускоряется глюконеогенез, усиливается окисление жиров и распад белков. Таким образом, запасы используются в качестве источников энергии и для пластических целей. Однако, разумеется, использование пищевых веществ для синтеза АТФ не прекращается и во время пищеварения. Да и сам процесс пищеварения связан с расходованием АТФ (на синтез и секрецию ферментов, на всасывание продуктов переваривания, на действие регуляторных механизмов и др.).

Регуляция смены абсорбтивного и постабсорбтивного состояний инсулином и глюкагоном

В постабсорбтивном состоянии концентрация глюкозы в крови равна примерно 5 ммоль/л (90 мг/дл). После приема пищи в результате всасывания глюкозы из кишечника ее концентрация в крови увеличивается (алиментарная гиперглюкоземия). Максимум концентрации — около 150 мг/дл — достигается примерно через час; еще примерно через 1,5 ч концентрация глюкозы возвращается к уровню постабсорбтивного состояния.

Синтез и секреция инсулина и глюкагона регулируются глюкозой, причем противоположным образом: при повышении концентрации глюкозы в крови секреция инсулина увеличивается, а глюкагона, наоборот, уменьшается. Таким образом, их концентрации в крови изменяются реципрокно: при пищеварении концентрация инсулина высокая, концентрация глюкагона низкая; в постабсорбтивном состоянии отношение обратное. Однако следует отметить, что амплитуда изменений концентрации инсулина гораздо больше, чем глюкагона: концентрация инсулина изменяется примерно в 7 раз, а глюкагона — в 1,5–2 раза. Противоположно также и действие этих гормонов на метаболизм: инсулин стимулирует процессы запасания веществ при пищеварении, а глюкагон — их мобилизацию в постабсорбтивном состоянии. Поэтому направление метаболических процессов зависит не столько от абсолютной концентрации гормонов, сколько от отношения их концентраций: [инсулин]/[глюкагон] (инсулин-глюкагоновый индекс).

РЕГУЛЯЦИЯ ДЕПОНИРОВАНИЯ И МОБИЛИЗАЦИИ ГЛИКОГЕНА

Гликоген как запасная форма глюкозы накапливается в клетках во время пищеварения и расходуется в промежутках между приемами пищи. Очевидно, при смене этих периодов должны изменяться относительные скорости синтеза и распада гликогена. Кроме того, энергетические потребности организма изменяются при переходе от покоя к активности и наоборот, и соответственно должна регулироваться скорость расходования гликогена. Наконец, одновременное протекание и синтеза, и распада гликогена в одной и той же клетке привело бы к образованию порочного (растратного) цикла, единственным результатом которого было бы растрачивание АТФ (рис. 9.25).

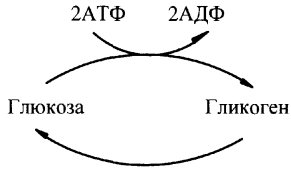


Рис. 9.25. Растратный цикл глюкоза—гликоген

Следовательно, регуляторные механизмы должны быть такими, чтобы при включении одного процесса автоматически выключался бы другой.

Депонирование и мобилизация гликогена в печени

Инсулин и глюкагон передают сигнал в клетки через мембранные рецепторы, как это описано в гл. 7. Начальные события, вызываемые изменением концентрации глюкозы в крови, можно представить следующей таблицей (стрелки, направленные вверх, указывают на увеличение параметра, вниз — на уменьшение):

Параметр	Абсорбтивное состояние	Постабсорбтивное состояние
Концентрация глюкозы в крови	↑	↓
Концентрация инсулина в крови	↑	↓
Концентрация глюкагона в крови	↓	↑
Концентрация цАМФ в клетке	↓	↑
Активность протеинкиназ А	↓	↑

Ключевую роль в регуляции синтеза и распада гликогена играют реакции фосфорилирования-дефосфорилирования гликогенсинтетазы и гликогенфосфорилазы. При этом фосфорилирование изменяет активность этих ферментов противоположным образом — ингибирует синтазу и активирует фосфорилазу; дефосфорилирование, наоборот, активирует синтазу и ингибирует фосфорилазу (рис. 9.26). Это обстоятельство и позволяет избежать образования растратного цикла.

Рис. 9.26. Изменения активности гликогенсинтетазы и гликогенфосфорилазы при их фосфорилировании-дефосфорилировании

После завершения пищеварения инсулин-глюкагоновый индекс уменьшается (главным образом за счет снижения концентрации инсулина и в меньшей мере за счет увеличения концентрации глюкагона). Глюкагон передает сигнал в клетку через аденилатциклазную систему, следовательно, в клетке активируется протеинкиназа А (рис. 9.27). Протеинкиназа А фосфорилирует (и инактивирует) гликоген-

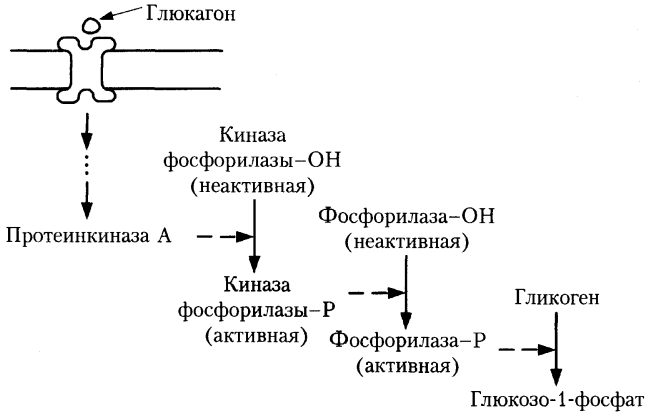


Рис. 9.27. Постабсорбтивное состояние: активация распада гликогена в печени

синтетазу: синтез гликогена прекращается. Далее протеинкиназа А фосфорилирует (и активирует) киназу гликогенфосфорилазы. Киназа фосфорилазы (активная форма), в свою очередь, фосфорилирует (активирует) фосфорилазу. Таким образом, синтез гликогена в клетке заторможен, но происходит его распад.

В абсорбтивном состоянии высокий инсулин-глюкагоновый индекс; инсулин активирует тирозинкиназу своего рецептора (см. гл. 7), и далее следует каскад реакций, в результате которого фосфорилируется и активируется печеночная протеинфосфатаза гранул гликогена 1 (ПфГр-1) (рис. 9.28). Затем ПфГр-1 дефосфорилирует (активирует) гликогенсинтетазу — становится возможным синтез гликогена. Кроме того, ПфГр-1 дефосфорилирует киназу гликогенфосфорилазы (инактивирует): в результате становится невозможным фосфорилирование (активация) гликогенфосфорилазы, и распад гликогена прекращается (ср. рис. 9.27 и 9.28).

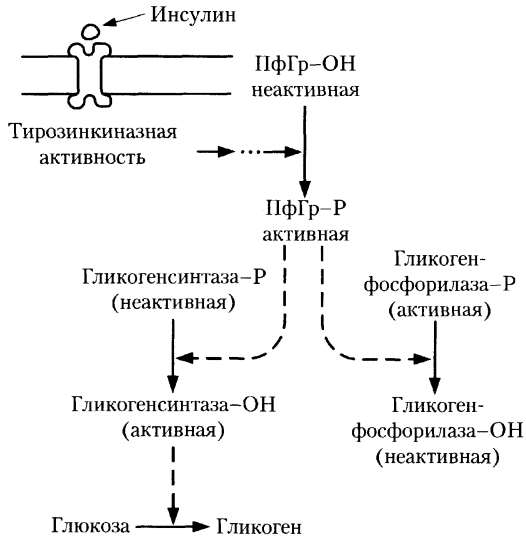


Рис. 9.28. Абсорбтивное состояние: ингибирование распада и активация синтеза гликогена в печени с участием инсулинового рецептора

Таким образом, инсулин не только открывает новый путь превращений глюкозы, но и отменяет некоторые результаты действия глюкагона. То же можно сказать и о глюкагоне в его отношении к инсулину.

Обмен гликогена в печени зависит не только от ритма питания, но и от мышечной активности. В этом случае сигналом, стимулирующим мобилизацию гликогена, служит гормон адреналин, концентрация которого в крови повышается при мышечной работе и стрессе (гормон «борьбы и бегства»). В гепатоцитах есть рецепторы адреналина двух типов: β_2-рецепторы, передающие сигнал через аденилатциклазную систему, и α_1-рецепторы, передающие сигнал через инозитолфосфатную систему (см. гл. 7). Начальные события в гепатоцитах, связанные со сменой состояний покой/мышечная работа, можно представить следующей таблицей:

Параметр	Покой	Работа
Концентрация адреналина в крови	↓	↑
Концентрация цАМФ в клетке	↓	↑
Активность протеинкиназ А	↓	↑
Концентрация $ИФ_3$ в клетке	↓	↑
Концентрация Ca^{2+}в клетке	↓	↑
Активность протеинкиназы С	↓	↑

При передаче адреналинового сигнала через β_2-рецепторы активируется протеинкиназа А, которая далее активирует распад гликогена, как и в случае регуляции глюкагоном (см. рис. 9.27).

При передаче сигнала через инозитолфосфатную систему (α_1-рецепторы адреналина) ключевую роль играют комплекс Са-кальмодулин (кальмодулин-4Ca^{2+}) и кальмодулинзависимые протеинкиназы (см. рис. 7.19). Са-кальмодулин, соединяясь с киназами, активирует их; комплекс Са-кальмодулин/протеинкиназа фосфорилирует свой субстрат. В частности, активируется протеинкиназа, фосфорилирующая гликогенсинтазу: синтез гликогена прекращается (рис. 9.29). Активируется также киназа фосфорилазы, которая фосфорилирует (активирует) гликогенфосфорилазу: начинается распад гликогена. Переключение происходит очень быстро, и гепатоциты начинают выделять глюкозу в кровь через несколько секунд после появления адреналинового сигнала.

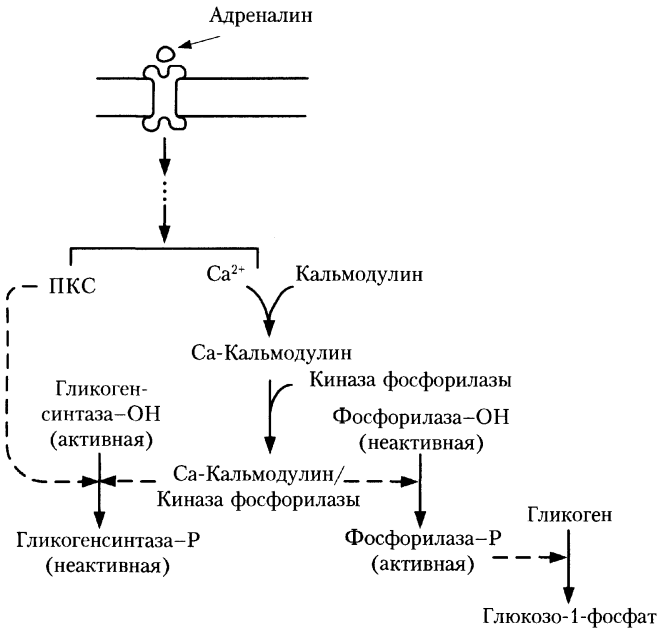


Рис. 9.29. Активация распада гликогена в печени при мышечной работе: ПКС — протеинкиназа С

Адреналин называют синергистом глюкагона в печени. При интенсивной мышечной работе стимуляция глюкагоном распада гликогена может оказаться недостаточной для снабжения мышц глюкозой, поэтому включаются дополнительные стимулы. Это относится к постабсорбтивному периоду. Но ситуации «борьбы и бегства» случаются и в абсорбтивном периоде, когда обмен гликогена находится под контролем инсулина. В этом случае адреналин предстает как антагонист инсулина, ограничивая синтез гликогена.

Синтез и мобилизация гликогена в мышцах

В абсорбтивном состоянии мышечные клетки активно потребляют глюкозу из крови и синтезируют гликоген. Этому способствуют алиментарная гиперглюкоземия и то, что инсулин стимулирует перемещение ГЛЮТ-4 из цитозоля в плазматическую мембрану.

В мышцах нет рецепторов глюкагона, и распад гликогена стимулируется главным образом ионами Ca^{2+} и адреналином, сходно с тем, как это происходит в печени. Однако источником Ca^{2+}в мышцах служит прежде всего его освобождение из саркоплазматического ретикулума при нейростимуляции, а не в результате действия адреналина.

При кратковременных мышечных нагрузках основным поставщиком энергии служит глюкоза, которая частью поступает в мышцы из крови, частью образуется (в форме глюкозо-1-фосфата) из гликогена, запасенного в самих мышечных клетках. Отметим, что 100 г гликогена могут обеспечить бег примерно в течение 15 мин.

При переходе от состояния покоя к интенсивной мышечной работе потребность скелетных мышц в энергии за короткое время (доли секунды) возрастает в десятки раз. Каскадный механизм обеспечивает быстрое включение реакций, поставляющих энергию. Процесс начинается вне организма — с возникновения стрессовой ситуации, связанной с необходимостью напряженной работы, например в спортивных состязаниях, при бегстве от опасности и т. п. В ответ на сигнал центральной нервной системы из мозгового вещества надпочечников секретируется в кровь адреналин, который взаимодействует с рецепторами мембран мышечных клеток, и запускаются каскады реакций, рассмотренные выше: аденилатциклазный, инозитолфосфатный, связанный с кальмодулином. В этих каскадах есть ступени усиления сигнала. Например, в аденилатциклазном каскаде одна молекула адреналина активирует одну молекулу аденилатциклазы — здесь усиления нет. Но одна молекула аденилатциклазы может синтезировать много молекул цАМФ — происходит усиление сигнала. Таким же образом сигнал усиливается на всех ферментативных стадиях. Это значит, что каскадный механизм обеспечивает включение в процесс катаболизма больших количеств глюкозы за короткое время.

Когда необходимость в мышечной работе отпадает, секреция адреналина прекращается. Уже выделившийся адреналин разрушается, в результате чего инактивируется аденилатциклаза. Имеющийся в клетке цАМФ разрушается фосфодиэстеразой, а следовательно, инактивируются протеинкиназы; гликогенфосфорилаза и гликогенсинтетаза дефосфорилируются фосфатазами, и система приходит в состояние, когда мобилизация гликогена подавлена, но возможен его синтез.

Влияние адреналина на работоспособность связано не только с мобилизацией гликогена. Адреналин стимулирует также мобилизацию жиров. Кроме того, адреналин увеличивает частоту и силу сокращений сердечной мышцы, а значит, и скорость кровотока. В результате увеличивается доставка в мышцы кислорода, а также глюкозы и других веществ, служащих источниками энергии.

Каскадный механизм в мышцах функционирует при необходимости интенсивной и срочной работы. При умеренных нагрузках в мышцах практически нет фосфорилазы-Р (фосфорилированной), но распад гликогена тем не менее происходит. Это связано с тем, что фосфорилаза-ОН может активироваться иным способом, без превращения в фосфорилазу-Р. В работающих мышцах в результате действия аденилаткиназы повышается концентрация АМФ вследствие его образования из АДФ:

$$2АДФ \rightarrow АТФ + АМФ.$$

АМФ является аллостерическим активатором мышечной фосфорилазы (печеночную фосфорилазу АМФ не активирует). Мышечная фосфорилаза представляет собой гомодимер; каждый из протомеров содержит центр связывания АМФ и центр фосфорилирования. Предельно активная фосфорилаза фосфорилирована и связана с АМФ (рис. 9.30). Промежуточные формы тоже обладают определенной активностью, достаточной для выполнения умеренной физической работы. Выведены мутантные мыши, в клетках которых нет киназы фосфорилазы, и, следовательно, вообще невозможно образование фосфорилазы-Р. В обычных ситуациях по двигательной активности эти мыши не отличаются от нормальных; в частности, они могут долго плавать в воде, при этом гликоген в их мышцах расходуется. Но если такую мышь напугать кошкой, то вместо стремительного бега у нее возникают судороги в результате невозможности срочной и интенсивной мобилизации гликогена.

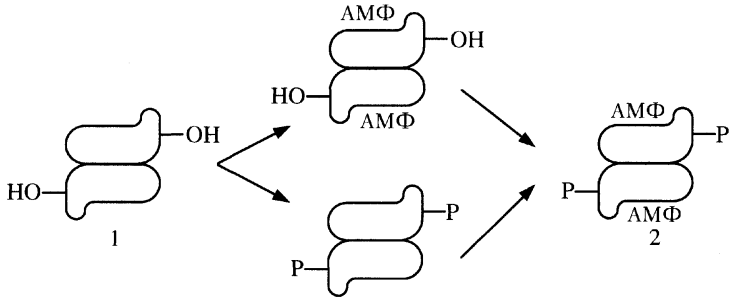


Рис. 9.30. Активация мышечной гликогенфосфорилазы:
1 — неактивная форма; *2* — полностью активная форма

РЕГУЛЯЦИЯ ГЛИКОЛИЗА И ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА

В печени кроме пары противоположных процессов синтеза и распада гликогена, свойственной многим клеткам, есть и другая пара противоположных процессов — гликолиз и глюконеогенез (в других органах — только гликолиз). Как и в случае

синтеза и распада гликогена, регуляция гликолиза и глюконеогенеза связана с ритмом питания, с гормонами инсулином и глюкагоном и с фосфорилированием-дефосфорилированием ферментов. Переключение печени с гликолиза на глюконеогенез и обратно происходит главным образом в результате изменений активности ферментов, образующих I и II субстратные циклы. Глюконеогенез включается в постабсорбтивном состоянии, когда концентрация глюкагона в крови повышена и, следовательно, активирована аденилатциклазная система и протеинкиназа А.

В регуляции I цикла основная роль принадлежит пируваткиназе, фосфорилированная форма которой неактивна, а дефосфорилированная — активна (рис. 9.31). Следовательно, гликолитическая реакция ФЕП → пируват ускоряется при пищеварении и замедляется в постабсорбтивном состоянии. Что касается реакций этого цикла, связанных с глюконеогенезом (пируват → оксалоацетат → ФЕП), то, по всей вероятности, они с определенной скоростью происходят при любых состояниях. Это может быть связано с необходимостью поддержания в клетке определенной концентрации оксалоацетата, поскольку он участвует во многих важных процессах, включая цитратный цикл.

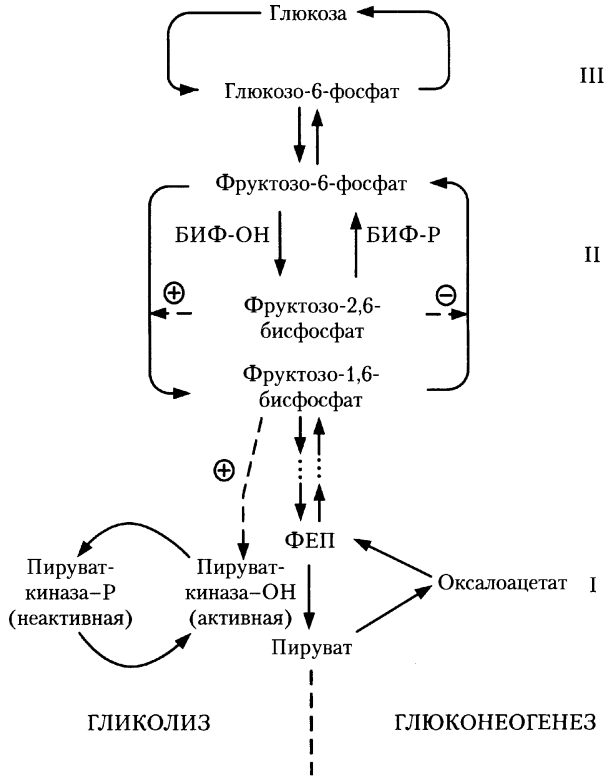


Рис. 9.31. Регуляция гликолиза и глюконеогенеза в печени:
I, II, III — субстратные циклы; *БИФ* — бифункциональный фермент

Активность ферментов второго субстратного цикла зависит от концентрации фруктозо-2,6-бисфосфата (см. рис. 9.31). Как и фруктозо-1,6-бисфосфат, фруктозо-2,6-бисфосфат образуется из фруктозо-6-фосфата и может снова превращаться во фруктозо-6-фосфат, т. е. тоже получается субстратный цикл. Обе реакции этого цикла катализирует один фермент — бифункциональный фермент (БИФ), который регулируется путем фосфорилирования-дефосфорилирования. Дефосфорилированный фермент (БИФ–ОН) обладает киназной активностью (фруктозо-6-фосфат-2-киназа), а фосфорилированный (БИФ–Р) — фосфатазной активностью (фосфатаза фруктозо-2,6-бисфосфата). Киназная и фосфатазная реакции катализируются разными активными центрами, но в каждом из двух состояний фермента — фосфорилированном и дефосфорилированном — один из активных центров ингибирован.

Фруктозо-2,6-бисфосфат активирует фосфофруктокиназу (6-фосфофруктокиназу), т. е. гликолитический фермент, и ингибирует фосфатазу фруктозо-1,6-бисфосфата — фермент глюконеогенеза. При пищеварении БИФ дефосфорилирован, следовательно, проявляет киназную активность, увеличивает концентрацию фруктозо-2,6-бисфосфата, который активирует гликолитическое направление цикла II, и ингибирует направление глюконеогенеза этого цикла.

В постабсорбтивном состоянии БИФ фосфорилирован, проявляет фосфатазную активность, и концентрация фруктозо-2,6-бисфосфата снижается. Вследствие этого активность 6-фосфофрукто-1-киназы тоже снижается, а активность фосфатазы фруктозо-1,6-фосфата увеличивается, т. е. гликолитическое направление тормозится, а направление глюконеогенеза активируется.

Субстратный цикл III регулируется главным образом концентрацией глюкозы. При пищеварении концентрация глюкозы в гепатоцитах существенно повышается и, соответственно, повышается скорость фосфорилирования глюкозы глюкокиназой (см. разд. «Фосфорилирование глюкозы»). Поскольку в этих условиях активированы гликолитические ветви субстратных циклов II и I, то основная часть глюкозо-6-фосфата направляется на путь гликолиза.

Фруктозо-1,6-бисфосфат является аллостерическим активатором пируваткиназы. При ускорении начальных стадий гликолиза после приема пищи концентрация фруктозо-1,6-бисфосфата повышается, что приводит к дополнительной активации пируваткиназы. Этим достигается координация функционирования I и II субстратных циклов.

В целом за счет распада гликогена и глюконеогенеза печень поставляет в кровь около 300 г глюкозы за сутки, из них примерно $^2/_3$ — из гликогена.

Один из основных результатов гликолиза в печени — образование исходных веществ для синтеза жиров. Конечный продукт аэробного гликолиза — пируват подвергается окислительному декарбоксилированию, и образующийся ацетил-КоА используется для синтеза жирных кислот (наряду с окислением в цитратном цикле). Необходимый для синтеза жиров α-глицерофосфат образуется из другого метаболита гликолиза — диоксиацетонфосфата. Подробнее синтез жиров из глюкозы рассматривается в гл. 10.

В целом регуляция гликолиза, глюконеогенеза, синтеза и распада гликогена с участием гормонов инсулина, глюкагона и адреналина обеспечивает следующие физиологические процессы:

1) запасание гликогена для использования в промежутках между приемами пищи;
2) предотвращение чрезмерного повышения концентрации глюкозы в крови после приема пищи (глюкоза в высоких концентрациях может быть токсичной — см. гл. 15);
3) при голодании снабжение глюкозой клеток, которые в качестве источника энергии используют преимущественно глюкозу (нервные клетки, эритроциты, мозговое вещество почек);
4) быстрое обеспечение глюкозой мышц, потребность которых в энергии резко возрастает при мышечной работе.

ОБМЕН ФРУКТОЗЫ И ГАЛАКТОЗЫ

Фруктоза включается в путь распада глюкозы на стадии триозофосфатов (см. рис. 9.32, *а*). С наследственной недостаточностью фруктозо-1-фосфатальдолазы (фермент *2* на схеме) связана врожденная непереносимость фруктозы. В этом случае при наличии в пище фруктозы в тканях накапливается фруктозо-1-фосфат (вследствие блока реакции 2), который ингибирует альдолазу фруктозо-1,6-бисфосфата — фермент гликолиза и глюконеогенеза. В результате нарушается и распад, и синтез глюкозы. Кроме того, фруктозо-1-фосфат ингибирует фосфорилазу гликогена. Эти причины приводят к появлению гипоглюкоземии после приема пищи, содержащей фруктозу. Болезнь обычно обнаруживается после перехода с грудного кормления на пищу, содержащую сахарозу, и проявляется приступами рвоты и судорог после еды. При устранении фруктозы из рациона дети развиваются нормально.

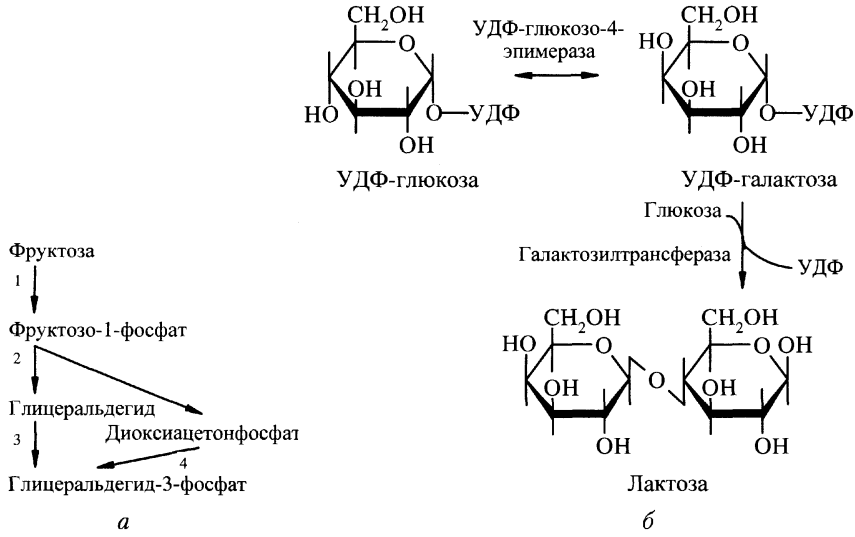


Рис. 9.32. Обмен фруктозы (*а*) и галактозы (*б*):

а: 1 — фруктокиназа; *2* — альдолаза фруктозо-1-фосфата; *3* — глицеральдегидкиназа; *4* — триозофосфатизомераза; *б: 1* — УДФ-глюкозо-4-эпимераза; *2* — галактозилтрансфераза

Известно также наследственное нарушение обмена *фруктоземия*, вызываемое недостаточностью фруктокиназы. Поступающая в организм фруктоза не подвергается никаким изменениям, обнаруживается в крови и выводится с мочой. Каких-либо других симптомов при фруктоземии не наблюдали.

Включается в метаболизм путем превращения в глюкозо-1-фосфат.

На рис. 9.32, *б* представлены пути превращений галактозы. Реакция, катализируемая УДФ-глюкозо-4-эпимеразой обратима, и используется как для синтеза УДФ-галактозы (и затем лактозы), так и для катаболизма галактозы. Лактоза синтезируется только в молочной железе женщин и только в период лактации.

Известно наследственное заболевание *галактоземия*, при котором имеется недостаточность галактозилтрансферазы (см. рис. 9.32, *б*). Болезнь обнаруживается с первых дней после рождения, проявляется в отказе от еды, рвоте, поносе. Характерным для галактоземии является развитие помутнения хрусталика (катаракта). Перевод на пищу, не содержащую галактозы, полностью предотвращает все проявления болезни. Однако уже развившаяся катаракта при этом не исчезает.

ВЛИЯНИЕ ЭТИЛОВОГО АЛКОГОЛЯ НА ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Метаболизм этилового спирта включает реакции дегидрирования, в результате которых образуется уксусная кислота (рис. 9.33). Примерно 90 % ацетата образуется в печени. Часть ацетата в печени же превращается в ацетил-КоА, но большая часть из гепатоцитов попадает в кровь, а затем в мышцы, где тоже превращается в ацетил-КоА. В этой форме ацетильный остаток включается в цитратный цикл. Это основной путь метаболизма этанола в организме; частично этанол окисляется другими путями, при участии микросомальных ферментов окисления.

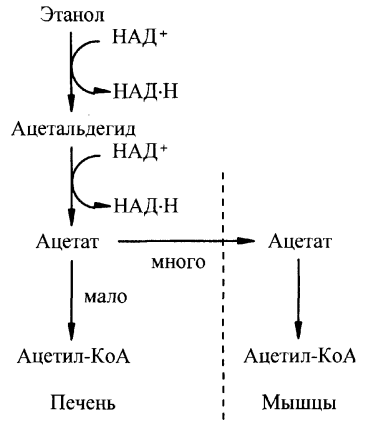


Рис. 9.33. Метаболизм этанола

В результате быстрого дегидрирования больших количеств этанола в клетках печени уменьшается концентрация НАД$^+$ и увеличивается концентрация НАДН. Для окисления 125 г этанола требуется НАД$^+$ столько же, сколько для окисления 500 г глюкозы, т. е. такое количество углеводов, которое потребляется за сутки. Значительная часть глюкозы пищи после еды депонируется в форме гликогена и расходуется постепенно. Обмен этанола происходит за существенно более короткое время, особенно первая реакция — образование ацетальдегида, поэтому после приема алкоголя отношение [НАД$^+$] / [НАДН] уменьшается. Это ведет к тому, что изменяется скорость всех реакций, зависящих от НАД$^+$ и НАДН. В частности, изменяются стационарные концентрации пирувата и лактата:

$$\text{Пируват} + \text{НАДН} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{Лактат} + \text{НАД}^+.$$

Концентрация пирувата в клетках и в крови уменьшается, а концентрация лактата увеличивается. Вследствие этого снижается скорость глюконеогенеза в пече-

ни, поскольку предшественником глюкозы служит пируват. Так как глюконеогенез — один из источников глюкозы крови, то возникает гипоглюкоземия. Особенно выраженной гипоглюкоземия бывает в тех случаях, когда отсутствуют запасы гликогена в печени и мышцах: при приеме алкоголя натощак, после значительной физической работы, у хронических алкоголиков, у которых постоянно снижен аппетит. Гипоглюкоземия может быть причиной потери сознания при алкогольном отравлении.

При больших дозах и хроническом потреблении алкоголя в крови содержится много ацетальдегида, который повреждает мембранные структуры клеток. В частности, повреждаются митохондрии: снижается трансмембранный потенциал и эффективность сопряжения дыхания с фосфорилированием.

ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ ПРЕВРАЩЕНИЙ ГЛЮКОЗЫ

Пентозофосфатный (фосфоглюконатный) путь обеспечивает клетку гидрированным НАДФ для восстановительных синтезов и пентозами для синтеза нуклеотидов. Следовательно, этот процесс выполняет анаболические функции. Кроме того, НАДФН используется в механизмах обезвреживания ряда токсических веществ и в разрушении фагоцитированных микроорганизмов (см. гл. 19). В пентозофосфатном пути можно выделить две части — окислительный и неокислительный пути.

Окислительный путь включает две реакции дегидрирования, в которых акцептором водорода служит НАДФ. Во второй из этих реакций одновременно происходит декарбоксилирование, углеродная цепь укорачивается на один атом углерода и получаются пентозы (рис. 9.34). Образование НАДФН регулируется по механизму

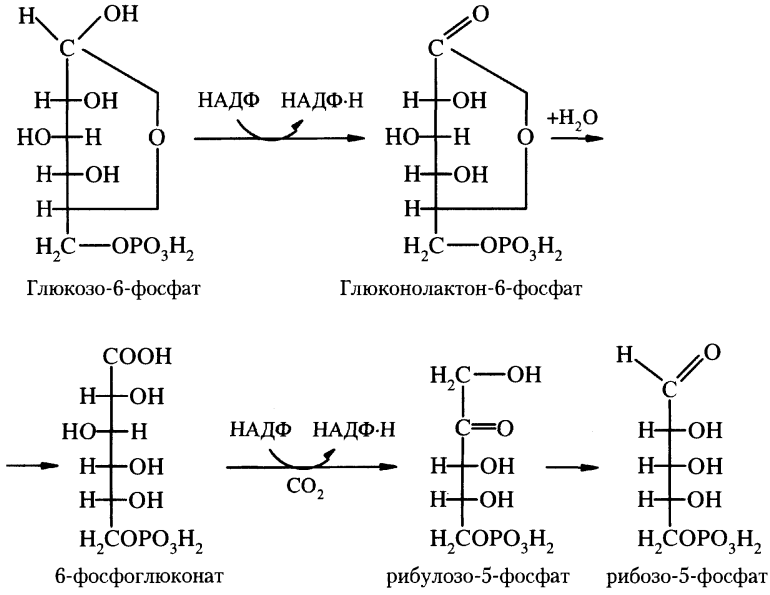


Рис. 9.34. Окислительные реакции пентозофосфатного пути

отрицательной обратной связи: НАДФН — сильный ингибитор глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, следовательно, скорость синтеза НАДФН пропорциональна скорости его расходования.

Неокислительный путь значительно сложнее. В этом пути нет реакций дегидрирования, он может служить только для полного распада пентоз (до CO_2 и H_2O) или для превращения пентоз в глюкозу. Общая схема неокислительного пути образования пентоз представлена на рис. 9.35.

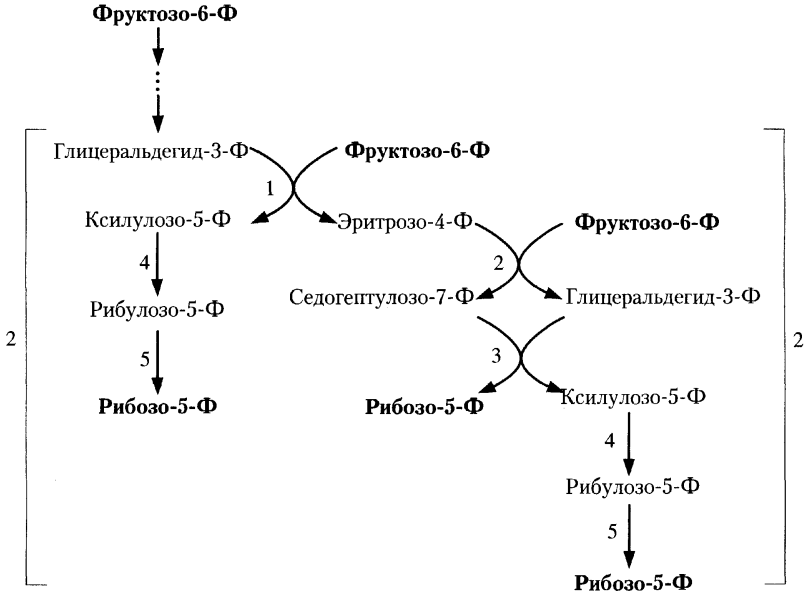


Рис. 9.35. Неокислительные реакции пентозофосфатного пути. У всех соединений в квадратных скобках стехиометрические коэффициенты равны двум; *Ф* — фосфат

В процессе, представленном на рис. 9.35, исходными веществами являются пять молекул фруктозо-6-фосфата, в сумме содержащие 30 углеродных атомов (обратите внимание на стехиометрический коэффициент 2); конечный продукт реакции — шесть молекул рибозо-5-фосфата, в сумме также содержащие 30 углеродных атомов (подчеркнуты пунктирной линией). Поскольку исходные вещества (фруктозо-6-фосфат), в свою очередь, образуются из глюкозы, можно сказать, что в этом процессе пять молекул глюкозы превращаются в шесть молекул пентозы без каких-либо потерь вещества.

Все реакции неокислительного пути образования пентоз обратимы. Следовательно, можно представить процесс, в котором шесть молекул пентоз превращаются в пять молекул глюкозы, т. е. путь возвращения пентоз в фонд гексоз. Этим способом могут утилизироваться пентозы, образующиеся в разных метаболических процессах, например при распаде нуклеотидов или в окислительном пути образования пентоз.

Окислительный путь образования пентоз и путь возращения пентоз в гексозы вместе составляют циклический процесс (рис. 9.36). В этом цикле за один

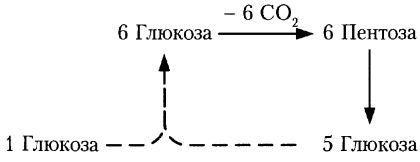


Рис. 9.36. Пентозофосфатный цикл

оборот полностью распадается одна молекула глюкозы, все шесть углеродных атомов которой превращаются в CO_2. Диоксид углерода — это продукт выделения, а единственным полезным продуктом является НАДФН, образующийся в окислительной части цикла. Такой процесс называют пентозофосфатным циклом или апотомическим путем распада глюкозы. Энергия распадающейся глюкозы трансформируется в энергию НАДФН, а затем, после использования водорода НАДФН для восстановительных синтезов, в энергию других веществ, например жирных кислот.

Глицеральдегидфосфат и фруктозо-6-фосфат, образующиеся в неокислительной части пентозофосфатного пути, являются промежуточными продуктами также и гликолиза и могут включиться в гликолиз. Поскольку все реакции неокислительного пути обратимы, то все его продукты могут вступить на путь гликолиза через глицеральдегидфосфат и фруктозо-6-фосфат. Такой вариант пути называют пентозофосфатным шунтом; это — основной маршрут метаболитов пентозофосфатного пути. Вероятно, в разных органах и условиях реализуются разные варианты пентозофосфатного пути.

Пентозофосфатный путь особенно активно функционирует в органах, где синтезируются большие количества липидов — в печени, жировой ткани, молочной железе, коре надпочечников. Это связано с тем, что при синтезе липидов происходит много реакций гидрирования, в которых донором водорода служит НАДФН. За счет окислительного пути синтеза пентоз обеспечивается примерно половина всей потребности клеток в НАДФН (другая половина получается в результате действия НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы; см. гл. 8).

ГЛИКОЛИПИДЫ И ГЛИКОПРОТЕИНЫ

В предыдущих разделах этой главы был рассмотрен обмен углеводов, в основном глюкозы, связанный главным образом с их использованием в качестве источника энергии для организма. Исключение составляет пентозофосфатный путь, который выполняет анаболические функции. В этом разделе описаны углеводы, которые содержатся в качестве составной части молекул в гликолипидах и гликопротеинах, выполняющих структурные и другие специальные функции в клетке. Структурные углеводы, характерные для межклеточного матрикса и соединительной ткани, рассмотрены в гл. 18.

Строение углеводной части

Углеводная часть гликолипидов и гликопротеинов может быть представлена моносахаридами, а также полисахаридами, которые обычно построены из разных моносахаридных остатков (гетерополисахариды). Чаще всего в углеводной части встречаются следующие моносахариды: галактоза (Gal), манноза (Man), глюкоза (Glc), 6-дезоксимоносахарид фукоза (Fuc), N-ацетилгалактозамин (GalNAc), N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), сиаловая кислота (N-ацетилнейраминовая кислота — NeuNAc) (рис. 9.37). Все эти моносахариды в организме синтезируются из глюкозы.

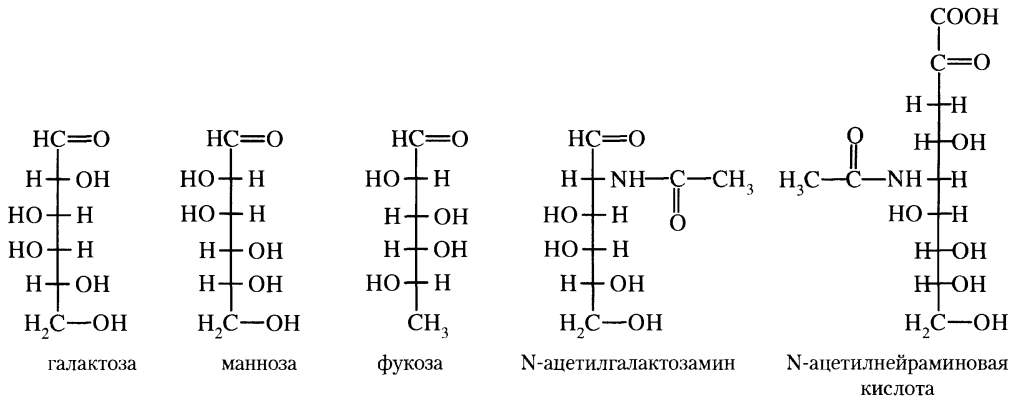


Рис. 9.37. Моносахариды углеводной части гликолипидов и гликопротеинов

В полисахаридах моносахариды соединены гликозидными связями, в образовании которых участвует полуацетальный (гликозидный) гидроксил одного моносахарида и любая гидроксильная группа другого моносахарида. Для альдогексоз возможны такие связи: 1→1, 1→2, 1→3, 1→4, 1→5, 1→6. При этом гликозидный гидроксил может иметь α- или β-конфигурацию. Вследствие этих особенностей даже из небольшого числа мономеров возможно построить огромное число разных олигосахаридов — линейных и разветвленных. Например, из трех моносахаридов можно образовать 1056 разных трисахаридов. Напомним, что из трех разных аминокислот получается только шесть разных трипептидов. Приведем в качестве примера строение антигена В системы групп крови АВО (Cer — остаток церамида):

Fuc (α1→2) Gal (β1→3) GlcNAc (β1→3) Gal (β1→3) GalNAc–Cer
3
↑
α1Gal

Наиболее распространенные гликолипиды — это гликоцерамиды (гликосфинголипиды), представляющие собой производные церамида (см. гл. 7). В частности, антигены А и В мембран эритроцитов являются гликоцерамидами.

В гликопротеинах углеводная часть может быть связана с белком за счет гидроксильных групп серина или треонина (О-гликозидная связь) или за счет амидной группы аспарагина (N-гликозидная связь). С одной белковой молекулой может быть связано разное число углеводных цепей — от одной до нескольких десятков, и цепи могут иметь разное строение.

Синтез углеводной части гликолипидов и гликопротеинов

Синтез гетерополисахаридов происходит при участии *гликозилтрансфераз* — ферментов, к числу которых относится и гликогенсинтетаза (глюкозилтрансфераза). Донорами моносахаридных остатков служат нуклеозиддифосфат-сахара — соединения типа УДФ-глюкозы. Синтез гликолипидов начинается с присоединения первого моносахаридного остатка к церамиду.

Например, так:

УДФ—GalNAc + Cer → УДФ + GalNac—Cer.

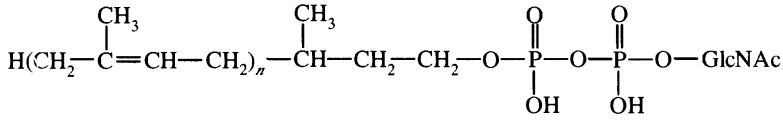
Эту реакцию катализирует трансфераза N-ацетилгалактозамина; фермент специфичен и к донору моносахарида, и к акцептору. Далее присоединяется второй моносахарид:

УДФ—Gal + GalNAc—Cer → УДФ + Gal(β1→3)GalNac—Cer.

Здесь действует другой фермент — галактозилтрансфераза, который тоже специфичен и к донору, и к акцептору моносахаридного остатка. Две приведенные реакции — это начало синтеза антигена В. Для завершения синтеза требуется еще несколько трансфераз с различной субстратной специфичностью.

Гликозилтрансферазы — очень большая группа ферментов, с помощью которых образуются разнообразные гетерополисахариды. Хотя синтез гетерополисахаридов не относится к матричным, результат получается сходным в том отношении, что образуются полимеры не с произвольной, а со строго определенной последовательностью мономеров.

Синтез углеводной части гликопротеинов, соединенной с белком О-гликозидной связью, происходит так же, как и в случае гликолипидов. Синтез полисахаридов, присоединенных N-гликозидной связью, происходит иначе: в этом случае участвует промежуточный носитель олигосахарида *долихолфосфат* — вещество изопреноидной природы. Долихолфосфат — амфифильное вещество. Гидрофобным концом оно погружено в мембрану, а выступающий гидрофильный конец служит акцептором первого моносахарида — GlcNAc; в результате реакции получается N-ацетилглюкозаминилдифосфорилдолихол:



Затем последовательно при действии серии специфических гликозилтрансфераз присоединяются другие моносахариды, и образуется олигосахарид, включающий больше десятка мономеров. Этот олигосахарид при участии специальной трансферазы целиком переносится на амидную группу аспарагина в составе пептидной цепи. Затем происходит доработка олигосахарида: часть мономеров отщепляется, вместо них присоединяются другие. В результате образуются разные углеводные компоненты у разных гликопротеинов.

Гликопротеины есть среди всех классов белков — ферментов, гормонов, транспортных белков, структурных белков и др. На рис. 9.38 приведены примеры олигосахаридных структур гликопротеинов.

В некоторых случаях одинаковые полисахариды обнаруживаются в составе как гликолипидов, так и гликопротеинов. Например, антигены системы АВО в эритроцитах связаны с церамидом, а в слюне — с белком.

Гликолипиды встречаются только в мембранах, и, главным образом, в плазматической мембране. Гликопротеины содержатся и в мембранах, и в цитозоле, и в жидкостях организма.

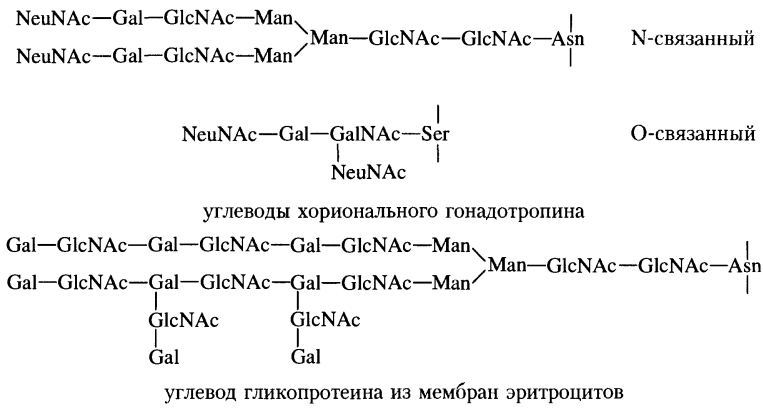


Рис. 9.38. Некоторые олигосахариды гликопротеинов

Функции углеводов мембран

Углеводная часть гликолипидов и гликопротеинов плазматической мембраны всегда находится на наружной поверхности мембраны, контактируя с межклеточным веществом. Углеводы плазматической мембраны выполняют роль специфических лигандов для белков. Они образуют участки узнавания, к которым присоединяются определенные белки; присоединившийся белок может изменить функциональное состояние клетки.

В наружной мембране эритроцитов некоторые полисахариды содержат N-ацетилнейраминовую кислоту на концах цепей. Если эритроциты выделить из крови, обработать *in vitro* нейраминидазой, отщепляющей N-ацетилнейраминовую кислоту от мембранных углеводов, и вновь ввести в кровь тому же животному, то обнаруживается, что время полужизни таких эритроцитов в крови уменьшается в несколько раз: они задерживаются в селезенке и разрушаются. Как выяснилось, в клетках селезенки есть рецептор, узнающий углевод, который утратил концевые остатки нейраминовой кислоты. Возможно, что такой механизм обеспечивает отбор селезенкой «состарившихся» эритроцитов и их разрушение.

Известно, что в суспензии клеток, выделенных из какой-либо ткани, через некоторое время образуются агрегаты клеток, причем в каждом агрегате, как правило, оказываются клетки одного типа. Например, в суспензии клеток, полученных из гаструлы, образуется три вида агрегатов: каждый из них содержит клетки, принадлежащие одному и тому же зародышевому листку — эктодерме, мезодерме или эндодерме. Узнавание между клетками обеспечивается, в частности, взаимодействием мембранных углеводов одной клетки с белками-рецепторами другой клетки (рис. 9.39). Эти механизмы узнавания могут участвовать в таких процессах, как гистогенез и морфогенез. Однако есть и другие механизмы, обеспечивающие межклеточные контакты.

Полисахариды клеточной мембраны наряду с белками выполняют роль антигенов при развитии клеточного иммунитета, в том числе при реакции отторжения трансплантата. Они также служат местами узнавания при заражении патогенными

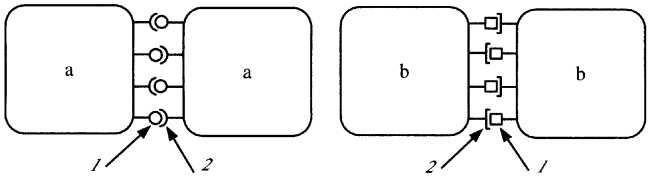


Рис. 9.39. Межклеточные контакты с участием углеводов мембраны:
1 — белки-рецепторы; *2* — углеводы; клетки a комплементарны друг другу, как и клетки b; клетки a некомплементарны клеткам b

вирусами и микроорганизмами. Например, вирус гриппа при проникновении в клетку сначала присоединяется к ее мембране, взаимодействуя с полисахаридом определенной структуры.

Роль углеводной части немембранных гликопротеинов

Углевод гликопротеина может защищать белковую часть от действия протеолитических ферментов. Например, внутренний фактор Касла, обеспечивающий перенос витамина B_{12} в клетки кишечника, представляет собой гликопротеин, достаточно устойчивый к действию пищеварительных протеиназ. Если этот белок обработать гликозидазами, разрушающими углеводную часть, он становится легкодоступным для протеиназ и быстро переваривается.

Белок плазмы крови церулоплазмин — тоже гликопротеин. Как у большинства гликопротеинов крови, углеводная часть церулоплазмина (сиалоцерулоплазмина) содержит на концах цепей сиаловую кислоту:

NeuNAc—Gal—GlcNAc—

Скорость обновления этого белка в крови довольно велика: время полужизни измеряется несколькими часами. Если же удалить концевые остатки сиаловой кислоты, время полужизни белка (асиалоцерулоплазмина) уменьшается до нескольких минут: такой церулоплазмин улавливается рецепторами гепатоцитов, комплементарными к дисахаридным остаткам Gal-GlcNAc-. Присоединение асиалоцерулоплазмина к рецепторам запускает механизм эндоцитоза, эндоцитозный пузырек затем сливается с лизосомой, и асиалоцерулоплазмин разрушается лизосомными ферментами. Если у церулоплазмина удалить еще и остаток галактозы, то взаимодействие с рецептором уже невозможно и время полужизни церулоплазмина в крови вновь увеличивается, становится таким же, как у исходного церулоплазмина. Таким образом, здесь, как и в случае с эритроцитами, углеводная часть гликопротеина определяет продолжительность его существования в крови.

Известны десятки белков, извлекаемых печенью из крови по такому же механизму, как церулоплазмин. Помимо рецепторов, узнающих углевод с галактозным концевым остатком, есть рецепторы, улавливающие гликопротеины с концевой фукозой, фосфоманнозой, маннозой, N-ацетилглюкозамином. Аналогичные рецепторы есть не только в плазматической мембране гепатоцитов, но и в звездчатых ретикулоэндотелиоцитах, в фибробластах, в некоторых клетках почек и, вероятно, во многих других органах. Набор рецепторов в клетках разных типов

может быть неодинаковым. Например, некоторые асиалогликопротеины, если от них отщепить еще и следующие моносахариды, улавливаются уже не печенью, а почками. После введения в кровь крысам меченных изотопами лимфоцитов через некоторое время можно обнаружить их накопление в селезенке. Если же перед введением удалить с помощью фермента фукозу из углеводов поверхности лимфоцитов, то их маршрут изменяется, и они оказываются в печени.

Таким образом, углеводная часть гликопротеинов служит чем-то вроде путевки, в которой при помощи определенного чередования моносахаридов записан адрес следования гликопротеина. Это относится не только к секретируемым белкам. Многие внутриклеточные гликопротеины локализованы и функционируют не в том месте, где они синтезируются: окончательное место они находят с помощью своей углеводной части и соответствующих рецепторов в определенном отсеке клетки.

В плазме крови содержится много разных гликопротеинов. Молекулы гликопротеинов, утратившие N-ацетилнейраминовую кислоту (асиалогликопротеины), улавливаются большей частью печенью и разрушаются в ней. При некоторых болезнях печени эта ее функция нарушается, и концентрация асиалогликопротеинов в крови увеличивается: в 1 мл плазмы крови здорового человека содержится от 1 до 5 мкг асиалогликопротеинов, а при гепатите, циррозе, раке печени — в 2–3 раза больше. По концентрации асиалогликопротеинов в крови часто можно оценить и тяжесть повреждения печени. Например, при раке печени наблюдается прямая корреляция между размерами опухоли и отношением асиалотрансферрин/сиалотрансферрин. Измерение концентрации асиалогликопротеинов в крови используется для диагностики заболеваний печени и для контроля эффективности лечения.

Делаются попытки применить полисахаридную «путевку» для доставки лекарственных веществ в нужный орган или нужные клетки. Если к простым белкам (не гликопротеинам) в условиях *in vitro* присоединить олигосахариды, характерные для асиалогликопротеинов, а затем ввести эти белки в кровь, то такие искусственные асиалогликопротеины тоже очень быстро извлекаются из крови печенью. Этим способом можно было бы, например, ввести гликогенфосфорилазу в клетки больного гликогенозом и удалить накопившийся гликоген. Аналогично можно вводить точно по адресу и другие лекарства, корректирующие нарушенные функции разных органов и клеток.

Гликозидозы

Как и все вещества в организме, гетерополисахариды гликолипидов и гликопротеинов непрерывно обновляются. При наследственной недостаточности ферментов, участвующих в обмене гетерополисахаридов, они накапливаются в клетке — развивается гликозидоз. Чаще всего такие болезни связаны с дефектом гликозидаз — ферментов, разрушающих гетерополисахариды. Известно несколько десятков гликозидаз, гидролизующих разные гликозидные связи в гетерополисахаридах. Эти ферменты локализованы преимущественно в лизосомах. Существует много форм гликозидозов: каждая из них обычно обусловлена дефектом какой-либо одной гликозидазы и характеризуется накоплением в клетках (в лизосомах)

определенного гетерополисахарида или группы сходных гетерополисахаридов. В табл. 9.2 приведены некоторые формы гликозидозов, связанные с нарушением метаболизма углеводной части гликолипидов (гликолипидозы).

Гликозидозы часто проявляются с первых недель жизни и обычно связаны с резким нарушением развития ребенка. Продолжительность жизни больных уменьшена, часто смерть наступает в раннем детском возрасте. Частота гликозидозов равна примерно 1:100 000.

Таблица 9.2. Некоторые типы гликолипидозов

Название болезни	Продукт накопления	Дефектный фермент
Болезнь Гоше	Glc—Cer	Глюкоцереброзид-β-глюкозидаза
Синдром Краббе	Gal—Cer	Галактоцереброзид-β-галактозидаза
Церамидлактозид-липидоз	Gal—Glc—Cer	Нейтральная β-галактозидаза
Метахроматическая лейкодистрофия	Gal(3-OSO3)—Cer	Арилсульфатаза А
Синдром Фабри	Gal—Gal—Glc—Cer	Церамидтригексозид-α-галактозидаза
Синдром Тея—Сакса	GalNAc—Gal—Glc—Cer | NeuNAc	Гексозаминидаза А
Болезнь Зандгоффа	GalNAc—Gal—Gal—Glc—Cer	Гексозаминидазы А и В
GM1-Ганглиозидоз	Gal—GalNAc—Gal—Glc—Cer | NeuNAc	β-Галактозидаза

Глава 10

ОБМЕН И ФУНКЦИИ ЛИПИДОВ

Липиды организма человека включают соединения, значительно различающиеся и по структуре, и по функциям в живой клетке. Наиболее важные группы липидов указаны ниже.

1. Жирные кислоты, самые простые по строению липиды. В организме они служат главным образом промежуточными продуктами при распаде или синтезе других липидов.
2. Жиры (триацилглицерины) выполняют главным образом функцию резервного энергетического материала. Липиды пищи представлены в основном жирами (около 99 %).
3. Фосфолипиды и гликолипиды (сложные липиды) — важнейшие компоненты клеточных мембран.
4. Стероиды; наиболее распространенный их представитель — холестерин. Он входит как структурный элемент в состав клеточных мембран, а также служит предшественником ряда других стероидов — желчных кислот, стероидных гормонов, витамина D_3.
5. Эйкозаноиды — производные арахидоновой кислоты. Выполняют регуляторные функции.

Эти разнородные вещества объединяют в класс липидов главным образом на основе общего для них свойства — гидрофобности всей или значительной части молекулы. Гидрофобность определяет ряд особенностей метаболизма и функций липидов.

С нарушением обмена липидов связан ряд патологических состояний, таких, как ожирение, желчнокаменная болезнь, метаболический ацидоз, атеросклероз.

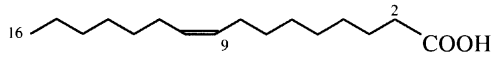
ОБМЕН ЖИРНЫХ КИСЛОТ

В липидах человека обнаруживается большое разнообразие жирных кислот; некоторые из них приведены в табл. 10.1 и на рис. 10.1. Цифровой символ жирной кислоты расшифровывается следующим образом: первая цифра указывает число углеродных атомов в молекуле, цифра после двоеточия — число двойных связей, а

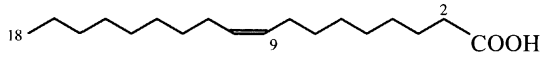
цифры в скобках — положение двойной связи, т. е. номер одного из двух углеродных атомов, соединенных двойной связью (ближайшего к карбоксилу).

Таблица 10.1. Некоторые насыщенные жирные кислоты липидов человека

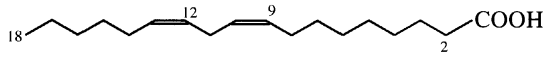
Название	Формула	Цифровой символ
Масляная	$CH_3(CH_2)_2COOH$	4:0
Миристиновая	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	14:0
Пальмитиновая	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	16:0
Стеариновая	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	18:0
Арахиновая	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	20:0
Бегеновая	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	22:0
Лигноцериновая	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	24:0



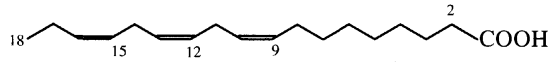
Пальмитоолеиновая кислота, 16:1 (9)



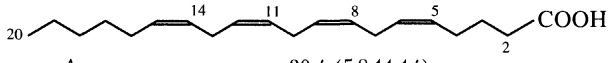
Олеиновая кислота, 18:1 (9)



Линолевая кислота, 18:2 (9,12)



Линоленовая кислота, 18:3 (9,12,15)



Арахидоновая кислота, 20:4 (5,8,11,14)

Рис. 10.1. Основные ненасыщенные жирные кислоты тканей человека

Подавляющее большинство жирных кислот организма имеет четное число углеродных атомов. Жирно-кислотный состав разных групп липидов различен. В триацилглицеринах (жирах) жировой ткани человека в наибольших количествах содержатся олеиновая, пальмитиновая и линолевая кислоты (табл. 10.2).

Таблица 10.2. Примерное содержание основных жирных кислот в триацилглицеринах жировой ткани человека

Жирная кислота	Содержание, %	Жирная кислота	Содержание, %
Миристиновая	3	Олеиновая	55
Пальмитиновая	20	Линолевая	10
Стеариновая	5	Арахидоновая	0,2
Пальмитоолеиновая	5		

В значительных количествах эти жирные кислоты содержатся и в других липидах, однако жирно-кислотный состав гликолипидов и фосфолипидов клеточных мембран гораздо более разнообразен. Особенно много характерных жирных кислот найдено в сложных липидах нервных клеток.

Источниками жирных кислот организма служат липиды пищи (главным образом жиры) и синтез жирных кислот из углеводов. Расходуются жирные кислоты в основном по трем направлениям:

1) включаются в состав резервных жиров;
2) включаются в состав сложных липидов;
3) окисляются до диоксида углерода и воды с использованием энергии для синтеза АТФ.

Свободные жирные кислоты в тканях содержатся в небольших концентрациях, поскольку они служат лишь промежуточными продуктами при синтезе и распаде других липидов. В крови циркулируют жирные кислоты (в соединении с альбуминами), образующиеся при гидролизе триацилглицеринов жировой ткани.

Все превращения свободных жирных кислот в клетках начинаются с образования ацил-КоА (активация жирных кислот):

$$R-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-OH + HS\text{-}KoA + АТФ \rightarrow R-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-S\text{-}KoA + АМФ + H_4P_2O_7$$

Эти реакции катализируются ацил-КоА-синтетазами. В качестве промежуточного продукта как при окислении, так и при синтезе жирных кислот образуется ацетил-КоА. Схема основных путей обмена жирных кислот представлена на рис. 10.2. Метаболизм жирных кислот тесно связан с метаболизмом всех других липидов.

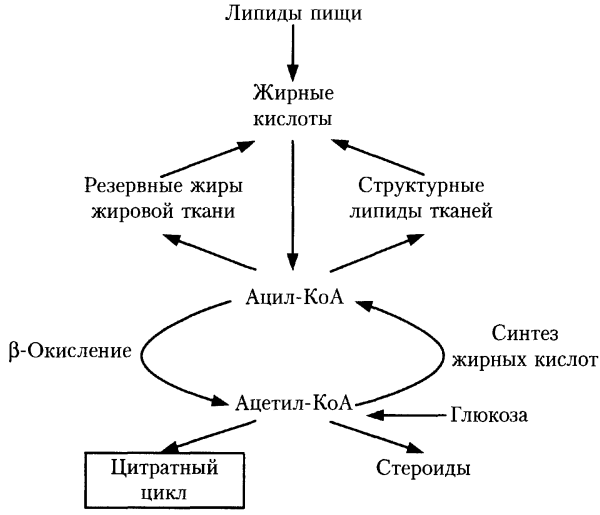


Рис. 10.2. Основные пути превращений жирных кислот

Окисление жирных кислот

Перенос жирных кислот в митохондрии. Все ферменты β-окисления находятся в митохондриях. Внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для жирных кислот; их перенос происходит при участии карнитина:

$$(CH_3)_3N^+-CH_2-CHOH-CH_2-COOH$$

При действии карнитин-ацилтрансферазы I к спиртовой группе карнитина присоединяется жирная кислота (сложноэфирной связью):

Ацил-SKoA + Карнитин ↔ Ацилкарнитин + HSKoA

Карнитин-ацилтрансфераза I локализована в наружной мембране митохондрий, причем активный центр экспонирован в межмембранное пространство (рис. 10.3). Внутренняя мембрана митохондрий содержит белок карнитин-ацилкарнитин-транслоказу: этот белок переносит ацилкарнитин из межмембранного пространства в цитозоль клетки в обмен на карнитин, переносимый из цитозоля в межмембранное пространство.

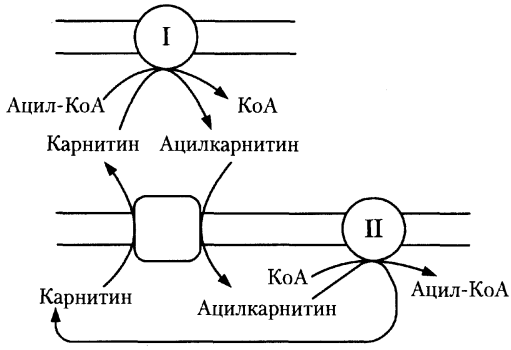


Рис. 10.3. Перенос жирных кислот из цитозоля в митохондрии:
I и *II* — карнитин-ацилтрансферазы

Во внутренней мембране митохондрий имеется также фермент карнитин-ацилтрансфераза II, который превращает ацилкарнитин в ацил-КоА и карнитин.

Специфический путь катаболизма жирных кислот (β-окисление). При β-окислении окисляется группа $-CH_2-$ в β-положении жирной кислоты до группы $-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-$ (рис. 10.4, реакции 1–3). При этом на двух стадиях происходит дегидрирование: при участии ацилдегидрогеназы (реакция *1*, флавиновый фермент, водород переносится на убихинон) и β-оксиацилдегидрогеназы (реакция *3*, акцептор водорода НАД$^+$). Затем β-кетоацил-КоА при действии фермента тиолазы (реакция *4*) распадается на ацетил-КоА и ацил-КоА, укороченный на два углеродных атома по сравнению с исходным. Этот ацил-КоА вновь подвергается β-окислению.

Многократное повторение этого процесса приводит к полному распаду жирной кислоты до ацетил-КоА. Например, молекула пальмитиновой кислоты (пальмитил-КоА), содержащая 16 углеродных атомов, превращается в 8 молекул ацетил-КоА за 7 циклов β-окисления. Суммарный результат окисления пальмитил-КоА можно представить так:

$$CH_3-(CH_2)_{14}-CO-SKoA + 7Q + 7H_2O + 7НАД^+ + 7HSKoA \rightarrow 8CH_3-CO-SKoA + 7QH_2 + 7(НАДН + H^+).$$

Образующиеся в реакциях дегидрирования восстановленные коферменты передают водород в дыхательную цепь: за счет этого при β-окислении 1 моль пальмитиновой кислоты может синтезироваться 35 моль АТФ.

Ацетильный остаток окисляется в цитратном цикле. За счет окисления 8 моль ацетил-КоА, образующихся из пальмитиновой кислоты, может синтезироваться 96 моль АТФ. Полный выход АТФ при окислении 1 моль пальмитил-КоА составляет 131 моль. В АТФ запасается около 60 % всей энергии распада пальмитиновой кислоты до CO_2 и H_2O. При расчете на один атом углерода выход АТФ составляет 8,1 для окисления пальмитата и 6,3 для окисления глюкозы; таким образом, энергетическая емкость жирных кислот существенно больше, чем глюкозы.

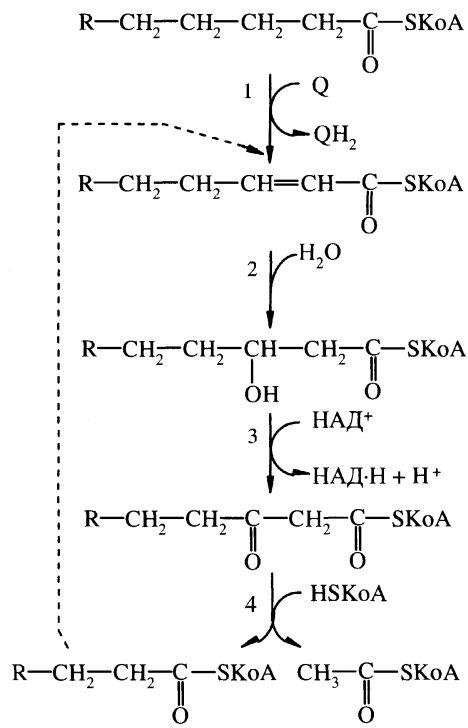


Рис. 10.4. Окисление жирных кислот

Использование жирных кислот путем β-окисления происходит во многих тканях. Особенно значительна роль этого источника энергии в скелетных мышцах при длительной физической работе и в сердечной мышце. Около 70 % кислорода, поглощаемого сердечной мышцей, используется для окисления жирных кислот. Нервная ткань не использует жирные кислоты как источник энергии.

Обмен пропионовой кислоты. В организме преобладают жирные кислоты с четным числом углеродных атомов. Из жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов, имеющихся в организме в небольшом количестве, на завершающей стадии β-окисления образуется пропионил-КоА. Кроме того, пропионил-КоА образуется при распаде некоторых аминокислот (валина, изолейцина, треонина, метионина). Пропионил-КоА окисляется по особому пути (см. рис. 8.15).

Биосинтез жирных кислот

Кроме пищевых жиров источником жирных кислот в организме служит их синтез из глюкозы. Непосредственным предшественником жирных кислот при их синтезе в организме является ацетил-КоА, т. е. то же вещество, которое образуется при β-окислении жирных кислот. Несмотря на то, что все реакции β-окисления обратимы, они не используются для синтеза жирных кислот.

Ацетил-КоА для синтеза жирных кислот образуется путем окислительного декарбоксилирования пирувата. Кроме того, окисление и синтез жирных кислот разделены в пространстве: окисление происходит в митохондриях, а синтез — в цитозоле.

$$R-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-OH + HS\text{-}KoA + АТФ \rightarrow R-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-S\text{-}KoA + АМФ + H_4P_2O_7$$

Перенос ацетильных остатков из митохондрий в цитозоль. Пируватдегидрогеназный комплекс локализован на внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрий, и ацетил-КоА освобождается в матрикс митохондрий. Для синтеза жирных кислот ацетил-КоА должен быть перенесен в цитозоль. Мембрана митохондрий непроницаема для ацетил-КоА, и перенос ацетильного остатка в цитозоль происходит при участии челночного механизма (рис. 10.5). Пируват, образующийся из глюкозы в цитозоле, поступает в митохондрии, где частью превращается в ацетил-КоА (окислительное декарбоксилирование), частью — в оксалоацетат (при действии пируваткарбоксилазы). Затем из этих веществ образуется цитрат, для которого, как и для пирувата, есть белок-переносчик в мембране митохондрий. В цитозоле цитрат распадается снова на оксалоацетат и ацетил-КоА при действии фермента цитратлиазы:

$$Цитрат + HS\text{-}KoA + АТФ \rightarrow Ацетил\text{-}KoA + Оксалоацетат + АДФ + H_3PO_4.$$

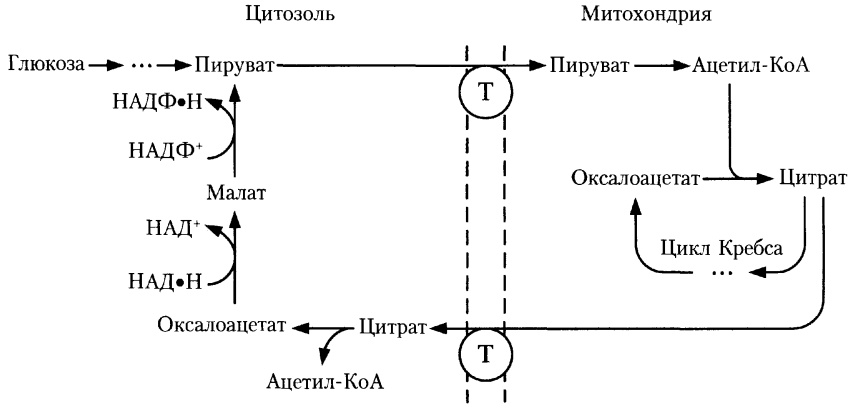


Рис. 10.5. Перенос ацетильного остатка из митохондрий в цитозоль (*Т* — транслокаазы)

Цикл переноса замыкается двумя реакциями, в результате которых оксалоацетат в цитозоле превращается в пируват. Первая из этих реакций катализируется цитозольной малатдегидрогеназой, аналогичной митохондриальной малатдегидрогеназе (но реакция в митохондриях — в цикле Кребса — идет в обратном направлении). Вторая реакция катализируется НАДФ-зависимой малатдегидрогеназой (малик-фермент, см. гл. 8).

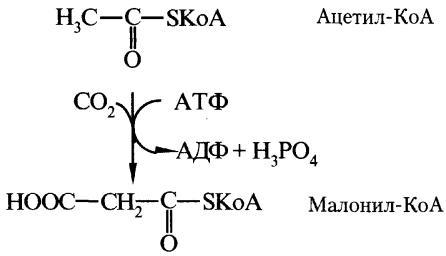


Рис. 10.6. Синтез малонил-КоА

Образование малонил-КоА. Преобладающая часть ацетил-КоА, используемого для синтеза жирных кислот, вначале превращается в малонил-КоА при действии ацетил-КоА-карбоксилазы (рис. 10.6). Фермент, как и другие карбоксилазы, содержит биотин, который непосредственно участвует в переносе CO_2 на субстрат.

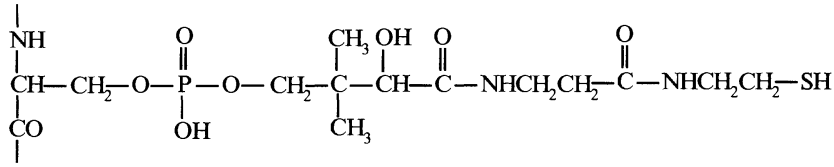
Пальмитилсинтаза. Центральную роль в синтезе жирных кислот играет пальмитилсинтаза (синтаза жирных кислот). Пальмитилсинтаза — многофункциональный белок; она катализирует серию реакций, суммарный результат которых следующий:

$$\text{Ацетил-КоА} + 7\text{Малонил-КоА} + 14(\text{НАДФН} + \text{H}^+) + \text{E} \rightarrow \text{Пальмитил-E} + 7\text{CO}_2 + 8\text{HSKoA} + \\ + 14\text{НАДФ}^+ + 7\text{H}_2\text{O}$$

(здесь E — пальмитилсинтаза).

В этом процессе 7 молекул CO_2 образуются за счет свободных карбоксильных групп 7 молекул малонил-КоА. Из 16 углеродных атомов пальмитиновой кислоты 2 атома образуются за счет ацетил-КоА (углеродные атомы метильного конца пальмитата CH_3–CH_2–), а остальные 14 — за счет малонил-КоА. В ходе синтеза семь карбонильных групп –CO– восстанавливаются до семи групп –CH_2– (одна карбонильная группа сохраняется в пальмитильном остатке). На это расходуется 14(НАДФН + H^+): за счет семи из них образуются водородные атомы групп –CH_2–, а за счет остальных семи кислород карбонильных групп превращается в воду.

Молекула пальмитилсинтазы построена из двух идентичных субъединиц. Каждая из них содержит фосфорилированную пантотеновую кислоту (4′-фосфопантетеин). Фосфопантетеин связан с остатком серина пептидной цепи фермента через фосфорную кислоту:



Синтез пальмитиновой кислоты. Пальмитилсинтаза обладает каталитической активностью, в результате которой ацетильный и малонильный остатки переносятся на SH-группу пантотеновой кислоты (ацилтрансферазная активность) (рис. 10.7, реакции *1* и *2*). Далее в реакции *3* ацетильный остаток переносится на место карбоксильной группы малонильного остатка; карбоксильная группа при этом отщепляется в виде CO_2 (реакция конденсации двух ацетильных остатков). Затем последовательно происходят восстановление β-карбонильной группы (реакция *4*), отщепление воды с образованием двойной связи между α- и β-углеродными атомами (реакция *5*), восстановление (гидрирование) двойной связи (реакция *6*). В результате получается остаток четырехуглеродной жирной кислоты, соединенный с ферментом (бутирил-E). Все эти реакции катализируются разными активными центрами одного белка: как мы уже отмечали, пальмитилсинтаза — многофункциональный фермент. Субъединица пальмитилсинтазы представляет собой доменный белок, каждый домен которого катализирует одну из шести указанных реакций. Промежуточные продукты остаются постоянно связанными с ферментом через пантотеновую кислоту, перемещаясь на этой «привязи» из одного активного центра в другой.

После образования масляной кислоты (точнее, бутирила-E) к свободной SH-группе фермента присоединяется новый малонильный остаток из малонил-КоА

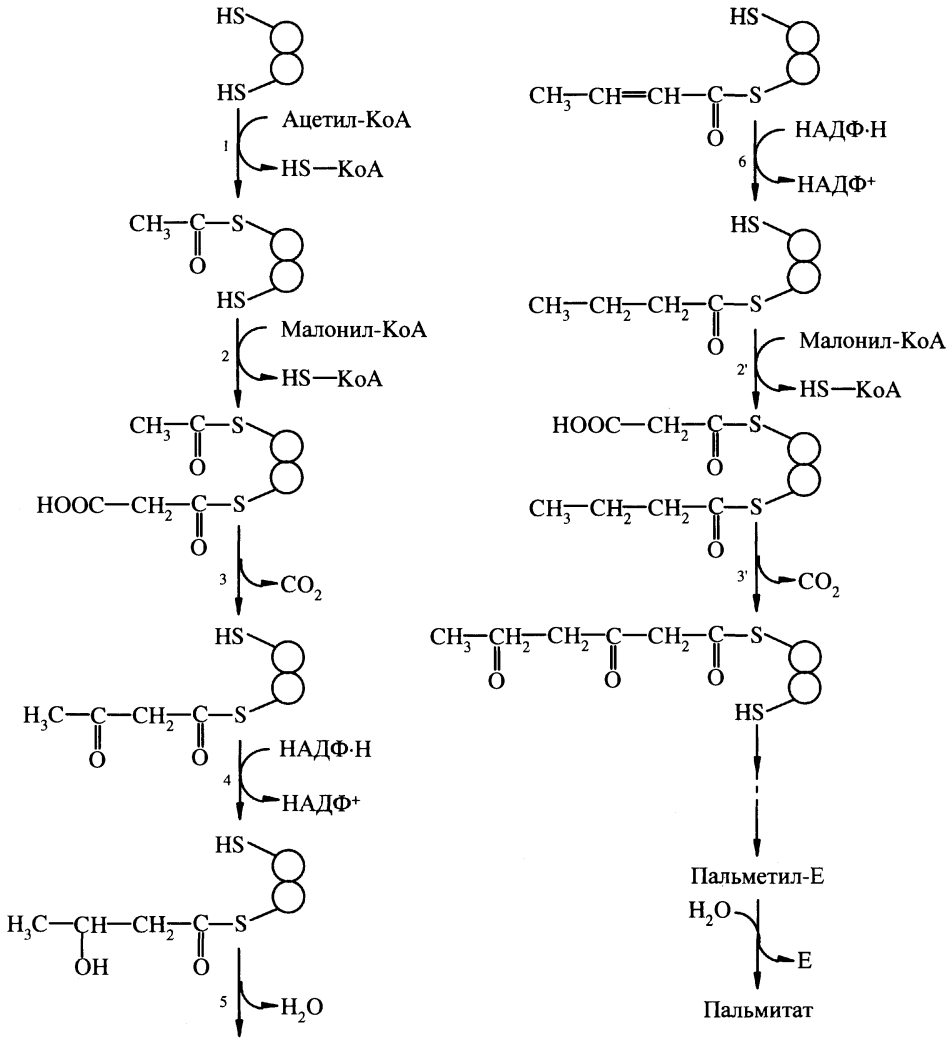


Рис. 10.7. Синтез пальмитиновой кислоты

(реакция 2′); его карбокисльная группа заменяется на бутирильный остаток (конденсация, реакция 3′). Далее происходят реакции 4′–6′, подобные реакциям 4–6; в результате получается остаток шестиуглеродной кислоты. Затем цикл повторяется снова; после семи оборотов цикла получается пальмитил-Е. При участии пальмитилдеацилазы пальмитил-Е гидролитически распадается на пальмитиновую кислоту и фермент (Е).

Пальмитат — это основной продукт действия пальмитилсинтазы, однако в небольших количествах образуются и другие жирные кислоты — с более короткой или более длинной углеродной цепью.

Удлинение углеродной цепи пальмитата. Пальмитиновая кислота служит предшественником других жирных кислот организма. Удлинение углеродной цепи

происходит за счет дополнительного присоединения ацетил-КоА или малонил-КоА при помощи ферментов, имеющихся как в цитозоле, так и в митохондриях. Присоединение к пальмитиновой кислоте ацетил-КоА и последующее восстановление β-карбонильной группы приводит к образованию стеариновой кислоты (18:0). При этом происходят реакции, сходные с теми, которые катализирует пальмитилсинтаза. Таким путем образуются жирные кислоты и с более длинной цепью — до 24 углеродных атомов (рис. 10.8). Ненасыщенные жирные кислоты образуются из насыщенных при участии ферментов десатураз; в этих реакциях используется кислород и восстановленный НАД.

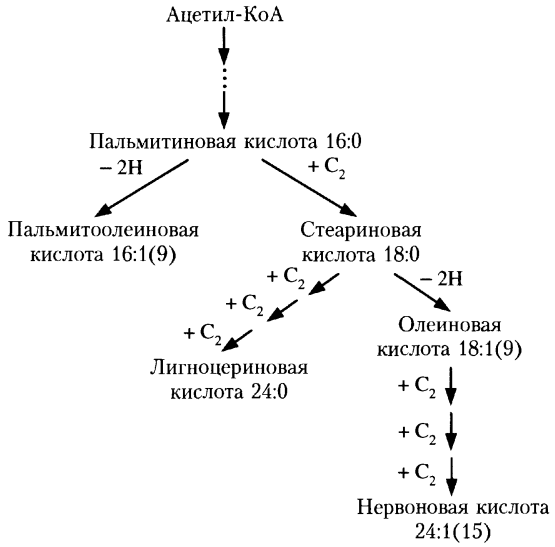


Рис. 10.8. Пути синтеза некоторых жирных кислот

Незаменимые жирные кислоты. Большинство жирных кислот, необходимых человеку, может синтезироваться в организме из углеводов. К числу незаменимых пищевых факторов относится линолевая кислота (рис. 10.9). Эта непредельная жирная кислота в организме человека служит предшественником арахидоновой кислоты, которая, в свою очередь, необходима для синтеза эйкозаноидов — группы гормонов местного действия (см. гл. 17). Основными пищевыми источниками полиненасыщенных жирных кислот, в том числе линолевой, являются растительные масла.

Наиболее интенсивно синтез жирных кислот происходит в печени, жировой ткани, молочных железах.

Источники НАДФН для синтеза жирных кислот. Примерно половину количества НАДФН поставляет пентозофосфатный путь окисления глюкозы. Другая половина образуется за счет действия НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы (см. рис. 10.5); таким образом цикл переноса ацетильных остатков выполняет двойную функцию в синтезе жирных кислот.

Регуляция синтеза и распада жирных кислот. В печени возможен как синтез, так и распад жирных кислот, и здесь мы вновь встречаемся с проблемой

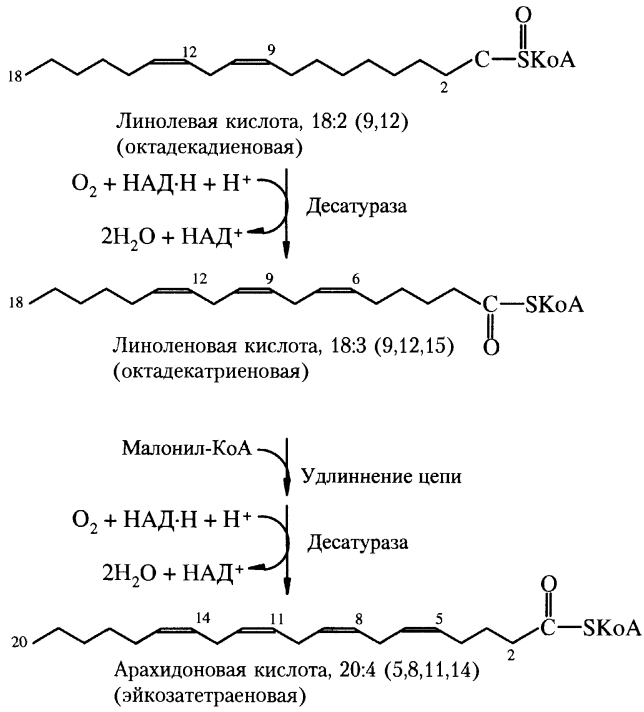


Рис. 10.9. Синтез арахидоновой кислоты

переключения с одного процесса на противоположный. Важнейшее звено регуляции — ацетил-КоА-карбоксилаза. Этот фермент может фосфорилироваться аденилатциклазной системой, включаемой глюкагоном и адреналином (рис. 10.10). Фосфорилированная форма неактивна. Дефосфорилирование происходит по сигналу инсулина через его рецептор: ацетил КоА-карбоксилаза активируется. Таким образом в абсорбтивном периоде активируется синтез жирных кислот из глюкозы в печени и жировых клетках. В постабсорбтивном перйоде (низкий инсулин-глюкагоновый индекс) синтез жирных кислот прекращается.

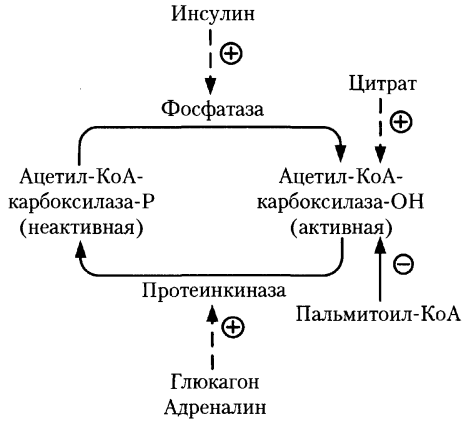


Рис. 10.10. Регуляция ацетил-КоА-карбоксилазы

Кроме того, при пищеварении в клетках печени повышаются концентрации оксалоацетата и цитрата и, следовательно, активируется перенос ацетильных остатков из митохондрий в цитозоль (см. рис. 10.4). Цитрат к тому же является аллостерическим активатором ацетил-КоА-карбоксилазы. А конечный продукт действия пальмитоилсинтетазы — пальмитоил-КоА — наоборот, ингибирует ацетил-КоА-синтетазу (рис. 10.10).

Малонил-КоА, концентрация которого повышается при синтезе жирных кислот, ингибирует карнитин-ацилтрансферазу (см. рис. 10.3); в результате поступление жирных кислот в митохондрии прекращается, а следовательно, прекращается их окисление. Наоборот, в постабсорбтивном перйоде уменьшение концентрации малонил-КоА открывает путь для жирных кислот в митохондрии, где начинается их окисление.

Таким образом, механизм включения синтеза жирных кислот одновременно является механизмом выключения их распада.

ОБМЕН ЖИРОВ

Природные жиры представляют собой смесь триацилглицеринов, различающихся по жирно-кислотному составу. Обычно в жирах обнаруживают смешанные триацилглицерины, т. е. содержащие в одной молекуле остатки разных жирных кислот, содержащие в одной молекуле остатки разных жирных кислот, например 1-олеил-2-пальмитил-3-стеарилглицерин, 1,3-диолеил-2-пальмитилглицерин и т. п. В триацилглицеринах человека содержится много ненасыщенных жирных кислот (см. табл. 10.3), поэтому жир человека имеет низкую температуру плавления — 10–15 °С; таким образом, в клетках он находится в жидком состоянии.

Жиры нерастворимы в воде, и с этим связан ряд особенностей их обмена, в частности необходимость специальных механизмов транспорта с кровью и лимфой, а также возможность депонирования в клетках, подобно гликогену. Биологическая функция жиров тоже подобна функции гликогена: оба эти вещества служат формами запасания энергетического материала.

Переваривание жиров

Жиры, наряду с белками и углеводами, относятся к основным пищевым веществам человека. Суточная потребность в них составляет 50–100 г. Жиры обеспечивают до 50 % потребности организма в энергии.

Переваривание жиров происходит в тонком кишечнике. В двенадцатиперстную кишку поступает желчь и сок поджелудочной железы, необходимые для переваривания жиров. В соке поджелудочной железы содержится липаза, гидролизующая сложноэфирную связь в триацилглицеринах. Под действием липазы жирные кислоты отщепляются от триацилглицерина одна за другой, сначала от α-углеродных атомов, потом от β-углеродного атома (рис. 10.11).

Поскольку жиры нерастворимы в водных средах, а липаза нерастворима в жирах, то гидролиз происходит лишь на поверхности раздела этих фаз и, следовательно, скорость переваривания зависит от площади этой поверхности.

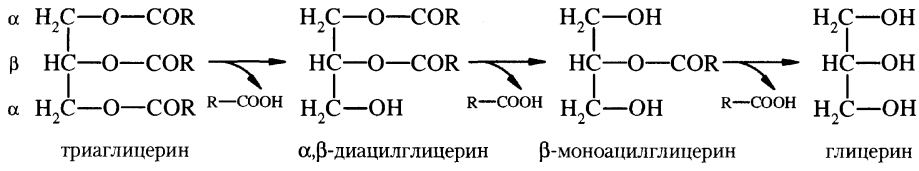


Рис. 10.11. Гидролиз жиров липазой

В составе желчи содержатся конъюгированные желчные кислоты, в том числе гликохолевая и таурохолевая (рис. 10.12). В желчи есть и другие желчные кислоты (их строение, а также синтез желчных кислот рассматриваются в разделе, посвященном обмену холестерина). Кроме того, в желчи содержатся фосфолипиды и холестерин.

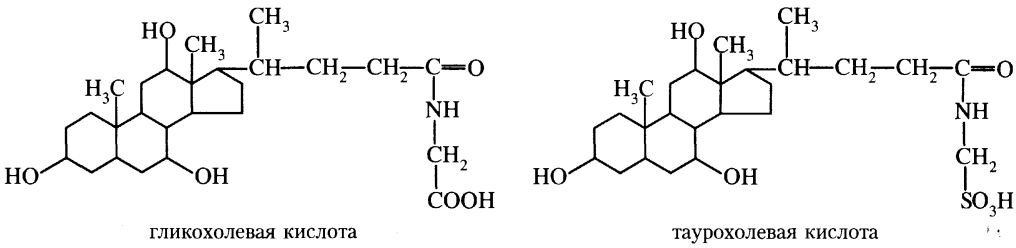


Рис. 10.12. Строение гликохолевой и таурохолевой кислот

Желчные кислоты и фосфолипиды обладают амфифильными свойствами. На поверхности раздела жир/вода они ориентируются таким образом, что гидрофобная часть контактирует с жиром, а гидрофильная — с водной фазой, в результате чего образуются стабильные мицеллы. Глицериновая часть молекул жира находится на поверхности таких мицелл. Липаза адсорбируется на поверхности мицелл, где и происходит гидролиз жира (рис. 10.13). Белок колипаза, секретирующийся вместе с липазой, способствует соединению липазы с мицеллами, активирует и стабилизирует липазу. Оптимум pH липазы в присутствии желчи смещается с 8 до 6, т. е. до значения pH, которое бывает в верхнем отделе кишечника после приема жирной пищи.

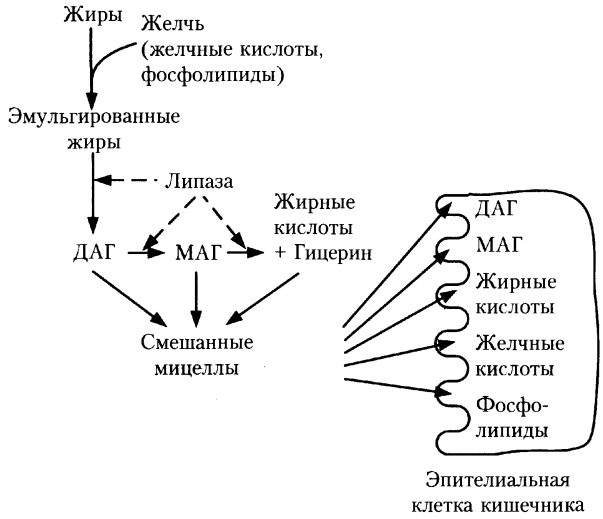


Рис 10.13. Переваривание жиров и всасывание продуктов переваривания

Всасывание продуктов переваривания

Всасываться в клетки могут все продукты переваривания, а в очень небольшой мере — и нерасщепленные жиры. Однако большая часть триацилглицеринов распадается до β-моноацилглицеринов, на долю которых приходится примерно $^3/_4$ всех всасывающихся продуктов. Продукты переваривания жиров вместе с желчными кислотами и фосфолипидами желчи образуют смешанные мицеллы, и затем все компоненты мицелл проникают в клетки слизистой кишечника.

Желчные кислоты затем поступают в кровь, а с ней — в печень и повторно участвуют в образовании желчи. Часть желчных кислот не всасывается и выводится с калом (0,2–0,5 г в сутки). Глицерин как водорастворимое вещество всасывается без участия желчи.

При нарушении желчеобразования или выделения желчи (например, вследствие закупорки желчного протока желчным камнем, опухолью) условия переваривания жиров и всасывания продуктов гидролиза ухудшаются, и значительная их часть выводится с калом (стеаторея). Жирорастворимые витамины при этом также не всасываются, что приводит к развитию гиповитаминоза.

Ресинтез жиров в клетках кишечника

В клетках кишечника большая часть продуктов переваривания вновь превращается в триацилглицерины. Жирные кислоты образуют ацил-КоА, а затем ацильные остатки переносятся на моноацилглицерин при участии трансацилаз (рис. 10.14).

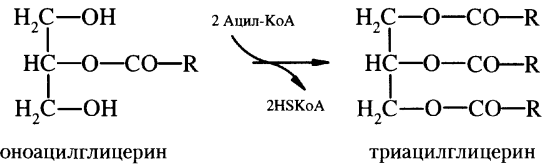


Рис. 10.14. Ресинтез жиров в клетках кишечника

Образование жиров из углеводов

Часть углеводов, поступающих с пищей, превращается в организме в жиры, особенно если количество углеводов превышает необходимое для возобновления запасов гликогена в печени и мышцах. Схема этого превращения представлена на рис. 10.15. Глюкоза служит источником ацетил-КоА, из которого синтезируются жирные кислоты. Необходимый для восстановительных реакций НАДФН поставляется за счет окисления глюкозы в пентозофосфатном пути, а также за счет дегидрирования яблочной кислоты НАДФ-зависимой малатдегидрогеназой. Глицерол-3-фосфат получается путем восстановления диоксиацетонфосфата — промежуточного продукта гликолиза (рис. 10.16).

Таким образом, из глюкозы образуется все, что необходимо для синтеза жиров.

Синтез триацилглицеринов из глицерол-3-фосфата и ацил-КоА представлен на рис. 10.17. Синтез жиров из углеводов наиболее активно происходит в печени, жировой ткани и лактирующих молочных железах.

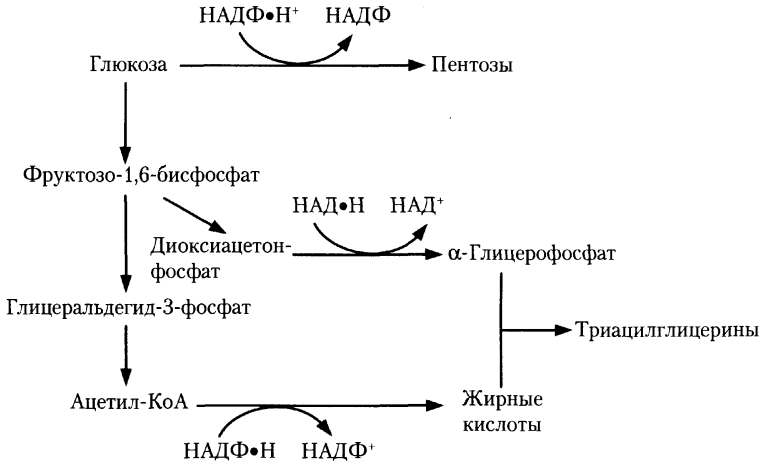


Рис. 10.15. Образование жиров из глюкозы

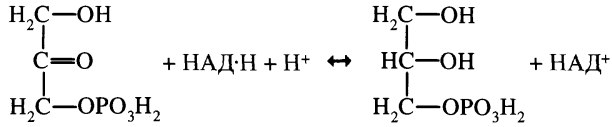


Рис. 10.16. Образование глицерол-3-фосфата из диоксиацетонфосфата

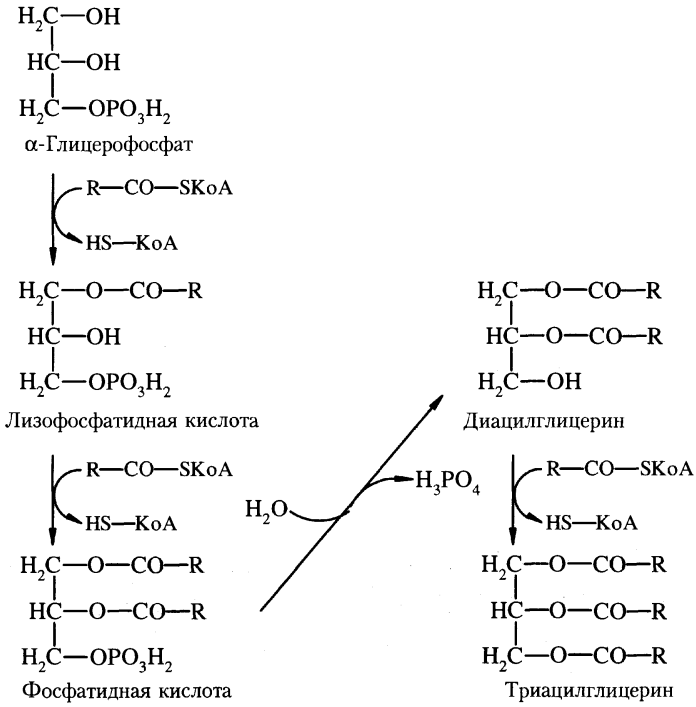


Рис. 10.17. Образование триацилглицеринов из глицерол-3-фосфата и жирных кислот

Транспортные липопротеины

Поскольку жиры и другие липиды нерастворимы или очень малорастворимы в воде и в жидкостях организма, необходимы специальные механизмы для транспорта этих веществ кровью. Транспорт осуществляется в составе особых частиц — липопротеинов. Липопротеины — многомолекулярные структуры. Они представляют собой сферические частицы, поверхностная часть которых образована монослоем ориентированных фосфолипидов и белками (аполипопротеинами). Фосфолипиды гидрофильными концами образуют наружную поверхность, а гидрофобные концы «растворены» в липидной фазе внутри частиц (рис. 10.18). Эта внутренняя липидная фаза содержит в основном триацилглицерины и эфиры холестерина.

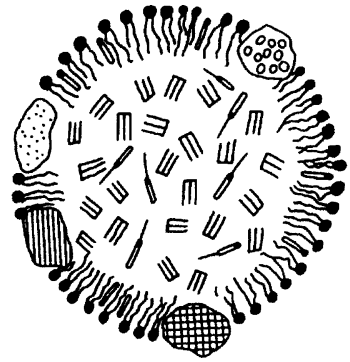


Рис. 10.18. Строение липопротеинов

В крови содержится несколько форм липопротеинов; основные из них — хиломикроны, липопротеины очень низкой плотности (ЛОНП), липопротеины низкой плотности (ЛНП) и липопротеины высокой плотности (ЛВП). Липопротеины различаются по составу и содержанию липидов и белков (табл. 10.3). Приведенные в таблице величины имеют лишь ориентировочный характер, поскольку в процессе функционирования липопротеинов их состав непрерывно изменяется.

Таблица 10.3. Состав липопротеинов крови человека (%)

Липопротеины	Белки	Триацилглицерины	Эфиры холестерина	Холестерин	Фосфолипиды
Хиломикроны	2	85	2	1	8
ЛОНП	10	55	10	7	20
ЛНП	20	10	35	10	20
ЛВП	45	8	15	5	25

Плотность липопротеинов прямо пропорциональна содержанию белков и обратно пропорциональна содержанию триацилглицеринов (табл. 10.4). Это позволяет разделять липопротеины методом центрифугирования. Липопротеины различаются также по электрофоретической подвижности: при pH 8,6 хиломикроны остаются на месте нанесения, ЛОНП мигрируют впереди фракции β-глобулинов сыворотки крови, ЛНП — вместе с β-глобулинами, ЛВП — с α-глобулинами.

Таблица 10.4. Плотность и размеры липопротеинов

Липопротеины	Плотность, г/мл	Диаметр, нм
Хиломикроны	0,93	30–500
ЛОНП	0,95–1,00	30–80
ЛНП	1,00–1,06	20–25
ЛВП	1,06–1,21	5–12

В составе липопротеинов обнаружено несколько разных белков — аполипопротеинов (табл. 10.5) Для аполипопротеинов характерно наличие гидрофильной и гидрофобной частей; гидрофильная часть контактирует с плазмой крови, а также с поверхностью липопротеиновой частицы, гидрофобная — с липидами внутри липопротеина.

Таблица 10.5. Функции некоторых аполипопротеинов

Апо-ЛП	Функция	ЛП, в которых данный белок является главным
A-I	Активатор ЛХАТ	ЛВП
B-100	Лиганд рецепторов B/E	ЛОНП, ЛНП
B-48	То же	ХМ
C-I	Активатор ЛХАТ*	ХМ, ЛОНП
C-II	Активатор ЛПЛ	ХМ, ЛОНП, ЛВП
D	Белок, переносящий эфиры холестерина	ЛВП
E	Лиганд рецепторов B/E и рецепторов, узнающих только апо-E	ХМ, ЛВП

* Примерно в 10 раз менее активный, чем A-I; ХМ — хиломикроны.

Время полураспада липопротеинов невелико (табл. 10.6).

Таблица 10.6. Концентрация в крови и время полураспада липопротеинов

Липопротеины	Концентрация в крови утром, до завтрака, мг/дл	Время полураспада
Хиломикроны	Отсутствуют*	Около 15 минут
ЛОНП	50–200	2–4 ч
ЛНП	200–300	2–3 сут
ЛВП	Мужчины 170–350	3–5 сут
	Женщины 220–470	3–5 сут

* Хиломикроны появляются в крови после приема пищи, содержащей жиры: через 4–5 ч после еды их концентрация может достигать 500 мг/дл, затем быстро снижается.

Липопротеины образуются в клетках слизистой оболочки кишечника (хиломикроны и ЛОНП), в гепатоцитах (ЛОНП и ЛВП), в плазме крови (ЛНП и ЛВП).

Хиломикроны и ЛОНП служат в основном для транспорта жиров по кровеносному руслу, а ЛНП и ЛВП — для транспорта холестерина.

Транспорт жиров

Образование хиломикронов

Жиры, синтезирующиеся в клетках кишечника из продуктов переваривания пищевых жиров, в этих же клетках включаются в липопротеины, главным образом в хиломикроны (образуется и немного ЛОНП). Ресинтез жиров, а также синтез основного белка хиломикронов — аполипопротеина B-48 — происходят в эндоплазматическом ретикулуме, а формирование хиломикронов — в пластинчатом комплексе.

Затем путем экзоцитоза хиломикроны попадают в лимфатические капилляры кишечника, далее через лимфатические сосуды брыжейки — в грудной проток и оттуда через яремную вену — в общий кровоток.

Внутриклеточно образуются предшественники липопротеинов, которые в крови быстро превращаются в зрелые липопротеины. Важным моментом дозревания является обмен поверхностными компонентами между разными липопротеинами. В частности, хиломикроны получают от ЛВП аполипопротеины Е и С-II (рис. 10.19).

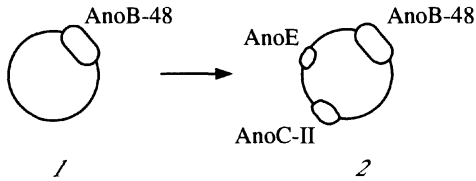


Рис. 10.19. Созревание хиломикронов в кровотоке:

1 — хиломикроны, секретируемые клетками кишечника; *2* — хиломикроны, циркулирующие в крови

Жиры, образующиеся в печени, упаковываются в липопротеины очень низкой плотности (ЛОНП), которые поступают в кровь.

После приема пищи начинается активный синтез хиломикронов и ЛОНП, концентрация их в крови повышается, причем иногда настолько, что плазма крови становится белесоватой. Максимум концентрации достигается через 4–5 ч после еды, а затем начинает снижаться.

Липопротеинлипаза

В эндотелии капилляров мышц (скелетных и сердечной) и жировой ткани имеется фермент липопротеинлипаза, гидролизующий жиры липопротеинов. Липопротеинлипаза синтезируется в адипоцитах, клетках сердечной и скелетных мышц и некоторых других органах, секретируется и прикрепляется к наружной поверхности эндотелиальных клеток капилляров, непосредственно контактирует с кровью.

Липопротеинлипаза имеет центр связывания липопротеинов и каталитический центр для гидролиза жиров. Гидролиз активируется аполипопротеином С-II, который содержится в хиломикронах и ЛОНП. Таким образом, гидролиз жиров происходит в комплексе, включающем липопротеин, липопротеинлипазу и внутреннюю поверхность капилляра. Жирные кислоты, образующиеся в результате гидролиза жиров, с помощью этого комплекса поступают в клетки, питаемые данным капилляром (в адипоциты — в жировой ткани, в миоциты — в мышечной ткани и т. д.).

Хиломикроны, циркулирующие в крови, постепенно освобождаются от триацилглицеринов (в результате контактов с липопротеинлипазой) и превращаются в остаточные хиломикроны, которые содержат очень мало триацилглицеринов и много холестерина. Остаточные хиломикроны (а частично и цельные) поглощаются клетками печени.

Такой же путь превращений проходит примерно половина ЛОНП. Другая половина ЛОНП в крови превращается в ЛНП, которые поглощаются как гепатоцитами, так и многими другими клетками.

Хиломикроны и ЛОНП распределяют по органам и тканям 70–150 г жиров за сутки, причем $^2/_3$ этого количества приходится на долю хиломикронов, распределяющих экзогенные жиры (поступающие с пищей), и $^1/_3$ — на долю ЛОНП, распределяющих эндогенные жиры (синтезируемые в печени).

Гиперхиломикронемия

При этом заболевании имеется врожденный дефект липопротеинлипазы — ее активность в несколько раз ниже, чем у здоровых людей. В результате резко повышается содержание хиломикронов в крови, а следовательно, и жиров: концентрация жиров в крови в 10–40 раз больше, чем в норме (примерно такая, как в молоке). В то же время содержание холестерина лишь немного превышает норму. Кровь таких больных иногда имеет цвет борща со сметаной; при центрифугировании крови на поверхности образуется слой «сметаны» — хиломикронов. Частым осложнением гиперхиломикронемии является панкреатит, который служит основной причиной смертности при этой болезни. Если резко ограничить потребление жиров с пищей (менее 25 г в сутки), гиперхиломикронемия и другие симптомы исчезают или становятся менее выраженными. Гиперхиломикронемия встречается сравнительно редко.

Депонирование жиров в жировой ткани

Жиры депонируются в специализированных клетках жировой ткани — адипоцитах. Жиры липопротеинов расщепляются липопротеинлипазой в капиллярах жировой ткани (рис. 10.20). Жирные кислоты проникают в жировые клетки, где вновь включаются в состав триацилглицеринов. Кроме того, жирные кислоты

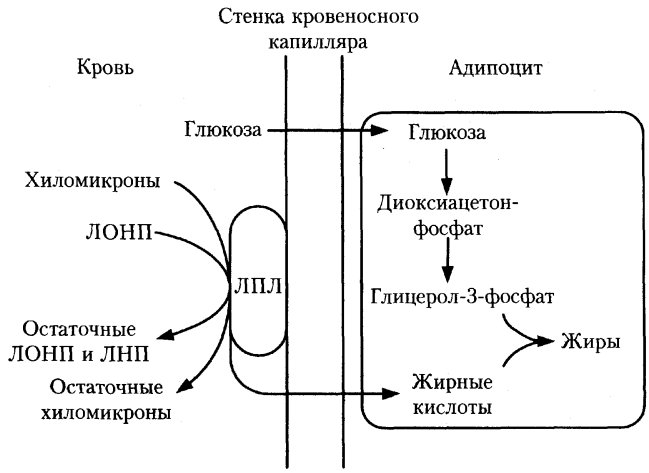


Рис. 10.20. Депонирование жиров в адипоцитах: ЛПЛ — липопротеинлипаза

могут синтезироваться и в самих адипоцитах из глюкозы (как и в печени). Необходимый для синтеза жиров глицерол-3-фосфат также образуется из глюкозы (непосредственно — из диоксиацетонфосфата в самих жировых клетках) — см. рис. 10.16.

На рис. 10.21 представлена обобщенная схема транспорта и превращений жиров.

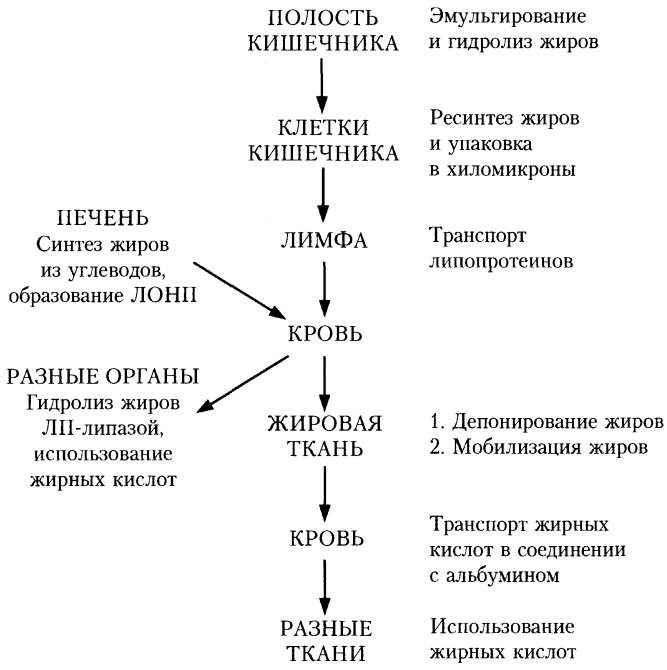


Рис. 10.21. Основные превращения и маршруты транспорта жиров

Регуляция обмена жиров

Концентрация жиров в крови. Жиры в крови находятся только в составе липопротеинов, главным образом в хиломикронах и ЛОНП. В норме концентрация жиров в крови колеблется в довольно широких пределах — 10–200 мг/дл, в среднем около 0,1 %. Отметим для сравнения, что концентрация жиров в молоке равна примерно 3 %.

После приема пищи концентрация хиломикронов в крови повышается, достигает максимума примерно через 5 ч, затем начинает снижаться. Сходным образом, но с меньшей амплитудой изменяется концентрация ЛОНП в крови. При этом надо отметить, что концентрация хиломикронов в большей мере зависит от содержания жиров в пище, а концентрация ЛОНП — от содержания углеводов. В крови, взятой для анализа утром до завтрака, т. е. после большого ночного перерыва в приеме пищи, хиломикроны не обнаруживаются, а концентрация ЛОНП минимальна. Пропорционально концентрации этих липопротеинов снижена и концентрация жиров в крови.

При обычном ритме питания и небольших физических нагрузках в крови в дневное время постоянно имеются хиломикроны и ЛОНП, поскольку время переваривания жиров мало отличается от времени между приемами пищи. Эти липопротеины обеспечивают ткани жирными кислотами, поэтому необходимости мобилизации жиров, депонированных в жировой ткани, не возникает, за исключением, может быть, короткого утреннего (до завтрака) промежутка времени. При значительной и продолжительной физической работе происходит мобилизация жиров жировой ткани и в дневное время.

Регуляция синтеза и распада жиров в печени. В клетках печени есть активные ферментные системы и синтеза, и распада жиров. Регуляция обмена жиров в значительной мере определяется регуляцией обмена жирных кислот, но не исчерпывается этими механизмами.

Синтез жирных кислот и жиров активируется при пищеварении, а их распад — в постабсорбтивном состоянии и при голодании. Кроме того, скорость использования жиров пропорциональна интенсивности мышечной работы. Регуляция обмена жиров тесно сопряжена с регуляцией обмена глюкозы. Как и в случае обмена глюкозы, в регуляции обмена жиров важную роль играют гормоны инсулин, глюкагон, адреналин и процессы переключения фосфорилирования-дефосфорилирования белков.

Напомним, что в печени после приема пищи ускоряется аэробный гликолиз и образование ацетил-КоА и оксалоацетата, а из них — цитрата (рис. 10.22; см. также рис. 10.5). Повышение концентрации цитрата активирует цикл переноса ацетильных остатков в цитозоль. В цитозоле в результате активации ацетил-КоА-карбоксилазы путем дефосфорилирования (см. рис. 10.10) ускоряется синтез жирных кислот. Одновременно стимулируется образование НАДФН в результате реакции малат → пируват, а также в результате активации пентозофосфатного пути (инсулин индуцирует синтез глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы). Жирные кислоты и глицерол-3-фосфат, образующийся тоже из глюкозы, превращаются в жиры, которые в печени упаковываются в ЛОНП и секретируются в кровь, а в жировой ткани пополняют запасы жира в адипоцитах. Таким образом в печени и в жировой ткани при пищеварении одновременно активируются гликолиз и синтез жиров из глюкозы. Перенос ацил-КоА в митохондрии не происходит вследствие высокой концентрации малонил-КоА, который ингибирует карнитин-ацилтрансферазу (см. рис. 10.22); следовательно, не происходит и β-окисление жирных кислот.

Регуляция депонирования и мобилизации жиров в жировой ткани. В абсорбтивном состоянии происходит накопление жиров в жировой ткани по следующим причинам:

1) инсулин стимулирует транслокацию ГЛЮТ-4 в мембрану адипоцитов: поглощение глюкозы клетками увеличивается;
2) активирован синтез жиров из глюкозы и заторможен гидролиз жиров вследствие высокого инсулин-глюкагонового индекса;
3) в крови высокая концентрация хиломикронов и ЛОНП, снабжающих клетки, в том числе адипоциты, жирными кислотами.

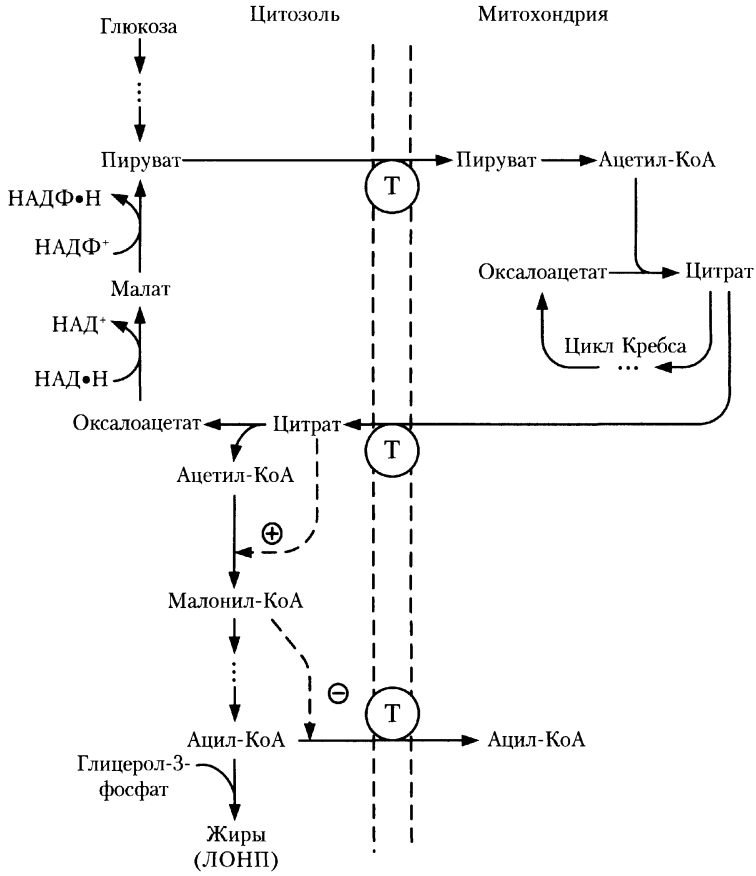


Рис. 10.22. Абсорбтивное состояние: синтез жиров из глюкозы в печени и жировой ткани

Мобилизация депонированных жиров

В адипоцитах содержится несколько липаз. В постабсорбтивном состоянии глюкагон активирует гормончувствительную липазу, и включается гидролиз жиров.

Гормоночувствительная липаза отщепляет один остаток жирной кислоты от триацилглицеринов, а затем другие липазы завершают гидролиз жиров (см. рис. 10.23).

Жирные кислоты поступают в кровь, где образуют нековалентные соединения с альбумином, и в такой форме транспортируются по кровеносному руслу.

Потребляются жирные кислоты большей частью мышцами, но также и другими органами. Концентрация жирных кислот в крови невелика — на их долю приходится только 1–3 % от всех липидов крови. Время полужизни жирных кислот в крови тоже очень мало — всего 2–4 мин. Последнее означает, что существует быстрый поток жирных кислот от жировой ткани к органам-потребителям. Высокая скорость этого потока даже при низкой концентрации переносимого вещества

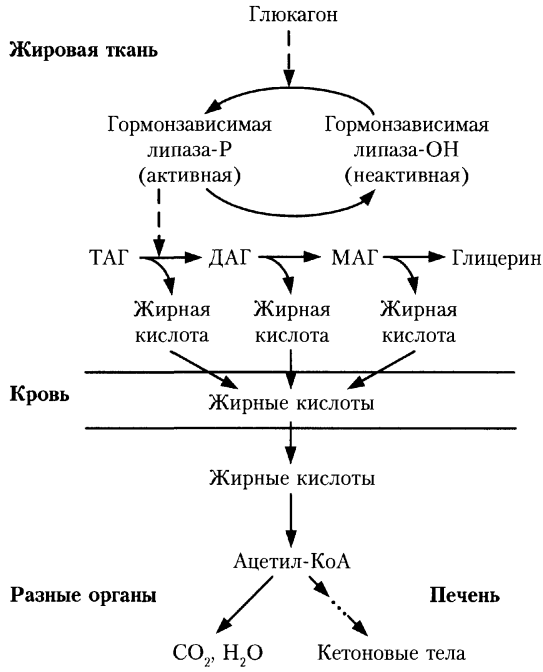


Рис. 10.23. Постабсорбтивное состояние: мобилизация депонированных жиров и использование жирных кислот в разных органах

обеспечивает перенос значительных количеств жирных кислот — до 150 г за сутки. Время полуобновления депонированных жиров в адипоцитах — несколько дней.

Глицерин транспортируется в растворенном состоянии и улавливается главным образом печенью; в печени глицерин превращается в глицерол-3-фосфат, который может поступать в реакции глюконеогенеза или окисляться в реакциях гликолиза и общего пути катаболизма.

Большую часть объема жировой клетки составляет капля жира, окруженная тонким слоем цитоплазмы, в которой находятся ядро, митохондрии и другие клеточные структуры; до 90 % массы жировой ткани приходится на жиры. В скелетных и сердечной мышцах жиры запасаются в составе внутриклеточных липидных капель для внутреннего использования.

Синтез и использование кетоновых тел

В печени часть жирных кислот превращается в так называемые кетоновые тела — ацетоуксусную и β-гидроксимасляную кислоты (рис. 10.24). Эти вещества затем поступают в кровь и используются как источники энергии в других органах и тканях.

В постабсортивном состоянии кетоновые тела в крови или отсутствуют, или их концентрация невелика — до 3 мг/дл. Содержание кетоновых тел в крови увеличивается в таких состояниях, когда основным источником энергии для организма

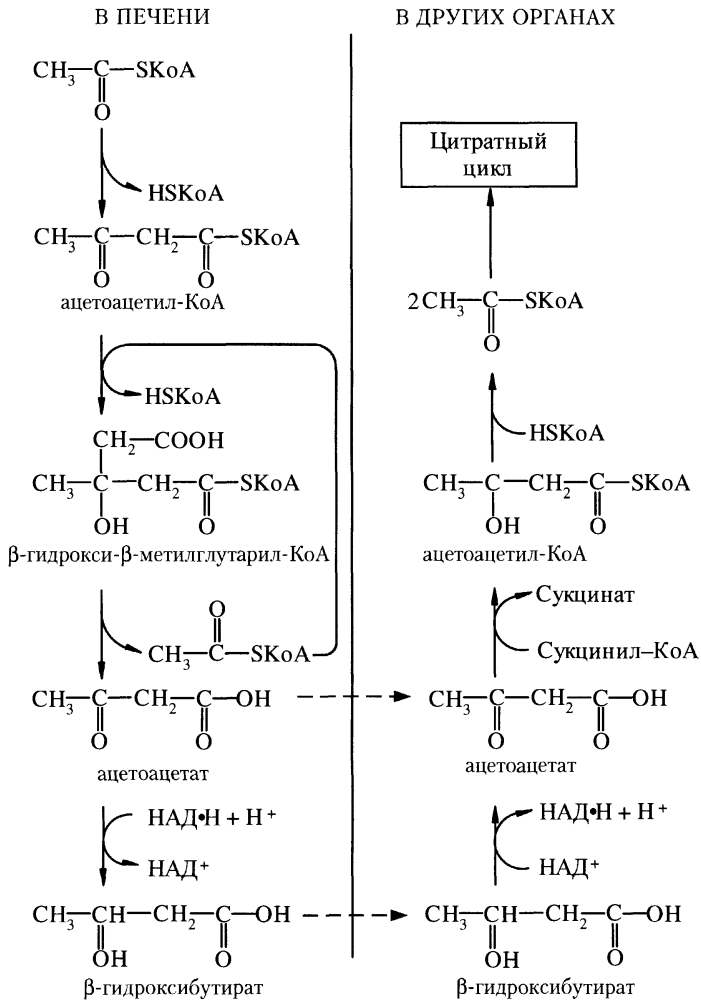


Рис. 10.24. Синтез и использование кетоновых тел

служат жирные кислоты — при длительной мышечной работе, при голодании, при некоторых болезнях. Через двое суток голодания концентрация кетоновых тел в крови достигает 5–6 мг/дл, через неделю — 40–50 мг/дл. При сахарном диабете концентрация кетоновых тел может повышаться до 300–400 мг/дл, что приводит к метаболическому ацидозу (см. гл. 14).

Адреналин активирует мобилизацию депонированных жиров, действуя по механизму, сходному с тем, как в случае мобилизации гликогена, т. е. через каскад реакций, включающий синтез цАМФ, активацию протеинкиназы А и фосфорилирование липазы. При феохромоцитомах (опухолях хромаффинной ткани надпочечников) концентрация адреналина (а также норадреналина) в крови резко повышена; вследствие этого концентрация жирных кислот в крови больных в десятки раз больше, чем у здоровых людей.

Сравнение жирных кислот и глюкозы (а также аминокислот) как энергоносителей

Жирные кислоты — основной энергоноситель в организме человека (табл. 10.7). В состоянии основного обмена за 12 ч используется около 60 г жирных кислот и около 70 г глюкозы. При выражении в калориях получается, что жирные кислоты поставляют почти вдвое больше энергии, чем глюкоза. Однако интенсивность метаболизма в разных органах неодинакова (табл. 10.8).

Таблица 10.7. Использование жирных кислот, глюкозы и аминокислот как источников энергии

Энергоноситель	Содержание в циркулирующей крови и межклеточной жидкости		Используется за 12 ч в состоянии основного обмена	
	г	ккал	г	ккал
Жирные кислоты	0,3	3	60	540
Глюкоза	20	80	70	280
Аминокислоты	0,3	1	20	80

Таблица 10.8. Интенсивность метаболизма углеводов и жиров в разных органах

Процесс	Печень	Мышцы	Жировая ткань	Кора почек	Мозг	Эритроциты
Цитратный цикл (ацетил-CoA → $CO_2 + H_2O$)	+++	+++	+++	+++	+++	–
β-окисление жирных кислот	+++	+++	–	+++	–	–
Синтез кетоновых тел	+++	–	–	+	–	–
Использование кетоновых тел	–	+++	+	++	–*	–
Синтез жирных кислот из глюкозы	+++	–	+	–	–	–
Глюконеогенез из лактата	+++	–	–	+	–	–
Обмен гликогена (синтез и использование)	+++	+++	+	+	(+)	–
Анаэробный гликолиз (глюкоза → лактат)	+	+++**	+	+	(+)	+++

* При нормальном режиме питания; при длительном голодании — три «плюса».

**При мышечной работе.

Сравнение гликогена и жиров как запасных энергоносителей

В самом общем смысле роль гликогена и жиров в организме одинакова — это форма запасания энергии. Однако между ними есть и значительные различия как в количественном, так и в функциональном отношении.

Две формы депонирования энергетического материала — гликоген и жиры — различаются по очередности мобилизации: при голодании или физической работе в первую очередь используются преимущественно запасы гликогена, а затем постепенно нарастает скорость мобилизации жиров. Кратковременные физические нагрузки практически полностью обеспечиваются энергией за счет гликогена, а при длительных нагрузках используются жиры. Об этом можно судить,

например, по изменению потребления кислорода для окисления гликогена мышц, окисления глюкозы, поступающей в мышцы из крови, и для окисления жирных кислот при продолжительной мышечной работе (рис. 10.25).

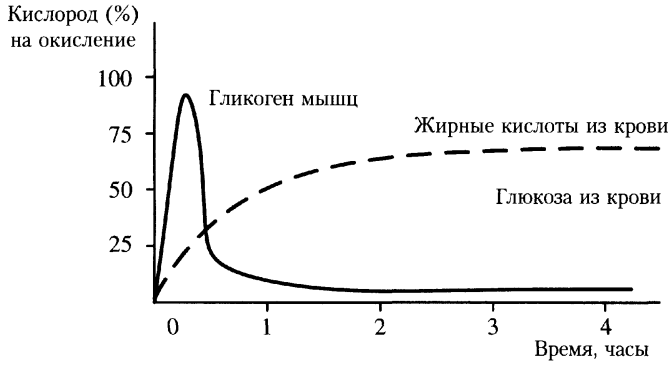


Рис. 10.25. Использование основных энергоносителей при продолжительной физической работе

Жиров в организме содержится в 30 раз больше, чем гликогена (табл. 10.9). Если учесть, что и по калорийности жиры превосходят углеводы (углеводы — 4 ккал/г, жиры — 9 ккал/г), то разница в запасе энергии в этих формах становится еще внушительнее. Гликогена хватает примерно на одни сутки голодания, в то время как жиров — на 5–7 недель.

Таблица 10.9. Гликоген и жиры в организме человека

Параметр	Гликоген	Жиры
Содержание в организме (а)	0,3 кг	10 кг
Суточное потребление (б)	0,4 кг*	0,1 кг
Отношение а/б	0,7	100

* Потребляются крахмал и другие углеводы, из которых образуется гликоген.

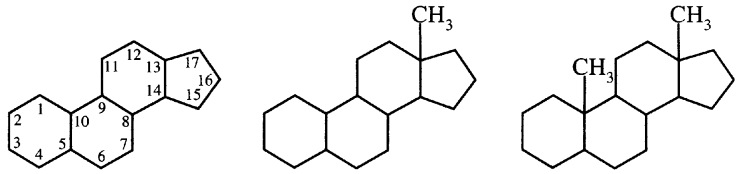
Суточное потребление углеводов превышает содержание гликогена в организме. Это значит, что полное обновление гликогена в организме может произойти меньше чем за двое суток (например, после суточного голодания и последующих приемов пищи в течение дня). А суточное обновление жиров составляет лишь около $^1/_{100}$ части всего запаса.

Запасы гликогена расходуются на всем протяжении суток, за исключением первых 2–3 ч после каждого приема пищи. Жиры, депонированные в жировой ткани, могут и не расходоваться, поскольку при обычном ритме питания в крови постоянно имеются липопротеины, снабжающие органы жирными кислотами. Таким образом, можно считать, что липопротеины выполняют не только транспортную функцию, но и функцию краткосрочного запасания жиров. По роли в энергетическом обмене жиры, запасенные в липопротеинах (хиломикронах и ЛОНП), в большей мере сходны с гликогеном, чем жиры, запасенные в адипоцитах.

Важной особенностью жиров является также то, что при их гидролизе образуется два функционально разных продукта — жирные кислоты и глицерин. Глицерин используется для глюконеогенеза (наряду с аминокислотами), тем самым участвуя в обеспечении глюкозой мозга и других глюкозозависимых органов при голодании. Таким образом, депонирование жиров можно рассматривать и как форму запасания глюкозы. Если принять, что на долю глицерина приходится $^1/_{10}$ часть массы жира, то количество глицерина, запасенного в жирах, составит примерно 1 кг, т. е. в 3 раза больше предельных запасов гликогена. Этот запас глюкозы представляется существенным, особенно если учесть, что при голодании обмен веществ снижен (через неделю голодания — примерно вдвое).

ОБМЕН И ФУНКЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА

Холестерин относится к группе веществ, называемых стероидами. Стероиды можно рассматривать как производные тетрациклического насыщенного углеводорода циклопентанпергидрофенантрена, метилированного в положении 13 (*эстран*) или в положениях 10 и 13 (*андростан*) (рис. 10.26).



циклопентанпергидрофенантрен (гонан) эстран андростан

Рис. 10.26. Строение стероидов

Многие стероиды содержат боковую цепь в положении 17. По строению этой боковой цепи, а также и по различиям функций стероиды тканей человека образуют четыре группы:

1) стерины, имеющие восьмиуглеродную боковую группу (основной представитель — холестерин);
2) желчные кислоты, у которых боковая группа содержит пять углеродных атомов;
3) кортикостероиды и прогестерон с двухуглеродной боковой группой;
4) женские и мужские половые гормоны (эстрогены и андрогены), у которых боковой группы в положении 17 нет совсем.

В этом разделе мы рассмотрим главным образом обмен и функции холестерина и желчных кислот.

Распространение и функции холестерина

На долю холестерина приходится основная масса всех стероидов организма. В тканях человека содержится около 140 г холестерина; содержание следующей по распространенности группы стероидов — желчных кислот — около 5 г. Часть

холестерина тканей этерифицирована высшими жирными кислотами, обычно олеиновой или линолевой кислотой. Эфиры холестерина — это, как правило, депонированная или транспортная форма холестерина. Например, 70 % холестерина липопротеинов крови этерифицировано. Столько же эфиров холестерина содержится в клетках надпочечников, где они депонируются в форме липидных капель в цитоплазме. В большинстве других органов эфиры составляют меньшую часть всего холестерина; например, в печени их 20–25 %.

Средняя концентрация холестерина в организме равна 0,2 г на 100 г ткани. Однако существуют различия между органами. В большинстве органов содержание холестерина лежит в пределах 0,1–0,3 г на 100 г; несколько больше — в жировой ткани и коже: 0,4–0,5 г на 100 г. Существенно отличаются от всех органов по содержанию холестерина лишь нервная система и надпочечники.

В нервной системе содержание холестерина равно 2 г на 100 г ткани, т. е. в 10 раз больше средней концентрации. Почти весь холестерин входит в состав плазматических мембран леммоцитов (в периферической нервной системе) или олигодендроглиальных (в центральной нервной системе) клеток, образующих многослойную оболочку вокруг нервных волокон (миелиновая оболочка). На долю нервной системы приходится около 2 % массы тела, однако вследствие высокого удельного содержания холестерина около 20 % его общего фонда содержится в нервной системе.

В клетках надпочечников содержание холестерина равно 10 г на 100 г ткани, т. е. в 50 раз больше средней концентрации. Основная часть холестерина в этих клетках находится в липидных каплях цитозоля, в форме эфиров. Холестерин в надпочечниках используется для синтеза стероидных гормонов. Поскольку масса надпочечников небольшая (12 г), то доля холестерина надпочечников в общем фонде невелика — примерно 1 %.

Концентрация холестерина в крови совпадает с его средней концентрацией в организме — 0,2 г/дл. Практически весь холестерин плазмы крови находится в составе липопротеинов, причем $^2/_3$ его этерифицированы. В эритроцитах содержится только свободный холестерин, и только в мембранах.

Холестерин выполняет в организме два рода функций: во-первых, он входит в качестве структурного компонента в состав клеточных мембран; во-вторых, служит предшественником при синтезе других стероидов — желчных кислот, стероидных гормонов, витамина D_3.

Фонд холестерина организма создается за счет холестерина пищи и его синтеза в самом организме. При питании растительной пищей, в которой холестерина мало, главное значение имеет синтез холестерина.

Синтез холестерина

Сложная молекула холестерина образуется целиком из ацетильных остатков ацетил-КоА (см. гл. 6). Одним из промежуточных продуктов является β-гидрокси-β-метилглутарил-КоА (ГМГ-КоА), который образуется и при синтезе кетоновых тел. Первая специфическая для биосинтеза холестерина реакция — восстановление ГМГ-КоА в мевалоновую кислоту при действии ГМГ-КоА-редуктазы (рис. 10.27).

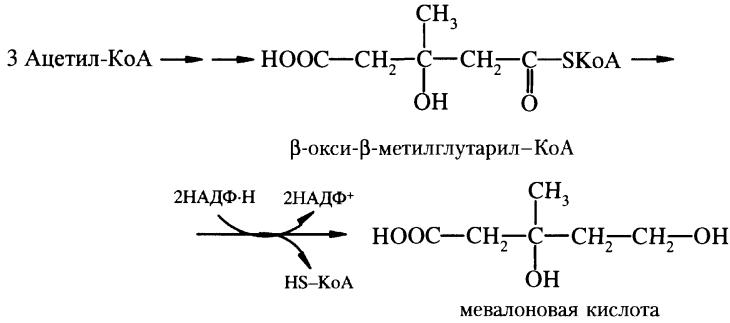


Рис. 10.27. Образование мевалоновой кислоты

Мевалоновая кислота далее подвергается ряду превращений, в ходе которых отщепляется карбоксильная группа, а пятиуглеродные части шести молекул мевалоновой кислоты конденсируются, образуя сквален. Сквален представляет собой линейную симметричную молекулу, построенную из шести изопреновых единиц (рис. 10.28). Предпочтительная пространственная структура изображена на рис. 10.29. Сквален затем превращается в ланостерин, который уже содержит тетрациклическую группу, характерную для холестерина. Из ланостерина в несколько стадий образуется холестерин (рис. 10.29).

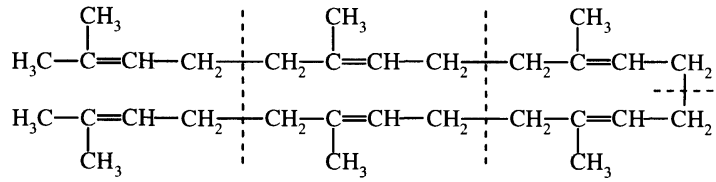


Рис. 10.28. Строение сквалена

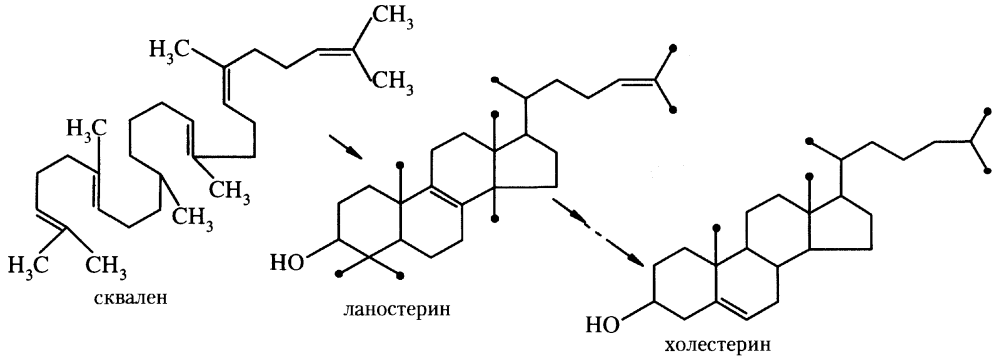


Рис. 10.29. Превращение сквалена в холестерин

Ферменты, необходимые для синтеза холестерина, есть во всех клетках, кроме зрелых эритроцитов. Однако подавляющая часть холестерина — около 80 % — синтезируется в печени; второе место занимают клетки тонкого кишечника, в

которых образуется около 10 % всего холестерина организма; еще примерно 5 % добавляют клетки кожи. Общее количество холестерина, синтезируемого в организме человека за сутки, составляет 1,3 г.

Регуляция синтеза холестерина

Скорость синтеза холестерина регулируется довольно сложным аппаратом. Основным пунктом регуляции является реакция образования мевалоновой кислоты — первая специфическая реакция в пути синтеза холестерина (рис. 10.30). Существует три механизма регуляции:

1. Аллостерическая регуляция по механизму отрицательной обратной связи: холестерин, а в печени — и желчные кислоты ингибируют ГМГ-КоА-редуктазу (см. рис. 10.30, *1*).

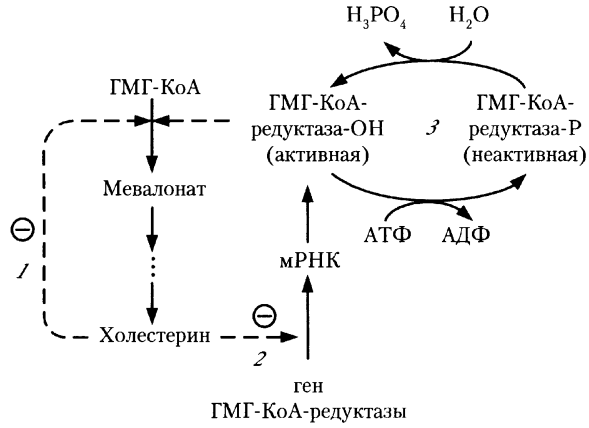


Рис. 10.30. Регуляция синтеза холестерина

2. Репрессия синтеза ГМГ-КоА-редуктазы холестерином — тоже механизм отрицательной обратной связи (см. рис. 10.30, *2*). При содержании 2–3 г холестерина в суточной пище человека синтез собственного холестерина почти полностью прекращается.
3. Регуляция путем фосфорилирования-дефосфорилирования ГМГ-КоА-редуктазы; активна нефосфорилированная форма (рис. 10.30, *3*). Фосфорилирование (инактивация) включается присоединением глюкагона к его рецептору на клеточной поверхности, а дефосфорилирование (активация) — сигналом инсулина и его рецептора. Этот механизм представляет собой сложный каскад реакций. Таким образом, скорость синтеза холестерина изменяется при смене абсорбтивного и постабсорбтивного состояний, поскольку в регуляции задействованы инсулин и глюкагон.

Обмен эфиров холестерина

Фонд холестерина содержит свободный холестерин и эфиры холестерина, которые имеются и в клетках, и в липопротеинах крови.

В клетках этерификация холестерина происходит при действии ацил-КоА-холестерин-ацилтрансферазы (АХАТ):

Ацил-КоА + Холестерин → HS-КоА + Ацилхолестерин

В клетках человека, в основном, образуется линолеилхолестерин. В отличие от свободного холестерина, его эфиры в клеточных мембранах содержатся в очень небольших количествах и находятся главным образом в цитозоле в составе липидных капель. Образование эфиров можно рассматривать, с одной стороны, как механизм удаления из мембран избыточного холестерина, а с другой стороны — как механизм запасания холестерина в клетке. Мобилизация запасов происходит при участии ферментов эстераз, гидролизующих эфиры холестерина:

Ацилхолестерин + H_2O → Жирная кислота + Холестерин

Синтез и гидролиз эфиров происходят во многих клетках, но особенно активно в клетках коры надпочечников: в этих клетках до 80 % всего холестерина представлено эфирами, в то время как в других клетках обычно меньше 20 %.

В липопротеинах крови образование эфиров происходит при участии лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ), катализирующей перенос ацильного остатка из β-положения лецитина на холестерин (рис. 10.31). ЛХАТ образуется в печени, секретируется в кровь и присоединяется к липопротеинам. Скорость этерификации для разных липопротеинов существенно различна и зависит от наличия аполипопротеинов, активирующих ЛХАТ (главным образом апо-А-I, а также С-I) или ингибирующих (С-II) этот фермент. Наиболее активна ЛХАТ в ЛВП, в которой на долю апо-А-I приходится более $^2/_3$ от всех белков. В наибольших количествах образуются эфиры олеиновой и линолевой кислот. В других липопротеинах образование эфиров происходит с меньшей скоростью, чем в ЛВП.

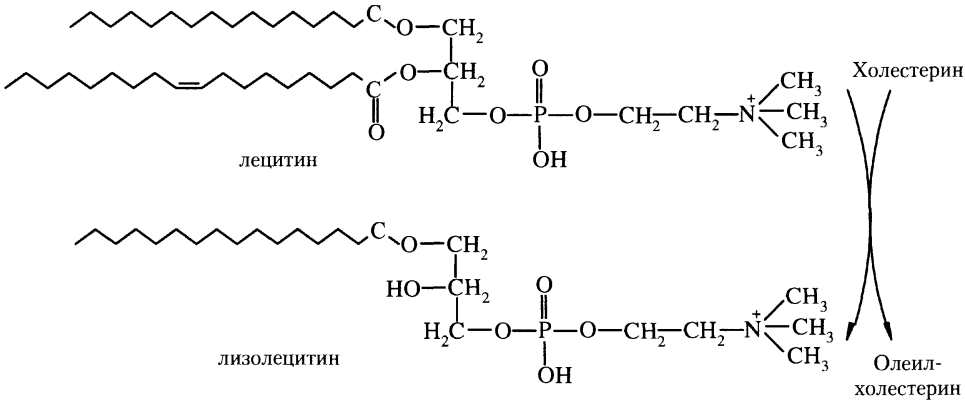


Рис. 10.31. Образование эфиров холестерина при действии ЛХАТ

ЛХАТ локализована в поверхностном слое ЛВП и использует в качестве субстрата холестерин, находящийся в фосфолипидном монослое. Образующиеся здесь эфиры холестерина в силу своей полной гидрофобности плохо удерживаются в

фосфолипидном монослое и погружаются в липидное ядро липопротеина. При этом в фосфолипидном монослое освобождается место для холестерина, которое может быть заполнено холестерином из клеточных мембран или из других липопротеинов. Таким образом, ЛВП в результате действия ЛХАТ оказываются ловушкой холестерина.

Синтез желчных кислот

В печени часть холестерина превращается в желчные кислоты. Желчные кислоты можно рассматривать как производные холановой кислоты (рис. 10.32).

Холановая кислота как таковая в организме не образуется. В гепатоцитах из холестерина получаются непосредственно хенодезоксихолевая и холевая кислоты — первичные желчные кислоты (рис. 10.33; см. также рис. 10.12).

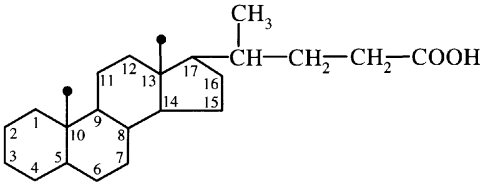


Рис. 10.32. Холановая кислота

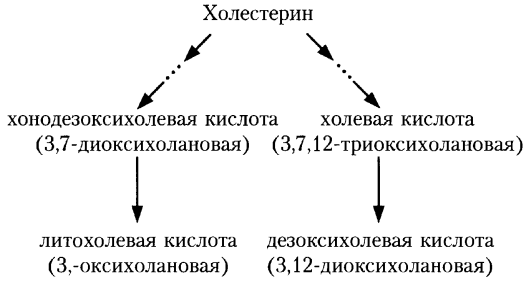


Рис. 10.33. Образование желчных кислот

Их образование включает реакции введения гидроксильных групп при участии гидроксилаз и реакции частичного окисления боковой цепи холестерина.

После выделения желчи в кишечник при действии ферментов кишечной флоры из первичных желчных кислот образуются литохолевая и дезоксихолевая кислоты — вторичные желчные кислоты. Они всасываются из кишечника, с кровью воротной вены попадают в печень, а затем в желчь. Следует отметить, что микроорганизмы кишечника образуют около 20 разных вторичных желчных кислот, но всасываются в заметных количествах только дезоксихолевая и, в меньшей мере, литохолевая кислоты; остальные выводятся с калом.

В желчи содержатся главным образом конъюгированные желчные кислоты, т. е. их соединения с глицином или таурином. Боковая цепь с остатком глицина или таурина гидрофильна, в то время как другой конец молекулы (циклическая группировка) гидрофобный. Амфифильная природа желчных кислот обусловливает их поверхностно-активные свойства, участие в образовании липидных мицелл и в переваривании жиров.

Концентрация желчных кислот в желчи равна примерно 1 %; в желчи содержатся также фосфолипиды (главным образом фосфатидилхолины, 0,5 %), холестерин (0,5 %), а также билирубин, белки, минеральные соли. Следует отметить, что концентрация желчи непостоянна: желчь может концентрироваться вследствие всасывания воды в желчном пузыре. Непостоянны также и относительные концентрации отдельных компонентов желчи.

Желчные кислоты, холестерин и фосфатидилхолины в пузырной желчи образуют смешанные мицеллы. Собственно эти мицеллы, т. е. все их компоненты, а не только желчные кислоты, участвуют в эмульгировании жиров в кишечнике и во всасывании продуктов переваривания жиров.

Энтерогепатическая циркуляция и экскреция желчных кислот и холестерина

Основная часть желчных кислот (90–95 %) из полости кишечника всасывается в клетки, с кровью воротной вены попадает в печень и повторно используется при образовании желчи. В результате этого вторичные желчные кислоты, возникшие при участии кишечных микроорганизмов, становятся равноправными функциональными компонентами желчи. Желчные кислоты проходят энтерогепатический круг 5–10 раз за сутки.

Небольшая часть желчных кислот — около 0,5 г за сутки — выводится с калом. Эта убыль компенсируется синтезом в печени новых желчных кислот в таком же количестве; фонд желчных кислот обновляется полностью примерно за 10 дней.

Холестерин также выводится в основном через кишечник. В кишечник холестерин поступает из двух источников — с пищей и из печени в составе желчи. В суточном рационе при обычном питании содержится 0,5–1 г холестерина; с желчью поступает около 2 г в сутки. В люмене кишечника холестерин пищи и холестерин желчи образуют смешанный фонд холестерина (холестерин суммарный, рис. 10.34), в котором уже неразличимо происхождение отдельных молекул. Часть холестерина этого фонда всасывается в кровь, а часть — экскретируется с калом. Холестерин, всосавшийся в кровь, содержит фракцию, происходящую из желчи, и фракцию, происходящую из пищи. Вторая из этих фракций обозначается как *экзогенный холестерин*, в отличие от *эндогенного холестерина*, синтезированного в печени из ацетил-КоА. Экскретируемый холестерин тоже включает фракции, происходящие из желчи и пищи.

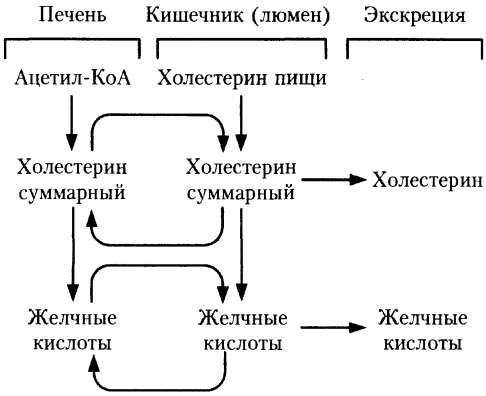


Рис. 10.34. Баланс холестерина в организме: изогнутые стрелки — энтерогепатическая циркуляция

Таким образом, пополнение фонда холестерина обеспечивается двумя путями: синтезом холестерина в тканях (около 1 г в сутки) и поступлением из кишечника (около 0,3 г в сутки). Удаление холестерина из тканей происходит тоже двумя путями: путем его окисления в желчные кислоты в печени с последующей экскрецией желчных кислот с калом (примерно 0,5 г в сутки) и путем экскреции неизмененного холестерина (тоже с калом).

В стационарном состоянии суммарное количество холестерина, поступающего в кишечник с пищей, и холестерина, синтезированного в тканях, равно

суммарному количеству экскретируемых холестерина и желчных кислот. Баланс можно представить как разность между прибылью и убылью холестерина в организме:

$$(\text{Холестерин}_{\text{энд}} + \text{Холестерин}_{\text{экз}}) - (\text{Холестерин}_{\text{экскр}} + \text{Желчные кислоты}_{\text{экскр}}) = 0$$

(энд — эндогенный, экз — экзогенный, экскр — экскретируемый).

Баланс может быть равным нулю, положительным или отрицательным. У здоровых людей при обычном питании баланс равен нулю. При этом ежесуточный расход холестерина (экскреция, использование для синтеза других стероидов) равен примерно 1,3 г. Этот расход восполняется путем синтеза холестерина (около 0,8 г) и экзогенного холестерина (около 0,5 г). При переходе на бесхолестериновую диету баланс в первые дни становится отрицательным. Затем, через несколько дней, устанавливается новое стационарное состояние в результате увеличения синтеза холестерина (максимальный суточный синтез — 1,5 г) и уменьшения его экскреции. При обратном переходе с бесхолестеринового питания на обычное в первые дни холестериновый баланс будет положительным, пока вновь не установится стационарное состояние, характерное для такого питания. Чем больше поступление холестерина с пищей, тем меньше синтезируется его в тканях (вследствие регуляции ГМГ-КоА-редуктазы). Что касается желчных кислот, то их синтез и экскреция мало зависят от поступления холестерина с пищей.

Выведение холестерина и желчных кислот — главный путь, которым организм может избавляться от избытка холестерина. Эти механизмы обеспечивают поддержание концентрации холестерина в организме на постоянном уровне. Если нарушен баланс между поступлением холестерина с пищей и его синтезом в организме, с одной стороны, и выведением желчных кислот и холестерина — с другой, то концентрация холестерина в тканях и в крови изменяется. Наиболее серьезные последствия связаны с повышением концентрации холестерина в крови (гиперхолестеринемия): при этом увеличивается вероятность заболевания атеросклерозом и желчнокаменной болезнью.

Желчнокаменная болезнь

При желчнокаменной болезни в желчном пузыре или протоках образуются камни в результате осаждения и кристаллизации компонентов желчи. Обычно в желчных камнях основная масса приходится на холестерин или билирубин – продукт распада гема. Различают два типа желчных камней: преимущественно холестериновые, которые содержат больше 70 % холестерина, и преимущественно билирубиновые. Чаще встречаются холестериновые камни, примерно в $^2/_3$ всех случаев болезни. В этом разделе мы рассмотрим образование холестериновых камней.

Холестерин в желчи может существовать в трех фазах. Одна фаза — это смешанные мицеллы, содержащие холестерин, желчные кислоты и фосфатидилхолин. Вторая фаза — внемицеллярный жидкокристаллический холестерин в водном окружении желчи. Третья фаза — твердокристаллический холестерин, осадок. Жидкокристаллическая фаза нестабильна: холестерин из нее стремится перейти либо в мицеллы, либо в осадок. Уменьшение концентрации желчных кислот или увеличение концентрации холестерина может привести к относительному избытку холестерина, к такому состоянию, когда имеющиеся мицеллы не способны

вместить весь холестерин желчи — желчь становится насыщенной холестерином. В этих условиях и образуется твердокристаллическая фаза, т. е. холестериновые камни. Осаждению холестерина способствуют застой желчи, воспалительные заболевания желчного пузыря и протоков.

Центрами кристаллизации часто служат конгломераты белков или слущившихся клеток эпителия, на которые слой за слоем осаждается холестерин. Нередко камни состоят из чередующихся слоев холестерина и билирубина. Камни могут быть одиночными или многочисленными, крупными (до размеров куриного яйца) или мелкими (песок). Камни вызывают спазмы желчного пузыря и протоков, которые больной ощущает как приступы боли. Камни затрудняют, а иногда полностью перекрывают отток желчи через желчный проток, что приводит к еще большему ускорению их роста.

До настоящего времени основным способом лечения желчнокаменной болезни остается хирургическое удаление камней. Однако применяют и другой метод лечения — введение хенодезоксихолевой кислоты: от этой желчной кислоты в большой степени зависит растворимость холестерина; кроме того, хенодезоксихолевая кислота ингибирует ГМГ-КоА-редуктазу. При приеме 1 г хенодезоксихолевой кислоты в день синтез холестерина снижается вдвое, его концентрация в желчи уменьшается; концентрация желчных кислот, наоборот, увеличивается в результате дополнения собственных желчных кислот введенным препаратом. В этих условиях не только прекращается осаждение холестерина, но становится возможным и растворение уже имеющихся камней; камни размером с горошину растворяются примерно в течение полугода. Разумеется, такой способ лечения возможен только в том случае, если камни образованы преимущественно холестерином; растворимость билирубина мало зависит от желчных кислот.

Транспорт холестерина и обмен липопротеинов

В транспорте и распределении холестерина по органам участвуют все липопротеины, но главная роль принадлежит ЛНП и ЛВП. Липопротеины содержат холестерин и эфиры холестерина. Свободный холестерин входит в состав поверхностного фосфолипидного монослоя и является интегральной частью этого монослоя: молекулы холестерина располагаются между гидрофобными концами фосфолипидных молекул. Эфиры холестерина находятся в ядре липопротеиновой частицы; они не могут встраиваться в поверхностный слой.

ЛВП синтезируются в печени и секретируются в кровь в форме незрелых ЛВП. Незрелые ЛВП представляют собой дисковидные частицы из двух фосфолипидных слоев, т. е. подобие кружочка, вырезанного из бислойной мембраны. По краям слои кружочка склеены молекулами аполипопротеина Е. После секреции в кровь ЛВП набирают холестерин из клеточных мембран в результате действия ЛХАТ. Образующиеся при этом эфиры холестерина накапливаются между фосфолипидными слоями диска, и частицы превращаются в зрелые ЛВП ($ЛВП_2$), имеющие сферическую форму (рис. 10.35). Около 90 % эфиров холестерина в крови образуется при участии ЛХАТ. ЛВП обмениваются липидами и белками с ХМ и ЛОНП, в частности передают им апо С-II и апо Е. Апо С-II активирует липопротеинлипазу и, следовательно, стимулирует использование тканями жиров из хиломикронов и

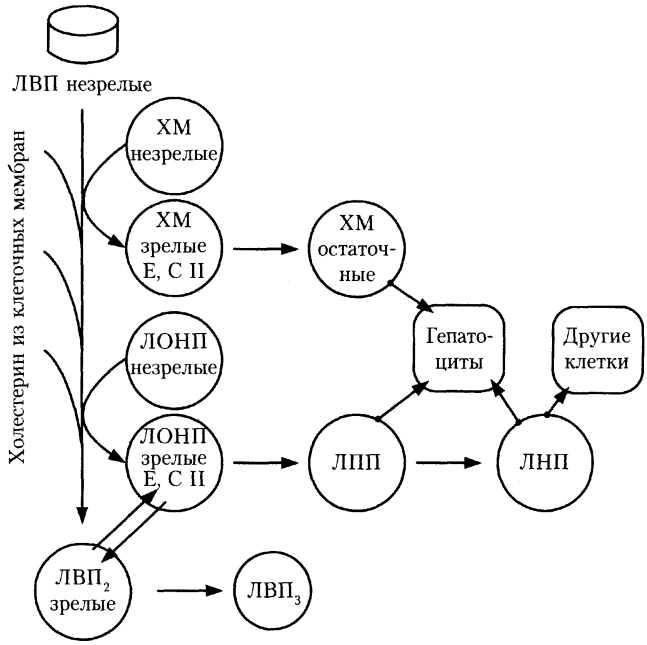


Рис. 10.35. Превращения липопротеинов, связанные с транспортом холестерина

ЛОНП. При этом зрелые хиломикроны превращаются в остаточные хиломикроны; апо Е служит лигандом для рецепторов в мембране гепатоцитов и обеспечивает эндоцитоз остаточных хиломикронов.

Более сложный путь превращений проходят ЛОНП. По мере расходования триацилглицеринов (в результате действия липопротеинлипазы) они утрачивают апо СII: этот белок, полученный ЛОНП от ЛВП, переносится обратно на ЛВП. На этой стадии ЛОНП превращаются в более мелкие и более плотные частицы — липопротеины промежуточной плотности (ЛПП). В некоторых частицах ЛПП гидролизуются триацилглицерины (в основном печеночной липазой), апо-Е переносится на ЛВП, и получаются ЛНП.

Зрелые ЛВП ($ЛВП_2$) при участии специального белка-переносчика передают эфиры холестерина на ЛОНП в обмен на триацилглицерины (см. рис. 10.35), а также на остаточные хиломикроны, ЛПП и ЛНП (тоже в обмен на триацилглицерины, при участии белка, переносящего эфиры холестерина).

ЛПП и ЛНП содержат мало триацилглицеринов, много эфиров холестерина и не содержат аполипопротеинов апо С II и апо Е, но содержат апоВ-100 (в ЛНП 95 % от всех белков приходится на апоВ-100). ЛПП и ЛНП эндоцитируются гепатоцитами. Однако ЛНП эндоцитируются также многими другими клетками, снабжая их холестерином: именно в этом заключается основная функция ЛНП.

Разрушение липопротеинов происходит в клетках ряда органов, но больше всего в печени. В плазматической мембране клеток содержатся рецепторы липопротеинов; лигандами этих рецепторов служат определенные аполипопротеины. Например, лигандами рецепторов В/Е (ЛНП-рецепторы, рис. 10.36)

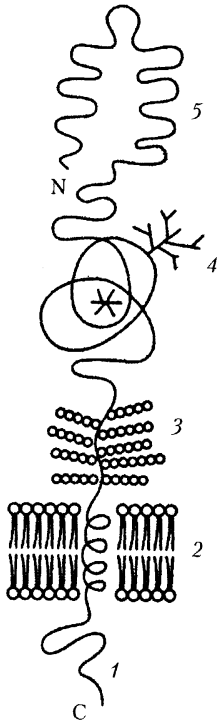


Рис. 10.36. Строение рецептора ЛНП

являются аполипопротеины B-100, B-48 и E. Следовательно, ЛНП-рецептор может связывать ЛНП, ЛОНП и остаточные хиломикроны, поскольку в них есть подходящие лиганды (см. табл. 10.5).

Каждая клетка содержит много копий рецептора; например, в фибробластах обнаруживается до 50 000 копий.

Присоединение липопротеина к рецептору включает механизм эндоцитоза, и липопротеин разрушается в лизосомах. Путем рецепторного эндоцитоза ЛНП передают клеткам разных органов около 1 г холестерина за сутки. При этом поглощение ЛНП регулируется самими клетками путем изменения количества рецепторов ЛНП в клеточной мембране (рис. 10.37). Повышение концентрации холестерина в цитозоле приводит к репрессии синтеза рецепторов на уровне транскрипции и, следовательно, к снижению их количества на поверхности клетки и к уменьшению поглощения ЛНП.

Механизм обмена холестерином между клетками и липопротеинами поддерживает гомеостаз холестерина в клетках разных органов: с помощью ЛВП удаляется избыток холестерина из клеток, а ЛНП обеспечивают клетки холестерином при увеличении потребности в нем (например, при росте и делении клеток, когда холестерин расходуется на образование новых мембран).

Кроме того, в результате описанных трансформаций холестерин, собранный ЛВП из клеточных мембран разных органов, через остаточные хиломикроны, ЛОНП, ЛПП и ЛНП переносится в печень, и если в гепатоциты поступает слишком много холестерина, то ингибируется его синтез, т. е. обеспечивается гомеостаз холестерина на уровне организма в целом.

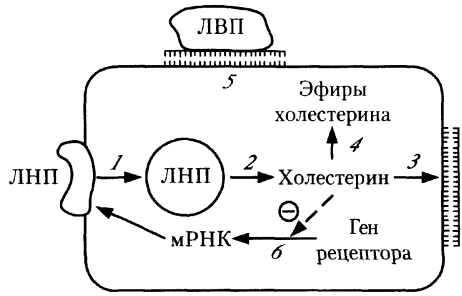


Рис. 10.37. Регуляция эндоцитоза ЛНП и концентрации холестерина в клетках:

1 — эндоцитоз ЛНП, связанного с рецептором; *2* и *3* — разрушение эндоцитозного пузырька с участием лизосом; *3* — включение холестерина в плазматическую мембрану; *4* — запасание холестерина в форме эфиров; *5* — включение холестерина из ЛВП в плазматическую мембрану клетки; *6* — избыток холестерина в клетке подавляет экспрессию гена рецептора ЛНП

Модифицированные липопротеины и путь «уборки мусора»

Липопротеины, циркулирующие в крови, могут повреждаться рядом факторов. Наиболее частым повреждением являются окислительные превращения ненасыщенных жирных кислот (перекисное окисление липидов, см. гл. 19), содержащихся в липидах клетки. Скорость окисления липидов особенно высока в ЛНП. Могут также повреждаться аполипопротеины (денатурация, частичный протеолиз). Модификация липопротеинов происходит в основном в межклеточном пространстве, куда липопротеины проникают через межклеточные промежутки или через клетки эндотелия путем везикулярного транспорта. В свою очередь, модифицированные липопротеины могут повреждать эндотелий сосудов.

Макрофаги (моноциты плазмы крови, мигрировавшие в артериальную стенку) содержат рецепторы, связывающие не нативные, а модифицированные, поврежденные ЛНП; их называют рецепторами-уборщиками, или скавенджерами (англ. *scavenger* — уборщик мусора). Поврежденные ЛНП удаляются очень быстро: их время полужизни измеряется всего лишь минутами. Тем не менее повреждение эндотелия сосудов модифицированными липопротеинами является важным моментом развития атеросклеротических изменений. Концентрация поврежденных липопротеинов, в частности, зависит от периода их полураспада. Известна мутация гена рецептора ЛНП, в результате которой период полураспада ЛНП увеличен в 2–3 раза по сравнению с нормой (норма — 2,5 суток). У таких индивидов повышена частота развития атеросклероза.

ГИПЕРЛИПОПРОТЕИНЕМИИ

Липопротеины в крови имеются постоянно, но их концентрация меняется в зависимости от ритма питания. За нормальное принимают содержание липопротеинов у здоровых людей через 10–12 ч после еды (постабсорбтивное состояние; кровь для анализа берут утром до завтрака). В этом состоянии в крови здоровых людей отсутствуют хиломикроны и обнаруживаются только ЛОНП (около 15 % от всех липопротеинов), ЛНП (60 %) и ЛВП (25 %) — см. табл. 10.6.

Практически весь холестерин и все жиры плазмы крови находятся в липопротеинах. В норме содержание холестерина в крови равно 200 ± 50 мг/дл (сумма свободного и этерифицированного холестерина); содержание жиров 100 ± 90 мг/дл. При повышенном содержании липопротеинов в крови (гиперлипопротеинемии) одновременно повышено содержание холестерина и жиров. Концентрация холестерина в большей мере связана с концентрацией ЛНП и ЛВП, а жиров — с концентрацией хиломикронов или ЛОНП. В связи с этим различают три формы гиперлипопротеинемии:

1) гиперхолестеринемия (повышена концентрация ЛНП или ЛВП);
2) гипертриацилглицеринемия (повышена концентрация хиломикронов или ЛОНП);
3) смешанная форма.

Гиперлипопротеинемии — очень распространенные нарушения обмена: они обнаруживаются примерно у каждого десятого человека. Главная опасность гипер-

липопротеинемий связана с тем, что повышается вероятность возникновения атеросклероза.

Известно около полусотни мутаций в гене рецептора ЛНП (он же рецептор В/Е). Их можно разделить на пять классов:

1) не образуется рецептор;
2) нарушена посттрансляционная достройка;
3) снижено сродство к лигандам;
4) нарушена способность к эндоцитозу;
5) нарушена диссоциация комплекса ЛНП-рецептор в эндосомах, ЛНП не разрушается.

Семейная гиперхолестеринемия (β-липопротеинемия) связана с полной или частичной утратой способности печени удалять из кровотока ЛНП вследствие дефекта ЛНП-рецептора. Вследствие этого в крови повышается концентрация ЛНП, а также холестерина, поскольку его много в ЛНП. Концентрация холестерина в крови может достигать 1000 мг/дл (норма 200 ± 50 мг/дл). Поэтому для β-липопротеинемии характерны отложение холестерина в тканях, в частности в коже (ксантомы), и атеросклеротические изменения артерий, высокая частота ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда, который у таких больных может быть в очень раннем возрасте, даже в 10 лет.

Вторичные (не врожденные) гиперлипопротеинемии — обычное явление при таких хронических заболеваниях, как сахарный диабет, нефрозы, гепатиты, хронический алкоголизм.

АТЕРОСКЛЕРОЗ

Гиперхолестеринемия создает повышенную опасность заболевания атеросклерозом. Вероятность заболевания тем выше, чем больше отношение концентрации ЛНП к концентрации ЛВП в крови; их называют соответственно атерогенными и антиатерогенными липопротеинами. Напомним, что ЛНП снабжают клетки холестерином, в то время как ЛВП удаляют из них избыток холестерина.

Главное биохимическое проявление атеросклероза — это отложения холестерина в стенках артерий. В 1913 г. Н. Аничков установил, что высокое содержание холестерина в корме кроликов вызывает у них гиперхолестеринемию и атеросклероз. Аничков сформулировал концепцию, согласно которой атеросклероз есть результат гиперхолестеринемии и инфильтрации холестерина из крови в стенки артерий.

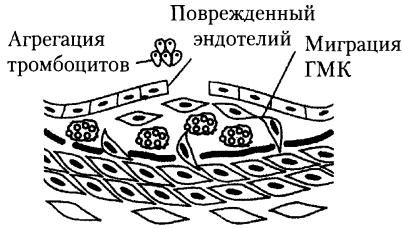
При атеросклерозе в артериях образуются бляшки, нарушающие кровоток или полностью закрывающие сосуд. Бляшки содержат гладкомышечные клетки, соединительную ткань, липиды (в основном эфиры холестерина), остатки разрушенных клеток.

Гиперхолестеринемия — одна из причин отложения холестерина в артериях. Но существенное значение имеют также первичные повреждения клеток сосудов. Повреждения эндотелия могут возникать вследствие действия модифицированных липопротеинов, а также при гипертонии, воспалительных процессах, нарушениях свертывания крови, действии токсических веществ (например, никотина).

Поврежденная поверхность артерии привлекает из крови моноцитов, которые превращаются в макрофагов. Макрофаги поглощают модифицированные липопротеины, остатки разрушенных клеток, накапливают липиды (содержание холестерина в них может увеличиться в 100–150 раз) и превращаются в пенистые

Нормальная стенка артерий.

Формирование жировых полосок. «Пенистые клетки», содержащие большое количество холестерола, проходят под слой эндотелия. Повреждение эндотелия происходит не всегда.



Пролиферация и миграция клеток гладкой мскулатуры в область бляшки. Эндотелий повреждается, активируется агрегация тромбоцитов.

Образование фиброзной бляшки. Клетки секретируют коллаген и другие белки, которые формируют фиброзную оболочку, внутри которой происходит некроз клеток.

В бляшке накапливаются омертвевшие ткани, пропитанные холестеролом. Происходит кальцификация бляшки.

Рис. 10.38. Образование атеросклеротической бляшки

клетки: капли эфиров холестерина в цитоплазме придают клеткам характерный пенистый вид (рис. 10.38). Скопления пенистых клеток в субэндотелиальном слое артерий образуют липидные пятна и полоски. В аорте пятна и полоски впервые появляются еще в детском возрасте, примерно с 3 лет. Со временем их количество увеличивается; они возникают и в других местах сосудистого русла — в коронарных артериях (к 15–20 годам), в артериях нижних конечностей.

На поврежденной поверхности происходит агрегация тромбоцитов, которые начинают выделять цитокины, стимулирующие пролиферацию гладкомышечных клеток и их миграцию из средней оболочки артерии во внутреннюю оболочку. Такие цитокины секретируются и макрофагами.

Клетки в области повреждения секретируют коллаген, эластин, гликозаминогликаны, образуя фиброзную капсулу — атеросклеротическую бляшку, содержащую эфиры холестерина. Клетки, оказавшиеся внутри бляшки, погибают. Разрыв капсулы и кровотечение из бляшки приводят к быстрому образованию тромба, закрывающего сосуд. Инфаркт миокарда — следствие такого осложнения, если оно случилось в коронарной артерии. Бляшки могут изъязвляться; язвы зарастают соединительной тканью (образуется рубец), в которую откладываются соли кальция. Стенки сосудов деформируются, становятся жесткими, нарушается моторика сосудов, суживается просвет вплоть до закупорки.

Наиболее опасные и частые осложнения атеросклероза — ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, инсульт, облитерирующий эндоартериит и гангрена нижних конечностей, одна из форм почечной гипертонии.

Между отложениями холестерина в артериях и липопротеинами крови происходит двусторонний обмен холестерином, но при гиперхолестеринемии преобладает поток холестерина в стенки артерий. Методы профилактики и лечения атеросклероза направлены на то, чтобы усилить обратный поток, обычно путем уменьшения гиперхолестеринемии. Для этого применяют малохолестериновую диету, лекарства, увеличивающие экскрецию холестерина или ингибирующие его синтез, прямое удаление холестерина из крови методом гемодиффузии и др.

ОБМЕН СЛОЖНЫХ ЛИПИДОВ

В отличие от жиров и жирных кислот (простых липидов), используемых в качестве энергетического материала, сложные липиды выполняют пластические функции и используются главным образом как структурные компоненты биологических мембран. Все сложные липиды содержат остаток жирных кислот. Спиртовая часть может быть представлена глицерином, сфингозином, инозитом.

Основные группы соединений, которые относят к сложным липидам, перечислены ниже.

I. Фосфолипиды:
   1. Глицерофосфолипиды: фосфатидилхолины (лецитины), фосфатидилэтаноламины (кефалины), фосфатидилсерины, фосфатидилглицерины, фосфатидилинозиты.
   2. Сфингофосфолипиды (сфингомиелины).

II. Гликолипиды (гликосфинголипиды, гликозилцерамиды):

1. Цереброзиды (углеводная часть не содержит сиаловых кислот).
2. Ганглиозиды (сиалогликосфинголипиды).

Обмен и функции гликолипидов описаны в гл. 7 и 9, строение и функции фосфолипидов, входящих в мембраны, — в гл. 7. В этом разделе мы остановимся на путях образования фосфолипидов.

Основную группу фосфолипидов составляют глицерофосфолипиды. Синтез глицерофосфолипидов проходит через стадию фосфатидной кислоты, так же как и синтез триацилглицеринов.

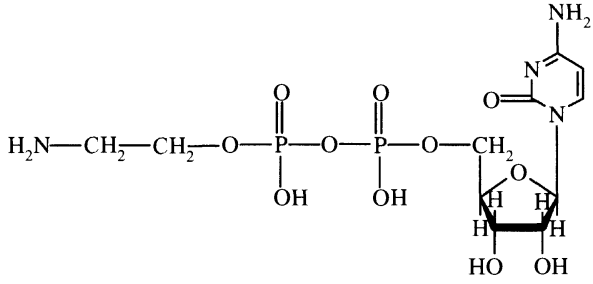


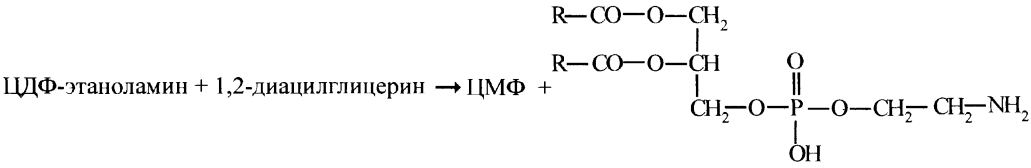
Рис. 10.39. ЦДФ-этаноламин

Синтез фосфатидилэтаноламинов, фосфатидилхолинов и фосфатидилсеринов. Непосредственными предшественниками фосфатидилэтаноламинов служат диацилглицерин и ЦДФ-этаноламин (рис. 10.39). Последнее соединение образуется путем фосфорилирования этаноламина (а) и взаимодействия фосфоэтаноламина с ЦТФ (б):

$$\underset{\text{этаноламин}}{HO—CH_2—CH_2—NH_2} + АТФ \rightarrow \underset{\text{фосфоэтаноламин}}{H_2O_3PO—CH_2—CH_2—NH_2} + АДФ \qquad (а)$$

$$ЦТФ + \text{Фосфоэтаноламин} \rightarrow ЦДФ\text{-этаноламин} + H_4P_2O_7 \qquad (б)$$

Остаток фосфоэтаноламина с ЦДФ-этаноламина затем переносится на глицериновый остаток 1,2-диацилглицерина:



Аналогичная последовательность реакций, в которых вместо этаноламина используется холин $HO—CH_2—CH_2—N^+(CH_3)_3$, приводит к образованию фосфатидилхолина (формула фосфатидилхолина приведена в гл. 7). Кроме того, фосфатидилхолин может образоваться путем метилирования фосфатидилэтаноламина с использованием метильных групп S-аденозилметионина (см. гл. 11):

Фосфатидилэтаноламин + 3S-Аденозилметионин → Фосфатидилхолин + 3S-Аденозилгомоцистеин

Фосфатидилсерин образуется в обменной реакции фосфатидилэтаноламина с серином:

Фосфатидилэтаноламин + Серин → Фосфатидилсерин + Этаноламин

На рис. 10.40 представлена общая схема синтеза фосфатидилэтаноламинов, фосфатидилхолинов и фосфатидилсеринов.

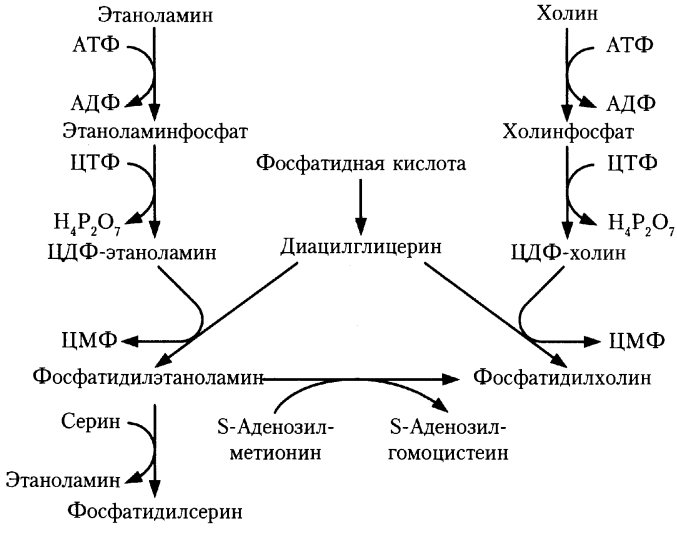


Рис. 10.40. Синтез фосфатидилэтаноламинов, фосфатидилхолинов и фосфатидилсеринов

Сходным образом синтезируются и сфингофосфолипиды, но вместо диацилглицерина используется церамид (N-ацилсфингозин) (рис. 10.41).

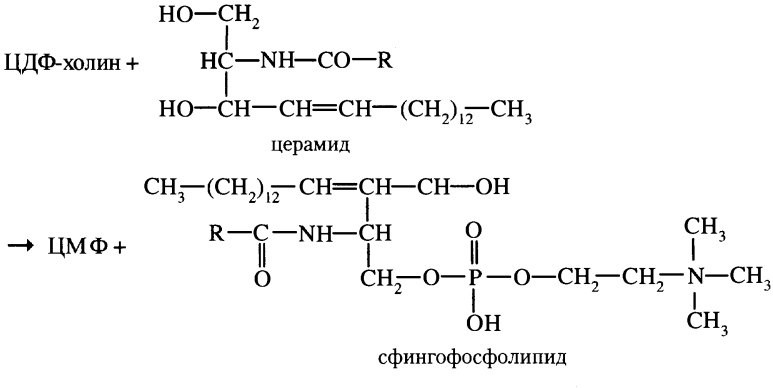
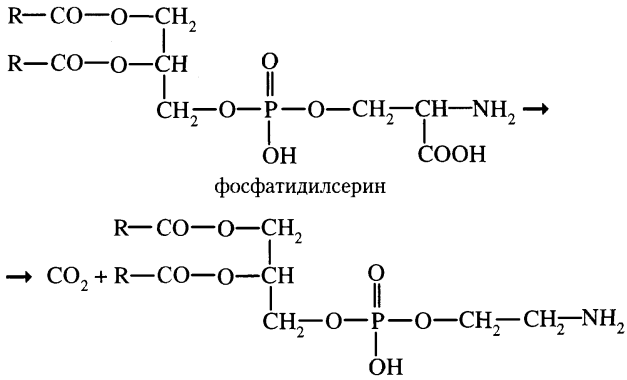


Рис. 10.41. Синтез сфингофосфолипидов

Не вполне ясным остается вопрос об источниках этаноламина и холина для образования этих соединений. Одно из возможных объяснений связано с наличием в клетках фермента, декарбоксилирующего фосфатидилсерин:



Эта реакция вместе с обменной реакцией фосфатидилэтаноламина с серином может образовать цикл, в котором серин превращается в этаноламин (рис. 10.42).

Этаноламин затем используется для синтеза новых молекул фосфатидилэтаноламина по уже описанному пути, а в реакции трансметилирования фосфатидилэтаноламин превращается в фосфатидилхолин. Однако возможно, что основным источником этаноламина и холина служит пища, особенно животного происхождения, поскольку эти вещества содержатся в значительных количествах в составе фосфолипидов клеточных мембран.

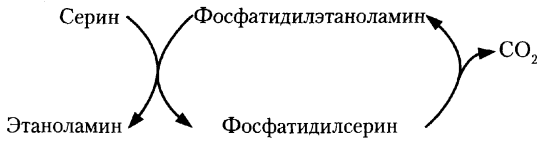


Рис. 10.42. Превращение серина в этаноламин

Во внутренней мембране митохондрий в значительных количествах (до 20 % от всех фосфолипидов) содержатся дифосфатидилглицерины, или кардиолипины (рис. 10.43). При гидролизе всех эфирных связей кардиолипина получаются 4 моль жирной кислоты, 3 моль глицерина и 2 моль фосфорной кислоты. Кардиолипины образуются в результате взаимодействия двух молекул фосфатидилглицерина.

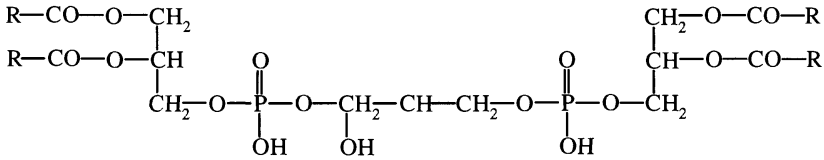


Рис. 10.43. Строение кардиолипинов

Глава 11

ОБМЕН И ФУНКЦИИ АМИНОКИСЛОТ

Значение аминокислот для организма определяется прежде всего тем, что они используются для синтеза белков и пептидов. Кроме того, из аминокислот образуется большое количество веществ непептидной природы, выполняющих специальные функции. К ним относятся нуклеотиды, холин, таурин, амины, гем, тироксин и много других. Катаболизм аминокислот может служить источником энергии для синтеза АТФ. При обычном питании энергетическая роль аминокислот невелика, однако может быть существенной при преимущественно белковом питании, а также при голодании; в последнем случае используются аминокислоты, образующиеся при распаде собственных белков.

Фонд свободных аминокислот организма составляет около 30 г. Содержание аминокислот в крови равно 35–65 мг/дл. Подавляющая часть аминокислот организма входит в состав белков: в организме взрослого человека содержится около 15 кг белков.

Источниками свободных аминокислот организма служат пищевые белки, белки собственных тканей, а также синтез аминокислот из углеводов.

В организме человека ежесуточно распадается на аминокислоты около 400 г белков. Однако столько же белков и синтезируется за сутки. Следовательно, тканевые белки не могут восполнять необратимые затраты аминокислот, которые происходят при их катаболизме или использовании для синтеза веществ неаминокислотной природы. Точно так же не могут служить первичным источником аминокислот и углеводы, поскольку из них образуется лишь углеродная часть аминокислот, а аминогруппы поставляются другими аминокислотами. К тому же почти половина аминокислот — это незаменимые пищевые факторы, углеродная часть которых в организме человека не синтезируется. Таким образом, первичным и главным источником аминокислот служат белки пищи.

АЗОТИСТЫЙ БАЛАНС

На долю аминокислот (в составе белков и свободных) приходится более 95 % всего азота организма. Поэтому об общем состоянии аминокислотного и белкового обмена можно судить по *азотистому балансу*, т. е. разнице между количеством азота,

поступающего с пищей, и количеством выделяемого азота (главным образом в составе мочевины). У взрослого здорового человека при нормальном питании имеет место *азотистое равновесие*, т. е. количество выделяемого азота равно количеству поступающего. В период роста организма, а также при выздоровлении после истощающих заболеваний выводится азота меньше, чем поступает, — *положительный азотистый баланс*. При старении, голодании и в течение истощающих заболеваний азота выводится больше, чем поступает, — *отрицательный азотистый баланс*.

При положительном азотистом балансе часть аминокислот пищи задерживается в организме, включаясь в состав белков и клеточных структур; общая масса белков в организме увеличивается. Наоборот, при отрицательном азотистом балансе общая масса белков уменьшается (*катаболическое состояние*).

Если из диеты исключить все белки, но полностью сохранить другие компоненты в количествах, обеспечивающих энергетические потребности организма, то азотистый баланс становится отрицательным. Примерно через неделю пребывания на такой диете количество выводимого азота стабилизируется, достигая величины около 4 г за сутки. Такое количество азота соответствует 25 г белка (или аминокислот). Следовательно, при белковом голодании организм ежесуточно расходует около 25 г белков собственных тканей. Практически такой же результат получается при исключении из диеты не всех белков, а только незаменимых аминокислот или даже только одной из них.

При полном голодании отрицательный азотистый баланс еще больше, чем при исключении из пищи только белков. Это обусловлено тем, что аминокислоты, образующиеся при распаде тканевых белков, при полном голодании используются также и для обеспечения энергетических потребностей организма.

В рационе, достаточном по калорийности, минимальное количество белков, необходимое для поддержания азотистого равновесия, составляет 30–50 г. Однако это количество не обеспечивает оптимума для здоровья и работоспособности. Взрослый человек при средней физической нагрузке должен получать около 100 г белков в сутки.

ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКОВ

В желудочно-кишечном тракте пищевые белки распадаются на аминокислоты при участии пищеварительных протеолитических ферментов — *пептидгидролаз*. Это группа ферментов, различающихся по субстратной специфичности: каждый из этих ферментов предпочтительно (т. е. с наибольшей скоростью) гидролизует пептидные связи, образованные определенными аминокислотами. В результате совместного действия всех пищеварительных пептидгидролаз белки пищи полностью распадаются на аминокислоты. Таким путем организм получает мономеры для синтеза собственных белков.

Переваривание белков в желудке

В желудке переваривание белков происходит при действии протеолитического фермента пепсина; существенную роль в этом процессе играет соляная кислота

желудочного сока. Соляная кислота образуется в обкладочных клетках желудочных желез и секретируется в полость желудка, где ее концентрация достигает 0,16 М (около 0,5 %). За счет этого желудочный сок имеет низкое значение pH, в пределах 1–2.

В главных (пепсиновых) клетках желудочных желез образуется белок пепсиноген — предшественник (профермент) пепсина. В кислой среде желудочного сока некоторые группы пепсиногена протонируются, изменяется конформация пепсиногена, в результате чего он приобретает небольшую протеолитическую активность:

$$\underset{\text{(неактивный)}}{\text{Пепсиноген}} + H^+ \rightarrow \underset{\text{(слабо активный)}}{\text{Пепсиноген}\bullet H^+}$$

При этом субстратом активированного пепсиногена служит тоже пепсиноген: одна молекула пепсиногена отщепляет от другой молекулы пепсиногена N-концевую часть, включающую 42 аминокислотных остатка (18 % всего числа аминокислотных остатков молекулы пепсиногена). В результате отщепления части молекулы и конформационных перестроек оставшейся части образуется фермент пепсин (рис. 11.1, *а*). Пепсин тоже катализирует превращение пепсиногена в пепсин (рис. 11.1, *б*). В этом случае активацию можно представить как циклический процесс с механизмом положительной обратной связи: продукт реакции пепсин ускоряет свое собственное образование (рис. 11.1, *в*). В таком процессе за каждый оборот цикла количество продукта (пепсина) удваивается, т. е. нарастает в геометрической прогрессии со множителем 2; за десять оборотов цикла количество продукта увеличится в 1000 раз.

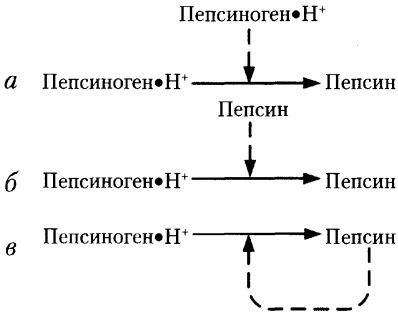


Рис. 11.1. Превращение пепсиногена в пепсин

Пепсин гидролизует пептидные связи, удаленные от концов пептидной цепи: такие пептидгидролазы называют *эндопептидазами*. Поэтому в результате действия пепсина белки в желудке распадаются на полипептиды; свободные аминокислоты практически не образуются. Наибольшую активность пепсин проявляет при pH 1–2,5.

Соляная кислота, помимо активации пепсиногена, выполняет и другие важные функции. В кислой среде желудочного сока большинство белков денатурируется, что облегчает их последующее переваривание пепсином. Конечно, если употребляется пища, обработанная при высокой температуре (например, вареное мясо), эта роль соляной кислоты не имеет значения. Кроме того, кислый поджелудочный сок, обладая бактерицидным действием, создает барьер для попадания болезнетворных бактерий в кишечник.

При многих заболеваниях желудочно-кишечного тракта, а также и других систем нарушается секреция соляной кислоты и пепсиногена в желудке. Изменения кислотности желудочного сока и содержания пепсина происходят не обязательно параллельно. Чаще увеличивается или уменьшается содержание соляной кислоты;

с другой стороны, нарушение секреции пепсина свидетельствует о более тяжелом повреждении желудка; если нет секреции пепсина, то, как правило, нет секреции и соляной кислоты.

Измерение концентрации соляной кислоты и пепсина в желудочном соке используется для диагностики некоторых заболеваний желудка. При исследовании секреции соляной кислоты сначала откачивают содержимое желудка с помощью зонда, затем подкожно вводят гистамин, который стимулирует секрецию соляной кислоты. После этого вновь откачивают желудочный сок, отбирая пробы каждые 15 мин. Эти пробы титруют раствором щелочи. В норме концентрация соляной кислоты достигает максимума примерно через 1 ч после введения гистамина и составляет около 100 ммоль/л.

Высокая кислотность часто бывает при язве желудка и двенадцатиперстной кишки. Низкая кислотность редко позволяет поставить определенный диагноз. Полное отсутствие кислоты обычно наблюдается при атрофических гастритах; в этих случаях, как правило, отсутствует и пепсин, т. е., точнее говоря, не происходит образования желудочного сока (*ахилия*). Частым следствием ахилии является злокачественная анемия, поскольку при этом отсутствует внутренний фактор Касла, необходимый для всасывания витамина B_{12}, и наступает гиповитаминоз.

Переваривание белков в кишечнике

Переваривание белков завершается в верхнем отделе тонкого кишечника под действием ферментов поджелудочной железы и клеток кишечника.

В клетках поджелудочной железы синтезируются проферменты трипсиноген, химотрипсиноген, прокарбоксипептидазы А и В, проэластаза. Активация трипсиногена происходит при участии фермента энтеропептидазы, выделяемого клетками кишечника. Энтеропептидаза — это тоже протеолитический фермент: он отщепляет N-концевой гексапептид трипсиногена, в результате чего происходит изменение конформации оставшейся части молекулы и формируется активный центр — получается фермент трипсин; таким путем образуется немного трипсина. Основное количество трипсиногена активируется трипсином, т. е. путем аутоактивации (рис. 11.2). Здесь, как и в случае аутоактивации пепсина, тоже действует циклический процесс с положительной обратной связью.

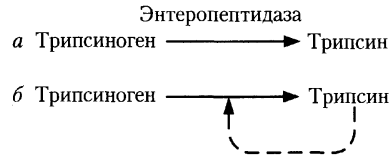


Рис. 11.2. Активация трипсиногена

Все другие проферменты поджелудочной железы активируются трипсином и тоже путем частичного избирательного протеолиза; в результате получаются ферменты химотрипсин, карбоксипептидазы А и В, эластаза (рис. 11.3).

Наличие высокоэффективного способа активации трипсина, вероятно, обусловлено тем, что в кишечнике перевариваются и сами протеазы; их убыль восполняется продолжающейся секрецией и активацией проферментов.

Трипсин, химотрипсин и эластаза, подобно пепсину, относятся к эндопептидазам. Они различаются по субстратной специфичности; в табл. 11.1 указаны пептидные связи, которые расщепляются главными пищеварительными эндопептидазами

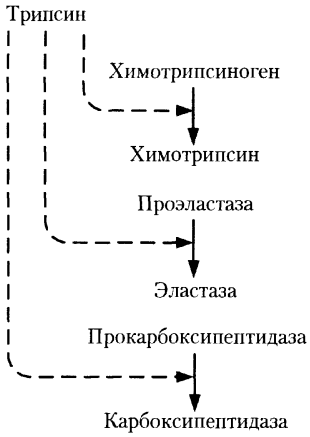


Рис. 11.3. Активация протеаз кишечника

с максимальной скоростью (при этом расщепляются и другие связи, но с меньшей скоростью). Основную часть продуктов действия этих ферментов составляют пептиды, но образуется также и некоторое количество аминокислот.

Карбоксипептидазы — это экзопептидазы: они гидролизуют пептидную связь, образованную С-концевым аминокислотным остатком. Карбоксипептидаза А отщепляет преимущественно С-концевые аминокислоты с гидрофобным радикалом, а карбоксипептидаза В отщепляет С-концевые остатки лизина и аргинина. Механизм действия карбоксипептидазы А описан в гл. 2.

Кислое желудочное содержимое в двенадцатиперстной кишке нейтрализуется соком поджелудочной железы, имеющим слабощелочную реакцию. Содержимое верхнего отдела тонкой кишки имеет pH ≈ 8; соответственно, в этой же области pH находится оптимум активности ферментов, действующих в кишечнике.

Последний этап переваривания происходит при участии ферментов, синтезируемых клетками кишечника, — *аминопептидаз* и *дипептидаз*. Аминопептидазы отщепляют N-концевые аминокислоты от пептидов, дипептидазы гидролизуют дипептиды. Эти ферменты в небольших количествах выделяются в просвет кишечника. Однако преобладающая часть дипептидов и олигопептидов расщепляется после их поступления в клетки кишечника. В кровоток из клеток кишечника поступают только аминокислоты.

Таблица 11.1. Связи, предпочтительно расщепляемые эндопептидазами

Пепсин	Химотрипсин	Трипсин	Эластаза
—Phe—X— —Tyr—X—Glu—X— —Asp—X—	—Try—X— —Phe—X— —Tyr—X— —Leu—X—	—Arg—X— —Lys—X—	—Ala—X— —Gly—X— —Ser—X—

Примечание. Справа от символа аминокислоты — пептидная связь, образованная карбоксильной группой указанной аминокислоты: именно она гидролизуется соответствующим ферментом; X — любая аминокислота.

Последовательное действие всего набора пищеварительных пептидгидролаз обеспечивает полное расщепление белков до аминокислот. Частичное переваривание белков в желудке хотя и облегчает последующее переваривание в тонком кишечнике, но не является абсолютно обязательным, о чем свидетельствует отсутствие существенных нарушений усвоения белков после тотальной резекции желудка.

Клетки желудка и кишечника защищены от действия пищеварительных пептидгидролаз благодаря образованию в клетках желез неактивных предшественников ферментов, активирующихся лишь после секреции. Находясь в полости желудка или кишечника, ферменты не контактируют с белками клеток, поскольку

слизистая оболочка защищена слоем слизи, а каждая клетка — полисахаридами наружной поверхности плазматической мембраны, которые не являются субстратами пептидгидролаз. Однако при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки происходит разрушение клеток протеиназами в области язвы.

РАСПАД ТКАНЕВЫХ БЕЛКОВ

Основные причины распада тканевых белков заключаются в следующем.

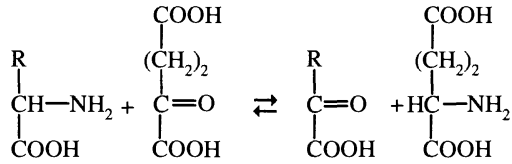
1. Старение клеток или их повреждение внешними факторами (токсические вещества, излучения). Состарившиеся и поврежденные клетки разрушаются путем апоптоза или фагоцитируются; все их компоненты, включая белки, деполимеризуются в лизосомах.
2. Денатурация белков, которая происходит непрерывно с определенной скоростью. Денатурированные белки — более доступные субстраты для протеолитических ферментов.
3. Частичный протеолиз белков в ходе посттрансляционной достройки. При превращении проферментов и предшественников других белков в функционально активные белки отщепляемая часть пептидной цепи гидролизуется до аминокислот.
4. Переваривание белков пищеварительных соков. Со всеми пищеварительными секретами у человека за сутки выделяется в кишечник около 50 г белков, в основном ферментов. Все эти белки тоже перевариваются, а аминокислоты всасываются.
5. Регуляция концентрации белков путем индукции и репрессии. Этот механизм регуляции немыслим без его дополнения механизмом разрушения соответствующих белков (ферментов, гормонов и др.) в условиях, когда необходимость в них отпала.

Уже упоминалось, что за сутки распадается около 400 г тканевых белков, однако скорость обновления разных белков неодинакова (см. гл. 4).

Клетки разных органов содержат большое количество протеолитических ферментов, которые и обеспечивают внутриклеточный гидролиз белков. В этом процессе участвует небольшой белок убиквитин (76 аминокислотных остатков), который присоединяется к ε-аминогруппам лизиновых остатков: меченные убиквитином белки гидролизуются протеазами. Часть белков распадается после их включения в лизосомы при действии внутрилизосомных пептидгидролаз.

ТРАНСАМИНИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Трансаминирование — это реакция обмена аминогруппы и кетогруппы между α-аминокислотой и α-кетокислотой (см. гл. 2). В организме человека имеется свыше десятка аминотрансфераз, различающихся по субстратной специфичности. В результате их действия почти все аминокислоты могут обмениваться аминогруппами. Исключение составляют лизин и треонин, которые не участвуют в реакциях трансаминирования. Во многих реакциях трансаминирования акцептором аминогрупп служит α-кетоглутаровая кислота:



Реакции трансаминирования обратимы; константа равновесия близка к единице. Направление превращения зависит от скорости поступления субстратов в клетку или скорости удаления продуктов реакции. Таким образом, тарнсаминирование может обеспечить образование тех аминокислот, содержание которых в пище недостаточно, за счет имеющихся в избытке. Замещение кетогруппы в α-кетокислоте на аминогруппу обычно представляет собой конечную стадию синтеза аминокислоты. Наоборот, замещение аминогруппы в аминокислоте на кетогруппу — первая стадия катаболизма аминокислоты. Следовательно, трансаминирование может служить как для синтеза, так и для катаболизма аминокислот.

Аминотрансферазы содержатся практически во всех органах, но наиболее активно реакции трансаминирования протекают в печени. Функциональное значение трансаминирования в разных органах различно. Например, работающая мышца выделяет в кровь наряду с молочной кислотой значительные количества аланина. Аланин образуется в мышце из пировиноградной кислоты путем трансаминирования. Из кровотока аланин поглощается печенью, превращается в пируват, а пируват используется для глюконеогенеза (глюкозо-аланиновый цикл, см. рис. 9.24). Этим путем осуществляется перенос из мышц в печень не только пирувата, но и азота; в печени за счет аминогруппы аминокислот образуется мочевина, которая выводится из организма.

Одна и та же реакция трансаминирования может протекать в противоположных направлениях в разных отсеках одной клетки. Например, реакция трансаминирования, катализируемая глутамат-оксалоацетат-аминотрансферазой и составляющая часть малат-аспартатного челночного механизма, протекает в противоположных направлениях в матриксе митохондрий и в цитозоле (см. рис. 9. 13).

ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ

При дезаминировании аминокислот аминогруппа отщепляется в форме аммиака с образованием безазотистого остатка аминокислоты (обычно α-кетокислоты). В результате реакций трансаминирования общее количество аминокислот в организме не изменяется, поскольку в каждой реакции одна аминокислота превращается в безазотистый остаток (α-кетокислоту), а один безазотистый остаток — в новую аминокислоту. Напротив, дезаминирование ведет к уменьшению общего количества аминокислот, так как аминогруппа не используется для образования новой аминокислоты, а превращается в аммиак.

Глутаматдегидрогеназа

С наибольшей скоростью дезаминируется глутаминовая кислота; дезаминирование сопровождается окислением (окислительное дезаминирование). Коферментом глутаматдегидрогеназы может быть как НАД, так и НАДФ (рис. 11.4).

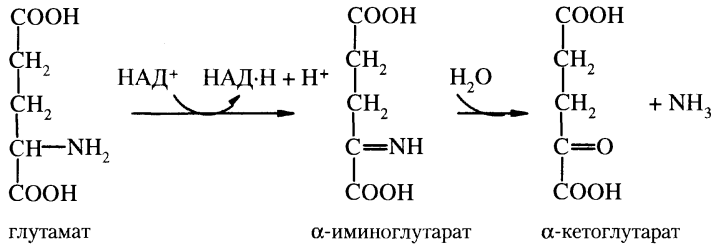


Рис. 11.4. Окислительное дезаминирование глутамата

Дегидрирование глутамата катализируется ферментом, а превращение α-иминоглутарата в α-кетоглутарат и аммиак происходит неферментативно.

Окислительное дезаминирование глутамата — обратимая реакция и в какой-то мере может протекать в некоторых органах в сторону синтеза глутамата. Однако в среднем в организме преобладает направление в сторону образования аммиака.

Непрямое дезаминирование аминокислот

В отличие от глутаминовой кислоты, аминогруппа других аминокислот превращается в аммиак непрямым путем, в результате последовательного действия аминотрансфераз и глутаматдегидрогеназы. При этом сначала происходит трансаминирование аминокислоты с α-кетоглутаратом и образуется глутаминовая кислота, которая затем дезаминируется глутаматдегидрогеназой (рис. 11.5).

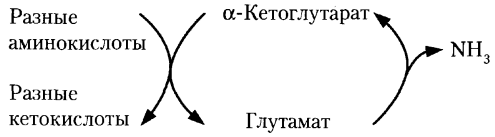


Рис. 11.5. Непрямое дезаминирование аминокислот

В результате циклических превращений α-кетоглутарата и глутамата аминокислоты перерабатываются в кетокислоты и аммиак. Поскольку все реакции этого цикла обратимы, в целом непрямое дезаминирование тоже обратимо, но в общем балансе организма преобладает распад аминокислот. Наиболее активно непрямое дезаминирование с участием глутаматдегидрогеназы происходит в печени.

Другой путь непрямого дезаминирования аминокислот включает перенос их аминогруппы сначала на аспартат, затем на инозиновую кислоту (ИМФ) с образованием АМФ и, наконец, дезаминирование АМФ (рис. 11.6).

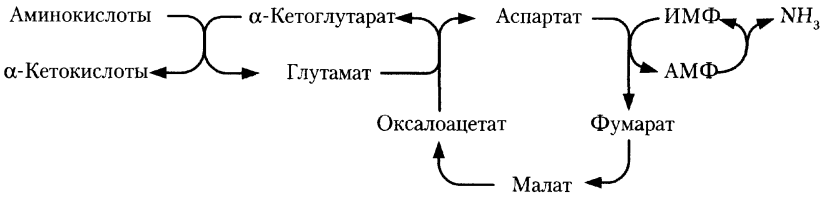


Рис. 11.6. Дезаминирование аминокислот с участием цикла ИМФ-АМФ

Аминогруппа аспартата в результате двух реакций преобразуется в аминогруппу АМФ (рис. 11.7, *а*); затем от АМФ аминогруппа отщепляется гидролитически, получаются аммиак и ИМФ (рис. 11.7, *б*) Этот сложный путь дезаминирования аминокислот особенно активно протекает в мышечной ткани, которая содержит мало глутаматдегидрогеназы, а также в мозге.

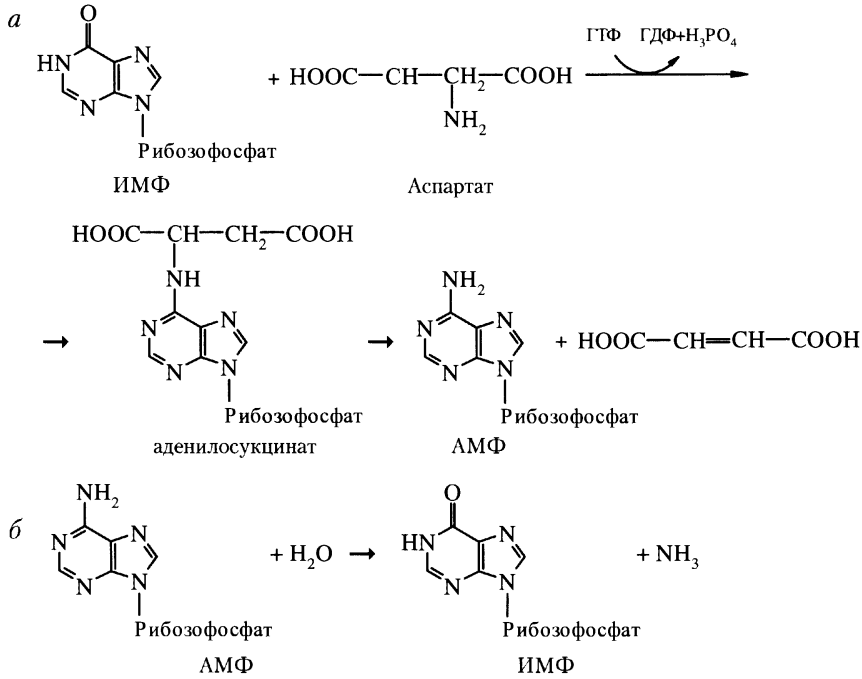


Рис. 11.7. Перенос аминогруппы с аспартата на ИМФ (*а*) и дезаминирование АМФ (*б*)

Дезаминирование гистидина, серина и треонина

Гистидин и серин могут дезаминироваться непрямым путем, но для каждой из этих аминокислот есть еще и другая возможность. Дезаминирование гистидина при действии гистидазы описано в гл. 2. Дезаминирование серина и треонина катализируется серин-треонин-дегидратазой. Реакция для серина представлена на рис. 11.8.

Лишь первая стадия (дегидратация) катализируется ферментом; две другие не нуждаются в катализаторе.

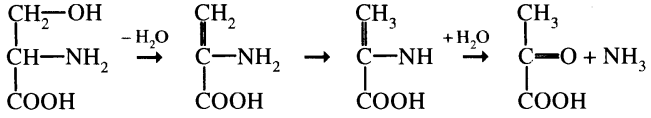


Рис. 11.8. Дезаминирование серина серин-треонин-дегидратазой

Дезаминирование треонина происходит аналогично. Напомним, что треонин не участвует в реакциях трансаминирования, а значит, не может дезаминироваться непрямым путем.

Оксидазы аминокислот

В печени и почках имеется оксидаза *L*-аминокислот, катализирующая окислительное дезаминирование многих аминокислот (реакция (б) проходит без участия фермента):

а

$$R-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH + O_2 \rightarrow R-\underset{\underset{NH}{\|}}{C}-COOH + H_2O_2$$

б

$$R-\underset{\underset{NH}{\|}}{CH}-COOH + H_2O \rightarrow R-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COOH + NH_3$$

Коферментом оксидазы *L*-аминокислот является ФМН, выполняющий роль переносчика водорода с аминокислоты на кислород. Этот фермент наиболее активен при pH = 10; скорость реакции *in vitro*, по-видимому, невелика, поскольку реакция среды в клетках близка к нейтральной.

Другая оксидаза аминокислот, тоже содержащаяся в печени и почках, дезаминирует лишь *D*-изомеры аминокислот. Поскольку содержание *D*-аминокислот в пище и в организме человека очень невелико, значение этого фермента остается неясным.

КАТАБОЛИЗМ АМИНОКИСЛОТ И ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ ИЗ АМИНОКИСЛОТ

Взрослый человек ежесуточно потребляет около 100 г аминокислот, поступающих с белками пищи. При азотистом равновесии такое же количество аминокислот распадается до конечных продуктов, выделяющихся из организма. Азот аминокислот превращается в мочевину — конечный продукт обмена азота. При этом половина выводимого азота проходит стадию превращения в аммиак, а другая половина включается в мочевину непосредственно из аминогрупп, не превращаясь в аммиак. И в том и в другом случае аминокислоты образуют безазотистые остатки, главным образом α-кетокислоты.

Безазотистые остатки большинства аминокислот при катаболизме проходят стадию образования пировиноградной кислоты (рис. 11.9). При этом некоторые аминокислоты превращаются в пируват непосредственно (аланин, цистеин, серин).

Другие аминокислоты проходят более длинный метаболический путь к пирувату: вначале они превращаются в промежуточные продукты цитратного цикла, а затем углерод аминокислот покидает цитратный цикл в составе оксалоацетата, который превращается в фосфоенолпируват, а затем в пируват. После окислительного декарбоксилирования пирувата оставшиеся углеродные атомы аминокислот (т. е. ацетильный остаток ацетил-КоА) вновь попадают в цитратный цикл, где и окисляются до CO_2.

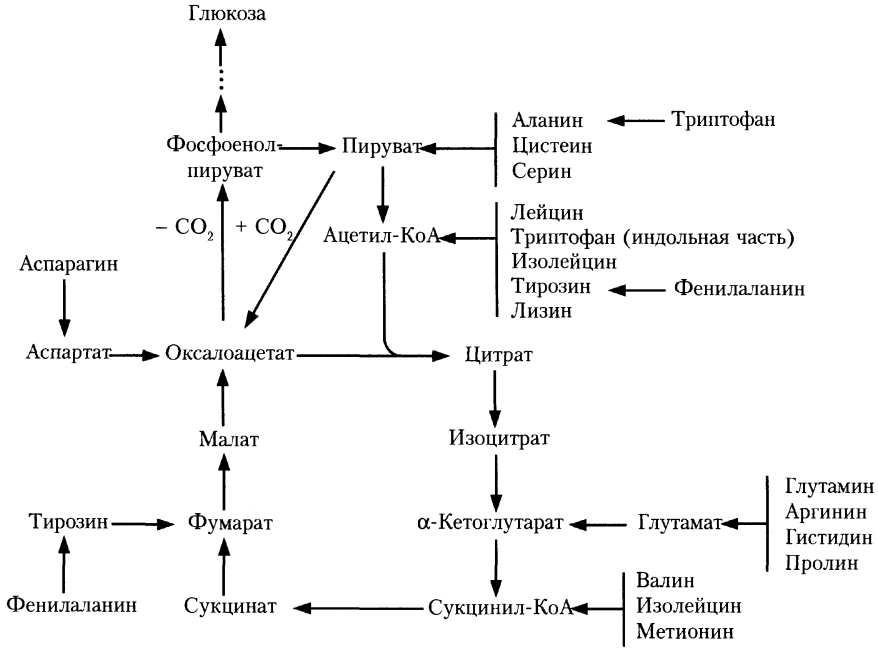


Рис. 11.9. Введение аминокислот в общий путь катаболизма и глюконеогенез

Предшественниками глюкозы при глюконеогенезе являются пируват, оксалоацетат и фосфоенолпируват. Поэтому аминокислоты, которые превращаются в эти соединения, могут быть использованы для синтеза глюкозы (глюконеогенез из аминокислот); такие аминокислоты называют *гликогенными*. Глюконеогенез с участием аминокислот происходит особенно активно при преимущественно белковом питании, а также при голодании. В последнем случае используются аминокислоты собственных белков тканей. Катаболизм лейцина и лизина не включает стадии образования пировиноградной кислоты; углеродная часть превращается непосредственно в ацетоуксусную кислоту и ацетил-КоА, из которых синтез углеводов невозможен: это *кетогенные аминокислоты*. Тирозин, фенилаланин, изолейцин и триптофан являются одновременно и гликогенными, и кетогенными: часть углеродных атомов их молекул при катаболизме образует пируват, другая часть включается в ацетил-КоА, минуя стадию пирувата.

СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ

Любая из заменимых аминокислот может синтезироваться в организме в необходимых количествах. При этом углеродная часть аминокислоты образуется из глюкозы, а аминогруппа вводится из других аминокислот путем трансаминирования.

Аланин, аспартат, глутамат образуются из пирувата, оксалоацетата и α-кетоглутарата соответственно. Глутамин образуется из глутаминовой кислоты при действии глутаминсинтетазы:

$$\text{Глутамат} + NH_3 + \text{АТФ} \rightarrow \text{Глутамин} + \text{АДФ} + H_3PO_4.$$

Аспарагин синтезируется из аспарагиновой кислоты и глутамина, который служит донором амидной группы; реакцию катализирует аспарагинсинтетаза (рис. 11.10). Пролин образуется из глутаминовой кислоты (рис. 11.11).

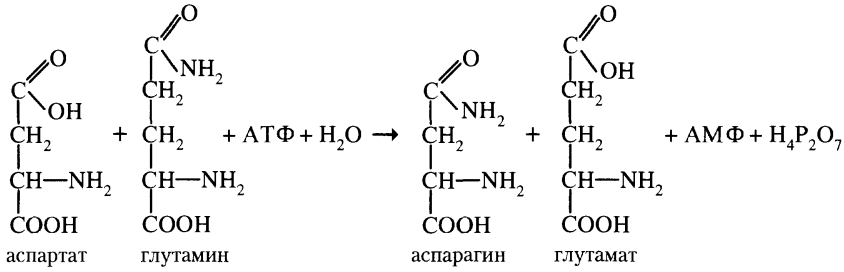


Рис. 11.10. Синтез аспарагина

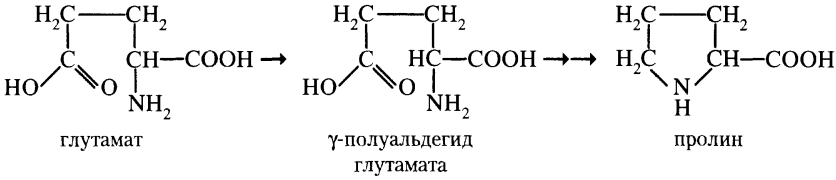


Рис. 11.11. Синтез пролина

Гистидин (частично заменимая аминокислота) синтезируется из АТФ и рибозы: пуриновая часть АТФ поставляет фрагмент —N=CH—NH— для имидазольного цикла гистидина; остальная часть молекулы образуется за счет рибозы. Синтез других заменимых аминокислот описан в последующих разделах этой главы.

Незаменимые аминокислоты

Аминокислоты, входящие в состав белков, можно разделить на следующие группы:

1. *Незаменимые:*
   - Валин;
   - Лейцин;
   - Изолейцин;
   - Треонин;
   - Метионин;
   - Фенилаланин;
   - Триптофан;
   - Лизин.
2. *Частично заменимые:*
   - Гистидин;
   - Аргинин.
3. *Условно заменимые:*
   - Цистеин;
   - Тирозин.

4. *Заменимые:*
   - Аланин;
   - Аспарагиновая кислота;
   - Аспарагин;
   - Глутаминовая кислота;
   - Глутамин;
   - Пролин;
   - Глицин;
   - Серин.

Если в пище нет заменимой аминокислоты, клетки синтезируют ее из других веществ, и тем самым поддерживается полный набор аминокислот, необходимый для синтеза белков. Если же отсутствует хотя бы одна из незаменимых аминокислот, то прекращается синтез белков. Это объясняется тем, что в состав подавляющего большинства белков входят все 20 аминокислот; следовательно, если нет хотя бы одной из них, синтез белков невозможен.

Частично заменимые аминокислоты синтезируются в организме, однако скорость их синтеза недостаточна для обеспечения всей потребности организма в этих аминокислотах, особенно у детей. Условно заменимые аминокислоты могут синтезироваться из незаменимых: цистеин — из метионина, тирозин — из фенилаланина. Иначе говоря, цистеин и тирозин — это заменимые аминокислоты при условии достаточного поступления с пищей метионина и фенилаланина.

Содержание незаменимых аминокислот определяет пищевую ценность продукта питания (пищевая ценность высока, если продукт содержит все незаменимые аминокислоты в необходимых для человека пропорциях). Такому требованию отвечают многие белки животных. Растительные белки часто содержат недостаточное количество незаменимых аминокислот, обычно лизина, метионина и триптофана, что снижает их пищевую ценность.

Незаменимые аминокислоты, за исключением лизина и треонина, участвуют в реакциях трансаминирования. Следовательно, при наличии соответствующих α-кетокислот они тоже могли бы синтезироваться в организме (кроме лизина и треонина). Незаменимы собственно α-кетокислоты, соответствующие незаменимым аминокислотам. Однако пища человека не содержит сколько-нибудь заметных количеств таких кетокислот, и их единственным источником служат незаменимые аминокислоты пищи. Из этого следует, что трансаминирование незаменимых аминокислот служит этапом только их катаболизма, а не синтеза, в отличие от заменимых аминокислот, для которых трансаминирование может быть начальной стадией катаболизма или конечной стадией синтеза.

СИНТЕЗ МОЧЕВИНЫ

Мочевина — главный конечный продукт обмена азота в организме: азот мочевины составляет около 90 % всего выводимого азота. Количество выделяемой мочевины зависит от количества аминокислот (белков), поступающих с пищей. Если в суточном рационе содержится 80–100 г белков, то за сутки образуется и выводится с мочой 25–30 г мочевины. Синтез мочевины происходит в печени. Это было

установлено в лаборатории И. П. Павлова в опытах по выключению печени из общего кровотока. Оказалось, что в этих условиях в крови и моче снижается концентрация мочевины и повышается концентрация аминокислот. Позднее роль печени в образовании мочевины была подтверждена и другими методами. Нарушение синтеза и выведения мочевины ведет к повышению концентрации аммиака в тканях и крови, что, в свою очередь, вызывает ряд других нарушений обмена веществ и физиологических функций.

Мочевина представляет собой довольно простое соединение — полный амид угольной кислоты $H_2N—CO—NH_2$. Однако синтез этого вещества в печени происходит в несколько стадий, образующих циклический процесс.

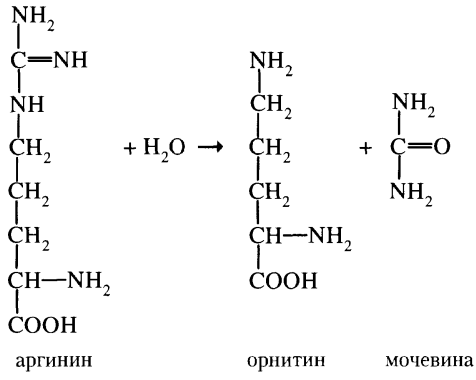


Рис. 11.12. Гидролиз аргинина

В 1903 г. немецкий химик Коссель открыл фермент *аргиназу*, катализирующий гидролиз аргинина с образованием орнитина и мочевины (рис. 11.12). Тогда же было высказано предположение, что эта реакция может быть конечной стадией синтеза мочевины в печени. Спустя 30 лет Кребс и Гензелейт в опытах на срезах печени обнаружили, что синтез мочевины ускоряется при добавлении в инкубационную среду орнитина. На этом основании они предположили существование циклического процесса, в котором орнитин, получающийся при распаде аргинина, затем вновь превращается в аргинин (орнитиновый цикл, цикл Кребса—Гензелейта). В последующие десятилетия были раскрыты остальные реакции цикла.

Один из двух атомов азота мочевины включается в нее за счет использования аммиака. При действии карбамоилфосфатсинтетазы I образуется карбамоилфосфат:

$$NH_3 + CO_2 + 2АТФ + H_2O \rightarrow H_2N—CO—OPO_3H_2 + 2АДФ + H_3PO_4.$$

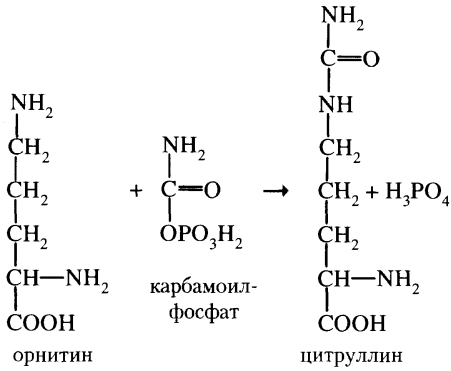


Рис. 11.13. Образование цитруллина

Карбамоильная группа далее переносится на орнитин с образованием цитруллина; реакцию катализирует орнитин-карбамоилтрансфераза (рис. 11.13). Эти две реакции происходят в митохондриях. Затем цитруллин переходит в цитозоль, где реагирует с аспарагиновой кислотой, превращаясь в аргинин-янтарную кислоту при действии аргининсукцинатсинтетазы (рис. 11.14).

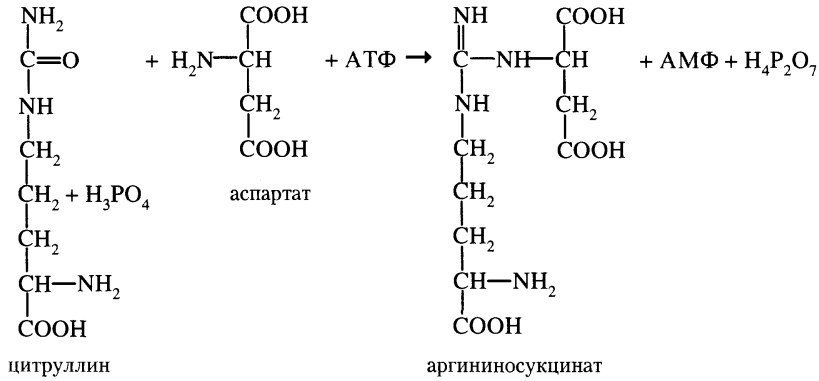


Рис. 11.14. Образование аргинин-янтарной кислоты

Аргининянтарная кислота при участии аргининсукциназы распадается на аргинин и фумаровую кислоту (рис. 11.15).

Далее аргинин гидролизуется аргиназой с образованием мочевины.

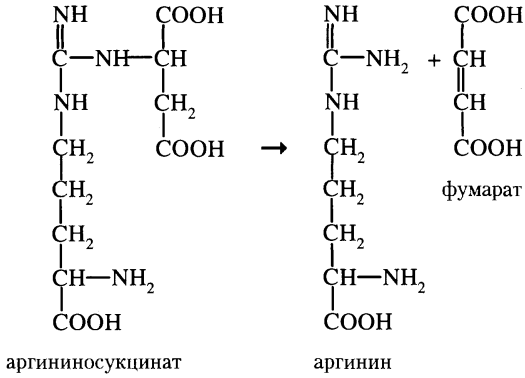


Рис. 11.15. Образование аргинина

Суммарное уравнение синтеза мочевины:

$$CO_2 + NH_3 + \text{Аспартат} + 3\text{АТФ} + 2H_2O = \text{Мочевина} + \text{Фумарат} +$$
$$+ 2\,(\text{АДФ} + H_3PO_4) + (\text{АМФ} + H_4P_2O_7).$$

Из уравнения видно, что один атом азота мочевины образуется за счет аммиака, а другой — за счет аминогруппы аспарагиновой кислоты. В целом орнитиновый цикл представлен на рис. 11.16.

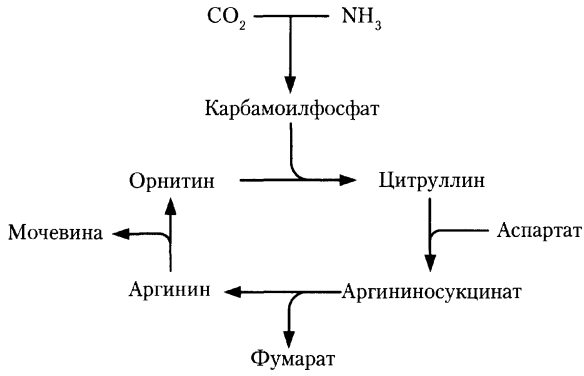


Рис. 11.16. Орнитиновый цикл

Полный набор ферментов орнитинового цикла есть только в гепатоцитах. Но отдельные из этих ферментов обнаруживаются и в других клетках. В энтероцитах, например, имеются два первых фермента, и, следовательно, может синтезироваться цитруллин. В почках имеются третий и четвертый ферменты цикла. Следовательно, цитруллин, образовавшийся в энтероцитах, с кровью может переноситься в почки и превращаться там в аргинин. Затем аргинин в печени гидролизуется аргиназой. Однако надо отметить, что активность этих рассеянных по разным органам ферментов значительно ниже, чем в печени.

На 1 моль синтезирующейся мочевины расходуется 3 моль АТФ. Эта затрата АТФ компенсируется тем, что образование аммиака происходит в глутаматдегидрогеназной реакции, где восстанавливается 1 моль НАД$^+$ (в расчете на 1 моль аммиака); последующий перенос водорода с НАД в дыхательной цепи обеспечивает синтез АТФ (до 3 моль).

Из суммарного уравнения видно, что на синтез 1 моля мочевины используется 1 моль аммиака и 1 моль аспарагиновой кислоты. При пересчете на весовые единицы получается, что для синтеза 25 г мочевины (среднесуточная величина у взрослого человека) необходимо 6,3 г аммиака и 50 г аспарагиновой кислоты. Орнитиновый цикл функционирует только в печени, а катаболизм аминокислот происходит и в других органах. Следовательно, должны существовать механизмы транспорта азота аминокислот в печень. Основными транспортными формами азота служат глутамин, аланин и аммиак.

Роль аланина

Значительная часть азота аминокислот переносится в печень из других органов в составе аланина. Многие органы выделяют в кровь аланин. Образование аланина в этих органах представлено на рис. 11.17. Аминогруппы разных аминокислот посредством реакций трансаминирования переносятся на пируват, источником которого служат глюкоза, а также безазотистые остатки аминокислот. Особенно много аланина содержится в крови, оттекающей от мышц и от кишечника. Из крови аланин извлекается в основном печенью и в гепатоцитах используется для синтеза аспарагиновой кислоты путем трансаминирования с оксалоацетатом.

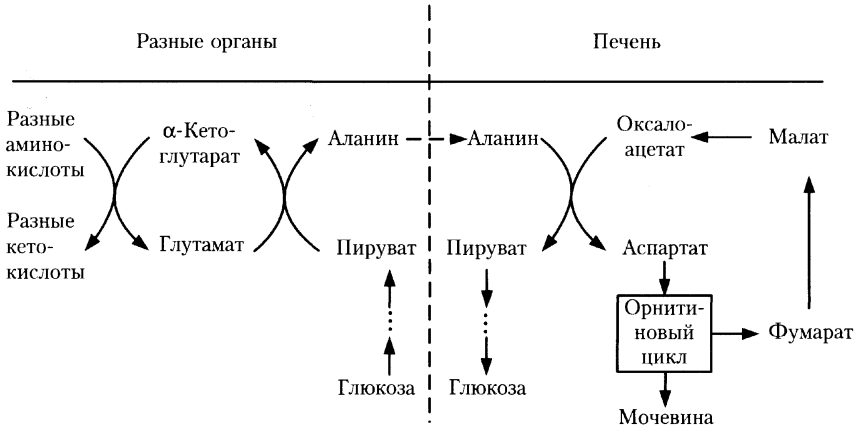


Рис. 11.17. Роль аланина в транспорте азота аминокислот для синтеза мочевины

Образование аланина в мышцах и его перенос в печень составляют часть глюкозо-аланинового цикла (см. рис. 9.22): пируват, образующийся в этом цикле в печени из аланина, используется для глюконеогенеза. Другой продукт реакции трансаминирования — аспартат — используется в орнитиновом цикле как донор аминогруппы и превращается в фумарат (см. рис. 11.17). Затем фумарат вновь превращается в аспартат с промежуточным образованием малата и оксалоацетата (две реакции цитратного цикла).

Таким путем аминогруппа любой аминокислоты (за исключением лизина и треонина) может включиться в мочевину. Если ввести в организм какую-либо меченную по азоту аминокислоту (^{15}N-аминокислоту), то метка (изотоп ^{15}N) очень скоро обнаруживается во всех аминокислотах, а также и в мочевине. Особенно активно метка включается в глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, аланин и мочевину. Этот опыт указывает на постоянный обмен аминогруппами между разными аминокислотами и на постоянный поток азота аминокислот в мочевину.

Роль глутамина и аммиака в синтезе мочевины

В результате дезаминирования аминокислот в разных органах образуется аммиак, котрый включается в глутамин при действии глутаминсинтетазы:

$$\text{Глутамат} + NH_3 + \text{АТФ} \rightarrow \text{Глутамин} + \text{АТФ} + H_3PO_4.$$

Глутаминсинтетаза обладает высоким сродством к аммиаку, и благодаря именно этой реакции в тканях поддерживается низкая концентрация аммиака. Концентрация аммиака в крови человека равна 0,05 ± 0,02 мг/дл, а концентрация глутамина — 7 ± 2 мг/дл, т. е. в 100 с лишним раз больше, чем аммиака. Поскольку аммиак токсичен для мозга, то синтез глутамина выступает как механизм обезвреживания аммиака. Но, кроме того, глутамин служит еще и транспортной формой аммиака (рис. 11.18). Многие органы выделяют глутамин в кровь, и в наибольшем количестве — мышцы. Глутамин из крови поглощается в основном клетками кишечника, в которых происходят следующие превращения:

1) Глутамин + H_2O → Глутамат + NH_3

2) Глутамат + Пируват → α-Кетоглутарат + Аланин

Глутамин + H_2O + Пируват → α-Кетоглутарат + NH_3 + Аланин

Первая реакция катализируется глутаминазой, вторая — аланинаминотрансферазой. Под чертой представлен суммарный результат реакций, который легко доказывается экспериментально путем измерения артериовенозной разницы концентраций веществ: в артериальной крови, питающей кишечник, больше глутамина и меньше аммиака и аланина, чем в крови воротной вены. Таким образом, в энтероцитах амидная группа глутамина превращается в аммиак, а аминогруппа глутамина — в аминогруппу аланина. В этом процессе используется пируват, расход которого пополняется за счет образования пирувата из α-кетоглутарата. Кроме того, окисление α-кетоглутарата служит основным источником энергии для синтеза АТФ в энтероцитах.

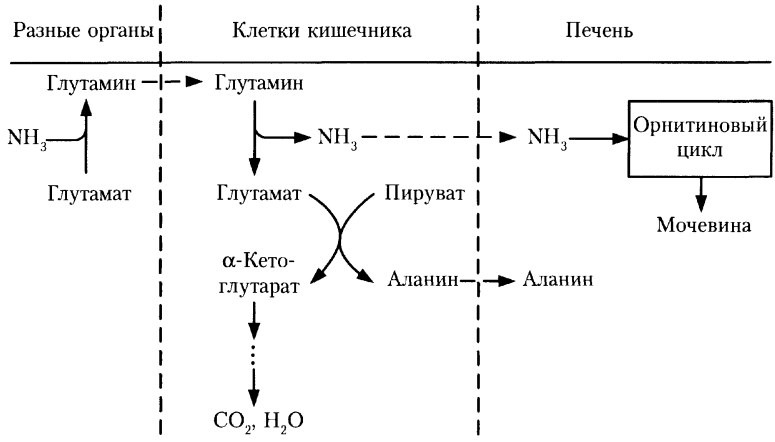


Рис. 11.18. Путь аммиака в мочевину

В кишечнике есть и другой источник аммиака — белки и аминокислоты люмена, из которых аммиак образуется в результате деятельности микрофлоры кишечника. Аммиак из люмена всасывается и тоже попадает в кровь воротной вены. Концентрация аммиака в крови воротной вены существенно больше, чем в общем кровотоке.

Аммиак и аланин извлекаются из крови воротной вены гепатоцитами и используются для синтеза мочевины. Основная часть аммиака для карбамоилфосфатсинтетазы поставляется именно из кишечника. Кроме того, аммиак может образоваться и в самих гепатоцитах путем дезаминирования аминокислот, а также гидролиза глутамина.

Таким образом, в обезвреживании аммиака и выведении азота участвуют многие органы. Особую роль в обмене аммиака выполняет глутаминсинтетаза: высокое сродство этого фермента к аммиаку обеспечивает поддержание концентрации аммиака в крови и тканях на низком, нетоксичном уровне.

Как мы видели, в орнитиновом цикле расходуется четыре макроэргических связи на каждый оборот цикла. Однако если рассматривать в целом процесс превращения аминокислот в безазотистые остатки и мочевину, то он, возможно, обеспечивает сам себя энергией. В самом деле, при регенерации аспартата из фумарата на стадии дегидрирования малата образуется НАДН, который может обеспечить синтез трех макроэргических связей. При окислительном дезаминировании глутамата в разных органах также образуется НАДН, соответственно — три макроэргических связи. Но аммиак, образующийся в этой реакции, обезвреживается при участии глутаминсинтетазы, что сопряжено с расходованием одной макроэргической связи.

Отметим также, что синтез и экскреция мочевины связаны с трансмембранным переносом веществ, требующим энергии. Первые две реакции орнитинового цикла происходят в митохондриях, а последующие три — в цитозоле. Это значит, что цитруллин, образующийся в митохондрии, должен быть перенесен в цитозоль, а орнитин, образующийся в цитозоле, должен быть перенесен в митохондрию. Кроме того, в почках перенос мочевины из крови в мочу происходит за счет градиента ионов натрия, создаваемого K,Na-АТФазой.

ОБМЕН АММИАКА

Главным источником аммиака в организме служит непрямое дезаминирование аминокислот с участием глутаматдегидрогеназы, а также дезаминирование в более сложном пути, включающем циклические превращения АМФ/ИМФ (см. рис. 11.6). Концентрация аммиака в жидкостях и тканях человека очень невелика; в крови обнаруживается 25–40 мкмоль/л (0,4–0,7 мг/л). Как уже упоминалось, низкая концентрация аммиака в тканях обеспечивается действием глутаминсинтетазы. Синтез глутамина происходит во многих органах и тканях, но особенно активно в мышцах, мозге, печени. При более высоких концентрациях аммиак токсичен: введение в кровь 50 мг аммиака (в форме соли аммония) убивает кролика.

Обезвреживание аммиака путем синтеза глутамина имеет и анаболическое значение, поскольку глутамин используется для синтеза ряда соединений. Прежде всего нужно отметить, что глутамин — одна из 20 аминокислот, входящих в белки. Кроме того, амидная группа глутамина используется для синтеза аспарагина, глюкозамина и других аминосахаридов, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Таким образом, в этих реакциях азот аммиака включается в разнообразные структурно-функциональные компоненты клетки.

Образование аммиака в почках

Аммиак в почках образуется главным образом из глутамина при действии глутаминазы и глутаматдегидрогеназы (рис. 11.19). Другой продукт этих реакций — α-кетоглутарат — используется почками как источник энергии.

Экскреция аммиака с мочой

В тканях аммиак находится преимущественно в виде иона аммония в равновесии с небольшой концентрацией неионизированного аммиака: $NH_4^+ \leftrightarrow NH_3 + H^+$.

Неионизированный аммиак проникает через клеточные мембраны путем простой диффузии, в то время как для иона аммония мембрана непроницаема.

В мембране почечных канальцев содержится белок, который по механизму антипорта перекачивает протоны из клетки в люмен канальца в обмен на ионы натрия, движущиеся в противоположном направлении (рис. 11.20). В люмене почечного канальца (т. е. уже в моче) аммиак акцептирует протон, образуя аммонийную соль. Поскольку гломерулярный фильтрат непрерывно течет в нисходящем направлении почечных канальцев и уносит NH_4^+ (а также NH_3 и H^+) из сферы реакций, то все реакции идут именно в том направлении, которое указано на рисунке.

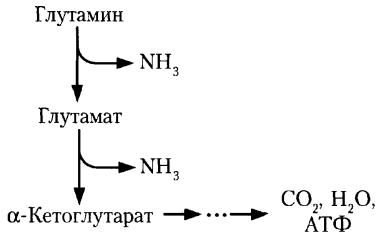


Рис. 11.19. Образование аммиака в почках

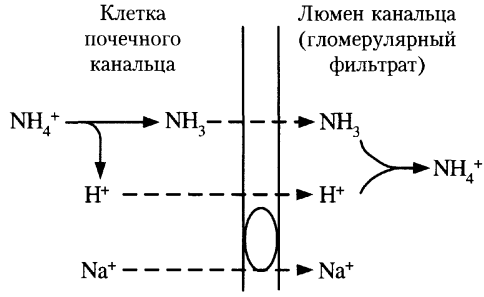


Рис. 11.20. Экскреция аммиака в почках

Экскреция аммиака с мочой в норме невелика — около 0,5 г в сутки. Но она в несколько раз повышается при ацидозе, т. е. при увеличении содержания кислот в организме — характерном симптоме ряда болезней. Кислоты, например угольная (H_2CO_3) или карбоновые кислоты (R-COOH), диссоциируют с образованием аниона и протона; повышение концентрации протонов и есть собственно ацидоз. А образование и экскреция аммиака почками представляют собой механизм экскреции протонов (в составе NH_4^+).

При ацидозе в почках включаются регуляторные механизмы (активация и индукция синтеза определенных ферментов, в частности глутаминазы, и др.), в результате которых увеличивается потребление глутамина клетками канальцев, ускоряется его катаболизм и, соответственно, повышается образование и выведение протонов в составе NH_4^+. Количество выводимого аммиака при ацидозе может достигать 10 г в сутки, т. е. в 20 раз больше, чем в норме.

Экскреция аммиака почками служит для выведения именно кислот, а не азота, на что указывает значительная скорость экскреции при ацидозе, малая скорость — при нормальной кислотности межклеточной жидкости и крови и отсутствие экскреции аммиака при алкалозе. Одновременно этот процесс обеспечивает сбережение организмом ионов Na^+, которые в отсутствие ионов аммония выводились бы с анионами кислот. Потеря таких количеств Na^+, которые необходимы для выведения кислот при ацидозе, могла бы вызвать снижение осмотического давления межклеточной жидкости и крови, а вследствие этого уменьшение объема межклеточной жидкости, т. е. обезвоживание тканей.

Образование и выведение солей аммония — не единственный механизм регуляции кислотно-щелочного и водно-солевого гомеостаза в организме (другие

механизмы описаны в гл. 14 и 21). Однако его нарушение может привести и к обезвоживанию организма в результате потери ионов натрия, и к ацидозу. Так бывает, например, при пиелонефрите с поражением той части паренхимы почек, где происходит образование и экскреция солей аммония.

Гипераммониемия

Орнитиновый цикл выполняет две функции: 1) превращение азота аминокислот в мочевину, которая экскретируется, и тем самым предотвращает накопление токсических продуктов, главным образом аммиака; 2) цикл включает реакции, необходимые для синтеза аргинина и пополнения его фонда в организме.

В орнитиновом цикле участвует пять ферментов; соответственно, известно пять типов наследственных болезней, связанных с недостаточностью какого-либо из этих ферментов. Первичное биохимическое следствие дефекта любого фермента — накопление предшественников субстрата поврежденного фермента. При дефекте аргиназы — последнего фермента цикла мочевины — накапливаются аргинин и предшествующие ему метаболиты; при дефекте аргининсукциназы накапливаются аргининянтарная кислота и предшествующие ей метаболиты и т. д. Недостаточность первого фермента цикла — карбамоилфосфатсинтетазы I — ведет к накоплению аммиака и его предшественников, т. е. аминокислот; из аминокислот накапливаются главным образом глутамин и аланин. Гипераммониемия и вызываемые ею явления — признак, общий для всех пяти типов наследственных нарушений орнитинового цикла, и притом наиболее опасный признак. Концентрация аммиака может превышать нормальную в 10–20 раз, концентрация глутамина — в 2–3 раза. Однако при дефекте пятого фермента — аргиназы — концентрации аммиака и глутамина повышаются в небольшой мере, но увеличивается концентрация аргинина и его производных, и клинические проявления существенно иные по сравнению с первыми четырьмя болезнями.

Повышение концентрации аммиака в крови может вызывать повторяющуюся рвоту, возбуждение, припадки с потерей сознания и судорогами. При хронической врожденной гипераммониемии наблюдается отставание умственного развития. Нарушение функционирования орнитинового цикла — главного пути удаления азота из организма — наиболее частая причина гипераммониемии.

Активность поврежденного фермента у разных больных может быть снижена в разной степени по сравнению с активностью у здоровых людей, вплоть до нуля. Гипераммониемия и накопление других предшественников тем больше, чем ниже активность дефектного фермента, и, кроме того, они пропорциональны потреблению белковой пищи. Соответственно, в разной степени выражены и другие симптомы гипераммониемии — от тяжелых нарушений обмена веществ и функций, которые приводят к летальному исходу вскоре после рождения, до таких, которые проявляются лишь тем, что индивиды не склонны к потреблению мясной и другой, богатой белками, пищи.

Точный диагноз типа гипераммониемии устанавливают путем определения метаболитов орнитинового цикла в крови или моче, а также путем измерения активности ферментов цикла в биоптате печени. Если гипераммониемия вызвана дефектом не карбамоилфосфатсинтетазы I, а любого другого из четырех

ферментов цикла, то в крови повышена концентрация производных пиримидина. Это связано с тем, что карбамоилфосфат, не используемый в этих условиях для синтеза мочевины, переходит в цитозоль и расходуется для синтеза пиримидинов (см. гл. 12).

У детей возникает иногда тяжелая гипераммониемия после острых респираторных заболеваний и вирусных инфекций. При этом обнаруживается снижение активности орнитинкарбамоилтрансферазы и карбамоилфосфатсинтетазы I в печени; по-видимому, синтез этих ферментов специфически нарушается вирусом. Мощность орнитинового цикла вследствие этого снижена; в сочетании с усиленным распадом белков, характерным для инфекционных болезней (катаболическое состояние), это ведет к накоплению аммиака.

В норме орнитиновый цикл функционирует примерно на 60 % своей полной мощности. Запас мощности необходим для того, чтобы не возникала гипераммониемия при неизбежных колебаниях количеств потребляемого белка. При циррозе печени в результате уменьшения массы паренхимы печени мощность орнитинового цикла снижена. В связи с этим у больных циррозом печени возникновение катаболических состояний (инфекционные болезни, массивные операции) также может приводить к гипераммониемии.

ОБМЕН СЕРИНА И ГЛИЦИНА. ОБРАЗОВАНИЕ ОДНОУГЛЕРОДНЫХ ГРУПП

В превращениях серина и глицина ключевую роль играют ферменты, кофактором которых служат производные фолиевой кислоты. Этот витамин широко

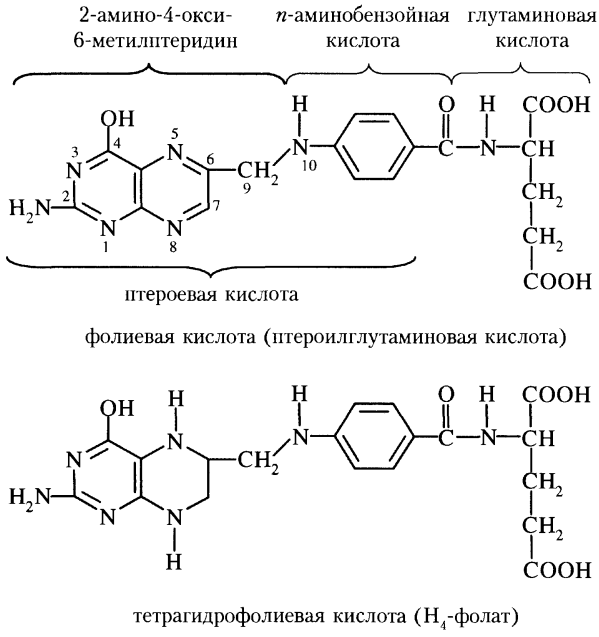


Рис. 11.21. Строение фолата и H_4-фолата

распространен в пищевых продуктах как животного, так и растительного происхождения (название витамина от лат. *folium* — лист). Коферментные формы фолиевой кислоты получаются после ее восстановления в тетрагидрофолиевую кислоту — H_4-фолат (рис. 11.21).

Серин — заменимая аминокислота, углеродная часть которой образуется из глюкозы (рис. 11.22). Метаболит глюкозы 3-фосфоглицерат дегидрируется, превращаясь в α-кетокислоту (3-фосфопируват). Затем реакции трансаминирования и гидролитического отщепления фосфата завершают синтез серина.

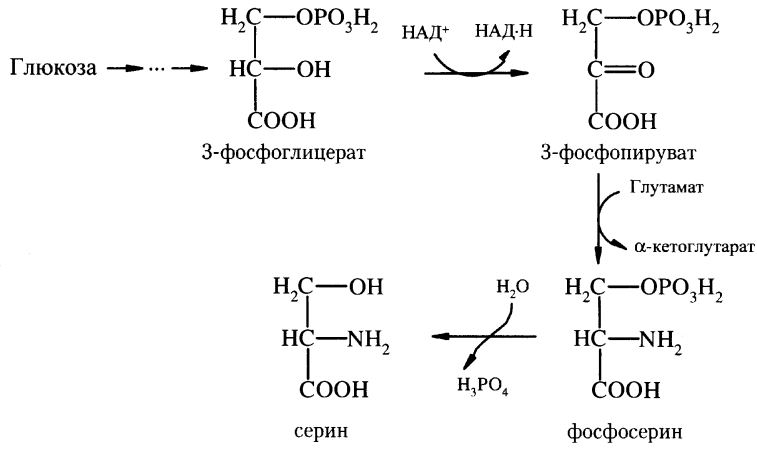
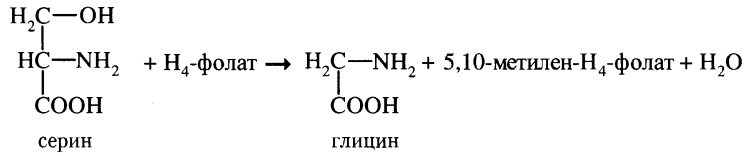


Рис. 11.22. Синтез серина

Из серина при действии серин-оксиметилтрансферазы получается глицин. Коферментом в этой реакции служит тетрагидрофолиевая кислота, которая акцептирует одноуглеродный фрагмент серина:



(*а*)

Строение образующейся в этой реакции 5,10-метилентетрагидрофолиевой кислоты представлено на рис. 11.23.

Распад глицина происходит также с участием H_4-фолата:

$$\text{Глицин} + H_4\text{-фолат} + \text{НАД}^+ \rightarrow CO_2 + NH_3 + \text{5,10-метилен-}H_4\text{-фолат} + \text{НАДН} + H^+ \qquad (б)$$

Физиологическое значение этих двух реакций с участием тетрагидрофолиевой кислоты заключается в том, что они служат для синтеза глицина (реакция *а*), катаболизма глицина (реакция *б*) и катаболизма серина (обе реакции вместе). Еще более широкое значение имеет то, что в этих реакциях образуется одноуглеродный (метиленовый) фрагмент. Метиленовая группа в молекуле 5,10-метилен-H_4-фолата может превращаться при действии специальных ферментов в другие одноуглеродные группы (рис. 11.24).

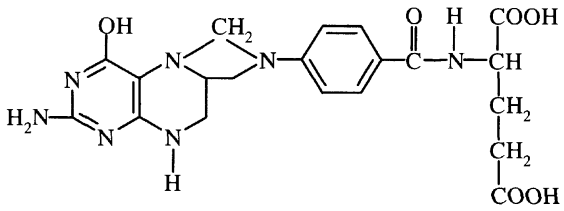


Рис. 11.23. Строение 5,10-метилентетрагидрофолиевой кислоты

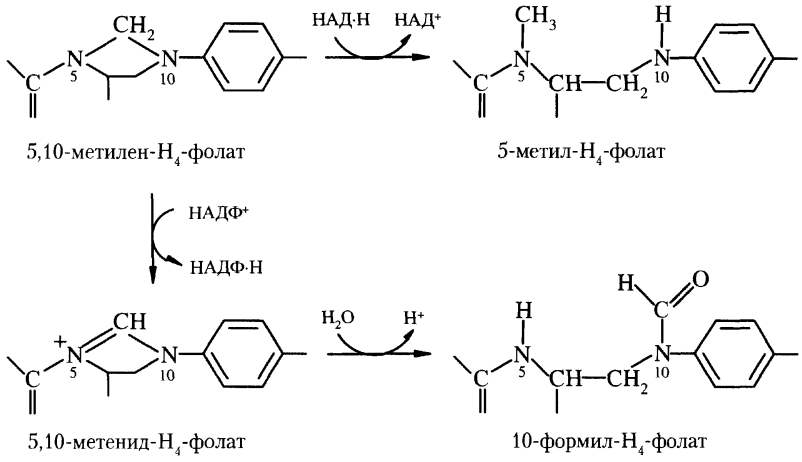


Рис. 11.24. Одноуглеродные фрагменты в составе производных тетрагидрофолиевой кислоты

Все эти производные тетрагидрофолиевой кислоты служат донорами одноуглеродных фрагментов при синтезе ряда соединений, в том числе тимидиловой кислоты, пуриновых нуклеотидов, метионина.

МЕТИОНИН И РЕАКЦИИ ТРАНСМЕТИЛИРОВАНИЯ

Метильная группа метионина — это тоже мобильный одноуглеродный фрагмент, который используется для метилирования большого числа разных соединений. Непосредственным донором метильной группы в реакциях трансметилирования служит производное метионина S-аденозилметионин, образующийся под действием метионин-аденозилтрансферазы из метионина и АТФ (рис. 11.25).

В качестве примера реакции трансметилирования укажем на синтез креатина. Это вещество играет важную роль в обеспечении работающей мышцы аденозинтрифосфатом. В синтезе креатина участвуют два органа — почки и печень (рис. 11.26). В почках образуется гуанидинуксусная кислота, которая с кровотоком транспортируется в печень, где, в реакции трансметилирования, превращается в креатин.

Другие примеры трансметилирования приведены в табл. 11.2. Одна из важных функций трансметилирования связана с метаболизмом и обезвреживанием чужеродных соединений, в том числе лекарств; эти реакции приводятся в гл. 19.

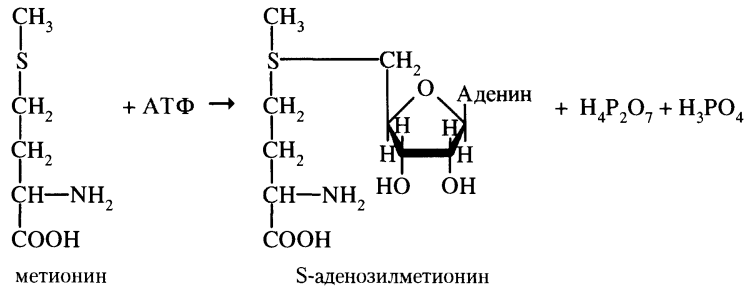


Рис. 11.25. Синтез S-аденозилметионина

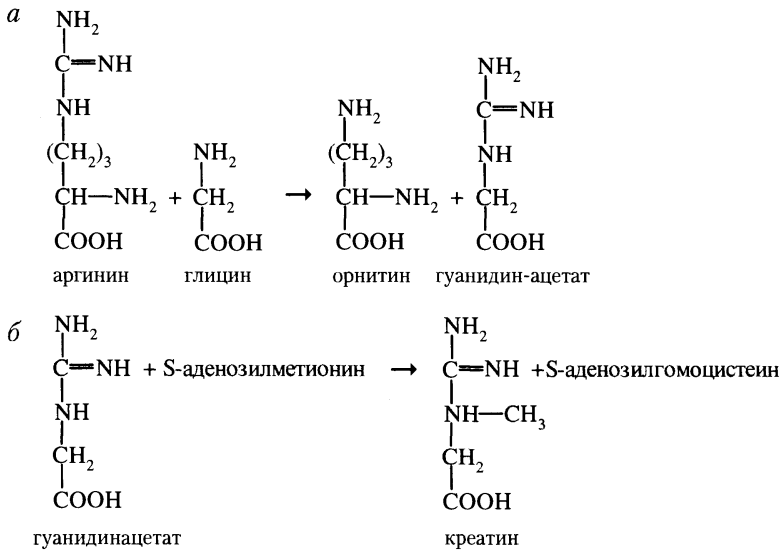


Рис. 11.26. Синтез креатина:

а — образование гуанидинацетата в почках; *б* — метилирование гуанидинацетата в печени

Таблица 11.2. Примеры трансметилирования с использованием метильной группы S-аденозилметионина

Субстрат	Продукт	Субстрат	Продукт
Норадреналин Адреналин Гуанидинацетат Карнозин N-Ацетил-5-окситриптамин	Адерналин Метадреналин Креатин Анзерин Мелатонин	Гистамин Фосфатидилэтаноламин Основания нуклеотидов в нуклеиновых кислотах	N-Метилгистамин Фосфатидилхолин Метилированные основания

Регенерация метионина

В реакциях трансметилирования наряду с метилированным продуктом образуется S-аденозилгомоцистеин. Это вещество при действии специфической гидролазы распадается на аденозин и гомоцистеин:

S-Аденозилгомоцистеин + H_2O → Аденозин + Гомоцистеин

Гомоцистеин может превращаться вновь в метионин в реакции трансметилирования с 5-метил-H_4-фолатом (рис. 11.27).

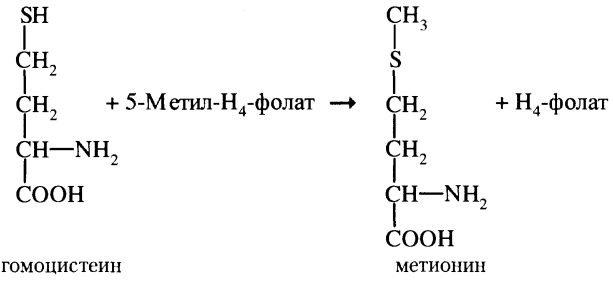


Рис. 11.27. Образование метионина из гомоцистеина

Промежуточным переносчиком метильной группы в этой реакции служит метилкобаламин, производное витамина B_{12}. Метионин — незаменимая для человека аминокислота. Учитывая возможности взаимопревращений метионина и гомоцистеина, в равной мере можно сказать, что незаменимым является и гомоцистеин. Однако единственный источник гомоцистеина в организме — это метионин. Содержание гомоцистеина в пище ничтожно, и потребности человека в метионине и гомоцистеине обеспечиваются именно метионином пищи.

Гомоцистеин используется также для синтеза цистеина: углеродная часть цистеина образуется из серина, а гомоцистеин поставляет атом серы. В качестве промежуточного продукта образуется цистатионин (рис. 11.28).

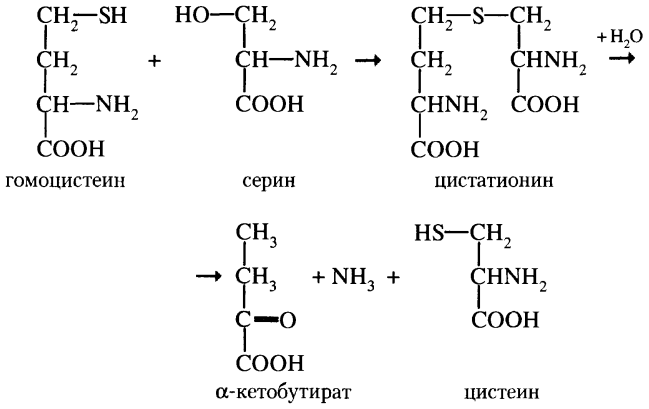


Рис. 11.28. Синтез цистеина

Цистатионин-β-синтаза и цистатионин-γ-лиаза, катализирующие эти реакции, содержат в качестве кофермента пиридоксальфосфат.

При нарушениях превращения гомоцистеина в метионин и цистеин в тканях и крови накапливается гомоцистин, образующийся из гомоцистеина (рис. 11.29).

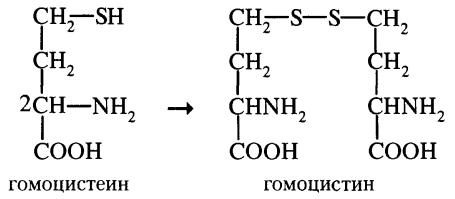


Рис. 11.29. Образование гомоцистина

Выделение гомоцистина с мочой (гомоцистинурия) — характерный симптом наследственной недостаточности ферментов, участвующих в обмене гомоцистеина, а также гиповитаминозов (недостаточность фолиевой кислоты, витамина B_{12}, витамина B_6).

НЕДОСТАТОЧНОСТЬ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

На рис. 11.30 представлен весь путь одноуглеродных групп от их первичного образования за счет углеродных атомов глюкозы до включения в конечные акцепторы. Наряду с серином, для превращения H_4-фолата в 5,10-метилен-H_4-фолат используется и глицин, образующийся из серина. Отметим, что 5,10-метенил-H_4-фолат и 10-формил-H_4-фолат являются донорами одноуглеродных фрагментов при синтезе нуклеотидов. Многообразие конечных акцепторов одноуглеродных групп и многообразие функций, выполняемых образующимися при этом веществами, определяют важность реакций синтеза и переноса одноуглеродных фрагментов.

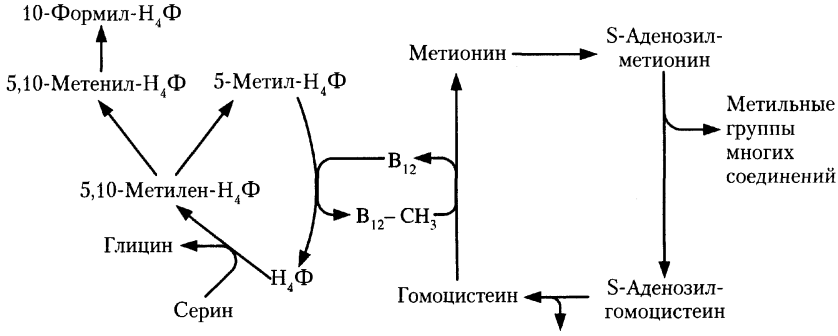


Рис. 11.30. Обмен одноуглеродных групп

При гиповитаминозе, связанном с недостаточностью фолиевой кислоты, обмен одноуглеродных групп нарушается. То же происходит и при дефиците витамина B_{12}, поскольку он участвует в одной из важных реакций, в которой регенерируются метионин и H_4-фолат (реакция превращения гомоцистеина в метионин).

Первым клиническим проявлением недостатка фолиевой кислоты является мегалобластная (макроцитарная) анемия.

Для этого заболевания характерно увеличение размеров эритроцитов, снижение количества эритроцитов в кровотоке, снижение концентрации гемоглобина

в крови. Такие же симптомы наблюдаются при злокачественной анемии (см. гл. 6), и причины их появления в обоих случаях сходны. Клетки кроветворной ткани относятся к быстроделящимся и поэтому особенно чувствительны к нарушениям синтеза нуклеиновых кислот, прежде всего синтеза ДНК. При недостаточности H_4-фолата возникает дефицит предшественников ДНК — тимидиловой кислоты и пуриновых нуклеотидов, нарушается метилирование нуклеиновых кислот и в конечном счете происходят изменения эритропоэза. Мегалобластная анемия почти всегда — результат недостаточности фолиевой кислоты (чаще всего) или витамина B_{12}, или того и другого вместе.

Суточная потребность взрослого человека в фолиевой кислоте составляет 0,1–0,5 мг. Основные источники витамина — свежие овощи и зелень, а также мясные продукты, особенно печень. Кроме того, фолиевая кислота синтезируется микроорганизмами кишечника. В организме взрослого человека содержится 7–12 мг фолиевой кислоты, из них больше половины — в печени.

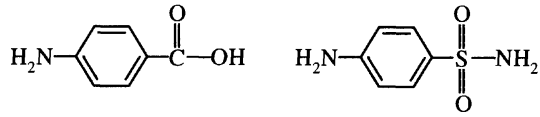
Фолиевая кислота широко распространена в обычных пищевых продуктах, и поэтому гиповитаминоз возникает сравнительно редко. Чаще всего причиной дефицита фолиевой кислоты бывает неправильное питание, когда пища содержит мало зеленых овощей и мясных продуктов; при этом одновременно с дефицитом фолиевой кислоты имеется и дефицит метионина, а также холина, что усугубляет нарушение обмена одноуглеродных фрагментов. Энтериты и другие заболевания кишечника, нарушающие всасывание, также могут привести к гиповитаминозу. При гепатите или циррозе печени гиповитаминоз может возникнуть вследствие снижения фолатредуктазной активности: в этом случае фолиевая кислота не превращается в коферментную форму — H_4-фолат. Нередко недостаточность фолиевой кислоты бывает при беременности как следствие увеличенной потребности в ней.

МЕХАНИЗМ БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СУЛЬФАНИЛАМИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Фолиевая кислота необходима и растениям, и животным, и микроорганизмам. В клетках растений это вещество синтезируется из других соединений, и они не нуждаются в его внешних источниках. Наоборот, для животных и человека фолиевая кислота — это незаменимый пищевой фактор, витамин. Среди микроорганизмов есть такие, которые способны синтезировать фолиевую кислоту, и есть такие, для которых она — тоже витамин. В клетках многих бактерий, в том числе болезнетворных, фолиевая кислота образуется, если бактерии получают из среды парааминобензойную кислоту — одну из составных частей фолиевой кислоты. Иначе говоря, для таких бактерий витамином является парааминобензойная кислота, которая в клетках бактерий служит основой для образования фолиевой кислоты и соответствующих коферментов.

Сульфаниламидные лекарственные препараты — это производные сульфаниламида (белого стрептоцида), который является структурным аналогом парааминобензойной кислоты (рис. 11.31).

При попадании в клетку бактерии сульфаниламидный препарат подавляет синтез фолиевой кислоты. Это происходит по двум причинам. Во-первых, сульфаниламиды ингибируют ферменты, субстратом которых при синтезе фолиевой кис-



парааминобензойная кислота сульфаниламид

Рис. 11.31. Строение парааминобензойной кислоты и сульфаниламида

лоты служит парааминобензойная кислота. Во-вторых, эти ферменты вследствие недостаточной субстратной специфичности могут использовать в качестве субстрата (псевдосубстрата) сульфаниламиды. При этом синтезируется не фолиевая кислота, а ее аналог, содержащий сульфаниламидный компонент вместо остатка парааминобензойной кислоты; такое соединение не способно выполнять коферментные функции. В результате в бактериальной клетке возникает недостаточность фолиевой кислоты, нарушаются все реакции, в которых она участвует, и размножение бактерий становится невозможным. С другой стороны, в организме человека сульфаниламиды не вызывают таких изменений, поскольку человек получает с пищей готовую фолиевую кислоту, и процессы синтеза, на которые действуют сульфаниламиды, в клетках человека не происходят.

Современная медицина использует большое количество сульфаниламидных бактериостатических лекарств для лечения разнообразных инфекционных болезней. Со времени внедрения этих лекарств в лечебную практику (40-е годы XX в.) многие болезни, такие, как крупозная пневмония, раневые инфекции и другие, перестали быть сложной проблемой для врача. Открытие сульфаниламидных лекарств — одно из величайших достижений медицины за всю ее историю. Несколько позднее широкое применение в медицине нашли антибиотики, которые оказались столь же эффективными противобактериальными средствами. Лекарства этих двух групп часто используются комбинированно, т. е. их назначают одновременно или последовательно.

ОБМЕН ФЕНИЛАЛАНИНА И ТИРОЗИНА

Фенилаланин — это незаменимая аминокислота, а тирозин — условно заменимая, поскольку образуется в организме из фенилаланина. Обе эти аминокислоты в достаточных количествах содержатся в пищевых белках, в том числе растительных. Основная масса фенилаланина расходуется по двум путям: включается в белки и превращается в тирозин. Обмен тирозина значительно сложнее: кроме использования для синтеза белков он служит предшественником катехоламинов, меланина, тироксина, а также может подвергаться катаболизму до CO_2 и H_2O.

Катаболизм фенилаланина и тирозина

Специфической частью катаболизма этих аминокислот является серия реакций, завершающаяся образованием фумарата и ацетоацетата (рис. 11.32).

Превращение фенилаланина в тирозин скорее нужно для удаления избытка фенилаланина, чем для образования тирозина, поскольку недостатка в последнем обычно не бывает. Эта реакция катализируется ферментом фенилаланингидроксилазой.

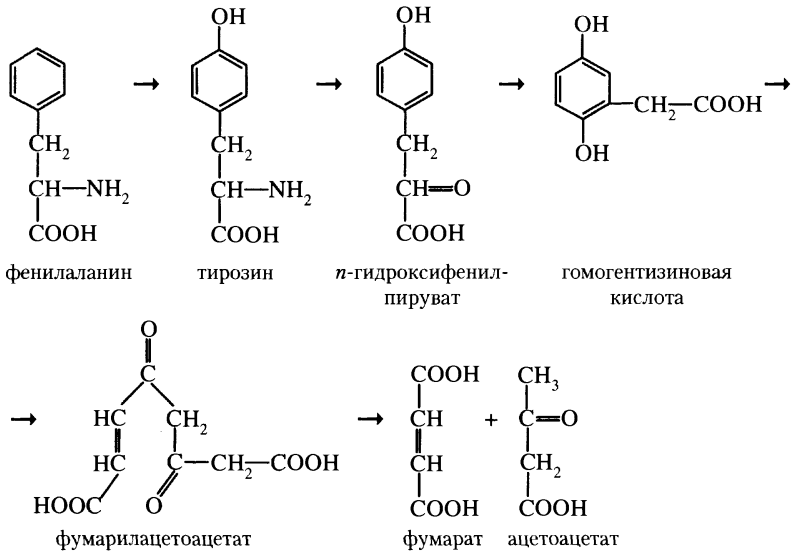


Рис. 11.32. Катаболизм фенилаланина и тирозина

В генофонде человека имеются аллельные гены фенилаланингидроксилазы, кодирующие неактивные варианты фермента. В гетерозиготном состоянии эти аллели обнаруживаются примерно у 2 % людей, но фенотипически обычно не проявляются, поскольку синтез активного фермента обеспечивается нормальным аллелем. У гомозиготных индивидов фенилаланингидроксилазной активности в тканях не обнаруживается (или она очень низка), в результате возникает блок реакции превращения фенилаланина в тирозин. Этот дефект метаболизма проявляется как болезнь *фенилкетонурия.* Концентрация фенилаланина в тканях больного повышается в десятки раз; его содержание в крови достигает 10–80 мг/дл (в норме 1–4 мг/дл). В этих условиях значительная часть фенилаланина превращается в фенилпировиноградную и фенилмолочную кислоты (рис. 11.33), которые в норме почти не образуются.

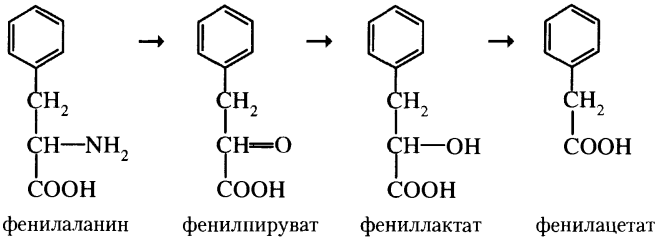


Рис. 11.33. Превращения фенилаланина при фенилкетонурии

Все эти соединения выделяются с мочой больного. Наиболее тяжелое проявление фенилкетонурии — резкое нарушение умственного и физического развития (в 10 лет ребенок не ходит, знает всего несколько слов). Вероятно, эти нарушения связаны с токсическим действием высоких концентраций фенилаланина.

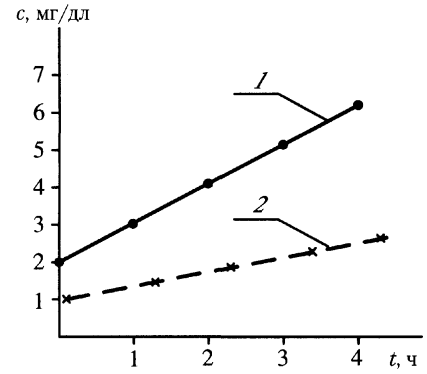


Рис. 11.34. Изменение концентрации тирозина в крови при фенилаланиновой нагрузке в норме (*1*) и при гетерозиготном носительстве гена фенилкетонурии (*2*)

При диете, содержащей мало фенилаланина, его концентрация в крови больных снижается, и развитие симптомов болезни замедляется. Если такое лечение начато сразу после рождения ребенка, повреждение мозга в значительной мере предотвращается.

Гетерозиготных носителей гена фенилкетонурии можно обнаружить с помощью теста толерантности к фенилаланину. Для этого обследуемому дают натощак около 10 г фенилаланина (обычно размешанного во фруктовом соке). Затем через часовые интервалы берут пробы крови, в которых определяют концентрацию тирозина. В норме концентрация тирозина в крови после фенилаланиновой нагрузки значительно выше, чем у гетерозиготных носителей гена фенилкетонурии (рис. 11.34). Тест толерантности к фенилаланину используется в генетической консультации для определения риска рождения больного ребенка: если оба брачных партнера являются носителями гена фенилкетонурии, вероятность рождения такого ребенка равна 1:4.

Наследственная болезнь *алкаптонурия*, связанная с блоком катаболизма тирозина на стадии гомогентизиновой кислоты, описана в гл. 4.

Синтез катехоламинов

В мозговом веществе надпочечников и в нервной ткани тирозин служит предшественником катехоламинов, важнейшими из которых являются дофамин, норадреналин и адреналин (рис. 11.35).

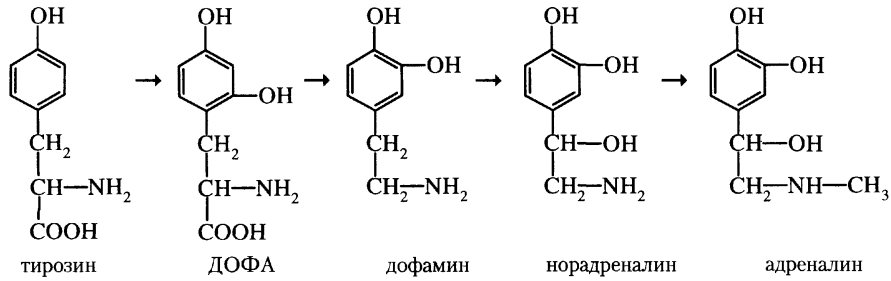


Рис. 11.35. Синтез катехоламинов

Дофамин и норадреналин выполняют функции медиаторов в синаптической передаче нервного импульса; адреналин — это гормон мозгового вещества надпочечников, который, в частности, стимулирует мобилизацию депонированных углеводов и жиров.

Инактивация катехоламинов происходит в основном двумя путями. Первый путь — метилирование по гидроксильной группе в третьем положении; донором метильной группы служит S-аденозилметионин (фермент катехол-О-метилтрансфераза). Второй путь связан с дезаминированием катехоламинов при действии мономаиноксидазы: в результате дезаминирования катехоламин превращается в катехолимин, который спонтанно гидролизуется с образованием альдегида и аммиака:

$$R{-}CH_2{-}NH_2 + O_2 \rightarrow R{-}CH{=}NH + H_2O_2 \qquad R{-}CH{=}NH + H_2O_2 \rightarrow R{-}\overset{\overset{\displaystyle H}{|}}{C}{=}O + NH_3$$

Таким образом, моноаминоксидаза катализирует дегидрирование амина, причем акцептором водорода служит кислород; пероксид водорода затем разрушается каталазой.

Синтез меланинов

В пигментных клетках (меланоцитах) тирозин служит предшественником темноокрашенных пигментов меланинов (от греч. *melas* — черный). При действии тирозиназы тирозин окисляется в ДОФА, из которого в результате ряда реакций окисления и полимеризации образуются эумеланины — черно-коричневые пигменты. Из соединения ДОФА с цистеином (цистеинил-ДОФА) получаются феомеланины, имеющие цвет от желтого до красного:

$$\begin{array}{ccccc} \text{Тирозин} & \rightarrow & \text{ДОФА} & \rightarrow & \text{Цистеинил-ДОФА} \\ \downarrow & & & & \downarrow \\ \text{Эумеланины} & & & & \text{Феомеланины} \end{array}$$

Меланины представляют собой группу полимерных соединений с неупорядоченной структурой. Цвет кожи зависит от количества и распределения меланоцитов и содержания меланинов в них. Меланины имеются также в сетчатке глаз.

Меланины поглощают свет видимой и особенно ультрафиолетовой области. Поглощенная энергия рассеивается в виде теплоты, в частности, за счет использования в обратимых окислительно-восстановительных реакциях хинон-гидрохиноновых структур.

Врожденное отсутствие тирозиназы в меланоцитах или отсутствие самих меланоцитов проявляется как *альбинизм*. Для этой болезни характерны отсутствие пигментации кожи и волос, светобоязнь, сниженная острота зрения.

ОБМЕН ГИСТИДИНА

Катаболизм гистидина происходит путем его дезаминирования с образованием уроканиновой кислоты, которая затем в серии реакций превращается в аммиак, одноуглеродный фрагмент, соединенный с тетрагидрофолиевой кислотой, и глутаминовую кислоту. Физиологически важный путь превращений гистидина связан с его декарбоксилированием и образованием гистамина (рис. 11.36).

Дезаминирование гистидина катализируется гистидазой, которая содержится в печени и в коже; уроканиновая кислота превращается в имидазолонпропионовую

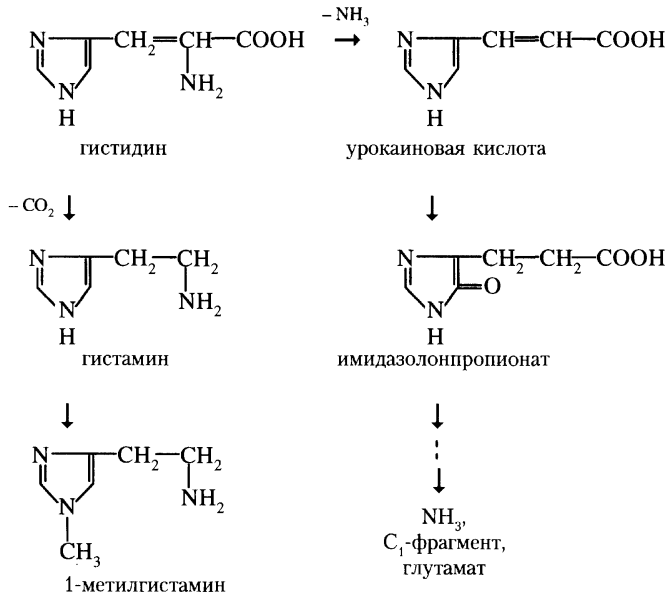


Рис. 11.36. Обмен гистидина

кислоту при действии уроканиназы, которая содержится только в печени. Оба эти фермента появляются в крови при заболеваниях печени, и измерение их активности используется для диагностики. Известна наследственная болезнь *гистидинемия*, связанная с дефектом гистидазы; для нее характерны повышенное содержание гистидина в тканях и нарушения физического и умственного развития.

Декарбоксилирование гистидина происходит при участии *гистидиндекарбоксилазы*, главным образом в тучных клетках, которые имеются в соединительной ткани практически всех органов. Гистамин накапливается и хранится в этих клетках в связанном с белками состоянии в специальных секреторных гранулах. Он может освобождаться в межклеточную среду и попадать в кровь при самых разнообразных воздействиях — при ударе, ожоге, электрическом раздражении, при действии многих эндогенных веществ. Гистамин обладает сильной и многообразной физиологической активностью. При введении гистамина в кровь наблюдаются следующие явления:

1. Расширяются артериолы и капилляры (в том числе в коже, возникает покраснение); в результате этого снижается кровяное давление.
2. Повышается проницаемость капилляров, жидкость из крови выходит в межклеточную среду, что приводит к уменьшению объема крови — еще одна причина снижения кровяного давления.
3. Расширение сосудов и выход жидкости из крови в головном мозге приводит к повышению внутричерепного давления и головной боли.
4. Сокращаются гладкие мышцы легких, что проявляется как приступ удушья.
5. Стимулируется секреция желудочного сока и слюны.

После введения гистамина все эти явления сильно выражены, имеют патологический характер; при достаточно большой дозе гистамина (для морской свинки примерно 1 мг) возникает опасный гистаминовый шок.

Предполагается, что в норме гистамин участвует в регуляции тех же систем, но изменения его концентрации, а соответственно и функций органов происходят в узких пределах, необходимых для сохранения гомеостаза или для адаптации к изменившимся условиям.

При попадании в организм некоторых антигенов (белковой, полисахаридной природы, ряда лекарств) возникает особое сенсибилизированное состояние организма — гиперчувствительность немедленного типа. Повторное попадание в организм того же антигена в течение нескольких минут приводит к развитию острой реакции, которая представляет собой почти точную копию гистаминового шока (анафилактические и аллергические реакции). Механизм этих реакций включает освобождение гистамина из тучных клеток, которое происходит в результате взаимодействия антиген—антитело на поверхности клеток.

Гистамин, освободившийся из тучных клеток в результате локального воздействия (удар, ожог и др.), не попадает в значительных количествах в кровь и вызывает только местную реакцию. При внутрикожном введении гистамина возникают краснота, локальное повышение температуры, отек, боль, т. е. характерные признаки воспаления. Это указывает на то, что гистамин участвует в развитии воспалительной реакции (см. также гл. 13). Инактивация гистамина происходит путем его метилирования; 1-метилгистамин выводится из организма с мочой.

Гистамин применяют при исследовании секреторной функции желудка (см. выше): если слизистая желудка не отвечает на введение гистамина усилением секреции, то это указывает на грубые повреждения секреторных клеток (атрофические гастриты).

НАСЛЕДСТВЕННЫЕ НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА АМИНОКИСЛОТ

Выше уже были описаны некоторые наследственные дефекты обмена аминокислот; в табл. 11.3 приведен более широкий перечень таких болезней, но далеко не исчерпывающий. Для многих из них описаны формы, различающиеся по клиническим проявлениям, в том числе по тяжести. Последнее указывает на то, что число аллельных вариантов соответствующего гена в генофонде человека больше двух. Многие наследственные нарушения обмена аминокислот, как и других соединений, приводят к нарушениям развития и функций мозга; причины этого пока неизвестны.

Таблица 11.3. Наследственные нарушения обмена аминокислот

Болезнь	Дефектный фермент или транспортная система	Основные проявления
Гиперглицинемия	Глицинрасщепляющий фермент	Резкое повреждение мозга, судороги, гипотония, нарушение дыхания
Гомоцистинурия	1. Цистатионин-β-синтаза	Высокая концентрация гомоцистина и метионина в тканях; нарушение умственного развития и развития скелета

Продолжение табл. 11.3

Болезнь	Дефектный фермент или транспортная система	Основные проявления
Гомоцистинурия	2. Метилентетрагидрофолатредуктаза 3. Фермент, превращающий витамин B_{12} в метилкобаламин, или белки, транспортирующие витамин B_{12} из кишечника в кровь	Высокая концентрация гомоцистина, нормальная — метионина; нарушение умственного развития Высокая концентрация гомоцистина, низкая — метионина; пенициозная анемия
Цистиноз	Транспорт или восстановление цистина	Внутриклеточное накопление цистина, часто образующего кристаллы в лизосомах. Нарушение роста. Нарушения функции почек
Цистинурия	Нарушение реабсорбции цистеина лизина, аргинина и орнитина в почках	Значительная экскреция с мочой всех названных аминокислот; цистиновые камни в мочевых путях
Аспартат-глутаматурия	Транспорт аспартата и глутамата в почках	Бессимптомна
Формиминоглутаматурия	Печеночная глутамат-формиминотрансфераза	Гиперкинезия, нарушение развития речи
Гипервалинемия	Валинаминотрансфераза	Нарушение физического и умственного развития, частая рвота
Болезнь кленового сиропа	Декарбоксилаза α-кетокислот с разветвленной углеродной цепью	Истощение, неврологические нарушения. Моча имеет запах кленового сиропа. Высокая концентрация лейцина, изолейцина, валина и соответствующих α-кетокислот в крови и моче
Синдром нарушения всасывания лизина	Транспорт лизина в кишечнике и почках	Нарушение физического и умственного развития. Увеличенная экскреция лизина с мочой, низкая концентрация лизина в крови
Гипераммониемия	Карбамоилфосфатсинтетаза I	Непереносимость белковой пищи, рвота, судороги, кома
Гипераммониемия	Орнитин-карбамоилтрансфераза	Рвота, головные боли, судороги, кома. Выделение оротовой кислоты с мочой
Цитруллинемия	Аргининсукцинатсинтетаза	Высокая концентрация цитруллина в крови и моче. Гипераммониемия разной степени
Аргининсукцинатурия	Аргининсукциназа	Высокая концентрация аргининсукцината в крови и моче. Судороги, нарушение умственного развития. Нарушение развития волос
Гипераргининемия	Аргиназа	Нарушение умственного развития, судороги
Лизинурическая непереносимость белков	Транспорт лизина, орнитина и аргинина в почках, кишечнике и через мембрану гепатоцитов	Понос, рвота, гипераммониемия после приема белковой пищи. Нерасположение (или отвращение) к белковой пище. Высокая концентрация лизина, аргинина и орнитина в моче, низкая — в крови

Продолжение табл. 11.3

Болезнь	Дефектный фермент или транспортная система	Основные проявления
Альбинизм	Тирозиназа	Нарушено образование меланина. Чувствительность к солнечному облучению. Снижение остроты зрения
Алкаптонурия	Диоксигеназа гомогентизиновой кислоты	Выделение с мочой гомогентизиновой кислоты, охроноз, артриты
Тирозинемия	Тирозинаминотрансфераза	Нарушение умственного развития, гиперкератоз ладоней и подошв, помутнение роговицы
Фенилкетонурия	1. Гидроксилаза фенилаланина 2. Дигидроптеридинредуктаза 3. Дигидробиоптеринсинтетаза	Симптомы — см. раздел об обмене фенилаланина и тирозина То же То же
Гистидинемия	Гистидаза	Высокая концентрация гистидина в крови и моче. Разной степени нарушения умственного развития и речи. Иногда бессимптомна
Гистидинурия	Транспорт гистидина в почках и кишечнике	Высокая концентрация гистидина в моче, нормальная — в крови. Может быть отставание умственного развития
Уроканатурия	Уроканаза	Нарушение умственного развития

Глава 12

ОБМЕН И ФУНКЦИИ НУКЛЕОТИДОВ

В предыдущих разделах уже были описаны многие функции нуклеотидов. Основные из них следующие:

1. Мононуклеотиды служат предшественниками и структурными компонентами нуклеиновых кислот.
2. Цикл АДФ-АТФ участвует в трансформации энергии окисления веществ в энергию, используемую в эндергонических процессах организма. В некоторых реакциях аналогичную роль могут выполнять и другие нуклеотиды.
3. Остаток адениловой кислоты входит в состав коферментов дегидрогеназ (НАД, НАДФ, ФАД) и кофермента ацилирования (КоА); УТФ, ГТФ и ЦТФ выполняют роль коферментов в реакциях переноса моносахаридных остатков; ЦТФ служит коферментом холинтрансферазы.
4. Циклические мононуклеотиды 3′,5′-цАМФ и 3′,5′-цГМФ являются посредниками при передаче гормональных и других сигналов на внутриклеточные эффекторные системы.

Практически все клетки организма способны к синтезу нуклеотидов. Кроме того, источниками нуклеотидов служат нуклеиновые кислоты пищи и собственных тканей организма, однако эти источники имеют второстепенное значение.

Нуклеиновые кислоты пищи в кишечнике гидролизуются под действием нуклеаз панкреатического сока — ДНКазы и РНКазы. Продуктами гидролиза являются мононуклеотиды (мононуклеозидфосфаты) и олигонуклеотиды. Фосфодиэстеразы кишечника расщепляют олигонуклеотиды до мононуклеотидов. Последние при участии фосфатаз гидролизуются с образованием нуклеозида и фосфорной кислоты; частично это происходит в просвете кишечника, частично же — в клетках кишечника после всасывания в них мононуклеотидов.

БИОСИНТЕЗ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

В экспериментах с мечеными веществами еще в 50-е годы XX в. было выяснено происхождение атомов пуринового ядра пуриновых нуклеотидов. Оказалось, что

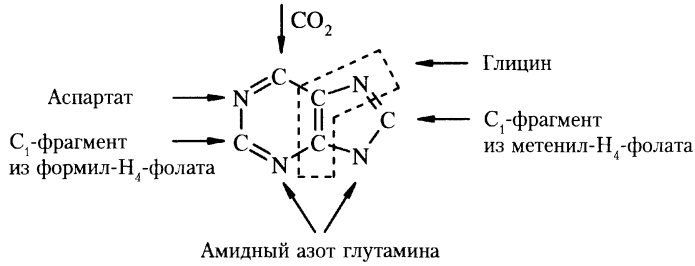


Рис. 12.1. Происхождение атомов пуринового ядра нуклеотидов

пуриновая структура образуется из мелких фрагментов, поставляемых разными соединениями (рис. 12.1).

Позднее была изучена вся последовательность реакций, ведущих к пуриновым нуклеотидам. Синтез начинается с превращения рибозо-5-фосфата в 5-фосфорибозил-1-пирофосфат (ФРПФ) (рис. 12.2). Затем остаток пирофосфата ФРПФ замещается аминогруппой в реакции с глутамином (используется амидная группа глутамина), и образуется 5-фосфорибозил-1-амин. Азот аминогруппы 5-фосфорибозил-1-амина — это первый атом будущего пуринового цикла. Далее в серии реакций к аминогруппе присоединяются другие атомы, доноры которых указаны на рис. 12.1, и образуется инозиновая кислота (ИМФ).

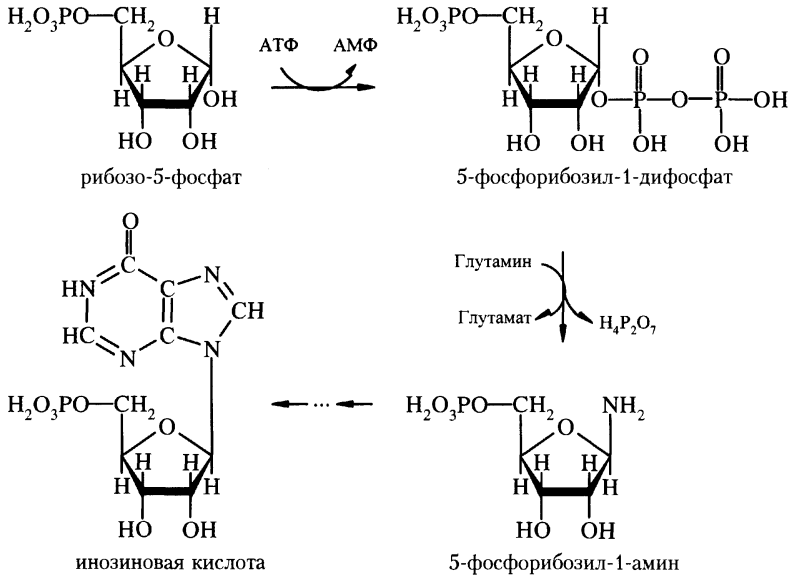


Рис. 12.2. Образование 5-фосфорибозил-1-амина

Инозиновая кислота — это нуклеотид, пуриновая часть которого представлена гипоксантином; она встречается в составе тРНК в качестве одного из минорных нуклеотидов. Кроме того, инозиновая кислота служит предшественником

основных пуриновых нуклеотидов — АМФ и ГМФ, схема синтеза которых представлена на рис. 12.3. При действии специфических киназ эти нуклеозидмонофосфаты превращаются в нуклеозиддифосфаты и нуклеозидтрифосфаты.

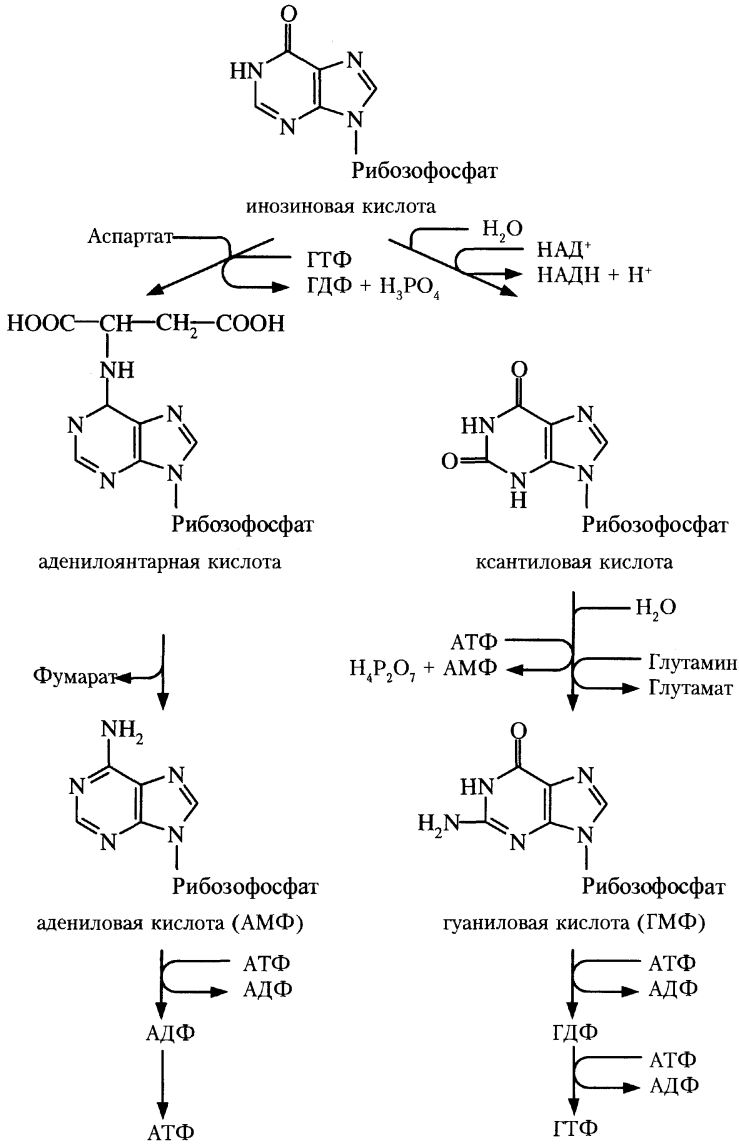


Рис. 12.3. Синтез адениловых и гуаниловых нуклеотидов

Регуляция синтеза пуриновых нуклеотидов

Реакции образования фосфорибозилпирофосфата и 5-фосфорибозиламина ингибируют АМФ и ГМФ, причем не по отдельности, а только при одновременном

повышении их концентрации (рис. 12.4). Эту реакцию ингибирует также и ИМФ. Кроме того, эта метаболическая цепь регулируется в месте ее разветвления: АМФ ингибирует реакцию образования аденилсукцината, а ГМФ — реакцию образования ксантиловой кислоты. В целом механизм регуляции обеспечивает поддержание необходимой скорости синтеза каждого из нуклеотидов.

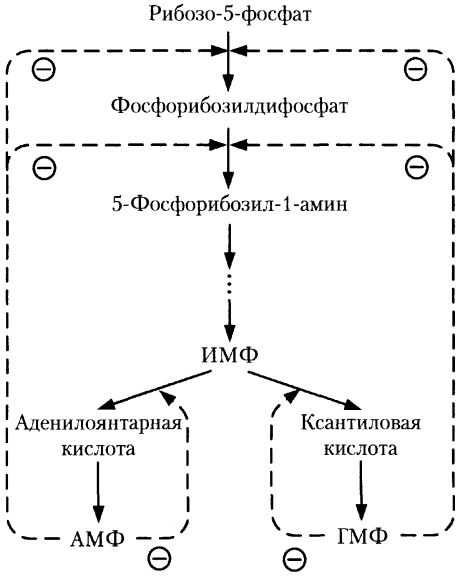


Рис. 12.4. Регуляция синтеза пуриновых нуклеотидов

Биосинтез пуриновых нуклеотидов из аденина и гуанина

В результате превращений нуклеотидов в тканях постоянно образуются свободные пуриновые основания — аденин и гуанин. Они могут повторно использоваться для синтеза нуклеотидов при участии ферментов аденинфосфорибозилтрансферазы и гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы:

$$\text{Аденин} + \text{Фосфорибозилдифосфат} \rightarrow \text{АМФ} + H_4P_2O_7.$$

$$\text{Гуанин} + \text{Фосфорибозилдифосфат} \rightarrow \text{ГМФ} + H_4P_2O_7.$$

Второй фермент может также использовать в качестве субстрата гипоксантин:

$$\text{Гипоксантин} + \text{Фосфорибозилдифосфат} \rightarrow \text{ИМФ} + H_4P_2O_7.$$

Этот механизм повторного включения азотистых оснований в метаболизм называют «путь спасения».

КАТАБОЛИЗМ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Катаболизм пуриновых нуклеотидов включает реакции гидролитического отщепления фосфатного остатка, рибозного остатка (или целиком рибозофосфатного остатка) и аминогруппы. В результате этих реакций из АМФ образуется гипоксантин,

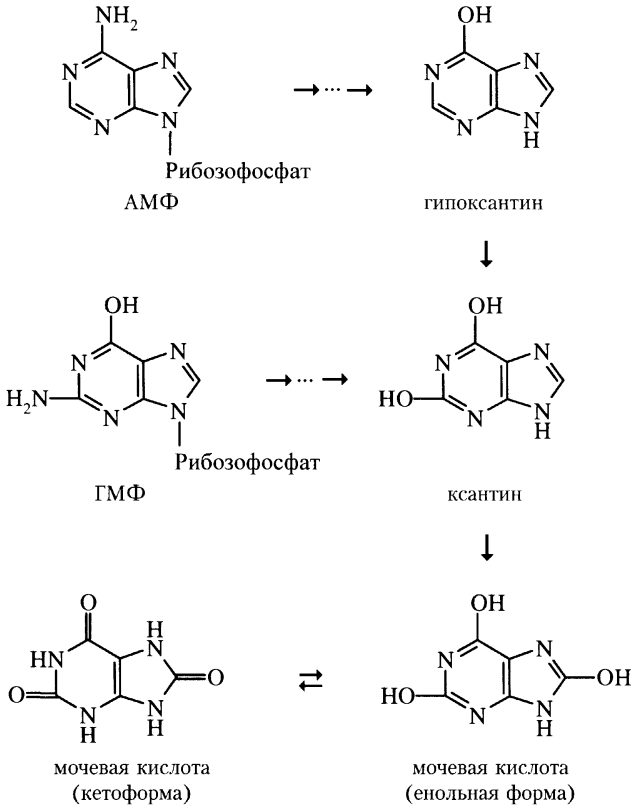


Рис. 12.5. Катаболизм пуриновых нуклеотидов

а из ГМФ — ксантин; в конечном счете пуриновое ядро пуриновых нуклеотидов превращается в мочевую кислоту (рис. 12.5).

Превращение гипоксантина в ксантин и ксантина в мочевую кислоту происходит при действии ксантиноксидазы; в этих реакциях используется молекула кислорода, один атом которого включается в пурин, а другой — в пероксид водорода:

$$\text{Гипоксантин} + O_2 + H_2O \rightarrow \text{Ксантин} + H_2O_2.$$

$$\text{Ксантин} + O_2 + H_2O \rightarrow \text{Мочевая кислота} + H_2O_2.$$

Образование мочевой кислоты происходит главным образом в печени. Мочевая кислота — основной продукт катаболизма пуриновых нуклеотидов у человека. В организме ежесуточно образуется 0,5–1 г мочевой кислоты, которая выводится через почки.

ГИПЕРУРИКЕМИЯ И ПОДАГРА

В крови здорового человека содержится 3–7 мг/дл мочевой кислоты. Хроническое повышение концентрации мочевой кислоты (*гиперурикемия*) часто приводит к развитию *подагры*. Мочевая кислота плохо растворима в воде. В крови в норме

концентрация мочевой кислоты больше, чем в насыщенном водном растворе. Это обусловлено тем, что часть мочевой кислоты связана с белками и некоторыми другими компонентами крови. Даже небольшое повышение концентрации мочевой кислоты в крови и тканях приводит к образованию кристаллов. С этим связаны основные симптомы подагры.

Наиболее характерный клинический признак подагры — повторяющиеся приступы острого воспаления суставов, чаще всего мелких (подагрические кризы, или атаки). Обычно (в $^3/_4$ случаев) болезнь начинается с воспаления первого плюснефалангового сустава большого пальца ноги. При кризе боль настолько сильна, что больной не в состоянии выносить даже прикосновение простыни. Приступ длится часами и повторяется с перерывами в несколько месяцев.

Подагрический криз связан с отложением кристаллов мононатриевой соли мочевой кислоты (урата натрия) в суставе. Об этом свидетельствует, в частности, такой опыт: если внести суспензию кристаллов мочевой кислоты в сустав экспериментального животного, возникает характерная для подагры реакция. Полагают, что кристаллы урата фагоцитируются лейкоцитами, в которых под действием этих кристаллов разрушаются мембраны лизосом; освободившиеся лизосомные ферменты, в свою очередь, разрушают клетки, а продукты клеточного распада вызывают воспаление.

Другой характерный признак подагры — подагрические узлы (тофусы). Они возникают в результате местного отложения и накопления уратов. Наиболее частая локализация отложений — мелкие суставы, сухожилия, хрящи, кожа. Иногда кожа над тофусом атрофируется, разрушается, и тогда из тофуса высыпается порошок, который состоит в основном из уратов. Образование узлов в суставах деформирует их и нарушает функцию. Отложение уратов в ткани почек приводит к почечной недостаточности — частому осложнению подагры. Ураты могут откладываться и в почечных лоханках, образуя почечные камни (примерно у половины больных подагрой).

Подагра — распространенное заболевание: в разных странах от 0,3 до 1,7 % взрослого населения страдает подагрой, причем мужчины болеют в 20 раз чаще, чем женщины. Подагру можно рассматривать как следствие гиперурикемии (точнее — повышенной концентрации уратов в тканях): среди людей с содержанием мочевой кислоты в крови от 7 до 8 мг/дл больны подагрой 20 %; при гиперурикемии свыше 9 мг/дл больны 90 %.

Гиперурикемия обычно имеет наследственный характер; среди родственников больного подагрой гиперурикемия обнаруживается во много раз чаще, чем в случайной подборке людей. Известна тяжелая форма гиперурикемии — *синдром Леша—Найхана*, которая наследуется как рецессивный признак, сцепленный с Х-хромосомой (проявляется у детей-мальчиков). У таких детей кроме симптомов, характерных для подагры, наблюдаются церебральные параличи, нарушения интеллекта, попытки наносить себе раны (укусы губ, пальцев). Эта болезнь связана с дефектом гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы, катализирующей превращение гипоксантина и гуанина в ИМФ и ГМФ соответственно («путь спасения»): активность этого фермента у больных в тысячи раз ниже, чем в норме. Вследствие этого гипоксантин и гуанин не используются повторно для синтеза нуклеотидов, а целиком превращаются в мочевую кислоту, что и ведет к

гиперурикемии (рис. 12.6). Возможно, более высокая частота подагры у мужчин связана именно с аллельными вариантами гена гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы, локализованного в Х-хромосоме. Однако легко представить, что нарушения и в других звеньях метаболизма пуринов также могут быть причиной гиперурикемии и подагры.

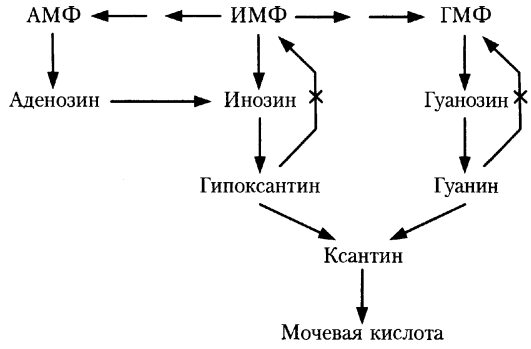


Рис. 12.6. Блок метаболизма пуриновых нуклеотидов (помечено крестиками) при синдроме Леша—Найхана

В пользу того, что гиперурикемия является основной причиной подагры, свидетельствует успешный опыт лечения ее и предупреждения аллопуринолом. Аллопуринол — это структурный аналог гипоксантина (рис. 12.7). Ксантиноксидаза окисляет аллопуринол в оксипуринол (аналог ксантина), но этот продукт реакции остается прочно связанным с активным центром фермента: таким образом фермент оказывается инактивированным (суицидный катализ). При этом конечным продуктом катаболизма пуринов становится гипоксантин, растворимость которого в моче и других жидкостях организма примерно в 10 раз больше, чем растворимость мочевой кислоты, и поэтому гипоксантин легче выводится из организма. Прием аллопуринола в дозах 0,2–0,8 г в сутки снижает содержание мочевой кислоты в крови до нормальных величин.

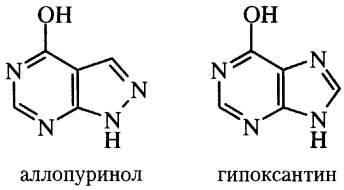


Рис. 12.7. Строение аллопуринола

Сравнительно редко бывают вторичные (приобретенные) гиперурикемия и подагра — при некоторых заболеваниях крови, почек, при отравлении свинцом, вследствие приема некоторых лекарственных веществ. Вторичные гиперурикемии обычно вызываются либо нарушением выведения мочевой кислоты, либо повреждением внешними агентами ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов.

ОБМЕН ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Пиримидиновое ядро пиримидиновых нуклеотидов образуется из диоксида углерода, амидной группы глутамина, аспарагиновой кислоты. В результате цепи реакций из этих веществ синтезируется уридинмонофосфорная кислота, которая, в

свою очередь, служит предшественником других пиримидиновых нуклеотидов — цитидиловых и тимидиловых.

Синтез уридиловой кислоты

Первая реакция пути синтеза УМФ — это образование карбамоилфосфата при действии карбамоилфосфатсинтетазы II (точнее, при действии карбамоилфосфатсинтетазного активного центра полифункционального фермента). В этой реакции NH_2-группа карбамоилфосфата образуется за счет амидной группы глутамина:

$$CO_2 + \text{Глутамин} + 2\text{АТФ} + H_2O \rightarrow H_2N{-}CO{-}OPO_3H_2 + \text{Глутамат} + 2\text{АДФ} + H_3PO_4.$$

Напомним, что при синтезе мочевины в реакции, катализируемой карбамоилсинтетазой I, используется аммиак, а не глутамин. Эти ферменты различаются также локализацией: карбамоилфосфатсинтетаза I содержится в митохондриях, главным образом в печени, а карбамоилфосфатсинтетаза II — в цитозоле, практически во всех клетках организма.

Далее карбамоилфосфат в реакции с аспарагиновой кислотой образует карбамоиласпарагиновую кислоту, которая дегидратируется с образованием пиримидинового цикла дигидрооротовой кислоты (рис. 12.8).

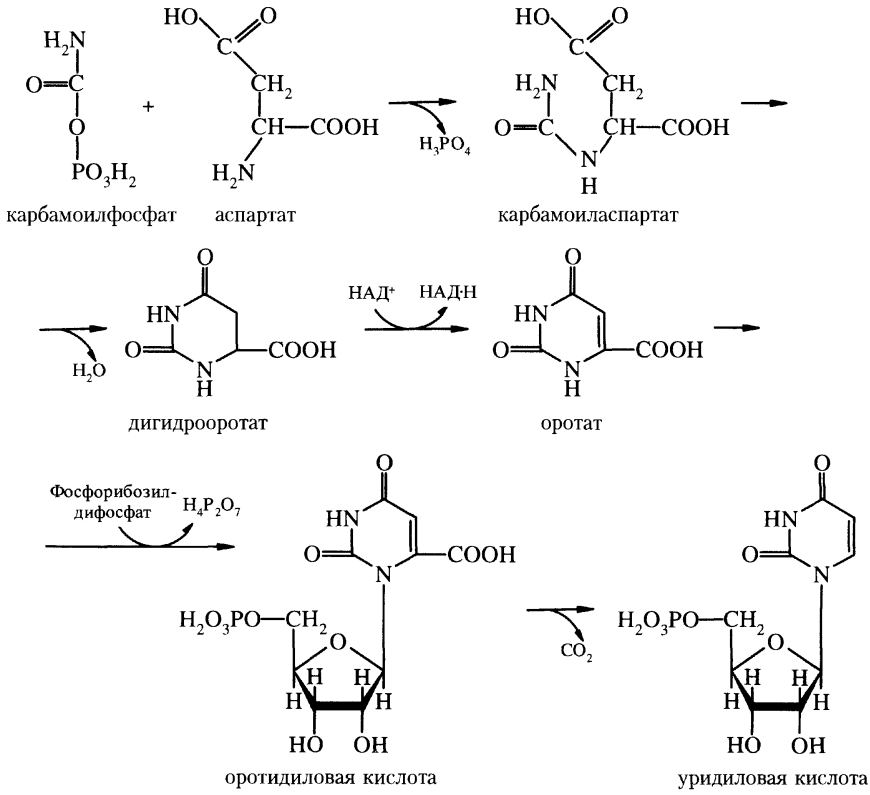


Рис. 12.8. Синтез уридиловой кислоты

Первые три реакции — образование карбамоилфосфата, карбамоиласпартата и дигидрооротовой кислоты — катализируются одним белком, содержащим активные центры для катализа каждой из реакций. Карбамоилфосфат и карбамоиласпартат не освобождаются из фермент-субстратного комплекса; освобождающимся продуктом действия этого белка является дигидрооротовая кислота. Следовательно, карбамоилфосфат, образующийся при синтезе УМФ, не может быть использован для синтеза мочевины.

Дигидрооротовая кислота при действии отдельного фермента (дегидрогеназы) превращается в оротовую кислоту. Две следующие реакции — образование оротидиловой кислоты и ее декарбоксилирование — катализируются также одним белком. Таким образом, шесть активных каталитических центров, необходимых для синтеза пиримидиновых нуклеотидов, кодируются только тремя структурными генами.

Синтез цитидиловых нуклеотидов

Из УМФ при действии специфических киназ образуются УДФ и УТФ:

УМФ + АТФ → УДФ + АДФ.

УДФ + АТФ → УТФ + АДФ.

Путем аминирования УТФ образуется цитидинтрифосфорная кислота; в этой реакции используется амидная группа глутамина (рис. 12. 9).

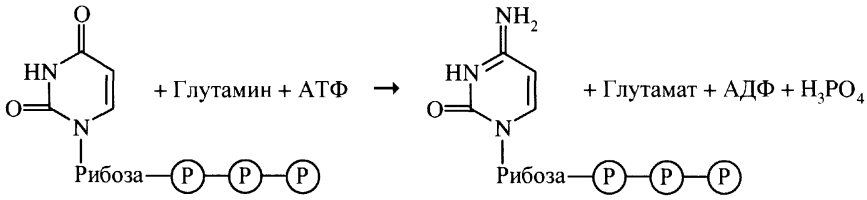


Рис. 12.9. Синтез цитидиловой кислоты

Более сложным путем из уридиловой кислоты (а также из цитидиловой кислоты) образуются тимидиловые нуклеотиды (см. ниже).

Синтез УМФ регулируется по механизму отрицательной обратной связи: УТФ является аллостерическим ингибитором первого фермента этой метаболической цепи — карбамоилфосфатсинтетазы II (см. рис. 2.26). Этот механизм предотвращает избыточный синтез не только УМФ, но и всех других пиримидиновых нуклеотидов, поскольку они образуются из УМФ.

Оротацидурия

Оротацидурией называют выделение с мочой больших количеств оротовой кислоты. Известна наследственная оротацидурия, при которой выделяется до 1,5 г оротовой кислоты в сутки, в 1000 раз больше, чем в норме. При охлаждении мочи больных в ней образуется осадок игольчатых кристаллов оротовой кислоты.

Болезнь связана с недостаточностью фермента, катализирующего две последние реакции синтеза УМФ — образования и декарбоксилирования оротидиловой кислоты. В результате возникает недостаточность пиримидиновых нуклеотидов, необходимых для синтеза нуклеиновых кислот, а оротовая кислота, наоборот, накапливается. Накоплению оротовой кислоты способствует также и отсутствие в этих условиях регулирующего действия УТФ — аллостерического ингибитора первой реакции, поскольку концентрация в клетках УТФ, как и других пиримидиновых нуклеотидов, постоянно низка. Вследствие этого синтез оротовой кислоты происходит с большей скоростью, чем в норме.

При отсутствии лечения наследственная оротацидурия приводит к развитию необратимого резкого отставания умственного и физического развития; обычно больные погибают в первые годы жизни. Оротовая кислота не токсична; нарушения развития являются следствием «пиримидинового голода». Поэтому для лечения этой болезни применяют уридин (нуклеозид, построенный из урацила и рибозы) в дозах 0,5–1 г в сутки. Это обеспечивает образование УМФ, а следовательно, и других пиримидиновых нуклеотидов в обход нарушенных реакций:

$$\text{Уридин} + \text{АТФ} \rightarrow \text{УМФ} + \text{АДФ}.$$

Такое лечение устраняет «пиримидиновый голод» и, кроме того, снижает выделение оротовой кислоты, поскольку включается механизм ингибирования первой реакции метаболического пути. Лечение должно продолжаться без перерывов на протяжении всей жизни; можно сказать, что уридин для таких больных является незаменимым пищевым фактором наряду с витаминами и незаменимыми аминокислотами.

Оротацидурия возможна также при гипераммониемии, когда последняя связана с дефектом не карбамоилфосфатсинтетазы I, а любого другого фермента орнитинового цикла. В этом случае карбамоилфосфат, образованный в митохондриях, используется не только для синтеза мочевины, но и для синтеза пиримидиновых нуклеотидов, а концентрация всех промежуточных метаболитов, в том числе оротовой кислоты, повышается.

Причиной оротацидурии может быть также введение аллопуринола при лечении подагры. Аллопуринол в организме частично превращается в аналог природного мононуклеотида — оксипуринолмононуклеотид, который является сильным ингибитором реакции декарбоксилирования оротидиловой кислоты, вследствие чего и вызывает накопление оротовой кислоты в тканях.

СИНТЕЗ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

Дезоксирибонуклеотиды — предшественники ДНК — образуются из рибонуклеотидов путем восстановления рибозного остатка при участии специфической ферментной системы. Фермент рибонуклеозидредуктаза катализирует восстановление гидроксильной группы рибозного остатка у второго углеродного атома; субстратами фермента являются дифосфаты нуклеотидов. Донором водорода в этой реакции служит низкомолекулярный белок тиоредоксин, содержащий SH-группы; водород используется для восстановления кислорода гидроксильной группы до молекулы воды (рис. 12.10, *а*).

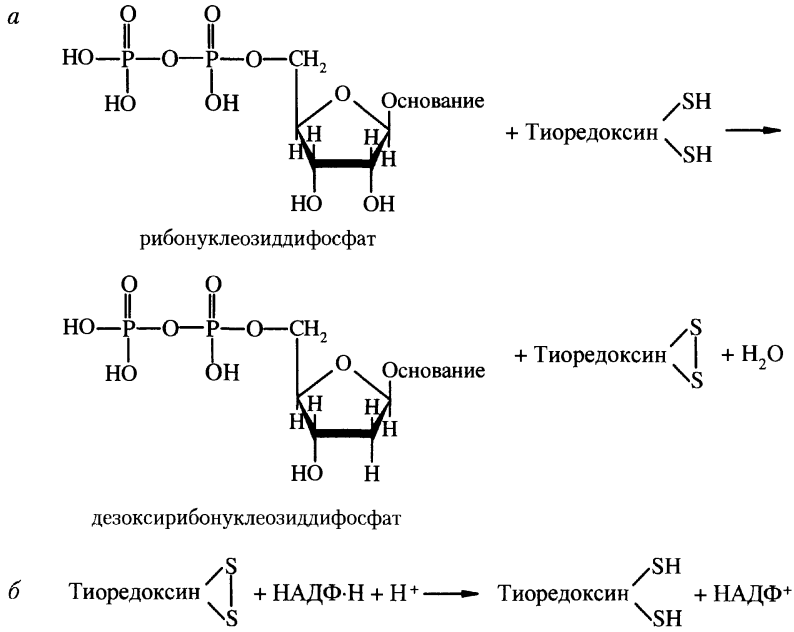


Рис. 12.10. Синтез дезоксирибонуклеотидов

Другой фермент системы — тиоредоксинредуктаза — катализирует гидрирование окисленного тиоредоксина (рис. 12.10, *б*).

Дезоксирибонуклеозиддифосфаты при участии киназ превращаются в дезоксирибонуклеозидтрифосфаты:

Дезоксирибонуклеозиддифосфат + АТФ → Дезоксирибонуклеозидтрифосфат + АДФ.

Синтез тимидиловых нуклеотидов

Тимидиловая кислота (дТМФ) образуется из дезоксиуридиловой кислоты (дУМФ) в реакции, катализируемой тимидилатсинтетазой. В этой реакции донором одноуглеродного фрагмента служит метилен-H_4-фолат, превращающийся в дигидрофолат (H_2-фолат) — рис. 12.11.

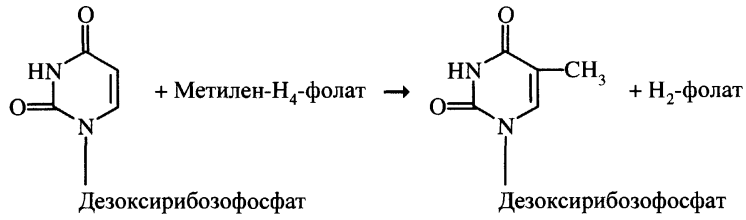


Рис. 12.11. Синтез тимидиловой кислоты

Синтез дезоксирибонуклеотидов и клеточное деление

Непосредственными предшественниками ДНК служат четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата, пути образования которых суммированы на рис. 12.12.

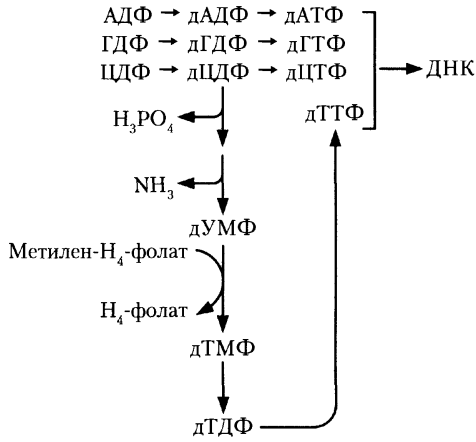


Рис. 12.12. Образование нуклеотидов — предшественников ДНК

Три нуклеотида — дАТФ, дГТФ и дЦТФ — образуются в результате действия рибонуклеотидредуктазы и киназ дезоксирибонуклеозиддифосфатов. Четвертый нуклеотид (дТТФ), необходимый для синтеза ДНК, синтезируется более сложным путем, включающим реакцию, катализируемую тимидилатсинтетазой. Субстрат тимидилатсинтетазы — дУМФ — кроме пути, указанного на рис. 12.10, может образоваться и другим путем:

$$\text{УДФ} \rightarrow \text{дУДФ} \rightarrow \text{дУТФ} \xrightarrow{-H_4P_2O_7} \text{дУМФ}$$

Рибонуклеотидредуктаза и тимидилатсинтетаза — это ключевые ферменты, лимитирующие скорость образования дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.

Синтез дезоксирибонуклеотидов в покоящихся клетках практически не происходит, их концентрация в клетке очень невелика, меньше 1 мкмоль/л. В этом состоянии дезоксирибонуклеотиды нужны только для репарации повреждений ДНК. В начале фазы S синтез ускоряется, и в продолжение всей фазы S (около 7 ч) концентрация дезоксирибонуклеотидов в клетке пддерживается на уровне 10–20 мкмоль/л. Регуляция синтеза дезоксирибонуклеотидов обеспечивается сложным механизмом, включающим изменения как активности, так и количества ферментов.

В отличие от дезоксирибонуклеотидов, скорость синтеза рибонуклеотидов мало изменяется при смене фаз клеточного цикла. Примечательно еще одно различие: концентрация дезоксирибонуклеотидов в клетке измеряется в микромолях, а рибонуклеотидов — в миллимолях, т. е. в 1000 раз больше.

Ингибиторы синтеза дезоксирибонуклеотидов делают невозможной репликацию ДНК и деление клетки; на этом основано применение ингибиторов рибонуклеотидредуктазы и тимидилатсинтетазы для лечения злокачественных опухолей.

В качестве примера укажем на применение 5-фтордезоксиуридина. В клетках 5-фтордезоксиуридин превращается в 5-фтордезоксиуридинмонофосфат (рис. 12.13). Это вещество является структурным аналогом тимидиловой кислоты и отличается от нее только наличием атома фтора в пятом положении вместо метильной группы; оно сильно ингибирует тимидилатсинтетазу и тем самым блокирует синтез ДНК.

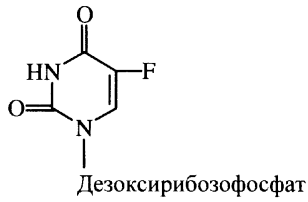


Рис. 12.13. Строение 5-фтордезоксиуридинмонофосфата

Другая мишень действия ингибиторов синтеза дТМФ — регенерация метилен-H_4-фолата. Напомним, что метилен-H_4-фолат служит донором метильной группы в тимидилатсинтетазной реакции. Он превращается в дигидрофолат (H_2-фолат), который затем снова превращается в метилен-H_4-фолат (рис. 12.14).

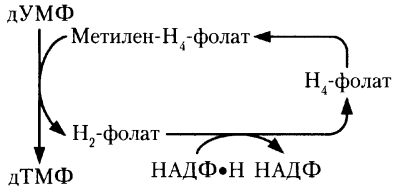


Рис. 12.14. Регенерация метилен-H_4-фолата

Некоторые структурные аналоги фолиевой кислоты ингибируют дигидрофолатредуктазу и тем самым блокируют синтез дТМФ и ДНК. В химиотерапии рака наиболее часто применяют аминоптерин, содержащий аминогруппу в четвертом положении (вместо карбонильной группы, которая имеется в молекуле фолиевой кислоты), и метотрексат, который представляет собой 10-метиламиноптерин.

Ингибиторы синтеза дезоксирибонуклеотидов блокируют синтез ДНК и в нормальных клетках, поэтому они токсичны для организма. Однако на опухолевые ткани они действуют сильнее, поскольку раковые клетки отличаются значительно большей скоростью пролиферации, а следовательно, и большей потребностью в дезоксирибонуклеотидах.

Часть III

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ И ФУНКЦИЙ

Глава 13

ГОРМОНЫ

Эндокринные, паракринные и аутокринные гормоны обеспечивают коммуникацию (обмен информацией) между разными клетками и органами. В результате действия этих механизмов достигается координация метаболизма и функций разных клеток и органов и адекватная реакция организма на изменения внешней среды.

В предыдущих разделах описаны многие частные случаи регуляции обмена веществ и функций с участием гормонов. В этой части книги (гл. 13–17) будет представлена более систематичная картина механизмов регуляции ряда биохимических систем в их связи с физиологическими функциями.

ОБЩИЕ АСПЕКТЫ ЭНДОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ. КЛАССИФИКАЦИЯ ЭНДОКРИННЫХ ГОРМОНОВ

По химической природе эндокринные гормоны делятся на три группы: пептидные (белковые), стероидные и непептидные производные аминокислот. Паракринные гормоны гораздо более разнообразны.

Для всех гормонов первым звеном передачи сигнала служит взаимодействие с белком-рецептором, причем для каждого гормона существует свой рецептор. Связывание гормона с рецептором — процесс обратимый; количество занятых рецепторов прямо пропорционально концентрации гормона в крови.

По механизму передачи сигнала в клетку-мишень гормоны можно разделить на две группы.

Первую группу составляют пептидные гормоны и адреналин. Их рецепторы расположены на наружной поверхности плазматической мембраны, и гормон внутрь клетки не проникает (см. гл. 7). Эти гормоны (первые вестники сигнала) передают сигнал посредством второго вестника, роль которого выполняют цАМФ, цГМФ, инозитолтрисфосфат, ионы Ca^{2+}. После присоединения гормона к рецептору следует цепь событий, изменяющих метаболизм клетки (например, включается каскадный механизм мобилизации гликогена и т. п.).

Другую группу составляют стероидные гормоны и тироксин. Рецепторы этих гормонов находятся в цитозоле клетки. Гормон проникает из крови в клетку,

соединяется с рецептором и вместе с ним транспортируется в ядро, или сначала проникает в ядро, где соединяется с рецептором.

В ядро может передаваться и сигнал гормонов, действующих через мембранные рецепторы — некоторых пептидных эндокринных гормонов (инсулин, гормон роста и др.) и всех цитокинов. В одном из механизмов такой передачи сигнала участвуют протеинкиназы особого семейства, получившие название Янус-киназы, JAK (поскольку, подобно богу древних римлян Янусу, имеют два «лица» — два активных центра). Когда рецептор связан с гормоном, к цитоплазматической части рецептора присоединяется JAK, и при этом активируется: фосфорилирует некоторые тирозиновые остатки и рецептора, и своей молекулы (рис. 13.1). В результате этого комплекс рецептор—JAK приобретает сродство к другим молекулам цитозоля — переносчикам сигнала и активаторам транскрипции, ПСАТ (STAT — signal transducers and activators of transcription — *англ.*). JAK фосфорилирует ПСАТ, после чего ПСАТ димеризуется, а димер может проходить через ядерную мембрану; в ядре димер присоединяется к энхансерам определенных генов и стимулирует транскрипцию этих генов.

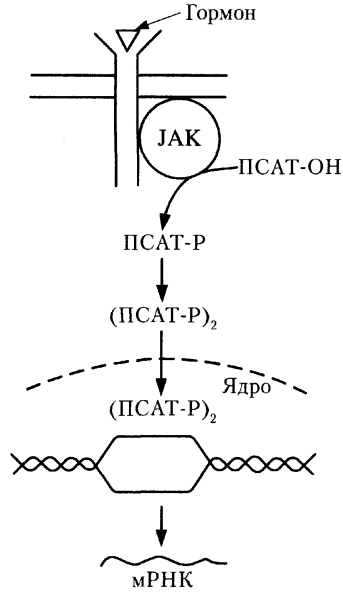


Рис. 13.1. Передача сигнала от мембранного рецептора в ядро

Если рецептор имеет собственную тирозинкиназную активность, как, например, рецептор инсулина, то сигнал в ядро может передаваться без участия JAK.

Наибольший интерес представляет классификация гормонов по биологическим функциям. Каждый гормон изменяет метаболизм специфическим образом и не обязательно действует на все органы. Избирательность действия гормонов на органы определяется наличием или отсутствием рецепторов для данного гормона в клетках органа. Кроме того, ответ разных органов даже на один и тот же гормон может быть различным в связи со специализацией клеток. Например, главный результат действия адреналина на клетки печени — усиление мобилизации гликогена, а на клетки жировой ткани — усиление мобилизации жиров.

По биологическим функциям гормоны можно разделить на следующие группы:

1. Регулирующие обмен углеводов, жиров, аминокислот: инсулин, глюкагон, адреналин, глюкокортикостероиды (кортизол).
2. Регулирующие водно-солевой обмен: минералокортикостероиды (альдостерон), антидиуретический гормон (вазопрессин).
3. Регулирующие обмен кальция и фосфатов: паратгормон, кальцитонин, кальцитриол (производное витамина D_3).
4. Регулирующие обмен веществ, связанный с репродуктивной функцией (половые гормоны): эстрадиол, прогестерон, тестостерон.
5. Регулирующие функции эндокринных желез (тропные гормоны): кортикотропин, тиротропин, гонадотропин.

Связи между эндокринной и нервной системой

Некоторые гормоны человека и связь эндокринной системы с нервной системой представлены на рис. 13.2. Под прямым контролем нервной системы находятся мозговое вещество надпочечников и гипоталамус; другие эндокринные железы связаны с нервной системой опосредованно, через гормоны гипоталамуса и гипофиза. В клетках гипоталамуса синтезируются особые пептиды — либерины (рилизинг-гормоны). В ответ на возбуждение определенных центров мозга либерины освобождаются из аксонов нервных клеток гипоталамуса, оканчивающихся в гипофизе, и стимулируют синтез и выделение тропных гормонов клетками гипофиза. Наряду с либеринами, в гипоталамусе вырабатываются статины, ингибирующие синтез и секрецию гормонов гипофиза.

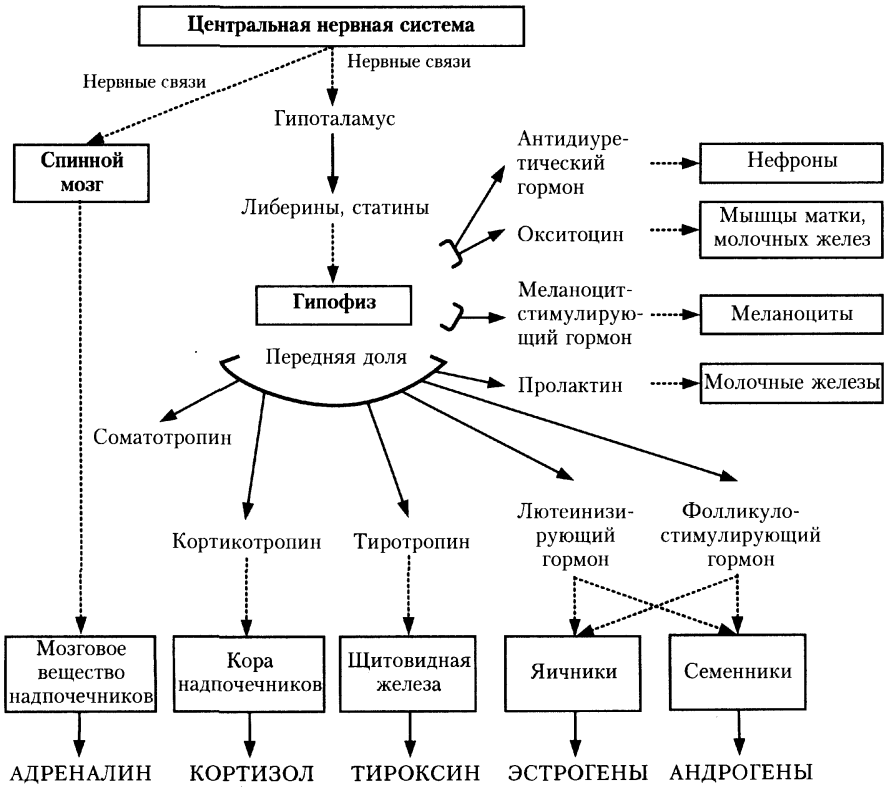


Рис. 13.2. Связи эндокринной и нервной систем. Сплошные стрелки обозначают синтез и секрецию гормона, пунктирные — влияние гормона на органы-мишени

Классификация гормонов по биологическим функциям в известной степени условна, поскольку многие гормоны полифункциональны. Например, адреналин и норадреналин регулируют не только обмен углеводов и жиров, но и частоту сердечных сокращений, сокращение гладких мышц, кровяное давление. В частности, по этой причине многие гормоны, особенно паракринные, не удается классифицировать по биологическим функциям.

Изменения концентрации гормонов в крови

Концентрация гормонов в крови низкая, порядка 10^{-6}–10^{-11} моль/л. Время полужизни в крови измеряется минутами, для некоторых гормонов — десятками минут, реже — часами. Увеличение концентрации гормона в крови при действии соответствующего стимула зависит от увеличения скорости синтеза гормона или скорости секреции уже имеющегося в эндокринной клетке гормона.

Стероидные гормоны представляют собой липофильные вещества, легко проникающие через клеточные мембраны. Поэтому они не накапливаются в клетках, и повышение их концентрации в крови определяется увеличением скорости синтеза.

Пептидные гормоны выделяются в кровь при участии специальных механизмов секреции. Эти гормоны после их синтеза включаются в секреторные гранулы — мембранные пузырьки, образующиеся в пластинчатом комплексе; гормон освобождается в кровь путем слияния гранулы с плазматической мембраной клетки (экзоцитоз). Синтез гормонов происходит быстро (например, молекула проинсулина синтезируется за 1–2 мин), в то время как образование и созревание секреторных гранул требуют большего времени — 1–2 ч. Запасание гормона в секреторных гранулах обеспечивает быструю реакцию организма на действие стимула: стимул ускоряет слияние гранул с мембраной и освобождение запасенного гормона в кровь.

Синтез стероидных гормонов

Строение и синтез многих гормонов описаны в предыдущих разделах. Стероидные гормоны представляют собой группу соединений, родственных по происхождению и структуре: все они образуются из холестерина. Промежуточными продуктами при синтезе стероидных гормонов служат прегненолон и прогестерон (рис. 13.3). Они образуются во всех органах, синтезирующих любые стероидные гормоны. Далее пути превращения расходятся: в коре надпочечников образуются кортизол (глюкокортикостероид) и альдостерон (минералокортикостероид) (C_{21}-стероиды), в семенниках — мужские половые гормоны (C_{19}-стероиды), в яичниках — женские половые гормоны (C_{18}-стероиды). За большинством стрелок на схеме скрывается не одна, а от двух до четырех реакций. Кроме того, возможны альтернативные пути синтеза некоторых гормонов. В целом пути синтеза стероидных гормонов образуют довольно сложную сетку реакций. Многие промежуточные продукты этих путей также обладают некоторой гормональной активностью. Однако основными стероидными гормонам служат кортизол (регуляция обмена углеводов и аминокислот), альдостерон (регуляция водно-солевого обмена), тестостерон, эстрадиол и прогестерон (регуляция репродуктивных функций).

В результате инактивации и катаболизма стероидных гормонов образуется значительное количество стероидов, содержащих кетогруппу в положении 17 (17-кетостероиды). Эти вещества выводятся через почки. Суточная экскреция 17-кетостероидов у взрослой женщины составляет 5–15 мг, у мужчин — 10–25 мг. Определение 17-кетостероидов в моче используется для диагностики: их выделение увеличивается при болезнях, сопровождающихся гиперпродукцией стероидных гормонов, и уменьшается при гипопродукции.

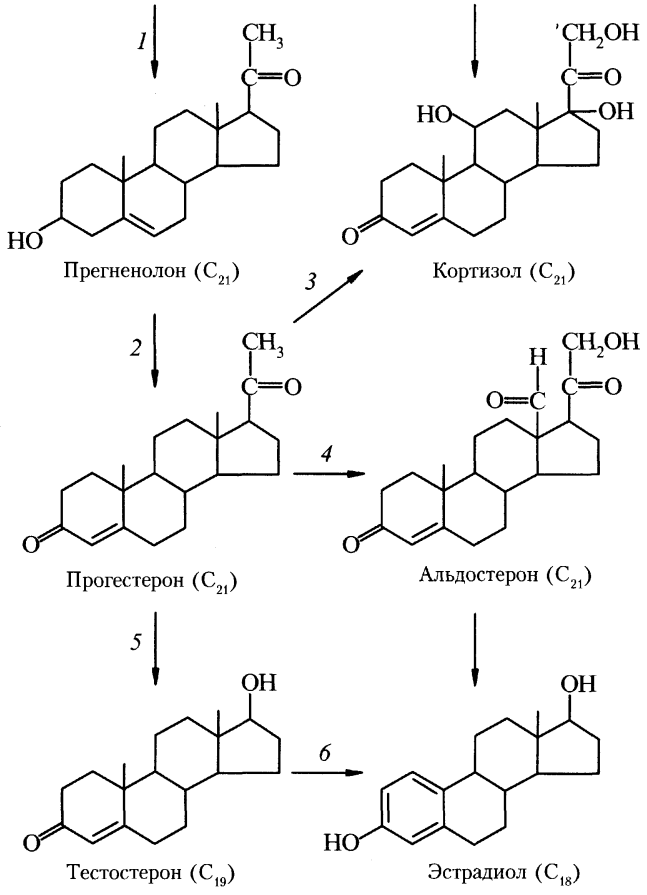


Рис. 13.3. Пути синтеза стероидных гормонов:

1, 2 — в коре надпочечников, семенниках и яичниках; *3, 4* — в коре надпочечников; *5* — в семенниках и яичниках; *6* — в яичниках

Паракринные гормоны

Цитокины

Цитокины — это сигнальные молекулы паракринного и аутокринного действия; в крови в физиологически активной концентрации практически не бывают (исключение — интерлейкин-1). Известны десятки разных цитокинов. К ним относятся интерлейкины (лимфокины и монокины), интерфероны, пептидные факторы роста, колониестимулирующие факторы. Цитокины представляют собой гликопротеины, содержащие 100–200 аминокислотных остатков. Большинство цитокинов образуется и действует во многих типах клеток и реагирует на разные стимулы, включая механическое повреждение, вирусную инфекцию, метаболические нарушения и др. Исключение составляют интерлейкины (ИЛ-1α и ИЛ-1β) — их синтез регулируется специфическими сигналами и в небольшом количестве типов клеток.

Цитокины действуют на клетки через специфические мембранные рецепторы и протеинкиназные каскады, в результате активируются факторы транскрипции — энхансеры или сайленсеры, белки, которые транспортируются в ядро клетки, находят специфическую последовательность ДНК в промоторе гена, являющегося мишенью данного цитокина, и активируют или подавляют транскрипцию гена.

Цитокины участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки, хемотаксиса, секреции, апоптоза, воспалительной реакции. Трансформирующий фактор роста (ТФР-β) стимулирует синтез и секрецию компонентов межклеточного матрикса, рост и пролиферацию клеток, синтез других цитокинов.

Цитокины имеют перекрывающуюся, но все же разную биологическую активность. Клетки разных типов, или разной степени дифференцированности, или находящиеся в разном функциональном состоянии могут по-разному реагировать на один и тот же цитокин.

Эйкозаноиды

Арахидоновая кислота, или эйкозатетраеновая, 20:4 (5, 8, 11, 14), дает начало большой группе паракринных гормонов — эйкозаноидов. Арахидоновая кислота, поступающая с пищей или образующаяся из линолевой кислоты, включается в состав мембранных фосфолипидов и может освобождаться из них в результате действия фосфолипазы A_2. Далее в цитозоле образуются эйкозаноиды (рис. 13.4). Различают три группы эйкозаноидов: простагландины (PG), тромбоксаны (TX), лейкотриены (LT). Эйкозаноиды образуются в очень малых количествах, и имеют, как правило, короткое время жизни — измеряемое минутами или даже секундами.

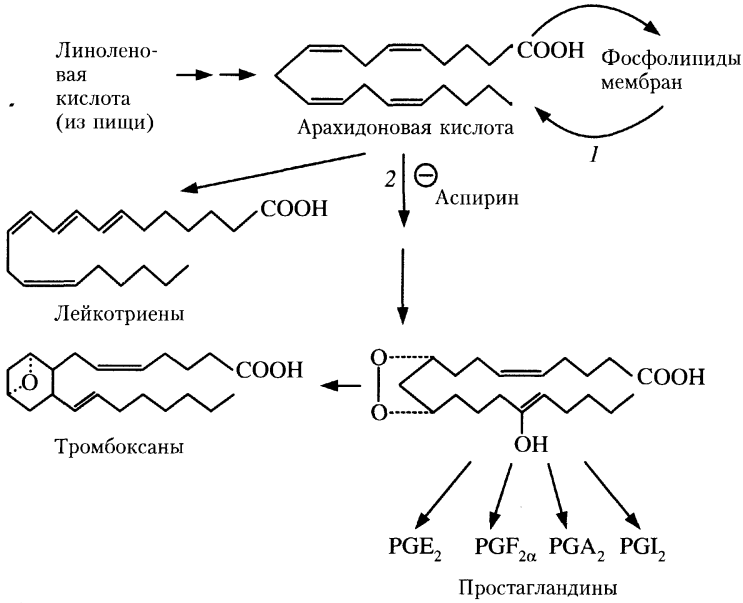


Рис. 13.4. Синтез и строение некоторых эйкозаноидов:
1 — фосфолипаза A_2; *2* — циклооксигеназа

В разных тканях и разных ситуациях образуются неодинаковые эйкозаноиды. Функции эйкозаноидов многообразны. Они вызывают сокращение гладких мышц и сужение кровеносных сосудов ($PGF_2\alpha$, синтезируется почти во всех органах) или, наоборот, — расслабление гладких мышц и расширение сосудов (PGE_2, синтезируется тоже в большинстве органов). PGI_2 синтезируется в основном в эндотелии сосудов, подавляет агрегацию тромбоцитов, расширяет сосуды. Тромбоксан TXA_2 синтезируется в основном в тромбоцитах и действует тоже на тромбоциты — стимулирует их агрегацию (аутокринный механизм) в области повреждения сосуда (см. гл. 21). Он же, тромбоксан TXA_2, сужает сосуды и бронхи, действуя на гладкомышечные клетки (паракринный механизм).

Эйкозаноиды действуют на клетки-мишени через специфические мембранные рецепторы. Соединение эйкозаноида с рецептором включает механизм образования второго (внутриклеточного) вестника сигнала; им могут быть цАМФ, цГМФ, инозитолтрисфосфат, ионы Ca^{2+}. Эйкозаноиды, наряду с другими факторами (гистамин, интерлейкин-1, тромбин и др.), участвуют в развитии воспалительной реакции.

Воспаление — естественная реакция на повреждение тканей, начальное звено заживления. Однако иногда воспаление бывает чрезмерным или слишком продолжительным, и тогда оно само становится патологическим процессом, болезнью, и требует лечения. Для лечения таких состояний применяют ингибиторы синтеза эйкозаноидов. Кортизол и его синтетические аналоги (дексаметазон и др.) индуцируют синтез белков липокортинов, которые ингибируют фосфолипазу A_2 (см. рис. 13.4). Аспирин (нестероидное противовоспалительное средство) ацетилирует и инактивирует циклооксигеназу (рис. 13.6).

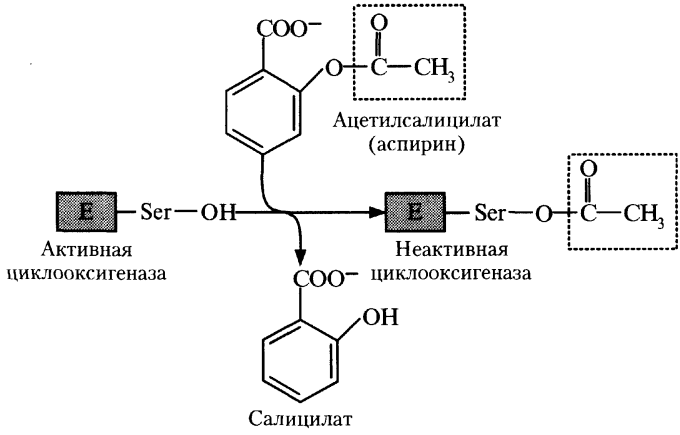


Рис. 13.6. Инактивация циклооксигеназы аспирином

Глава 14

РЕГУЛЯЦИЯ ВОДНО-СОЛЕВОГО ОБМЕНА

Вода и растворенные в ней вещества, в том числе минеральные соли, создают внутреннюю среду организма, свойства которой сохраняются постоянными или изменяются закономерным образом при изменении функционального состояния органов и клеток.

Вода тканей является не просто растворителем или инертным компонентом: она выполняет существенную структурную и функциональную роль. Например, взаимодействие белков с водой обеспечивает их конформацию с преимущественным расположением гидрофильных групп на поверхности белковой глобулы, а гидрофобных — внутри. Еще большее значение имеет вода для структурной организации биологических мембран и их основы — двойного липидного слоя, в котором гидрофильные поверхности каждого монослоя взаимодействуют с водой, отграничивая от нее гидрофобное пространство внутри мембраны, между монослоями.

Вода служит средством транспорта веществ как в пределах клетки и окружающего ее межклеточного вещества, так и между органами (кровеносная и лимфатическая системы). Подавляющая часть химических реакций в организме происходит с веществами, растворенными в воде. Во многих химических превращениях вода служит реагентом: это реакции гидролиза, гидратации, дегидратации, образование воды при тканевом дыхании, гидроксилазных реакциях; у растений происходит фотоокисление воды, и образующийся при этом водород используется для восстановления углекислого газа при фотосинтезе.

Почти $^2/_3$ массы тела человека приходится на воду. Суточное потребление воды составляет около 2 л, к этому добавляется 0,3–0,4 л метаболической воды, образующейся при тканевом дыхании. При отсутствии питья человек погибает через несколько суток в результате дегидратации тканей, когда количество воды в организме уменьшается примерно на 12 %.

Примерно 6 % всей воды организма находится в крови, 25 % — в межклеточном матриксе (интерстициальная вода). Воду этих двух бассейнов называют внеклеточной водой. Около 70 % воды организма — внутриклеточная вода. Между тремя основными бассейнами существует интенсивный обмен жидкостью. Например, пе-

ремещение жидкости (путем диффузии) через стенки капилляров в теле человека составляет около 1500 л в 1 мин.

ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ВОДНО-СОЛЕВОГО ОБМЕНА

Основными параметрами жидкой среды организма являются осмотическое давление, pH и объем. Осмотическое давление и pH межклеточной жидкости и плазмы крови одинаковы; они также одинаковы в межклеточной жидкости разных органов. С другой стороны, значение pH внутри клеток разных типов может быть различным; оно может быть различным и в разных отсеках одной клетки. Различие pH объясняется особенностями метаболизма, механизмами активного транспорта, избирательной проницаемостью мембран. Однако значение pH, характерное для данного типа клеток, поддерживается на постоянном уровне; повышение или понижение pH приводит к нарушению функций клетки. Поддержание постоянства внутриклеточной среды обеспечивается постоянством осмотического давления, pH и объема межклеточной жидкости и плазмы крови, т. е. внеклеточной жидкости. В свою очередь, постоянство параметров внеклеточной жидкости определяется действием почек и системы гормонов, регулирующих их функцию.

Осмотическое давление внеклеточной жидкости в значительной мере зависит от NaCl — соли, которая в этой жидкости содержится в наибольшей концентрации (табл. 14.1). Поэтому основной механизм регуляции осмотического давления связан с изменением скорости выделения либо воды, либо NaCl, вследствие чего изменяется концентрация NaCl в жидкостях тканей, а значит, изменяется и осмотическое давление. Регуляция объема происходит путем одновременного изменения скорости выделения и воды, и NaCl. Кроме того, механизм жажды регулирует потребление воды. Регуляция pH обеспечивается избирательным выделением кислот или щелочей с мочой; pH мочи в зависимости от этого может изменяться в пределах от 4,6 до 8,0.

С нарушением водно-солевого гомеостаза связаны такие патологические состояния, как дегидратация тканей или, наоборот, отеки, повышение или снижение кровяного давления, шок, ацидоз, алкалоз.

Таблица 14.1. Электролитный состав жидкостей организма человека (приведены округленные значения)

Электролит	Плазма крови		Межклеточная жидкость		Внутриклеточная жидкость	
	ммоль/л	мг/дл	ммоль/л	мг/л	ммоль/л	мг/дл
Na^+	140	325	140	325	10	22
K^+	5	16	5	16	160	510
Mg^{2+}	1	2,5	0,8	2	7	27
Ca^{2+}	2,5	10	1,3	5	—	—
Cl^-	100	360	110	390	2	7
HCO^-_3	30	200	25	170	8	55
H_3PO_4	1,2	3,5	1,2	3,5	—	—
Белки*	7		0,5		20	

* Содержание белков приведено в процентах.

Следует различать понятия «водно-солевой обмен» и «минеральный обмен». Говоря о водно-солевом обмене, имеют в виду обмен основных минеральных электролитов (см. табл. 14.1), и прежде всего — обмен воды и NaCl. Минеральным обменом называют обмен любых минеральных компонентов организма, в том числе и таких, которые не влияют на основные параметры жидкой среды организма, т. е. на объем жидкости, осмотическое давление и pH (например, микроэлементы).

ВЫДЕЛЕНИЕ ВОДЫ И СОЛЕЙ ПОЧКАМИ

Главная функция почек заключается в образовании мочи, которое происходит в функциональных единицах почек — нефронах. Из крови в капсулу клубочка нефрона фильтруется вода и все другие низкомолекулярные вещества плазмы; движущей силой этой фильтрации является разность гидростатического давления в капиллярах клубочка и в полости капсулы клубочка. Таким образом, фильтрат капсулы клубочка (первичная моча) по составу и концентрации низкомолекулярных веществ не отличается от плазмы крови. Обратное всасывание компонентов первичной мочи в кровь, которое происходит в канальцах нефрона, имеет избирательный характер. Избирательность определяется наличием специфических транспортных белков; при этом многие вещества всасываются против градиента концентрации, т. е. путем активного транспорта. Основной движущей силой этого переноса служит градиент концентраций ионов Na^+ и K^+, создаваемый Na,K-АТФазой, а вместе с этими ионами по механизмам симпорта или антипорта перемещаются и другие вещества. Таким путем в канальцах почек образуется окончательная моча, отличающаяся от плазмы крови по концентрации растворенных веществ (табл. 14.2).

Таблица 14.2. Суточная фильтрация, реабсорбция и экскреция некоторых компонентов плазмы крови

Вещество	Фильтруется		Реабсорбируется		Выводится с мочой		м/п*
	ммоль	г	ммоль	г	ммоль	г	
Na^+	24 500	563	24 350	560	150	3,5	0,8–1,5
K^+	770	30	690	27	80	3	10–15
Mg^{2+}	135	33	127	32,8	8	0,2	2
Ca^{2+}	270	11	267	10,9	3	0,1	2
Cl^-	19 850	700	19 700	695	150	5,5	0,8–2
HCO^-_3	4 900	300	4 888	300	2	0–3	0–2
H_3PO_4	210	6,5	180	5,5	30	1	25
Мочевина	870	53	460	28	410	25	60
Глюкоза	780	140	780	140	0	0	—
Вода, л	180		178,5		1,5		—

* м/п — отношение концентрации в моче к концентрации в плазме крови.

В нефронах фильтруется и реабсорбируется около 180 л жидкости в сутки. В теле человека содержится примерно 45 л жидкости; следовательно, вся жидкость организма фильтруется четыре раза в сутки. Это нужно не только для поддержания водно-солевого гомеостаза, но и для выделения конечных продуктов обмена, главным из которых в моче является мочевина.

Почки отличаются интенсивным энергетическим обменом: в них расходуется 10 % всего потребляемого человеком кислорода, в то время как масса почек составляет только 0,5 % от массы тела. Это связано с необходимостью активного трансмембранного переноса значительных количеств веществ при образовании мочи.

РЕГУЛЯЦИЯ ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ И ОБЪЕМА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ЖИДКОСТИ

Выделение воды и NaCl почками регулируется антидиуретическим гормоном, альдостероном и ренин-ангиотензиновой системой.

Антидиуретический гормон

Антидиуретический гормон (вазопрессин) представляет собой нонапептид следующего строения:

```
Cys—Tyr—Phe—Gln—Asn—Cys—Pro—Arg—GlyN
 |                   |
 S———————————————————S
```

Вазопрессин синтезируется в нейронах гипоталамуса, по аксонам транспортируется в заднюю долю гипофиза и секретируется из окончаний этих аксонов в кровь (рис. 14.1, *а*). Осморецепторы гипоталамуса при повышении осмотического давления тканевой жидкости стимулируют освобождение вазопрессина из секреторных гранул. Осморецепторы обладают высокой чувствительностью: изменение давления всего на 2–3 % уже приводит к секреции вазопрессина.

Вазопрессин увеличивает скорость реабсорбции воды из первичной мочи и тем самым уменьшает диурез. Вазопрессин, циркулирующий в крови, присоединяется к специфичным рецепторам на базолатеральной поверхности клеток дистальных извитых канальцев (рис. 14.1, *б*). Рецепторы вазопрессина связаны с аденилатциклазой. Повышение концентрации цАМФ активирует каскад протеинкиназ, в результате которого сигнал передается в ядро клетки; в конечном счете активируется энхансер, стимулирующий экспрессию гена аквапорина-2.

Аквапорин — белок, образующий водные каналы (см. рис. 14.1, *б*). Аквапорин из цитозоля мигрирует к мембране апикального (контактирующего с мочой) конца клетки и встраивается в мембрану, образуя каналы; через эти каналы вода из мочи поступает в клетку, а с противоположного конца клетки фильтруется в кровь. При этом моча становится более концентрированной. Таким путем антидиуретический гормон сохраняет необходимый объем жидкости в организме, не влияя на количество выделяемого NaCl. Осмотическое давление внеклеточной жидкости при этом уменьшается, т. е. ликвидируется стимул, который вызвал выделение вазопрессина (рис. 14.2). Кроме того, повышение осмотического давления вызывает жажду, и потребление воды тоже участвует в снижении осмотического давления.

При некоторых болезнях, повреждающих гипоталамус или гипофиз (опухоли, травмы, инфекции), синтез и секреция вазопрессина уменьшаются и развивается несахарный диабет. Характерное проявление этой болезни — резкое увеличение выделения мочи, даже до 10 л в сутки; соответственно, увеличивается и потребление воды.

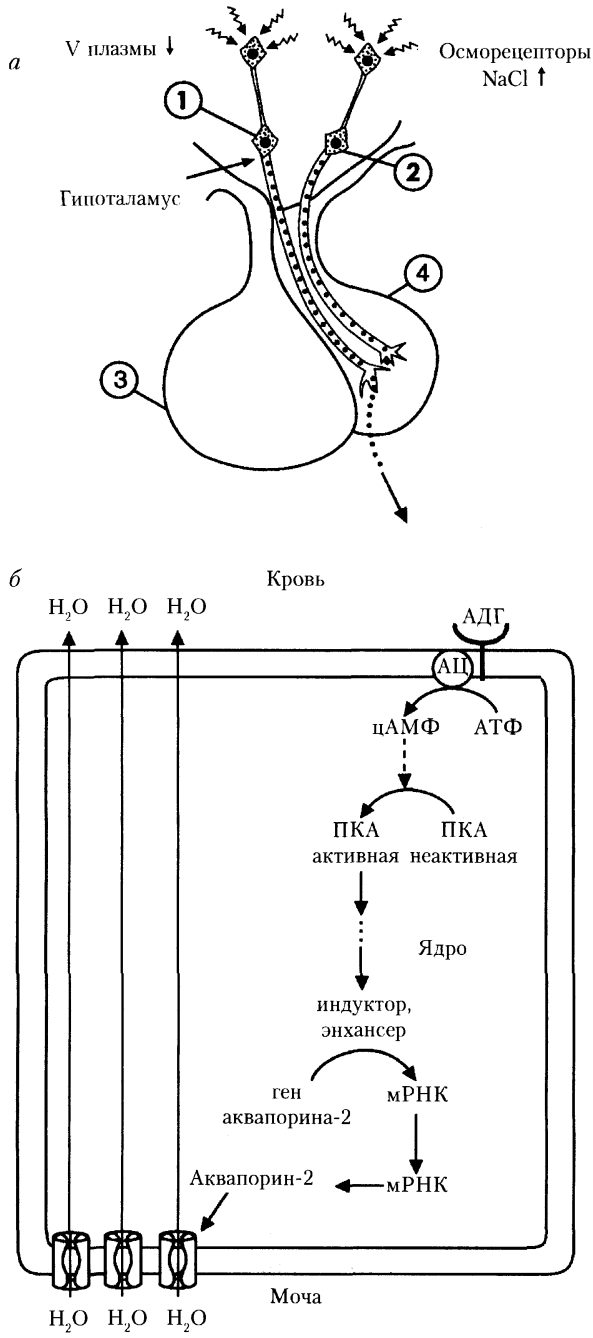


Рис. 14.1. Секреция и механизм действия антидиуретического гормона:

1 — супраоптический нейрон; *2* — паравентрикулярный нейрон; *3* — передняя доля гипофиза; *4* — задняя доля гипофиза

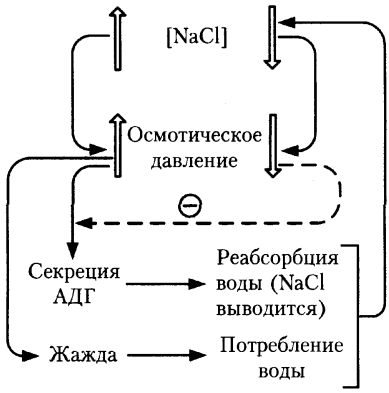


Рис. 14.2. Регуляция осмотического давления жидкостей организма вазопрессином

Кроме снижения диуреза вазопрессин вызывает также сужение артериол и капилляров (отсюда и его название), а следовательно, и повышение кровяного давления. Это действие обнаруживается лишь при достаточно высокой концентрации вазопрессина и, вероятно, не имеет физиологического значения.

Альдостерон

Альдостерон — основной минералокортикоид организма — вырабатывается в коре надпочечников; он содержит альдегидную группу, что нашло отражение в его названии. Суточная секреция альдостерона измеряется микрограммами (кортизола — миллиграммами). Во время прохождения крови через печень разрушается примерно 90 % альдостерона крови. Секреция увеличивается при снижении концентрации NaCl в крови (рис. 14.3). В почках альдостерон увеличивает скорость реабсорбции Na^+ (а вместе с ним и Cl^-) в канальцах нефронов, что вызывает задержку NaCl в организме. Вода при этом продолжает выводиться, следовательно, концентрация NaCl повышается, т. е. устраняется стимул, который вызвал секрецию альдостерона.

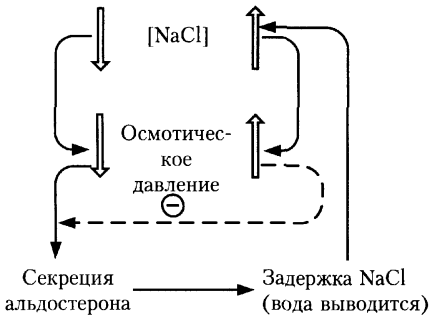


Рис. 14.3. Регуляция осмотического давления жидкостей организма альдостероном

Избыточная секреция альдостерона (гиперальдостеронизм) приводит, соответственно, к избыточной задержке NaCl и повышению осмотического давления внеклеточной жидкости. А это служит сигналом освобождения вазопрессина, который ускоряет реабсорбцию воды в почках. В результате в организме накапливается и NaCl, и вода; объем внеклеточной жидкости увеличивается при сохранении нормального осмотического давления. Ежедневное введение альдостерона человеку приводит к дополнительному накоплению в организме до 400 ммоль NaCl (около 10 г) и до 3 л воды, после чего дальнейшее накопление

прекращается. В результате увеличения объема внеклеточной жидкости повышается кровяное давление.

Система ренин-ангиотензин-альдостерон

Эта система служит главным механизмом регуляции объема жидкости в организме и, следовательно, регуляции объема крови и артериального давления.

Ренин представляет собой протеолитический фермент, синтезирующийся в юкстагломерулярных клетках, окружающих приносящую артериолу почечного клубочка. Юкстагломерулярные клетки являются рецепторами растяжения стенки артериолы; снижение кровяного давления в приносящих артериолах служит сигналом секреции ренина в кровь.

Субстратом ренина является ангиотензиноген — гликопротеин крови, синтезирующийся в печени. Ренин гидролизует пептидную связь между Leu10 и Leu11 в молекуле ангиотензиногена, и от нее отщепляется N-концевой декапептид ангиотензин I (рис. 14.4). Последний превращается в ангиотензин II (октапептид) при действии карбоксидипептидилпептидазы (ангиотензинпревращающий фермент). Этот фермент отщепляет дипептид His-Leu с карбоксильного конца ангиотензина I. Карбоксидипептидилпептидаза имеется в плазматической мембране эндотелия кровеносных сосудов; особенно высока активность этого фермента в легких.

	8 9 10 11
Ангиотензиноген	Asp–Arg–Val–Tyr–Ile–His–Pro–Phe–His–Leu–Leu
	↓
Ангиотензин I	Asp–Arg–Val–Tyr–Ile–His–Pro–Phe–His–Leu
	↓
Ангиотензин II	Asp–Arg–Val–Tyr–Ile–His–Pro–Phe
	↓
Ангиотензин III	Asp–Arg–Val–Tyr–Ile–His–Pro

Рис. 14.4. Образование ангиотензина II

Мишенями ангиотензина II служат гладкомышечные клетки, клетки коры надпочечников, клетки канальцев нефрона. Сигнал передается в клетки через мембранные рецепторы, связанные с инозитолфосфатным механизмом.

Ангиотензин II вызывает сокращение гладкомышечных клеток кровеносных сосудов, и соответственно повышение кровяного давления; это наиболее мощное из известных сосудосуживающих веществ. В коре надпочечников ангиотензины II и III стимулируют синтез альдостерона. В почках ангиотензин II (как и альдостерон) стимулирует реабсорбцию воды и NaCl. Кроме того, ангиотензин II вызывает жажду. Эти свойства ангиотензина II определяют его роль в регуляции водно-солевого обмена.

Ренин-ангиотензиновая система играет важную роль при восстановлении объема крови, который может уменьшиться в результате кровотечения, обильной рвоты, поноса (диарея), потения. На рис. 14.5 представлена последовательность событий при восстановлении объема крови. Сужение сосудов под действием анги-

отензина II играет роль экстренной меры для поддержания кровяного давления. Одновременно начинает действовать система восстановления нормального состояния: поступающие с питьем и пищей вода и NaCl задерживаются в организме в большей мере, чем в норме. В этом процессе участвуют не только ангиотензин II и альдостерон, но и вазопрессин: его секреция в такой ситуации стимулируется барорецепторами. Когда объем внеклеточной жидкости и давление крови достигают нормальных величин, ренин перестает выделяться, уже имеющиеся в крови вещества-регуляторы разрушаются и система приходит в исходное состояние.

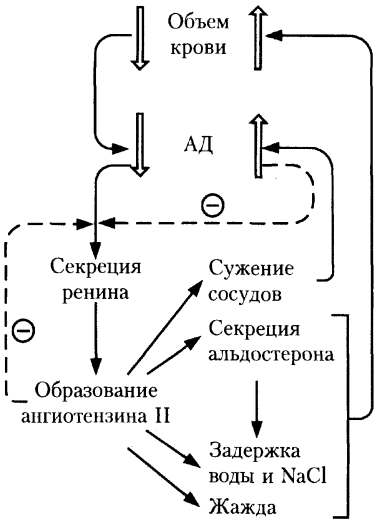


Рис. 14.5. Регуляция объема внеклеточной жидкости и артериального давления ренин-ангиотензиновой системой (АД — артериальное давление)

Снижение перфузионного давления в почечных клубочках может наступить и вследствие сужения (стеноза) почечной артерии. В этом случае также включается вся система, представленная на рис. 14.5. Однако, поскольку исходные объем и давление крови при этом нормальны, включение системы приводит к повышению кровяного давления сверх нормы как вследствие сужения сосудов ангиотензином II, так и вследствие хронической задержки воды и NaCl. Эту форму гипертонии называют почечной.

Значительное уменьшение объема циркулирующей жидкости может стать причиной опасного нарушения кровоснабжения тканей, прежде чем регуляторные системы восстановят давление и объем крови. При этом нарушаются функции всех органов, и прежде всего головного мозга; возникает состояние, которое называют шоком. В развитии шока (а также отеков) существенная роль принадлежит изменению нормального распределения жидкости и альбумина между кровеносным руслом и межклеточным пространством (см. гл. 21).

Атриальный натриуретический пептид

Прогормон атриального натриуретического пептида синтезируется в кардиоцитах атриума, секретируется в кровь, где путем частичного протеолиза превращается в активный гормон атриопептин I — пептид из 28 аминокислотных остатков, содержащий одну дисульфидную связь. В результате отщепления некоторых аминокислот от обоих концов атриопептина I образуется атриопептин II — пептид из 20 аминокислотных остатков, еще более активный гормон.

Образование атриопептина стимулируется при увеличении объема крови и давления крови в магистральных венах. Вазопрессин, альдостерон и ангиотензин участвуют в регуляции водно-солевого баланса, действуя на уровне канальцев нефрона — изменяют скорость реабсорбции компонентов первичной мочи. В отличие от этого атриопептины действуют на уровне образования первичной мочи,

т. е. на уровне клубочков: они снижают тонус афферентных (входящих) артериол и повышают тонус эфферентных (выходящих) артериол. В результате увеличивается разность гидростатического давления в капиллярах клубочка и в полости капсулы клубочка; следовательно, возрастает скорость фильтрации в клубочковом аппарате. Таким образом увеличивается выведение воды и NaCl без существенного изменения концентрации NaCl в моче. Примечательной особенностью действия атриопептинов является то, что они подавляют секрецию ренина, альдостерона и вазопрессина, т. е. выключают все другие механизмы регуляции водно-солевого обмена.

ВОДНО-СОЛЕВОЙ ОБМЕН И СЕКРЕЦИЯ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ СОКОВ

Объем суточной секреции всех пищеварительных желез составляет около 8 л (табл. 14.3). В нормальных условиях вода этих жидкостей вновь всасывается в кишечнике; обильная рвота и диарея, как мы уже упоминали, могут быть причиной драматического снижения объема внеклеточной жидкости и дегидратации тканей. Значительная потеря жидкости с пищеварительными соками влечет за собой повышение концентрации альбумина в плазме крови и межклеточной жидкости, поскольку альбумин с секретами не выводится; по этой причине повышается осмотическое давление в межклеточной жидкости, вода из клеток начинает переходить в межклеточную жидкость и функции клеток нарушаются. Высокое осмотическое давление внеклеточной жидкости приводит также к снижению или даже прекращению образования мочи (анурия), и, если вода и соли не поступают извне, у больного развивается коматозное состояние.

Одним из звеньев регуляции секреции кишечного сока является аденилатциклаза: ее активация стимулирует секрецию, инактивация — прекращает. С активацией аденилатциклазы связано возникновение диареи при острых кишечных инфекциях (сальмонеллезы, дизентерия, холера). При холере аденилатциклаза активируется токсином холерного вибриона, который сходен с дифтерийным токсином (см. гл. 2). Холерный токсин катализирует АДФ-рибозилирование α-протомера белка G, в результате чего этот белок стабилизируется в форме комплекса с ГТФ (см. рис. 7.17), и аденилатциклаза приобретает очень высокую активность независимо от наличия гормонов. Секреция кишечного сока увеличивается примерно в 10 раз, возникают характерные для холеры понос и резкая дегидратация тканей (рис. 14.6).

Таблица 14.3. Суточный объем секреции пищеварительных желез у взрослого человека

Секрет	Объем, л	Секрет	Объем, л
Слюна	1,5	Панкреатический сок	0,7
Желудочный сок	2,5	Кишечный сок	3,0
Желчь	0,5		

При некоторых опухолях поджелудочной железы наблюдается панкреатический холероподобный синдром — сильное обезвоживание из-за интенсивного выделения панкреатического сока, содержащего главным образом воду и электролиты, но мало ферментов.

Рис. 14.6. Цветущая молодая женщина 23 лет (слева) и она же через час после начала приступа холеры и за $^3/_4$ часа до смерти (справа). Рисунок сделан в начале XIX в. во время эпидемии холеры в Европе

РОЛЬ ПОЧЕК В РЕГУЯЦИИ КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОГО РАВНОВЕСИЯ

Значение pH внутриклеточной жидкости варьирует от 4,5 в клетках предстательной железы, а также в лизосомах всех клеток до 8,5 в остеобластах. Желудочный сок имеет pH 1,5–2; вероятно, в обкладочных клетках желудочных желез, точнее — в тех отсеках клеток, где образуется соляная кислота, pH также близок к этому значению. С другой стороны, pH внеклеточной жидкости в норме лежит в пределах 7,36–7,44. Постоянство pH поддерживается буферными системами внеклеточной жидкости, изменением легочной вентиляции (частоты и глубины дыхания) и скорости выделения кислот через почки. При патологии возможности регуляторных механизмов могут быть превышены и возникает ацидоз или алкалоз. Пределы отклонения pH от нормы, совместимые с жизнью, — до 7,0 при ацидозе и до 7,8 при алкалозе.

Главным буфером внеклеточной жидкости служит система угольной кислоты:

Равновесие в этой системе устанавливается довольно быстро даже в водном растворе; в организме же достижение равновесия дополнительно ускоряется действием фермента карбоангидразы, которая катализирует более медленную реакцию из двух реакций системы:

$$HCO^-_3 + H^+ \rightleftarrows H_2CO_3 \rightleftarrows H_2O + CO_2$$

Карбоангидраза имеется в эритроцитах, в почках, печени и многих других тканях.

Значение pH определяется отношением $[HCO^-_3]$ / $[CO_2]$. При pH 7,4 оно равно 20:1; уменьшение этого отношения означает снижение pH, ацидоз; увеличе-

$$H_2CO_3 \rightleftarrows H_2O + CO_2$$

ние — повышение pH, алкалоз. Определенное количество кислот и щелочей может связываться этой системой за счет буферной емкости без изменения pH (компенсированный ацидоз или алкалоз).

Отношение $[HCO^-_3]$ / $[CO_2]$ может возрастать или понижаться в результате изменения как $[HCO^-_3]$, так и $[CO_2]$. Концентрация CO_2 в крови зависит от скорости его удаления через легкие, и по этой причине при нарушениях дыхательной функции изменяется pH внеклеточной жидкости (дыхательный ацидоз или алка-

лоз). Концентрация HCO^-_3 изменяется главным образом в результате метаболических нарушений, например уменьшается при повышении концентрации кетоновых тел (метаболический ацидоз).

Почки участвуют в регуляции кислотно-щелочного равновесия, изменяя выделение H^+. Как уже было отмечено выше, pH мочи может изменяться в пределах от 4,6 до 8,0, т. е. концентрация H^+ в предельно кислой моче более чем в 1000 раз превышает концентрацию в предельно щелочной моче. Ионы водорода выделяются или в составе недиссоциированных кислот, например ацетоуксусной кислоты, или в составе NH^+_4 (см. рис. 11.20).

Кроме того, клетки почек могут поставлять в кровь дополнительные количества иона HCO^-_3, образующегося в результате окисления метаболитов:

Затем H^+ (кислота) выводится из клеток в канальцы нефрона (по механизму антипорта с Na^+) и экскретируется с мочой, а HCO^-_3 (щелочь) из почечных клеток переходит в кровь в форме $NaHCO_3$, понижая ее кислотность (рис. 14.7). Не исключено, что этот механизм является основным при компенсации ацидоза.

$$\text{Метаболиты} + O_2 \rightarrow CO_2$$

$$CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3 \rightleftarrows HCO^-_3 + H^+$$

Пища животного происхождения имеет кислый зольный остаток, обусловленный главным образом фосфатами. Поэтому и моча в норме обычно имеет более кислую реакцию, чем кровь (pH 5,5–6,5), в связи с постоянным выделением избытка кислот.

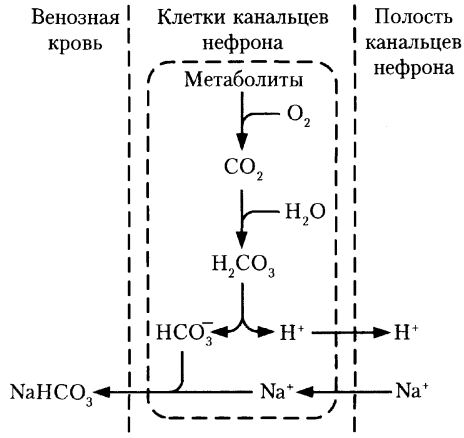


Рис. 14.7. Компенсация ацидоза за счет окисления метаболитов в почках

Гормоны непосредственно не участвуют в регуляции pH внеклеточной жидкости, однако как вторичное явление нарушение кислотно-щелочного равновесия наблюдается при ряде заболеваний эндокринной системы, например ацидоз при сахарном диабете.

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА МОЧИ

Главная проблема, которая решается нефронами почек, заключается в разделении потока веществ, поступающих из крови, на два потока разного химического состава: все ценное для организма (глюкоза, аминокислоты, витамины и др.) возвращается в кровь, а конечные продукты обмена направляются в мочу. Конечно, при этом происходит некоторая утечка и полезных веществ плазмы, но их концентрация в окончательной моче невелика. Если в крови концентрация какого-либо вещества увеличивается, то и с мочой его выводится больше. Другой причиной увеличения скорости выведения веществ является нарушение функции почек. При этом нарушение избирательности реабсорбции может быть специфичным (например, для какой-нибудь одной аминокислоты) или общим. Последнее наблюдается, в частности, при воспалительных заболеваниях почек. Таким образом, при любой болезни, сопровождающейся изменением состава крови или нарушением выделительной функции почек, изменяется состав мочи, причем часто характерным для данной болезни образом. На этом основано применение анализа мочи для диагностики болезней. Наиболее часто в моче измеряют концентрацию глюкозы, креатинина, кетоновых тел, билирубина, уробилина, белков. Во многих специальных случаях определяют и другие вещества, как минеральные, так и органические.

КАМНИ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ

Мочекаменная болезнь очень распространена: она поражает около 1 % людей, обычно в среднем и пожилом возрасте. Камни мочевых путей образуются из кристаллов солей щавелевой кислоты (оксалатные камни), $Ca_3(PO_4)_2$, $MgNH_4PO_4$, $CaCO_3$, мочевой кислоты, цистина. Отдельный камень образуется не путем кристаллизации, а путем агрегации уже сформировавшихся кристаллов. Обычно камни содержат смесь кристаллов разных солей, но какие-либо из них могут быть в преобладающих количествах; наиболее часто (примерно в половине случаев) встречаются камни с преобладанием оксалатов.

Все перечисленные компоненты в нормальной моче содержатся в более высоких концентрациях, чем можно было бы растворить в воде. Часть из них находится в растворенном состоянии, часть — в форме микроскопических кристаллов. Кроме того, в моче содержатся вещества, препятствующие осаждению солей-камнеобразователей — ионы магния, пирофосфат, гликозамингликаны (особенно гепарин и хондроитинсульфаты). Уменьшение концентрации этих веществ или увеличение концентрации солей-камнеобразователей приводит к кристаллизации солей и агрегации кристаллов. Кроме того, образование камней может быть связано с изменением pH мочи: в кислой моче образуются оксалатные и уратные камни, в щелочной — фосфатные и карбонатные. Образование камня — процесс необратимый: в моче камни не растворяются. Попытки создать лекарства, растворяющие камни в мочевых путях, пока не привели к заметному успеху, и камни приходится удалять хирургическим путем.

Глава 15

РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА УГЛЕВОДОВ, ЖИРОВ И АМИНОКИСЛОТ

Наиболее интенсивный поток веществ в организме связан с использованием углеводов и жиров (в меньшей мере аминокислот) в качестве источников энергии. Основными энергоносителями, которые через кровоток распределяются по органам, служат глюкоза, жиры липопротеинов, жирные кислоты и кетоновые тела (рис. 15.1). Главными их продуцентами являются печень и жировая ткань; потребляют эти энергоносители все органы, но в количественном отношении первое место принадлежит мышечной ткани вследствие ее значительной массы и большой энергоемкости физической работы.

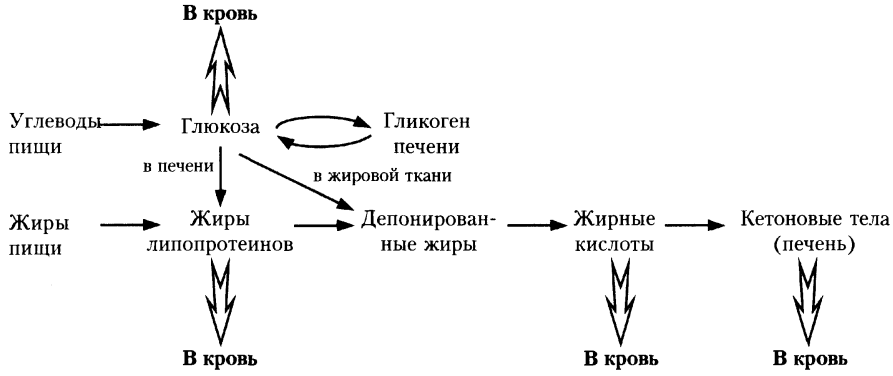


Рис. 15.1. Основные энергоносители, транспортируемые кровью

После приема смешанной пищи переваривание углеводов заканчивается примерно через 2 ч, переваривание белков и жиров — через 4–5 ч: это период пищеварения (абсорбтивный период). За ним следует постабсорбтивный период. У человека при трехразовом питании на периоды пищеварения приходится 10–15 ч в сутки, а расход энергии происходит в течение всех 24 ч (с определенным снижением в часы ночного сна). Поэтому часть энергоносителей во время пищеварения складируется для использования в постабсорбтивном состоянии (рис. 15.2).

Рис. 15.2. Пути использования основных энергоносителей:
1 и *2* — при пищеварении; *3* — в постабсорбтивном периоде; *4* — постоянно (при голодании глюкоза используется преимущественно нервной тканью, в то время как другие ткани используют преимущественно жирные кислоты)

Режим запасания включается после приема пищи и сменяется режимом мобилизации запасов после завершения пищеварения.

При переходе от одного периода к другому происходят значительные изменения метаболизма: для первого периода характерны процессы депонирования углеводов (в форме гликогена), депонирования жиров, преимущественное использование глюкозы для обеспечения энергетических потребностей; для второго периода характерны мобилизация депонированных углеводов и жиров, преимущественное использование жиров, а также аминокислот в качестве источников энергии.

Следовательно, у человека при обычном трехразовом питании смена режимов происходит трижды за сутки. Однако при этом смена режимов выражена нечетко, поскольку в течение дня промежутки между приемами пищи небольшие (5–6 ч), и постабсорбтивный период едва успевает начаться (если вообще успевает), как наступает время очередного приема пищи. Типичным постабсорбтивным состоянием считают состояние утром до завтрака, после примерно десятичасового ночного перерыва в приеме пищи. Еще более наглядную картину дает модель ритма питания, которой придерживался великий немецкий философ Э. Кант: он принимал пищу раз в сутки. За сутки исчерпываются запасы гликогена в организме, единственным источником глюкозы становится глюконеогенез, глюкоза используется преимущественно нервными клетками, в то время как почти все другие клетки обеспечиваются энергией за счет окисления жирных кислот, а также кетоновых тел, образующихся в печени из жирных кислот. Эту модель мы и будем иметь в виду, рассматривая смену режимов обмена энергоносителей.

Печень, жировая ткань и мышцы — главные органы, связанные со сменой режимов запасания и использования энергоносителей. Переключение метаболизма при смене периодов пищеварения и постабсорбтивного состояния и поддержание концентрации глюкозы в крови обеспечиваются системой регуляторных механизмов, включающих гормоны инсулин, глюкагон, адреналин, кортизол.

Мышечная работа во время пищеварения замедляет процессы запасания, так как при этом часть поступающих из кишечника продуктов переваривания непосредственно расходуется в мышцах. В постабсорбтивном состоянии мышечная работа стимулирует мобилизацию запасов, главным образом жиров. В регуляции изменений, связанных со сменой покоя и мышечной работы, важная роль принадлежит адреналину.

На рис. 15.3 представлены пути превращений глюкозы и жиров, а также белков и аминокислот. Как видно, при смене режимов многие процессы меняют направление на противоположное. За каждой из стрелок скрывается серия реакций; ферменты, катализирующие ключевые реакции (лимитирующие скорость данной метаболической цепи), находятся под контролем многих регулирующих механизмов, включающих в качестве первого (внеклеточного) вестника сигнала главным образом инсулин и глюкагон, а также адреналин и кортизол.

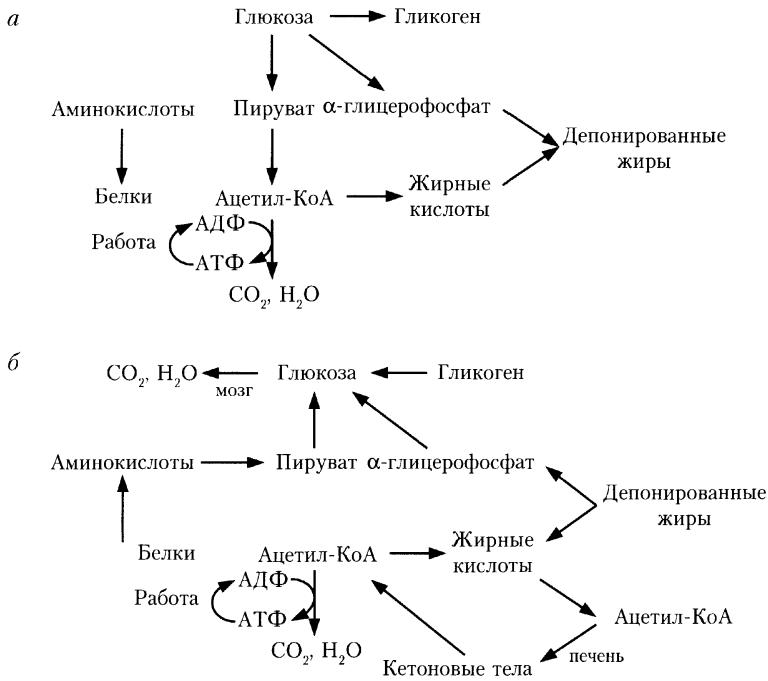


Рис. 15.3. Метаболизм основных энергоносителей в абсорбтивном (*а*) и постабсорбтивном (*б*) периодах

КОНЦЕНТРАЦИЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

Одним из результатов регуляции обмена энергоносителей является поддержание концентрации глюкозы в крови на относительно постоянном уровне.

Концентрация глюкозы в крови определяется балансом скоростей ее поступления в кровь, с одной стороны, и потребления тканями — с другой. В постабсорбтивном состоянии в норме концентрация глюкозы в крови равна 60–100 мг/дл (3,3–5,5 ммоль/л); более высокая концентрация (гиперглюкоземия) указывает на нарушение обмена углеводов. После приема пищи или раствора сахара (сахарная нагрузка) гиперглюкоземия бывает и у здоровых людей — алиментарная гиперглюкоземия. Обычно она не превышает 150 мг/дл и начинает снижаться через 1–1,5 ч после еды. При нарушениях углеводного обмена (стероидный диабет, сахарный диабет) алиментарная гиперглюкоземия превышает 150 мг/дл и держится

дольше, т. е. имеет место снижение толерантности к глюкозе. Толерантность к глюкозе измеряют с целью диагностики нарушений углеводного обмена. Обследуемому дают выпить раствор сахара из расчета 1 г на 1 кг массы тела (сахарная нагрузка) и через каждые 30 мин берут пробы крови для определения концентрации глюкозы. Типичные результаты измерения толерантности приведены на рис. 15.4.

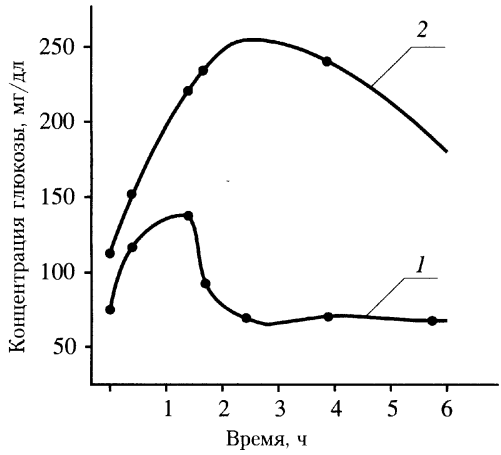


Рис. 15.4. Измерение толерантности к глюкозе у здорового человека (*1*) и у больного сахарным диабетом (*2*)

Если гиперглюкоземия превышает почечный порог, т. е. величину 180 мг/дл, то глюкоза начинает выводиться с мочой (глюкозурия). Глюкозурия свидетельствует о нарушении углеводного обмена или о повреждении почек.

При некоторых патологических состояниях, в частности при голодании, возникает гипоглюкоземия. Снижение концентрации глюкозы в крови до 40 мг/дл приводит к возникновению судорог и других симптомов нарушения функций головного мозга вследствие нарушения его питания.

КОРТИЗОЛ И РЕГУЛЯЦИЯ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА

В постабсорбтивном состоянии по мере исчерпания запасов гликогена в печени стимулируется глюконеогенез. Существенная роль в регуляции глюконеогенеза в этих условиях принадлежит глюкокортикостероидам, основным из которых является кортизол.

Если животному или человеку ввести кортизол, наблюдается повышение концентрации глюкозы в крови, причем это происходит даже при отсутствии запасов гликогена в печени. Одновременно повышается образование и выделение мочевины. Отсюда следует, что глюкоза, появляющаяся в крови, образуется из аминокислот.

Усиление глюконеогенеза из аминокислот является результатом следующих двух процессов, вызываемых кортизолом:

1. Кортизол сильно тормозит синтез белков в мышцах и других тканях, за исключением печени. Вследствие этого концентрация аминокислот в тканях и крови повышается, и они могут быть использованы для глюконеогенеза в печени и почках.
2. В печени кортизол стимулирует синтез белков, в частности ферментов, участвующих в глюконеогенезе (тирозинаминотрансфераза, триптофанпирролаза, серин-треонин-дегидратаза, карбоксикиназа фосфоенолпирувата). Содержание этих ферментов в гепатоцитах может повышаться в несколько раз, соответственно увеличивается и скорость глюконеогенеза.

Сигналом для стимуляции глюконеогенеза служит снижение концентрации глюкозы в крови. Однако этот сигнал действует не непосредственно на надпочечники, а через цепь других сигналов (рис. 15.5). Контрольные механизмы центральной нервной системы реагируют на снижение концентрации глюкозы в крови и стимулируют секрецию клетками гипоталамуса кортикотропин-либерина. Либерин по отросткам нейронов поступает в гипофиз, где стимулирует секрецию кортикотропина (адренокортикотропный гормон). Кортикотропин — это пептидный гормон, построенный из 39 аминокислотных остатков. Он улавливается специфическими рецепторами мембран клеток коры надпочечников и через аденилатциклазную систему активирует ряд ферментов, участвующих в синтезе кортизола.

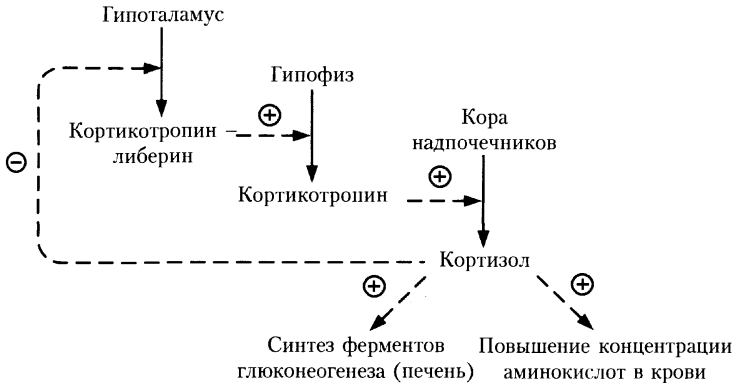


Рис. 15.5. Регуляция секреции кортизола

Избыточное образование глюкокортикостероидов предотвращается механизмом отрицательной обратной связи: кортизол подавляет секрецию кортикотропин-либерина и тем самым прерывает цепь событий, ведущих к образованию кортизола (см. рис. 15.5).

Скорость глюконеогенеза у человека может изменяться от нуля до примерно 4 г за 1 ч (около 100 г за сутки). В ближайшие часы после приема пищи, богатой углеводами, она минимальна, а затем нарастает по мере исчерпания запасов гликогена в печени, достигая максимума при голодании в течение нескольких часов.

Напомним, что глюконеогенез происходит в печени, в корковом слое почек и клетках кишечника.

Кортизол и стресс

Синтез и секреция кортизола стимулируются не только при гипогликемии, но и при других стрессовых воздействиях (травма, высокая температура, переохлаждение, чрезмерная физическая нагрузка, инфекция, громкий звук и т. п.). Стрессовые воздействия вызывают ответную реакцию организма, направленную на устранение опасных последствий стресса. Стрессовое состояние детектируется центральной нервной системой, сигналы которой стимулируют секрецию кортикотропин-либерина в гипоталамусе, и далее синтез и секрецию кортизола в надпочечниках, как показано на рис. 15.5. Стресс часто (но не всегда) сопровождается гипогликемией, и поэтому стимуляция глюкогенеза кортизолом является антистрессовым фактором. Но, кроме того, кортизол оказывает многообразное действие на ряд клеток, тоже имеющее антистрессовое значение, в частности стимулирует синтез специфических белков, участвующих в репарации поврежденных клеток. В реакции на стресс участвуют и другие гормоны (адреналин, инсулин, глюкагон), а также ряд цитокинов.

БОЛЕЗНЬ ИЦЕНКО—КУШИНГА

Болезнь Иценко—Кушинга характеризуется избыточным образованием кортикостероидов, главным образом кортизола. Такое состояние (гиперкортицизм) может возникать при опухоли надпочечника, когда увеличивается масса ткани, продуцирующей кортикостероиды; при опухоли гипофиза и связанной с этим повышенной продукцией кортикотропина; при нарушениях образования либеринов в гипоталамусе. Гиперкортицизм может быть также следствием развития опухолей, выделяющих кортикотропинподобные вещества, в тимусе, бронхах, поджелудочной железе и др.

Один из симптомов болезни Иценко—Кушинга — снижение толерантности к глюкозе, т. е. превышающая норму гиперглюкоземия после еды или сахарной нагрузки. В тяжелых случаях гиперглюкоземия имеет место и в постабсорбтивном состоянии. Концентрация глюкозы в крови может превышать почечный барьер, и тогда возникает глюкозурия. Такое состояние называют стероидным диабетом. Снижение толерантности к глюкозе и гиперглюкоземия связаны с повышенным катаболизмом белков и глюконеогенезом из аминокислот.

Характерным проявлением гиперкортицизма является также остеопороз — изменение состава, главным образом минерального, костной ткани, в результате чего прочность кости резко снижается. Кортизол ингибирует активность и синтез некоторых ферментов, участвующих в образовании коллагена и гликозаминогликанов. Именно по этой причине происходит атрофия кожи в местах продолжительного введения кортизола. При гиперкортицизме синтез коллагена нарушается и в костях, а вследствие этого нарушается включение в костную ткань солей кальция и фосфатов: при болезни Иценко—Кушинга имеет место отрицательный баланс этих солей.

Гипертония, почти всегда сопровождающая болезнь Иценко—Кушинга, отчасти связана с повышенной продукцией другого гормона коры надпочечников — альдостерона (гиперальдостеронизм). Однако следует отметить, что все кортико-

стероиды в той или иной мере обладают смешанным действием. В частности, кортизол не только стимулирует глюконеогенез, но и вызывает задержку NaCl. В этом отношении он в сотни раз менее активен, чем альдостерон, однако, учитывая его более высокую концентрацию в крови (на два порядка), можно думать, что кортизол при гиперкортицизме вносит заметный вклад в развитие гипертонии.

При лечении гиперкортицизма применяют вещества, ингибирующие синтез кортизола. Одним из таких веществ является хлодитан — производное дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ). Токсичность ДДТ для животных обусловлена тем, что он нарушает обмен стероидов.

ИНСУЛИН И ГЛЮКАГОН

История открытия и изучения инсулина тесно переплетается с поисками причин, механизмов развития и способов лечения сахарного диабета — одного из самых распространенных и тяжелых заболеваний человека. В конце XIX в. было установлено, что у животных после удаления поджелудочной железы появляются гипергликоземия, глюкозурия и другие симптомы диабета. В 1900 г. Л. В. Соболев обнаружил, что после перевязки протоков поджелудочной железы железистая ткань атрофируется, а панкреатические островки сохраняются. Диабет при этом не возникает. Эти результаты, наряду с известным фактом изменения островков у больных диабетом, позволили Соболеву сделать заключение, что панкреатические островки необходимы для регуляции углеводного обмена. Канадские исследователи Бантинг и Бест в 1922 г. впервые успешно применили очищенные препараты инсулина для лечения диабета. В 50-е годы была установлена структура инсулина.

Синтез и секреция инсулина

Ген инсулина в геноме человека представлен единственной копией. Инсулин образуется в β-клетках панкреатических островков. Превращение проинсулина в инсулин (см. рис. 4.19) происходит в пластинчатом комплексе и секреторных гранулах. Таким образом, в секреторных гранулах содержатся (и секретируются из них) инсулин и С-пептид в эквимолярных количествах. Глюкоза стимулирует секрецию инсулина. На рис. 15.6 показаны изменения концентрации инсулина в крови человека после приема пищи. Одновременно со стимуляцией β-клеток к секреции инсулина происходит ингибирование секреции глюкагона из α-клеток панкреатических островков. Глюкагон в крови в постабсорбтивном состоянии содержится в очень небольшой концентрации — около 150 пг/мл; в постабсорбтивном периоде концентрация еще ниже — примерно 70 пг/мл.

Время полураспада инсулина в крови 3–10 мин, С-пептида — около 30 мин. Кровь при однократном прохождении через печень теряет до 60 % инсулина. В почках задерживается до 40 % инсулина, содержащегося в протекающей через почки крови, причем в клубочках инсулин фильтруется, а затем, наряду с другими белками первичной мочи (альбумин, гемоглобин и др.), реабсорбируется и разрушается в клетках проксимальных канальцев.

Регуляция секреции инсулина зависит от глюкозосенсорной системы β-клеток, обеспечивающей пропорциональность между концентрацией глюкозы в крови и

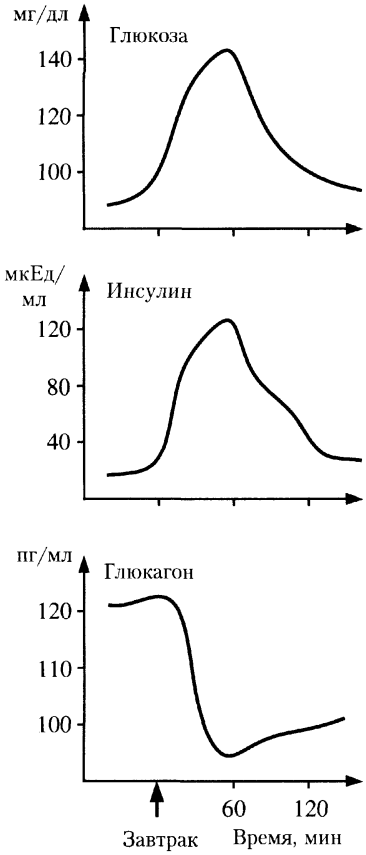


Рис. 15.6. Изменение концентраций в крови глюкозы, инсулина и глюкагона после приема пищи. 1 Ед инсулина содержит 0,4081 мг белка инсулина

секрецией инсулина. Потребление глюкозы β-клетками происходит при участии ГЛЮТ-2 (основной переносчик глюкозы в β-клетках человека). Эта стадия не является лимитирующей: концентрация глюкозы в клетке быстро уравнивается с концентрацией в крови. В β-клетках глюкоза превращается в глюкозо-6-фосфат глюкокиназой (как и в глюкозосинтезирующих органах — печени, почках), имеющей высокую K_M для глюкозы — 12 мМ. Вследствие этого скорость фосфорилирования глюкозы практически линейно зависит от ее концентрации в крови. Кроме того, глюкокиназа в β-клетках — лимитирующее звено гликолиза. Поэтому глюкокиназа, вероятно, основной (но не единственный) элемент глюкозосенсорной системы β-клеток. Мутации глюкокиназы приводят к развитию одной из форм сахарного диабета — диабет 1 типа у взрослых (см. ниже).

Специфический ингибитор глюкокиназы манногептулоза подавляет стимуляцию глюкозой синтеза и секреции инсулина. Это указывает на то, что непосредственные сигналы, регулирующие синтез и секрецию инсулина, образуются в результате метаболизма глюкозы. Природа этих молекул неизвестна. Ряд данных указывает на участие в регуляции секреции инсулина не только гликолиза, но и митохондриальных процессов. В частности, существенное значение могут иметь анаплеротические реакции: пируват → оксалоацетат, глутамат → α-кетоглутарат и др. Эти реакции увеличивают количество компонентов цитратного цикла, а следовательно, и его мощность. Стимулированная глюкозой секреция инсулина усиливается некоторыми аминокислотами (особенно аргинином и лизином), кетоновыми телами и жирными кислотами. Таким образом, в стимуляции секреции участвует не только глюкоза, но все основные энергоносители. Иначе говоря, секреция инсулина пропорциональна калорийности потребляемой пищи.

Популяция β-клеток в островках неоднородна. В частности, есть клетки с различной чувствительностью к глюкозе. Это еще один элемент глюкозосенсорного механизма: при высокой концентрации глюкозы увеличивается число клеток, секретирующих инсулин.

Синтез и секреция глюкагона

Глюкагон — небольшой белок, содержит 29 аминокислотных остатков. Проглюкагон (160 аминокислотных остатков) синтезируется α-клетками панкреатических

островков в поджелудочной железе, а также специализированными нейроэндокринными клетками кишечника (L-клетки) и некоторыми клетками ЦНС. В результате процессинга проглюкагона образуется ряд пептидов, неодинаковых в поджелудочной железе и в клетках кишечника. Основным источником глюкагона крови являются α-клетки панкреатических островков. Глюкоза и инсулин подавляют секрецию глюкагона, а аминокислоты, особенно аланин, стимулируют. Глюкагон из крови активно поглощается печенью и почками; время полужизни глюкагона в крови составляет только 3–5 мин.

Общие мишени инсулина и глюкагона

Главным органом-мишенью для глюкагона служит печень, где он стимулирует распад гликогена и глюконеогенез: рецептор глюкагона вместе с соответствующими G-белками активирует аденилатциклазу, а цАМФ активирует цАМФ-зависимые протеинкиназы.

Первичным сигналом для смены абсорбтивного и постабсорбтивного режимов являются изменение концентрации глюкозы в крови и вызванные этим реципрокные изменения концентраций инсулина и глюкагона. Регуляцию метаболизма инсулином и глюкагоном невозможно рассматривать по отдельности. В крови постоянно присутствуют оба гормона, однако изменяются их относительные концентрации. Действие каждого из них часто направлено на одни и те же конкретные мишени. Например, глюкагон через цАМФ-зависимые протеинкиназы одновременно ингибирует гликогенсинтетазу и активирует гликогенфосфорилазу в печени (см. рис. 9.26), а инсулин через свой рецептор одновременно активирует гликогенсинтетазу и ингибирует гликогенфосфорилазу (рис. 15.7).

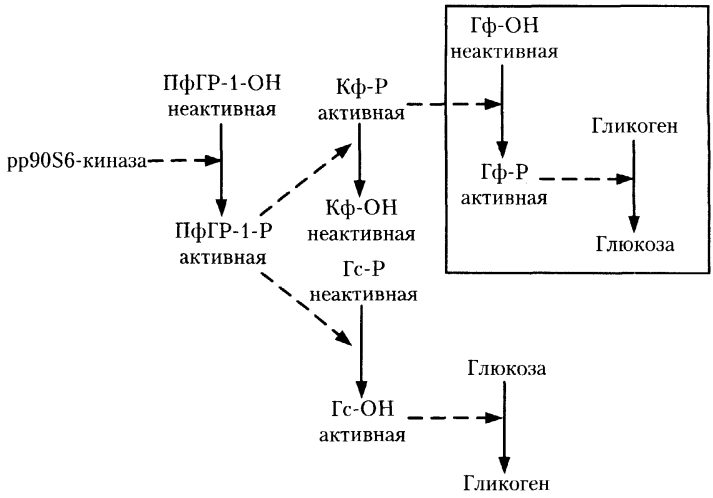


Рис. 15.7. Регуляция синтеза гликогена инсулином:

pp90S6-киназа — одна из протеинкиназ, активируемых рецептором инсулина; ПФГр-1 — протеинфосфатаза гранул гликогена; КФ — киназа гликогенфосфорилазы; ГФ — гликогенфосфорилаза; ГС — гликогенсинтетаза. В рамке — процессы, которые при стимуляции клетки инсулином прекращаются вследствие дефосфорилирования киназы гликогенфосфорилазы

Глюкагон в жировых клетках через аденилатциклазную систему активирует цАМФ-зависимую липазу и тем самым включает процесс мобилизации жиров (см. рис. 10.8). Инсулин, наоборот, выключает мобилизацию (рис. 15.8). В результате каскада реакций, инициируемых рецептором инсулина, фосфорилируется (и активируется) протеинкиназа В, которая фосфорилирует (и тоже активирует) фосфодиэстеразу цАМФ. Концентрация цАМФ снижается, а в таких условиях липаза находится в нефосфорилированном неактивном состоянии. И еще пример: инсулин не уменьшает базальную скорость глюконеогенеза, а только стимулированную глюкагоном. На рис. 15.9 показаны некоторые другие мишени метаболических путей глюкозы в печени, общие для инсулина и глюкагона. Кроме того, инсулин снижает секрецию и самого глюкагона.

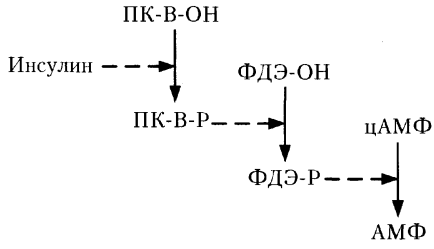


Рис. 15.8. Выключение мобилизации жиров инсулином:

ПКВ — протеинкиназа В; ФДЭ — фосфодиэстераза цАМФ

Глюкоза проникает в гепатоциты (как и в β-клетки) путем облегченной диффузии при участии ГЛЮТ-2, независимого от инсулина и имеющего высокую $K_м$. В гепатоцитах глюкоза быстро превращается в глюкозо-6-фосфат глюкокиназой (гексокиназой IV), которая тоже имеет высокую $K_м$ (12 мМ) и не ингибируется продуктом реакции (в отличие от других гексокиназ). Далее глюкозо-6-фосфат может использоваться по двум направлениям — синтез гликогена и синтез жиров. При синтезе гликогена глюкозо-6-фосфат превращается в глюкозо-1-фосфат, который непосредственно включается в гликоген. Синтез жиров гораздо сложнее: он включает гликолиз (для образования глицерина и пирувата), окислительное декарбоксилирование пирувата, пентозофосфатный путь, синтез жирных кислот и синтез жиров. В печени необратимые реакции этих путей стимулируются инсулином и подавляются глюкагоном. Необратимые реакции глюконеогенеза, наоборот, подавляются инсулином и стимулируются глюкагоном.

При пищеварении существенная часть ацетил-КоА превращается в малонил-КоА и далее в жирные кислоты и жиры. Малонил-КоА, концентрация которого в этих условиях значительна, ингибирует транспорт жирных кислот в митохондрии и, следовательно, их окисления и образования кетоновых тел не происходит (см. рис. 10.22). Мобилизация депонированных жиров в этих условиях заторможена высокой концентрацией инсулина. Все органы в качестве источника энергии используют главным образом глюкозу, а также жиры липопротеинов.

В постабсорбтивном состоянии при высокой концентрации глюкагона ингибирован синтез малонил-КоА. Концентрация малонил-КоА снижается, становится возможным транспорт жирных кислот в митохондрии и их β-окисление. В результате уменьшения концентрации инсулина и увеличения концентрации глюкагона усиливаются мобилизация депонированных жиров и снабжение печени жирными кислотами. Ацетил-КоА в печени в этих условиях превращается в кетоновые тела. Основными источниками энергии для инсулинзависимых органов в этих условиях служат жирные кислоты и кетоновые тела. Клетки мозга и другие незави-

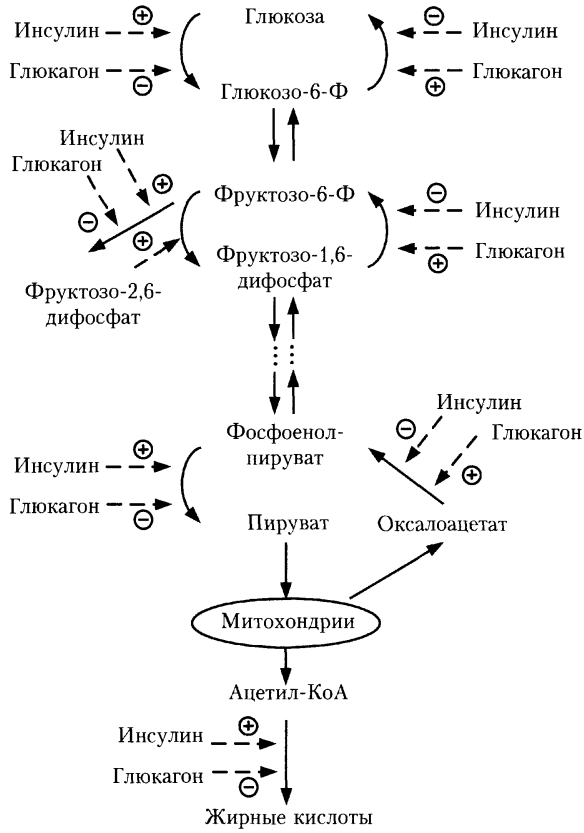


Рис. 15.9. Действие инсулина и глюкагона на метаболизм глюкозы и жиров в печени: (+) — активация, (–) — ингибирование

симые от инсулина клетки обеспечиваются глюкозой за счет ее синтеза из аминокислот и глицерина.

Следует отметить, что состояние обмена основных энергоносителей зависит и от многих других гормонов. В частности, соматотропин (гормон роста) стимулирует поступление глюкозы в мышечные и жировые клетки, но в отличие от инсулина не подавляет, а активирует глюконеогенез в печени. Кроме того, соматотропин стимулирует секрецию инсулина и глюкагона, в то время как другой гормон — соматостатин — ингибирует ее. Андрогены и тироксин увеличивают скорость синтеза белков и скорость окисления глюкозы. По-видимому, основная функция перечисленных гормонов — регуляция анаболических процессов, связанных с ростом и морфогенезом, а их влияние на энергетический обмен углеводов, жиров и аминокислот является вторичным.

ИЗМЕНЕНИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ ПРИ ГОЛОДАНИИ

Голодание может быть неполным (недоедание) и полным. Главные патологические проявления неполного голодания связаны с белковой недостаточностью.

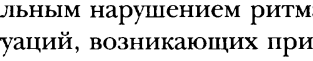
В этом разделе рассмотрены биохимические изменения при полном голодании, которое можно считать экстремальным нарушением ритма питания.

Полное голодание, кроме ситуаций, возникающих при катастрофах и стихийных бедствиях, нередко связано с болезнями пищеварительного тракта и невозможностью потребления пищи, а также с психическими заболеваниями, когда больные отказываются от еды. Кроме того, полным голоданием лечат некоторые болезни.

В изменениях обмена веществ при полном голодании можно выделить три фазы.

Первая фаза следует за постабсорбтивным периодом и продолжается примерно сутки. За это время исчерпываются запасы гликогена; концентрация инсулина в крови снижается в 10–15 раз по сравнению с периодом пищеварения, а концентрации глюкагона и кортизола увеличиваются. В результате изменения гормонального статуса и действия внутриклеточных механизмов регуляции нарастает скорость мобилизации жиров и скорость глюконеогенеза из аминокислот и глицерина. Тем не менее концентрация глюкозы в крови уменьшается до нижних пределов нормы (близка к 60 мг/дл) и на этом уровне поддерживается и в последующие периоды голодания (за счет глюконеогенеза).

Вторая фаза длится около одной недели. Мобилизация жиров продолжается, концентрация жирных кислот в крови увеличивается примерно вдвое по сравнению с постабсорбтивным состоянием (рис. 15.10). Увеличивается образование кетоновых тел в печени и их концентрация в крови. В результате становится заметной скорость реакции неферментативного декарбоксилирования ацетоуксусной кислоты с образованием ацетона:



$$CH_3{-}CO{-}CH_2{-}COOH \rightarrow CH_3{-}CO{-}CH_3 + CO_2.$$

Ацетон не используется в организме и выводится главным образом с выдыхаемым воздухом и через кожу: уже на третий–четвертый день ощущается запах ацетона изо рта и от кожи голодающего человека. В этой фазе энергетические потребности мышц и большинства других органов удовлетворяются за счет жирных кислот и кетоновых тел. Поскольку концентрация инсулина в крови при голодании

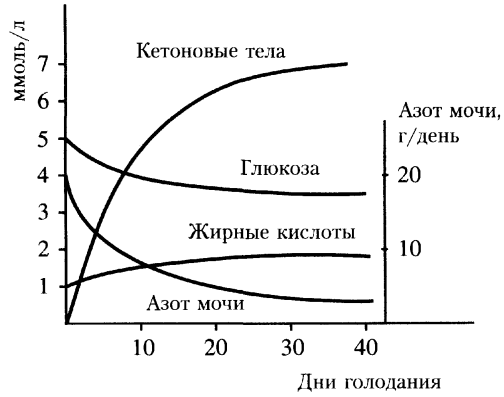


Рис. 15.10. Изменения концентрации энергоносителей в крови при голодании

очень низка, глюкоза в мышечные клетки не проникает. Потребителями глюкозы в этих условиях становятся только инсулинонезависимые клетки, и прежде всего клетки мозга. Однако и в мозге в этом периоде часть энергетических потребностей обеспечивается кетоновыми телами. Глюконеогенез продолжается за счет распада тканевых белков. Интенсивность обмена веществ в целом снижена: через неделю голодания потребление кислорода уменьшается примерно на 40 %.

Третья фаза продолжается несколько недель. Скорость распада белков стабилизируется на уровне примерно 20 г в сутки; при распаде такого количества белков образуется и выводится около 5 г мочевины в сутки (при обычном питании — 20–25 г). Азотистый баланс во все фазы голодания отрицательный, поскольку поступление азота равно нулю. Соответственно снижению скорости распада белков уменьшается и скорость глюконеогенеза. В этой фазе и для мозга основным источником энергии становятся кетоновые тела. Если в этой фазе ввести аланин или другие гликогенные аминокислоты, немедленно повышается концентрация глюкозы в крови и снижается концентрация кетоновых тел.

При продолжении голодания нарастает атрофия тканей: через несколько недель (обычно от 4 до 8) масса сердечной мышцы и мозга уменьшается на 3–4 %, скелетных мышц — на $^1/_3$, печени — вдвое. В теле человека массой 70 кг имеется около 15 кг белков; после израсходования от $^1/_3$ до $^1/_2$ всех белков наступает гибель.

САХАРНЫЙ ДИАБЕТ

Сахарный диабет является следствием нарушения инсулиновой регуляции функций ряда клеток организма. Нарушение регуляции может быть связано со снижением образования инсулина (диабет 1 типа, инсулинзависимый диабет, ИЗСД) или с повреждением механизмов трансдукции инсулинового сигнала, причем концентрация инсулина в крови может быть нормальной или даже повышенной (диабет 2 типа, инсулинонезависимый диабет, ИНСД). Характерным признаком сахарного диабета как 1, так и 2 типа является гиперглюкоземия, как после приема пищи, так и натощак, а также глюкозурия. Тяжелыми клиническими проявлениями являются острые осложнения диабета — коматозные состояния, связанные с ацидозом и нарушением водно-солевого обмена. Поздние осложнения диабета — микроангиопатии (нефропатия, ретинопатия и др.) и макроангиопатии часто приводят к ранней инвалидизации больных. Сахарный диабет — распространенная болезнь, занимает третье место среди причин смертности после сердечно-сосудистых заболеваний и рака. В мире около 100 млн человек страдает сахарным диабетом, и это число увеличивается: каждые 10–15 лет число больных диабетом во всех странах мира удваивается. Наибольшему риску заболевания подвержено население развивающихся стран и группы малообеспеченных лиц в индустриально развитых странах.

Диабет 2 типа начинается в зрелом возрасте, обычно после 40 лет, развивается постепенно, симптомы выражены умеренно, острые осложнения бывают редко. Диабет 1 типа начинается обычно в юношеском возрасте, иногда в детстве, иногда у взрослых. Он является следствием аутоиммунного разрушения β-клеток в островках поджелудочной железы. В результате дефицита инсулина нарушается склади-

рование энергоносителей и проявляется клиническая картина ИЗСД. Диабет 1 типа протекает гораздо более тяжело, чем диабет 2 типа. При недостаточном врачебном контроле нередки острые осложнения. Распространенность диабета 1 типа почти в 10 раз меньше, чем диабета 2 типа.

Сахарный диабет в силу его высокой распространенности, ранней инвалидизации и уменьшения продолжительности жизни больных является одной из важнейших медико-социальных проблем.

Изучение механизмов инсулиновой регуляции, этиологии и патогенеза сахарного диабета, поиски новых методов лечения проводятся в мире очень широко и интенсивно, а в последнее время главной задачей исследований становится переход от диагностики диабета к его предсказанию и от лечения к предупреждению.

Основные проявления сахарного диабета

Снижение синтеза и депонирования гликогена и жиров. При сахарном диабете инсулин-глюкагоновый индекс снижен. Это связано не только с уменьшением секреции инсулина, но и с увеличением секреции глюкагона (инсулин ингибирует секрецию глюкагона). В норме инсулин не только стимулирует процессы, характерные для абсорбтивного периода, но и отменяет действия глюкагона. В отсутствие инсулина действия глюкагона не отменяются. В результате ослаблена стимуляция процессов складирования и усилена стимуляция мобилизации запасов, усилена настолько, что печень, мышцы, жировая ткань даже после приема пищи функционируют в режиме постабсорбтивного состояния. При этом продукты переваривания, а также их метаболиты, вместо того, чтобы складироваться в форме гликогена и жиров, циркулируют в крови. Вероятно, в какой-то мере происходят и затратные циклические процессы типа одновременно протекающих гликолиза и глюконеогенеза, или синтеза и распада жиров и т. п.

Гиперглюкоземия. Для всех форм сахарного диабета характерна сниженная толерантность к глюкозе, т. е. гиперглюкоземия после приема пищи или даже и натощак. Характерна также глюкозурия: в норме концентрация глюкозы в моче 10–20 мг/дл; при диабете она увеличивается в десятки раз. В норме за сутки с мочой выводится меньше 0,5 г глюкозы; при диабете может выводиться больше 100 г. Именно глюкозурия послужила основанием для названия болезни — diabetes mellitus (от лат. *diabetes* — прохожу через, *melle* — мед). Название возникло в те времена, когда врачи, анализируя мочу, пробовали ее на вкус.

Отметим основные причины гиперглюкоземии.

1. Глюкоза не используется (или используется в ограниченных количествах) для работы мышц и для запасания в форме гликогена в мышцах и в форме жиров – в жировой ткани, так как:
   а) потребление глюкозы мышцами и жировой тканью ограничено, поскольку в отсутствие инсулина ГЛЮТ-4 не экспонирован на поверхности миоцитов и адипоцитов;
   б) при низкой концентрации инсулина и высокой — глюкагона гликогенсинтетаза находится в фосфорилированной неактивной форме;
   в) в печени в этих условиях глюкоза не используется и для синтеза жиров: ферменты гликолиза и пируватдегидрогеназа находятся в неактивной

форме и, следовательно, заторможено превращение глюкозы в ацетил-КоА, необходимый для синтеза жирных кислот.

2. Путь глюконеогенеза при низкой концентрации инсулина и высокой — глюкагона активирован и возможен синтез глюкозы из аминокислот и глицерина.

Гиперлипопротеинемия. Инсулин стимулирует синтез и секрецию липопротеинлипазы в адипоцитах. Липопротеинлипаза прикрепляется в капиллярах жировой ткани и гидролизует жиры хиломикронов и ЛОНП; жирные кислоты транспортируются в адипоциты (см. рис. 10.20). Понятно, что в отсутствие инсулина этот механизм не работает; к тому же и глюкоза, необходимая для синтеза триацилглицеринов как предшественник глицерофосфата, в адипоциты не проникает. Поэтому при сахарном диабете повышена концентрация в крови липопротеинов (главным образом ЛОНП).

Кетонемия. При сахарном диабете имеется относительный избыток глюкагона, который активирует цАМФ-зависимую липазу адипоцитов. Поэтому повышена концентрация свободных жирных кислот в крови. Жирные кислоты поглощаются печенью, часть их превращается в гепатоцитах в триацилглицерины, которые в составе ЛОНП секретируются в кровь. Другая часть жирных кислот вступает в путь β-окисления в митохондриях печени, и образующийся ацетил-КоА используется для синтеза кетоновых тел. Кетонемия — характерный и опасный (см. ниже) симптом сахарного диабета.

Азотемия и азотурия. При недостаточности инсулина снижается синтез белков и, соответственно, увеличивается катаболизм аминокислот. В связи с этим у больных повышена концентрация мочевины в крови и увеличено ее выведение с мочой.

Полиурия и полидипсия. Концентрационная способность почек ограничена, поэтому для выведения больших количеств глюкозы, кетоновых тел и мочевины при диабете требуется выделение больших количеств воды. Больные выделяют мочи в 2–3 раза больше, чем в норме (полиурия). Соответственно, и потребление воды у них увеличивается (полидипсия). При тяжелых формах диабета может наступить обезвоживание организма: в результате выделения больших количеств мочи уменьшается объем крови; в нее поступает вода из межклеточной жидкости; межклеточная жидкость становится гиперосмоляльной и «высасывает» воду из клеток, развиваются внешние признаки дегидратации — сухие слизистые оболочки, дряблая и морщинистая кожа, запавшие глаза. Кровяное давление при этом падает, и поэтому ухудшается снабжение тканей кислородом.

Коматозные состояния (острые осложнения) при диабете. Коматозные состояния при сахарном диабете могут быть разного патогенеза. Различают три основные формы:

1) кетоацидотическая кома, с абсолютной инсулиновой недостаточностью;
2) гиперосмолярная кома, с умеренной недостаточностью инсулина;
3) лактатацидотическая кома, с выраженной гипоксией, сепсисом, сердечно-сосудистым шоком.

Эти состояния могут развиваться не только при сахарном диабете, но и при действии многих других факторов (токсических, инфекционных и др.). Кроме

того, при инсулинотерапии сахарного диабета может быть гипогликемическая кома, связанная с передозировкой инсулина.

Первичной причиной кетоацидоза является инсулиновая недостаточность: в период комы инсулин в крови не определяется. Гипергликемия отмечается всегда, 20–30 ммоль/л, а иногда и более. Ацидоз при диабетической коме является следствием накопления кетоновых тел, а также лактата и пирувата.

Напомним, что концентрация кетоновых тел в крови в норме меньше 2 мг/дл, при голодании — до 30 мг/дл. При диабете кетонемия часто бывает 100 мг/дл, а может достигать и 400 мг/дл. В тканях происходит декарбоксилирование ацетоуксусной кислоты: от больных исходит запах ацетона, который ощущается даже на расстоянии.

Кетоновые тела, являясь кислотами, снижают буферную емкость крови, а при высоких концентрациях снижают и pH крови — возникает ацидоз. В норме pH крови равна 7,4 ± 0,04. При содержании кетоновых тел 100 мг/дл и больше значение pH крови может быть близко к 7,0. Ацидоз такой степени резко нарушает функции мозга, вплоть до потери сознания.

Развивается дегидратация, дефицит воды может быть до 10 % от общей массы тела. Количество циркулирующей жидкости уменьшается на 25–30 %, в результате снижается кровяное давление. Кислородное и энергетическое голодание миокарда, уменьшение объема крови ведут к сердечно-сосудистой недостаточности. Могут быть повышение свертываемости крови, инфаркт миокарда, инфаркты паренхиматозных органов, инсульт, периферические тромбозы.

Диабетическая кома развивается медленно, в течение нескольких дней, но иногда может развиться за несколько часов. Появляются тошнота, рвота, черты лица заостряются, глаза западают, нарастает безучастность к окружающему, заторможенность, переходящая в глубокую кому (полностью выключенное сознание, отсутствие рефлексов, атония мышц и др.).

Диабетическая кома требует немедленного лечения, которое включает следующие мероприятия:

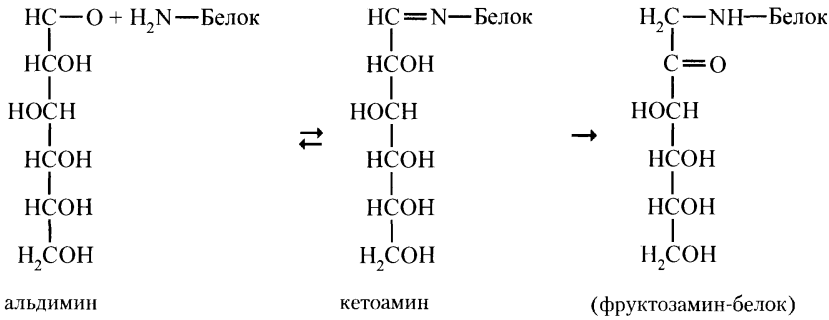
1) ликвидация инсулиновой недостаточности путем введения инсулина в дозах, обеспечивающих постепенное снижение концентрации глюкозы в крови до уровня, близкого к нормальному;
2) регидратация организма путем введения жидкости;
3) восстановление нормального солевого состава и pH жидкостей организма путем введения соответствующих солевых растворов;
4) восстановление запасов гликогена в организме.

Проявления комы обычно ликвидируются в течение 2–3 дней при непрерывно продолжающемся лечении, причем лечение в первые несколько часов имеет решающее значение для спасения жизни больного.

До развития методов лечения диабета инсулином больные умирали вскоре после начала болезни от диабетической комы. Но и теперь кома наблюдается нередко. В частности, первое проявление болезни в 15–30 % случаев сопровождается кетоацидозом и комой. Смертность от диабетической комы остается высокой — от 1 до 30 %. Но основной причиной смерти больных диабетом в настоящее время являются поздние осложнения.

Биохимия поздних осложнений сахарного диабета. Поздние осложнения сахарного диабета связаны прежде всего с повреждением кровеносных сосудов (диабетические ангиопатии). Наиболее частые осложнения — диабетическая нефропатия и диабетическая ретинопатия. Осложнения развиваются медленно, в течение многих лет. Их основной причиной является гиперглюкоземия. Об этом свидетельствует то, что вероятность появления осложнений и скорость их развития тем выше, чем больше средняя (например, среднегодовая) гиперглюкоземия у больного.

Гликирование белков. Один из основных механизмов повреждения тканей при диабете — гликирование (гликозилирование) белков, неферментативная реакция глюкозы со свободными аминогруппами белковой молекулы (Лиз, Арг, N-концевая аминокислота):



Вначале образуется нестабильная альдиминовая группировка (альдимин), которая может превращаться в ряд других, более стабильных соединений, в частности кетоамин: это так называемые «ранние продукты гликозилирования». Понятно, что при этом функции белка могут быть нарушены в результате изменения заряда белковой молекулы, ее конформации или блокирования активного центра. Глюкозилирование — медленная реакция, в тканях здоровых людей обнаруживаются лишь небольшие количества гликозилированных белков. При гипергликемии реакция существенно ускоряется. Например, у больных диабетом в состоянии гипергликемии содержание одного из гликозилированных гемоглобинов — HbA1c — в течение 2–3 недель увеличивается в 2–3 раза. Степень гликозилирования разных белков неодинакова; в основном она зависит от скорости обновления данного белка. В медленно обменивающихся белках накапливается больше модифицированных аминогрупп. Кроме того, в таких белках происходят дальнейшие изменения углеводных остатков — перестройки структуры, окислительные превращения, в результате которых образуются разнообразные «поздние продукты гликозилирования» (ППГ), часто коричневого цвета, флюоресцирующие, и некоторые из них обладают высокой реакционной активностью и способностью дополнительно повреждать белки, в том числе образовывать поперечные сшивки между молекулами белков. К медленно обменивающимся белкам относятся многие белки соединительнотканных образований, межклеточного матрикса, базальных мембран. К тому же белки этих структур непосредственно контактируют с межклеточной жидкостью, в которой концентрация глюкозы такая же, как в крови (в клетках

она обычно гораздо ниже в результате использования глюкозы в метаболических процессах). В этих структурах ППГ накапливается с возрастом и у здоровых людей, а при сахарном диабете накопление сильно ускоряется.

ППГ-белки могут гидролизоваться макрофагами (с участием ППГ-рецепторов) или межклеточными протеолитическими системами с образованием ППГ-пептидов, часто длиной около 30 аминокислотных остатков. ППГ-белки, и особенно образующиеся в результате их гидролиза ППГ-пептиды, попадают и в кровоток. Концентрация ППГ-пептидов в крови резко повышается при почечной недостаточности разного происхождения, в том числе при диабетической нефропатии. Это связано с тем, что элиминация ППГ-пептидов происходит с участием почек: ППГ-пептиды фильтруются в клубочках, реабсорбируются клетками проксимальных канальцев и катаболизируются в лизосомах этих клеток.

В экспериментах на крысах показано, что введение ППГ-белков в кровь приводит к ковалентному связыванию этих белков с белками межклеточного матрикса во многих тканях и к появлению структурных и функциональных нарушений, сходных с теми, которые бывают при сахарном диабете.

ППГ проявляют многообразную биологическую активность: повышают проницаемость эндотелиальных клеток, соединяются с рецепторами макрофагов, эндотелиальных и мезангиальных клеток, активируют макрофаги к секреции цитокинов (рецепторным путем), подавляют образование NO и, соответственно, ингибируют расширение сосудов. ППГ усиливают окисление ЛНП: в норме гликолизировано 1,3–2 % лизиновых остатков ЛНП, а у больных диабетом в 2–3 раза больше. Модифицированные ЛНП могут повреждать стенку артерий и инициировать развитие атеросклеротической бляшки (см. гл. 10).

Диабетические макроангиопатии. Поражения крупных и средних сосудов сердца, мозга, нижних конечностей обычно имеют форму атеросклероза, однако развиваются в гораздо более раннем возрасте, чем у лиц, не страдающих диабетом. Смертность от сердечно-сосудистых заболеваний при диабете примерно втрое больше, чем при других формах сердечно-сосудистых заболеваний.

Возможен и другой механизм повреждения артериальной стенки при сахарном диабете — гликирование белков, в частности коллагена и эластина, в среднем и наружном слоях. Механические свойства упорядоченных сетевых структур, построенных из коллагена и эластина, имеют решающее значение для функционирования артерий и точно подогнаны к гемодинамическим условиям в кровотоке каждого участка артериального русла. Коллаген и эластин — очень медленно обменивающиеся белки, и поэтому велика вероятность накопления в них повреждений, связанных с гликозилированием. После инкубации в течение нескольких дней отрезков артерий в растворе глюкозы в них обнаруживаются ППГ-белки, в том числе коллаген и эластин, снижается прочность и растяжимость артериальной стенки.

Недавно обнаружен ППГ, обозначенный как NFC-1 (его строение пока неизвестно). NFC-1 с высокой активностью образует поперечные сшивки между молекулами коллагена. В аорте больных сахарным диабетом количество поперечных сшивок, образованных NFC-1, увеличивается с возрастом и достигает величин до одной сшивки на одну молекулу коллагена, т. е. практически все молекулы коллагена

соединены друг с другом ковалентными связями. Это, конечно, может существенно изменить физические свойства сосуда.

Микроангиопатии. Диабетическая нефропатия — одна из форм микроангиопатии и наиболее частая причина инвалидизации и смертности больных сахарным диабетом.

Основной характеристикой диабетической нефропатии на завершающих стадиях является гломерулосклероз и нефросклероз, приводящие к хронической почечной недостаточности и к гибели больных от уремии. Клинические признаки нефропатии появляются через 10–15 лет после манифестации диабета, и еще в течение нескольких лет болезнь развивается до финальных состояний с появлением симптомов уремии.

Альбуминурия. В норме с мочой выводится за сутки в среднем 8 мг альбумина. Состояние, когда суточное выведение альбумина достигает 30–300 мг, называют микроальбуминурией; при этом концентрация альбумина в моче равна 20–200 мг/л. При ИЗСД микроальбуминурия редко бывает в период 5–10 лет после постановки диагноза диабета, а появившись — непрерывно увеличивается, на 15–40 % в год. Микроальбуминурия — следствие нарушения структуры и проницаемости капилляров почечных клубочков: она является предвестником диабетической нефропатии, которая развивается через 6–12 лет после начала микроальбуминурии.

Гломерулосклероз. Накопление белков межклеточного матрикса и изменение их состава в гломерулярной, тубулярной и интерстициальной областях почки, утолщение базальной мембраны клубочков, гипертрофия мезангиальных клеток — основные патоморфологические изменения при диабетической нефропатии. При усиленном образовании межклеточного матрикса происходит прогрессивное утолщение стенки сосудов, снижение скорости клубочковой фильтрации, нарушение проницаемости базальной мембраны (и как следствие — альбуминурия). В конечном счете происходит полное закрытие сосудов и образование рубца на месте клубочка — гломерулосклероз. Сходные изменения происходят и в тубулярной области — тубулоинтерстициальный фиброз. Эти процессы характеризуют финальные стадии развития нефропатии.

Указанные изменения рассматриваются как результат нарушения репаративных процессов, направленных на устранение повреждений матрикса, вызванных гипергликемией и другими факторами, действующими при сахарном диабете.

Важнейшая роль в репаративных процессах, а также и в развитии фиброза (склероза) принадлежит ТФР-β. Этот цитокин стимулирует синтез и подавляет деградацию белков межклеточного матрикса — коллагена, фибронектина, ламинина, гликозамингликанов. ТФР-β стимулирует также экспрессию интегринов, регулирующих образование макроструктур межклеточного матрикса и связей между матриксом и клетками (см. гл. 18). Таким образом ТФР-β обеспечивает накопление межклеточного матрикса, необходимое при пролиферации и миграции клеток, для образования тканей и специализированных многоклеточных структур как в норме, так и при патологии, в том числе при репарации повреждений тканей. При хроническом действии повреждающих факторов происходит гиперпродукция ТФР-β, и процесс заканчивается избыточным накоплением межклеточного вещества, т. е. фиброзом.

Диабетическая нефропатия развивается только у трети больных сахарным диабетом 1 типа. Это указывает на то, что кроме гиперглюкоземии имеют значение и другие факторы, связанные с индивидуальными генетическими особенностями.

Диабетическая ретинопатия. Диабетическая ретинопатия через 10 лет после манифестации диабета обнаруживается у половины больных, а через 15 лет — у 80 %, и часто ассоциирована с нефропатией. Частые и продолжительные периоды гипергликемии, определяемые по содержанию гликированного гемоглобина в крови, являются главным фактором риска развития ретинопатии. В возрастной группе 20–70 лет сахарный диабет занимает первое место среди причин слепоты. При этом на долю диабетической ретинопатии приходится 70 % случаев, далее следуют катаракта и другие диабетические повреждения глаза.

Диабетическая ретинопатия на ранних стадиях проявляется микроаневризмами сосудов, точечными кровоизлияниями в сетчатку, расширением сосудов сетчатки, отеком (непролиферативная фаза), затем происходит новообразование сосудов в сетчатке и стекловидном теле (пролиферативная фаза). С течением времени эти изменения становятся все более выраженными. Причиной слепоты являются кровоизлияния из вновь образованных сосудов в сетчатку или в стекловидное тело и отслойка сетчатки.

Гликозилированные гемоглобины. В крови человека содержится ряд гликозилированных гемоглобинов. Обычно определяют HbA1c, который содержится в наибольшей концентрации: в норме около 5 % от всего гемоглобина, при диабете концентрация увеличивается в 2–3 раза. HbA1c определяют не только для диагностики, но и для контроля эффективности компенсации гликемии при инсулинотерапии. Это возможно потому, что концентрация гликозилированного гемоглобина пропорциональна усредненной концентрации глюкозы в крови за последние несколько недель.

С-пептид. Инсулин и С-пептид секретируются β-клетками в эквимолярных количествах. В печени задерживается около 60 % инсулина, поступающего с кровью воротной вены из поджелудочной железы, поэтому отношение концентраций С-пептид/инсулин в воротной вене и периферическом кровообращении при базальных условиях равно примерно 3/1 (или больше), поскольку из периферической крови инсулин удаляется с большей скоростью, чем С-пептид. С-пептид удаляется из организма в основном через почки. Суточная экскреция С-пептида составляет около 45 мкг и пропорциональна суточной продукции инсулина. Таким образом, по величине суточной экскреции С-пептида можно судить о функциональном состоянии β-клеток.

Лечение сахарного диабета

Основные традиционные методы лечения ИЗСД — это диетотерапия, инсулинотерапия, а также специфические методы лечения осложнений.

К диете при лечении диабета предъявляются строгие требования: 4–5-кратный прием пищи в течение суток, исключить легкоусвояемые («быстрые») углеводы, полностью исключить употребление сахара, пива, спиртных напитков, сиропов, соков, сладких вин, пирожных, печенья, бананов, винограда и подобных им про-

дуктов. Иногда соблюдение диеты можно использовать как единственный метод лечения. Однако гораздо чаще приходится прибегать и к другим методам, прежде всего к инсулинотерапии. Инсулинотерапия остается основным методом лечения. Она имеет целью поддержание нормогликемии, или, по-другому, компенсацию нарушений складирования энергоносителей, в основном гликогена и жиров.

Инсулин вводят с интервалами, которые определяются числом приемов пищи и ее составом, а также чувствительностью пациента к биологическому действию инсулина. Обычно требуются одна или две инъекции в день; три или больше инъекций в день лучше защищают от развития поздних осложнений. Однако медицинский контроль гликемии никогда не достигает той точности, которая обеспечивается нормальными панкреатическими островками: риск декомпенсации и кетоацидоза остается, и поздние осложнения тоже развиваются. Лечение продолжается всю жизнь. Известны случаи, когда больные при таком лечении доживали до 100 лет. Но все же в среднем продолжительность жизни больных диабетом примерно на $^1/_3$ меньше средней продолжительности жизни в популяции: это обусловлено главным образом осложнениями диабета.

Перспективные методы лечения

Как уже отмечено, инсулинотерапией не удается достигнуть той степени точности регуляции гликемии, которая обеспечивается нормальными панкреатическими островками, Слишком часто случаются эпизоды гипергликемии, а отсюда – гликирование белков и поздние осложнения сахарного диабета. Гипергликемия в течение нескольких дней уже вызывает изменения в капиллярах. Первоначальные изменения могут быть обратимыми, но повторяющиеся эпизоды гипергликемии приводят к необратимым повреждениям. Поэтому остаются актуальными поиски новых методов лечения диабета.

Трансплантация генетически реконструированных клеток

Продолжаются попытки лечения ИЗСД трансплантацией донорской поджелудочной железы, панкреатических островков, β-клеток. Но трансплантация часто не удается (отторжение трансплантата), а если удается, то затем требуется постоянное применение иммунодепрессантов.

Перспективным направлением поиска новых средств лечения диабета является создание методами генной инженерии клеток, не вызывающих иммунного ответа. Исходным материалом для таких конструкций могут быть собственные клетки пациента.

Клетка, пригодная для трансплантации, должна обладать рядом специфических свойств:

1) содержать глюкозоизмерительный аппарат, т. е. ГЛЮТ-2 и глюкокиназу;
2) содержать эффективный механизм экспрессии проинсулина и образования инсулина;
3) иметь механизм регуляции секреции инсулина в ответ на изменения концентрации глюкозы.

Неизвестны клетки с таким набором свойств, кроме β-клеток. Однако существующий арсенал методов генной инженерии допускает возможность создания подобных клеток. В частности, ведутся работы по модификации гепатоцитов в инсулинпродуцирующие клетки.

Стимуляция регенерации панкреатических островков как возможный метод лечения диабета

В поджелудочной железе человека содержится 10^4–10^6 панкреатических островков, или примерно 1,5 % объема железы. Около 75 % клеток островков приходится на β-клетки, синтезирующие инсулин. Примерно 20 % составляют А-клетки, синтезирующие глюкагон.

Островки при эмбриогенезе развиваются из эндодермальных клеток, находящихся в эпителиальном слое протоков поджелудочной железы. В раннем периоде жизни количество β-клеток определяется балансом между репликацией существующих клеток и появлением (в результате дифференцировки) новых клеток — с одной стороны, и апоптозом — с другой: потери, вызванные апоптозом, компенсируются новой популяцией клеток.

Гистологическими методами уже давно установлено, что у молодых пациентов с ИЗСД происходит регенерация островков, содержащих преимущественно β-клетки, наряду с продолжающимся аутоиммунным разрушением β-клеток. Общее количество β-клеток, а следовательно, и клинические проявления диабета зависят от баланса между деструктивным аутоиммунным процессом — с одной стороны, и способностью поджелудочной железы увеличивать массу β-клеток — с другой.

У взрослых пролиферативная активность островков весьма ограничена, и все же их количество может увеличиваться, причем как путем пролиферации уже существующих β-клеток, так и путем дифференцировки из клеток протоков. Исследования молекулярных механизмов пролиферации и дифференцировки β-клеток и их регуляции могут послужить основой для разработки методов лечения ИЗСД.

От диагностики и лечения к предсказанию и предупреждению ИЗСД

ИЗСД рассматривается как многофакторное заболевание, обусловленное и наследственной предрасположенностью, и влияниями среды обитания. В западных странах примерно один из 300 индивидов случайной выборки заболевает ИЗСД, а среди родственников первой степени родства больных ИЗСД заболевает один из 20 индивидов. В целом, по примерным оценкам, заболеваемость на 80 % определяется генотипом и на 20 % — факторами среды.

Напомним, что в геноме человека имеется единственный ген инсулина. Тем не менее ИЗСД является полигенной болезнью; найдены десятки генных локусов и множество аллельных вариантов этих локусов, определяющих предрасположенность.

В частности, известна форма диабета 1 типа — диабет юных, начинающийся в зрелом возрасте, — связанная с мутациями гена глюкокиназы β-клеток и синтезом менее активного фермента:

- нормальная глюкокиназа, $V_{макс}$ = 93 ед/мг;
- мутация Глу256 → Лиз, $V_{макс}$ = 0,2 ед/мг;
- мутация Сер131 → Про, $V_{макс}$ = 46 ед/мг.

Поскольку глюкокиназа служит основным элементом глюкозосенсорной системы, то при сниженной активности глюкокиназы нарушается нормальное соотношение между концентрацией глюкозы в крови и секрецией инсулина: секреция инсулина меньше, чем требуется при данной концентрации глюкозы. Это значит, что будет гиперглюкоземия.

В наибольшей мере восприимчивость к ИЗСД зависит от генов главного комплекса гистосовместимости (см. гл. 20).

Метод полимеразной цепной реакции позволяет быстро и точно определять наличие того или иного аллеля в геноме и проводить массовые исследования распределения аллелей среди индивидов популяции. Обнаружилось, что у больных ИЗСД встречаемость аллелей ГКГ класса II существенно отличается от встречаемости тех же аллелей у здоровых людей. Некоторые аллели часто встречаются у больных; очевидно, они определяют предрасположенность к болезни. И наоборот, есть аллели, которые почти не встречаются у больных ИЗСД; их рассматривают как снижающие предрасположенность, протективные аллели.

Эти исследования создают основу для разработки методов предсказания и предупреждения ИЗСД. В настоящее время больной ИЗСД попадает в поле зрения врача при появлении клинических признаков, т. е. после того, как в течение нескольких лет до этого в результате аутоиммунного процесса уже погибло около 80 % β-клеток. Если проводить обследование всех новорожденных на генетическую предрасположенность к ИЗСД, то детей с неблагоприятным генотипом можно взять под наблюдение и принимать предупредительные меры при угрозе начала аутоиммунного процесса. Возможно также применять методы генетической консультации для предупреждения рождения детей, предрасположенных к заболеванию ИЗСД.

Глава 16

РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА КАЛЬЦИЯ И ФОСФОРА

Основные функции кальция заключаются в следующем:

1) соли кальция образуют минеральный компонент костей;
2) ионы Ca^{2+} являются кофакторами многих ферментов и неферментных белков;
3) ионы Ca^{2+} во взаимодействии с белками-модуляторами (кальмодулином и рядом других Са-связывающих белков) служат посредником в передаче сигналов, регулирующих многие биохимические процессы и физиологические функции.

Обмен кальция тесно связан с обменом фосфорной кислоты, образующей с кальцием плохо растворимые соли — $Ca_3(PO_4)_2$, $CaHPO_4$, $Ca(H_2PO_4)_2$ (перечислены в порядке увеличения растворимости).

В организме взрослого человека содержится около 1,2 кг кальция, который образует два неравных фонда. Один из них — это кальций костей. В состав костей входит 99 % всего кальция организма, 87 % фосфора, около 60 % магния и примерно 25 % натрия. Кальций в костях находится в форме минерала гидроксиапатита, примерный состав которого $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Минеральные компоненты кости составляют половину ее массы; другая половина образована органическим матриксом, который на 90 % состоит из коллагена. Поскольку минеральная часть кости имеет большую плотность, на нее приходится только четверть объема кости.

Другой фонд кальция в организме — это ионы Ca^{2+}, растворенные в жидкостях или соединенные с белками жидкостей и тканей. Между этими фондами происходит постоянный обмен кальцием. Внутриклеточный кальций выполняет роль второго вестника сигналов) и регулирует большое число активностей клетки — от активации ряда ферментов до таких сложных, как мышечная и нервная возбудимость или пролиферация клеток. Регуляция происходит путем изменения концентрации Ca^{2+}, как и в случае регуляторных молекул органической природы. Но эти, последние, могут синтезироваться и распадаться, а концентрация Ca^{2+} может изменяться только путем перекачки из клетки в межклеточную жидкость или обратно, из цистерн эндоплазматического ретикулума в цитозоль или обратно, и др.

Концентрация ионов Ca^{2+} в межклеточной жидкости и крови равна 10 мг/дл, а во внутриклеточной жидкости — в тысячи раз меньше. Благодаря такой разнице небольшие изменения проницаемости клеточной мембраны могут привести к многократным изменениям концентрации Ca^{2+} в клетке. Разность концентраций создается главным образом Са-АТФазой, которая имеется в плазматической мембране и в мембранах эндоплазматического ретикулума. Кроме того в регуляции участвует система ионных каналов: Na^+,Ca^{2+}-обменники, H^+,Ca^{2+}-обменники, ионные каналы, пропускающие Ca^{2+} по градиенту концентрации. Некоторые из них реагируют на изменения мембранного потенциала. Многие процессы, зависящие от концентрации Ca^{2+}, обсуждались в предшествующих главах.

Для регуляции внутриклеточной концентрации Ca^{2+} необходима его высокая и стабильная концентрация в крови и межклеточной жидкости, а в последней она регулируется эндокринными гормонами, основные из которых — паратгормон, кальцитонин и кальцитриол.

ПАРАТГОРМОН

Паратгормон — это пептидный гормон (84 аминокислотных остатка), образующийся в паращитовидных железах, расположенных на задней поверхности щитовидной железы. Его синтез и секреция стимулируются при снижении концентрации Ca^{2+} в крови и подавляются при повышении. Период полужизни паратгормона в крови человека составляет примерно 10 мин.

Таблица 16.1. Регуляция обмена кальция

Гормон	Вещество, регулирующее синтез и секрецию гормона	Действие гормона			Влияние на концентрацию Ca^{2+} в крови
		мобилизация Ca^{2+} из костей	выведение Ca^{2+} через почки	всасывание Ca^{2+} в кишечнике	
Паратгормон	Ca^{2+} ингибирует	Активирует	Ингибирует		Повышает
Кальцитриол	Паратгормон активирует	»		Активирует	»
Кальцитонин	Ca^{2+} активирует	Ингибирует			Снижает

Основными органами-мишенями паратгормона являются кости и почки (см. табл. 16.1). Мембраны клеток этих органов содержат специфические рецепторы, улавливающие паратгормон, которые связаны с аденилатциклазой. В костях активация аденилатциклазы стимулирует метаболическую активность остеокластов, в результате чего начинается резорбция кости и поступление Ca^{2+} и фосфатов в кровь. В почках паратгормон увеличивает реабсорбцию Ca^{2+} и уменьшает реабсорбцию фосфатов; в результате Ca^{2+} сберегается для организма, а фосфаты выводятся. Восстановление нормальной концентрации Ca^{2+} в крови приводит к прекращению синтеза и секреции гормона.

ВИТАМИН D_3

В отличие от большинства витаминов, которые служат в качестве коферментов, витамин D_3 является предшественником вещества, функционирующего как стероидный гормон; это вещество — кальцитриол. Превращение витамина в кальцитриол происходит с участием двух органов — печени и почек: в печени образуется кальцидиол, который в почках превращается в кальцитриол (рис. 16.1). Специфические гидроксилазы, которые катализируют эти реакции, активируются паратгормоном.

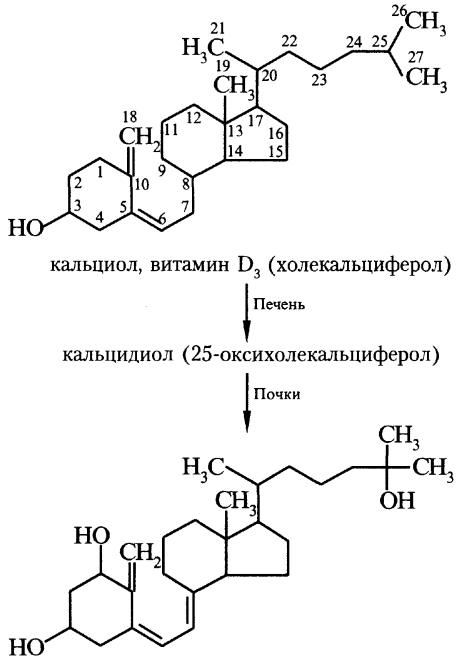


Рис. 16.1. Превращение витамина D_3 в кальцитриол

Органы-мишени кальцитриола — тонкий кишечник и кости. В тонком кишечнике гормон стимулирует всасывание кальция и фосфатов, в костях — мобилизацию кальция. Подобно другим стероидным гормонам, кальцитриол взаимодействует с хроматином, изменяя скорость синтеза определенных белков. В частности, в клетках кишечника при введении витамина D_3 ускоряется синтез специального белка, связывающего кальций и участвующего в его всасывании. Таким образом, паратгормон и витамин D_3 являются синергистами в отношении мобилизации кальция из костей и повышения его концентрации в крови.

При недостаточности витамина D у детей развивается рахит. Основной признак этой болезни — нарушение минерализации растущих костей; вследствие этого кости не имеют нормальной жесткости, и у детей, страдающих рахитом, наблюдаются различные деформации скелета — выгнутые наружу голени, вывернутые

внутрь колени, «четки» на ребрах, «птичья грудь» и др. Рахит обычно излечивается витамином D, однако есть формы, не поддающиеся такому лечению: они связаны с нарушением превращения витамина D_3 в организме в кальцитриол.

Лечебное действие витамина D_3 при рахите вряд ли можно объяснить только тем, что он стимулирует всасывание кальция в кишечнике; возможно, он непосредственно участвует в минерализации костей, хотя это экспериментально пока не подтверждено; наоборот, мобилизация кальция из костей при введении витамина D_3 экспериментально доказана.

Легкие формы рахита — довольно распространенная болезнь раннего детского возраста. Это связано с тем, что обычная пища ребенка в первые 1–2 года жизни содержит недостаточно витамина D. Вероятность заболевания увеличивается, если ребенок мало подвергается облучению солнечным светом: при действии солнечного света витамин D синтезируется в коже из 7-дегидрохолестерина, который образуется из холестерина.

Наиболее богатым источником витамина D является жир печени рыб. Суточная потребность взрослого человека в витамине D равна примерно 40 мкг. Продолжительное поступление избыточного количества (в несколько раз больше нормы) приводит к деминерализации костей (вследствие чего легко могут возникать переломы), к повышению концентрации кальция в крови и его отложению в мягких тканях, к образованию камней в мочевых путях.

КАЛЬЦИТОНИН

Пептидный гормон кальцитонин (32 аминокислотных остатка) синтезируется в С-клетках паращитовидных и щитовидной желез. Секреция кальцитонина увеличивается при возрастании содержания кальция в крови; таким образом, паратгормон и кальцитонин регулируются кальцием противоположным образом. Основной орган-мишень для кальцитонина — кости, в которых он подавляет мобилизацию кальция.

КОНЦЕНТРАЦИЯ КАЛЬЦИЯ ВО ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ЖИДКОСТИ

В плазме крови здоровых людей концентрация кальция равна 9–11 мг/дл; половина этого количества представлена ионами Ca^{2+} в растворенном состоянии, другая половина — в соединении с альбумином. Постоянство концентрации поддерживается благодаря совместному действию трех гормонов — паратгормона, кальцитриола и кальцитонина (рис. 16.2). Эти гормоны регулируют обмен кальцием между двумя основными фондами — кальцием гидроксиапатита костей и кальцием других тканей; кроме того, они регулируют поступление кальция из кишечника и выведение его через почки. Механизм обратной связи (ингибирование синтеза и секреции паратгормона при повышении концентрации Ca^{2+}) допускает лишь небольшие изменения концентрации кальция в крови и межклеточной жидкости. Гипокальциемия и гиперкальциемия, когда концентрация кальция в плазме крови соответственно меньше 9 мг/дл или больше 11 мг/дл, свидетельствует о патологии. Изменение концентрации кальция во внеклеточной жидкости сказывается и на его концентрации внутри клеток: изменяются трансмембранные градиенты

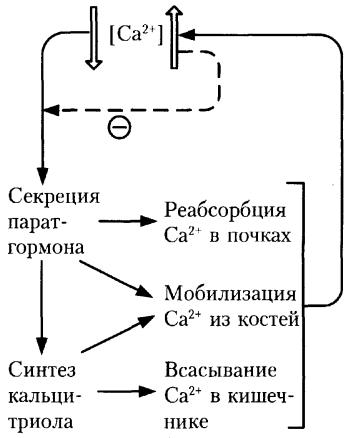


Рис. 16.2. Регуляция концентрации Ca^{2+} в крови

концентраций Ca^{2+}, нарушается функционирование кальциевого насоса, зависимых от кальция ферментов и регуляторных систем.

При гипокальциемии наблюдаются судороги, гиперрефлексы, спазмы гортани (последние могут быть причиной смерти от асфиксии). Эти явления — следствие снижения порога возбуждения нервных и мышечных клеток: нерв может быть возбужден даже легким стимулом в любом месте его протяжения. Тяжелая гипокальциемия бывает редко. Наиболее частая ее причина — гипопаратиреоз, вызванный повреждением паращитовидных желез при операциях на щитовидной железе. Кроме того, гипокальциемия может быть следствием нарушения всасывания кальция в кишечнике, например, при гиповитаминозе D, при большом содержании в пище оксалата или других соединений, связывающих кальций.

При гиперкальциемии снижается нервно-мышечная возбудимость; если концентрация кальция в крови достигает 16 мг/дл, наступает глубокое расстройство нервных функций — психозы, ступор и даже кома. Характерными симптомами гиперкальциемии являются кальцификация мягких тканей и образование камней в мочевых путях. Чаще всего причиной гиперкальциемии бывает гиперпаратиреоз как результат образования опухоли из клеток паращитовидных желез; гиперкальциемия бывает также при передозировке витамина D.

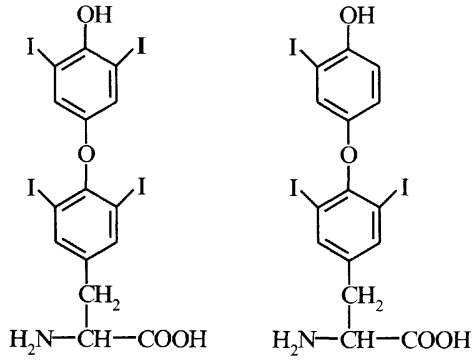
Глава 17

ГОРМОНЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

СТРОЕНИЕ И СИНТЕЗ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Щитовидная железа синтезирует и секретирует йодтиронины: тироксин (тетрайодтиронин) и трийодтиронин. Йодтиронины представляют собой йодированные производные тирозина (рис. 17.1).

В синтезе йодтиронинов участвует белок тиреоглобулин, который в результате йодирования превращается в йодтиреоглобулин. Йодирование происходит по некоторым остаткам тирозина в молекуле тиреоглобулина при участии специальной ферментной системы. При этом тирозиновые остатки превращаются в монойодтирозиновые и дийодтирозиновые. Затем происходит конденсация двух йодированных остатков тирозина с образованием йодтиронинов, включенных в пептидную цепь белка (рис. 17.2). Если один из остатков йодированного тирозина представлен монойодтирозином, то образуется трийодтиронин.



тироксин (3,5,3',5'-тетраиодтиронин) трииодтиронин (3,5,3'-трииодтиронин)

Рис. 17.1. Строение йодтиронинов

Йодтиреоглобулин — белок с молекулярной массой 660 000, гликопротеин, содержит 0,5–1 % йода.

Синтез йодтиреоглобулина происходит в кубоидальных эпителиальных клетках щитовидной железы. Эти клетки группируются в монослои, образующие пузырьки (фолликулы), в полость которых секретируется йодтиреоглобулин. Фолликулы заполнены гомогенным гелем, так называемым коллоидом, главный компонент которого — йодтиреоглобулин: он представляет собой запасную форму гормонов щитовидной железы.

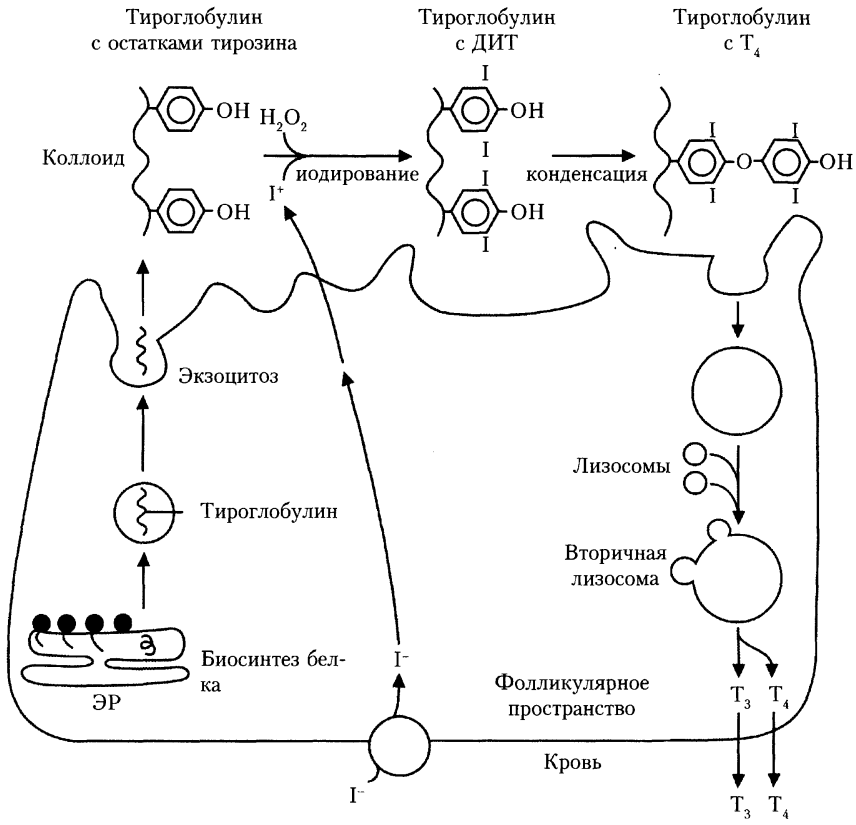


Рис. 17.2. Синтез йодтиронинов

Йодтиреоглобулин из фолликулов может путем эндоцитоза вновь поступать в клетки; эндоцитозный пузырек сливается с лизосомой и йодтиреоглобулин гидролизуется лизосомными ферментами. При этом образуются свободные йодтиронины, которые секретируются в кровь.

Регуляция синтеза и секреции йодтиронинов

Синтез и секреция йодтиронинов регулируются гипоталамо-гипофизарной системой (рис. 17.3). Тиротропин-либерин гипоталамуса стимулирует секрецию гипофизарного тиреотропного гормона, который, в свою очередь, стимулирует синтез и секрецию йодтиронинов. Повышение концентрации йодтиронинов в крови ингибирует синтез и секрецию тиролиберина и тиреотропного гормона (отрицательная обратная связь). Образование тиреотропного гормона ингибируется также гормоном роста.

Концентрация йодтиронинов в крови равна 4–8 мкг/дл; T_4 в крови примерно в 15 раз больше, чем T_3. Йодтиронины циркулируют в крови в соединении со специальным гликопротеином — тироксинсвязывающим белком. Равновесие реакции

Гормон + Гормонсвязывающий белок → Гормон-гормонсвязывающий белок

сильно смещено в сторону комплекса: только 0,03 % T_4 и 0,3 % T_3 находятся в свободной форме. И только свободные T_3 и T_4 обладают физиологической активностью: именно они проникают в клетки-мишени, поскольку для них (как и для стероидных гормонов) гидрофобный слой мембраны не является препятствием.

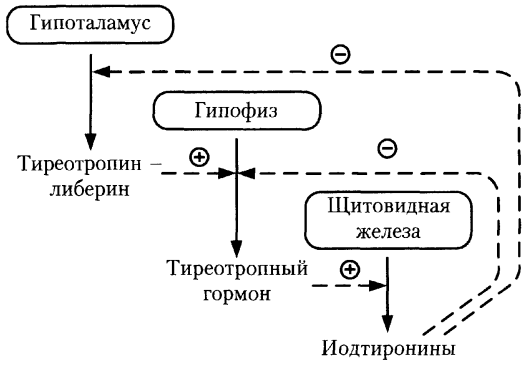


Рис. 17.3. Регуляция синтеза йодтиронинов

Доля несвязанного с транспортным белком T_3 в 10 раз больше, чем T_4, поэтому можно считать, что функциональное значение обеих форм примерно одинаково.

Время полужизни T_4 в крови составляет 5–7 дней, T_3 — 1–2 дня.

Йодтиронины проникают, по-видимому, во все клетки, кроме клеток мозга и гонад. В клетках-мишенях йодтиронины, подобно стероидным гормонам, взаимодействуют с хроматином, изменяя скорость транскрипции определенных генов.

Йодтиронины регулируют процессы двух типов:

1) рост и дифференцировку тканей;
2) энергетический обмен (при гипофункции щитовидной железы основной обмен понижается, при гиперфункции — повышается).

ГИПЕРФУНКЦИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Диффузный токсический зоб (болезнь Гревса, базедова болезнь) — наиболее распространенная форма гиперфункции щитовидной железы. При этой болезни щитовидная железа увеличена, на передней поверхности шеи отмечается припухлость (зоб); скорость синтеза йодтиреоглобулина повышена. Концентрация йодтиронинов в плазме крови в 2–5 раз превышает нормальную, что приводит к тиреотоксикозу.

Характерными симптомами тиреотоксикоза являются мышечная слабость, повышенные аппетит и потребление пищи и одновременно потеря веса (отрицательный азотистый баланс), повышенная температура тела. Эти проявления болезни объясняют одновременным усилением анаболических и катаболических процессов, причем катаболизм усиливается в большей мере, о чем свидетельствует потеря веса. Одной из причин может быть стимуляция активности или синтеза Na,K-АТФазы, вследствие чего ускоряется обмен ионов между клетками и межклеточной средой. Работа натриевого насоса требует существенного расхода АТФ

(в норме натриевый насос потребляет около 20 % всей синтезируемой в организме АТФ). Увеличенный расход АТФ при тиреотоксикозе приводит к ускорению катаболизма пищевых веществ и синтеза АТФ в результате действия дыхательного контроля и регуляции общего пути катаболизма. Основной обмен у страдающих диффузным токсическим зобом повышен на 30–60 % по сравнению с нормой.

Причины возникновения диффузного токсического зоба неясны. Концентрация тиреотропного гормона в крови больных снижена вследствие высокой концентрации йодтиронинов, что указывает на нормальное функционирование гипоталамо-гипофизарного звена регуляции. Примерно у половины больных в крови обнаруживается иммуноглобулин, избирательно связывающийся с рецепторами тиреотропного гормона в щитовидной железе; этот иммуноглобулин имитирует действие тиреотропного гормона, т. е. стимулирует синтез йодтиреоглобулина. Возможно, в этих случаях гиперфункция щитовидной железы является следствием нарушения иммунных реакций организма, проявляющегося в образовании антител к белкам собственных тканей.

ГИПОФУНКЦИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Характерными симптомами недостаточности йодтиронинов являются снижение основного обмена и температуры тела, больные плохо переносят холод. Гипофункция, начинающаяся в раннем детском возрасте, приводит к задержке роста и непропорциональному развитию тела, глубоким нарушениям психики и умственных способностей. У взрослых гипофункция проявляется как микседема (слизистый отек): происходит утолщение кожи вследствие избыточного накопления в ней протеогликанов и воды.

Гипофункция может возникать в результате врожденных дефектов ферментов и регуляторных белков, участвующих в синтезе йодтиронинов, или как осложнение других болезней, при которых повреждаются гипоталамус, гипофиз, щитовидная железа. Однако самой частой причиной недостаточности йодтиронинов в организме является дефицит йода в пище. Йод, как и все минеральные компоненты организма, относится к незаменимым пищевым факторам. Суточная потребность в нем составляет 100–200 мкг; за всю жизнь человек потребляет одну чайную ложку йода. Йод — элемент, сравнительно мало распространенный в земной коре, и есть районы, весьма обширные, в которых содержание йода в воде и почве недостаточно, чтобы обеспечить потребности организма. Почти $^1/_3$ населения мира обитает в районах с повышенной опасностью развития йоддефицитных заболеваний.

Наиболее выраженной формой недостаточности йода является эндемический зоб, т. е. увеличение размеров щитовидной железы, приуроченное к определенному географическому району. Увеличение щитовидной железы происходит главным образом за счет разрастания соединительной ткани; продукция йодтиронинов при этом не увеличивается. Характерно также отставание умственного развития, вплоть до олигофрении и кретинизма. Более легкие формы умственной отсталости могут быть настолько распространенными, что снижают интеллектуальный потенциал населения в целом в зоне йодной недостаточности.

Для предупреждения развития зоба в местностях с малым содержанием йода в воде и почве добавляют соли йода в продаваемые пищевые продукты, обычно в поваренную соль (25–50 г йодистого калия на 1 т NaCl).

Часть IV

ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИИ ОТДЕЛЬНЫХ ОРГАНОВ И СИСТЕМ

Глава 18

БИОХИМИЯ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Межклеточный матрикс — это определенным образом организованное вещество, заполняющее промежутки между клетками. Матрикс построен в основном из соединений четырех классов — коллагенов, протеогликанов, неколлагеновых структурных гликопротеинов и эластина. Различают две части межклеточного матрикса — базальные мембраны и интерстициальную (фиброретикулярную) соединительную ткань.

Базальные мембраны представляют собой тонкие пленки, на которых «растут» все клетки организма, кроме клеток соединительной ткани и крови (рис. 18.1). Базальные мембраны имеются между эпидермальным и дермальным слоем кожи; под эпителием, выстилающим полости пищеварительного, дыхательного, мочеполового трактов; под эндотелием кровеносных сосудов; вокруг леммоцитов, адипоцитов, мышечных клеток (в скелетных и сердечной мышцах); в основании паренхиматозных клеток экзокринных и эндокринных желез.

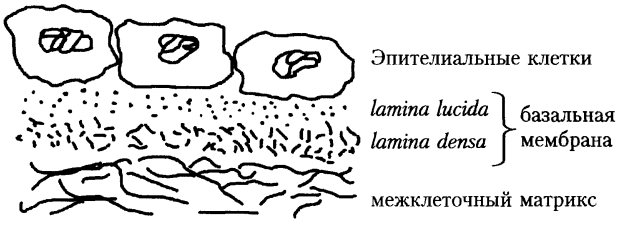


Рис. 18.1. Строение базальных мембран:

1 — эпителиальные клетки; *2* — базальная мембрана (*а* — светлый слой, lamina lucida; *б* — плотный слой, lamina densa); *3* — фиброретикулярный межклеточный матрикс

Эпителиальные клетки, образующие слой, основанием которого служит базальная мембрана, часто отличаются ясно выраженной структурной и функциональной асимметрией; в частности, неодинаковы по строению и функциям участки плазматической мембраны, контактирующие с базальной мембраной, с соседними клетками, и свободная (апикальная) часть; пластинчатый комплекс обычно расположен в апикальной части клетки. Основание (базальный конец клетки) содержит

специальные молекулярные структуры, прикрепляющие клетку к базальной мембране и обеспечивающие обмен сигналами между клеткой и межклеточным матриксом (см. ниже).

Соединительная ткань, подобно любой ткани, наряду с межклеточным веществом содержит клетки, главными из которых являются фибробласты и их разновидности (остеобласты, хондробласты, кератобласты и др.). Клетки соединительной ткани не связаны с базальными мембранами; они покоятся или мигрируют непосредственно в толще межклеточного вещества. Соединительную ткань отличают от других тканей большие промежутки между клетками и, соответственно, большое количество межклеточного вещества. Более 80 % всего коллагена тела находится в коже, костях, связках, сухожилиях, хрящах. Поэтому основные компоненты межклеточного матрикса были впервые обнаружены именно в соединительной ткани и долгое время считались характерными только для этой ткани.

Межклеточный матрикс выполняет многообразные, в том числе специализированные, функции в разных органах. Если же говорить о наиболее общих его функциях, то прежде всего следует отметить участие межклеточного матрикса в образовании тканей, в создании сложной микроархитектуры тканей и органов: в этих процессах межклеточный матрикс выполняет роль строительных лесов и каркаса, на котором формируется ткань. Кроме того, в сформированных тканях межклеточный матрикс скрепляет, склеивает клетки друг с другом, поддерживает форму клеток и органов, придает тканям механическую прочность. Более сложная функция связана с регуляторными влияниями межклеточного матрикса на клетки.

КОЛЛАГЕН

Суперсемейство коллагенов включает по крайней мере 19 белков — собственно коллагенов и еще 10 белков, содержащих коллагеноподобные домены. Наиболее распространенные коллагены образуют в межклеточном матриксе фибриллы (коллагены типов I, II, III, V, XI) и сетевидные структуры (коллагены IV, VIII и X). Функции других коллагенов многообразны.

Известно свыше 400 мутаций разных коллагенов, связанных с болезнями человека — osteogenesis imperfekta, хондродисплазии, некоторые формы остеопороза и остеоартритов, болезнь почек, известная под названием синдром Альпорта, и др.

Коллаген синтезируют и секретируют в межклеточную среду многие клетки (если не все), но в количественном отношении главными продуцентами коллагена являются клетки фибробластного ряда соединительной ткани (в соответствии с большой массой межклеточного вещества в этой ткани).

Фибриллообразующие коллагены

Молекулы коллагенов I, II, III, V, XI образованы тремя полипептидными цепями, каждая из которых скручена в левую спираль, а эти спиральные цепи скручены вместе в правую суперспираль. Спиральный домен коллагена I содержит около 1000 аминокислотных остатков (330 повторов Гли-X-Y). Глицин повторяющейся последовательности Гли-X-Y (см. рис. 1.28) обязателен для образования такой структуры, поскольку радикал любой другой аминокислоты не помещается между

тремя пептидными цепями в центре тройной спирали. В последовательности Гли-X-Y позиция X часто занята пролином, а позиция Y – оксипролином. Эти две аминокислоты ограничивают вращение полипептидной цепи. Тройная спираль стабилизирована водородными связями и водными мостиками, многие из которых образуются с участием оксипролина. Радикалы аминокислот в позициях X и Y находятся на поверхности тройной спирали. Порядок распределения кластеров гидрофобных и заряженных радикалов по длине молекулы обеспечивает самосборку многомолекулярных коллагеновых структур с упорядоченным расположением молекул.

Коллаген I содержится в тканях (в наибольших количествах) и в разных органах. Распространение других коллагенов более избирательно.

Синтез коллагена включает стадии трансляции, внутриклеточной посттрансляционной модификации и внеклеточной модификации, завершающейся образованием коллагеновых волокон (рис. 18.2).

Пептидные цепи коллагена образуются на полирибосомах, связанных с мембранами эндоплазматического ретикулума. Одновременно с трансляцией происхо-

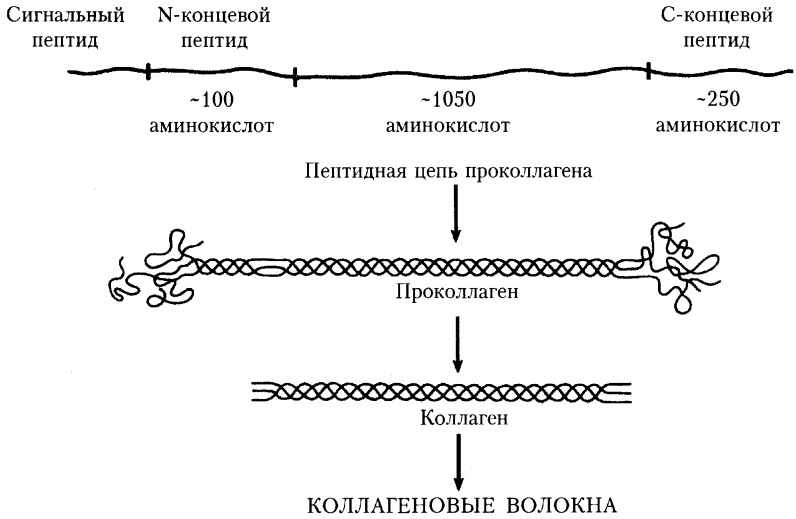


Рис. 18.2. Синтез коллагена I

дит гидроксилирование пролиновых и лизиновых остатков в растущих пептидных цепях. В этой реакции используются кислород и α-кетоглутарат; в качестве кофакторов участвуют ион Fe^{2+} и аскорбиновая кислота (витамин С) — рис. 18.3. Один из двух атомов кислорода расходуется на образование гидроксильной группы в аминокислоте, а другой — на образование карбоксильной группы в янтарной кислоте.

Аскорбиновая кислота легко окисляется в дегидроаскорбиновую кислоту (рис. 18.4).

Обратное превращение происходит в ферментативном процессе за счет восстановленного глутатиона. В качестве кофермента гидроксилаз аскорбиновая кис-

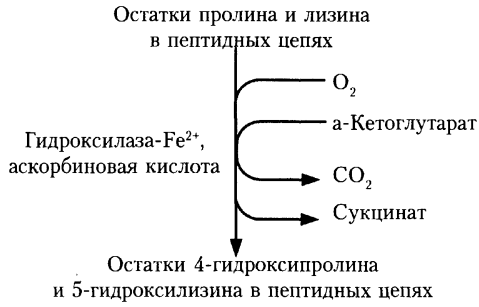


Рис. 18.3. Гидроксилирование пролина и лизина

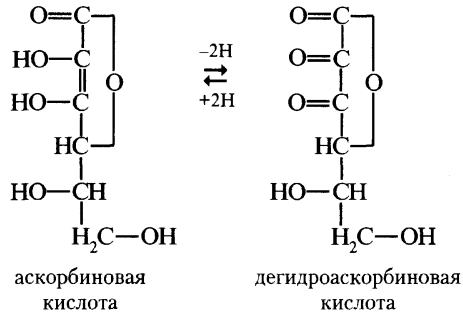


Рис. 18.4. Окисление и восстановление аскорбиновой кислоты

лота, вероятно, выполняет роль восстановителя, способствующего сохранению иона железа в двухвалентном состоянии.

Гидроксилирование пролина необходимо для образования на последующих этапах стабильной трехспиральной структуры коллагена. Гидроксилированные остатки лизина (наряду с негидроксилированными) участвуют в образовании ковалентных связей между молекулами коллагена при сборке коллагеновых фибрилл. При цинге — болезни, вызванной недостатком витамина С, синтез коллагена нарушен на стадии гидроксилирования пролиновых и лизиновых остатков. В результате неполного гидроксилирования пептидных цепей образуются менее стабильные и менее прочные коллагеновые волокна. С этим связаны ломкость кровеносных сосудов при цинге и возникновение множественных точечных кровоизлияний.

По мере роста пептидных цепей они с помощью гидрофобного сигнального участка на N-конце проникают через мембрану в полость эндоплазматического ретикулума, где происходит гликозилирование пептидных цепей и их объединение в трехспиральные молекулы проколлагена: в правильной ориентации цепей участвуют концевые пропептиды. В ходе этих превращений проколлаген перемещается из эндоплазматического ретикулума в пластинчатый комплекс, включается в секреторные гранулы и секретируется. Уже в межклеточном пространстве при действии группы специальных протеолитических ферментов от проколлагена отщепляются концевые пропептиды, и образуется коллаген (тропоколлаген). В коллагене базальных мембран концевые пептиды могут и не отщепляться.

Образование коллагеновых фибрилл — это в основном процесс самосборки, но структуры, получающиеся в результате самосборки, закрепляются путем образования межмолекулярных ковалентных сшивок. В межклеточном матриксе есть фермент лизилоксидаза, который отщепляет ε-аминогруппу остатков лизина и гидроксилизина с образованием альдегидной группы (получается аллизин, рис. 18.5). Далее остаток аллизина одной молекулы коллагена реагирует с аминогруппой остатка лизина другой молекулы коллагена с образованием ковалентной сшивки. Возможно образование связи и между двумя остатками аллизина.

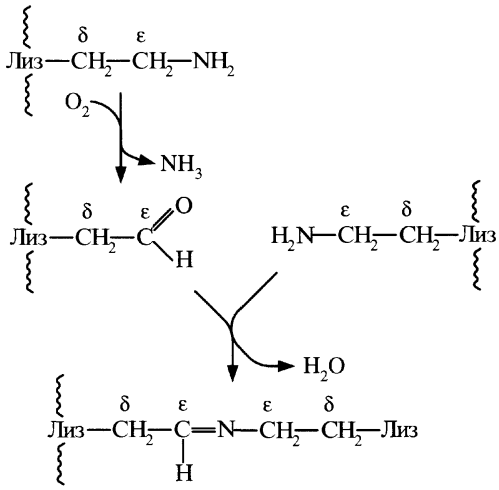


Рис. 18.5. Дезаминирование остатков лизина в коллагене и образование межмолекулярных сшивок

Альтернативный сплайсинг пре-мРНК некоторых коллагенов увеличивает разнообразие молекул коллагена.

Некоторые из ферментов, участвующих в пострансляционной модификации коллагена, рассматриваются как перспективные мишени лекарств (ингибиторов) для предотвращения избыточной фиброзной реакции при многих болезнях.

На рис. 18.6 представлена электронная микрофотография базальной мембраны и коллагеновых волокон. Коллагеновые волокна имеют высокую механическую прочность; разветвленные и переплетающиеся волокна образуют трехмерную сетку, заполненную другими веществами межклеточного матрикса, которая и придает прочность тканям.

Рис. 18.6
Электронная микрофотография базальной мембраны и расположенных под ней коллагеновых фибрилл

Коллагены, образующие сетевидные структуры

Наиболее распространенным белком этой группы является коллаген IV типа, основной структурный белок базальных мембран. В геноме человека имеется шесть локусов, кодирующих шесть различающихся пептидных цепей, из которых строятся трехцепочечные молекулы коллагена IV. Пептидные цепи коллагена IV не подвергаются протеолитической модификации после секреции и сохраняют концевые глобулярные домены. Чаще всего коллаген IV содержит цепи α1(IV) и α2(IV) в составе гетеротримеров [α1(IV)]2α2(IV). Взаимодействуя глобулярными С-концевыми доменами, молекулы образуют димеры, а при взаимодействии N-концевыми доменами – тетрамеры (рис. 18.7). Далее к этим взаимодействиям конец в конец добавляются латеральные взаимодействия трехцепочечных спиральных доменов, в том числе с образованием суперспиралей. В результате получается сетевидная трехмерная структура с гексагональными ячейками рамером 170 нм.

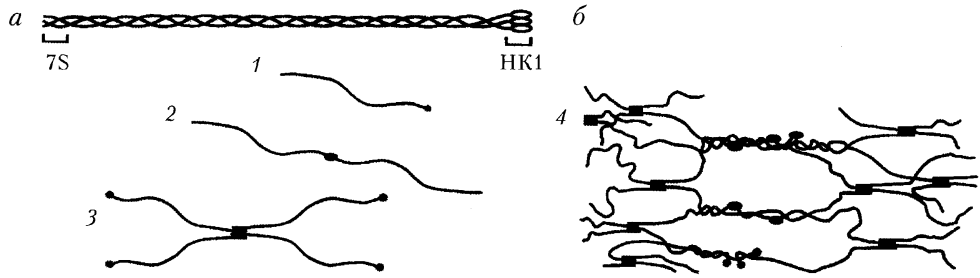


Рис. 18.7. Сетевидная структура, образованная коллагеном IV:

а — тройная спираль мономера коллагена IV: 7S — N-конец; НК1 — С-конец; *1* — мономер; *2*— димер, образованный соединением мономеров в области доменов НК1; *3* — тетрамер, образованный соединением мономеров в области доменов 7S; *4* — образование сетчатой структуры из олигомерных форм коллагена IV

Многие из коллагенов, не образующих фибрилл (коллагены типов IX, XII, XIV, XVI, XIX и некоторые другие), связаны с фибриллами и оказывают влияние на структуру (в частности, на толщину) и ориентацию фибрилл.

ЭЛАСТИН

Наряду с коллагеном, в соединительной ткани содержится эластин. Как и коллаген, эластин содержит много глицина и пролина. Однако, в отличие от коллагена, в нем мало гидроксипролина, нет гидроксилизина и необычно много валина, даже больше, чем пролина; много также других гидрофобных аминокислот. Пептидная цепь эластина длиной около 450 аминокислотных остатков не имеет постоянной пространственной структуры, но каждая молекула в ненапряженном состоянии произвольно изогнута, образуя очень рыхлую глобулу (рис. 18.8). В межклеточном матриксе молекулы эластина соединены множеством сшивок, в образовании которых участвуют остатки лизина. В результате получаются эластиновые волокна и слои. Гибкая и случайная конформация молекул эластина в этих волокнах и слоях делает возможным обратимое растяжение (рис. 18.9).

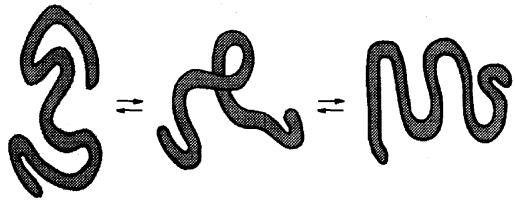


Рис. 18.8. Разные случайные конформации молекулы эластина

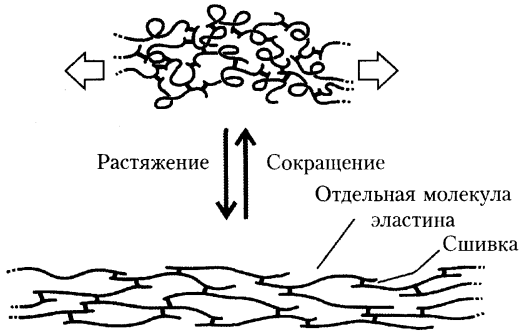


Рис. 18.9. Растяжение и сокращение эластина

Эластин — основной компонент эластических волокон соединительной ткани. Способность коллагена к упругому растяжению невелика, в то время как эластин — резиноподобный полимер. Он содержится в больших количествах в межклеточном веществе тканей, испытывающих периодические растяжения и сокращения, таких, как крупные кровеносные сосуды, связки, легкие; например, в аорте эластин составляет 30–60 % от массы вещества ткани, в выйной связке — 70–80 %.

Время полужизни эластина в тканях человека — около 75 лет. Таким образом, за всю жизнь эластин обновляется только наполовину.

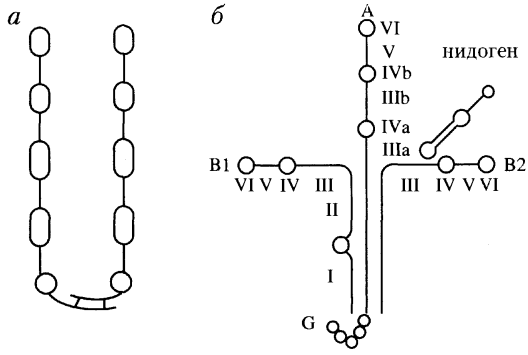


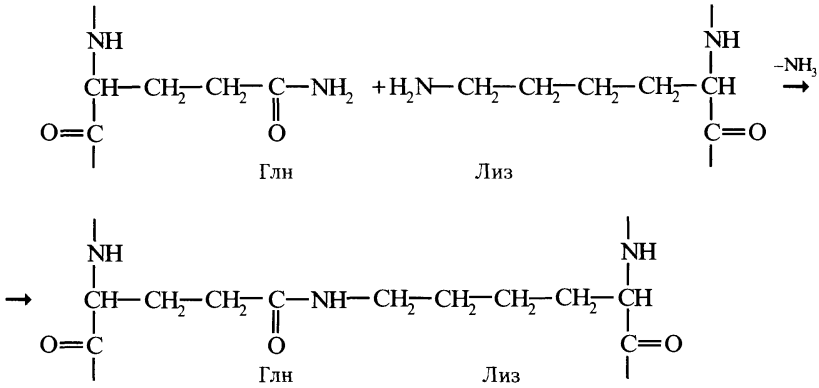
Рис. 18.10. Строение фибронектина (*а*) и комплекса ламинин-нидоген (*б*):
кружки и овалы — глобулярные домены; *G* — С-концевые глобулярные домены цепи А ламинина

НЕКОЛЛАГЕНОВЫЕ СТРУКТУРНЫЕ ГЛИКОПРОТЕИНЫ

Фибронектин

Фибронектин представляет собой димер двух одинаковых или немного различающихся субъединиц с молекулярной массой около 250 кДа, соединенных антипараллельно двумя дисульфидными связями в области С-концов (рис. 18.10, *а*). Пептидная цепь образует несколько глобулярных доменов. Молекулы имеют вытянутую форму (примерные размеры 60×2 нм). Молекула фибронектина содержит специфические центры связывания с другими молекулами фибронектина, с коллагеном, сульфированными гликозамингликанами, интегринами.

Кроме того, на молекуле фибронектина есть центр связывания трансглутаминазы — фермента, который катализирует реакцию между остатками глутамина одной белковой молекулы и остатками лизина другой белковой молекулы, сшивая их друг с другом:



Присоединяясь к фибронектину, трансглутаминаза сшивает поперечными связями молекулы фибронектина друг с другом, с коллагеном и другими белками. Таким способом структуры, возникающие путем самосборки, фиксируются прочными ковалентными связями.

В геноме человека один ген пептидной цепи фибронектина, но в результате альтернативного сплайсинга, а также посттрансляционной модификации (гликозилирование, фосфорилирование, сульфирование) образуется несколько форм белка, различных в клетках разных типов. Фибронектины синтезируются и секретируются многими клетками, включая фибробласты, гладкомышечные, эндотелиальные и эпителиальные клетки. Фибронектин содержится главным образом в фиброретикулярном матриксе и в незначительных количествах — в базальных мембранах. Особая (растворимая) форма фибронектина имеется в плазме крови.

Ламинин

Ламинин представляет собой гетеротример AB_1B_2 (рис. 18.10, *б*). Известны варианты каждой из трех цепей, которые могут комбинироваться по-разному при образовании тримерной молекулы. Молекула ламинина имеет крестообразную форму, с

тремя короткими ветвями, каждая из которых содержит глобулярные домены, и длинной ветвью с С-концевым глобулярным доменом цепи А. Ламинин в базальных мембранах находится в комплексе с другим белком — нидогеном (энтактином). Нидоген имеет стержневидный сегмент, по концам которого находятся глобулярные домены. С-концевым доменом нидоген соединен с одной из коротких ветвей ламинина. На N-конце имеются два глобулярных домена; один из них содержит центры связывания коллагена IV и белкового ядра перлекана (протеогликан, см. ниже). Таким образом нидоген обеспечивает структурную интеграцию важнейших компонентов базальной мембраны. Кроме того, глобулярные домены самого ламинина содержат центры связывания ряда лигандов независимо от нидогена. К числу таких лигандов относятся другие молекулы ламинина, некоторые белки межклеточной адгезии (включая интегрины), гепарансульфатные протеогликаны как базальной мембраны, так и клеточной поверхности.

В присутствии Ca^{2+} ламинин путем самосборки образует сетевидные структуры за счет Са-зависимого взаимодействия глобулярных доменов коротких ветвей. Возможно, в базальных мембранах сетевидные ламининовые слои наложены на сетевидные коллагеновые слои, и в некоторых местах эти слои скреплены между собой при участии нидогена.

ГЛИКОЗАМИНГЛИКАНЫ И ПРОТЕОГЛИКАНЫ

Гликозамингликаны

Гликозамингликаны (мукополисахариды) представляют собой линейные гетерополисахариды, построенные из повторяющихся дисахаридных единиц. В состав гликозамингликанов входят гексуроновые кислоты (чаще глюкуроновая кислота) и N-ацетилпроизводные глюкозамина или галактозамина. В табл. 18.1 приведены основные гликозамингликаны тканей человека.

Таблица 18.1. Строение гликозамингликанов

Гликозамингликан	Дисахаридная единица		Число сульфатных групп на 1 дисахаридную единицу
	гексуроновая кислота	гексозамин	
Гиалуроновая кислота	Глюкуроновая	N-ацетилглюкозамин	0
Хондроитин-4-сульфаты и хондроитин-6-сульфаты	»	N-ацетилгалактозамин	0,1–1,3
Дерматансульфаты	Идуроновая или глюкуроновая	»	1–3
Кератансульфаты	Галактоза*	N-ацетилглюкозамин	0,9–1,8
Гепарансульфаты	Глюкуроновая или идуроновая	»	0,4–2
Гепарин**	То же	»	1,6–3

* Не уроновая кислота.

** Гепарин существует в форме одиночных полисахаридных цепей или в форме протеогликанов — белков, содержащих несколько полисахаридных цепей. Гепарин синтезируется в тучных клетках, располагающихся вдоль стенок кровеносных сосудов; участвует в регуляции свертывания крови (см. гл. 21).

Гиалуроновая кислота построена из повторяющейся единицы, включающей глюкуроновую кислоту (GlcUA) и N-ацетилглюкозамин (рис. 18.11, *а*). Молекулярная масса гиалуроновой кислоты достигает нескольких миллионов (20 000–30 000 мономеров в молекуле).

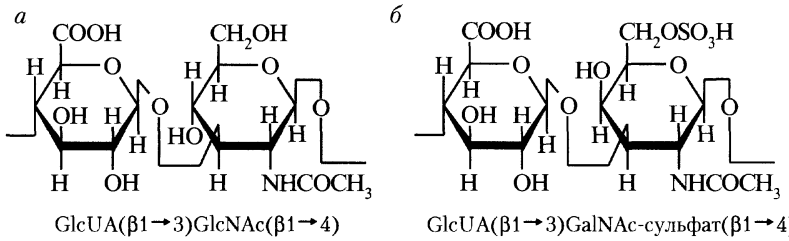


Рис. 18.11. Повторяющиеся димеры гиалуроновой кислоты (*а*) и хондроитинсульфата (*б*)

Хондроитинсульфаты содержат повторяющуюся единицу из глюкуроновой кислоты и сульфированного N-ацетилгалактозамина (рис. 18.11, *б*). В хондроитин-4-сульфате остаток серной кислоты находится в четвертом положении. Молекулярная масса хондроитинсульфатов лежит в пределах 10 000–60 000.

Гепарансульфат представляет собой неразветвленную цепь, построенную из глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина, с последовательностью $(ГлкА\text{-}ГлкN)_n$. Остаток глюкозамина может быть сульфирован по 2-й, 3-й и 6-й позициям. Молекулярная масса цепей обычно от 50 до 100 кДа.

Протеогликаны

Сульфированные гликозамингликаны входят в состав соединений, содержащих белок и называемых протеогликанами. С одной пептидной цепью часто связано большое число цепей гликозамингликана, так что получается молекула протеогликана, напоминающая ершик. Молекула агрекана — протеогликана из хряща — содержит около 100 цепей хондроитинсульфата и около 60 цепей кератансульфата (рис. 18.12). Разные протеогликаны различаются набором гликозамингликанов, размером молекулы, относительным содержанием белка (рис. 18.13). Перлекан — основной гепарансульфат-протеогликан базальных мембран, содержит одну большую пептидную цепь (около 3500 аминокислотных остатков) и три гепарансульфатные цепи длиной примерно в 200 мономеров каждая). Петидная цепь включает около трех десятков глобулярных доменов (каждый содержит около 100 аминокислотных остатков), разделенных короткими стержневидными сегментами, так что при электронной микроскопии молекула выглядит как нитка бус. Гепарансульфатные цепи связаны с пептидной цепью через гидроксильные группы серина в области первых пятнадцати аминокислотных остатков с N-конца. Глобулярные домены пептидной цепи перлекана содержат центры связывания некоторых компонентов базальной мембраны, в том числе коллагена IV и ламинина. Во взаимодействии с этими молекулами участвуют и гепарансульфатные цепи: коллаген IV и ламинин имеют специфические центры связывания гепарансульфатов. Кроме того, перлекан, а также другие гепарансульфат-протеогликаны разными способами могут быть связаны с поверхностью клеток.

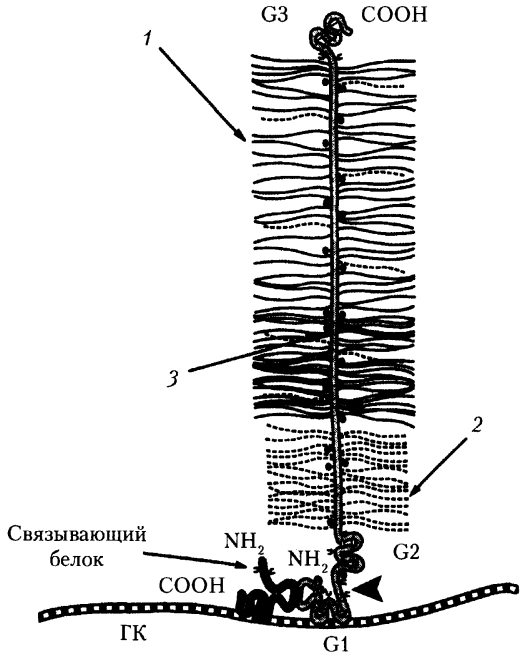


Рис. 18.12. Агрекан, соединенный с гиалуроновой кислотой:

1 — хондроитинсульфатные цепи; *2* — кератансульфатные цепи; *3* — пептидная цепь; *ГК* — гиалуроновая кислота

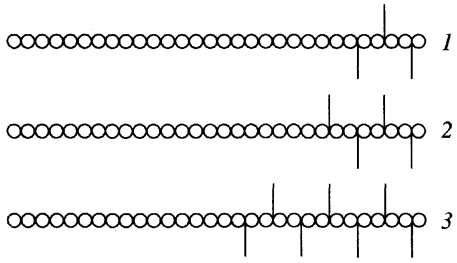


Рис. 18.13. Строение некоторых гепарансульфатпротеогликанов:

1 — перлекан из базальных мембран; *2* — ГСПГ 200 кДа; *3* — ГСПГ 350 кДа

В межклеточном матриксе многих органов содержатся малые протеогликаны, к числу которых относятся декорин, бигликан, фибромодулин. Они имеют небольшую молекулярную массу, содержат центр связывания трансформирующего фактора роста (ТФР-β) и участвуют в регуляции его активности.

Синтез протеогликанов

Белковая часть протеогликанов, как и другие секретируемые белки, синтезируется на полирибосомах, связанных с эндоплазматическим ретикулумом. Пептидная цепь пронизывает мембрану и растет в полость эндоплазматического ретикулума

(рис. 18.14). Здесь начинается синтез глюкозамингликановой части протеогликана. К гидроксильным группам серина при участии гликозилтрансферазы присоединяется первый моносахаридный остаток, затем цепь удлинняется путем присоединения очередных моносахаридов. Здесь же происходит сульфирование углеводной части. Одновременно с синтезом полисахаридных цепей молекула протеогликана продвигается по направлению к пластинчатому комплексу, где включается в секреторные гранулы и экзоцитируется.

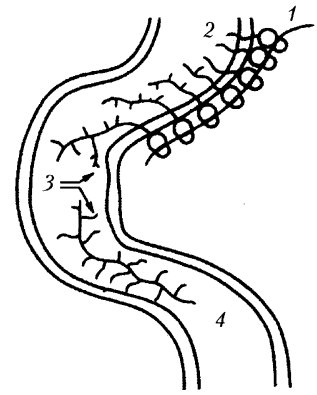


Рис. 18.14. Синтез протеогликанов:

1 — мРНК в составе полирибосомы, связанной с мембраной; *2* — растущая пептидная цепь; *3* — полисахаридные цепи; *4* — полость эндоплазматического ретикулума

В межклеточном веществе протеогликаны содержатся главным образом в составе комплексов с гиалуроновой кислотой, как это представлено на рис. 18.12. На N-конце пептидной цепи протеогликана в глобулярном домене есть центр связывания, взаимодействующий с моносахаридами гиалуроновой кислоты (при участии еще одной молекулы — связывающего белка). Одна молекула гиалуроновой кислоты может присоединить до 150 молекул сульфатированных протеогликанов.

Время полужизни протеогликанов в межклеточном матриксе многих тканей измеряется днями или неделями, а протеогликанов клеточной поверхности — часами. Разрушаются протеогликаны в лизосомах.

Рессорная функция протеогликанов

Молекулы протеогликанов в растворе «распушены» вследствие отталкивания одноименно заряженных сульфатированных цепей гликозамингликанов, а также вследствие гидратации. Кроме того, по тем же причинам отдельные молекулы располагаются не вплотную друг к другу. Таким образом, объем, занимаемый молекулами, значительно больше, чем объем самих полисахаридных и пептидных цепей. При увеличении давления объем, занимаемый молекулами, обратимо уменьшается: жидкость выжимается из промежутков между гликозамингликановыми цепями, и они сближаются друг с другом. Поскольку цепи одноименно заряжены, сопротивление давлению нарастает по мере сжимания молекул. Если давление снять, молекулы вновь принимают «распушенную» форму. Это свойство протеогликанов особенно важно для хрящей суставных поверхностей, где протеогликаны смягчают переменные нагрузки, выполняя роль рессор. Межклеточный матрикс хряща содержит коллагеновые волокна, которые делают его прочным, а распределенный между волокнами протеогликановый гель, подобно частично сжатой пружине, создает тургор и гасит резкие перемены нагрузки.

В межпозвоночных дисках содержание воды тоже непостоянно: вода вытесняется из них при механических нагрузках (мышечное напряжение, сила тяжести) и вновь возвращается, когда нагрузка снята. При смене ночного отдыха на дневную деятельность увеличивается нагрузка на диски, и из них в течение дня постепенно

выдавливается вода, ее содержание в дисках снижается примерно на 20 %. Вследствие этого рост человека к вечеру на 1–2 см меньше, чем утром. У космонавтов в условиях невесомости наблюдается увеличение роста за счет накопления воды в дисках даже на 5 см.

Мукополисахаридозы. Катаболизм гликозамингликанов (мукополисахаридов) происходит в лизосомах при участии набора специфических гликозидаз, каждая из которых гидролизует определенные гликозидные связи. Мукополисахаридозы — это форма гликозидозов, связанная с наследственным дефектом какого-либо из ферментов, гидролизующих гликозамингликаны (табл. 18.2). Мукополисахаридозы — тяжелые заболевания, проявляющиеся резким нарушением развития ребенка и уменьшением продолжительности жизни.

Таблица 18.2. Некоторые мукополисахаридозы

Название болезни	Продукты накопления	Дефектный фермент
Болезнь Гурлер	Дерматансульфат, гепарансульфат	α-L-Идуронидаза
Болезнь Гюнтера	Дерматансульфат	Идуронатсульфатаза
Болезнь Санфилиппо	Гепарансульфат	Гепарансульфатаза, N-ацетил-α-D-глюкозаминидаза или ацетилтрансфераза
Болезнь Моркио	Кератансульфат, хондроитин-6-сульфат	Хондроитинсульфат-N-ацетилгалактозамин-6-сульфат-сульфатаза
Синдром Марото—Лами	Дерматансульфат	Хондроитинсульфат-N-ацетилгалактозамин-4-сульфат-сульфатаза
Болезнь Слая	Хондроитинсульфаты	β-Глюкуронидаза

САМОСБОРКА МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Большинство основных компонентов межклеточного матрикса обнаруживается во многих тканях, но существуют значительные особенности в количественных отношениях компонентов и в их пространственной организации, которые определяются типом окружающих клеток. Например, эпителиальные клетки, связанные с базальными мембранами, с очень малой скоростью синтезируют коллаген IV, ламинин, фибронектин, гепарансульфаты. Но если клетки культивировать на пластиковой подложке, то образование этих веществ сильно увеличивается: клетка пытается восстановить нормальное окружение.

По-видимому, специализированных структур межклеточного матрикса не меньше, чем фенотипически различающихся клеток и разных органов. Например, соединительная ткань в роговице глаза обеспечивает ее прозрачность, в структурах уха — восприятие звука, в коже, сухожилиях, связках — прочность, в хрящах суставных поверхностей — рессорные свойства, в легких — эластичность. В мышцах межклеточный матрикс окружает мышечные волокна, соединяя их вместе в функциональную анатомическую единицу, и служит для передачи силы сокращения мышцы.

Межклеточный матрикс содержит молекулы, способные путем самосборки образовывать ассоциаты. В предшествующем тексте многократно упоминалось о наличии разных центров связывания на молекулах межклеточного матрикса. Благодаря определенному расположению центров связывания на молекулах и специфичности их взаимодействий образуется высокоупорядоченная трехмерная структура межклеточного матрикса, определяющая ее функциональные свойства. Некоторое представление о такой организации матрикса дает рис. 18.15. Кроме того, в результате надмолекулярной организации матрикса презентируется ряд центров связывания клеток, обеспечивающих определенные позиционные отношения между клетками и матриксом. Можно сказать, что контактирующие поверхности клетки и межклеточного матрикса комплементарны. При этом обеспечивается также возможность обмена сигналами между матриксом и клетками и взаимовлияние на их функциональное состояние.

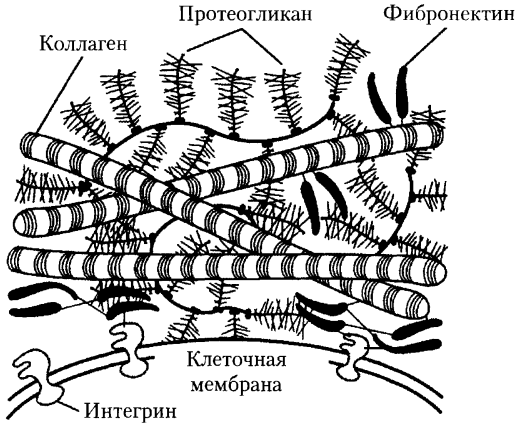


Рис. 18.15. Межмолекулярные взаимодействия в матриксе и связи матрикса с клеткой

Количество и разнообразие специфических центров связывания между молекулами межклеточного матрикса вполне допускает представление о том, что степень упорядоченности трехмерной структуры матрикса, и особенно базальных мембран, сопоставима со степенью упорядоченности пространственной структуры глобулярных белков. В определенной мере некоторый участок межклеточного матрикса можно рассматривать как единый олигомерный белок, кооперативно реагирующий на изменение любого из его мономеров. Конечно, в кооперативный ответ включается не весь матрикс в целом, а лишь некоторая область вокруг точки воздействия.

Межклеточный матрикс содержит ряд ферментов, цитокинов и других макромолекул, которые нельзя отнести к структурным компонентам, но они обеспечивают поддержание нативной структуры матрикса. Важно отметить, что эти неструктурные молекулы удерживаются в матриксе благодаря наличию специфических центров связывания со структурными компонентами, и их активность зависит от изменений (повреждений) нативной структуры матрикса.

Интеграция межклеточного матрикса и клеток

Адгезия клеток друг с другом и с межклеточным матриксом имеет решающее значение для очень большого числа физиологических и патологических процессов, таких, как пролиферация и дифференцировка клеток, их организация при образовании тканей, обмен сигналами между клетками и матриксом, заживление ран, рост и метастазирование опухолей. Интеграция обеспечивается молекулами адгезии. Известны три основные группы таких молекул: интегрины, селектины и иммуноглобулиновые молекулы адгезии.

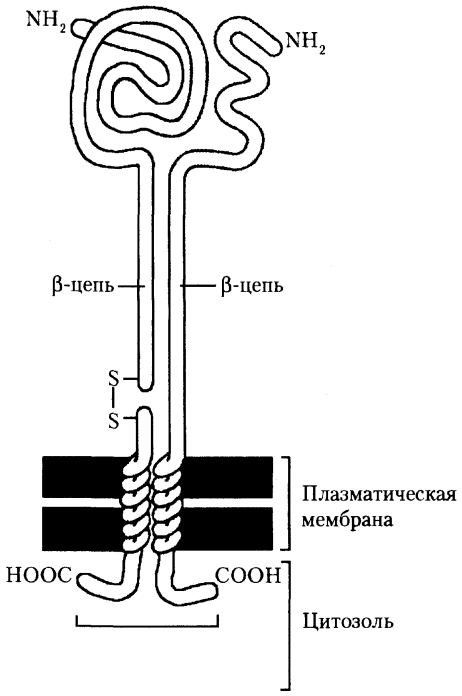


Рис. 18.16. Строение интегринов

Интегрины уникальны среди других молекул адгезии тем, что возможна модуляция их сродства к своим лигандам, и тем, что они могут реагировать на изменения концентрации паракринных гормонов.

Интегрины (рис. 18.16) — трансмембранные белки, представляют собой αβ-димеры (α-цепь 120–180 кДа, β-цепь 90–110 кДа). Каждая цепь пересекает мембрану один раз. Известны 15 разных α-цепей и 8 β-цепей; каждая из них кодируется отдельным геном. Кроме того, имеются изоформы этих цепей, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга. Найдено более 20 разных α/β-димерных интегринов. Там, где клеточная мембрана тесно контактирует с компонентами межклеточного матрикса (места фокальной адгезии), находятся скопления интегринов. Клетки разных фенотипов содержат разные наборы интегринов.

Обе цепи интегрина имеют большие внеклеточные домены. Эти домены содержат центры связывания, комплементарные соответствующим лигандам. Лигандами служат, в частности, компоненты межклеточного матрикса. Ламинин служит лигандом для 6 разных интегринов, коллагены — для 4, фибронектины — для 8. Разные лиганды (и соответствующие интегрины) вызывают разные функциональные изменения клеток.

Внутриклеточные домены интегринов короткие — 50 или меньше аминокислотных остатков (за исключением цепи β4 — около 1000 остатков). Эти домены взаимодействуют с актиновыми белками цитоскелета, а также и с другими цитоплазматическими белками, в том числе регуляторными. Когда в матриксе в области внеклеточного домена интегрина происходят изменения (например, повреждаются некоторые молекулы матрикса), сигнал передается на внутриклеточный домен и регуляторные белки, связанные с ним (сигнализация снаружи внутрь). Сигнализация интегринами снаружи внутрь приводит к изменениям многих кле-

точных функций, в том числе к изменению синтеза и секреции компонентов межклеточного матрикса или синтеза и секреции протеиназ, разрушающих компоненты матрикса. Сходным образом происходит передача сигнала изнутри наружу.

Интегрины обычно называют молекулами клеточной адгезии, однако их скорее следует относить к сигнальным молекулам. Интегрины не просто осуществляют физический контакт между внеклеточными и внутриклеточными структурами, а обеспечивают трансмембранную передачу сигнала, т. е. они — подлинные рецепторы, по механизму действия близкие к рецепторам гормонов.

Катаболизм белков межклеточного матрикса

Онтогенетическое развитие, воспаление, заживление ран, регенерация тканей связаны с миграцией клеток. Межклеточный матрикс с его переплетением макромолекул создает препятствие для миграции клеток. Это препятствие преодолевается путем локального разрушения матрикса ферментами, секретируемыми клетками или связанными с мембраной клеток.

В катаболизме белков межклеточного матрикса главная роль принадлежит металлопротеиназам (МПМ). МПМ составляют подсемейство металлоферментов — Са-зависимых, цинк-связывающих эндопептидаз, способных разрушать практически все структурные компоненты межклеточного матрикса. Известно более 20 металлопротеиназ, различающихся по субстратной специфичности и другим свойствам. Синтез и активность МПМ строго регулируются, причем в большинстве тканей базальная активность близка к нулю. При воздействиях и процессах, связанных с изменениями межклеточных взаимодействий и структуры межклеточного матрикса, синтез и активность МПМ повышаются; главными регуляторами служат тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП), а также цитокины, регулирующие экспрессию МПМ и их ингибиторов. Плазмин также способен разрушать многие белки ММ и играет важную роль в нормальном обновлении матрикса, а также его репарации при повреждениях.

Коллагены — медленно обменивающиеся белки: время их полужизни измеряется неделями или месяцами (при расчете на тотальный коллаген организма). Большинство протеолитических ферментов тканей, а также пищеварительные ферменты не гидролизуют нативный коллаген. Ключевую роль в катаболизме фибриллообразующих коллагенов играют МПМ группы коллагеназ. Коллагеназа перерезает все три пептидные цепи молекулы коллагена в одном месте, примерно на $^1/_4$ расстояния от С-конца, между остатками глицина и лейцина (или изолейцина) (рис. 18.17). Образующиеся фрагменты растворимы в воде и легко денатурируются, после чего их пептидные связи становятся доступными для гидролиза разными пептидгидролазами. Распад коллагена — единственный источник свободного гидроксипролина в организме. Преобладающая часть гидроксипролина катаболизируется, а часть выделяется с мочой, главным образом в составе небольших пептидов (ди- и трипептидов). Поэтому содержание гидроксипролина в крови и

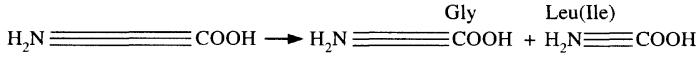


Рис. 18.17. Гидролиз коллагена коллагеназами

моче отражает баланс скорости катаболизма коллагена (источник гидроксипролина) и скорости катаболизма гидроксипролина. У взрослого человека экскретируется 15–50 мг гидроксипролина в сутки; в возрасте 10–20 лет — до 200 мг в сутки. При некоторых болезнях, связанных с поражением соединительной ткани, экскреция гидроксипролина увеличивается вследствие ускоренного распада коллагена, например при гиперпаратироидизме, болезни Педжета (до 1 г в сутки). Еще больше выделяется гидроксипролина при наследственной гипергидроксипролинемии: в этом случае причиной является нарушение катаболизма гидроксипролина, а именно — дефект фермента гидроксипролиноксидазы.

Базальная мембрана капилляров почечного клубочка

Базальная мембрана почечных клубочков участвует в образовании первичной мочи. В отличие почти от всех органов базальная мембрана клубочков трехслойна (рис. 18.18). Обычно базальные мембраны одной поверхностью контактируют с выстилающими ее клетками, а другой – с межклеточным матриксом интерстициальной соединительной ткани (см. рис. 18.1). Базальная мембрана капилляров в почечных клубочках относится к исключениям из этого правила: обе ее поверхности контактируют с клетками. Между клетками эндотелия имеются промежутки (окна, фенестры), в области которых кровь непосредственно контактирует с базальной мембраной. Именно здесь происходит фильтрация, в результате чего в полость капсулы клубочка попадают вода и растворенные в ней низкомолекулярные компоненты плазмы крови; белки плазмы почти не проникают через мембрану.

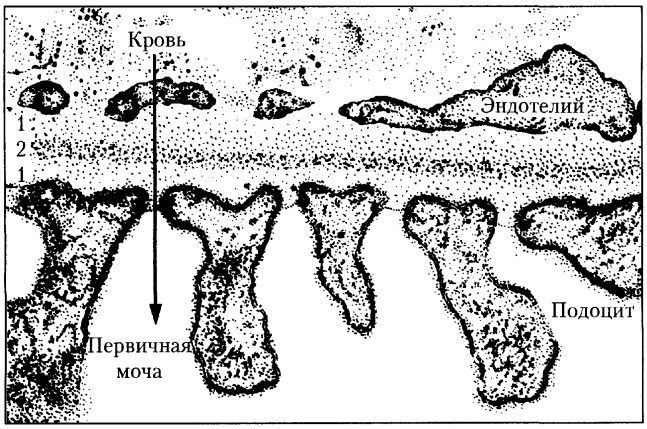


Рис. 18.18. Строение стенки капилляров в почечных клубочках. В базальной мембране слои 1 содержат протеогликаны, углеводная часть которых представлена гепарансульфатом, гиалуроновой кислотой, а также неколлагеновые структурные гликопротеины (ламинин, фибронектин); слой 2 построен из коллагена типа IV

Базальная мембрана клубочков непроницаема для белков плазмы по двум причинам: во-первых, размер промежутков между молекулами в мембране ограничивает возможность проникновения через нее веществ с высокой молекулярной мас-

сой (больше 70 000); во-вторых, белки плазмы крови имеют отрицательный заряд, что создает еще одно препятствие для их проникновения в отрицательно заряженную область сульфатированных гликозамингликанов базальной мембраны. Значение заряда можно обнаружить в простом опыте: если животному ввести в кровь какой-нибудь не слишком крупный белок с положительным суммарным зарядом, то он появляется в моче.

Репарация повреждений межклеточного матрикса в норме

Как и все структуры организма, межклеточный матрикс хотя и медленно, но постоянно обновляется. В норме в матриксе могут возникать отдельные очаги повреждения (например, в результате гликирования или случайного протеолиза), объем которых соизмерим с размерами молекул матрикса. Картину репарации локального повреждения базальной мембраны можно представить так. Поскольку базальная мембрана реагирует на воздействия кооперативно, повреждение даже единичных молекул может вызвать нарушение трехмерного ансамбля базальной мембраны в некотором пространстве вокруг повреждения. В зоне нарушения активируются металлопротеиназы, которые находятся в матриксе в латентном состоянии. Происходит деградация поврежденных и неправильно ориентированных молекул; вследствие этого нарушаются связи между базальной мембраной и интегринами. Интегрины «замечают» нарушение и передают сигнал в клетку, которая отвечает усилением синтеза и секреции компонентов матрикса. Возможна также стимуляция синтеза в результате освобождения связанных с матриксом молекул ТФР-β. Базальная мембрана с нативной трехмерной структурой, граничащая с местом повреждения, служит матрицей для сборки новой мембраны, замещающей поврежденную. Поскольку формирование трехмерной структуры базальной мембраны происходит путем самосборки и в объединении компонентов мембраны участвует множество слабых связей, то неизбежны ошибочные соединения, образование неправильных структур (механизм проб и ошибок, как и при образовании пространственной структуры белковой молекулы). Неправильные (ошибочные) структуры также разрушаются протеиназами, и попытка самосборки повторяется. Протеиназы удаляют также и избыточные молекулы, не нашедшие себе места во вновь образующейся базальной мембране.

Заживление ран

В заживлении ран участвует ряд цитокинов, но особая роль принадлежит трансформирующему фактору роста (ТФР-β).

ТФР-β синтезируется в большинстве (если не во всех) клетках организма. Примечательная черта ТФР-β — его способность сильно стимулировать накопление межклеточного матрикса. ТФР-β индуцирует синтез коллагена, фибронектина, ламинина, гликозамингликанов и одновременно подавляет их деградацию. ТФР-β стимулирует также экспрессию интегринов, регулирующих образование компонентов и макроструктур межклеточного матрикса. Таким путем обеспечивается восполнение матрикса в месте повреждения, необходимое для пролиферации и миграции клеток, и в конечном счете для восстановления нормальной ткани.

ТФР-β — белок с молекулярной массой 12,5 кДа, гомодимер с дисульфидными связями между пептидными цепями. ТФР-β и другие цитокины могут связываться с клеточной поверхностью и с матриксом, включая базальные мембраны. Такое взаимодействие позволяет резервировать цитокины на поверхности клетки и в матриксе.

После механического повреждения ткани на поверхности раны происходит агрегация тромбоцитов и образование фибринового сгустка между краями раны. При этом из тромбоцитов освобождается ТФР-β (рис. 18.19). Поврежденный межклеточный матрикс также выделяет ТФР-β. Далее концентрация ТФР-β нарастает за счет его секреции клетками в результате аутокринной и паракринной стимуляции. Затем следует воспалительная реакция, выделение жидкого экссудата, содержащего белки. В первые 24 часа наблюдается повышенная митотическая активность эпителиальных клеток по краям раны и их миграция. ТФР-β действует как хемоаттрактант: в область повреждения мигрирует ряд клеток, в том числе моноциты и фибробласты. ТФР-β индуцирует синтез и секрецию компонентов матрикса фибробластами, а также и клетками самой поврежденной ткани. По мере образования матрикса ТФР-β активирует рецепторы тромбоцитарного фактора роста на клетках ткани, и этот цитокин индуцирует клеточную пролиферацию. Пролиферация эпителия продолжается, пока не закроется рана. Происходит также пролиферация фибробластов по краям раны (в течение примерно 3-х дней).

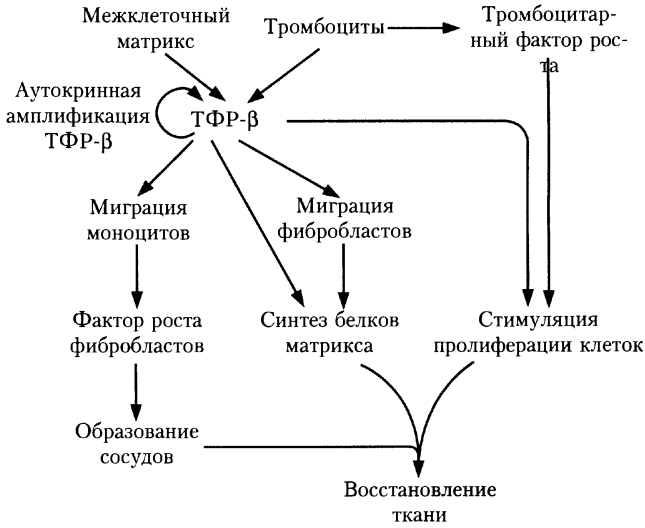


Рис. 18.19. Основные события при заживлении раны

В это же время фактор роста фибробластов (ФРФ), секретируемый моноцитами, индуцирует образование новых сосудов, врастающих из краев раны. Образующаяся грануляционная ткань содержит коллагеновые фибриллы, контактирующие с поверхностью фибробластов. Эластин образуется на поздних стадиях заживления. По мере накопления грануляционной ткани и межклеточного матрикса образуется трехмерная сеть коллагеновых фибрилл, что ведет к увеличению

стягивающего напряжения и образованию рубца — репарация завершается: концентрация ТФР-β снижается, и весь аппарат репарации выключается. Однако иногда выключение запаздывает, и образуется гипертрофированный рубец, келоид; причины образования келоида неизвестны.

В репарации повреждений участвуют и другие цитокины. В частности, фактор некроза опухолей и ИЛ-1 индуцируют воспаление, клеточную миграцию и пролиферацию.

Так заживает резаная рана. Если же при ранении утрачена часть ткани, заживление происходит путем образования грануляционной ткани на дне раны и реэпителизации поверхности раны. В ране образуется белоксодержащий экссудат, который при высыхании образует корку (струп). У краев раны происходит пролиферация эпителиальных клеток, и слой эпителия растет под коркой в направлении от краев раны к центру. Существенную роль в заживлении играет сжатие раны, уменьшающее площадь заживаемой поверхности. Многие фибробласты в таких ранах приобретают свойства миофибробластов (под влиянием ТФР-β). Эти клетки обладают способностью сжимать трехмерную сеть, построенную из коллагеновых фибрилл, уменьшая объем геля коллагена: фибробласты мигрируют внутрь сети и каким-то образом укладывают фибриллы в пучки, компактизируют упаковку. Заживление регулируют в основном те же цитокины, что и в случае резаных ран.

ФИБРОЗ

Фиброз (или склероз) — стадия развития многих хронических заболеваний, проявляющаяся избыточным накоплением межклеточного матрикса в области поврежденной ткани, испытывающей хроническое действие повреждающего агента. Фиброзные изменения могут происходить в разных органах (фиброз почек, печени, легких, сердца, костного мозга, кожи) и, понятно, характеризуются органной специфичностью, однако в их молекулярной основе есть много общего.

Фиброз обычно представляет собой финальную стадию развития разных хронических болезней того или иного органа: накоплению межклеточного матрикса предшествует достаточно длительная воспалительная фаза развития болезни (например, гепатит, гломерулонефрит), обычно связанная с хроническим действием повреждающего фактора (этанол при циррозе печени, вдыхание пыли при фиброзе легких, гипергликемия при диабетической нефропатии и др.). Именно этой ранней фазой определяется этиологическая и патогенетическая специфика развития болезни, завершающейся фиброзом. Например, нефросклероз может быть следствием (осложнением) гломерулонефрита, гипертензии, сахарного диабета.

Глава 19

МЕХАНИЗМЫ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ ТОКСИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ

ТОКСИЧНОСТЬ КИСЛОРОДА

До появления фотосинтезирующих организмов земная атмосфера, по-видимому, почти не содержала кислорода. Он создавался и создается в наше время фотосинтезирующими организмами путем разложения воды за счет энергии солнечного света. При фотосинтезе водород используется для синтеза органических веществ (восстановления CO_2), а кислород является побочным продуктом. С образованием кислородной атмосферы стало возможным развитие организмов, использующих энергию органических веществ (иначе говоря, энергию солнечного света, запасенную в органических веществах) путем их окисления кислородом. Такой путь получения энергии гораздо более эффективен, чем те, которые возможны в отсутствие кислорода и действуют у анаэробных организмов. Однако вместе с преимуществами кислород принес и новую опасность для жизни. Молекулярный кислород, не слишком реакционноспособный в своем основном состоянии, может образовывать высокоактивные формы, способные даже убить живую клетку. В связи с этим одновременно с механизмами использования кислорода в ходе биологической эволюции вырабатывались и механизмы защиты от его повреждающего действия. С другой стороны, фагоцитирующие лейкоциты используют активные формы кислорода для разрушения бактерий и других клеток.

Молекулярный кислород O_2 в основном триплетном состоянии имеет два неспаренных электрона с одинаково ориентированными спинами, занимающих самостоятельные внешние орбитали. Каждая из этих орбиталей может принять еще один электрон. Полное восстановление O_2 до $2H_2O$ требует присоединения четырех электронов:

$$O_2 + 4\,e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O.$$

Однако в большинстве случаев в организме восстановление кислорода происходит поэтапно, с переносом одного электрона на каждом этапе (рис. 19.1).

Присоединение первого электрона образует супероксидный анион O_2^-, который имеет на внешней орбитали неспаренный электрон; такие атомы (или молекулы, содержащие такие атомы) называют свободными радикалами. Супероксид,

получая еще один электрон, в водной среде превращается в пероксид водорода H_2O_2. Далее присоединение третьего электрона приводит к образованию молекулы воды и гидроксильного радикала $OH^{\bullet}$. Четвертый электрон превращает гидроксильный радикал в молекулу воды.

Супероксидный анион может действовать как окислитель (акцептор электрона; рис. 19.1, реакция 2) и как восстановитель (донор электрона). В том числе возможна и такая реакция, когда одна молекула супероксида служит донором электрона, а другая — акцептором (реакция дисмутации):

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

(реакция 5 на рис. 19.1).

Пероксид водорода, в свою очередь, может восстанавливаться супероксидом:

$$H_2O_2 + O_2^- \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2$$

(реакции 6 и 6′ на рис. 19.1).

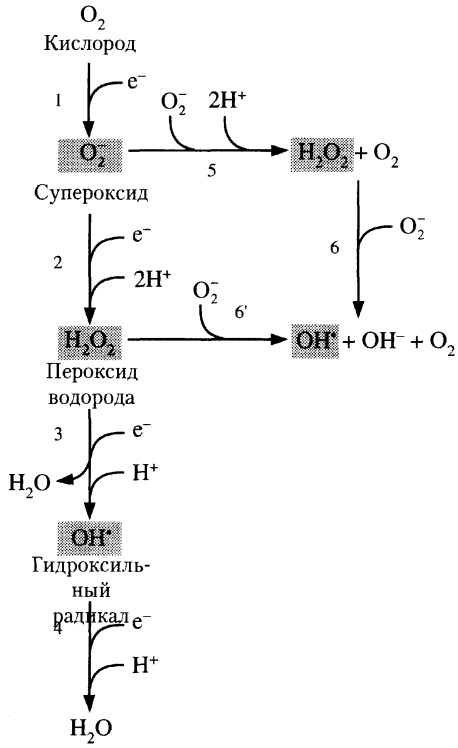


Рис. 19.1. Восстановление кислорода и образование активных форм кислорода

В реакциях 6 и 6′, как и в реакции 3, образуется свободный гидроксильный радикал $OH^{\bullet}$. Супероксид, пероксид водорода и гидроксильный радикал называют активными формами кислорода. Супероксид и гидроксильный радикал представляют собой свободные радикалы; пероксид водорода не является свободным радикалом, но может порождать свободные радикалы (реакции 3 и 6 на рис. 19.1). Свободные радикалы имеют высокую химическую активность, реагируют практически с любой встретившейся молекулой, извлекая из нее электрон и тем самым порождая новые свободные радикалы, т. е. возникают цепные реакции. Свободные радикалы повреждают многие вещества клеток, в том числе нуклеиновые кислоты, мембранные липиды, белки, углеводы; повреждения могут быть гибельными для клетки. Около 2 % потребляемого человеком кислорода уходит на образование его активных форм; количество окислительных повреждений ДНК составляет около 10 000 в день.

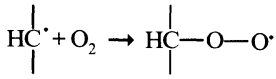
Ферменты, использующие кислород в качестве субстрата, являются основным источником активных форм кислорода. В составе фермент-субстратного комплекса образуются промежуточные продукты неполного восстановления. Эти продукты, в основном, быстро подвергаются дальнейшим превращениям, оставаясь связанными с ферментом, но возможна их некоторая утечка в окружающий раствор. Пероксид водорода образуется в реакциях, катализируемых оксидазами, а также в реакции дисмутации супероксидного иона. Значительная часть активных форм

кислорода образуется в процессах микросомального (монооксигеназного) окисления (см. ниже) и при переносе электронов в митохондриальной дыхательной цепи, прежде всего в QH_2-цитохром *c*-редуктазном комплексе.

Активные формы кислорода в организме могут образоваться и в реакциях самопроизвольного (неферментативного) окисления ряда веществ. Одним из важных примеров является окисление гемоглобина в метгемоглобин, при котором образуется супероксид (подробнее этот процесс рассматривается в гл. 21).

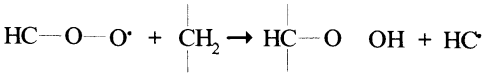
Перекисное окисление липидов

Активные формы кислорода способны отнимать водород от определенных групп $-CH_2-$ ненасыщенной жирной кислоты, превращая их в свободнорадикальные группы $-CH^{\bullet}$. Такой радикал жирной кислоты легко присоединяет молекулу кислорода и превращается в пероксидный радикал жирной кислоты:



(а)

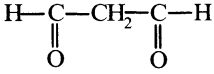
Пероксидный радикал может отнимать водород от другой молекулы жирной кислоты:



(б)

В этой реакции пероксидный радикал восстанавливается в гидропероксид за счет окисления другой молекулы жирной кислоты в свободный радикал. Этот второй радикал проходит реакцию (а), затем снова следует реакция (б), в которой образуется третий свободный радикал жирной кислоты, и т. д. Иначе говоря, возникает цепной химический процесс. Активные формы кислорода нужны лишь для инициирования цепной реакции, а начавшись, она продолжается уже независимо от инициирующих веществ.

Пероксиды весьма нестабильны и распадаются с образованием альдегидов: это происходит путем разрыва в жирной кислоте углерод-углеродной связи, соседствующей с пероксидной группой. В значительных количествах образуется малоновый диальдегид:



По концентрации малонового диальдегида в тканях можно судить об интенсивности перекисного окисления липидов. Таким путем могут окисляться как свободные жирные кислоты, так и остатки жирных кислот в составе других липидов. Наиболее легко повреждаются полиненасыщенные жирные кислоты, в частности арахидоновая кислота. Пероксидное окисление уменьшает гидрофобность липидов, изменяет их конформацию, приводит к образованию ковалентных сшивок между молекулами липидов или липидов и белков. Вследствие этого при окислении мембранных липидов резко повреждаются структура и функции мембран.

МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ ОТ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КИСЛОРОДА

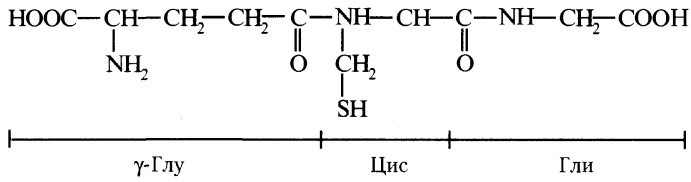
Антиоксидантные ферменты

Супероксиддисмутаза и каталаза. Во всех клетках имеется фермент супероксиддисмутаза, катализирующая реакцию дисмутации супероксидного иона (см. рис. 19.1, реакция 5). Повышенная концентрация свободных радикалов индуцирует синтез супероксиддисмутазы. Пероксид водорода, образующийся при действии супероксиддисмутазы, а также в реакциях, катализируемых оксидазами, расщепляется каталазой, которая тоже содержится во всех клетках:

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2.$$

Высокая активность и высокое сродство этих ферментов к их субстратам предотвращают накопление в клетке супероксида и пероксида водорода.

Глутатионпероксидаза. Этот фермент катализирует восстановление пероксида водорода за счет окисления глутатиона. Глутатион представляет собой трипептид γ-глутамилцистеинилглицин; остаток глутаминовой кислоты в этом пептиде соединен со следующей аминокислотой своей γ-карбоксильной группой:



Здесь представлена восстановленная форма глутатиона (ГSH). При дегидрировании по SH-группе две молекулы глутатиона соединяются дисульфидной связью, получается окисленная форма глутатиона (ГSSГ). Реакция, катализируемая глутатионпероксидазой, представлена на рис. 19.2.

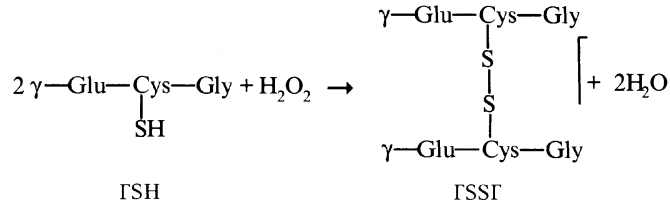
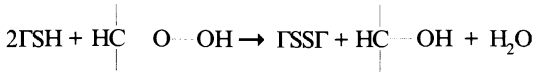


Рис. 19.2. Восстановление пероксида водорода глутатионпероксидазой

Фермент восстанавливает также органические пероксиды:



Глутатионпероксидаза обнаружена в клетках многих органов. Структурной особенностью этого фермента является наличие в его пептидной цепи остатка селе-

ноцистеина — аналога цистеина, в котором атом серы замещен атомом селена. Селеноцистеин входит в активный центр фермента.

Восстановленный глутатион, расходующийся в этих реакциях, регенерируется при действии глутатионредуктазы:

$$ГSSГ + НАДФН + H^+ \rightarrow 2ГSH + НАДФ^+.$$

Эта реакция — один из основных потребителей НАДФН в организме (наряду с синтезом жирных кислот). В клетках глутатион восстановлен на 95 %.

Антиоксидантные витамины. Несколько сходных соединений образуют группу витаминов Е, или токоферолов; наиболее распространенным из них является α-токоферол (рис. 19.3).

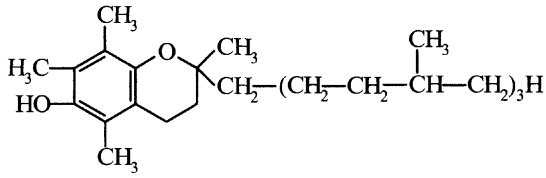


Рис. 19.3. Строение α-токоферола

Важнейшее свойство α-токоферола заключается в его способности окисляться (отдавать электрон) с образованием малоактивного свободного радикала. Поскольку α-токоферол — липофильное вещество, то он может действовать в гидрофобной зоне мембран. Акцепторами электрона могут быть, в частности, свободные радикалы жирных кислот: восстанавливая их, α-токоферол прерывает цепную реакцию пероксидного окисления жирных кислот. Обезвреживание свободных радикалов, по-видимому, единственная физиологическая функция витамина Е.

Характерным проявлением недостаточности витамина Е является атрофия мышц. Это объясняют тем, что при гиповитаминозе вследствие усиленного пероксидного окисления липидов происходит повреждение лизосомных мембран, и освобождающиеся гидролазы разрушают клетку.

Кроме витамина Е антиоксидантными свойствами обладают витамин С и каротиноиды — предшественники витамина А.

Многие другие вещества (природные и синтетические фенолы, ароматические амины, гидрированные пиридины и др.) могут нейтрализовать свободные радикалы. Выраженными антиоксидантными свойствами обладает мочевая кислота. Существует даже гипотеза, согласно которой мочевая кислота — один из главных факторов увеличения средней продолжительности жизни приматов по сравнению с другими млекопитающими со сходной массой и размерами тела (в тканях других млекопитающих есть фермент уратоксидаза, превращающий мочевую кислоту в аллантоин, не имеющий антиоксидантных свойств; аллантоин выводится с мочой).

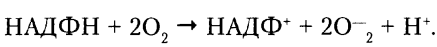
Состояние, когда активные формы кислорода образуются с большей скоростью, чем происходит их обезвреживание, называют окислительным стрессом. Окислительный стресс является осложнением очень многих болезней. В частности образование активных форм кислорода повышается при реперфузии — состоянии,

когда восстанавливается кровоснабжение (следовательно и снабжение кислородом) после его временного нарушения, например после прекращения спазма сосуда при стенокардии, после лизиса тромба, снятия жгута и др.

БАКТЕРИЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФАГОЦИТИРУЮЩИХ ЛЕЙКОЦИТОВ

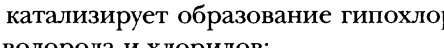
Фагоцитоз, открытый в 1883 г. И. И. Мечниковым, — один из важнейших механизмов иммунитета. Основными фагоцитирующими лейкоцитами являются гранулоциты (полиморфно-ядерные лейкоциты), макрофаги и эозинофилы. В этих клетках в процессе фагоцитоза примерно в 10 раз увеличивается поглощение кислорода («дыхательный взрыв»), который расходуется на образование его активных форм. Активные формы кислорода образуются при действии специальных ферментов; к их числу относятся НАДФН-оксидаза и миелопероксидаза.

НАДФН-оксидаза катализирует образование супероксидного иона:



$$НАДФН + 2O_2 \rightarrow НАДФ^+ + 2O^-_2 + H^+.$$

Миелопероксидаза катализирует образование гипохлорной (хлорноватистой) кислоты из пероксида водорода и хлоридов:



$$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow H_2O + HOCl.$$

Эти процессы происходят одновременно с эндоцитозом бактерии: образованием углубления на плазматической мембране и затем — эндоцитозного пузырька (рис. 19.4). НАДФН-оксидаза находится в плазматической мембране клетки, а миелопероксидаза поступает из гранул цитозоля, сливающихся с эндоцитозным пузырьком.

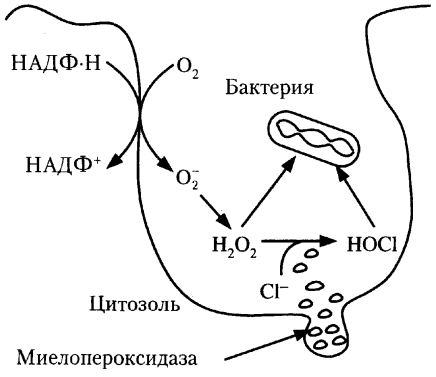


Рис. 19.4. Бактерицидное действие лейкоцитов

Молекулы бактериальных клеток (нуклеиновые кислоты, белки, липиды) повреждаются активными формами кислорода, что и составляет сущность бактерицидного действия лейкоцитов. Основную роль в бактерицидном действии играют пероксид водорода, образующийся из супероксида (см. рис. 19.1), и гипохлорит. Гипохлорит тоже является сильным окислителем: он издавна применяется в качестве дезинфицирующего средства [в форме хлорной извести Ca(Cl)OCl], а также для обезвреживания ядовитых веществ и отбеливания тканей и бумаги.

В результате действия активных форм кислорода могут погибать и сами лейкоциты. Соседние клетки ткани тоже повреждаются как активными формами кислорода, так и лизосомными гидролазами, освобождающимися из погибших клеток. Эти процессы характерны для воспалительной реакции.

Известна наследственная болезнь хронический грануломатоз: при этой болезни имеется дефект ферментов, участвующих в продуцировании активных форм кислорода в лейкоцитах, вследствие чего больные грануломатозом страдают повышенной восприимчивостью к бактериальной инфекции.

ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ МЕТАБОЛИТОВ И ОБМЕН ЧУЖЕРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Число разных соединений в организме человека велико, но в окружающей среде, включая организмы других видов, оно несравненно больше. Вещества среды, не используемые организмом для пластических целей или как источники энергии, называют чужеродными веществами (ксенобиотиками). Они могут попадать в организм с пищей или путем вдыхания, или через кожу; многие из них могут быть токсичными. В процессе эволюции животные и человек постоянно встречались с этими веществами, поэтому выработались механизмы их детоксикации и выведения из организма. Кроме чужеродных соединений, детоксикации (инактивации) и выведению подвергаются некоторые собственные метаболиты, например продукты распада гема, стероидные гормоны, катехоламины и др. Главным органом, где происходит детоксикация веществ, является печень, хотя и другие органы тоже участвуют в этом процессе. Через печень протекает около 1,2 л крови в минуту, причем 70 % ее поступает через воротную вену, собирающую кровь от пищеварительного тракта. Такое положение печени определяет ее важную роль в превращениях веществ, всасывающихся из кишечника, и в регуляции их концентрации в крови.

Механизмы обезвреживания абсолютно необходимы для выживания.

Микросомальное окисление и реакции конъюгации

Обезвреживание веществ заключается в их химической модификации, которая обычно включает две фазы. В первой фазе вещество подвергается окислению, или восстановлению, или гидролизу, в результате чего образуются группы –OH, –COOH, –SH, $-NH_2$ и некоторые другие. Во второй фазе к этим группам присоединяется какое-либо вещество — глюкуроновая кислота, серная кислота, глицин, глутамин, ацетильный остаток (реакции конъюгации). В некоторых случаях обезвреживание включает только одну фазу — первую или вторую. Многие вещества частично или полностью выводятся вообще без всяких изменений.

Монооксигеназное окисление

Главная роль в реакциях первой фазы обезвреживания принадлежит микросомальным гидроксилазам (монооксигеназам). Эти ферменты содержатся в мембранах гладкого эндоплазматического ретикулума в клетках большинства органов (отсут-

ствуют в эритроцитах и мышечных клетках). Микросомальные гидроксилазы катализируют гидроксилирование большого числа разных субстратов. В этих реакциях используется молекулярный кислород: один атом кислорода расходуется на образование гидроксильной группы, а второй восстанавливается, образуя воду (монооксигеназное окисление). Для восстановления второго атома кислорода используется НАДФН (рис. 19.5). Эта окислительная система включает два белковых компонента: цитохром Р450 и НАДФН-цитохром Р450-редуктазу. Цитохром Р450, как и другие цитохромы, является гемопротеином; он присоединяет гидроксилируемый субстрат (RH) и молекулу кислорода, а редуктаза переносит на этот комплекс два электрона с НАДФН. При выделении эндоплазматического ретикулума из клеток мембрана распадается на части, каждая из которых образует замкнутый пузырек — микросому. Окисление с участием цитохрома Р450 обычно изучают, используя препараты микросом; отсюда название — микросомальное окисление.

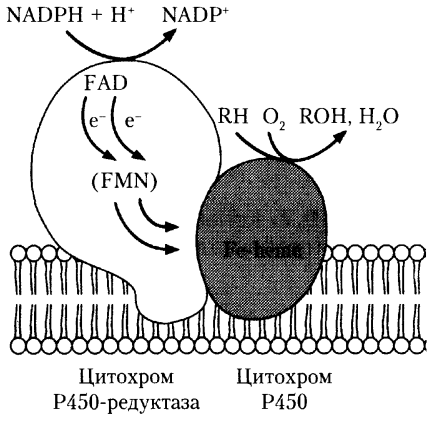


Рис. 19.5. Монооксигеназное окисление

Цитохром Р450 катализирует образование гидроксильных групп при синтезе желчных кислот, стероидных гормонов, при катаболизме ряда нормальных метаболитов и обмене чужеродных соединений. Гидроксилируемый субстрат присоединяется к цитохрому Р450, следовательно, субстратная специфичность определяется именно этим компонентом системы. Известно около 100 форм (изоферментов) цитохрома Р450 с различной, но перекрывающейся субстратной специфичностью; каждая из этих форм окисляет широкий круг субстратов, очень разных по строению, но, как правило, гидрофобных. Синтез цитохромов Р450 индуцируется их субстратами.

Примером реакций первой фазы обезвреживания является гидроксилирование бензола (рис. 19.6).

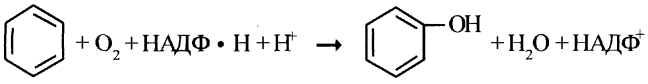


Рис. 19.6. Гидроксилирование бензола

Реакции конъюгации

Множество токсических веществ обезвреживается конъюгацией с глутатионом, например 1-хлор-2,4-динитробензол, используемый в производстве ряда лекарств (рис. 19.7). Глутатионтрансферазы, катализирующие подобные реакции, представлены большим количеством изоферментов. Изоферменты различаются по субстратной специфичности, причем каждый изофермент обладает широкой

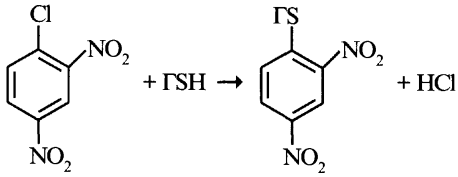


Рис. 19.7. Конъюгация 1-хлор-2, 4-динитробензола с глутатионом

субстратной специфичностью. Субстрат должен быть гидрофобным или иметь гидрофобную зону. Известно более 3000 веществ, которые могут быть субстратами глутатионтрансфераз. Эти ферменты содержатся во всех органах, причем иногда в больших количествах: у человека в почках и кишечнике — 1 % от всех белков цитозоля, в печени — 3 %.

Конъюгаты транспортируются из клеток с помощью специальной ГSSГ-зависимой АТФазы и затем в печени выводятся с желчью, а в других органах — с кровью, и далее через почки.

Распространенная реакция конъюгации — присоединение глюкуроновой кислоты с образованием глюкуронида. Донором глюкуроновой кислоты служит УДФ-глюкуронат (рис. 19.8); реакция катализируется глюкуронилтрансферазой — интегральным белком эндоплазматического ретикулума.

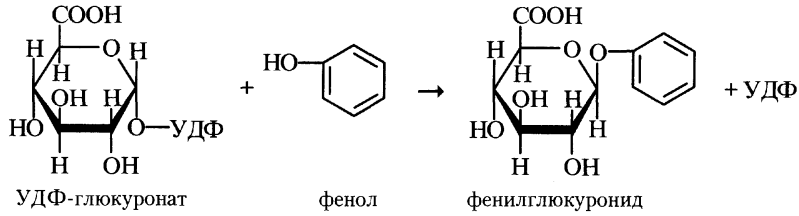


Рис. 19.8. Конъюгация фенола с глюкуроновой кислотой

В реакции конъюгации с серной кислотой донором остатка серной кислоты служит 3′-фосфоаденозин-5′-фосфосульфат (ФАФС, ФАФ-SO_3H) (рис. 19.9).

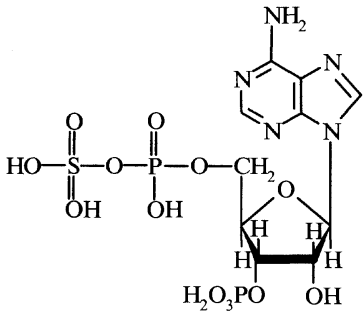
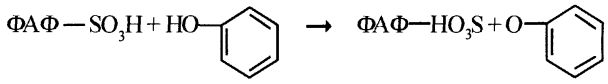


Рис. 19.9. Строение ФАФС

Образование конъюгата с фенолом (фенилсульфата) представлено на рис. 19.10.

При реакциях окисления и конъюгации на молекулах обезвреживаемых веществ образуются гидрофильные группы, вещество в целом становится более растворимым в воде, что облегчает его выведение из организма. Кроме того, химическая модификация токсичных веществ, как правило, снижает их токсичность.



фенол фенилсульфат

Рис. 19.10. Конъюгация фенола с серной кислотой

ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ НОРМАЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Катаболизм гема

Гем является простетической группой гемоглобина и геминовых ферментов; около 80 % всего гема организма находится в гемоглобине, поэтому обмен гема прежде всего отражает состояние обмена гемоглобина.

Время жизни эритроцитов составляет 110–120 дней; «состарившиеся» эритроциты фагоцитируются макрофагами, главным образом в селезенке, а также в печени и костном мозге. Освобождающийся из гемоглобина гем повторно не используется: он распадается с образованием железа и желчных пигментов; железо реутилизируется, а желчные пигменты выводятся из организма.

Первая реакция распада гема катализируется гем-оксигеназой — ферментом эндоплазматического ретикулума. В реакции используются НАДФН и O_2; один из метеновых мостиков тетрапиррольной структуры гема окисляется, углерод метеновой группы превращается в оксид углерода CO (рис. 19.11). При этом от гема отщепляется железо. В результате образуется биливердин — пигмент зеленого цвета. Биливердин затем восстанавливается до билирубина биливердинредуктазой; билирубин имеет красно-коричневый цвет.

Основная часть билирубина образуется в клетках ретикулоэндотелиальной системы селезенки и костного мозга. Из этих органов билирубин в соединении с альбумином крови транспортируется кровью в печень, где происходит его конъюгация с глюкуроновой кислотой. Глюкуроновая кислота присоединяется к карбоксильным группам пропионильных остатков, образуя глюкурониды билирубина. Конъюгация с глюкуроновой кислотой существенно изменяет свойства билирубина. Билирубин нерастворим в воде; именно поэтому он транспортируется кровью в соединении с альбумином. Билирубинглюкуронид растворим в воде и легко выводится с желчью в кишечник. Билирубин токсичен, особенно для мозга; глюкурониды билирубина нетоксичны. Таким образом, в результате конъюгации билирубина происходит его детоксикация и облегчается выведение из организма.

В кишечнике от билирубинглюкуронидов под действием бактериальных ферментов гидролитически отщепляется глюкуроновая кислота, а вновь образовавшийся билирубин восстанавливается по некоторым двойным связям, образуя две группы продуктов: уробилиногены и стеркобилиногены. Основная часть этих веществ (примерно 95 %) выводится с калом. Остальная часть уробилиногенов и стеркобилиногенов всасывается из кишечника в кровь и затем вновь попадает в желчь, а частично выводится через почки. Уробилиногены и стеркобилиногены — бесцветные вещества; в кале и выпущенной моче они окисляются кислородом воздуха и превращаются в уробилины и стеркобилины, имеющие желтую окраску.

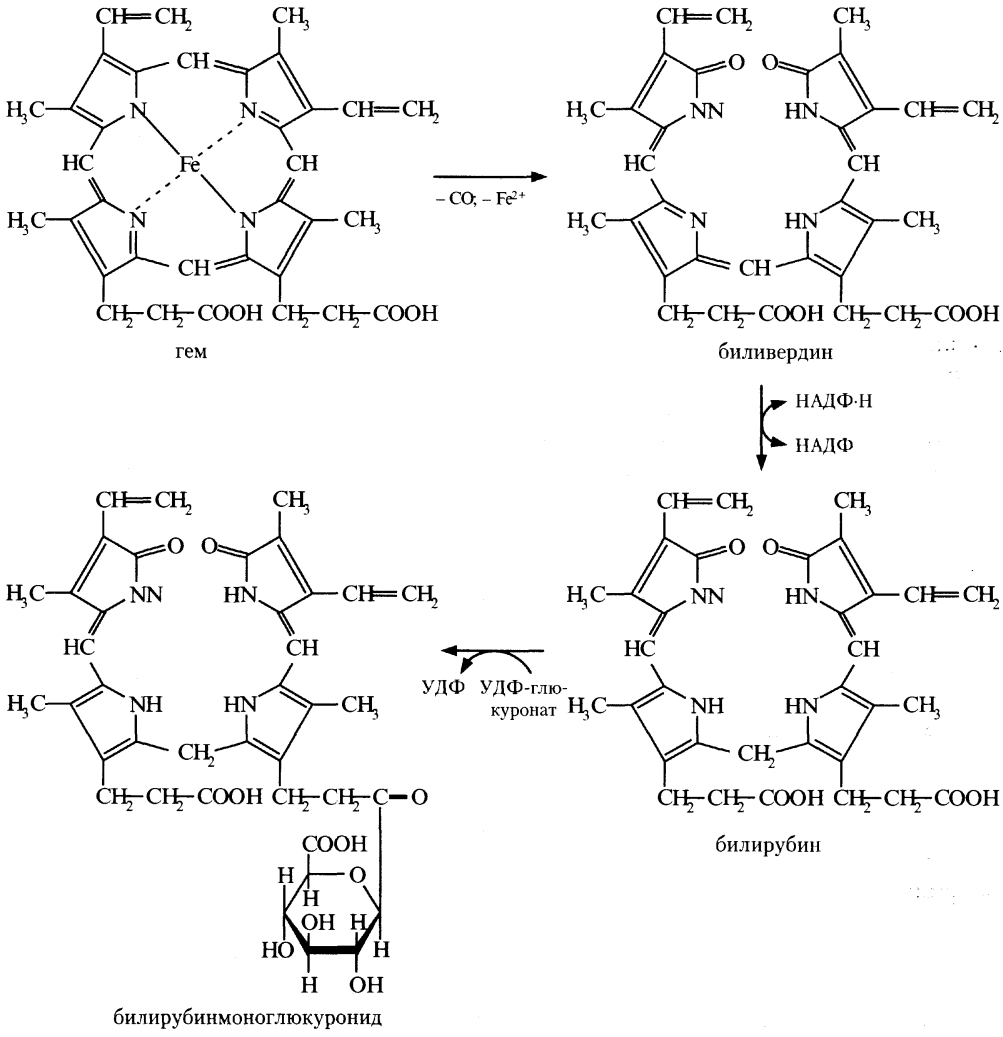


Рис. 19.11. Катаболизм гема

Часто продукты превращений билирубина называют желчными пигментами независимо от того, имеют они окраску или нет; все они в тех или иных количествах обнаруживаются в желчи. Здоровый взрослый человек ежедневно выделяет 200–300 мг желчных пигментов с калом и 1–2 мг — с мочой. Желчные пигменты практически всегда содержатся в желчных камнях, а примерно в $^1/_4$ случаев являются их основным компонентом. Определение концентрации желчных пигментов в крови и моче применяют при выяснении происхождения желтух.

Желтуха

Концентрация билирубина в крови здорового человека равна 0,1–1 мг/дл (1,7–17 мкмоль/л). В крови содержится как неконъюгированный билирубин (примерно $^3/_4$),

так и глюкурониды. При этом неконъюгированный билирубин, поскольку он нерастворим в воде, находится в соединении с альбумином крови. Билирубин с диазохлорсульфоновой кислотой образует азосоединение розово-фиолетового цвета; эта реакция используется для определения билирубина в крови и моче. Неконъюгированный билирубин, связанный с альбумином, реагирует лишь после добавления спирта, который освобождает его из соединения с альбумином (непрямой билирубин); глюкурониды билирубина определяются и без добавления спирта (прямой билирубин).

При усилении распада эритроцитов, закупорке желчного протока или нарушении функций печени концентрация билирубина в крови увеличивается, в результате кожа, слизистые оболочки, склера глаз окрашиваются в желтый цвет (желтуха). Желтое окрашивание кожи становится заметным, когда концентрация билирубина в крови достигает 2–3 мг/дл. Определение концентрации разных желчных пигментов в крови и моче позволяет выяснить причину желтухи.

Гемолитическая желтуха. При усиленном распаде эритроцитов билирубина образуется больше и скорость его глюкуронирования в печени, а также скорость экскреции в кишечник увеличиваются. Однако скорость образования билирубина может превысить способность печени удалять его из крови. Следовательно, при гемолитической желтухе повышается концентрация непрямого билирубина в крови; кроме того, увеличивается выделение стеркобилиногенов и уробилиногенов с мочой, поскольку печень выделяет в кишечник большие количества глюкуронидов билирубина, из которых образуются стеркобилиногены и уробилиногены.

Обтурационная желтуха. При закупорке желчных протоков (желчный камень, опухоль, рубец) желчь перестает поступать в кишечник, но гепатоциты продолжают ее вырабатывать. В этих условиях желчные пигменты попадают в кровеносное русло, поэтому в крови повышается концентрация как прямого, так и непрямого билирубина. Прямой билирубин как вещество водорастворимое и низкомолекулярное фильтруется в капсулу клубочка и выводится с мочой. Поскольку билирубин в кишечник не поступает, уробилиногенов и стеркобилиногенов в моче нет.

Печеночно-клеточная желтуха. При гепатитах повреждаются клетки печени, вследствие чего снижается продукция желчи; кроме того, в результате повреждения паренхимы печени желчь поступает не только в желчные канальцы, но и в кровь. Отсюда, по аналогии с двумя предыдущими формами желтухи, легко заключить, что при печеночной желтухе в крови увеличивается концентрация непрямого билирубина (нарушено глюкуронирование) и прямого билирубина (желчь поступает в кровь). В моче обнаруживается прямой билирубин.

Желтуха новорожденных. У плода и у новорожденного количество эритроцитов в расчете на единицу массы тела больше, чем у взрослых; больше также и концентрация гемоглобина в эритроцитах. В течение нескольких недель после рождения количество гемоглобина в крови новорожденного приближается к величине, характерной для взрослых; в этот период относительная скорость распада эритроцитов больше, чем в последующее время. С другой стороны, способность печени удалять из крови билирубин у плода развита слабо (во внутриутробном периоде билирубин удаляется, по-видимому, через плаценту). Однако скорость удаления билирубина из крови увеличивается в 3–4 раза в первые часы или дни после рождения.

В первые дни в крови новорожденных концентрация билирубина увеличена, причем у части новорожденных (примерно у 20 %) увеличение значительно. Желтуха новорожденных может быть связана с запаздыванием включения генов, кодирующих глюкуронилтрансферазу. Другими причинами могут быть низкая способность печени извлекать билирубин из крови и реабсорбция билирубина из кишечника. В тяжелых случаях желтухи новорожденных, когда концентрация билирубина в крови превышает 30 мг/дл, повреждаются функции мозга; в этих условиях для удаления билирубина из организма прибегают к массивному переливанию крови.

Инактивация гормонов

Инактивация (катаболизм) адреналина и норадреналина происходит путем дезаминирования моноаминоксидазой, метилирования по гидроксильным группам и конъюгации с серной или глюкуроновой кислотами. Главное место этих превращений — печень; продукты катаболизма выводятся в основном с мочой.

Значительная часть стероидных гормонов инактивируется при участии микросомальных гидроксилаз в печени и выводится в форме конъюгатов с глюкуроновой или серной кислотами. Катаболизм большей части тироксина происходит в печени: здесь тироксин путем трансаминирования превращается в кетопроизводное, а также конъюгируется с глюкуроновой или серной кислотами (конъюгация происходит по фенольной группе тироксина).

ОБМЕН ЧУЖЕРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Каждое чужеродное соединение выводится частично в неизмененном виде, частично — в форме метаболитов, образующихся из него в организме. Как правило, доля вещества, экскретируемого в форме метаболитов, больше, если оно плохо растворимо в воде. Это связано с тем, что водорастворимые вещества сразу попадают в циркулирующие жидкости и фильтруются из плазмы крови в мочу, в то время как циркуляция гидрофобных веществ затруднена, и они склонны задерживаться в тканях либо в соединении с белками, либо в липидных структурах — в клеточных мембранах, в депонированных жирах. В результате реакций обезвреживания гидрофобные соединения превращаются в гидрофильные, и таким способом ускоряется их выведение.

Метаболизм лекарственных веществ

Лекарством может быть только такое вещество, действие которого через определенное время прекращается. Прекращение действия может происходить или потому, что лекарство выводится из организма, или потому, что оно инактивируется путем химической модификации. Рассмотрим некоторые примеры метаболических превращений лекарств.

Фенобарбитал (люминал) применяется в качестве снотворного и обезболивающего средства. Примерно 10 % введенного фенобарбитала экскретируется в неизмененном виде, остальная часть подвергается гидроксилированию по фенилу и последующей конъюгации с глюкуроновой кислотой; оксифенобарбитал и

глюкуронид — основные экскретируемые продукты (рис. 19.12). В целом за сутки выводится половина введенной лечебной дозы фенобарбитала. Фенобарбитал плохо растворяется в воде; без метаболических превращений для его выведения из организма понадобилось бы в несколько раз больше времени.

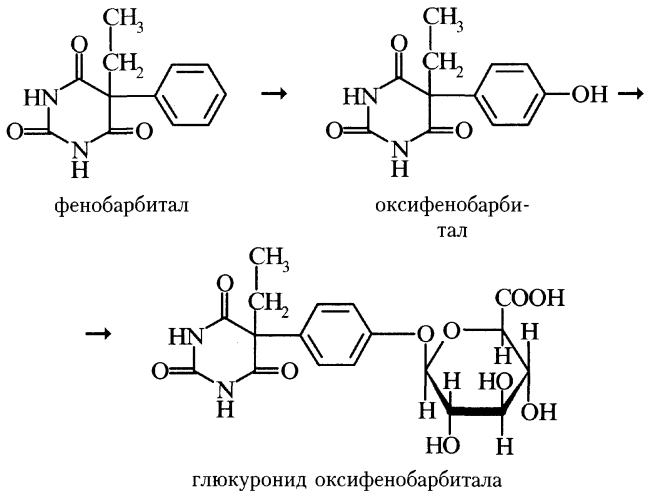


Рис. 19.12. Метаболизм фенобарбитала

Аспирин (ацетилсалициловая кислота) широко применяется как противовоспалительное средство (см. рис. 13.4); выводится аспирин после конъюгации с глюкуроновой кислотой или глицином, а также в форме гентизиновой кислоты (рис. 19.13).

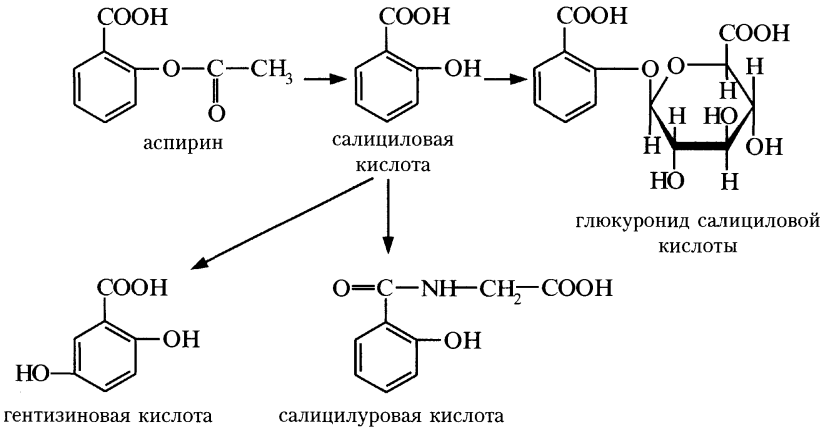


Рис. 19.13. Метаболизм аспирина

Главные продукты метаболизма изониазида, применяемого при лечении туберкулеза, — ацетилизониазид и изоникотиновая кислота (рис. 19.14).

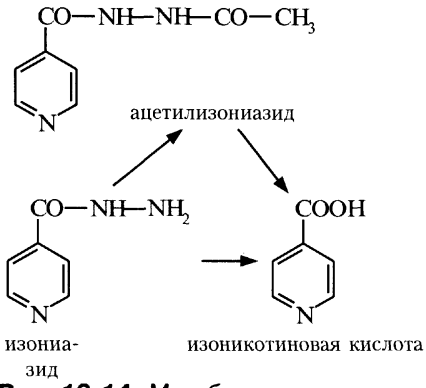


Рис. 19.14. Метаболизм изониазида

Лекарства, которые медленно метаболизируются и выводятся, могут накапливаться в организме (кумуляция). С учетом этого при лечении такими лекарствами постепенно уменьшают их дозу или увеличивают интервалы между приемами.

Метаболизм лекарств у детей раннего возраста

Механизмы метаболизма и детоксикации чужеродных соединений у новорожденных не вполне развиты. Так, активность глюкуронилтрансферазы у детей в возрасте одного месяца примерно в 4 раза меньше, чем у взрослых. Соответственно, у них снижена скорость метаболизма и выведения лекарств. Зависимость действия лекарств от возраста наглядно проявляется в следующем эксперименте: фенобарбитал в дозе 0,5 мг на 10 г массы тела для новорожденных мышей летален, у семидневных он вызывает сон продолжительностью 4 ч, у двадцатидневных — сон 1 ч, у взрослых — 20 мин. Действие фенобарбитала обратно пропорционально скорости, с какой фенобарбитал метаболизируется гомогенатами печени мышей разного возраста. Низкая активность процессов детоксикации — одна из причин того, что дозы лекарств, рассчитанные на единицу массы тела, для детей раннего возраста обычно меньше, чем для взрослых.

Индукция синтеза ферментов, участвующих в метаболизме лекарств. При систематическом приеме многих лекарств их действие на организм ослабляется, и для продолжения лечения приходится увеличивать дозу. Снижение эффективности лекарства может происходить вследствие увеличения скорости микросомального окисления и реакций конъюгации. Некоторые лекарства и другие чужеродные соединения индуцируют синтез цитохрома P450 и ферментов, катализирующих реакции конъюгации. В частности, хорошим индуктором оказался фенобарбитал. По этой причине он нашел применение для предупреждения и лечения желтухи новорожденных. При угрозе желтухи матери перед родами и ребенку сразу после рождения начинают вводить небольшие дозы фенобарбитала; вследствие индукции синтеза ферментов обезвреживающая способность печени увеличивается быстрее и концентрация билирубина в крови не достигает высоких величин (рис. 19.15).

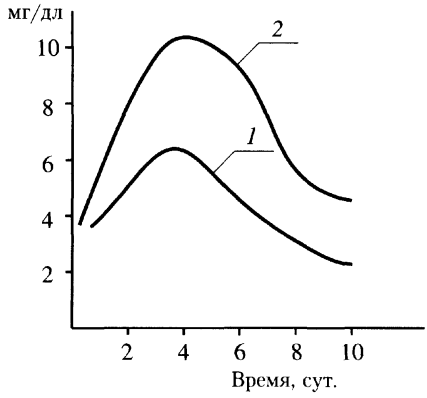


Рис. 19.15
Концентрация билирубина в крови новорожденных, которым вводили фенобарбитал (10 инъекций по 5 мг в первые три дня) (кривая *1*), и без введения фенобарбитала (кривая *2*)

ДДТ в биосфере

В 40–70-е годы прошлого века ДДТ был наиболее широко применяемым инсектицидом. Он представляет собой производное трихлорэтана — 2,2-бис-(парахлорфенил)-1,1,1-трихлорэтан (рис. 19.16). ДДТ, а также его производные, образующиеся в организме, токсичны. В частности, они ингибируют синтез и секрецию кортикостероидов и вызывают атрофию надпочечников. На этом основано применение некоторых производных ДДТ для лечения гиперкортицизма.

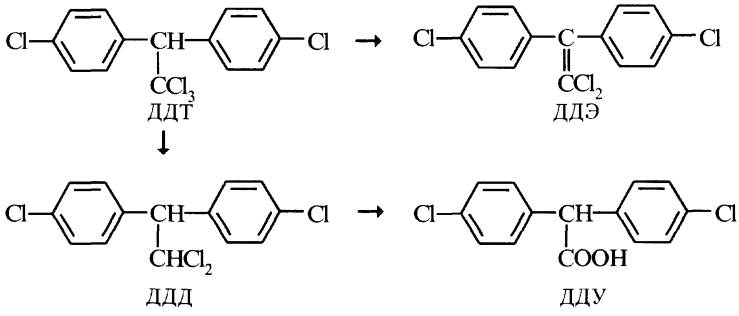


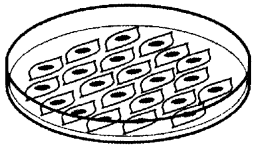
Рис. 19.16. Строение ДДТ

Выделение ДДТ и продуктов его метаболизма из организма человека и животных происходит очень медленно; как вещество липофильное, ДДТ накапливается в жировой ткани, что приводит к его концентрированию в живых организмах: чем более высокое место занимает организм в экологической цепи питания, тем больше относительная концентрация ДДТ в его тканях. Если концентрацию ДДТ в воде принять за единицу, то его концентрация в планктоне будет равна примерно 800, в рыбах — 25 000, в теле бакланов (птиц, питающихся рыбой) — 500 000. Начиная с 40-х годов XX в. ДДТ обнаруживали во всех исследуемых в этом отношении трупах людей. Абсолютная концентрация ДДТ в теле человека невелика, порядка 10^{-6} %.

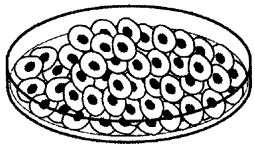
Высокая стабильность ДДТ в условиях земной поверхности, его устойчивость к действию ферментов разных организмов, способность концентрироваться в организмах и токсичность создали ДДТ печальную известность, и в последние десятилетия его производство и применение во многих странах было ограничено или совсем прекращено. Но, с другой стороны, высказываются мнения, что ДДТ спас больше жизней и предотвратил больше болезней, чем любое другое вещество, изобретенное человеком. Эта противоречивость оценок отражает противоречивость реальной ситуации. Например, в Шри-Ланке в 1960-х годах отказались от применения ДДТ для борьбы с малярией после того, как в течение более 10 лет практически не было заболеваний. Но в 1968 г. вновь увеличилась частота заболеваний — свыше 1 млн на 10 млн населения, и правительство было вынуждено закупить 2500 т ДДТ для применения против малярийного комара. ДДТ дает нам пример проблем, характерных для современной гигиены и экологии человека.

ХИМИЧЕСКИЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Механизмы метаболизма чужеродных соединений, снижающие их токсичность и ускоряющие выведение, имеют безусловное значение для выживания в среде, из которой в организм поступает множество потенциально опасных веществ. Однако в некоторых случаях метаболическая модификация чужеродного соединения повышает его токсичность. В частности, таким путем в организме образуются соединения, вызывающие рак. Рак занимает второе место среди причин смерти после сердечно-сосудистых заболеваний. Химический канцерогенез (синоним — онкогенез) считают самой частой причиной рака (другие причины — онкогенные вирусы, ультрафиолетовые и космические лучи, врожденные генетические дефекты). Сущность рака (злокачественных опухолей) заключается в том, что происходит нерегулируемый рост и размножение клеток в условиях, когда нормальные клетки находятся в состоянии пролиферативного покоя.



нормальные клетки



опухолевые клетки

Рис. 19.17. Рост нормальных и раковых клеток в культуре

Разные дифференцированные клетки делятся с неодинаковой частотой. Например, эритроидные клетки делятся часто, эпителиальные клетки кожи, кишечника — пореже,а клетки хрусталика, нейроны, возможно, совсем не делятся. Особенно часто делятся эмбриональные клетки. Значит, потенциальная способность клеток к делению выше, чем фактическая скорость деления дифференцированных клеток. Таким образом, в процессе развития и роста регуляция скорости деления клеток сводится к ее притормаживанию, причем в разной степени для разных типов клеток. При культивировании нормальных клеток *in vitro* клетки образуют монослой. Для них характерно контактное ингибирование: деление прекращается, когда клетки касаются друг друга. Раковые клетки не имеют механизма контактного ингибирования: они растут, образуя неупорядоченную кучку (рис. 19.17). Изменяется и форма клеток — они стано-

вятся округлыми. Важной особенностью раковых клеток является их бессмертие, точнее — способность к беспредельному делению.

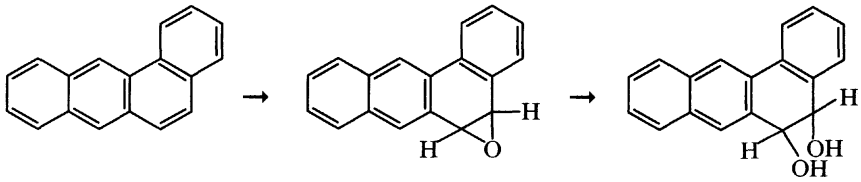
В регуляции пролиферации участвует более 100 белков и соответствующих им структурных генов. Эти гены называют протоонкогенами. Мутации протоонкогенов могут привести к синтезу белков с утраченной регуляторной функцией (онкобелки) и к нарушению регуляции пролиферации, т. е. к неконтролируемому делению клеток:

Протоонкоген	→	Белок, участвующий в регуляции роста и деления клеток	→	Контролируемые рост и деление клеток
↕				
Онкоген (мутантный протоонкоген)	→	Онкобелок (мутантный регуляторный белок)	→	Неконтролируемое деление клеток

Нарушения регуляции деления могут быть вызваны и мутациями в промоторных зонах ДНК — в энхансерах и сайленсерах. В этом случае может синтезироваться нормальный белок (не онкобелок), но не в должное время или не в должном количестве.

Историю изучения химического канцерогенеза принято отсчитывать с 1775 г., когда английский врач П. Потт отметил, что рак мошонки встречается особенно часто у трубочистов, и объяснил это постоянным контактом последних с каменноугольной смолой и сажей. Почти полтора века спустя это объяснение было подтверждено экспериментально: смазыванием в течение многих месяцев кожи кроликов каменноугольной смолой удалось вызвать рак. В 30-х годах XX в. из смолы были выделены индивидуальные вещества — бензантрацен и другие полициклические углеводороды, которые вызывали рак кожи. В последние три десятилетия обнаружены канцерогенные вещества в разных классах химических соединений.

Бензантрацен в организме подвергается гидроксилированию с участием микросомальной системы окисления; в качестве промежуточного продукта образуется эпоксид (рис. 19.18).



бензантрацен — эпоксид бензантрацена — бензантрацендиол

Рис. 19.18. Метаболизм бензантрацена

На схеме представлен основной путь «обезвреживания» бензантрацена; слово «обезвреживание» взято здесь в кавычки потому, что промежуточный продукт — эпоксид — является канцерогеном. Он обладает высокой химической активностью и алкилирует ДНК.

Канцерогенные вещества весьма разнообразны по химической структуре и происхождению. Среди них есть как природные, так и антропогенные соединения. Приведем некоторые примеры из числа наиболее известных канцерогенов.

Бензпирен. Содержится в дыме, образующемся при сгорании многих органических веществ, в том числе — в табачном дыме. При окислении в организме превращается в эпоксиды (рис. 19.19) и другие токсичные продукты. Эпоксиды могут присоединяться к аминогруппе гуанина в ДНК, нарушая структуру двойной спирали. Курение значительно повышает вероятность развития рака легких.

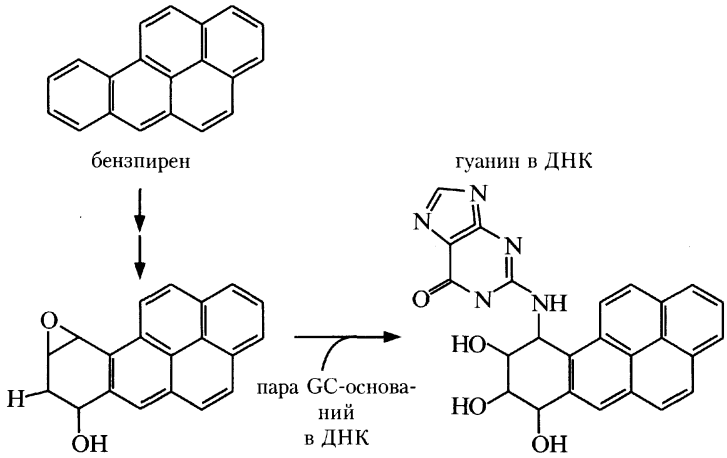


Рис. 19.19. Окисление бензпирена и связывание с ДНК

Ароматические амины. Вещества этой группы используются в больших количествах в производстве анилиновых красителей. У людей, занятых на этих работах, отмечалась повышенная частота рака мочевого пузыря; изучение причин болезни привело к открытию канцерогенных свойств у многих ароматических аминов. Одним из них является 2-нафтиламин. Метаболизм 2-нафтиламина происходит в основном в печени. Канцерогеном является 2-амино-1-нафтол, однако в печени он быстро превращается в безвредные конъюгаты, которые выводятся с мочой (рис. 19.20). В мочевом пузыре часть конъюгатов расщепляется гидролазами, имеющимися в моче в небольших количествах, и вновь образуется 2-амино-1-нафтол — канцероген, который при повторяющихся контактах человека с нафтиламином вызывает раковое перерождение клеток мочевого пузыря.

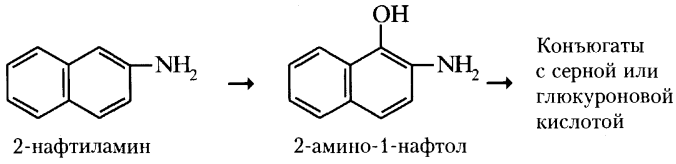


Рис. 19.20. Метаболизм 2-нафтиламина

Другой амин — ацетиламинофлюорен — вызывает рак печени. В ходе его метаболизма образуется канцероген ацетиламинофлюоренсульфат — нестабильное вещество с высокой алкилирующей способностью (рис. 19.21). В 1940 г.

ацетиламинофлюорен был запатентован как перспективный инсектицид, но не был пущен в производство после проверки на канцерогенную активность.

Для морских свинок, в отличие от других животных, ацетиламинофлюорен не является канцерогеном. Оказалось, что у них несколько иной путь метаболизма ацетиламинофлюорена — он гидроксилируется не по азоту, а по ароматическим циклам, и канцерогенный N-сульфат не образуется. Это один из примеров видовой специфичности метаболизма чужеродных соединений. Видовые различия значительно осложняют проверку веществ на канцерогенность, поскольку приходится проводить ее на нескольких видах животных.

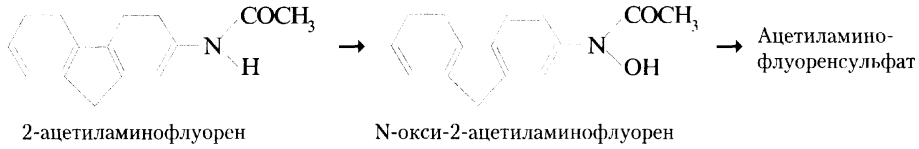


Рис. 19.21. Метаболизм 2-ацетиламинофлюорена

Афлатоксины. Эти вещества являются метаболитами некоторых видов плесеней. Афлатоксин B_1 — наиболее сильный из известных канцерогенов: даже однократное его введение вызывает рак печени у экспериментальных животных. Канцерогеном является образующийся в печени эпоксид афлатоксина (рис. 19.22).

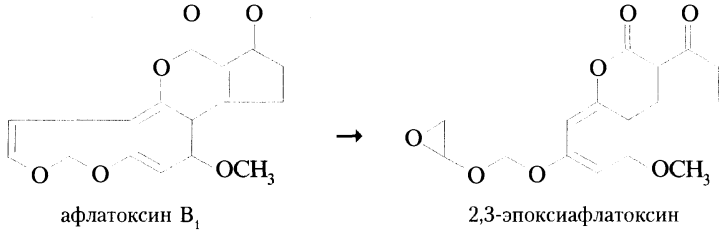


Рис. 19.22. Окисление афлатоксина B_1

Плесени рода Aspergillus flavus, продуцирующие афлатоксины, весьма распространены и, в частности, заводятся на зерне и других пищевых продуктах при плохом хранении.

Нитрозамины. Метаболизм нитрозаминов при действии микросомальной системы окисления приводит к образованию высокоактивного иона карбония (рис. 19.23). Ион карбония может метилировать нуклеиновые кислоты и белки. Нитрозамины индуцируют злокачественные опухоли в печени, почках, легких, желудке, пищеводе. Источником нитрозаминов в организме могут быть вторичные алифатические амины, которые при взаимодействии с нитритами

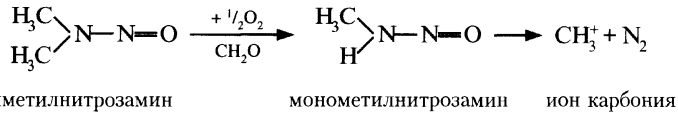


Рис. 19.23. Метаболизм нитрозаминов

образуют нитрозамины. И вторичные амины, и нитриты являются постоянными компонентами пищи: первые содержатся в рыбных продуктах, в ароматических добавках к пище; вторые применяются как консерванты мяса, рыбы и содержатся в зеленых растениях.

Канцерогенные метаболиты, образующиеся в организме из прекарциногенов, отличаются высокой реакционной способностью, которая объясняет и их нестабильность. Именно поэтому канцерогенные вещества редко имеются в среде в готовом виде, хотя известны и такие канцерогены, которые не нуждаются в предварительных метаболических превращениях. Индукция развития опухоли требует, как правило, длительных и неоднократных контактов с канцерогеном. Проверка веществ на канцерогенность обычно занимает многие месяцы или годы и проводится с использованием лабораторных животных разных видов, за которыми, после их обработки исследуемым веществом, наблюдают в течение всей их жизни.

Развитие раковой опухоли

Превращение нормальной клетки в раковую требует мутации не одного протоонкогена, а нескольких из сотни протоонкогенов, имеющихся в геноме человека. Особенно часто – больше, чем у половины больных — встречается мутация гена, кодирующего белок p53. Синтез этого белка индуцируется при повреждениях ДНК (в частности, при окислительном стрессе). В свою очередь, белок p53 индуцирует синтез белка p21, который является ингибитором клеточного цикла (рис. 19.24; см. также рис. 4.7). В норме прохождение фаз клеточного цикла регулируется циклинами и циклинзависимыми протеинкиназами. Белок p21 соединяется с комплексами циклин–циклинзависимая протеинкиназа и ингибирует их киназную активность, а следовательно, и прохождение клеточного цикла. Одновременно активируются механизмы репарации повреждений ДНК. Кроме того, белок p53 инициирует механизм апоптоза: если репарация не удается, то происходит самоуничтожение клетки. Таким образом, ген p53 и белок p53 выступают как механизм защиты клетки от ее трансформации в раковую клетку, т. е. как супрессоры онкогенеза. Из этого следует, что мутации самого гена p53 и синтез функцио-

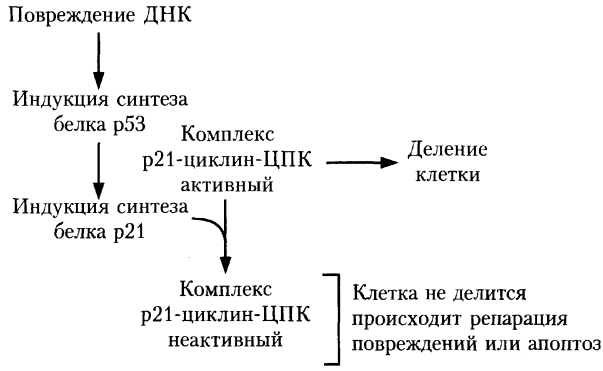


Рис. 19.24. Ингибирование клеточного цикла белком p53

нально неполноценного белка p53 повышают вероятность развития раковой опухоли. При этом существенно то, что не работает механизм ингибирования клеточного цикла — мутантный белок p53 (онкобелок) не индуцирует синтез белка p21, клетка может делиться, в ней накапливаются новые мутации, и это может быть началом роста раковой опухоли. В геноме человека есть и другие гены-супрессоры онкогенеза, однако ген p53, по-видимому, является важнейшим из них: об этом свидетельствует высокая встречаемость мутаций гена p53 в разных опухолях. Мыши, лишенные обоих аллелей гена p53, развиваются нормально, но 75 % их погибает от опухолей в течение первых шести месяцев.

Раковая опухоль обычно образуется из одной клетки, т. е. является моноклональной. Раковые клетки секретируют протеиназы, разрушающие межклеточный матрикс, поэтому опухоль может прорастать в окружающие ткани (инвазия опухоли, рис. 19.25). При прорастании опухоли в стенку кровеносных сосудов отдельные опухолевые клетки оказываются в кровотоке. Они могут задерживаться в разных органах, образуя там новые колонии раковых клеток — метастазы.

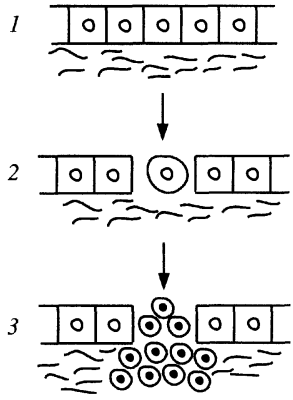


Рис. 19.25. Развитие раковой опухоли:

1 — нормальная ткань; *2* — накопление мутаций (онкогенов) в одной клетке; *3* — пролиферация раковой клетки и инвазия опухоли

Глава 20

ОСНОВНЫЕ БЕЛКИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Иммунная система защищает организм от чужеродных макромолекул (главным образом от белков), паразитарных организмов (бактерий, вирусов, грибков, простейших), мутантных клеток, образующихся из собственных клеток организма. Реакцию организма на попадание чужеродных макромолекул во внутреннюю среду организма называют иммунным ответом или иммунной реакцией. Чужеродные макромолекулы, вызывающие иммунную реакцию, называют антигенами. Эти вещества могут быть в растворенной форме или входить в состав клеточных структур: иммунная реакция на паразитарные организмы обусловлена имеющимися в них молекулами-антигенами. Собственные мутантные клетки содержат макромолекулы, не свойственные нормальным клеткам (мутантные макромолекулы), и поэтому воспринимаются иммунной системой как чужеродные.

В иммунном ответе можно выделить два основных процесса:

1) распознавание чужеродных молекул, т. е. различение их от собственных макромолекул организма;
2) обезвреживание (разрушение) чужеродных молекул, паразитарных организмов, мутантных клеток.

Ядро иммунной системы составляют три семейства белков:

1) иммуноглобулины (антитела), синтезируемые и секретируемые в кровь лимфоцитами В;
2) Т-рецепторы, которые синтезируются лимфоцитами Т и локализуются на наружной поверхности их плазматической мембраны;
3) белки главного комплекса гистосовместимости (белки ГКГ), синтезируемые многими (почти всеми) клетками организма и локализованные тоже на поверхности клеток.

Белки этих трех семейств в главной их части сходны по структуре и родственны по происхождению; вместе они образуют суперсемейство иммуноглобулинов. Вся специфика иммунной системы определяется именно этими белками, хотя в ней задействовано множество и других белков. Главными особенностями биохимии иммунной системы являются следующие:

1) огромное разнообразие иммуноглобулинов;
2) синтез некоторого индивидуального иммуноглобулина индуцируется только в ответ на попадание в организм соответствующего антигена;
3) антигенами в норме служат только чужеродные, а не собственные макромолекулы (различение «сам — не сам»).

Известно много болезней, связанных с нарушением функций иммунной системы. Эти нарушения бывают двух основных типов:

1) иммунодефицитность, т. е. недостаточность функции иммунной системы. Следствиями иммунодефицитности являются повышенная восприимчивость к инфекционным болезням и повышенная частота рака;
2) иммунная реакция против собственных нормальных (не мутантных) макромолекул и собственных нормальных клеток (аутоиммунные болезни).

СТРОЕНИЕ АНТИТЕЛ

Антитела или иммуноглобулины (Ig) синтезируются в лимфоцитах В, главным образом в лимфатических узлах и селезенке, и выделяются в кровь, образуя фракцию иммуноглобулинов плазмы.

Структурную основу иммуноглобулинов составляют четыре пептидные цепи, соединенные друг с другом дисульфидными связями: две тяжелые (цепи Н) с молекулярной массой 50 000 (от 450 до 700 аминокислотных остатков) и две легкие (цепи L) с молекулярной массой 25 000 (около 200 аминокислотных остатков) (рис. 20.1). Такую структуру обычно называют мономером. В пептидных цепях различают вариабельные (V) и постоянные, или константные (С), области. По различиям первичной структуры постоянных областей легкие цепи делятся на два типа (κ и λ), тяжелые — на пять типов (табл. 20.1). По типу тяжелых цепей, входящих в мономеры, все иммуноглобулины делятся на пять классов. Каждый класс включает огромное множество индивидуальных иммуноглобулинов, различающихся по первичной структуре вариабельных областей; общее число индивидуальных иммуноглобулинов всех классов равно примерно 10^7. Молекулы антител классов IgG, IgD и IgE мономерны; они имеют Y-образную форму. Антитела IgA построены из двух–четырех мономеров $(H_2L_2)_{2\text{-}4)}$, а IgM — из пяти мономеров $(H_2L_2)_5$.

Таблица 20.1. Классы иммуноглобулинов человека

Класс	Цепь Н	Содержание цепей в молекуле	Молекулярная масса	Концентрация в сыворотке крови, г/дл
IgG	γ	$\kappa_2\gamma_2$ или $\lambda_2\gamma_2$	150 000	0,6–1,7
IgA	α	$(\kappa_2\alpha_2)_n$ или $(\lambda_2\alpha_2)_n$ (n = 2, 3 или 4)	360 000–720 000	0,14–0,42
IgM	μ	$(\kappa_2\mu_2)_5$ или $(\lambda_2\mu_2)_5$	950 000	0,05–0,19
IgD	δ	$\kappa_2\delta_2$ или $\lambda_2\delta_2$	160 000	0,003–0,04
IgE	ε	$\kappa_2\varepsilon_2$ или $\lambda_2\varepsilon_2$	190 000	0,00001–0,00014

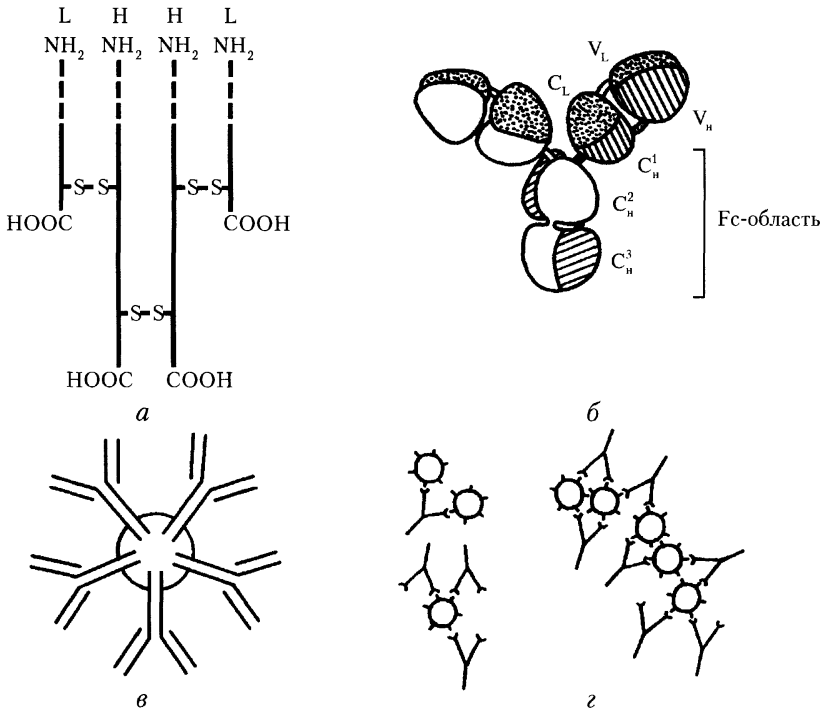


Рис. 20.1. Строение иммуноглобулинов:

а — пептидные цепи иммуноглобулинов (пунктиром выделены вариабельные области); *б* — модель молекулы иммуноглобулина; пептидные цепи имеют доменную структуру: легкие цепи содержат по два глобулярных домена, тяжелые — по четыре (в IgM по пять); *в* — схема пентамерной молекулы IgM; мономеры соединены друг с другом дисульфидными связями; *г* — комплексы антиген—антитело

РЕАКЦИЯ АНТИГЕН—АНТИТЕЛО

Синтез антител начинается в ответ на попадание во внутреннюю среду организма чужеродных макромолекул, например белков бактериальной клетки. Антитела способны связывать антиген, вызвавший их образование, и тем самым защищать организм от возможного вредного действия чужеродных макромолекул, бактерий или других частиц. Реакция связывания антигена антителом отличается высокой специфичностью. Так, антитела, индуцированные белками возбудителя дифтерии (C. diphteriae), связывают эти белки, но не реагируют с белками дизентерийной палочки или других бактерий. Еще более наглядно специфичность антител обнаруживается в опытах с синтетическими антигенами. Низкомолекулярные вещества сами по себе не индуцируют синтез антител, но после их присоединения к молекуле белка стимулируется образование антител как к белку, так и к присоединенному низкомолекулярному веществу — гаптену. Даже если в роли гаптена выступают очень сходные вещества, например изомеры аминобензойной кислоты (рис. 20.2), к каждому из них синтезируются специфические антитела, не реагирующие с двумя другими гаптенами.

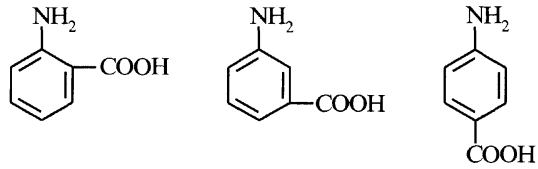


Рис. 20.2. Изомеры аминобензойной кислоты

Избирательность взаимодействия обусловлена комплементарностью между структурой активного центра антитела и структурой некоторого участка антигена — антигенной детерминанты. Антигенной детерминантой может быть участок поверхности белка, образованный радикалами аминокислот, гаптен или простетическая группа белка (особенно часто полисахаридные группы гликопротеинов). Многие части поверхности одного и того же антигена могут быть антигенными детерминантами (эпитопами). Иначе говоря, к одному антигену может быть несколько разных антител. Например, в молекуле белка лизоцима известны три эпитопа для трех разных антител. Эти эпитопы занимают около 40 % поверхности лизоцима; возможно, что и любая часть поверхности лизоцима — потенциальный антиген.

Активные центры (центры связывания) антител расположены в вариабельных областях пептидных цепей. Антитела класса IgG двухвалентны, т. е. имеют два центра связывания антигена. Таким образом, каждая молекула антитела может присоединить две молекулы антигена. С другой стороны, к каждой молекуле антигена может присоединиться несколько молекул антител, поскольку на антигене есть несколько антигенных детерминант и к каждой из них образуются антитела. В результате возникают сложные молекулярные комплексы (см. рис. 20.1, *г*). Такие комплексы могут выпадать в осадок; на этом основана реакция преципитации для обнаружения антител или антигенов. Если антиген не свободен, а содержится в мембране клеток, то происходит склеивание (агглютинация) клеток антителами. Реакция агглютинации также используется для обнаружения антител и антигенов (в частности, при определении групп крови). В результате действия антител может разрушаться клеточная оболочка — происходит лизис клеток. В лизисе клеток, помимо антител, участвует комплемент — сложная ферментная система, находящаяся в плазме крови.

В конечном счете комплексы антитело—антиген поглощаются фагоцитирующими клетками — макрофагами, нейтрофилами. Эти клетки имеют на своей поверхности рецепторы Fc-области антител; бактерия, покрытая антителами, связывается фагоцитирующей клеткой, включается процесс фагоцитоза, и бактерия, а также связанные с ней антитела разрушаются (рис. 20.3; см. также рис. 19.4).

РАЗНООБРАЗИЕ АНТИТЕЛ

Напомним, что активные центры антител сформированы вариабельными областями Н-цепей (V_H) и L-цепей (V_L). Константные области этих цепей (C_H и C_L) прямо не участвуют в связывании антигена. Разнообразие антител определяется преимущественно разнообразием вариабельных областей, в то время как константных областей имеется лишь несколько типов.

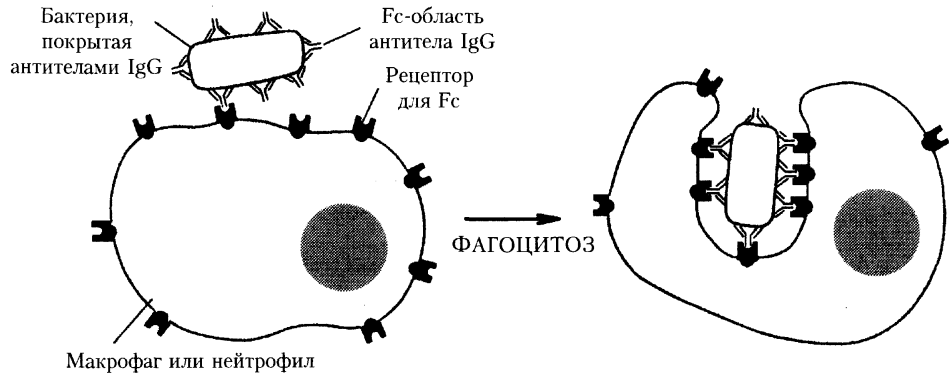


Рис. 20.3. Фагоцитоз меченных антителами бактерий

Число разных активных центров (центров связывания), образуемых лимфоцитами в форме антител, по примерным оценкам, составляет 10^7; это значительно больше (примерно на два порядка), чем число разных центров связывания, образуемых в форме всех других белков всеми другими клетками, вместе взятыми. Разнообразию антител соответствует разнообразие В-лимфоцитов. Как показали опыты по культивированию лимфоцитов *in vitro*, колония клеток, выращенных из одной клетки (моноклональная культура), синтезирует антитела одного типа. Моноклональные колонии, выращенные из разных клеток лимфоцитов, синтезируют разные антитела. Следовательно, популяция лимфоцитов в организме гетерогенна: существует 10^7 клонов лимфоцитов, каждый из которых синтезирует антитела только одного типа. Общее число лимфоцитов в теле человека составляет 10^{12}; следовательно, они образуют 10^7 клонов по 10^5 клеток в каждом клоне (все приведенные величины являются приближенными).

Антиген, попадая в организм, встречает 10^7 разных клонов лимфоцитов и «выбирает» из них лимфоциты только одного клона. Узнавание определяется тем, что в лимфоцитах имеются уже готовые антитела, причем в клетках каждого клона — антитела своего вида, отличающие этот клон от всех других клонов. Антитела располагаются на поверхности клетки и служат рецепторами антигена. Практически для любого из чужеродных веществ, которые могут попасть в организм, найдется среди 10^7 клонов лимфоцитов хотя бы один клон, антитела которого имеют центр связывания, комплементарный этому веществу.

Таким образом, существование антител к данному антигену не является результатом действия самого антигена: в организме уже заранее имеется готовый набор антител, способных связывать огромное количество разных чужеродных веществ, с которыми организм прежде никогда не встречался. Однако до встречи с антигеном концентрация антител к нему в организме ничтожна. Антиген, присоединяясь к лимфоцитам соответствующего клона, вызывает пролиферацию этого клона и активирует синтез и секрецию антител клетками этого клона.

Происхождение разнообразия антител

В ходе дифференцировки лимфоцитов действуют специальные механизмы рекомбинаций и мутирования, которые и служат причиной появления клонов, имеющих

разные V-гены (гены вариабельных областей). Следовательно, клоны В-лимфоцитов различаются не только фенотипически, но и генотипически; они отличаются по V-генам также от других клеток организма, в том числе от гамет.

В эмбриональном периоде в предшественниках лимфоцитов гены, кодирующие разные области пептидных цепей антител, расположены не рядом друг с другом, а в разных частях молекулы ДНК. В процессе онтогенеза происходит дифференцировка лимфоцитов и образование клонов. Важнейшим моментом дифференцировки является особого рода рекомбинация генов: она заключается в том, что происходит перенос генов (или их частей) из одного места в другое в пределах одной молекулы ДНК. Такую рекомбинацию называют транспозицией генов.

Рассмотрим этот процесс на примере рекомбинации генов, кодирующих тяжелые цепи. В ДНК лимфоцитов содержатся гены константных областей пяти классов (см. табл. 20.1) и гены вариабельных областей трех типов: 300–400 разных генов V, около 20 разных генов D и четыре разных гена J. Эти группы генов расположены в разных участках ДНК (рис. 20.4). В результате транспозиции происходит объединение трех генов V, D и J в полный ген вариабельной области цепи H. При этом выбор каждого гена из группы соответствующих генов происходит случайно: любой ген V_i из сотен генов V может оказаться объединенным с любыми генами D_i и J_i из групп соответственно D и J. Далее, также путем транспозиции, полный ген вариабельной области может объединиться с любым из генов константной области, в результате получается полный ген соответствующей H-цепи ($H_г$, $H_б$ и т. д.). Общее число вариантов полного гена H-цепи равно примерно 4000. Сходным путем образуются и гены легких цепей; их тоже может быть около 4000 вариантов. При образовании иммуноглобулинов цепи H и L могут соединяться в разных сочетаниях (см. табл. 20.1), поэтому общее число разных иммуноглобулинов достигает порядка 10^7 ($4000 \times 4000 = 1{,}6 \cdot 10^7$).

Поскольку объединение генов при транспозиции имеет случайный характер, в разных лимфоцитах образуются разные сочетания генов V, D, J и C в полном гене иммуноглобулиновой цепи, т. е. происходит дифференциация лимфоцитов и образование клонов, различающихся генотипически. Соответственно, они различаются и фенотипически — по способности синтезировать антитела определенной специфичности.

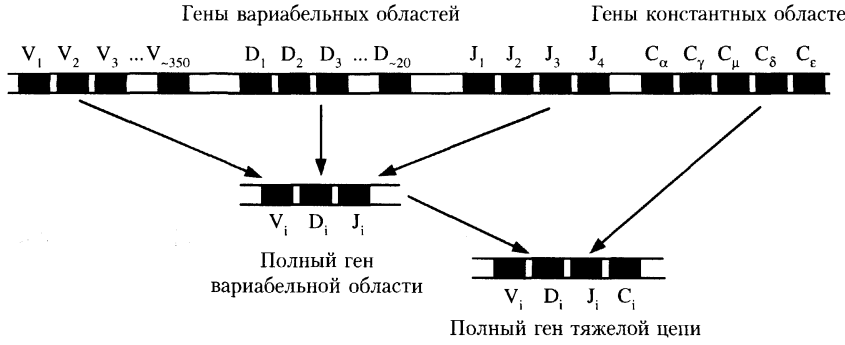


Рис. 20.4. Образование гена тяжелой цепи иммуноглобулинов при дифференцировке эмбриональных лимфоцитов

ИНДУКЦИЯ СИНТЕЗА АНТИТЕЛ

В отсутствие антигена образуется настолько мало антител, что в крови их обнаружить не удается. Индукция синтеза антител происходит следующим образом. На наружной поверхности плазматической мембраны лимфоцитов содержатся антитела (или их фрагменты), причем в клетках разных клонов антитела разные. Антиген, попавший в организм, присоединяется к лимфоцитам, содержащим «подходящие» антитела, т. е. таким, центр связывания которых комплементарен данному антигену; это происходит при участии клеток (обычно макрофагов), представляющих атиген В-лимфоцитам (рис. 20.5). Присоединенный антиген служит сигналом для начала двух процессов: пролиферации В-лимфоцитов этого клона и ускорения в них синтеза антител (такой В-лимфоцит называют плазматической клеткой). В результате количество антител в крови быстро нарастает, развивается иммунный ответ. Антитела соединяются с антигеном, комплекс антиген—антитело поглощается макрофагами и антиген разрушается в них при участии лизосом. Есть и другие механизмы разрушения антигенов.

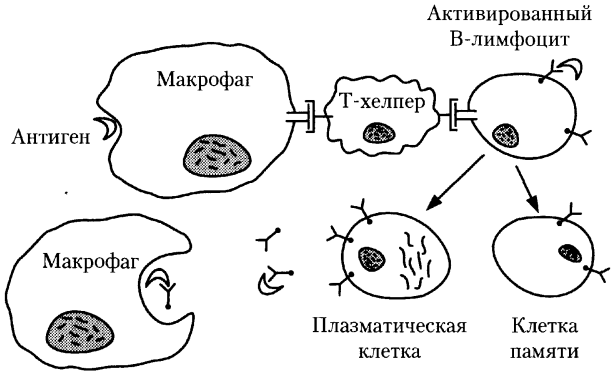


Рис. 20.5. Гуморальный иммунный ответ

При первом контакте организма с новым антигеном (например, с патогенным микроорганизмом) антитела к этому антигену начинают синтезироваться через 2–3 дня, и их концентрация в крови достигает максимума примерно через неделю, а затем постепенно снижается. Это первичный иммунный ответ. После завершения первичного иммунного ответа в крови постоянно обнаруживается небольшое количество новых антител, которых не было прежде; эти антитела содержатся в лимфоцитах, называемых клетками памяти.

При повторном контакте с тем же антигеном (через месяцы, годы) синтез антител начинается раньше, и их концентрация в крови бывает выше — это вторичный иммунный ответ. Следовательно, в организме сохраняется память об имевшем место контакте с антигеном — иммунологическая память. В крови взрослого человека находят множество антител — результат прошлых контактов с разными антигенами. Благодаря быстроте и интенсивности вторичного ответа повторное заражение тем же микроорганизмом не успевает развиться в болезнь — в этом и состоит сущность приобретенной невосприимчивости к инфекционной болезни. На этом

же основана и искусственная иммунизация с целью профилактики инфекционных болезней. Для лечения уже развившейся болезни (при первом заражении) применяют готовые антитела к тому виду микроорганизма, который вызвал заболевание.

Т-РЕЦЕПТОРЫ И БЕЛКИ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ

Иммуноглобулины и синтезирующие их В-лимфоциты составляют только часть иммунной системы организма. Эту часть называют гуморальным иммунитетом, поскольку антитела находятся в растворенном состоянии в жидкостях организма. Другая часть иммунной системы — клеточный иммунитет — представлена Т-рецепторами и белками главного комплекса гистосовместимости (белки ГКГ).

Т-рецепторы синтезируются Т-лимфоцитами. Эти белки, подобно антителам, являются рецепторами антигенов, но отличаются от антител по структтуре, а также тем, что они не секретируются: образовавшись в цитоплазме, они встраиваются в плазматическую мембрану лимфоцита, т. е. становятся интегральными белками мембраны. При этом центр связывания антигена экспонирован на наружной поверхности мембраны.

Белки ГКГ — тоже интегральные белки клеточных мембран. Они имеются на поверхности практически всех клеток.

Эти два семейства молекул принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов, в которое входит также семейство иммуноглобулинов (антител), давших название всему суперсемейству.

Т-рецепторы

Т-рецепторы представляют собой гетеродимеры αβ, содержащие межцепочечную дисульфидную связь. Каждая цепь содержит глобулярные вариабельный и константный домены, экспонированные на наружной поверхности мембраны, а также трансмембранный домен и короткий цитоплазматический домен (рис. 20.6, *а*). Т-рецепторы составляют часть многомолекулярного белкового комплекса, включающего в общей сложности 7–9 пронизывающих мембрану пептидных цепей. Этот комплекс формируется в цитозоле и затем включается в мембрану. Существует множество клонов Т-лимфоцитов, различающихся по структуре вариабельного

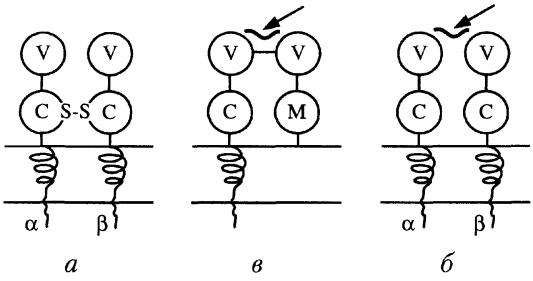


Рис. 20.6. Строение Т-рецепторов (*а*) и белков ГКГ классов I (*б*) и II (*в*):
V и *C* — вариабельные и константные глобулярные домены соответственно; *M* — β_2-микроглобулин. Стрелки указывают на пептиды-антигены

домена Т-рецептора, т. е. множество Т-рецепторов с разной специфичностью к лигандам. Лигандами для Т-рецепторов служат короткие пептиды (10–20 аминокислотных остатков), которые образуются из чужеродных белков в результате протеолитической фрагментации. При этом такие пептиды должны быть включены в комплексы с белками ГКГ.

Белки ГКГ

Известны два класса белков ГКГ, несколько различающихся по структуре и функциям. Белки класса I содержат две нековалентно связанные пептидные цепи — легкую и тяжелую (рис. 20.6, *б*). Тяжелая цепь своей большой N-концевой частью экспонирована на наружной поверхности клеточной мембраны, далее следуют небольшие трансмембранный и цитоплазматический домены. Легкая цепь представлена β_2-микроглобулином (β_2m). Внеклеточная часть тяжелой цепи содержит три глобулярных домена: α1 и α2 — вариабельные домены, α3 — константный домен, сходный по структуре с пептидом β_2m.

Белки ГКГ класса II — это гомодимеры; на поверхности клетки экспонированы вариабельный и константный глобулярные домены обеих цепей (рис. 20.6, *в*).

Белки ГКГ класса I имеются практически во всех клетках организма человека, а класса II — только в макрофагах, в лимфоцитах В и в некоторых специализированных эпителиальных клетках. Главным комплексом гистосовместимости (ГКГ) называют участок генома, содержащий небольшое число структурных генов (в пределах десятка), и белки, кодируемые этими генами; они имеются у всех млекопитающих, а также у некоторых других животных. Гены ГКГ и белки ГКГ человека называют также соответственно HLA-генами и HLA-белками.

Белки ГКГ являются рецепторами небольших пептидов (длиной в 10–20 аминокислотных остатков). Центр связывания этих пептидов образуют вариабельные домены белков ГКГ (см. рис. 20.6). Пептиды-лиганды могут образоваться в результате протеолитической фрагментации как собственных белков организма, так и чужеродных белков; в последнем случае пептиды-лиганды служат антигенами, вызывают иммунную реакцию с участием Т-лимфоцитов. Комплекс белка ГКГ с пептидом служит лигандом Т-рецептора определенного клона Т-лимфоцитов (рис. 20.7). Т-лимфоцит своим Т-рецептором присоединяется к клетке, представившей на своей поверхности комплекс ГКГ/пептид, и, если пептид в этом комплексе происходит не из собственного, а из чужеродного белка, Т-лимфоцит активируется и включается механизм уничтожения клетки, несущей чужеродный антиген. Подчеркнем,

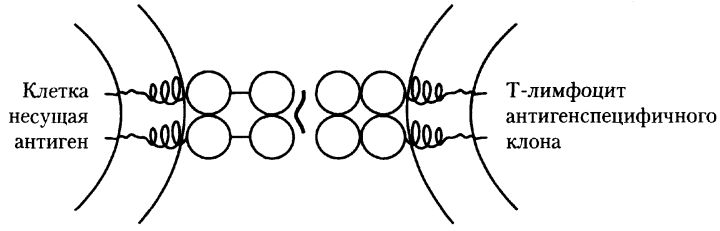


Рис. 20.7. Взаимодействие клетки, несущей антиген, с Т-рецептором

что Т-рецептор соединяется не отдельно с белком ГКГ, и не отдельно с пептидом-антигеном, а именно с комплексом этих молекул, которые вместе участвуют в образовании центра связывания для Т-рецептора. Следовательно, специфичность клеточного иммунного ответа определяется двумя классами белков — Т-рецепторами и белками ГКГ: она есть результат вариабельности Т-рецепторов и белков ГКГ, которые вместе определяют выбор пептида-антигена. Напомним, что специфичность гуморального иммунного ответа определяется только одним классом белков — антителами.

Т-лимфоциты в организме человека представлены тремя типами: цитотоксические Т-лимфоциты (Т-киллеры), имеющие механизм уничтожения клеток, и два типа, выполняющие регуляторные функции — Т-хелперы и Т-супрессоры. Т-хелперы, присоединившие антиген, стимулируют остальные компоненты иммунной системы, а именно — специфичные к данному антигену другие Т-лимфоциты. Т-супрессоры, наоборот, подавляют активность этих клеток. Т-хелперы, вероятно, играют главную роль в инициации иммунного ответа, и не только клеточного, но и гуморального.

На рис. 20.8 приведена очень упрощенная схема инициации клеточного иммунного ответа на эндоцитированный чужеродный белок. Антиген, обычно растворимый белок, часто гликопротеин, эндоцитируется антигенпредставляющими клетками — АПК (например, тканевыми макрофагами). В эндоцитозе участвует рецептор антигена на поверхности макрофага. Комплекс Аг-рецептор эндоцитируется, в эндосоме происходит частичный протеолиз чужеродного белка с образованием пептидов длиной в 10–20 аминокислотных остатков. Пептиды соединяются с белками класса II главного комплекса гистосовместимости. Затем эндосома сливается с плазматической мембраной, и комплекс антигенного пептида с белком ГКГ класса II экспонируется на поверхности клетки. Экспонированный комплекс распознается Т-хелпером специфического клона, несущим подходящий Т-рецептор. Взаимодействие макрофага с Т-хелпером активирует транскрипцию ряда цитокиновых генов. Цитокины вызывают много разных молекулярных событий в окружающих клетках; в частности, интерлейкин-1, секретируемый макрофагами, стимулирует синтез и секрецию Т-хелперами интерлейкина-2, который активирует Т-киллеры клона, специфичного для данного антигена.

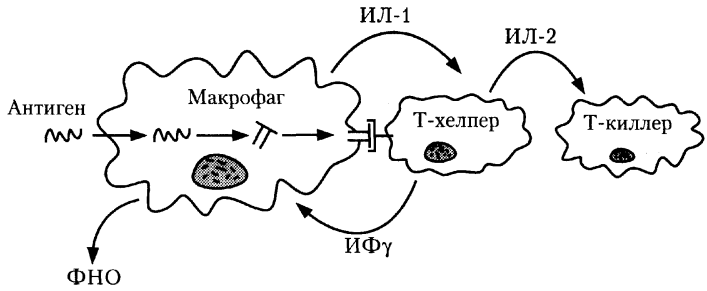


Рис. 20.8. Инициация клеточного иммунного ответа

В ранней фазе иммунного ответа происходит взаимодействие одной антигенпредставляющей клетки (макрофага) с одной антигенузнающей клеткой (Т-хелпером). Затем γ-интерферон, секретируемый Т-хелперами, активирует другие макрофаги. Таким образом γ-интерферон обеспечивает положительную обратную связь с макрофагами в отношении продукции интерлейкина-1 и фактора некроза опухолей (ФНО-α, обладает цитотоксическим действием), вследствие чего иммунный ответ амплифицируется.

В конечном счете клетки, несущие антиген, уничтожаются активированными макрофагами, Т-киллерами и клетками, которые называют естественными киллерами.

ИЛ-1, ФНО-α и γ-интерферон являются главными медиаторами развития острой фазы воспаления, инфекции и травмы. Они имеют перекрывающуюся, но все же разную биологическую активность. Эта система участвует также и в регуляции гуморального иммунного ответа (см. рис. 20.5). В частности, пролиферация и окончательная дифференцировка В-лимфоцитов, узнавших чужеродный антиген, требует активации Т-хелперами.

Т-клетки созревают во внутриутробном периоде, в тимусе: именно здесь происходит перестройка генов Т-рецепторов и начинается их экспрессия. В тимусе в процессе созревания и отбора Т-лимфоцитов (клональной селекции) происходит их массовое образование из стволовых клеток-предшественников и массовая гибель по механизму апоптоза: погибает 95–99 % этих клеток. Затем сохраненные клетки мигрируют в другие органы и непрерывно циркулируют между лимфоидной тканью разных органов, где и реагируют с чужеродными макромолекулами.

ЗНАЧЕНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Иммунная система необходима для выживания организма. Это со всей очевидностью следует из наблюдений наследственной недостаточности иммунной системы. Различают три группы иммунодефицитных состояний. Наиболее тяжелые формы связаны с нарушением дифференцировки стволовых клеток, дающих начало как В-, так и Т-лимфоцитам. Дети с таким дефектом сразу же после рождения подвержены разным инфекционным болезням — бактериальным, вирусным, грибковым, вследствие чего продолжительность их жизни не превышает нескольких месяцев.

Вторая группа иммунодефицитности — это результат нарушения дифференцировки Т-клеток. Хотя В-лимфоциты при этом имеются в нормальных количествах, их ответ на введение антигена ослаблен, что указывает на взаимосвязь двух видов иммунитета — гуморального и клеточного. По последствиям эта группа нарушений сходна с первой.

Третья группа иммунодефицитности связана с нарушением дифференцировки В-клеток. Организм этих больных справляется с вирусными инфекциями (клеточный иммунитет сохраняется), но подвержен бактериальным. При постоянном приеме антибиотиков и введении иммуноглобулинов больные доживают до 20–30 лет.

ТРАНСПЛАНТАЦИОННАЯ НЕСОВМЕСТИМОСТЬ

Отторжение трансплантата в наибольшей мере определяется главным комплексом гистосовместимости. Гены ГКГ отличаются необычайно высоким полиморфизмом. В геноме индивида содержится лишь несколько разных генов, кодирующих белки ГКГ. Но в популяциях человека известно огромное количество аллельных вариантов этих генов и, соответственно, белков — варианты белков класса I и варианты белков класса II; отдельные индивиды могут наследовать лишь один (гомозиготы) или два (гетерозиготы) из этих вариантов. Таким образом, между людьми существуют индивидуальные различия по белкам ГКГ. Число комбинаций разных аллелей по генам этой системы достигает нескольких миллионов. Это самая полиморфная система человека из всех известных в настоящее время. Высокая степень полиморфизма генов обеспечивает столь же высокую степень индивидуальности по белкам, которые кодируются этими генами.

Подбор донора и реципиента, сходных по антигенным свойствам белков ГКГ, значительно повышает вероятность приживления трансплантата, однако трансплантационная несовместимость пока остается главным препятствием на пути трансплантологии.

Разумеется, в ходе биологической эволюции такая реакция на чужеродные клетки выработалась не для отторжения трансплантата. Действительная биологическая роль клеточного иммунитета, помимо защиты от вирусной и некоторых других инфекций, состоит в устранении измененных клеток, которые возникают в результате соматических мутаций. Общее число клеток в организме человека громадно — порядка 10^{15}, поэтому и число мутантных клеток тоже велико: в каждый момент оно может измеряться биллионами клеток. Размножение мутантных клеток, не способных выполнять нормальные функции, могло бы оказаться вредным для организма. На них и направлено действие клеточного иммунитета. Таким способом осуществляется иммунологический надзор за постоянством клеточного состава организма. Иммунологический надзор служит как бы второй линией обороны против появления мутантных клеток (первую линию обороны составляют системы репарации ДНК).

СИНДРОМ ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНОДЕФИЦИТА (СПИД)

СПИД — инфекционное заболевание, вызывается вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Вирус инфицирует Т-лимфоциты класса хелперов. Вирусная частица присоединяется к Т-рецептору на наружной поверхности мембраны Т-хелпера, липидная оболочка вируса сливается с клеточной мембраной, и содержимое вирусной частицы оказывается в цитозоле (рис. 20.9). ВИЧ содержит РНК, которая служит матрицей для синтеза ДНК (ретровирус); фермент, необходимый для такого синтеза — обратная транскриптаза, — также содержится в вирусной частице (см. раздел об особенностях репликации вирусного генома в гл. 4). Образующаяся ДНК поступает в ядро, интегрируется с ДНК лимфоцита (при участии белков вируса) и служит матрицей для транскрипции — синтезируется вирусная РНК. В результате трансляции этой РНК образуются вирусные белки — обратная транскриптаза, белки оболочки вируса, а также регуляторные белки, стимулирующие по

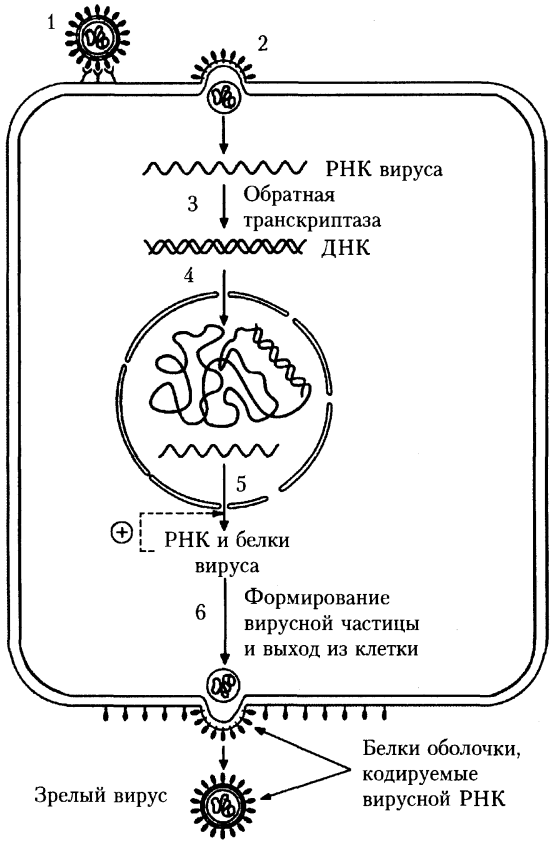


Рис. 20.9. Размножение вируса ВИЧ в клетке:

1 — присоединение вируса к рецепторам клетки; *2* — слияние вирусной липидной оболочки с мембраной клетки; РНК и белки вируса попадают в цитозоль клетки; *3* — синтез ДНК на матрице РНК при участии обратной транскриптазы; *4* — интеграция ДНК, синтезированной обратной транскриптазой, с ядерной ДНК клетки; *5* — амплификация РНК вируса (транскрипция) и синтез вирусных белков (трансляция); *6* — формирование вирусной частицы и выход из клетки

механизму положительной обратной связи транскрипцию и трансляцию вирусной РНК. Комплекс вирусной РНК и вирусных белков присоединяется к внутренней поверхности мембраны лимфоцита и покидает клетку вместе с частью мембраны лимфоцита, образующей липидную оболочку вируса.

Размножение вируса в клетке истощает ее ресурсы, и она в конечном счете погибает. В норме в 1 мл крови содержится около 1000 Т-лимфоцитов; у лиц, инфицированных ВИЧ, их содержание снижается. Когда количество Т-лимфоцитов уменьшится в 4–5 раз (через 7–10 лет после инфицирования), появляются явные и тяжелые симптомы недостаточности иммунной системы. Главные из них — вирусные, грибковые и бактериальные инфекции (часто — туберкулез), а также злокачественные опухоли (часто — саркома Капоши, форма рака кожи).

АУТОИММУННЫЕ БОЛЕЗНИ

Напомним, что в эмбриональном и раннем постнатальном периоде в результатате селекции формируется набор клонов лимфоцитов, умеющих различать свои и чужие белки, и реагирующих только с чужеродными белками (иммунная толерантность). Однако при некоторых условиях толерантность иммунной системы к некоторым собственным белкам оказывается нарушенной. В частности, это имеет место при инсулинзависимом сахарном диабете.

Гипергликемия и другие первичные симптомы ИЗСД обусловлены дефицитом инсулина, который, в свою очередь, вызван уменьшением количества b-клеток (а также панкреатических островков) в поджелудочной железе. Множество экспериментальных и клинических исследований указывает на то, что разрушение островков происходит в результате клеточной аутоиммунной реакции.

При манифестации (т. е. первом клиническом проявлении) ИЗСД почти всегда обнаруживается воспалительная реакция в поджелудочной железе — инсулит. Панкреатический инфильтрат при ИЗСД содержит Т-лимфоциты, В-лимфоциты, натуральные киллеры и макрофаги. При этом инфильтрат образуется только в тех островках, в которых есть β-клетки. В островках, продуцирующих глюкагон, соматостатин, но не содержащих β-клеток, нет и инфильтрата. Такая локальность, точечность реакции указывает на то, что причиной ее являются компоненты и свойства, присущие только β-клеткам. Как показывают многие наблюдения, специфичность повреждения β-клеток может быть следствием клеточной аутоиммунной реакции.

Остается неясным вопрос о природе антигена, запускающего реакцию клеточного иммунитета, избирательно направленную на β-клетки. Из тканей мышей с высокой генетической предрасположенностью к диабету удается выделить клоны лимфоцитов, введение которых здоровым мышам вызывает диабет. Кроме того, такие лимфоциты оказались способными связывать инсулин, причем узнаваемой частью служит фрагмент β-цепи, включающий 9–23 аминокислотных остатка (пептид В). В этих лимфоцитах пептид В соединен с белками ГКГ класса II. Не исключено, что инсулин может быть первичным аутоантигеном при сахарном диабете.

Аутоиммунные болезни обычно многофакторны, требуют наследования, по крайней мере, одного гена и действия одного или нескольких факторов среды. Они часто развиваются гораздо более медленно, чем иммунный ответ на патогенные организмы, что указывает на продолжающееся действие контрольных механизмов до определенного момента; часто чередуются облегчение (ремиссия) и ухудшение состояния больного, т. е. контрольные механизмы временами восстанавливаются.

Глава 21

КРОВЬ

Главные функции крови связаны с тем, что она — жидкая подвижная ткань, перемещающаяся по кровеносным сосудам. Эритроцит проходит по кровеносному руслу около двух километров в день. Кровь выполняет роль транспортного и коммуникативного средства в интеграции обмена веществ разных органов. Среди функций крови, обусловленных ее движением по сосудам, отметим следующие.

1. Дыхательная функция: перенос кислорода из легких в ткани и диоксида углерода из тканей в легкие.
2. Трофическая функция: перенос продуктов пищеварения от кишечника к разным органам: перенос глюкозы и кетоновых тел из печени в мышцы, жиров из печени в жировую ткань, молочной кислоты из мышц в печень, жирных кислот из жировой ткани в разные органы и т. д.
3. Выделительная функция: перенос мочевины из печени в почки, билирубина из разных тканей в печень и т. д.
4. Коммуникативная (регуляторная) функция: перенос химических сигналов — гормонов и других регуляторных веществ — к органам-мишеням.

С движением крови связаны также и другие ее функции: защитная, выполняемая антителами и фагоцитирующими лейкоцитами крови; участие в регуляции водно-солевого и кислотно-щелочного баланса; регуляция температуры тела путем теплообмена между тканями и движущейся кровью.

Общее количество крови в организме взрослого человека составляет около 5 л (примерно 7 % от массы тела). Если кровь центрифугировать, то форменные элементы (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты) осаждаются, а над осадком остается светло-желтая прозрачная жидкость — плазма крови. В плазме содержится примерно 7 % белков, а также разнообразные низкомолекулярные вещества. При стоянии в течение нескольких минут плазма свертывается — образуется сгусток, который затем сокращается, и из него выжимается жидкость — сыворотка крови. Сыворотка отличается от плазмы только тем, что в ней не содержится белок фибриноген: при свертывании плазмы он превращается в нерастворимый фибрин, который и образует сгусток.

Состав плазмы крови является своего рода зеркалом метаболизма, поскольку изменения концентрации метаболитов в клетках, даже если они происходят в отдельных органах, отражаются на концентрации этих метаболитов в крови. Состав плазмы крови изменяется также при нарушении проницаемости клеточных мембран. По этой причине, а также потому, что пробы крови для анализа получать просто, анализ крови широко применяется для диагностики болезней и контроля эффективности лечения. Наиболее частые нарушения функций крови связаны с повреждением эритропоэза или ускорением распада эритроцитов (разные формы анемий), с повреждениями печени (поскольку почти все белки плазмы крови образуются в печени), а также с повреждениями кровеносных сосудов (атеросклероз, тромбозы, разрывы).

ЭРИТРОЦИТЫ И ГЕМОГЛОБИН

Эритроциты занимают 36–48 % объема крови. В 1 мм^3 содержится 4–5 млн эритроцитов; во всей крови взрослого человека — $2{,}5 \cdot 10^{13}$ эритроцитов. Примерно 95 % массы сухого вещества эритроцитов приходится на гемоглобин, благодаря которому эритроцит и выполняет свою функцию транспорта кислорода. На долю гемоглобина приходится половина объема эритроцита, т. е. практически плотная упаковка шариков (шар, вписанный в куб, занимает 52 % объема куба).

Общее содержание гемоглобина в крови составляет 13–16 г/дл; если гемоглобин просто растворить в плазме, то такой раствор будет слишком вязким, чтобы его можно было протолкнуть через сосуды. В процессе развития эритроцитов из стволовых кроветворных клеток на стадии ретикулоцитов утрачиваются ядро и хроматин. Ретикулоцит содержит много глобиновой мРНК и активно синтезирует гемоглобин; затем, при превращении ретикулоцита в эритроцит, РНК и рибосомы разрушаются; утрачиваются также и митохондрии. В результате зрелый эритроцит отличается упрощенным метаболизмом, предназначенным, главным образом, для сохранения структуры мембраны и стромы эритроцита и предотвращения окисления гемоглобина.

Продолжительность жизни эритроцита составляет 110–120 дней; в организме взрослого человека ежесуточно распадается $2 \cdot 10^{11}$ эритроцитов и столько же образуется новых. Общая масса эритроцитов, образуемых за 10 лет, примерно равна массе тела человека. Эритропоэз стимулируется гликопротеином эритропоэтином. Этот белок образуется в почках из белка-предшественника, имеющегося в циркулирующей крови. Концентрация эритропоэтина в крови увеличивается при гипоксии и потере крови. Анемии, связанные с нарушением эритропоэза при недостаточности витамина B_{12} и фолиевой кислоты, рассмотрены в гл. 6 и 11.

Синтез гемоглобина

Строение гемоглобина описано в гл. 1. В ретикулоцитах происходит координированный синтез α- и β-пептидных цепей гемоглобина, а также синтез его простетической группы – гема. Предшественниками при синтезе гема являются глицин и сукцинил-КоА. При действии δ-аминолевулинатсинтетазы из них образуется δ-аминолевулиновая кислота (рис. 21.1, *а*). Затем происходит конденсация двух

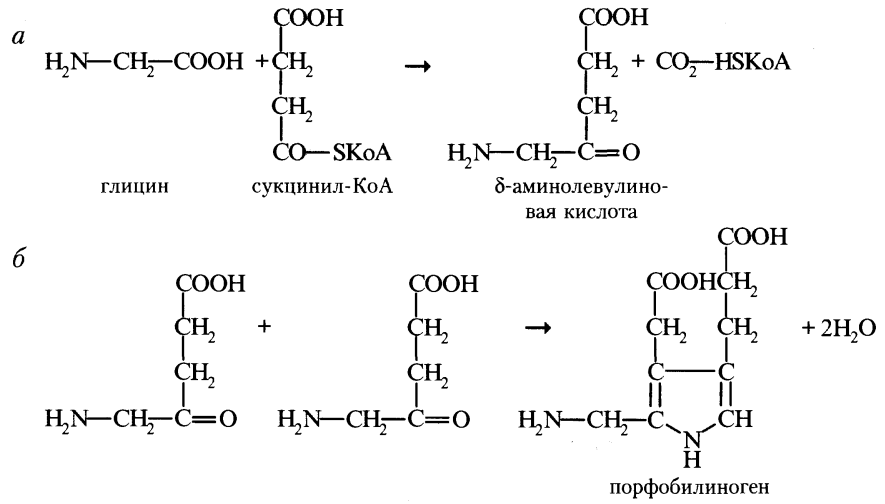


Рис. 21.1. Синтез порфобилиногена

молекул δ-аминолевулиновой кислоты с образованием порфобилиногена; реакцию катализирует δ-аминолевулинатдегидратаза (рис. 21.1, *б*).

Далее путем конденсации четырех молекул порфобилиногена образуется тетрапиррольное соединение уропорфириноген, который затем модифицируется в протопорфин IX. Последний при действии феррохелатазы присоединяет железо и превращается в гем (рис. 21.2).

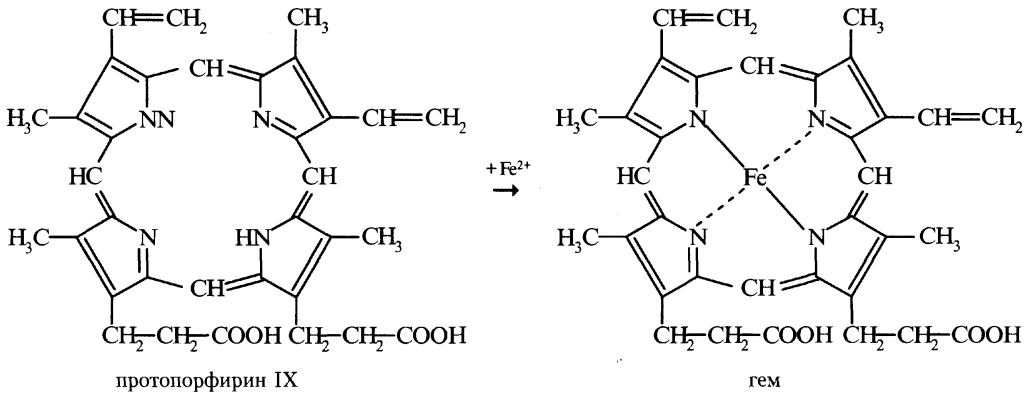


Рис. 21.2. Превращение протопорфирина IX в гем

Молекула гемоглобина содержит два протомера α, два протомера β и четыре гема. Механизмы регуляции обеспечивают синтез этих компонентов в соответствующих количествах, так что избытка или недостатка какого-нибудь из них не получается.

Синтез глобинов регулируется на уровне трансляции (напомним, что в ретикулоцитах нет ДНК, а следовательно, невозможна регуляция на уровне транскрипции).

Синтез пептидных цепей гемоглобина происходит только в присутствии гема, и образующиеся пептидные цепи тут же соединяются с гемом (рис. 21.3). Влияние гема обусловлено тем, что он ингибирует протеинкиназу, которая фосфорилирует (и инактивирует) фактор инициации EIF2 (рис. 21.4). Поэтому при низкой концентрации гема в ретикулоцитах синтез глобинов замедляется.

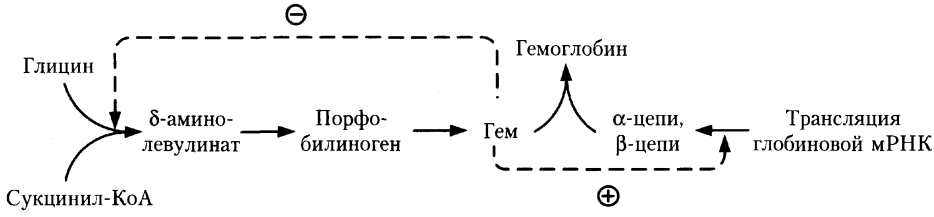


Рис. 21.3. Регуляция синтеза гемоглобина

С другой стороны, гем ингибирует δ-аминолевулинатсинтетазу, а также снижает трансляцию мРНК этого фермента (см. рис. 21.3).

Известны наследственные анемии, связанные с дефектами ферментов, участвующих в синтезе гема. При этом в организме нередко образуются избыточные количества окрашенных порфиринов — предшественников гема, которые выводятся с мочой (моча имеет красный цвет). Такие формы нарушения обмена гема называют порфириями. У больных отмечается чувствительность кожи к солнечному облучению вследствие фотосенсибилизации порфиринами.

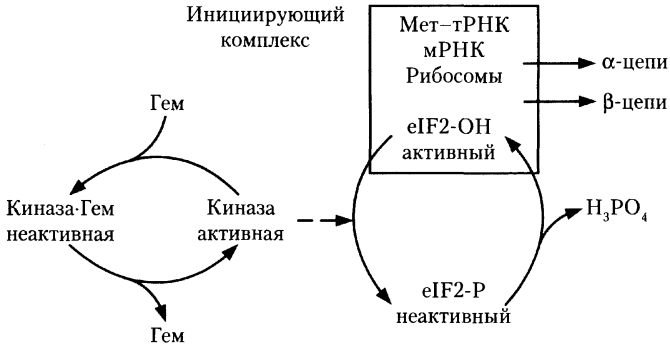


Рис. 21.4. Регуляция трансляции глобиновых мРНК. eIF2 — один из факторов инициации

Обмен железа

В организме человека содержится 3–4 г железа; из них около 2,5 г (70 %) находится в составе гемоглобина эритроцитов, около 20 % — в мышцах (главным образом в составе миоглобина), до 15 % — в печени и селезенке. Небольшая доля железа (около 1 %) входит в состав геминовых ферментов, а также белков, содержащих негеминовое железо. Таким образом, в количественном отношении обмен железа определяется прежде всего синтезом и распадом гемоглобина эритроцитов,

а недостаточное поступление или нарушения утилизации железа проявляются прежде всего как малокровие (железодефицитные анемии).

При тех значениях pH и концентрации кислорода, которые характерны для тканей, стабильная форма железа — Fe^{3+}. Трехвалентный ион железа склонен образовывать сложные нерастворимые гидроксиды. В процессе эволюции возникли белки, способные поддерживать железо в форме, удобной для транспортировки и использования при синтезе гема. Этими белками являются трансферрин и ферритин.

Трансферрин представляет собой гликопротеин плазмы крови. Он имеет два центра связывания железа; железо в составе трансферрина находится в трехвалентном состоянии в форме $Fe^{3+}CO_3^{2-}$. Трансферрин, содержащий железо, эндоцитируется клетками при участии мембранных рецепторов. Главная функция трансферрина — перенос железа с током крови к местам депонирования и использования. Содержание трансферрина в плазме крови равно примерно 0,4 г/дл.

Ферритин — это крупный белок (молекулярная масса около 450 000), отличающийся своеобразным строением. Он содержит 24 идентичных протомера, образующих полую сферу диаметром около 12 нм; диаметр полости 7,5 нм. В белковой оболочке имеется шесть каналов, ведущих в полость. Через эти каналы в полость проникают ионы железа, образуя железное ядро молекулы. Содержание железа в молекуле ферритина непостоянно: оно может быть равным нулю (апоферритин) и может достигать 4500 атомов железа на одну молекулу ферритина. Железо в ферритине находится в форме гидроксидфосфата примерного состава $[(FeO{\bullet}OH)_8(FeO{\bullet}OPO_3H_2)]$. Функция ферритина — депонирование железа; в наибольших количествах он содержится в печени, селезенке и костном мозге, но имеется также и в большинстве других органов.

Железо, освобождающееся из гема при распаде эритроцитов, используется повторно. Однако часть железа — около 1 мг в сутки — теряется организмом, в основном с желчью. Эти потери компенсируются поступлением железа с пищей. Суточное потребление железа должно составлять 10–20 мг, т. е. значительно больше, чем выводится из тканей с желчью. Это связано с тем, что из кишечника всасывается лишь небольшая часть имеющегося в пище железа. У женщин в связи с потерей крови при менструациях потребность в железе в 1,5–2 раза больше, чем у мужчин.

Всасывание железа в кишечнике происходит при участии белка, сходного с трансферрином. Затем железо поступает на трансферрин крови, который передает его ферритину в клетках разных органов (рис. 21.5).

В соединении с белками железо находится в трехвалентном состоянии, но при переходе с одного белка на другой валентность каждый раз дважды меняется: Fe^{3+},

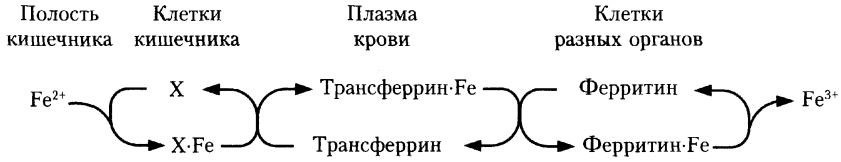


Рис. 21.5. Всасывание, транспорт и депонирование железа

Fe^{2+} и снова Fe^{3+}. Этот процесс катализируется специальными окислительно-восстановительными ферментами или самими белками-переносчиками и необходим для освобождения железа из соединения с белком. На рис. 21.6 представлена общая схема обмена железа.

Железодефицитные анемии встречаются чаще других форм анемий. Причинами дефицита железа в организме могут быть длительные, повторяющиеся кровопотери, усиленный расход железа при беременности, ухудшение его всасывания после операций на желудочно-кишечном тракте. Сравнительно редко бывает дефицит железа вследствие его недостатка в пище; исключение составляют дети раннего возраста, получающие мало мясной пищи, а следовательно, и геминового железа.

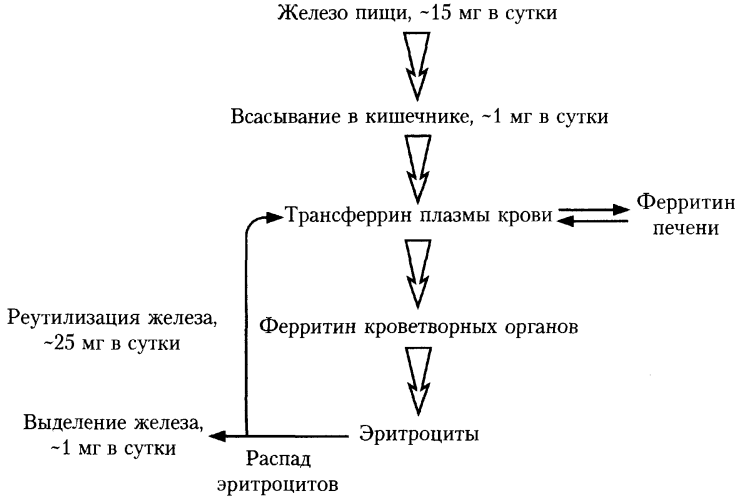


Рис. 21.6. Обмен железа

Метаболизм эритроцита

Поскольку в зрелом эритроците нет ядра, хроматина и аппарата трансляции, на протяжении всей примерно четырехмесячной жизни эритроцита в нем функционируют только те белки, которые образовались на стадии ретикулоцита или даже на более ранних стадиях развития эритроцита. С другой стороны, концентрация кислорода в эритроцитах больше, чем в клетках других тканей, и эритроциты в большей мере подвержены его повреждающему действию. Кроме того, эритроциты непосредственно контактируют с окислителями, поступающими из желудочно-кишечного тракта. Окисление сульфгидрильных групп ферментов и других белков, окисление гемоглобина в метгемоглобин инактивирует эти белки. Однако в эритроцитах существуют специальные защитные восстановительные системы, ослабляющие вредное действие кислорода.

Гликолиз в эритроцитах

Эритроциты не имеют митохондрий; АТФ, необходимая для функционирования транспортных АТФаз и поддержания разности концентраций веществ в плазме и

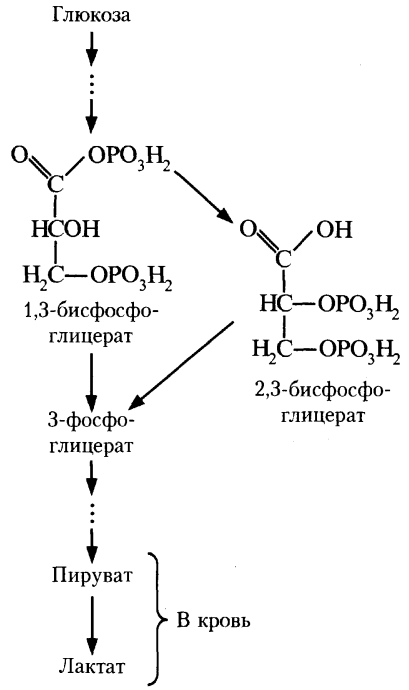


Рис. 21.7. Гликолиз в эритроцитах

эритроцитах, образуется путем гликолиза. Образующийся при этом лактат выделяется в плазму крови и используется другими клетками. Однако роль анаэробного гликолиза в эритроцитах не сводится только к синтезу АТФ: с ним связаны еще два процесса, необходимые для выживания и нормального функционирования эритроцита.

Один из этих процессов — образование НАДН в реакции дегидрирования глицеральдегидфосфата. Основная доля НАДН используется для восстановления пирувата в лактат, но он служит также для восстановления метгемоглобина в гемоглобин при участии метгемоглобинредуктазы (см. ниже). В результате этого пути расходования НАДН не весь пируват, образующийся из глюкозы, превращается в лактат: часть его выводится в плазму крови (рис. 21.7).

Другой связанный с гликолизом процесс в эритроцитах — образование 2,3-бисфосфоглицерата из 1,3-бисфосфоглицерата (см. рис. 21.7); 2,3-бисфосфоглицерат необходим для регуляции взаимодействия гемоглобина с кислородом (см. ниже). В свою очередь, 2,3-бисфосфоглицерат может распадаться при участии специфической фосфатазы на 3-фосфоглицерат и H_3PO_4. Эти две реакции обеспечивают поддержание необходимой концентрации 2,3-бисфосфоглицерата в эритроцитах, примерно равной концентрации гемоглобина. Расходование части 1,3-бисфосфоглицерата на образование 2,3-бисфосфоглицерата несколько снижает выход АТФ при гликолизе в эритроцитах.

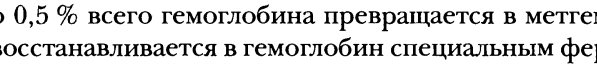
Примерно 90 % глюкозы в эритроцитах распадается в процессе гликолиза и 10 % — в пентозофосфатном пути. Пентозофосфатный путь служит для образования НАДФН, который в эритроцитах, как и НАДН, участвует в системах обезвреживания активных форм кислорода.

Метгемоглобин

Как уже упоминалось, при тех значениях pH и концентрациях кислорода, которые имеются в организме, стабильной формой железа является ион Fe^{3+} (ферриформа). Ион Fe^{2+} (ферро-форма) легко окисляется в ферри-форму Fe^{3+}, в том числе в составе гема. Однако в молекуле гемоглобина эта реакция существенно заторможена благодаря влиянию белковой части в окружении гема. И все же с небольшой скоростью происходит окисление оксигемоглобина кислородом с образованием метгемоглобина:

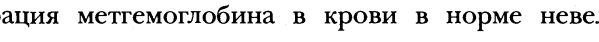
$$Hb(Fe^{2+})O_2 \rightleftarrows Hb(Fe^{3+}) + O_2^- .$$

Образующийся при этом супероксид кислорода, в свою очередь, может окислять оксигемоглобин:



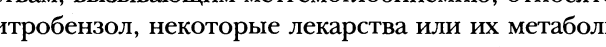
$$Hb(Fe^{2+})O_2 + O_2^- + 2H^+ \rightleftarrows Hb(Fe^{3+}) + O_2 + H_2O_2.$$

Пероксид водорода — тоже окислитель оксигемоглобина:



$$Hb(Fe^{2+})O_2 + H_2O_2 \rightleftarrows Hb(Fe^{3+}) + OH^- + OH^-.$$

Гидроксильный радикал OH· окисляет гемоглобин (не оксигемоглобин):



$$Hb(Fe^{2+}) + OH^- \rightleftarrows Hb(Fe^{3+}) + OH^-.$$

Не только кислород, но и другие окислители могут окислять гемоглобин в метгемоглобин. Метгемоглобин не присоединяет кислород и поэтому не может обеспечить дыхание тканей. Образование метгемоглобина происходит постоянно: ежедневно около 0,5 % всего гемоглобина превращается в метгемоглобин. Метгемоглобин снова восстанавливается в гемоглобин специальным ферментом, использующим НАДН — метгемоглобинредуктазой (НАДН-цитохром β_5-редуктаза). Поэтому концентрация метгемоглобина в крови в норме невелика — меньше 1 г/дл. Однако она может значительно повышаться при попадании в организм ряда веществ. К веществам, вызывающим метгемоглобинемию, относятся нитраты, нитриты, анилин, нитробензол, некоторые лекарства или их метаболиты. При семейной метгемоглобинемии снижена активность метгемоглобинредуктазы в эритроцитах; в результате содержание метгемоглобина в крови может достигать 40 % от всего гемоглобина, что приводит к резкому нарушению снабжения тканей кислородом.

Метгемоглобинредуктаза — специфический для эритроцитов механизм защиты от действия активных форм кислорода и других окислителей. Кроме того, в эритроцитах действует и другой механизм защиты от окислителей, свойственный не только эритроцитам и связанный с использованием НАДФН и глутатиона (см. гл. 19). В эритроцитах единственным источником НАДФН служит пентозофосфатный путь окисления глюкозы. Антиоксидантные системы для эритроцитов имеют особое значение, поскольку в эритроцитах не происходит обновления белков путем синтеза.

Если в организм попадает большое количество окисляющих веществ, системы обезвреживания не справляются с их устранением и может наступить гемолиз в результате повреждения мембран эритроцитов. На решающее значение антиокислительных систем для выживания эритроцитов указывают наблюдения наследственных дефектов метаболизма эритроцитов. Примерно у $^1/_{20}$ части людей снижена активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах — первого фермента пентозофосфатного пути окисления глюкозы. Такие люди гораздо более чувствительны к окислителям; в частности, при лечении противомалярийным препаратом примахином у них возникает гемолиз.

Транспорт кислорода

Гемоглобин извлекает из воздуха и передает тканям за сутки около 600 л O_2 (27 моль; 850 г). В тканях за сутки образуется около 500 л CO_2 (22 моль; 1000 г), который удаляется из организма также при существенном участии гемоглобина. Каждый грамм

гемоглобина может присоединять 1,34 мл O_2; поскольку концентрация гемоглобина в крови составляет около 15 г/дл, 100 мл цельной крови связывают 20 мл O_2, в то время как в 100 мл плазмы крови растворяется только 0,3 мл O_2.

Движущими силами переноса кислорода от легких в ткани являются ток крови и градиент концентраций кислорода между альвеолярным воздухом и межклеточной жидкостью. Альвеолярный воздух несколько отличается от атмосферного, поскольку вдыхаемый атмосферный воздух смешивается в легких с остатками воздуха от предыдущего вдоха: парциальное давление O_2 в альвеолярном воздухе равно 100 мм рт. ст. (табл. 21.1). Градиент концентраций кислорода создается его непрерывным использованием митохондриями, где кислород при участии цитохромоксидазы превращается в воду. Максимальная скорость действия цитохромоксидазы достигается уже при давлении кислорода 4–5 мм рт. ст. Митохондрии создают как бы кислородный вакуум в клетках, в который с помощью эритроцитов засасывается кислород из атмосферы.

Таблица 21.1. Градиенты концентраций кислорода и диоксида углерода в организме

Воздух и жидкости организма	Парциальное давление, мм рт. ст.*		Степень насыщения гемоглобина кислородом, %
	O_2	CO_2	
Атмосферный воздух	157	0,3	—
Альвеолярный воздух	100	40,0	—
Артериальная кровь	93	40,0	97
Межклеточная жидкость	35	50,0	—
Венозная кровь	40	46,0	64

* В СИ давление выражается в паскалях (Па): 1 мм рт. ст. = 133 Па.

В артериях и венах нет внешних источников O_2 и CO_2, и никаких изменений в гемоглобине не происходит, роль его пассивна — плыть по течению крови. Перенос O_2 и CO_2 происходит только в капиллярах: в капиллярах легких O_2 — из альвеолярного воздуха в эритроциты, CO_2 — в обратном направлении; в капиллярах прочих тканей O_2 — из эритроцитов в клетки тканей, CO_2 — в обратном направлении.

Скорость и полнота переноса зависят от изменений сродства гемоглобина к кислороду. Сродство повышается при присоединении каждой из четырех молекул кислорода к молекуле гемоглобина — положительная регуляция (см. гл. 1, рис. 1.26). Кроме того, существует отрицательная регуляция: 2,3-бисфосфоглицерат (2,3-БФГ), ионы водорода (снижение pH) и CO_2 уменьшают сродство гемоглобина к O_2; с другой стороны, кислород снижает сродство гемоглобина к этим веществам. Кислород, 2.3-БФГ, ионы водорода и CO_2 действуют как аллостерические регуляторы активности гемоглобина.

Концентрация 2,3-БФГ в крови близка к концентрации гемоглобина (моль/моль) и одинакова в венозной и артериальной крови. В центральной части тетрамерной молекулы гемоглобина имеется полость, содержащая несколько положительно заряженных групп, расположенных на примыкающих друг к другу участках поверхности обоих β-протомеров. К ним присоединяется 2,3-БФГ своими отрицательно заряженными фосфатными группами (рис. 21.8). 2,3-БФГ реагирует только с дезоксигемоглобином: в оксигемоглобине полость с центром связывания 2,3-БФГ закрыта.

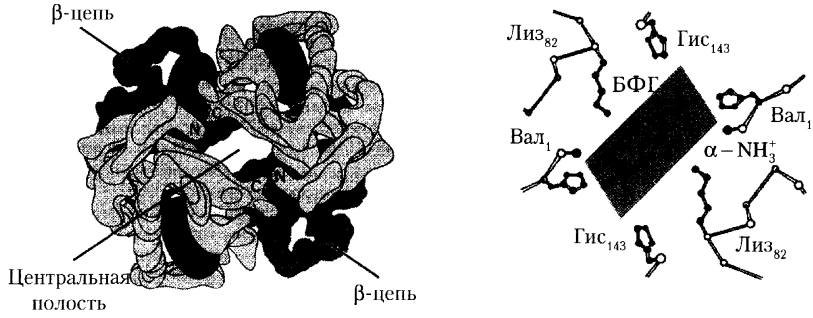


Рис. 21.8. Взаимодействие 2,3-БФГ с гемоглобином

Перенос кислорода из крови в клетки работающих мышц

Взрослый человек при полном покое потребляет около 400 л кислорода в сутки. Такое количество кислорода содержится в 2000 л воздуха. При тяжелой физической работе потребление кислорода увеличивается в несколько раз (до десятикратного), причем почти исключительно за счет потребления в скелетных мышцах (в 20–25 раз) и в сердце (в 4 раза).

Если гемоглобин насыщен кислородом на 100 %, то все молекулы гемоглобина находятся в форме $Hb(O_2)_4$. При меньшем насыщении в эритроците имеются в равновесных концентрациях все формы оксигенированного гемоглобина — от HbO_2 до $Hb(O_2)_4$, а также неоксигенированный Hb (рис. 21.9). Поскольку сродство гемоглобина к кислороду возрастает по мере присоединения каждой очередной молекулы кислорода, то концентрация $Hb(O_2)_4$ наибольшая, а другие формы содержатся в убывающей концентрации.

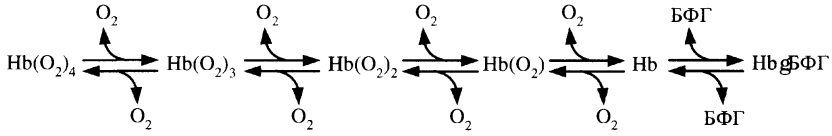


Рис. 21.9. Равновесие оксигенированных форм гемоглобина в эритроцитах

В капилляры мышц поступает артериальная кровь, в которой PO_2 равно примерно 95 мм рт. ст., и гемоглобин на 95 % насыщен кислородом (рис. 21.10). Почти все молекулы гемоглобина полностью насыщены кислородом, т. е. находятся в форме $Hb(O_2)_4$. Напомним, что в такой форме молекулы кислорода связаны с гемоглобином примерно в 300 раз прочнее, чем в молекуле HbO_2. Но в работающей мышце низкое парциальное давление кислорода — 20 мм рт. ст. или даже меньше, т. е. существует более чем четырехкратная разница в концентрациях кислорода в крови и мышечных клетках. Поэтому от гемоглобина могут отщепляться даже прочно связанные молекулы кислорода. В результате перемещения кислорода из капилляра в ткань мышцы разность парциального давления между капилляром и мышцей снижается, т. е. уменьшается одна из движущих сил переноса кислорода из эритроцита в ткани. Но появляются другие движущие силы.

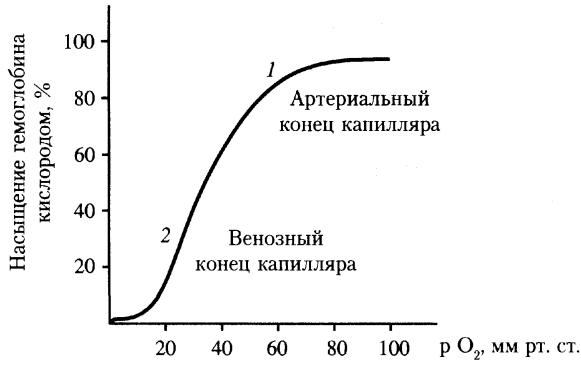


Рис. 21.10. Перенос кислорода из крови в клетки работающих мышц

1. Увеличивается относительное содержание не полностью насыщенных кислородом молекул гемоглобина [$Hb(O_2)_n$, $n < 4$], от которых кислород отщепляется легче.
2. В результате интенсивного метаболизма в работающей мышце образуется много CO_2, который превращается в угольную кислоту, диссоциирующую с образованием протона и HCO^-_3:

$$CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow H^+ + HCO^-_3.$$

Повышение концентрации протонов приводит к протонированию некоторых кислотных групп пептидных цепей гемоглобина и к снижению его сродства к кислороду:

$$H^+ + HbO_2 \rightarrow H^+Hb + O_2.$$

Дальнейшее снижение сродства гемоглобина к O_2 происходит в результате присоединения CO_2 к некоторым незаряженным аминогруппам гемоглобина (образуется карбгемоглобин):

$$Hb\text{–}NH_2 + CO_2 \rightarrow Hb\text{–}NH\text{–}COO^- + H^+.$$

3. И наконец, 2,3-БФГ взаимодействует с молекулами гемоглобина, лишенными кислорода, и сдвигает равновесие реакций вправо (см. рис. 21.9).

В результате действия этих механизмов работающие мышцы извлекают из крови до 85 % содержащегося в ней кислорода. При этом на графике переноса кислорода (см. рис. 21.10) можно различить две фазы. Фаза 1: пологое снижение насыщенности гемоглобина кислородом (с 97 до 65 %) при значительном снижении парциального давления кислорода в капиллярах (со 100 до 40 мм рт. ст.). Фаза 2: крутое снижение насыщенности гемоглобина (с 65 до 20 %) при небольшом снижении парциального давления кислорода (от 40 до 20 мм рт. ст.). Таким образом, в первой фазе перенос кислорода определяется главным образом разностью парциальных давлений в крови и в клетках, а во второй фазе — снижением сродства гемоглобина к кислороду. Фаза 1 протекает в начальных частях капилляра, фаза 2 — в конечных. Напомним, что эритроцит проходит капилляр за секунду или даже доли секунды.

Перенос кислорода в капиллярах немышечных тканей и покоящихся мышц

Разные органы потребляют неодинаковые количества кислорода; неодинакова также и полнота извлечения кислорода из гемоглобина. Как уже было отмечено, работающие мышцы извлекают до 85 % кислорода. Но это исключение: другие органы, а также покоящиеся мышцы извлекают из крови гораздо меньшую долю кислорода. В венах, содержащих смешанную кровь из разных органов, насыщенность гемоглобина кислородом равна 65 % (парциальное давление кислорода 40 мм рт. ст.). Таким образом, в среднем органы потребляют лишь около $^1/_3$ кислорода крови, и перенос происходит в результате действия фазы 1, т. е. в основном за счет разности парциальных давлений (рис. 21.11).

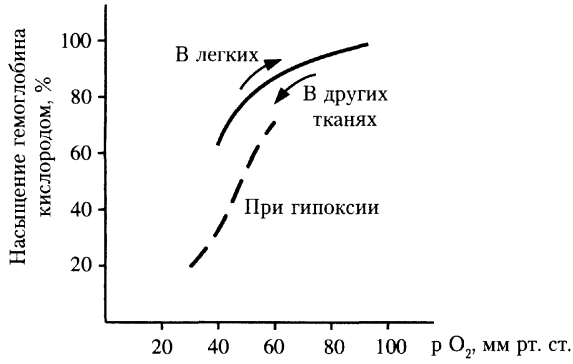


Рис. 21.11. Перенос кислорода в капиллярах легких, в других органах (включая неработающие мышцы) и при гипоксии

Перенос кислорода в капиллярах легких

В венозной крови, притекающей к легким, гемоглобин насыщен кислородом на 65 % (рис. 21.11). Значительная часть молекул гемоглобина протонирована, соединена с CO_2 и 2,3-БФГ, т. е. имеет пониженное сродство к кислороду.

Из капилляров легких в альвеолярный воздух диффундирует CO_2, и поэтому снижается концентрация протонов и их ингибирующее действие на гемоглобин:

$$H^+ + HCO^-_3 \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow CO_2 + H_2O;$$

$$H^+Hb \rightarrow H^+ + Hb.$$

Отщепляется также CO_2, соединенная с аминогруппами гемоглобина:

$$Hb{-}NH{-}COO^- + H^+ \rightarrow Hb{-}NH_2 + CO_2.$$

Поскольку парциальное давление кислорода в альвеолярном воздухе больше, чем в венозной крови, кислород диффундирует в кровь и соединяется с гемоглобином. В результате увеличивается количество оксигенированных молекул гемоглобина и снижается количество неоксигенированных. Последнее приводит к тому, что реакция гемоглобина с 2,3-БФГ идет в направлении освобождения гемоглобина:

$$Hb\text{-БФГ} \rightarrow Hb + \text{БФГ}.$$

По мере поступления кислорода в эритроцитах увеличивается содержание молекул гемоглобина, не полностью насыщенных кислородом — $Hb(O_2)_3$ и др.; эти молекулы имеют повышенное сродство к кислороду.

В результате всех указанных процессов реакции, приведенные на рис. 21.9, идут слева направо.

При физической нагрузке легочная вентиляция увеличивается пропорционально нагрузке. При этом в артериальной крови парциальное давление кислорода и углекислоты не изменяется; в венозной крови давление кислорода уменьшается, а углекислоты — увеличивается.

При подъеме на большие высоты или при нарушении легочной вентиляции вследствие болезней кровь в легких не полностью насыщается кислородом. Гипоксия тканей в таких ситуациях частично компенсируется тем, что увеличивается синтез БФГ: его концентрация в крови в течение одного–двух дней повышается вдвое. При этом насыщение крови кислородом в легких еще несколько снижается, но в большей мере увеличивается потребление кислорода тканями: БФГ сдвигает кривую диссоциации оксигемоглобина вправо. Перенос кислорода в капиллярах тканей при экзогенной или легочной гипоксии описывается нижним отрезком кривой диссоциации оксигемоглобина (см. рис. 21.11, пунктирная линия).

Монооксид углерода CO (угарный газ) связывается с гемоглобином, подобно кислороду, с образованием карбоксигемоглобина (HbCO):

$$Hb + CO = HbCO.$$

Сродство гемоглобина к CO в 200 с лишним раз больше, чем к O_2, поэтому даже при низкой концентрации угарного газа значительная часть гемоглобина превращается в карбоксигемоглобин и выключается из транспорта кислорода. Точнее говоря, в тетрамерной молекуле гемоглобина одни протомеры оказываются занятыми монооксидом углерода, другие — кислородом; в таких молекулах кислород удерживается прочнее, чем в молекулах, не содержащих CO, и освобождение кислорода в тканях затруднено. Таким образом, возникновение дефицита кислорода в тканях при отравлении угарным газом обусловлено как блокированием части гемов гемоглобина, так и нарушением функции свободных от CO гемов.

Транспорт диоксида углерода

Градиент парциального давления CO_2 между межклеточной жидкостью и артериальной кровью составляет около 10 мм рт. ст., т. е. значительно меньше, чем градиент концентраций O_2 (см. табл. 21.1). Однако скорость диффузии CO_2 примерно в 30 раз больше, чем O_2, поэтому переход CO_2 из межклеточной жидкости в кровь происходит быстро. Образующийся в тканях CO_2 поступает в кровь и в эритроцитах при действии карбангидразы превращается в H_2CO_3 (рис. 21.12). Далее H_2CO_3 диссоциирует с образованием протона и иона HCO^-_3; протоны присоединяются к гемоглобину и способствуют освобождению O_2 (см. выше). После этих изменений, происходящих в капиллярах тканей, эритроцит с венозной кровью попадает в капилляры легких, и здесь происходят процессы, обратные тем, которые протекают в тканях. Гемоглобин насыщается кислородом; присоединение кислорода увеличивает степень диссоциации некоторых кислотных групп белковой части гемогло-

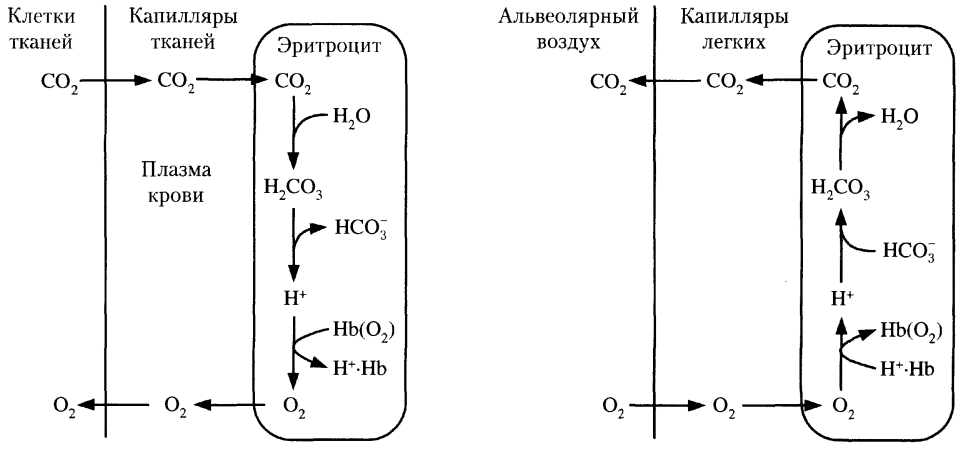


Рис. 21.12. Перенос диоксида углерода кровью

бина (т. е. повышается кислотность гемоглобина). Освобождающиеся протоны нейтрализуют HCO^-_3, угольная кислота расщепляется карбангидразой, образующийся CO_2 диффундирует в альвеолярный воздух.

Равновесие реакции

$$CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3 \rightleftarrows H^+ + HCO^-_3$$

сильно смещено влево. В капиллярах тканей повышение концентрации CO_2 и связывание H^+ гемоглобином смещают его вправо; в капиллярах легких освобождение H^+ из гемоглобина и удаление CO_2 смещают равновесие влево. Реакция $CO_2 + H_2O \leftrightarrows H_2CO_3$ протекает достаточно медленно; карбангидраза эритроцитов в высокой степени ускоряет достижение равновесия в этой реакции: это один из самых активных ферментов. Во время движения крови по артериям и венам скорость прямой и обратной реакций одинакова; в капиллярах тканей скорость образования H_2CO_3 больше, чем скорость ее распада на CO_2 и H_2O, а в капиллярах легких отношение обратное.

Изменение кислотности Hb при его оксигенировании в легких и снижение сродства гемоглобина к O_2 в присутствии CO_2 в тканях обусловлены конформационными перестройками молекулы гемоглобина при связывании лигандов (O_2 или H^+). Регуляция сродства гемоглобина к кислороду ионами водорода известна под названием эффекта Бора (К. Бор, датский физиолог, отец знаменитого Н. Бора). Как видно из изложенного, эффект Бора тесно связан с транспортом CO_2: можно сказать, что CO_2 вытесняет O_2 из гемоглобина в тканях, а в легких наоборот — O_2 вытесняет CO_2 из крови в альвеолярный воздух.

Примерно 80 % CO_2 из тканей переносятся в легкие в форме HCO^-_3; остальная часть транспортируется в форме растворенного в плазме CO_2, а также в форме карбгемоглобина — соединения CO_2 с N-концевыми аминогруппами гемоглобина (см. выше). Эритроцит проходит через капилляры легких меньше чем за секунду, а при интенсивной физической работе — вдвое быстрее и за это время освобождается от CO_2 и полностью оксигенируется.

ДЫХАТЕЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ pH ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ЖИДКОСТИ

Кроме того, что эффект Бора важен для снабжения тканей кислородом и удаления CO_2, он еще участвует и в стабилизации pH крови. Превращение CO_2 в угольную кислоту в капиллярах тканей могло бы изменить pH крови в кислую сторону, если бы протон не связывался с гемоглобином; наоборот, в капиллярах легких освобождение протона гемоглобином предотвращает подщелачивание. Буферные свойства гемоглобина создают примерно $^3/_4$ всей буферной емкости крови и наряду с буферными свойствами системы $[HCO^-_3]/[H_2CO_3]$, находящейся в равновесии с газообразным CO_2, поддерживают pH крови с высокой точностью.

В норме отношение $[HCO^-_3]/[H_2CO_3]$ в крови равно 20:1. При гипервентиляции легких (частое, усиленное дыхание) концентрация внеклеточной H_2CO_3 может снижаться, отношение $[HCO^-_3]/[H_2CO_3]$ увеличивается, и возникает дыхательный алкалоз. Наоборот, при гиповентиляции (например, при воспалении легких) отношение $[HCO^-_3]/[H_2CO_3]$ уменьшается, и возникает дыхательный ацидоз.

Дыхательный алкалоз наступает, если гипервентиляция происходит при исходно нормальном значении pH внеклеточной жидкости. Если же имеет место метаболический ацидоз (например, вследствие кетонемии), то возбуждается дыхательный центр, чувствительный к pH, усиливается дыхание, и ацидоз частично компенсируется. Однако главную роль в компенсации ацидоза играют почечные механизмы, которые описаны в гл. 15.

ПЛАЗМА КРОВИ

Плазма крови представляет собой примерно 10% водный раствор органических и минеральных веществ. Концентрация белков составляет около 7 %, минеральных солей — около 1 %; остальная часть приходится на различные небелковые органические соединения (табл. 21.2; содержание минеральных веществ в плазме крови — см. табл. 14.1).

Таблица 21.2. Некоторые небелковые органические соединения плазмы крови (диапазон концентраций у здоровых людей, мг/дл)

Вещество	Концентрация	Вещество	Концентрация
Мочевина	20–30	α-Кетоглутаровая кислота	0,2–0,1
Билирубин	0,2–1,4	Аскорбиновая кислота	1–2
Индикан	0,2–0,7	Янтарная кислота	0,1–0,6
Креатин	0,2–0,9	Триацилглицерины	50–200
Креатинин	1–2	Жирные кислоты	8–30
Мочевая кислота	2–6	Холестерин (неэтерифицированный)	40–70
Глюкоза	80–120		
Фруктоза	6–8	Эфиры холестерина	90–190
Молочная кислота	8-17	Фосфатидилхолины	100–200
Пировиноградная кислота	0,4–2,0	Фосфатидилэтаноламины	0–30
Ацетоуксусная кислота	0,8–2,8	Холевая кислота	0,5–1,5
Лимонная кислота	1,4–30		

Белки плазмы методом электрофореза в простых его вариантах разделяются на пять фракций: альбумины, α_1-глобулины, α_2-глобулины, β-глобулины и γ-глобулины (см. рис. 1.33). Каждая из этих фракций представляет собой смесь разных белков; методами с более высокой разрешающей способностью в плазме удается обнаружить около сотни разных белков. Если же выявлять белки не по окрашиванию разными красителями, как это обычно делается при электрофорезе белков, а по биологической активности, то разных белков обнаруживается еще больше. Вероятно, очень многие растворимые белки тканей могут в небольших количествах появляться в крови.

Наиболее однородна альбуминовая фракция плазмы крови: она почти целиком представлена одним белком — альбумином крови. Фракция γ-глобулинов содержит главным образом антитела (иммуноглобулины). Другие фракции гетерогенны.

Большинство белков, постоянно содержащихся в плазме, функции которых связаны именно с нахождением в крови, синтезируется в печени.

Альбумин

В печени человека ежедневно синтезируется 10–16 г альбумина. На долю альбумина приходится больше половины всех белков плазмы крови: его концентрация в плазме равна 40–50 г/дл. Важную функцию альбумина составляет участие в регуляции распределения воды между кровью и межклеточным пространством. Молекула альбумина содержит много дикарбоксильных аминокислот; в крови, которая имеет pH 7,4, отрицательный заряд альбумина равен 18. Благодаря этому в плазме крови удерживается много положительно заряженных ионов, главным образом Na^+, и таким способом создается значительная часть осмотического давления крови.

Альбумин из крови поступает в межклеточную жидкость, из которой по лимфатической системе вновь возвращается в кровь. Несколько больше половины общего количества альбумина находится в межклеточной жидкости, но его концентрация в плазме крови больше, поскольку объем крови примерно в 4 раза меньше объема межклеточной жидкости. При увеличении проницаемости капилляров альбумин в большем количестве выходит в межклеточную жидкость, и вклад, который он вносит в создание осмотического давления, уменьшается в крови и увеличивается в межклеточной жидкости. Поскольку осмотическое давление не может быть разным в разных частях тела, вместе с альбумином и компенсирующими его заряд ионами Na^+ из крови в межклеточное пространство уходит вода, изменяются относительные количества межклеточной жидкости и крови.

Если увеличение проницаемости капилляров имеет острый характер, т. е. наступает быстро, то объем крови резко уменьшается, кровяное давление падает; клинически это проявляется как шок. Шок — частое следствие тяжелых травм и ожогов.

При нарушениях кровообращения (болезни сердца, тромбозы, расширение вен) также усиливается выход альбумина в межклеточное пространство вследствие замедления тока крови. Поскольку в этих случаях события развиваются медленно, уменьшение объема крови компенсируется действием ренин-ангиотензин-альдостероновой системы восстановления объема крови. В частности, включение этой

системы вызывает жажду, однако потребляемая вода вновь уходит из крови в межклеточное пространство, что приводит к возникновению отеков.

Концентрация альбумина в крови может снижаться также вследствие его выделения с мочой при заболевании почек (альбуминурия). Печень человека синтезирует и выделяет в кровь 10–15 г альбумина в сутки. При некоторых болезнях печени (например, при циррозе) синтез альбумина нарушается. Для этих состояний тоже характерны отеки.

Другая важная функция альбумина — транспорт веществ. Альбумин способен присоединять многие гидрофобные вещества; в частности, в соединении с альбумином транспортируются жирные кислоты при мобилизации жиров жировой ткани, билирубин, некоторые гормоны.

СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ

Повреждение кровеносного сосуда вызывает каскад молекулярных процессов, в результате которых образуется сгусток крови — тромб, прекращающий вытекание крови. В этом процессе решающую роль играют тромбоциты и группа белков плазмы крови. В целом в остановке кровотечения выделяют три фазы. Первая фаза — сокращение кровеносного сосуда; понятно, при этом уменьшается скорость вытекания крови. Вторая фаза — агрегация тромбоцитов и образование тромбоцитарной пробки (белый тромб): в месте повреждения прикрепляются тромбоциты, к первому слою тромбоцитов прикрепляются второй, третий и т. д. слои, которые могут закупорить кровеносный сосуд, если он не слишком велик. Третья фаза — формирование фибринового тромба (красный тромб, поскольку он содержит эритроциты). Фибриновый сгусток образуется в результате превращения растворимого белка плазмы фибриногена в нерастворимый белок фибрин. Вторая и третья фазы обычно не разделены во времени, и фибрин откладывается между тромбоцитами по мере их агрегации. В этих отложениях оказываются замурованными и эритроциты, и таким образом формируется красный тромб.

Снижение способности крови свертываться ведет к повышению кровоточивости: опасные кровотечения и внутренние кровоизлияния могут быть даже при небольших ранах и ушибах (геморрагические состояния, гемофилии). Наоборот, при повышенной свертываемости крови могут образоваться внутрисосудистые тромбы, закупоривающие неповрежденные сосуды (тромботические состояния, тромбофилии).

В свертывании крови участвует около двух десятков белков плазмы и, по крайней мере, два интегральных белка клеточных мембран, а также ионы Ca^{2+} и фосфолипиды мембран клеток, в области которых образуется тромб. Свертываться может не только кровь в области раны, но и кровь в пробирке, и плазма крови, не содержащая форменных элементов. С меньшей скоростью происходит свертывание лимфы.

Большинство веществ (факторов), участвующих в свертывании, обозначают римскими цифрами (фактор I, фактор II и т. д.); они имеют также и тривиальные названия (табл. 21.3). Все белковые факторы свертывания, имеющиеся в плазме, синтезируются в печени и секретируются в кровь в форме неактивных предшественников. В крови они превращаются в активные факторы, которые обозначают той же римской цифрой с добавлением буквы «а» (IIa, Xa и т. д.).

Тканевой фактор (Тф) и тромбомодулин (Тм) не являются циркулирующими в крови белками: это — интегральные белки плазматической мембраны клеток. Тканевой фактор содержится во многих клетках, непосредственно не контактирующих с кровью; в тромбоцитах и эндотелиальных клетках тканевого фактора нет. Тромбомодулин обнаружен только в эндотелиальных клетках сосудов.

Таблица 21.3. Факторы, участвующие в свертывании крови

Цифровое обозначение и название фактора	Краткая характеристика
I, фибриноген	Растворимый белок, предшественник фибрина
II, протромбин	Профермент тромбина (фактора IIa)
Тканевой фактор (Тф)	Интегральный белок мембран некоторых клеток, кофактор фактора VIIa
IV, Ca^{2+}	Участвует во многих реакциях свертывания крови; декальцинированная кровь не свертывается
V, проакселерин	Предшественник фактора V', активирующего фактор Xa по аллостерическому механизму
VII, проконвертин	Профермент фактора VIIa
VIII, антигемофилический фактор	Предшественник фактора VIII', активирующего фактор IXa по аллостерическому механизму
IX, фактор Кристмаса	Профермент фактора IXa
X, фактор Стюарта	Профермент фактора Xa
XI	Профермент фактора XIa
XIII, предшественник трансглутаминазы	Профермент фактора XIIIa
Белок С	Профермент протеазы АС
Тромбомодулин (Тм)	Мембранный белок клеток эндотелия, рецептор тромбина (фактора IIa)

Образование и стабилизация фибринового сгустка

Непосредственно тромбообразовательным процессом является превращение растворимого белка плазмы фибриногена в нерастворимый фибрин. Это происходит в результате частичного протеолиза фибриногена при действии сериновой протеазы тромбина (фактора IIa).

Фибриноген — это крупный белок (молекулярная масса 340 000), построенный из трех пар пептидных цепей ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$), которые соединены дисульфидными связями. Молекулу фибриногена удобнее рассматривать как построенную из двух одинаковых частей — $(\alpha\beta\gamma)_2$, рис. 21.13). Три пептидные цепи каждой из половин в нескольких местах соединены дисульфидными связями и ориентированы параллельно, т. е. С-концами в одну сторону. Обе половины своими N-концевыми частями соединены друг с другом также дисульфидными связями. Пептидные цепи фибриногена имеют глобулярную конформацию в месте соединения двух половин (область N-концов) и в областях С-концов. В целом молекула имеет три глобулярных домена, разделенных двумя доменами, имеющими стержневидную форму.

Тромбин (фактор IIa) отщепляет от каждой из цепей небольшие N-концевые фрагменты А и В (фибринопептиды, около 3 % от общего числа аминокислот фибриногена); оставшаяся часть молекулы представляет собой фибрин, а точнее — мономер фибрина.

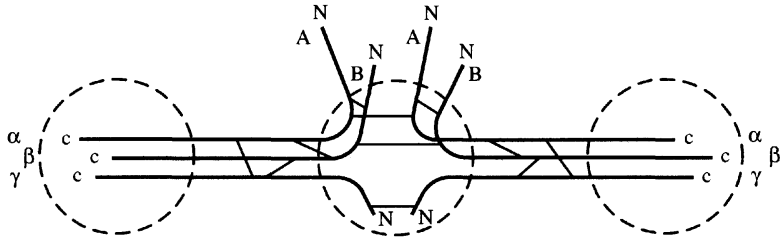


Рис. 21.13. Строение фибриногена:

толстые линии — пептидные цепи, тонкие линии — дисульфидные связи; *А* и *В* — N-концевые фрагменты, отщепляемые тромбином; пунктиром обозначены глобулярные домены

Молекулы мономера имеют удлиненную форму (длина примерно в 5 раз превышает толщину) и могут соединяться конец в конец и бок в бок за счет слабых связей. В результате образуются фибриллы с периодической структурой (рис. 21.14). Фибриноген к такой самосборке не способен по той причине, что имеющиеся в нем фрагменты А и Б содержат много остатков дикарбоксильных кислот, и это создает электростатическое сопротивление объединению молекул.

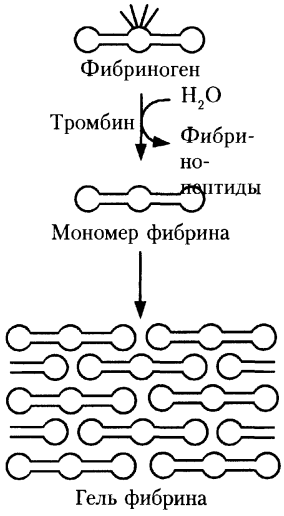


Рис. 21.14. Превращение фибриногена в гель фибрина

Фибриновые фибриллы соединяются друг с другом, образуя трехмерную решетку, в которую включены тромбоциты, а также и другие форменные элементы крови. Белок фибронектин, имеющийся в плазме крови и в межклеточном матриксе, тоже специфически соединяется с фибрином. Поскольку фибронектин взаимодействует и с другими молекулами межклеточного матрикса, фибриновый тромб оказывается прикрепленным к матриксу в области повреждения сосуда.

Свежеобразованный тромб, получающийся в результате самосборки, не отличается прочностью: фибриновый гель легко можно разрушить механическим воздействием. Однако после образования фибрина начинается новый химический процесс — стабилизация геля. Это происходит при действии фактора XIIIa (фермента трансглутаминазы, см. гл. 18): молекулы фибрина в геле соединяются друг с другом ковалентной связью. Трансглутаминаза образует ковалентные связи также между фибрином и фибронектином. В результате увеличивается прочность тромба и прочность его фиксации в месте повреждения. Через час или несколько большее время тромб сжимается (ретракция тромба). Ретракция является следствием сократительной способности тромбоцитов: усилия, создаваемые внутри клетки микрофиламентами, каким-то образом передаются на нити фибрина.

У людей с наследственными дефектами трансглутаминазы кровь свертывается так же, как у здоровых, однако тромб получается хрупкий, поэтому легко возникают вторичные кровотечения.

Прокоагулянтный путь

Кровотечение из капилляров и мелких сосудов останавливается уже при образовании тромбоцитной пробки. Для остановки кровотечения из более крупных сосудов необходимо быстрое образование прочного тромба, чтобы свести к минимуму потерю крови. Это достигается каскадом ферментных реакций с механизмами усиления на многих ступенях.

Свертывание крови должно быть локальным, должно происходить только в области повреждения сосуда и не распространяться на другие участки кровеносного русла. Это достигается тем, что активация ферментов происходит одновременно с их прикреплением к клеточным мембранам в месте повреждения сосуда. Кроме того, распространению тромбообразования препятствует противосвертывающая система (см. ниже).

Прокоагулянтный путь (рис. 21.15) занимает центральное место в свертывании крови. В циркулирующей крови содержатся проферменты протеолитических ферментов, секретируемые клетками печени: факторы VII, XI, IX, X и фактор II (протромбин). При повреждении сосуда включается каскадный механизм активации этих проферментов. В активации участвуют также циркулирующие в крови факторы VIII и V и мембранный белок Тф (тканевой фактор, фактор III): эти факторы выполняют роль кофакторов ферментов (активаторов). В ходе активации образу-

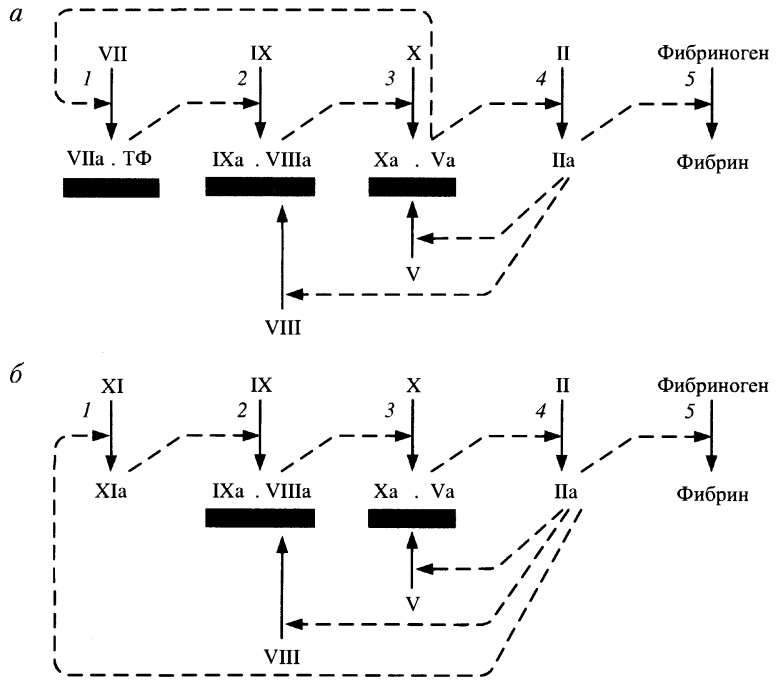


Рис. 21.15. Прокоагулянтный путь свертывания крови:

а — внешний путь свертывания крови; *б* — внутренний путь. Сплошные стрелки — превращения, пунктирные — катализ; вертикальной штриховкой отмечены ферментные комплексы, связанные с мембранами

ются связанные с мембранами комплексы, содержащие фермент и белок-активатор (см. рис. 21.15). Протромбин (фактор II) активируется комплексом Xa-Va, и тромбин (фактор IIa) катализирует образование фибрина.

Три механизма активации ферментов каскада

1. Частичный протеолиз. Все ферменты прокоагулянтного пути являются сериновыми протеазами, синтезируются в печени как неактивные проферменты и в такой форме секретируются и циркулируют в крови. При повреждении сосуда проферменты путем частичного протеолиза превращаются в ферменты. В качестве примера такой модификации рассмотрим образование тромбина (рис. 21.16). Протромбин (фактор II) содержит одну пептидную цепь, включающую около 580 аминокислотных остатков. В N-концевой части имеется несколько остатков карбоксиглутаминовой кислоты, в С-концевой половине — внутренняя дисульфидная связь. Пептидная цепь содержит две аминокислотные последовательности, узнаваемые фактором Xa. В области каждой из этих последовательностей фактор Xa гидролизует пептидную связь, образованную карбоксильной группой аргинина. В результате получаются три фрагмента. Два из этих фрагментов остаются соединенными друг с другом дисульфидной связью: это и есть тромбин.

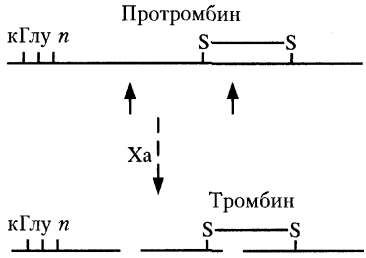


Рис. 21.16
Протеолитическая модификация протромбина:

КГлу — карбоксиглутаминовая кислота. Короткие стрелки указывают положение гидролизуемых пептидных связей

Неферментные белки — факторы VIIIa и Va — также образуются из предшественников (факторов VIII и V) путем частичного протеолиза: без такой модификации они не могут включаться в мембранные комплексы. Но тканевой фактор в протеолитической модификации не нуждается.

2. Взаимодействие с белками-активаторами. Тканевой фактор, фактор VIIIa и фактор Va имеют центры связывания ферментов VIIa, IXa и Xa соответственно. При связывании с белками-активаторами активность указанных ферментов увеличивается в результате конформационных изменений.
3. Взаимодействие с клеточными мембранами. Ферменты прокоагулянтного пути имеют необычную особенность первичной структуры — содержат γ-карбоксиглутаминовую кислоту. Эта аминокислота образуется из глутаминовой кислоты в результате посттрансляционной модификации (рис. 21.17). Превращение глутамильного остатка в карбоксиглутамильный катализируется карбоксилазой, коферментом которой служит витамин К. Радикалы карбоксиглутаминовой кислоты образуют центры связывания ионов Ca^{2+} на про-

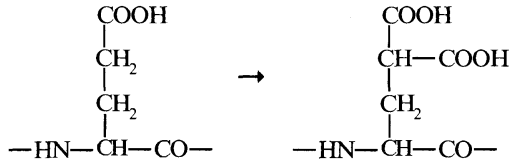


Рис. 21.17. Превращение глутамильного остатка в карбоксиглутамильный

тромбине (фактор II) и факторах VII, IX, X; посредством двухвалентных ионов Ca^{2+} эти ферменты могут соединяться кальциевыми мостиками с некоторыми фосфолипидами клеточных мембран, а также друг с другом и с белками-кофакторами, и в таких комплексах происходит активация указанных факторов (рис. 21.18). В отсутствие ионов Ca^{2+} кровь не свертывается. Ионы Ca^{2+} соединяются не с любыми фосфолипидами мембран, а преимущественно с фосфатидилсеринами, взаимодействуя с ионизированной (отрицательно заряженной) карбоксильной группой остатка серина. В норме фосфатидилсерины содержатся в основном во внутреннем слое фосфолипидного бислоя и почти отсутствуют в наружном слое. Таким образом, поверхность нормальной клетки почти не содержит центров связывания Ca^{2+} и поэтому не является тромбогенной. При повреждении мембран эта асимметрия нарушается, появляются участки и фрагменты мембран с фосфатидилсерином, контактирующим с плазмой крови и доступным для ионов Ca^{2+} — мембраны становятся тромбогенными. Таким образом, изменение мембран является одним из первых и обязательных событий при инициации тромбообразования.

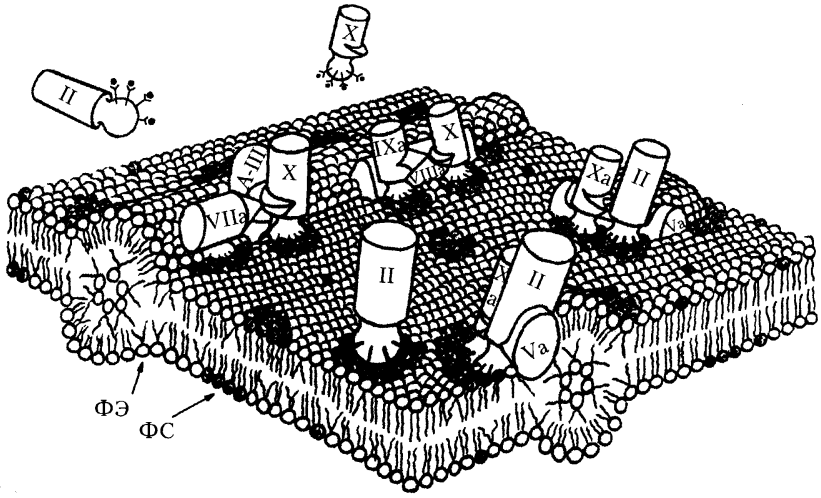


Рис. 21.18. Комплексы витамин К-зависимых факторов свертывания крови на клеточной мембране

Белки-кофакторы V и VIII также взаимодействуют с мембраной, но механизм взаимодействия несколько иной, поскольку они не содержат доменов кГлу: они со-

единяются с мембраной в основном ионными и гидрофобными связями. Третий белок-кофактор — тканевой фактор (Тф), представляет собой интегральный мембранный белок, необратимо связанный с клеткой посредством трансмембранного домена. Активация факторов происходит следующим образом. Неактивные проферменты и факторы V и VIII (предшественники кофакторов Va и VIIIa), содержащиеся в плазме крови, присоединяются к поврежденной мембране (см. рис. 21.18), и в результате латеральной диффузии и контактов происходит их активация. В конечном счете образуются активные комплексы трех типов — VIIa.Тф, IXa.VIIIa и Xa.Va; каждый из них включает мембрану, ионы Ca^{2+}, фермент и белок-кофактор (четверные комплексы). Активация фермента есть результат взаимодействия всех компонентов комплекса.

Инициация свертывания крови

В норме в сосудистом русле постоянно обнаруживаются небольшие (следовые) количества активированных факторов свертывания. Это обусловлено тем, что постоянно возникают физиологические микротравмы — эрозия эндотелия, старение и слущивание клеток, повреждение токсичными агентами среды и др. Таким образом, можно говорить, что в организме здорового человека происходит непрерывное свертывание крови. Однако этот процесс не приводит к образованию массивного плазменного тромба: интенсивность его мала и находится под контролем противосвертывающей и антикоагулянтной систем (см. ниже).

Ситуация изменяется при ранениях или других грубых повреждениях сосудов (например, в области атеросклеротической бляшки):

1) обнажается и вступает в контакт с плазмой крови тканевой фактор, который в норме содержится в основном в клетках, непосредственно не контактирующих с кровью; фактор VII, соединенный с Тф, активируется следовыми количествами фактора Xa (в меньшей мере другими факторами);
2) происходит массивное повреждение клеточных мембран — в мембранах и их фрагментах (мембранных пузырьках), в наружном слое липидного бислоя увеличивается содержание сериновых фосфолипидов, которые образуют места связывания для факторов свертывания крови.

В результате этих событий включается каскад реакций, представленных на рис. 21.15, *а*; его называют внешним путем свертывания, поскольку в нем участвует тканевой фактор, а он, в отличие от других факторов, не содержится в плазме крови, внешний. Реакции внешнего пути происходят в основном на мембранах клеток, содержащих Тф, и продолжаются недолго: скоро эти клетки оказываются изолированными от плазмы крови: их закрывают образующийся фибрин и налипающие тромбоциты (см. рис. 21. 19). Следовательно, в дальнейшем Тф уже не принимает участия в образовании тромба. Это — первая фаза тромбообразования, ее назначение — включить вторую (основную) фазу, в которой, собственно, и образуется тромб.

Включение второй фазы происходит в результате увеличения концентрации тромбина в первой фазе. Тромбин, образовавшись с участием мембранного комплекса Xa.Va из протромбина, освобождается в плазму крови, в отличие от других акти-

вированных факторов, которые остаются связанными с мембранами. Тромбин активирует фактор XI, и затем последовательно активируются другие факторы прокоагулянтного пути (см. рис. 21.15, *б*). Фактор XI не содержит остатков карбоксиглутаминовой кислоты, но обратимо связывается с мембранами тромбоцитов, около 1500 молекул на одну клетку; при нормальной концентрации фактора XI все центры связывания заняты. Фактор XI активируется как на мембранах, так и в плазме крови.

Таким образом, во внешнем пути свертывания участвуют мембраны клеток, содержащих Тф. В основной фазе (внутренний путь) в принципе могут использоваться поврежденные мембраны любых клеток, поскольку вторая фаза не нужда-

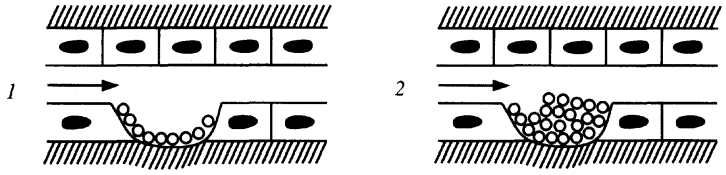


Рис. 21.19. Адгезия (*1*) и агрегация (*2*) тромбоцитов в месте повреждения сосуда

ется в тканевом факторе. Однако фактически активация факторов происходит преимущественно на мембранах тромбоцитов (рис. 21.19).

Тромбоциты выполняют важнейшие и многообразные функции при тромбообразовании. Тромбоцит содержит ряд рецепторов, взаимодействующих с некоторыми молекулами межклеточного матрикса. На раневой поверхности сосуда происходит налипание (адгезия) тромбоцитов и затем агрегация тромбоцитов — налипание на первый слой новых тромбоцитов; в результате образуется многослойная структура, составляющая основу тромба (см. рис. 21.19). Это сопровождается так называемой реакцией освобождения: тромбоциты выделяют множество веществ с разнообразными функциями, в том числе сужающих сосуд, стимулирующих адгезию и агрегацию, изменяющих форму тромбоцитов и структуру их мембран (мембраны становятся тромбогенными). В стимуляции адгезии и агрегации участвует также и тромбин. Мембраны тромбоцитов становятся главным местом действия прокоагулянтного пути и образования фибрина.

Циклические ферментные каскады в прокоагулянтном пути

До сих пор продолжается обсуждение вопроса о ступени, активация которой запускает механизм свертывания крови при ранениях сосудов. Традиционно прокоагулянтный путь изображается как линейная последовательность реакций с положительными обратными связями, как это представлено на рис. 21.15.

Положительная обратная связь от тромбина к фактору XI (к реакции 1 на рис. 21.15, *б*) — это реакция того же типа, что и другие («прямые») реакции каскада (реакции 2, 3 и 4 на рис. 21.15, *б*). Поэтому прокоагулянтный путь можно представить как циклический ферментный каскад (рис. 21.20). В принципе процесс может быть

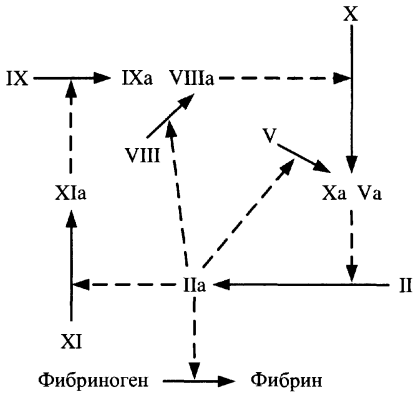


Рис. 21.20. Циклический ферментный каскад прокоагулянтного пути (основная фаза)

начат с активации любого из ферментов цикла: во всех случаях произойдет лавинообразное нарастание скорости процесса. Вероятно *in vivo* свертывание при повреждении сосуда и появлении тромбогенных мембран начинается с одновременной активации всех ферментов каскада, поскольку фактически речь идет не о начале нового процесса, а об усилении нормального постоянно текущего медленного процесса, уравновешенного противосвертывающей и антикоагулянтной системами.

Субстратная специфичность ферментов прокоагулянтного пути не настолько высока, чтобы обеспечить протекание реакций по единственному пути.

Например, комплексом Xa.Va активируется не только фактор II, но и сам фактор X. Некоторые факторы способны к аутоактивации. Обычно один из субстратов фермента системы свертывания крови является основным, а по отношению к другим возможным субстратам активность ниже. Однако при инициации свертывания роль дополнительных путей активации проферментов может быть заметной.

Тем не менее следует отметить, что тромбин, который обычно рассматривается как конечный продукт прокоагулянтного пути, может играть решающую роль именно в инициации тромбообразования, поскольку он активирует факторы V и VIII. Представляет интерес сопоставить это обстоятельство с тем, что выключение процесса тромбообразования происходит путем инактивации именно факторов V и VIII при содействии того же тромбина (антикоагулянтный путь, см. ниже).

По результатам действия циклический ферментный каскад сходен с реакциями аутоактивации, такими, как аутоактивация трипсина в двенадцатиперстной кишке (см. гл. 11): при каждом обороте цикла удваивается содержание тромбина, а также и других активированных факторов. Иначе говоря, происходит амплификация каскада в геометрической прогрессии. При этом аутоактивация не нуждается в повторении первичного стимула, вызвавшего процесс. Предел нарастанию скорости амплификации цикла кладут наличие тромбогенных мембран и доступность субстратов (т. е. неактивированных факторов свертывания).

В области растущего тромба ферменты каскада очень скоро устраняются из сферы реакции. Это происходит тремя путями. Во-первых, фрагменты мембран с ферментами каскада и растворенные в плазме тромбин и фактор XIa частично уносятся током крови и уничтожаются противосвертывающей системой. Во-вторых, значительные потери ферментов связаны с тем, что главным местом действия прокоагулянтного пути второй фазы служат тромбогенные мембраны тромбоцитов. На них формируются ферментные комплексы каскада и происходит образование фибрина. При этом каждый ферментный комплекс функционирует лишь короткое время: при образовании нового слоя тромбоцитов ферменты предшествующего слоя оказываются отделенными от плазмы крови. В-третьих, очень скоро после начала тромбообразования начинается фибринолиз, разрушение тромба

(см. ниже), и этот процесс компенсируется соответствующей скоростью тромба. Непрерывная убыль ферментов требует образования новых ферментных комплексов, что обеспечивается действием циклического каскада.

Фибринолиз

Фибринолизом называют разрушение фибрина протеолитическим ферментом плазмином. Плазмин гидролизует в фибрине пептидные связи, образованные остатками аргинина и триптофана, причем образуются растворимые пептиды (рис. 21.21). В циркулирующей крови находится предшественник плазмина — плазминоген. Он активируется путем частичного протеолиза специфическими ферментами — активаторами плазминогена (тканевой и урокиназный активато-

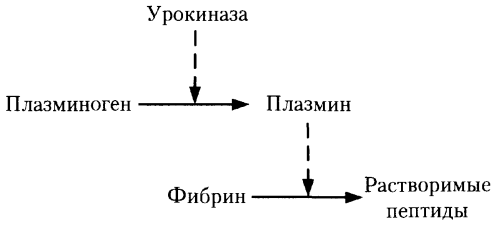


Рис. 21.21. Фибринолиз

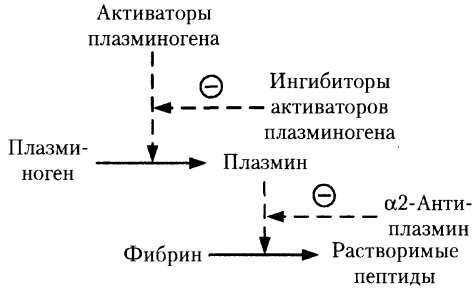


Рис. 21.22. Регуляция фибринолиза

ры). Действие активаторов регулируется белками — ингибиторами активаторов плазминогена (рис. 21.22).

Во время образования тромба плазминоген и его активаторы адсорбируются фибрином и фиксируются в тромбе; постепенно происходит активация плазминогена, и образующийся плазмин гидролизует фибрин тромба. Плазмин может активироваться и в циркулирующей крови, без повреждения сосудов: здесь он выполняет роль одного из факторов противосвертывающей системы (см. ниже). Но в плазме крови плазмин быстро инактивируется белковым ингибитором α_2-антиплазмином, в то время как внутри тромба он защищен от действия ингибитора.

Фибринолиз начинается вскоре после начала свертывания. Его основное назначение в этой стадии свертывания — предотвратить перекрывание сосуда тромбом: фибринолитическая система освобождает просвет кровеносного сосуда от отложений фибрина.

При ранении наряду со свертыванием крови включаются механизмы заживления раны (см. гл. 18). В этом случае роль фибринолиза заключается в удалении фибрина в местах пролиферации и миграции клеток. По мере заживления раны тромб в течение нескольких дней после образования полностью рассасывается.

Недостаточность фибринолитической системы проявляется разными формами тромбофилии.

Урокиназа — эффективное средство для растворения тромбов или предупреждения их образования при тромбофлебитах, тромбоэмболии легочных сосудов, инфаркте миокарда, массивных хирургических вмешательствах. До недавнего

времени урокиназу получали из мочи человека, поэтому она была малодоступна; сейчас используют рекомбинантные препараты. С этой же целью применяют рекомбинантный тканевой активатор плазминогена.

Избыточная активность фибринолитической системы связана с риском гемофилии. Для лечения этих форм гемофилии применяют синтетические ингибиторы плазмина — ε-аминокапроновую кислоту, парааминобензойную кислоту.

Противосвертывающая система. При развитии системы свертывания крови в ходе эволюции решались две противоположные задачи: предотвращать вытекание крови при повреждении сосудов путем образования тромба, но сохранять кровь в жидком состоянии в неповрежденных сосудах. Вторая задача решается противосвертывающей системой, основными звеньями которой служат механизм антитромбин/гепарин и антикоагулянтный путь.

Антитромбин/гепарин. Белок плазмы антитромбин ингибирует тромбин, а также ряд других ферментов, участвующих в свертывании крови. Гепарин усиливает ингибирующее действие антитромбина: присоединение гепарина индуцирует конформационные изменения, которые повышают сродство ингибитора к тромбину и другим факторам. Однако после соединения этого комплекса с тромбином гепарин освобождается и может присоединяться к другим молекулам антитромбина. Таким образом, каждая молекула гепарина может активировать большое

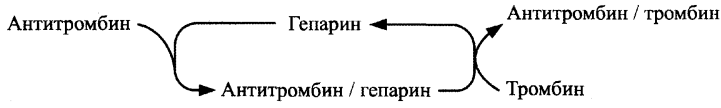


Рис. 21.23. Действие механизма антитромбин/гепарин

количество молекул антитромбина; в этом отношении действие гепарина сходно с действием катализаторов (рис. 21.23).

Антитромбин не действует на факторы, находящиеся в составе комплексов с фосфолипидами, а только на те, которые находятся в плазме в растворенном состоянии. Следовательно, он нужен не для регуляции образования тромба, а для устранения ферментов, попадающих в кровоток из места образования тромба, и таким путем он предотвращает распространение свертывания крови на неповрежденные участки кровеносного русла.

Гепарин применяют как антикоагулянт при лечении тромботических состояний.

Известен генетический дефект, при котором концентрация антитромбина в крови вдвое меньше, чем в норме; у таких людей часто наблюдаются тромбозы.

Антитромбин — главный компонент противосвертывающей системы: примерно $^3/_4$ всего тромбина удаляется этим ингибитором. Однако в плазме крови имеются и другие ингибиторы протеиназ, которые также могут уменьшать вероятность внутрисосудистого свертывания крови. Отметим один из них — α_2-макроглобулин. Это крупный белок с молекулярной массой 720 000, построенный из четырех идентичных субъединиц. Он ингибирует многие протеиназы, и не только те, которые участвуют в свертывании крови. Интересен механизм действия

α_2-макроглобулина. Он содержит участки пептидной цепи, которые являются субстратами для многих протеиназ; протеиназы присоединяются к этой «приманке», гидролизуют в ней некоторые пептидные связи, в результате чего изменяется конформация α_2-макроглобулина, и он захватывает фермент, подобно капкану. Для этого ингибитор должен иметь большие размеры. Фермент при этом не повреждается: в комплексе с ингибитором он способен гидролизовать низкомолекулярные пептиды, но для крупных молекул активный центр фермента недоступен. Комплекс α_2-макроглобулина с ферментом быстро удаляется из крови: время его полужизни в крови — около 10 мин.

При массивном поступлении в кровоток активированных факторов свертывания крови мощность противосвертывающей системы может оказаться недостаточной, появляется опасность тромбозов. Такая ситуация возникает, в частности, при обширных травмах и больших хирургических операциях.

Антикоагулянтный путь

Антикоагулянтный путь представляет собой короткий каскад реакций, в котором участвуют тромбин (IIa), тромбомодулин (Тм), белок С и факторы Va и VIIIa (рис.

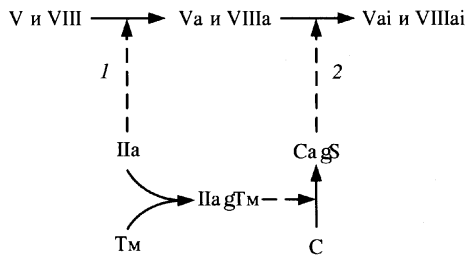


Рис. 21.24. Антикоагулянтный путь:

1 — активация факторов V и VIII в прокоагулянтном пути; *2* — инактивация факторов Va и VIIIa в антикоагулянтном пути

21.24). В результате этого каскада инактивируются факторы Va и VIIIa, необходимые для прокоагулянтного пути.

Тромбомодулин — это интегральный белок плазматической мембраны, подобно тканевому фактору, но, в отличие от тканевого фактора, обнаруживается только в эндотелиальных клетках, т. е. контактирует с кровью, в то время как тканевой фактор содержится в основном в более глубоко расположенных клетках и контактирует с кровью только при повреждении тканей. Тромбомодулин не нуждается в протеолитической активации и служит рецептором тромбина (образуется комплекс IIa·Тм).

Белок С — профермент, содержит домен кГлу, синтезируется в основном в печени и секретируется в кровь. Белок С активируется путем частичного протеолиза комплексом IIa:Тм на мембранах эндотелия. Белок S синтезируется и секретируется гепатоцитами, тоже содержит домен кГлу. Фермент Ca (активированный С) образует с белком S мембранно-связанный комплекс Ca·S, который расщепляет в

факторах Va и VIIIa некоторые пептидные связи, инактивируя эти факторы, и тем самым тормозит прокоагулянтный путь.

Антикоагулянтный путь, в частности, предотвращает распространение тромбообразования за пределы поврежденной области сосуда. На границе между растущим тромбом (уже закрывшим поврежденный участок сосуда) и нормальной поверхностью сосуда тромбин контактирует с неповрежденным эндотелием, взаимодействует с тромбомодулином эндотелиальных клеток и включает механизм инактивации факторов Va и VIIIa. А это означает выключение цикла аутоактивации в целом, в том числе прекращение образования и самого тромбина. Таким путем останавливается рост тромба в сторону неповрежденных областей сосуда.

Таким образом, тромбин в зависмости от условий выполняет противоположные функции: в растущем тромбе он активирует факторы V и VIII и тем самым обеспечивает действие цикла аутоактивации, а после закрытия повреждения тромбом он (тромбин) через антикоагулянтный путь инактивирует факторы Va и VIIIa и тем самым выключает цикл аутоактивации.

При дефектах антикоагулянтной системы, например при наследовании мутантных факторов V и VIII, активные формы которых (Va и VIIIa) не подвержены действию протеазы С, вероятность нарастания тромба далеко в пределы неповрежденного сосуда повышена.

Многообразные и противоположные (как прокоагулянтные, так и антикоагулянтные) функции тромбина

Не будет лишним резюмировать тему об исключительной роли тромбина в регуляции тромбогенеза. Тромбин выполняет следующие функции:

1) участвует в одном из звеньев цикла аутоактивации (прокоагулянтный путь), в котором активирует факторы XI, V и VIII;
2) активирует адгезию и агрегацию тромбоцитов;
3) катализирует образование фибрина, а также стабилизацию фибринового геля (через посредство фактора XIII), т. е. служит эффекторным звеном всего каскада свертывания крови;
4) инактивирует ингибитор активатора плазминогена-1 (ПАИ-1), а следовательно, ускоряет фибринолиз, т. е. разрушает фибрин (который сам же и создал);
5) активирует белок С антикоагулянтного пути, который, в свою очередь, инактивирует факторы Va и VIIIa (активированные самим же тромбином). Тем самым тромбин выключает прокоагулянтный путь и свое собственное образование из протромбина.

Витамин К

Превращение глутамильного остатка факторов II, VII, IX, X и белков С и S в γ-карбоксиглутамильный катализируется ферментом, коферментом которого служит витамин К (рис. 21.25). Недостаточность витамина К возникает редко: он содержится во многих пищевых продуктах, а кроме того, синтезируется кишечной флорой. Поскольку это жирорастворимый витамин, возникновение гиповитаминоза

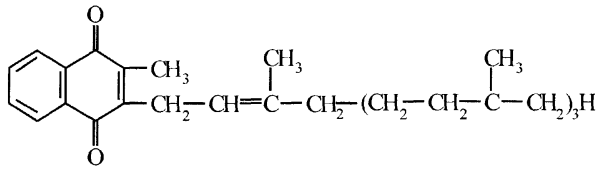


Рис. 21.25. Витамин K_1 (2-метил-3-фитил-1,4-нафтохинон)

обычно связано с нарушением всасывания жиров, например, при закупорке желчных протоков.

Гиповитаминоз, вызванный в эксперименте у животных, проявляется повышенной кровоточивостью, подкожными и внутренними кровоизлияниями. Это связано с тем, что в отсутствие витамина К образуются факторы II, VII, IX, X, C и S (витамин К-зависимые факторы), не содержащие γ-карбоксиглутамильных остатков: такие проферменты не могут превращаться в активные ферменты.

Структурный аналог витамина К дикумарол ингибирует фермент, превращающий глутамильные остатки в γ-карбоксиглутамильные: введение дикумарола вызывает такие же последствия, как и недостаточность витамина К.

Белки свертывания крови достаточно быстро обновляются. Для многих из них время полужизни составляет 2–5 дней. После введения дикумарола вновь синтезируемые витамин К-зависимые факторы не содержат γ-карбоксиглутамильных остатков, и постепенно нормальные факторы заменяются дефектными, свертываемость крови снижается. Дикумарол применяют для предупреждения тромбозов при повышенной свертываемости крови; его действие начинает проявляться примерно через день после введения.

Гемофилии А и В

Наиболее часто встречается гемофилия, вызванная недостаточностью фактора VIII — гемофилия А. Ген фактора VIII локализован в Х-хромосоме; повреждение этого гена проявляется как рецессивный признак, поэтому у женщин, в геноме которых две Х-хромосомы, гемофилии А не бывает. У мужчин, имеющих одну Х-хромосому, наследование дефектного гена приводит к гемофилии. Известно около 150 мутаций гена фактора VIII; примерно $^2/_3$ из них связаны с тяжелой и средней формами гемофилии. Признаки болезни обычно обнаруживаются в раннем детстве: при малейшем порезе, ушибе, выпадении молочных зубов, а то и спонтанно возникают кровотечения и кровоизлияния; характерны для гемофилии внутрисуставные кровоизлияния. Частая потеря крови приводит к развитию железодефицитной анемии. Для остановки кровотечения при гемофилии вводят свежую донорскую кровь, содержащую фактор VIII, или препараты фактора VIII.

Гемофилия В обусловлена мутациями гена фактора IX, который, как и ген фактора VIII, локализован в половой хромосоме; мутации рецессивны, следовательно, гемофилия В бывает только у мужчин. Количество известных мутаций приближается к тысяче. Гемофилия В встречается примерно в 5 раз реже, чем гемофилия А. Лечат гемофилию В введением препаратов фактора IX.

Глава 22

мышцы

Мышцы составляют около половины массы тела человека. Функция мышц заключается в развитии напряжения и укорочения, в результате чего обеспечивается подвижность организма или сопротивление механической силе (статические нагрузки). В организме человека различают три основных типа мышц: поперечнополосатые скелетные мышцы, сокращающиеся произвольно; поперечнополосатая сердечная мышца, сокращающаяся непроизвольно; гладкие мышцы, сокращающиеся также непроизвольно. Сокращение мышцы происходит за счет энергии АТФ и вызывается нервным импульсом.

Мышца состоит из отдельных волокон, которые представляют собой мышечные клетки. Толщина мышечной клетки равна 10–100 мкм, а длина может быть равна длине мышцы; клетки портняжной мышцы человека достигают длины 12 см. Клетка окружена плазматической мембраной (сарколеммой); в цитоплазме находятся многочисленные ядра (100–200), примыкающие к сарколемме, митохондрии и другие обычные для клеток органеллы. В эмбриогенезе каждая мышечная клетка образуется путем слияния множества клеток-предшественников. В мышечной клетке имеются миофибриллы — особым образом организованные пучки белков, располагающиеся вдоль клетки. Миофибриллы, в свою очередь, построены из белковых нитей (филаментов) двух типов — толстых и тонких. Основным белком толстых нитей является миозин, а тонких — актин. Миозиновые и актиновые нити — главный компонент всех сократительных систем.

Электронно-микроскопическое изучение поперечных и продольных срезов мышц обнаружило строго упорядоченное расположение миозиновых и актиновых нитей в миофибрилле (рис. 22.1). Функциональной единицей миофибриллы является саркомер — участок миофибриллы (длиной 2,5 мкм) между двумя Z-пластинками. Саркомер включает пучок миозиновых нитей, серединой прикрепленных к М-пластинке (М-линия), и пучки актиновых нитей, прикрепленных к Z-пластинкам. Многие сотни саркомеров образуют миофибриллу.

Чередование в миофибрилле участков, содержащих толстые нити, с участками, содержащими тонкие нити (А-диски и I-диски), создает поперечную полосатость мышц. На электронно-микроскопических фотографиях сокращенной мышцы

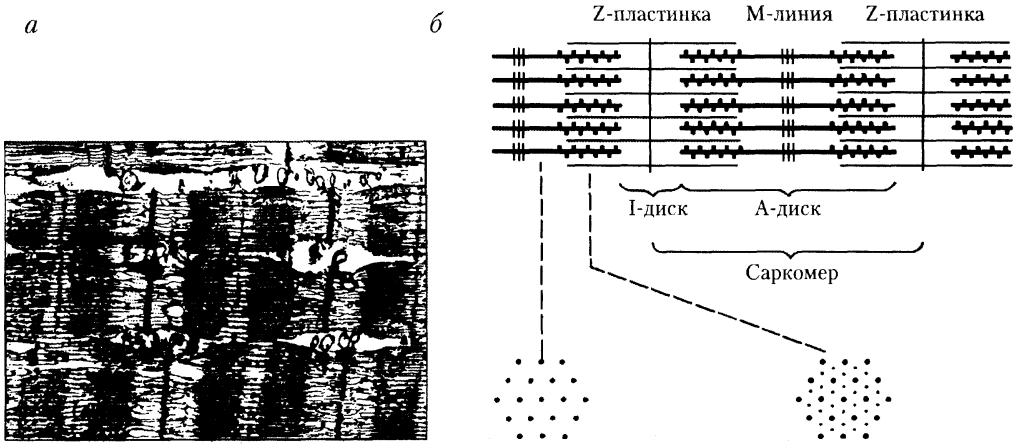


Рис. 22.1. Строение мышечного волокна:

а — электронная микрофотография; *б* — схема строения саркомера (вверху — продольный срез, внизу — поперечные срезы)

видно, что диски I почти исчезают, концы толстых нитей приближаются к Z-пластинкам, а тонких нитей — к М-линии. Это означает, что сокращение происходит путем скольжения тонких и толстых нитей навстречу друг другу. При сокращении саркомер укорачивается на 25–50 %.

Саркоплазма, вмещающая миофибриллы, пронизана между ними сетью цистерн и трубочек эндоплазматического (саркоплазматического) ретикулума, а также системой поперечных трубочек, которые тесно контактируют с саркоплазматическим ретикулумом, но не сообщаются с ним (рис. 22.2).

Основные вопросы, на которые биохимики издавна искали ответы, заключаются в следующем: каков молекулярный механизм укорочения мышцы; как энергия АТФ трансформируется в механическую энергию; каким образом нервный импульс, т. е. электрический потенциал мембраны нервного волокна, включает процесс сокращения мышцы.

Изучение биохимии мышц важно для понимания молекулярных механизмов болезней, поражающих мышцы (мышечные дистрофии, изменения при гиподинамии), а также для выбора эффективных методов тренировки спортсменов и людей, профессия которых требует хорошей физической подготовки.

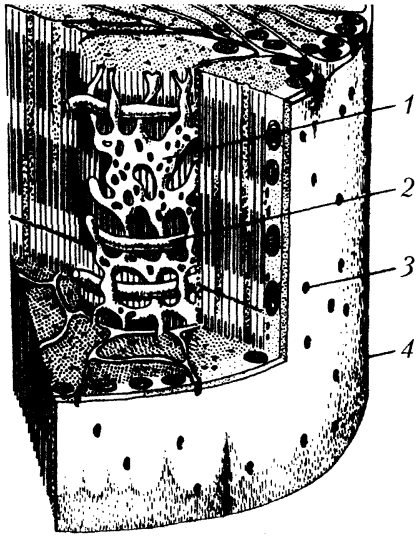


Рис. 22.2. Поперечные трубки и саркоплазматический ретикулум мышечного волокна:

1 — саркоплазматический ретикулум, оплетающий миофибриллу; *2* — Т-трубки; *3* — устье Т-трубки; *4* — сарколемма

СТРОЕНИЕ МИОЗИНОВЫХ НИТЕЙ

Миозиновые нити образованы белком миозином, строение которого показано на рис. 22.3. Миозин составляет почти половину всех белков скелетной мышцы. Молекула миозина содержит две идентичные тяжелые полипептидные цепи (молекулярная масса каждой 200 000) и четыре легкие цепи (молекулярная масса около 20 000). Каждая тяжелая цепь на большой части длины с С-конца имеет конформацию α-спирали, и обе спирали скручены друг с другом; эта часть молекулы имеет форму палочки. Противоположные концы каждой цепи (N-концы) имеют глобулярную форму, образуя «головки» молекулы. К каждой из головок нековалентно присоединены по две легкие цепи.

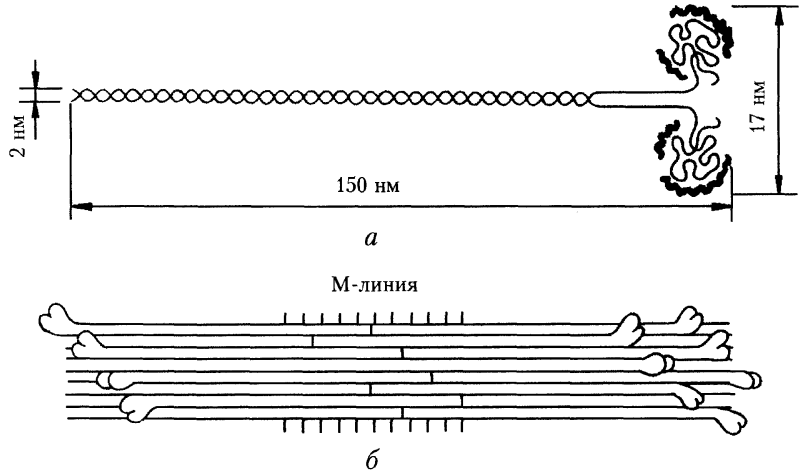


Рис. 22.3. Строение миозина (*а*) и миозиновой нити саркомера (*б*)

Миозин катализирует гидролиз АТФ; это было установлено Энгельгардтом и Любимовой в 1939 г. Энергия гидролиза используется для сокращения мышцы. Значительно позднее выяснилось, что каталитический активный центр локализован в головках молекулы миозина. Открытие АТФазной активности миозина в высокой степени стимулировало исследования мышечного сокращения, поскольку было первым прямым указанием на источник энергии для сокращения и на роль миозина в использовании этой энергии.

Палочкообразные хвосты молекул миозина могут соединяться друг с другом продольно, образуя пучки; головки выступают на поверхности пучка, выстраиваясь вокруг него по спирали. В области М-линии пучки стыкуются «хвост к хвосту» (рис. 22.3, *б*). Так получаются миозиновые нити саркомера, каждая из которых содержит около 400 молекул миозина.

СТРОЕНИЕ АКТИНОВЫХ НИТЕЙ

В состав актиновых нитей входят белки актин, тропомиозин и тропонин. Основу нитей составляют молекулы актина. Актин — это глобулярный белок с молекулярной

массой 43 000 и шарообразными молекулами диаметром около 5 нм; такая форма актина называется G-актин (глобулярный актин). G-актин содержится и во многих немышечных клетках.

Молекулы G-актина могут нековалентно соединяться, образуя фибриллярный актин — F-актин. Форма молекул F-актина напоминает две нитки бус, скрученные друг с другом (рис. 22.4). В мышечных клетках весь актин находится в форме F-актина.

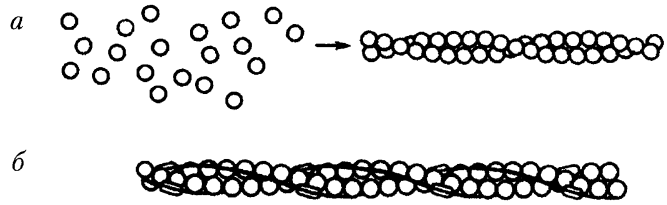


Рис. 22.4. Строение G-актина и F-актина (*а*) и актиновой нити саркомера (*б*)

К F-актину могут присоединяться головки миозина, причем на каждой молекуле G-актина в F-актине есть центр связывания миозина. В результате такого взаимодействия в сотни раз увеличивается АТФазная активность миозина. Соединение F-актина с миозином называют актомиозином. Образование связей между миозиновыми и актиновыми нитями в саркомере имеет важное значение в процессе сокращения мышцы.

Молекулы другого белка актиновых нитей — тропомиозина — имеют форму палочек длиной 40 нм. Они располагаются вблизи желобков спиральной ленты F-актина, вдоль нее, причем каждая молекула тропомиозина соединена с семью молекулами G-актина, а концами примыкает к соседним молекулам тропомиозина (рис. 22.4, *б*).

Третий белок актиновых нитей — тропонин — имеет глобулярную форму; он построен из трех разных субъединиц. Тропонин нековалентно связан с тропомиозином и с актином; на каждую молекулу тропомиозина приходится одна молекула тропонина. Одна из субъединиц тропонина содержит Са-связывающие центры: эта субъединица по строению сходна с кальмодулином.

Тонкие нити прикреплены к Z-пластинкам, которые тоже представляют собой белковые структуры. Содержание миозина, актина, тропомиозина и тропонина в миофибриллах равно примерно 55, 25, 15 и 5 % соответственно.

Белки миофибрилл можно выделять из мышц и изучать в чистом виде. Из них *in vitro* удается получать миозиновые и актиновые нити. Миозиновые и актиновые нити можно также выделить из мышечной ткани после осторожного разрушения клеточных мембран и миофибрилл. Можно получать также актомиозиновые комплексы, которые, как мы уже отмечали, образуются в результате присоединения головок миозина к молекулам G-актина в актиновых нитях (поперечные мостики). Актомиозиновые волокна *in vitro* при определенных условиях могут сокращаться. Использование таких отдельных систем оказалось чрезвычайно полезным для изучения механизма мышечного сокращения.

МЕХАНИЗМ СОКРАЩЕНИЯ МЫШЦЫ

Сокращение мышц есть результат укорочения каждого ее саркомера. Укорочение саркомера происходит путем вдвигания актиновых нитей между миозиновыми нитями в направлении М-линии; максимальное укорочение достигается тогда, когда Z-пластинки, к которым прикреплены актиновые нити, приближаются вплотную к концам миозиновых нитей (рис. 22.5). Движение актиновых нитей, в свою очередь, есть результат взаимодействия четырех основных белков миофибрилл — миозина, актина, тропомиозина и тропонина. Сокращение саркомера сопровождается гидролизом АТФ и регулируется ионами кальция.

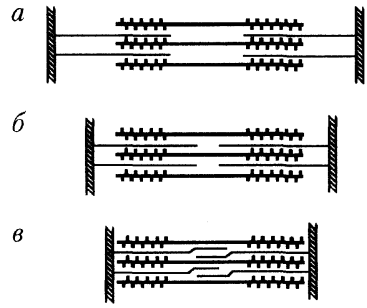


Рис. 22.5. Сокращение саркомера: *а* — состояние покоя; *б* — умеренное сокращение; *в* — предельное сокращение

Разделение функций между миозиновыми и актиновыми нитями при сокращении можно представить следующим образом. Миозиновые нити содержат активный центр для гидролиза АТФ, устройство для превращения энергии АТФ в механическую тягу, устройство для сцепления с актиновыми нитями и устройство для восприятия регуляторных сигналов со стороны актиновых нитей. Актиновые нити имеют механизм сцепления с миозиновыми нитями и механизмы регуляции сокращения и расслабления.

Модель сокращения саркомера представлена на рис. 22.6. АТФазные центры головок миозина отличаются высоким сродством к АТФ, так что в мышце большинство головок содержит связанный АТФ. В присутствии ионов Ca^{2+} на мономерах актиновой нити открываются центры связывания миозиновых головок. Это происходит в результате присоединения Ca^{2+} к Са-связывающей субъединице тропонина (рис. 22.6, *а*).

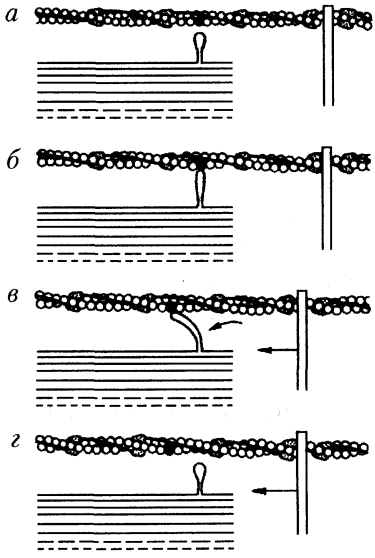


Рис. 22.6. Механизм укорочения саркомера

Ионы Ca^{2+} вызывают конформационные изменения во всей системе тропонин-тропомиозин-актин, включающей по одной молекуле тропонина и тропомиозина и семь молекул G-актина: на всех семи мономерах актина открываются центры связывания с головками миозина. Миозиновая головка присоединяется к одному из мономеров актина (ближайшему), и таким путем происходит сцепление актиновых и миозиновых нитей (состояние *б* на рис. 22.6).

Присоединение головки к актину активирует АТФазный центр, АТФ гидролизуется, АДФ и фосфат покидают активный центр, что приводит к изменению конформации миозина: возникает напряжение, стремящееся уменьшить угол α между головкой и хвостом молекулы миозина, т. е. наклонить головку в направлении М-линии. Поскольку головка прикреплена к актиновой нити, она, наклоняясь в сторону М-линии, смещает в этом же направлении и актиновую нить (состояние *в* на рис. 22.6). Теперь АТФазный центр может присоединить новую молекулу АТФ; ее присоединение уменьшает сродство миозиновой головки к актину, миозин возвращается в исходное состояние, и начинается новый цикл взаимодействия с актином. В новом цикле та же самая головка присоединяется уже к другому мономеру актина, расположенному ближе к Z-пластинке, поскольку вся актиновая нить переместилась (состояние *г* на рис. 22.6).

Сотни миозиновых головок каждой миозиновой нити работают одновременно (но не синхронно), втягивая актиновую нить. Предельное сокращение мышцы развивается в сотые доли секунды (порядка 0,02 с). Сила сокращения зависит от количества миозиновых головок, включенных в работу.

Покоящаяся мышца эластична, легко растягивается. Сокращенная мышца, наоборот, неэластична, ригидна; растяжению препятствуют связи между актиновыми и миозиновыми нитями.

Ригидность возникает также при сильном снижении концентрации АТФ в мышцах: в этих условиях все большее и большее число миозиновых головок остается связанным с актином в состоянии *в* (рис. 22.6), так как для выхода из этого состояния требуется АТФ.

Такая ригидность может возникать, например, при сильной гипоксии. Окоченение трупа также обусловлено образованием связей между актиновыми и миозиновыми нитями вследствие исчезновения АТФ.

ВКЛЮЧЕНИЕ СОКРАЩЕНИЯ МЫШЦЫ

Сокращение мышцы включается потенциалом действия нервного волокна, который через нервно-мышечный синапс при посредстве медиатора трансформируется в потенциал действия сарколеммы и трубочек Т-системы. Ответвления трубочек окружают каждую миофибриллу, а также контактируют с цистернами саркоплазматического ретикулума (см. рис. 22.2). В цистернах в значительной концентрации содержится кальций, часть которого хранится в соединении со специальным Са-связывающим белком секвестрином. Потенциал действия, поступающий по трубочкам, вызывает освобождение ионов Ca^{2+} из цистерн саркоплазматического ретикулума. В покоящихся мышцах концентрация кальция в цитозоле клеток несколько меньше 10^{-7} моль/л; при возбуждении она увеличивается примерно до 10^{-5} моль/л. При такой концентрации молекулы тропонина насыщаются ионами Ca^{2+}, и включается сокращение.

В мембране саркоплазматического ретикулума имеется Са-АТФаза, которая составляет преобладающий интегральный белок этих мембран (около 90 % от всех белков). При повышении концентрации Ca^{2+} в цитозоле Са-АТФаза начинает перекачивать его обратно в полость ретикулума. Если с нерва не поступает новый

импульс, вызывающий выход Ca^{2+} из цистерн ретикулума, то скоро его концентрация в цитозоле снижается до 10^{-7} моль/л, и мышца расслабляется.

СОКРАЩЕНИЕ ГЛАДКИХ МЫШЦ

Изгнание плода из матки, приступ астмы, спазм коронарных артерий — все это результат сокращения гладких мышц. Гладкие мышцы составляют основную часть стенки матки, дыхательных путей, кровеносных сосудов, желудка, желчного пузыря, кишечника.

Повышение и снижение концентрации Ca^{2+} в цитозоле клетки и зависимое от АТФ взаимодействие актиновых и миозиновых волокон с последующим перемещением их относительно друг друга — основные механизмы сокращения и расслабления как в поперечнополосатых, так и в гладких мышцах. Но в поперечнополосатых мышцах кальций активирует сокращение, соединяясь с тропонином, который входит в состав тонких мышечных волокон, в то время как в гладких мышцах Ca^{2+} соединяется с кальмодулином. Комплекс Ca^{2+}-кальмодулин активирует киназу легких цепей миозина (ЛЦМК, рис. 22.7). Фосфорилирование этих цепей придает миозиновым фибриллам способность взаимодействовать с актином, который акти-

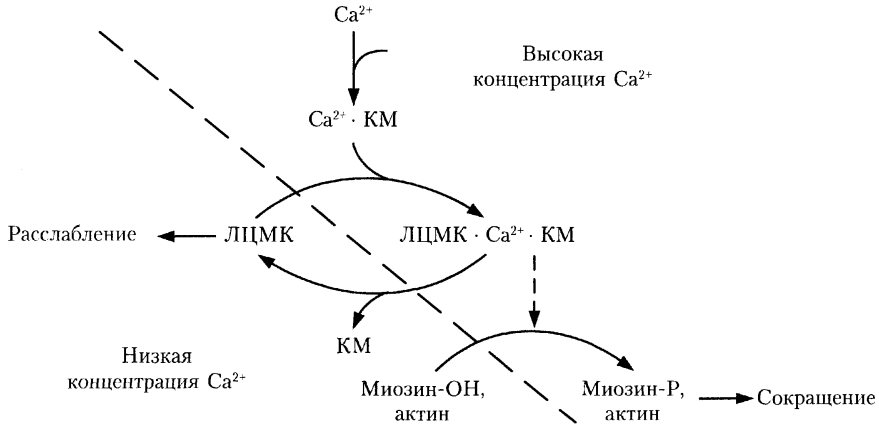


Рис. 22.7. Регуляция сокращения гладких мышц:
ЛЦМК — киназа легких цепей миозина; *КМ* — кальмодулин

вирует миозиновую АТФазу, и мышца сокращается. Уменьшение концентрации Ca^{2+} инактивирует киназу легких цепей; миозин дефосфорилируется фосфатазой легких цепей, далее инактивируется актомиозиновая АТФаза, и наступает расслабление.

Повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле и сокращение мышцы происходят в результате открытия потенциал-чувствительных ионных каналов саркоплазматического ретикулума, а также через инозитолфосфатный механизм. Расслабление гладких мышц обеспечивается не только снижением концентрации Ca^{2+} в цитозоле в результате действия Ca^{2+}-АТФазы, но и при действии внешних сигналов, вторым

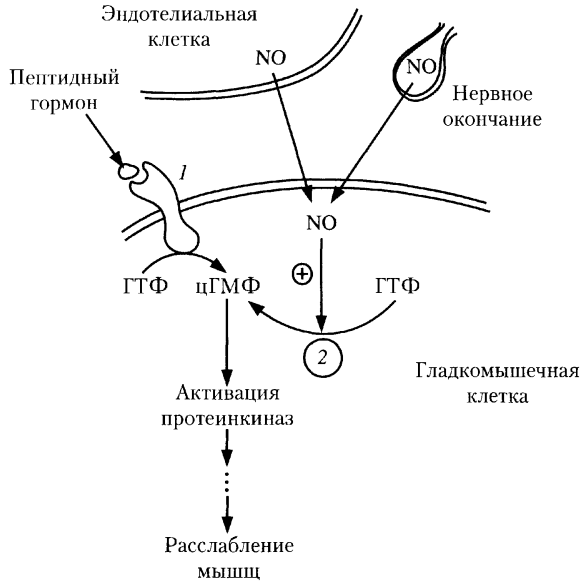


Рис. 22.8. Регуляция расслабления гладких мышц:
1 и *2* — соответственно мембранная цитозольная гуанилатциклазы

(внутриклеточным) вестником которых служит циклогуанозинмонофосфат (цГМФ) — аналог цАМФ. Он образуется из ГТФ при действии гуанилатциклазы. Есть две формы этого фермента: мембранная и цитозольная (рис. 22.8). Мембранная форма активируется пептидными гормонами, а цитозольная — окисью азота.

ОКИСЬ АЗОТА

Окись азота (нитроксид, NO) — высокотоксичный свободный радикал с очень коротким периодом полураспада. Каждая молекула существует лишь несколько секунд: взаимодействуя с водой и кислородом, NO превращается в нитриты и нитраты. Концентрация NO в тканях низкая, измеряется в пикомолях.

NO образуется из аргинина и O_2; аргинин при этом превращается в цитруллин (рис. 22.9). Фермент NO-синтаза содержит в качестве коферментов ФМН, ФАД, гем и тетрагидробиоптерин; в реакции участвует НАДФН. Механизм реакции очень сложный.

Имеются две формы фермента — конститутивная и индуцируемая NO-синтазы, различающиеся по свойствам, локализации и функциям. В эндотелии сосудов, нервных клетках, тромбоцитах находится конститутивный фермент, содержание которого в клетках поддерживается на постоянном уровне, но активность регулируется (активи-

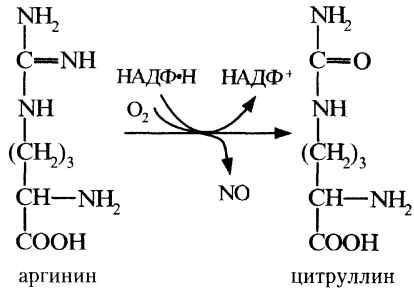


Рис. 22.9. Образование нитроксида

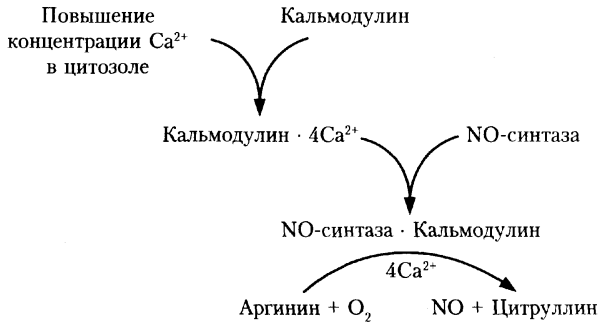


Рис. 22.10. Регуляция активности конститутивной NO-синтазы

руется кальмодулином). Фермент эндотелия сосудов участвует в регуляции тонуса гладкомышечных клеток. Повышение концентрации Ca^{2+} в эндотелиальных клетках активирует NO-синтазу (рис. 22.10). Кроме того, NO образуется в отростках нервных клеток в ответ на нервный импульс. Далее NO диффундирует в гладкомышечные клетки (см. рис. 22.8), где активирует цитозольную цГМФ-синтазу; цГМФ активирует специфические протеинкиназы, и происходит расслабление мышц, а следовательно, и расширение сосудов.

Нитроглицерин и нитропруссиды, применяющиеся как сосудорасширяющие лекарства, в организме распадаются с образованием NO.

В разных клетках и органах существуют варианты и дополнительные механизмы регуляции сокращения гладких мышц, в том числе независимые от концентрации кальция.

Другие функции нитроксида

В мозге конститутивная NO-синтаза участвует в межнейрональной передаче импульсов.

В макрофагах, нейтрофилах, гепатоцитах содержится индуцируемая NO-синтаза, независимая от Ca^{2+}-кальмодулина. Индукторами синтеза могут быть цитокины (фактор роста опухолей, интерлейкин-1 и некоторые другие), а также бактериальные липополисахариды и цитокин γ-интерферон, секреция которого увеличивается при бактериальной инфекции. NO, а особенно другие свободнорадикальные продукты, образующиеся с участием NO, обладают бактерицидными свойствами.

НЕМЫШЕЧНЫЕ СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ

Актин и миозин содержатся во всех клетках и обеспечивают их подвижность — амебоидное движение лейкоцитов, тромбоцитов, фибробластов и других клеток, внутриклеточные движения (например, расхождение хромосом), эндоцитоз и экзоцитоз, движения ресничек и микроворсинок эпителиальных клеток. В противоположность мышечным клеткам, в других клетках относительное содержание миозина меньше, чем актина; некоторые типы клеток содержат только актин. В активно передвигающихся клетках (макрофаги, тромбоциты) актин — это преобладающий белок цитоплазмы: его содержание достигает 20–30 % от всех белков; в

менее подвижных клетках — 1–2 %. Во всех случаях эти белки образуют фибриллярные структуры, способные к сокращению. Организация этих структур, механизмы генерации движения и регуляции сокращения изучены недостаточно. В клеточном движении участвуют также микротрубочки, построенные из белка тубилина.

ИСТОЧНИКИ ЭНЕРГИИ ДЛЯ МЫШЕЧНОЙ РАБОТЫ

Скелетная мышца, работающая с максимальной активностью, потребляет в десятки раз больше энергии, чем покоящаяся, причем переход от состояния покоя к состоянию максимальной работы происходит за доли секунды. В связи с этим для мышцы, в отличие от других органов, оказались необходимыми механизмы изменения скорости синтеза АТФ в очень широких пределах, а также быстрого переключения с одного режима на другой.

Механизмы увеличения продукции АТФ. Многие процессы, обеспечивающие работу мышц энергией, рассмотрены в предыдущих разделах. К ним относится увеличение снабжения мышц окисляемыми субстратами: мобилизация гликогена печени и мышц, глюконеогенез из молочной кислоты (цикл Кори и глюкозо-аланиновый цикл), мобилизация депонированных жиров и поступление жирных кислот и кетоновых тел в мышцы. Увеличиваются также легочная вентиляция и скорость кровотока, а следовательно, и снабжение мышц кислородом. Эти процессы вместе с механизмами аллостерической регуляции, повышающими активность ключевых ферментов катаболизма, многократно увеличивают скорость синтеза АТФ.

В работающей мышце увеличивается скорость кругооборота цикла АТФ-АДФ. Однако концентрация АТФ изменяется незначительно: она лишь на 10–20 % меньше, чем в покоящейся мышце.

Общее содержание АТФ в мышце составляет примерно 5 мкмоль на 1 г ее массы. При прекращении синтеза АТФ этого количества хватает лишь примерно на 1 с работы. Отсюда следует, что каждую секунду должно синтезироваться около 5 мкмоль АТФ на 1 г мышц. Исходя из этого, можно подсчитать, что если в работу включена $^1/_3$ мышц тела (примерно 10 кг) и работа продолжается 10 мин, то за это время синтезируется около 1,5 кг АТФ (и столько же превратится в АДФ). Конечно, эта величина лишь ориентировочна и сильно зависит от интенсивности работы.

Поскольку снабжение митохондрий кислородом становится лимитирующим звеном в работающей мышце, важное значение имеет активация анаэробного распада глюкозы. Усиление гликолиза связано с действием аденилаткиназы, которая катализирует следующую реакцию:

$$2АДФ \rightarrow АТФ + АМФ.$$

Концентрация АДФ в работающей мышце несколько увеличена (соответственно снижению концентрации АТФ); поэтому в результате действия аденилаткиназы повышается и концентрация АМФ, который является аллостерическим активатором фосфофруктокиназы — ключевого фермента гликолиза, а также гликогенфосфорилазы.

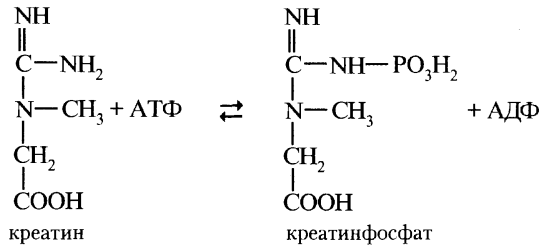


Рис. 22.11. Образование креатинфосфата

Механизмы быстрого переключения энергетического обмена мышц. В мышцах имеется высокоэнергетическое вещество креатинфосфат, которое образуется из креатина и АТФ при действии креатинкиназы (рис. 22.11). Эта реакция легко обратима. Содержание креатинфосфата в покоящейся мышце в 3–8 раз больше, чем содержание АТФ; такое количество обеспечивает интенсивную работу мышц в течение 2–5 с. За это время человек может пробежать 15–50 м. Мышцы при переходе от покоя к работе сначала используют АТФ, образующийся из креатинфосфата: это наиболее быстрый путь генерации АТФ. Тем временем включаются другие механизмы: каскадный механизм мобилизации гликогена в мышечных клетках, а затем и механизмы усиленного транспорта в мышцы субстратов окисления из печени и жировой ткани. Напомним, что при мышечной работе в первую очередь используются запасы углеводов, а при длительной работе постепенно увеличивается использование жиров. Изменяется также относительная интенсивность анаэробного и аэробного путей образования АТФ: кратковременная интенсивная работа (например, бег на 100 м) может совершаться почти целиком за счет гликолиза. При продолжении работы вклад аэробного процесса увеличивается, а анаэробного — уменьшается.

Красные и белые мышцы. Скелетные мышцы неоднородны: в них различают несколько разновидностей, основные из которых — красные мышцы (медленные, аэробные) и белые мышцы (быстрые, анаэробные). Красные мышцы содержат много митохондрий и обладают высокой способностью к аэробному окислению глюкозы, жирных кислот, кетоновых тел. Они хорошо снабжаются кровью и содержат много миоглобина, который и придает им красный цвет. В белых мышцах мало митохондрий, но зато много гликолитических ферментов, и в них с большой скоростью происходит анаэробный распад гликогена. Соответственно, различаются и функциональные возможности этих мышц. Красные мышцы более приспособлены к продолжительной работе, в то время как белые мышцы быстрее переходят от состояния покоя к максимальной активности, сокращаются энергично, но в них скоро истощаются запасы гликогена, а поступление глюкозы из крови и ее использование в клетках белых мышц происходят медленно.

В теле человека нет целиком белых или целиком красных мышц (в отличие от многих животных, например птиц, кроликов). Мышцы человека содержат и красные, и белые мышечные волокна; их относительное количество в разных мышцах неодинаково. Имеются также и индивидуальные различия. Последнее обстоятельство позволяет оценивать спортивные возможности людей: например, более пер-

спективным спринтером можно считать человека, в мышцах которого много белых волокон.

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Сердечная мышца за сутки сокращается больше 100 000 раз, перекачивая около 7200 л крови. Миокард по структуре и свойствам сходен с красными скелетными мышцами. Особенностью энергетического обмена сердечной мышцы является его почти полностью аэробный характер. При этом основными субстратами, поставляющими энергию, служат жирные кислоты: около 70 % потребляемого сердечной мышцей кислорода расходуется на окисление жирных кислот. Кроме того, используются глюкоза, молочная и пировиноградная кислоты. После приема пищи использование глюкозы увеличивается, а жирных кислот — уменьшается: при физической работе возрастает доля молочной кислоты в обеспечении сердца энергией.

ОБРАЗОВАНИЕ АММИАКА В МЫШЦАХ

В работающей мышце образуются значительные количества аммиака. Непосредственным источником аммиака служит дезаминирование АМФ:

$$\text{АМФ} + H_2O \rightarrow \text{ИМФ} + NH_3.$$

Однако АМФ вновь регенерируется с использованием аминогруппы аспарагиновой кислоты:

$$\text{ИМФ} + \text{Аспартат} + \text{ГТФ} \rightarrow \text{АМФ} + \text{Фумарат} + \text{ГДФ} + H_3PO_4.$$

Фумарат затем превращается в оксалоацетат и далее — в аспартат. Таким образом, первичным источником аммиака можно считать аспарагиновую кислоту и другие аминокислоты, которые трансаминируются с оксалоацетатом. Вероятно, эта система реакций служит для непрямого дезаминирования аминокислот, а образующиеся кетокислоты используются как источники энергии.

МЫШЕЧНЫЕ ДИСТРОФИИ

Первичные прогрессивные мышечные дистрофии (миопатии) — тяжелые заболевания с выраженной наследственной природой. Болезнь начинается обычно в детском или юношеском возрасте. Она проявляется в постепенной гибели мышечных клеток и замещении их соединительной тканью: мышцы становятся все слабее и слабее и в конечном счете исчезают вовсе. Больные погибают обычно от инфекций. Исчезновение мышц происходит в результате действия кислых гидролаз, особенно протеиназ, освобождающихся из лизосом. Первичный дефект, ведущий к появлению лизосомных ферментов в цитозоле, неизвестен.

При Е-авитаминозе, денервации мышц, иммобилизации мышц (наложение гипсовой повязки), перерезке сухожилий также происходит усиленный распад мышечных белков (атрофия мышц). Атрофия мышц при Е-авитаминозе связана, по-видимому, с повреждением мембран мышечных лизосом продуктами пероксид-

ного окисления липидов, которое в отсутствие антиоксиданта (витамина Е) происходит более активно.

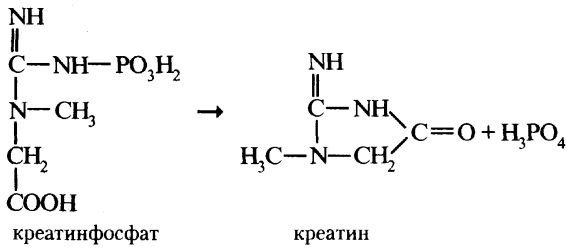


Рис. 22.12. Образование креатинина

ЭКСКРЕЦИЯ КРЕАТИНА И КРЕАТИНИНА

При болезнях мышц, особенно сопровождающихся их атрофией, увеличивается концентрация креатина в крови и выделение его с мочой. Концентрация креатина в крови определяется балансом скоростей его синтеза, выведения с мочой (в норме от 0 до 150 мг в сутки) и превращения в креатинин, который тоже выводится с мочой (1–2 г в сутки). Креатинин образуется в мышцах в результате неферментативной реакции (рис. 22.12).

При болезнях мышц выделение креатина увеличивается, а креатинина — уменьшается. Вероятно, это связано со снижением скорости фосфорилирования креатина в мышцах.

Суточное выделение креатинина в норме — величина постоянная для каждого человека, прямо пропорциональная массе мышц. Концентрация креатинина в крови в норме 1–2 мг/дл. Креатинин не реабсорбируется из первичной мочи в канальцах нефронов, поэтому количество выделяемого креатинина отражает величину клубочковой фильтрации: по выделению креатинина можно рассчитать объем фильтрации и объем реабсорбции в почках. При болезнях почек с нарушением фильтрации выделение креатинина уменьшается, а его концентрация в крови увеличивается: креатинин в крови и моче определяют с целью диагностики.

Глава 23

НЕРВНАЯ СИСТЕМА

Нервная система, подобно эндокринной системе, обеспечивает быструю связь между отдаленными друг от друга частями тела. Эндокринная система очень сложна. Еще многократно сложнее иммунная система, но и она по сложности несопоставима с нервной системой.

Мозг человека содержит 10^{11} нейронов. Каждый нейрон связан с большим числом других нейронов с помощью дендритов и аксонов; число межнейрональных контактов (синапсов) в головном мозге человека оценивают величиной 10^{13}–10^{14}. Больше половины всей поверхности нейрона, включая дендриты и аксоны, занято синапсами. Аксон соединяет нервную клетку также и с эффекторными клетками. Дендриты и аксоны служат для проведения нервного импульса. В мозг поступает поток афферентных импульсов от органов чувств, а также от мышц, сухожилий, сердца, кровеносных сосудов, желез, где есть чувствительные нервные окончания, реагирующие на изменения химического состава, механического давления, растяжения, температуры. В мозге формируется поток эфферентных импульсов, которые регулируют функции органов и поведение. Таким образом работа мозга в значительной мере сводится к расшифровке информирующих афферентных импульсов и созданию управляющих эфферентных импульсов. Эти процессы управляют произвольными движениями (соматическая двигательная система), регулируют функции непроизвольных гладких мышц, сердца, желез (автономная нервная система). Они же лежат в основе высших функций нервной системы — сознания и мышления, а также эмоций, инстинктов, памяти.

В настоящее время достаточно много известно о молекулярных механизмах возникновения и проведения нервного импульса и механизмах синаптической передачи импульса. Что касается интегральных функций мозга, то мы не знаем, как работает наш мозг, например, когда мы протягиваем руку, чтобы нажать на определенную клавишу компьютера, а тем более когда мы избегаем опасности поставить неправильный диагноз болезни. Современное состояние нейробиохимических исследований можно охарактеризовать лишь как поиски подходов к таким проблемам.

Множество наблюдений указывает, что ряд болезней нервной системы имеет своим началом или важным этапом патогенеза нарушения молекулярных

процессов. Изучение биохимии нервной системы необходимо для эффективной диагностики и лечения таких болезней. Многие результаты нейробиохимических исследований уже и сейчас воплощаются в практические приложения медицины.

СТРОЕНИЕ НЕРВНОГО ВОЛОКНА

Нервные волокна дендритов и аксонов представляют собой трубочку, которая является продолжением плазматической мембраны тела нейрона. В мембране волокна находятся основные молекулярные структуры, формирующие нервный импульс и обеспечивающие его движение по волокну. Полость волокна содержит цитоплазму (аксоплазму); основными органеллами аксоплазмы являются микротрубочки, образованные белком тубулином. Они имеют диаметр около 25 нм и располагаются пучком вдоль волокна. Кроме того, аксоплазма содержит и другие белковые фибриллярные структуры: нейрофиламенты диаметром 10 нм и микрофиламенты диаметром 5 нм, построенные из актина. Аксоплазматические фибриллярные структуры участвуют в образовании непрерывного движения аксоплазмы в направлении от тела нейрона к синапсам (аксоплазматический ток). Скорость аксоплазматического тока составляет около 20 см в сутки. С этим током переносятся в синаптические окончания нервов метаболиты, белки и субклеточные органеллы (митохондрии, саркоплазматический ретикулум, лизосомы). Существует и обратный ток, менее интенсивный – в сторону тела нейрона.

Нервные волокна окружены миелиновой оболочкой, которую в периферической нервной системе образуют леммоциты, а в мозге — клетки глии (олигодендроглиальные клетки). Миелиновая оболочка представляет собой производное плазматической мембраны леммоцита или глиальной клетки: мембрана сложена вдвое и многократно обернута вокруг аксона (рис. 23.1). Миелиновая оболочка образует по длине аксона короткие чехольчики, между

которыми имеются немиелинизированные участки — перехваты Ранвье; они

расположены на расстоянии 0,1–1 мм друг от друга. Мембрана миелиновой оболочки построена по тому же типу, что и другие мембраны. В расчете на массу сухого вещества миелиновая оболочка содержит 70 % липидов и 30 % белков. Основные липиды миелина указаны в табл. 23.1. Около 65 % всех липидов мозга находится в миелиновых оболочках.

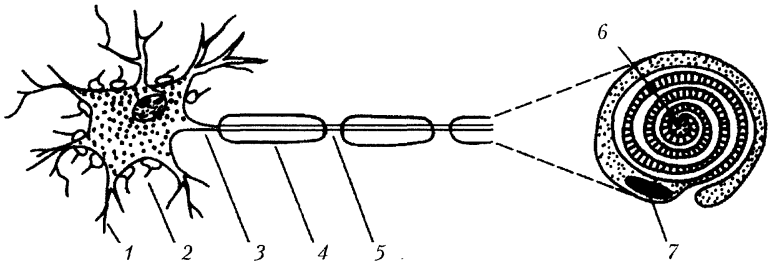


Рис. 23.1. Строение нервной клетки:

а — нервная клетка с дендритами (*1*), прилегающими к ней окончаниями других нейронов (*2*), аксоном (*3*), окруженным миелиновой оболочкой (*4*); *5* — перехват Ранвье; *б* — поперечный разрез миелинового волокна; *6* — аксон; *7* — ядро леммоцита

Таблица 23.1. Липидный состав миелина нервной ткани человека

Липид	Содержание, %	Липид	Содержание, %
Холестерин	27,7	Сфингомиелины	7,9
Цереброзиды	22,7	Фосфатидилсерины	4,8
Фосфатидилэтаноламины	15,6	Плазмалогены	12,3
Фосфатидилхолины	11,2		

Миелиновая оболочка выполняет роль изолятора, предотвращающего «короткое замыкание» между соседними волокнами, а главное — обеспечивает примерно в 6 раз более быстрый перенос нервного импульса, чем в немиелинизированных волокнах (см. ниже).

Белки миелина, как правило, гидрофобны, не растворяются в воде, но образуют нековалентные соединения с липидами мембраны; некоторые из белков содержат ковалентно связанные жирные кислоты (протеолипиды).

Около $^1/_3$ от всех белков миелина приходится на водорастворимый щелочной белок (pI = 10,6), получивший название «энцефалитогенного» белка. Введение этого белка некоторым экспериментальным животным вызывает у них аллергический энцефалит — болезнь, которая сопровождается демиелинизацией нервных волокон и параличами. Болезнь связана с образованием антител к энцефалитогенному белку: антитела затем реагируют с собственным щелочным белком нервов, вызывая воспалительный процесс и повреждение миелиновых оболочек. Экспериментальный аллергический энцефалит в некоторых отношениях напоминает рассеянный склероз у человека и используется в качестве модели для изучения этой болезни. Демиелинизация нервов бывает и при других болезнях, например при дифтеритных невритах, наследственных дефектах обмена липидов, углеводов, аминокислот.

НЕРВНЫЙ ИМПУЛЬС

Сигналы, передаваемые нервными клетками, имеют разное значение и разный смысл, но их природа всегда одинакова — это изменение электрического потенциала плазматической мембраны нейронов (нервный импульс).

В экспериментальных условиях возникновение и проведение нервного импульса можно наблюдать в аксоне, лишенном тела нейрона. Например, нерв лягушки проводит импульсы более недели после отделения от клеток. Даже если из аксона удалить аксоплазму и заменить ее солевым раствором, то оставшаяся мембранная трубочка сохраняет способность к возбуждению и проведению импульса. Именно с применением таких трубочек, изготовленных из гигантского аксона кальмара, впервые были изучены электрические характеристики и механизм нервного импульса.

Основными инструментами мембраны аксона, создающими нервный импульс, являются натриевый насос (Na,K-АТФаза) и два типа ионопроводящих каналов — натриевые каналы и калиевые каналы. Каждое из этих трех устройств представляет собой самостоятельную структурную единицу, построенную из специальных белков. Функционально все три устройства связаны друг с другом. Натриевый насос перекачивает ионы Na^+ наружу, а K^+ внутрь, создавая трансмембранный гра-

диент концентраций этих ионов за счет энергии АТФ. Натриевые и калиевые каналы могут открываться и закрываться; они пропускают ионы Na^+ и K^+ по градиентам концентрации этих ионов. Следовательно, будучи открытыми, ионные каналы могут уничтожить градиент, создаваемый Na,K-АТФазой.

Потенциал покоя. В состоянии покоя натриевые и калиевые каналы закрыты. Натриевый насос работает непрерывно, компенсируя утечку ионов по градиентам их концентраций. Разность концентраций ионов Na^+ и K^+ по сторонам мембраны, образуемая натриевым насосом, влияет на распределение и других ионов (табл. 23.2).

Таблица 23.2. Основные ионы, образующие потенциал покоя (примерные концентрации)

Ион	Концентрация, ммоль/л		Ион	Концентрация, ммоль/л	
	внутри	снаружи		внутри	снаружи
Na^+	10	145	HCO^-_3	10	25
K^+	150	5	A^-*	155	5
Cl^-	5	120			

* A^- — анионные группы макромолекул и фосфатов.

В результате устанавливается динамическое равновесие, при котором электрохимический трансмембранный градиент равен нулю, а распределение зарядов неравномерно: внутри аксона образуется избыток отрицательных зарядов, снаружи — избыток положительных, т. е. возникает трансмембранная разность электрических потенциалов — потенциал покоя. Разность потенциалов по сторонам мембраны можно измерить, вводя микроэлектрод внутрь аксона: в состоянии покоя она равна 60–70 мВ, отрицательный заряд внутри аксона. Потенциал покоя одинаков на всем протяжении волокна и в состоянии покоя изменяется лишь в небольших пределах.

Потенциал покоя не является специфической особенностью нервных клеток. Натриевый насос имеется в плазматической мембране всех клеток и во всех случаях его действия приводит к возникновению трансмембранной разности электрических потенциалов с избытком отрицательных зарядов на внутренней поверхности плазматической мембраны.

Потенциал действия. Раздражение нерва открывает натриевые и калиевые каналы в мембране аксона. Вероятно, это происходит в результате изменения конформации и ионизации белков, из которых построены каналы. Натриевые каналы открываются несколько раньше, чем калиевые, и их пропускная способность больше. В результате потока ионов Na^+ внутрь аксона быстро изменяется величина трансмембранного электрического потенциала: сначала он становится равным нулю (деполяризация мембраны), а затем вновь происходит поляризация, но теперь внутри аксона больше положительных зарядов, чем снаружи (инверсия полярности). В этом состоянии разность потенциалов достигает 40 мВ, положительный заряд — внутри аксона. Таким образом, общая амплитуда изменения от потенциала покоя (–60...–70 мВ) до максимального значения потенциала при раздражении нерва (+40 мВ) составляет примерно 100 мВ (рис. 23.2). Затем натриевые каналы закрываются, а калиевые открываются, начинается выход ионов K^+

из клетки, и потенциал изменяется от +40 до –70 мВ, т. е. до уровня потенциала покоя. Количества ионов Na^+ и K^+, которые необходимо переместить для такого изменения потенциала, настолько малы, что концентрации ионов внутри и снаружи аксона изменяются незначительно (примерно на одну миллионную часть). Ионные каналы остаются открытыми непродолжительное время; после их закрытия натриевый насос восстанавливает исходное распределение ионов по сторонам мембраны. Эту последовательность событий называют потенциалом действия; она продолжается менее 1 мс. В отличие от потенциала покоя, значение которого одинаково на всем протяжении аксона, потенциал действия охватывает лишь очень небольшой участок аксона (в миелинизированных волокнах — от одного перехвата Ранвье до соседнего).

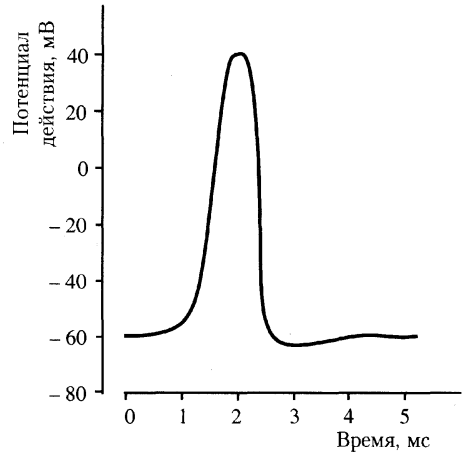


Рис. 23.2. Потенциал действия

Потенциал действия возникает всякий раз, когда какая-либо причина уменьшает потенциал покоя примерно до 50 мВ (пороговая величина). В эксперименте это может быть электрический ток или добавление растворов, изменяющих относительные концентрации ионов снаружи и внутри аксона. Механизм включения потенциала действия функционирует по принципу «все или ничего»: если действие раздражителя изменило потенциал покоя, но это изменение не достигло 50 мВ, потенциал действия не возникает; если же пороговое значение достигнуто или превышено, то каждый раз развивается одинаковый потенциал действия.

Не совсем ясен молекулярный механизм открывания и закрывания ионных каналов. Можно думать, что белки этих структур чувствительны к степени поляризации мембраны и изменяют конформацию, открывая каналы, когда потенциал снижается до 50 мВ. Изменения конформации, однажды начавшись, далее происходят независимо от концентрации ионов, и в конечном счете белки возвращаются в исходное состояние: каналы закрываются подобно тому, как закрывается открытая толчком дверь на пружине. Продолжительность потенциала действия определяется временем, в течение которого каналы открыты. Во время закрывания каналов они не чувствительны к поляризации, и раздражение в этот период не вызывает потенциала действия (рефрактерный период, продолжающийся около 1 мс).

Движение потенциала действия по аксону. Потенциал действия, возникнув в одном участке аксона, вследствие диффузии ионов из этого участка вдоль волокна снижает потенциал покоя в соседнем участке и вызывает здесь тоже развитие потенциала действия. Благодаря этому механизму потенциал действия, возникнув в одном месте, проходит весь аксон и достигает воспринимающей клетки. В таком качестве потенциал действия называют нервным импульсом.

В миелинизированном нервном волокне млекопитающих натриевые и калиевые ионные каналы расположены в немиелинозированных участках перехватов Ранвье, где мембрана аксона контактирует с межклеточной жидкостью. Вследствие этого

нервный импульс перемещается «скачками»: ионы Na^+, поступающие внутрь аксона при открытии каналов в одном перехвате, диффундируют вдоль аксона до следующего перехвата, снижают здесь потенциал до 50 мВ и тем самым индуцируют потенциал действия. Диффузия происходит быстро, поскольку между перехватом Ранвье, находящимся в максимуме потенциала действия, и соседним покоящимся перехватом возникает разность потенциалов, близкая к 100 мВ; по существу, это не диффузия, а ионный электрический ток, или электрофорез. Благодаря такому устройству скорость проведения импульса в миелинизированном волокне равна 30–50 м/с; это в 5–6 раз больше, чем в немиелинизированных волокнах, где ионные каналы расположены равномерно по всей длине волокна и потенциал действия перемещается не скачками, а плавно.

Пороговая величина поляризации, вызывающая нервный импульс, зависит от концентрации ионов Ca^{2+}. Внутриклеточная концентрация Ca^{2+} в норме равна примерно 0,3 мкмоль/л; при гипокальциемии она уменьшается, вследствие чего снижается пороговая величина возбуждения нервов и могут возникать судороги.

Аналогичный механизм возникновения и распространения потенциала действия функционирует в плазматической мембране мышечной клетки (сарколемме). В мышцах потенциал действия вызывает освобождение ионов Ca^{2+} из цистерн саркоплазматического ретикулума, которые включают процесс сокращения.

ИНГИБИТОРЫ РАЗВИТИЯ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ

Натриевый насос непосредственно в проведении нервного импульса не участвует, но он обеспечивает необходимую для этого разность концентраций ионов натрия и калия по сторонам мембраны аксона. Хотя одиночный потенциал действия незначительно изменяет концентрации натрия и калия в аксоне, при генерации большого количества импульсов распределение этих ионов могло бы существенно измениться. Этому препятствует работа Na,K-АТФазы. Уабаин (строфантин G) избирательно соединяется с Na,K-АТФазой и ингибирует ее активность. Аксон нервной клетки в присутствии уабаина способен провести несколько тысяч импульсов, после чего концентрации натрия и калия изменяются настолько, что возникновение потенциала действия становится невозможным.

Тетродотоксин (выделен из рыб семейства Tetraodontidae) и сакситоксин (из морского фитопланктона ряда Gonyaulax) — полициклические соединения, содержащие гуанидиновую группу. Оба они могут присоединяться к белкам натриевого канала в области его наружного входа, блокируя прохождение ионов натрия, а следовательно, и развитие потенциала действия. Если тетродотоксин и сакситоксин вводить внутрь аксона, то они не ингибируют проведение импульса. Оба вещества отличаются очень высоким сродством к своим рецепторам на аксоне и поэтому относятся к наиболее сильным токсинам: 1 мг сакситоксина вызывает паралич с летальным исходом.

Калиевые каналы можно блокировать тетраметиламмонием и ионами цезия; они действуют со стороны внутреннего входа этих каналов.

Растительный алкалоид кокаин и его синтетические аналоги (новокаин и др.) применяются для местного обезболивания (анестезии). Их анестезирующее действие связано с блокированием ионных каналов аксонов.

Ингибиторы позволяют изучать локализацию белков, участвующих в проведении нервного импульса, определять их количество (титрование лигандом), выключать то одно, то другое звено и таким путем выяснять функции отдельных частей аппарата и последовательность событий при возникновении и проведении нервного импульса.

СИНАПТИЧЕСКАЯ ПЕРЕДАЧА НЕРВНОГО ИМПУЛЬСА

В синапсе аксон прерывается, и передача импульса на другую клетку происходит путем диффузии определенного вещества — медиатора. В синапсах одного нейрона используется в качестве медиатора какое-либо одно вещество — ацетилхолин (холинергические нейроны, или синапсы), норадреналин (адренергические нейроны) и т. д.

В процессе синаптической передачи импульса можно выделить следующие этапы:

а) нервный импульс, дошедший до окончания аксона, вызывает освобождение медиатора из нервного окончания в синаптическую щель (рис. 23.3).

б) медиатор диффундирует к мембране другой клетки (постсинаптической мембране);

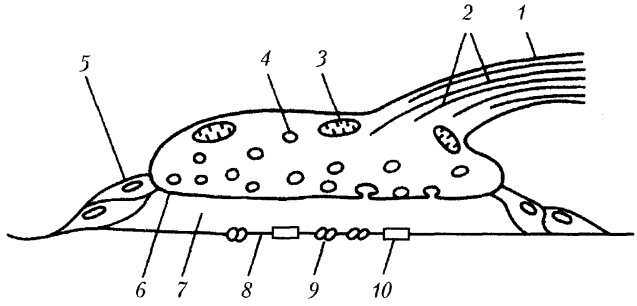


Рис. 23.3. Строение синапса:

1 — аксон; *2* — микротрубочки; 3 — митохондрии; *4* — синаптические пузырьки; *5* — леммоциты; *6* — пресинаптическая мембрана; *7* — синаптическая щель; *8* — постсинаптическая мембрана; *9* — рецептор ацетилхолина; *10* — ацетилхолинэстераза

в) в постсинаптической мембране медиатор присоединяется к рецептору медиатора — белку, и в результате изменения конформации рецептора генерируется возбуждающий постсинаптический потенциал, который при достижении порогового уровня может вызвать потенциал действия. Если постсинаптическая мембрана принадлежит аксону другой нервной клетки, потенциал действия начинает движение по этому аксону (нервный импульс); если синапс соединяет аксон с эффекторной клеткой, возникает характерная для клетки реакция, например секреция железы или сокращение мышечного волокна;

г) медиатор в синаптической щели инактивируется или удаляется из нее, после чего синапс готов к передаче следующего импульса.

Многие исследования биохимии синаптической передачи выполнены с препаратами синапсов, которые получают из ткани головного или спинного мозга. При гомогенизации ткани нервные окончания отрываются, мембрана в месте разрыва смыкается и получаются замкнутые пузырьки — синаптосомы; их отделяют от других компонентов гомогената методом дифференциального центрифугирования. Синаптосомы секретируют медиатор при воздействиях, изменяющих их трансмембранный потенциал в сторону положительного знака.

Холинергические синапсы

К этой группе относятся нервно-мышечные соединения, образуемые моторными нейронами, синапсы преганглионарных нейронов автономной нервной системы и постганглионарных нейронов парасимпатической нервной системы. Области, содержащие холинергические синапсы, имеются и в головном мозге.

В окончаниях холинергических нервов содержится фермент холинацетилтрансфераза, катализирующий синтез ацетилхолина из ацетил-КоА и холина:

$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-S\text{-}KoA + HO-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3 \rightarrow$$

$$\rightarrow CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3 + HS\text{-}KoA.$$

Ацетил-КоА образуется в самих нервных окончаниях, а холин поступает из крови. Ацетилхолин накапливается в синаптических пузырьках, окруженных мембраной. В пузырьках имеется кислый белок везикулин, с которым ацетилхолин образует солеобразные соединения. Каждый пузырек содержит 10^4–10^5 молекула ацетилхолина.

При поступлении потенциала действия в нервное окончание некоторая часть пузырьков (200–300) сливается с пресинаптической мембраной и содержимое пузырьков освобождается в синаптическую щель (экзоцитоз); здесь солеобразное соединение ацетилхолина и везикулина диссоциирует. В экзоцитозе участвуют сократимые волокна цитоплазмы нервного окончания: потенциал действия вызывает увеличение концентрации Ca^{2+} в нервном окончании, а Ca^2 включает механизм сокращения этих волокон.

Ацетилхолин диффундирует к постсинаптической мембране и здесь соединяется с рецептором ацетилхолина. Рецептор представляет собой интегральный белок постсинаптической мембраны. Присоединение ацетилхолина к рецептору — процесс обратимый; чем больше концентрация ацетилхолина в синаптической щели, тем большее число молекул рецептора соединено с ним. Ацетилхолин индуцирует конформационные изменения рецептора, которые передаются на белки натриевых и калиевых каналов в постсинаптической мембране; в результате каналы открываются. Освобождение ацетилхолина из 200–300 пузырьков создает такую его концентрацию в синаптической щели, при которой связывается с ацетилхолином большое число рецепторов и открывается достаточное число ионных каналов, чтобы на постсинаптической мембране возник возбуждающий потенциал, способный вызвать потенциал действия. Затем потенциал действия начинает свой путь

по аксону постсинаптической клетки, если это межнейрональный синапс, или по сарколемме, если это нервно-мышечный синапс.

В постсинаптической мембране наряду с рецепторами ацетилхолина имеется фермент ацетилхолинэстераза, гидролизующий ацетилхолин:

$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3 + H_2O \rightarrow$$

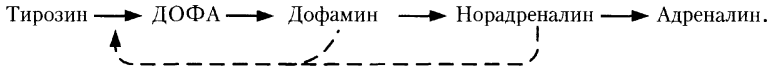
$$\rightarrow CH_3-\underset{\underset{O}{|}}{C}-OH + HO-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3.$$

После выделения ацетилхолина в синаптическую щель сразу же начинается его гидролиз. По мере гидролиза и снижения концентрации ацетилхолина происходит диссоциация комплекса ацетилхолин—рецептор и в конечном счете все молекулы рецептора освобождаются от ацетилхолина, конформация рецепторов и ионных каналов возвращается в исходное состояние, а Na,K-АТФаза постсинаптической мембраны восстанавливает характерное для покоя распределение ионов и электрического заряда (потенциал покоя).

Холин и ацетат, образующиеся в результате действия ацетилхолинэстеразы, транспортируются через пресинаптическую мембрану в нервное окончание и вновь используются для синтеза ацетилхолина. Количество заполненных ацетилхолином пузырьков в нервном окончании достаточно для проведения 2000–5000 импульсов; этого хватает на несколько минут работы при сильной стимуляции.

Адренергические синапсы

К адренергическим синапсам относятся такие, в которых медиаторами служат катехоламины – норадреналин, дофамин. Синтез катехоламинов описан в гл. 11. Ферменты, участвующие в синтезе катехоламинов, образуются в теле нейронов и с аксоплазматическим током транспортируются в окончания нервов. Скорость синтеза катехоламинов регулируется по механизму отрицательной обратной связи концентрацией медиатора в нервном окончании: дофамин и норадреналин ингибируют первый фермент цепи реакций — тирозингидроксилазу:



Медиатор накапливается в синаптических пузырьках и освобождается в синаптическую щель при поступлении нервного импульса. Величина освобождающейся порции также регулируется по механизму отрицательной обратной связи: в пресинаптической мембране имеется регуляторный белок, который связывает медиатор при повышении его концентрации в синаптической щели и выключает дальнейший экзоцитоз медиатора.

Адренергические синапсы в отличие от холинергических не содержат фермента, разрушающего медиатор в синаптической щели. Вместо этого передача импульса завершается перекачкой медиатора обратно через пресинаптическую мембрану, в которой имеется специальная транспортная система. Здесь медиатор включа-

ется в синаптические пузырьки или инактивируется путем дезаминирования моноаминоксидазой, а также путем метилирования катехол-О-метилтрансферазой.

Норадреналин функционирует в синапсах постганглионарных волокон симпатической нервной системы и в разных отделах головного мозга (подбугорная область, зрительный бугор, лимбические отделы).

Дофамин служит медиатором в синапсах, образуемых нейронами черной субстанции ствола мозга: аксоны этих нейронов заканчиваются в полосатом теле. Эти отделы мозга контролируют произвольные движения. С нарушением дофаминергической передачи импульсов связана болезнь Паркинсона. При этой болезни наблюдаются ригидность мышц, скованность движений, характерные непроизвольные движения (особый вид дрожания). В полосатом теле мозга людей, умерших от болезни Паркинсона, резко снижено содержание дофамина. Введение ДОФА в кровь больным снимает симптомы болезни: ДОФА, в отличие от дофамина, легко проникает из крови в мозг, где превращается в дофамин.

Другие медиаторы

В наибольшем числе нейронов мозга — примерно в половине всех синапсов — функционируют в качестве медиаторов 4-аминомасляная кислота и глицин. Оба эти медиатора вызывают процессы торможения в нейронах, в то время как другие медиаторы могут функционировать и как возбуждающие, и как тормозные. Развитие возбуждения или торможения в этих случаях зависит не от природы медиатора, а от его рецептора на постсинаптической мембране.

К числу медиаторов относят также серотонин, адреналин, гистамин, некоторые пептиды. Не для всех этих веществ имеются достаточно надежные доказательства их медиаторной функции. С другой стороны, есть основания предполагать, что сейчас известны далеко не все медиаторы.

ПЕПТИДЫ НЕРВНОЙ ТКАНИ

В последние годы обнаружилось, что медиаторные функции в синапсах ряда нейронов могут выполнять специальные пептиды. Они обычно имеют небольшой размер (трипептиды, тетрапептиды), но есть и такие, которые построены из десятков аминокислот. В настоящее время имеются экспериментальные данные о медиаторной функции примерно полутора десятков разных пептидов; некоторые из них указаны в табл. 23.3. Многие из этих пептидов, подобно норадреналину и адреналину, функционируют не только как медиаторы, но и как гормоны, т. е. передают информацию через циркулирующие жидкости организма. Нейропептиды синтезируются в нейронах мозга и в некоторых клетках кишечника — вероятно, в тех, которые образуются из общих для них и нейронов эмбриональных клеток.

Энкефалины и эндорфины имеются в спинном мозге — в сенсорных нейронах, воспринимающих чувство боли, и в нейронах лимбической системы, регулирующих эмоции. Эти пептиды образуются путем частичного гидролиза белков-предшественников. В частности, проопиомеланокортин служит предшественником кортикотропина, β-липотропина, β-эндорфина и метионин-энкефалина (рис. 23.4). Пептид β-липотропин был известен давно и своим названием обязан тем, что в

Таблица 23.3. Некоторые пептиды нервной системы

Название	Строение
Метионин-энкефалин	Arg–Tyr–Gly–Gly–Phe–Met
Холецистокинин-8	Asp–Tyr–Met–Gly–Trp–Met–Asn–Phe
Вещество P	Arg–Pro–Lys–Pro–Gln–Gln–Phe–Phe–Gly–Leu–Met
Нейротензин	пиро–Glu–Leu–Tyr–Glu–Asn–Lys–Pro–Arg–Arg–Pro–Tyr–Ile–Leu
Вазоактивный кишечный пептид	1 26 His–…–Asn
Брадикинин	Arg–Pro–Pro–Glu–Phe–Ser–Pro–Phe–Arg
Ангиотензин II	Asp–Arg–Val–Tyr–Val–His–Pro–Phe
Тиролиберин	пиро–Glu–His–Pro
Соматостатин	Ala–Gly–Cys–Lys–Asn–Phe–Phe–Trp–Lys–Thr–Phe–Thr–Cys

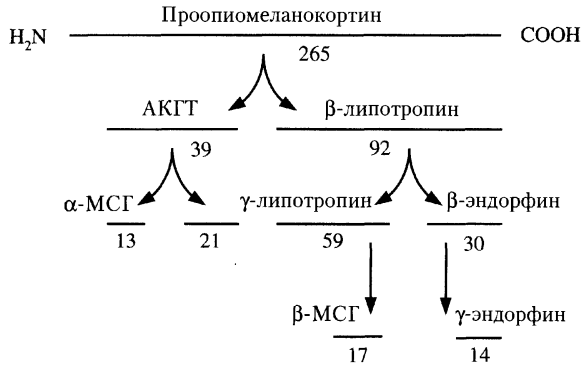


Рис. 23.4. Процессинг проопиомеланокортина.

Указано число аминокислотных остатков в пептидах; МСГ — меланоцитстимулирующий гормон

небольшой мере активирует липолиз в жировой ткани, однако его физиологическая функция, вероятно, не связана с этим свойством. Сходные механизмы образования из единого предшественника обнаружены и для других нейропептидов и пептидных гормонов.

Известны две формы холецистокинина — одна из них построена из 33 аминокислотных остатков, другая — из 8. Холецистокинин-8 образуется из холецистокинина-33 в результате частичного протеолиза. Холецистокинин содержится в мозге, в том числе в коре мозга, и в ткани кишечника. В кишечнике он функционирует как местный гормон, стимулируя сокращение желчного пузыря и секрецию сока поджелудочной железы. Функции холецистокинина в мозге неясны. Содержание холецистокинина во всей коре мозга человека составляет 1–2 мг, в то время как другие нейропептиды измеряются в мкг. И в мозге, и в кишечнике преобладающей формой является холецистокинин-8.

Вещество P обнаружено в сенсорных нейронах спинного мозга, где оно функционирует как медиатор, и в тканях кишечника, где выполняет функции местного гормона. Оно вызывает сокращение гладких мышц кишечника, стимулирует слюноотделение, снижает кровяное давление (расширяет сосуды).

Ангиотензин II участвует в регуляции водно-солевого обмена и объема циркулирующей жидкости. Все компоненты ренин-ангиотензиновой системы есть в мозге. Область мозга вокруг третьего желудочка ответственна за появление жажды. Введение в желудочек ангиотензина II вызывает жажду, а также стимулирует секрецию антидиуретического гормона. Кроме того, ангиотензин II оказывает прямое центральное вазопрессорное действие. С нарушением центральной регуляции кровяного давления ангиотензином II, возможно, связано возникновение эссенциальной гипертонии, поскольку у таких больных обнаружена повышенная концентрация ангиотензина II в спинномозговой жидкости.

Соматостатин обнаружен в разных отделах мозга и в кишечнике. Он ингибирует секрецию гипофизарных гормонов — соматотропина, тиротропина и пролактина. Функции соматостатина в других отделах мозга неизвестны. В пищеварительном тракте соматостатин действует как местный гормон, ингибируя секрецию глюкагона, инсулина и гастрина.

Медиаторные функции нейропептидов и регулируемые ими физиологические процессы изучены недостаточно. Возможно, что некоторые из нейропептидов не являются сами медиаторами, но влияют на медиаторные функции других веществ.

Обратим внимание на расплывчатость границ между понятиями «медиаторы» и «гормоны». Либерины и статины, секреция которых в гипоталамусе стимулируется нервным импульсом, проходят небольшой путь до гипофиза и, действуя через специфические рецепторы мембран, стимулируют или ингибируют секрецию гормонов гипофизарными клетками. Либерины и статины можно рассматривать как гормоны местного действия. С другой стороны, каналы, соединяющие клетки гипоталамуса с клетками гипофиза, можно рассматривать как «растянутые синапсы», а либерины и статины — как медиаторы в этих синапсах.

Клетки мозгового вещества надпочечников (хромаффинные клетки), синтезирующие адреналин и норадреналин, имеют общего эмбрионального предшественника с адренергическими нейронами. Хромаффинные клетки модифицировались таким образом, что в ответ на нервный импульс выделяют медиатор не в синаптическую щель, а в межклеточную жидкость, откуда она попадает в кровь. Вероятно, такие же отношения существуют между медиаторной функцией пептидов в мозге и гормональной функцией тех же пептидов в кишечнике.

Отметим, что медиаторы из типичных синапсов частично тоже диффундируют в межклеточную жидкость и попадают в кровь, и наоборот — из крови могут проникать в синапсы. Последнее свойство позволяет выяснить, какие физиологические функции регулируются данным медиатором. Например, введение в кровь экспериментальному животному ацетилхолина вызывает такие же реакции органов, как и раздражение электрическим током холинергических нервов. На этом же свойстве — способности проникать из крови в синапсы — основано применение медиаторов и их аналогов в качестве лекарственных средств.

СОЕДИНЕНИЯ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЕРЕДАЧУ НЕРВНЫХ ИМПУЛЬСОВ

Большое значение для изучения биохимии синапсов и физиологических функций разных отделов нервной системы имеют поиски и использование в экспериментах

in vitro и *in vivo* веществ, изменяющих синаптическую передачу нервных импульсов. Многие соединения такого рода влияют на психические функции, эмоциональное состояние и поведение. Эти исследования позволили понять механизм действия ряда лекарств и токсинов и, главное, наметить пути целенаправленного создания новых лекарств для лечения нарушений функций нервной системы, в том числе для лечения психических заболеваний (психотропные средства).

Все вещества, которые ингибируют развитие потенциала действия, могут ингибировать не только проведение нервного импульса по аксону, но и синаптическую передачу, поскольку она связана с образованием потенциала действия на постсинаптической мембране. Кроме того, в синапсе протекают и другие процессы, на которые может быть направлено действие разных веществ. Основные из этих процессов следующие:

1) синтез медиатора;
2) освобождение медиатора в синаптическую щель;
3) взаимодействие медиатора с рецептором;
4) устранение медиатора (инактивация или удаление из синаптической щели).

Известно много веществ, влияющих на передачу в синапсах с разными медиаторами. Сведения о некоторых из этих веществ приведены в табл. 23.4.

Таблица 23.4. Соединения, влияющие на синаптическую передачу нервного импульса

Название соединения	Характеристика соединения и его действия
Холинергические синапсы	
Ботулотоксин	Белок анаэробных микроорганизмов клостридий. Ингибирует освобождение ацетилхолина из синаптических пузырьков. Может быть причиной отравлений при потреблении плохо хранившихся мясных, рыбных и грибных продуктов
Никотин	Алкалоид табака. Имитирует действие ацетилхолина на «никотиновые» рецепторы
Мускарин	Алкалоид гриба-мухомора Amanita muscaria. Имитирует действие ацетилхолина на «мускариновые» рецепторы
Тубокурарин	Основной компонент яда кураре, получаемого из некоторых южноамериканских растений. Блокирует рецепторы в нервно-мышечных синапсах скелетной мускулатуры. Применяется в качестве миорелаксанта
Дитилин	Синтетическое соединение с высокой курареподобной активностью. Применяется как миорелаксант
б-Бунгаротоксин	Пептид яда змей бунгаров (крайтов) из семейства аспидов. Блокирует никотиновые рецепторы
Атропин	Алкалоид растений семейства пасленовых. Блокирует мускариновые рецепторы. Применяется при лечении болезней, связанных со спазмами гладкой мускулатуры, а также для расширения зрачка при обследовании глазного дна
Физостигмин	Алкалоид калабарских бобов. Ингибирует ацетилхолинэстеразу; применяется при лечении глаукомы
Адренергические синапсы	
Дигидроэрготамин	Продукт восстановления эрготамина, алкалоида спорыньи. Блокирует α-адренорецепторы. Применяется при лечении мигрени

Продолжение табл. 23.4

Название соединения	Характеристика соединения и его действия
Адренергические синапсы	
Анаприлин (пропранолол)	Синтетическое вещество. Блокирует β-адренорецепторы. Применяется при лечении стенокардии, нарушений сердечного ритма, некоторых форм гипертонии
Имизин	Синтетическое вещество. Ингибирует обратный перенос катехоламинов из синаптической щели в нервное окончание. Применяется при лечении депрессивных психозов
Ипразид	Синтетическое вещество. Ингибирует моноаминоксидазу и тем самым повышает концентрацию катехоламинов в синапсах. Применяется при лечении депрессивных психозов
Резерпин	Алкалоид раувольфии. Ингибирует депонирование катехоламинов в синаптических пузырьках. Применяется как лекарство, снижающее кровяное давление, и при лечении шизофрении
Глициновые синапсы	
Стрихнин	Алкалоид семян чилибухи. Связывается с глициновыми рецепторами, ингибируя присоединение к ним глицина. Применяется как тонизирующее средство; при передозировке возникают судороги
Пептидные синапсы	
Морфин	Алкалоид опия, наркотик. Соединяется с энкефалиновыми рецепторами, имитируя их действие. Применяется как болеутоляющее средство
Налоксон	Синтетический препарат, структурный аналог морфина. Антагонист энкефалинов. Применяется как противоядие при отравлении морфином

Действие веществ, взаимодействующих с рецептором медиатора, может быть двояким. Одни из них вызывают деполяризацию постсинаптической мембраны, подобно медиатору, т. е. они имитируют действие медиатора. Такие лиганды называют агонистами или миметиками. Другие, присоединяясь к рецептору, не вызывают в нем изменений, обеспечивающих проведение импульса; с другой стороны, они блокируют присоединение медиатора — это антагонисты, или литики.

По действию такого рода лигандов различают два типа холинергических нейронов: никотиновые и мускариновые (никотин и мускарин — агонисты). Никотиновые рецепторы содержатся в нервно-мышечных синапсах скелетных мышц и в вегетативных ганглиях; мускариновые — в гладких мышцах и мозге. Эти два типа холинергических синапсов различаются также по действию на них антагонистов. Никотиновые синапсы блокируются курареподобными ядами и ядами змей семейства аспидов (например, кобры); мускариновые синапсы блокируются атропином. Некоторые антагонисты образуют очень прочные соединения с рецепторами и используются при выделении этих белков из гомогенатов синаптосом.

Ингибиторы ацетилхолинэстеразы прерывают проведение импульса, поскольку ацетилхолин не устраняется из синаптической щели и синапс оказывается не готовым к проведению следующего импульса. Ацетилхолинэстеразу ингибируют растительный алкалоид физостигмин и его синтетические аналоги (прозерин и др.).

Диалкилфосфаты, в частности диизопропилфторфосфат, ингибируют ацетилхолинэстеразу в очень низких концентрациях и поэтому исключительно токсичны: доза 0,5 мкг на 1 кг массы тела смертельна для животных. Диизопропилфторфосфат присоединяется к остатку серина в активном центре фермента; он ингибирует не только ацетилхолинэстеразу, но и протеолитические ферменты, имеющие серин в активном центре.

Норадреналиновые синапсы также существуют по меньшей мере в двух вариантах (α и β), различающихся по действию агонистов и антагонистов; α-рецепторы содержатся в синапсах гладких мышц желудочно-кишечного тракта, β-рецепторы — в сердце и скелетных мышцах.

Многие вещества, применяемые при лечении депрессивных состояний, — антидепрессанты (имизин, ингибиторы моноаминоксидазы) — разными путями увеличивают концентрацию катехоламинов в синаптической щели, так что стимуляция постсинаптической мембраны облегчается. Наоборот, резерпин уменьшает концентрацию катехоламинов в синаптической щели; с другой стороны, введение резерпина в кровь может вызвать психическую депрессию. Эти наблюдения привели к катехоламиновой гипотезе происхождения депрессии, согласно которой она связана с недостатком катехоламинов в мозге и снимается лекарствами, повышающими содержание катехоламинов в синаптической щели.

Для лечения шизофрении применяются аминазин и галоперидол: эти препараты блокируют дофаминовые рецепторы, с чем и связывают их лечебное действие. Вероятно, при шизофрении усилена дофаминергическая импульсация. Такие выводы подкрепляются наблюдениями другого рода. Фенамин повышает концентрацию дофамина в синаптической щели. Он применятся как средство, стимулирующее центральную нервную систему. С другой стороны, при многократном приеме больших доз фенамина развивается психоз с галлюцинациями и таким же поведением, как при параноидной шизофрении (разные формы психического и двигательного возбуждения). Аминазин и галоперидол снимают симптомы психоза, вызванного фенамином. Конечно, изложенные здесь представления о депрессии и психомоторном возбуждении при шизофрении, а также о действии лекарств являются лишь первым приближением к пониманию молекулярных механизмов этих крайне сложных явлений. Но значение их в том, что они указывают, в каком направлении сделать последующие шаги.

Издавна известно, что алкалоиды опиума — морфин и другие опиаты — снимают боль (анальгетическое действие) и вызывают эйфорию. Поиски молекул-мишеней, на которые первично действует морфин, привели к открытию белков — «опиатных» рецепторов. А затем были найдены и естественные лиганды этих рецепторов — энкефалины. Энкефалиновые рецепторы и сейчас часто называют опиатными рецепторами. Опиаты являются агонистами энкефалинов.

Алкалоиды опия — наиболее эффективные болеутоляющие лекарства. Однако они обладают существенным недостатком — их употребление приводит к возникновению патологического пристрастия (наркомания). Открытие энкефалинов — естественных лигандов тех белков, с которыми соединяются опиаты, ставит поиски болеутоляющих средств на рациональную основу: изучив пространственную структуру энкефалинов и структуру активного центра их рецептора, можно наде-

яться, что удастся синтезировать аналоги энкефалинов, обладающие столь же сильным обезболивающим действием, как морфин, но не являющиеся наркотиками.

ЗРЕНИЕ

Первичное образование нервных импульсов, циркулирующих в нервной системе, происходит в сенсорных окончаниях афферентных нервов в органах чувств и во внутренних органах. Именно здесь находится первое звено длинной и разветвленной цепи событий, в результате которых энергия внешнего воздействия превращается в факт сознания, а также в неосознаваемые реакции органов. В большинстве случаев неизвестно, какие молекулы в сенсорных окончаниях воспринимают химические, механические, термические воздействия и трансформируют их энергию в потенциал действия. Лучше других изучено восприятие света.

Сетчатка глаза человека содержит рецепторные клетки двух типов — палочки и колбочки. Палочки отличаются большей светочувствительностью — всего пяти квантов света достаточно, чтобы вызвать нервный импульс. Они предназначены для зрения при малой освещенности и дают черно-белую картину. Колбочки обеспечивают цветовое зрение. Существует три вида колбочек — чувствительные к синей, зеленой и красной частям спектра.

Родопсин

Молекулой, воспринимающей свет в палочках сетчатки, является родопсин, или зрительный пурпур. Родопсин находится в мембранных структурах — дисках, заполняющих наружный сегмент палочки (рис. 23.5). Каждый диск представляет собой замкнутый уплощенный мембранный пузырек; палочка содержит около тысячи дисков, уложенных в стопку. Диски синтезируются в прилегающем (внутреннем) сегменте палочки и отсюда поступают в наружный сегмент. С противоположного конца наружного сегмента время от времени отделяются части этого сегмента и фагоцитируются клетками пигментного эпителия. Процесс образования новых дисков и удаления старых происходит на протяжении всей жизни.

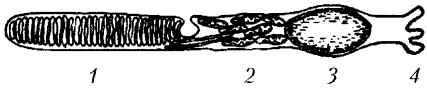


Рис. 23.5. Строение зрительной палочки:

1 — наружный сегмент, содержащий диски; 2 — внутренний сегмент, содержит много митохондрий; *3* — ядерная область; *4* — синаптическое тельце

Основной белок мембранных дисков — родопсин: на его долю приходится около 80 % от всех белков мембраны. Молекула родопсина пронизывает мембрану насквозь. Родопсин — это сложный белок, содержащий в качестве простетической группы 11-цис-ретиналь, одну из форм витамина А (рис. 23.6); цис-ретиналь служит первичным акцептором фотонов. При попадании света на сетчатку происходит изомеризация 11-цис-ретиналя в транс-ретиналь за счет энергии поглощенного света (рис. 23.7). Геометрия молекулы ретиналя при таком превращении зна-

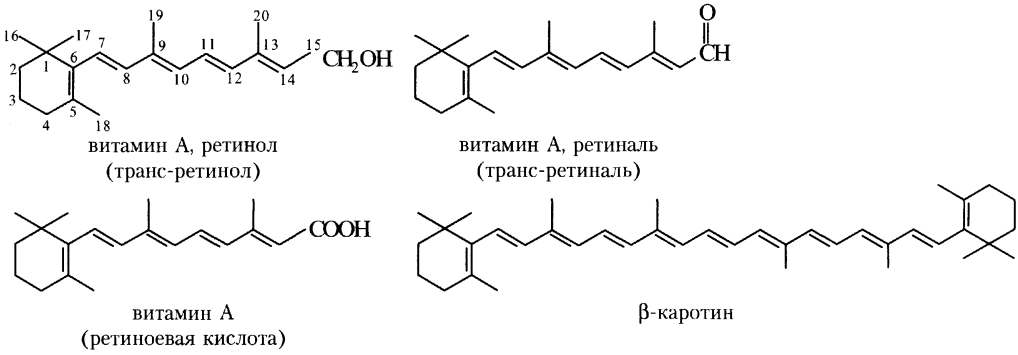


Рис. 23.6.

чительно изменяется, и утрачивается соответствие между его структурой и структурой центра связывания на опсине — белковой части родопсина; в результате происходит диссоциация родопсина на опсин и транс-ретиналь:

$$\text{Родопсин} \xrightarrow{h\nu} \text{Опсин} + \text{транс-ретиналь}$$

Вследствие отщепления ретиналя изменяется и конформация белковой части, т. е. опсина.

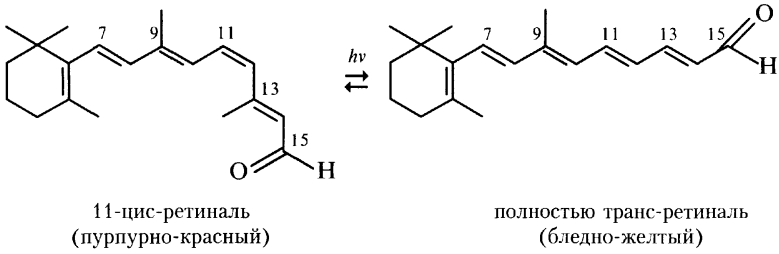


Рис. 23.7. Изомеризация 11-цис-ретиналя в транс-ретиналь

Родопсин имеет красный (пурпурный) цвет, который ему придает цис-ретиналь; транс-ретиналь практически бесцветен. Поэтому при освещении родопсин обесцвечивается. Это легко наблюдать на изолированной сетчатке: при выдерживании в темноте в течение нескольких часов сетчатка лягушки или кролика становится красной, а при освещении обесцвечивается за несколько минут.

Для повторного участия в восприятии света транс-ретиналь вновь должен превратиться в цис-ретиналь и вместе с опсином образовать родопсин. Это происходит в результате действия ретинальизомеразы (рис. 23.8). Возможно также обратимое превращение транс-ретиналя в транс-ретинол.

Изомеризация в цис-форму происходит также и в печени. В крови в норме постоянно содержится ретинол в соединении с ретинолсвязывающим белком плазмы; этот комплекс улавливается пигментным эпителием сетчатки, и ретинол поступает в зрительные клетки. Соединение 11-цис-ретиналя с опсином, т. е. образование родопсина, происходит без участия ферментов.

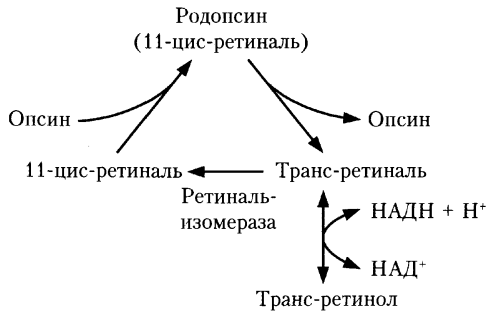


Рис. 23.8. Кругооборот 11-цис-ретиналь/транс-ретиналь в зрительных палочках

В темноте зрительная клетка деполяризована (натриевые каналы открыты); в этих условиях синаптическое тельце зрительной клетки выделяет много медиатора, который оказывает тормозящее действие на постсинаптические нейроны (рис. 23.9). При освещении выделение медиатора замедляется, постсинаптический нейрон растормаживается, и возникающий в нем нервный импульс передается в зрительную область мозга: это происходит в результате сложного каскада процес-

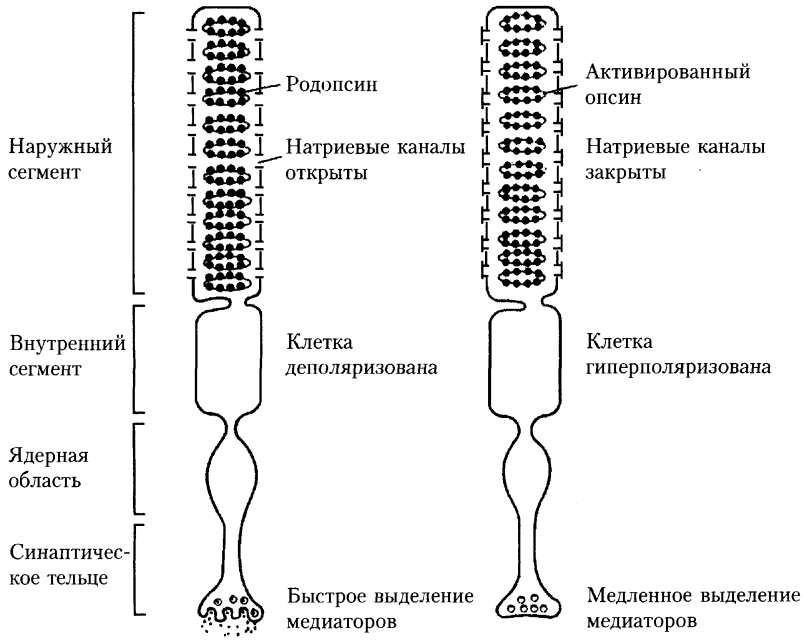


Рис. 23.9. Состояние зрительных палочек в темноте и при освещении

сов (рис. 23.10). После поглощения фотона и отщепления ретиналя от родопсина образуется опсин. Опсин активирует трансдуцин (белок семейства G-белков), который, в свою очередь, активирует цГМФ-фосфодиэстеразу. Снижение концентрации цГМФ приводит к закрытию натриевых каналов, гиперполяризации палочки и замедлению выделения медиатора: постсинаптический нейрон растор-

маживается, сигнал передается в мозг. Чем ярче освещение, тем меньше выделение медиатора.

Поглощение фотона
↓
Активация опсина
↓
Активация трансдуцина
↓
Активация цГМФ-фосфодиэстеразы,
гидролиз цГМФ
↓
Закрытие натриевых каналов,
гиперполяризация палочки
↓
Замедление выделения медиатора
↓
Снижение тормозящего действия медиатора
на постсинаптические нейроны
↓
Прием сигнала постсинаптическим нейроном,
передача в зрительную область мозга

Рис. 23.10. Последовательность молекулярных событий в палочках сетчатки при реакции на свет

В колбочках, обеспечивающих цветовое зрение, обнаружено три пигментных белка, поглощающих свет разных областей спектра — синей, зеленой и красной (максимумы поглощения при длинах волн 430, 540 и 575 нм соответственно). По-видимому, частью, улавливающей свет, во всех трех белках является также 11-цис-ретиналь, а чувствительность к свету с различной длиной волны определяется белками (опсинами), с которыми он соединен. Наследственные нарушения цветового зрения (дальтонизм) связаны с дефектами того или иного опсина колбочек.

Витамин А

Витамин А, жирорастворимый витамин, в организме человека представлен тремя формами — ретинол (спирт), ретиналь (альдегид) и ретиноевая кислота. Ретиноевая кислота функционирует подобно стероидным гормонам — при посредстве внутриклеточных рецепторов регулирует транскрипцию некоторых генов.

Витамин А поступает с пищей, с такими продуктами, как печень, а также жирная рыба. Однако главным источником витамина А для человека являются зеленые овощи, фрукты и некоторые корнеплоды (морковь, свёкла). Эти растительные продукты содержат каротины — вещества, родственные по структуре витамину А (см. рис. 23.6). В организме человека молекула каротина превращается в две молекулы витамина А.

При недостатке в пище витамина А развивается куриная слепота — самый ранний признак гиповитаминоза. При куриной слепоте увеличивается зрительный порог, т. е. минимальная интенсивность света, которая еще вызывает зрительное ощущение. У страдающих куриной слепотой зрительный порог может быть в сотни раз больше, чем в норме, и они не видят в сумерках.

Витамин А и его производные участвуют не только в восприятии света, но и в других процессах: недостаточность витамина влияет на развитие и функции практически всех органов.

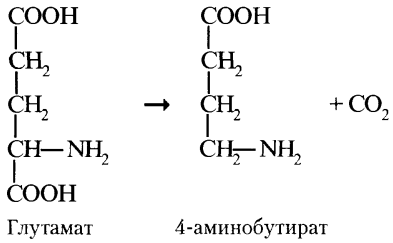
МЕТАБОЛИЗМ МОЗГА

Мозг обеспечивается энергией почти полностью за счет аэробного распада глюкозы. В покое примерно 20 % потребляемого человеком кислорода используется в мозге, в то время как масса мозга составляет только 2 % массы тела. За сутки в мозге окисляется 100–120 г глюкозы. Лишь при голодании и длительной мышечной работе начинают использоваться кетоновые тела, окисление которых может обеспечивать в этих условиях до половины потребности мозга в энергии. В ткани мозга имеется лактатдегидрогеназа, однако мозг не выделяет в кровь молочную кислоту. Более того, при мышечной работе мозг поглощает молочную кислоту из крови. По-видимому, лактатдегидрогеназа и система лактат-пируват играет роль своего рода буфера, регулирующего концентрацию пирувата.

Основным потребителем энергии в мозге является Na,K-АТФаза, поддерживающая потенциал покоя и восстанавливающая его после прохождения нервного импульса. Преимущественное потребление глюкозы делает мозг в высокой степени чувствительным к гипогликемии, а аэробный характер катаболизма глюкозы делает его чувствительным к гипоксии.

Мозг отличается характерным набором свободных аминокислот: примерно 75 % аминокислот составляют аспарат, глутамат и их производные — глутамин, 4-аминомасляная кислота, N-ацетиласпартат.

Предшественником 4-аминомасляной кислоты служит глутаминовая кислота:



Реакция катализируется глутаматдекарбоксилазой. Напомним, что 4-аминомасляная кислота является нейромедиатором.

В ткани мозга постоянно образуется аммиак; его непосредственным источником служит дезаминирование АМФ. Вероятно, дезаминирование АМФ, как в мышцах, является частью какого-то регуляторного механизма. Образующийся аммиак связывается с глутаматом и в форме глутамина покидает мозг. Регенерация АМФ из ИМФ происходит по пути, описанному в гл. 11; при этом первичным источником аминогруппы служат разные аминокислоты, а промежуточными переносчиками — глутамат и аспарат. Таким образом, первичным источником аммиака в мозге являются аминокислоты.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Абсорбтивное состояние 267
Авитаминозы 182
Агликогенозы 263
Агрекан 441, 442
Аденилаткиназа 273, 527
Аденилатциклаза 95, 213, 214
Адениловая кислота см. Аденозин-5"-монофосфат
Аденин 102
S-Аденозилгомоцистеин 354,
S-Аденозилметионин (SAM) 353, 354
Аденозин 103
Аденозин-5"-монофосфат 103, 368
Аденозинтрифосфат 67, 103, 226
Аденозинтрифосфатазы транспортные 209, 210
Аденозинтрифосфатсинтаза (H^+-АТФ-синтаза) 232
Адипоциты 304, 307
Адреналин 270, 271, 360, 382
Адренокортикотропный гормон 403
Адренорецепторы 270, 271
Азидотимидин 171
Азота оксид 525
Азотистый баланс 330, 331
Активный транспорт 187, 208, 250, 388, 389
Активный центр 49, 65, 71, 90, 91, 275
Актин 60, 219, 520, 523
Актомиозин 521, 524
Аланин 345, 346, 347,
Алкалоз 349, 388, 396, 502
Алкаптонурия 125, 360
Алкогольдегидрогеназа 277
Аллеломорфизм белков 164
Аллопуринол 372, 375
Аллостерическая регуляция 92, 93, 94, 315
Альбинизм 361
Альбумин 503, 504
Альбуминурия 417, 504
Альдостерон 383, 394, 405
Амилаза 249, 250
Аминоацил-тРНК 134, 135, 137
Аминоацил-тРНК-синтетазы 131, 134, 135
n-Аминобензойная кислота 351
Аминокислоты
– гликогенные 340, 411

– незаменимые 181, 331, 341
– дезаминирование 336, 337, 338, 348
– трансаминирование 70, 335
Аминокислотный код см. Биологический код
Аминолевулиновая кислота 489
4-Аминомасляная кислота 540, 550
Аминопептидаза 334
Аминоптерин 378
Аминотрансферазы 71, 335, 336
Аммиак 337, 343, 346, 347, 348, 350
Аммониемия 350
Анаболизм 186, 187
Анаплеротические реакции 243, 244, 406
Анаэробный гликолиз 258, 259, 494
Анемия
– гемолитическая 210
– железодефицитная 492
– злокачественая 182, 183, 184
– мегалобластная 356
– серповидноклеточная 26, 60, 159, 169
Ангиотензин 21, 393, 394
Антибиотики 152
Антигены 476, 477, 483, 487
Антидепрессанты 545
Антидиуретический гормон 381, 390, 392, 394
Антикоагулянты 514, 515, 516
Антикодон 111, 135
Антиоксиданты 455, 456, 495
Антипорт 211, 349
Антитела 167, 476
Антитромбин 514
Аполипопротеины 302, 316, 320
Апоптоз 156, 157, 472, 484
Апофермент 70, 74, 75
Арахидоновая кислота 287, 288, 295, 385
Аргиназа 343, 350
Аргинин 340, 343, 345, 526
Аргининсукцинат 344
Аскорбиновая кислота 186, 434, 435
Аспарагин 29, 100, 341
Аспарагиназа 100
Аспарагиновая кислота 18, 341, 372
Аспарагинсинтетаза 341
Аспирин 385, 386, 465
Атеросклероз 169, 287, 324, 416
Атриальный натриуретический пептид 394
Атропин 543
Аутокринная регуляция 192, 386
Аутофагия 220, 221
Афлатоксины 471
Ацетальдегид 277
N-Ацетилгалактозамин 202, 281, 441
N-Ацетилглюкозамин 166, 441
Ацетил-КоА 235, 236, 243
Ацетил-КоА-карбоксилаза 296, 306
N-Ацетилнейраминовая кислота 202, 281, 285
Ацетилхолин 52, 53, 170, 537, 538
Ацетилхолинэстераза 88, 170, 539
Ацетоацетат 309, 359
Ацетоацетил-КоА 309
Ацетон 54, 410, 414
Ацидоз 309, 349, 414, 502
Ацилирование 76, 366
Ацил-КоА-синтетаза 76, 78, 289, 296
Ацил-КоА-холестерин-ацилтрансфераза (АХАТ) 316
Ацилтрансферазы 77, 78, 290
Аэробный гликолиз 254, 275

Б

Базальные мембраны 432, 448
Бактериальные токсины 153, 395
Бактериофаги 118, 150, 151
Белки
– главного комплекса гистосовместимости 474, 481, 483
– теплового шока см. Шапероны
– хроматина 114, 115, 116
Белые мышцы 528
Бензантрацен 469
Бензпирен 470
Бери-бери 181, 184
Биливердин 461, 462
Билирубин 462, 466, 467
Билирубинглюкурониды 461
Биологический код 132, 133
Биотин 244, 292
1,3-Бисфосфоглицерат 74, 255, 264, 494
2,3-Бисфосфоглицерат 494, 496
Бифункциональный фермент (БИФ) 85, 274, 275
Бора эффект 501, 502
Брожение 61, 259

В

Вазопрессин см. Антидиуретический гормон
Валин 22, 244, 291
Векторная ДНК 172, 174, 175
Ветвления фермент 261
Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) 171, 485, 486
Вирусы 118, 150, 154, 171, 172
Витамины 69, 70, 181,
Водородные связи 27, 31, 33, 106, 111, 121
Вторичная структура белков 27, 28, 29, 138
Вторично-активный транспорт 208, 211, 212
Высокоэнергетические соединения 68, 227

Г

Галактоза 141, 166, 202, 250, 276
Галактоземия 277
Галактозидазы 141, 142
Ганглиозиды 202, 327
Гаптен 476, 477
Гексокиназа 33, 91, 97, 253, 408
Гексуроновые кислоты 440
Гель-фильтрация 17, 45, 56
Гем 41, 230, 490
Гемоглобин
– варианты 165
– плода 51
– функции 489
Гемопротеины 41, 229
Гемофилия 504, 514, 517
Генетический код см. Биологический код
Генная инженерия 171, 172, 174, 419
Геном человека 123, 146
Гены
– антител 479, 480
– вирусов 150, 151, 485
– клонирование 147, 171, 173, 174
– мутации 158, 171, 473, 517
– регуляция действия 141, 143, 145
– транспозиция 479
– эволюция 161, 163, 165

Гепарансульфаты 440, 441, 444
Гепарин 398, 440, 514
Гетерополисахариды 223, 248, 280, 285
Гетерофагия 220, 221
Гиалуроновая кислота 441, 443, 448
Гибридизация нуклеиновых кислот 110, 112, 113
Гидроксиапатит 422
Гидроксилазы 191, 317, 424, 435, 458
Гидроксимасляная кислота 308
Гидроксиметилглутарил-КоА 309, 314
Гидроксипролин 18, 47, 140, 437, 447
Гидроксифенилпируват 359
Гидролазы 79
Гидрофильные группы 46, 47, 203, 460
Гидрофобные взаимодействия 31, 39, 107, 115, 204, 206
Гиперальдостеронизм 404
Гипераммониемия 350, 351, 375
Гиперглюкоземия 402, 404, 412, 421
Гипертензия почечная 451
Гипогликемия 404, 550
Гипоксантин 367, 369, 372
Гипоксия 247, 489, 523, 550
Гипохлорит 457
Гистамин 333, 361, 363
Гистидаза 65, 338, 362
Гистидин 41, 65, 338, 361
Гистидиндекарбоксилаза 65
Гистидинемия 99, 362
Гистоны 114,
Гликирование белков 415, 416, 418 449
Гликоген
– депонирование 268
– мобилизация 248, 263, 268
Гликогенные аминокислоты 340, 411
Гликогеновые болезни 263
Гликогенсинтаза 269, 270, 271
Гликогенфосфорилаза 262, 269, 285, 407
Гликозамингликаны 440, 442
Гликозидазы 79, 249, 444
Гликозидозы 285, 444
Гликозилтрансферазы 261, 282, 443
Гликолиз 254, 258, 264, 527
Гликолипиды 200, 280, 281, 326
Гликопротеины 197, 204, 280, 439
Гликофорин 204
Гликохолевая кислота 298
Гликоцерамиды 281
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа 74, 279
Глицерин 79, 299
Глицерофосфат 77, 257, 300
Глицерофосфатный челночный механизм 257
Глицерофосфолипиды 198, 199, 326, 327
Глицин 317, 351, 490
Глобины 41, 131, 159, 493
Гломерулярная фильтрация 349
Глутаминовая кислота 66, 337, 342, 455
Глутаматдегидрогеназа 74, 336, 348
Глутамин 67, 341, 367, 550
Глутаминаза 68, 347, 349
Глутаминсинтетаза 68, 340, 348
Глутатион 455, 456, 495
Глутатионпероксидаза 455
Глутатионредуктаза 456
Глюкагон 268, 381, 401, 407
Глюкоза
– в крови 251, 263, 311, 402
– катаболизм 248
– синтез 264
– трасмембранный перенос 208
Глюкозоаланиновый цикл 266
Глюкозолактатный цикл 266

Глюкозо-1-фосфат 253, 260, 262
Глюкозо-6-фосфат 253, 261, 406
Глюкозо-6-фосфатаза 253
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 278, 306, 495
Глюкозурия 212, 213, 402, 412
Глюкокиназа 97, 253, 406, 421
Глюкокортикостероиды 381, 383, 402, 403
Глюконеогенез 264, 273, 402, 413
Глюконолактон-6-фосфат 278
Глюкуронилтрансфераза 460, 464, 466
Голодание 247, 262, 310
Гомогентизиновая кислота 125, 359
Гомоцистеин 328, 355, 356
Гомоцистинурия 356
Гормоны 191, 213, 380, 464
Группы крови 166, 167, 281
Гуанидинуксусная кислота 354
Гуанилатциклаза 524, 525
Гуанин 102, 106, 372
Гуанозин 103, 372

Д

ДДТ 405, 467, 468
Дегидроаскорбиновая кислота 434, 435
Дегидрогеназы 72, 73, 75, 226, 237
Дезаминирование аминокислот 336, 337
Дезоксиаденозилкобаламин 183
Дезоксирибоза 102
Дезоксирибонуклеиновая кислота
- гибридизация 112, 113
- рекомбинантная 171, 172, 173, 175
- репарация 155, 472
- репликация 117, 121, 151, 188
Дезоксирибонуклеозиды 120
Дезоксирибонуклеопротеины 114
Дезоксирибонуклеотиды 103, 375, 377
Дезоксихолевая кислота 317
Декарбоксилирование
- аминокислот 241, 339, 375
- α-кетокислот 339
Делеции 159, 160
Денатурация белков 35, 36, 47, 335
Денатурация нуклеиновых кислот 110, 111
Диабет сахарный 309, 412, 418, 487
Диарея 251, 395
Диацилглицерины 214, 215
Дигидроксиацетонфосфат 255
Дигидроксифенилаланин (ДОФА) 360, 361, 539
Дигидроксифенилэтиламин (Дофамин) 360, 361, 539
Дигидролипоевая кислота 236, 237
Дигидрооротовая кислота 373, 374
Дигидрофолат 378
Дигидрофолатредуктаза 378
Диизопропилфторфосфат 88, 545
Дикумарол 517
2,4-Динитрофенол 234
Диоксид углерода
- образование при тканевом дыхании 225, 488
- транспорт кровью 500, 501
Диоксифенилаланин 360, 361, 539
Дипептидазы 334
Дисахариды 250, 251
Дисульфидная связь 30, 31
Дитилин 52, 53, 170
Дифтерийный токсин 153, 395
Диффузия
- облегченная 207, 212, 251
- простая 207
ДНК
- клонирование 147, 171, 173
- митохондриальная 147

– мутации 155, 158, 163, 171
– повреждения 155, 160, 163, 189, 453, 472
– рекомбинантная 171, 172, 173
ДНК-зонды 113, 159
ДНК-лигаза 123, 157
ДНК-полимераза 120, 148, 188
Долихолфосфат 282
Доменные белки 34, 293
ДОФА см Диоксифенилаланин
Дофамин 360, 539, 545
Дыхательная цепь 228, 231, 241
Дыхательный контроль 234, 241, 430

Е

Единицы активности ферментов 83, 84

Ж

Железо 41, 230, 490, 492
Железодефицитная анемия 493, 517
Желтуха 462, 463
Желчнокаменная болезнь 287, 319, 320
Желчные кислоты 298, 317
Жирные кислоты
– биосинтез 291
– катаболизм 2 90
– перекисное окисление 323, 454
Жиры
– биосинтез 299
– депонирование 309
– мобилизация 307, 310
– переваривание 297, 299, 399
– транспорт 297, 302, 305, 307

З

Заменимые аминокислоты 248, 340, 341, 342
Замены нуклеотидов 159
Затравка 121, 148, 261
Злокачественная анемия 182
Зрительный пурпур см. Родопсин

И

Изобелки 51, 163, 164
Изолейцин 291, 340, 341
Изомеразы 79, 548
Изониазид 465, 466
Изоферменты 97, 134, 259, 459
Изоцитрат 238, 340
Изоэлектрическая точка 46, 56
Иммуноглобулины
– антитела 474, 481
– белки главного комплекса гистосовместимости 481
– Т-рецепторы 481
Иммунный ответ 221, 419, 474, 480
Ингибиторы
– аллостерические 92, 93, 194, 374
– лекарственные вещества 88
– токсичные 378
Индукция синтеза белков 141, 472
Инициация трансляции 129, 136
Инициирующий кодон 136
Инозиновая кислота 337, 367
Инозит 326
Инозитолтрифосфат 215, 380, 393
Инсулин
– мишени действия 407, 408
– регуляция секреции 251, 405
– рецептор 217, 222, 270

Интегрины 447, 448
Интерфероны 154, 174, 384, 526
Интроны 129, 131, 172
Информационная РНК см. Матричная РНК
Иодтиреоглобулин 427, 428
Иодтиронины 427, 428, 429
Ионные каналы 208, 423, 524, 536
Ионные связи 35, 39, 70, 89
Иценко–Кушинга болезнь 404

К

Кальмодулин 96, 216, 271, 422, 521, 525
Кальциевые каналы 216, 533
Кальциевый насос 210, 211
Кальций
- в мышечном сокращении 522, 523, 524, 526
- в свертывании крови 504, 509
- регуляция обмена 381, 422, 423
Кальцитонин 381, 423, 425
Кальцитриол 381, 423, 424, 425
Кальцификация 325, 426
Канцерогены 468, 469, 471, 472
Карбамоилфосфат 93, 98, 345, 351, 373
Карбгемоглобин 498, 501
Карбоангидраза 396
Карбоксибиотин 244
Карбоксигемоглобин 500
Карбоксиглутаминовая кислота 508
Карбоксидипептидилпептидаза 393
Карбоксилазы 292, 508
Карбоксипептидаза 79, 89, 139, 334
Кардиолипины 329
Карнитин 289, 290, 297
Каротины 547, 549
Каскадные механизмы 272, 273, 507, 528
Катаболизм 186, 225, 235, 240, 241
Каталаза 78, 361, 455
Катализ 61, 62, 64
Катехоламины 358, 360, 361, 458, 545
Кератансульфат 442
Кератин 48, 126
Кетогенные аминокислоты 340
α-Кетоглутарат 71, 239, 243, 337, 434
α-Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс 238
Кетоновые тела 308, 410, 414
17-Кетостероиды 383
Кефалины 326
Киназа фосфорилазы 269, 270, 271, 273
Киназы 79
Кислород
- в тканевом дыхании 225
- токсичность 452, 453
- транспорт 43, 168, 495
Клатрин 219, 222
Клеточный цикл 123, 377
Клонирование генов 147, 171, 172, 174
Кобаламины 182, 183, 184
Кодон 132, 133, 159
Кокаин 536
Коллаген 140, 416, 433, 437, 439
Коллагеназа 447
Комплементарность 39, 49, 91, 119, 477
Комплементарная ДНК 147, 151, 159
Кортизол 145, 381, 402, 404
Кортикотропин см. Адренокортикотропный гормон
Кофакторы ферментов 68, 69, 422, 507
Кофермент А (КоА) 70, 76, 77, 236, 336
Кофермент Q см. Убихинон
Коэффициент седиментации 43, 44, 116

Крахмал 249, 311
Креатин 353, 354, 527, 529
Креатинин 100, 398, 529
Креатинкиназа 99, 527
Креатинфосфат 527, 528
Кребса цикл см. Цитратный цикл
Ксантин 370, 372
Ксантиноксидаза 370, 372
Ксилулозо-1-фосфат 279
Кураре 53

Л

Лактаза 141, 170, 251
Лактат 258, 266, 494
Лактатдегидрогеназа 74, 97, 550
Лактоза 141, 142, 170. 250
Ламинин 439, 440, 448
Ланостерин 314
Лейкоциты фагоцитирующие 452, 457, 488
Лейциновая застежка-молния 115, 116
Лецитин-холестерин-ацилтрансфераза (ЛХАТ) 316
Леша–Найхана синдром 371, 372
Лиазы 79, 80
Либерины 382, 403, 404
Лигазы 68, 80, 123, 157, 173
Лизин 114, 341, 435
Лизосомы 98, 219, 322, 428, 480
Лимонная кислота 12, 238
Лимфоциты 474, 475, 480, 487
Линолевая кислота 288, 296
Линоленовая кислота 288, 296, 385
Липаза 65, 94, 97, 297
Липидный бислой 202, 387, 510
Липоевая кислота 236, 237
Липопротеинлипаза 303, 304, 321, 413
Липопротеины 301,320, 323, 399
Липосомы 202, 206
Литохолевая кислота 317

М

Макроэргические связи 67, 226, 239
Малат 66, 239, 245, 292, 306
Малат-аспартатный челнок 257, 258, 336
Малатдегидрогеназа 239
Малик-фермент 245, 292
Малонил-КоА 292, 293, 408
Малоновый диальдегид 454
Малые ядерные рибонуклеопротеины (МЯРНП) 129
Мальтоза 250
Матрикс митохондрий 229, 233, 258, 292
Матричная РНК 110, 127, 131, 135, 145
Мевалоновая кислота 313, 314, 315
Мегалобластная анемия 356, 357
Меланины 361
Метаболизм 91, 97, 186
Металлопротеиназы 447, 449
Метастазирование 446, 475
Метгемоглобин 454, 493, 495
Метилирование 353, 464
Метилкобаламин 183, 355
Метилмалоновая кислота 183
Метионин 136, 340, 353, 354
Метотрексат 378
Миелин 312, 532, 533
Миелопероксидаза 457
Микросомальное окисление 458, 471
Микросомы 195, 459

Микросфероцитарная гемолитическая анемия 210
Микротрубочки 40, 526, 537
Минералокортикостероиды 381, 383
Минеральные вещества 186, 502
Миоглобин 27, 41, 42, 49, 162
Миозин 220, 518, 520, 522
Миофибриллы 518, 519, 521, 523
Митотический цикл см. Клеточный цикл
Митохондрии 221, 228, 292, 528
Мицеллы 56, 202, 205, 206, 299
Молочная кислота 258, 266
Моноаминоксидаза 361, 540
Монооксигеназы 454, 458
Морфин 545, 546
Моча 391, 393, 448
Мочевая кислота 398, 456
Мочевина 12, 98, 111, 179, 342
Мукополисахариды см. Гликозамингликаны
Мускарин 544
Мутагенез 157, 158
Мутации 155, 158, 171, 324, 421
Мышечное сокращение 187, 520, 521
Мышечные белки 529

Н

Наследственные болезни 168, 171
Натриевые каналы 533, 548, 549
Натриевый насос 209, 210, 430, 536
Натриуретический пептид 394
Незаменимые пищевые вещества 181
Нейраминовые кислоты 283
Нейромедиаторы 550
Нейропептиды 540, 541, 542
Нейтрофилы 477, 478, 526
Ненасыщенные жирные кислоты 288, 295, 297, 454
Нервный импульс 533, 546, 548
Нидоген 438, 440
Никотин 324, 544
Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) 72, 74
Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) 74, 245
Никотиновая кислота 73, 184
Нингидрин 22, 23
Нитрозамины 471, 472
Нитроксид (NO) 525, 526
Новокаин 536
Норадреналин 360, 537, 540
Нуклеозидфосфаты 103, 104, 239
Нуклеозиды 103, 366, 375
Нуклеопротеины 114
Нуклеосомы 49, 114, 115
Нуклеотидный код см. Биологический код

О

Облегченная диффузия 207, 212, 251
Одноуглеродные фрагменты 353
Оказаки фрагменты 122, 123
β-Окисление 289, 290, 408
Окислительно-восстановительный потенциал 231, 232
Окислительное дезаминирование 158, 336, 337, 348
Окислительное фосфорилирование 226, 239
Оксалоацетат 238, 258, 265, 274, 292
Оксигеназы 461
Оксидазы 78, 125, 339, 455

Оксид углерода 461
Оксидоредуктазы 78, 80
Окситоцин 382
Онкогены 469, 473
Олеиновая кислота 180, 288, 313
Оперон 142, 143, 158, 161
Опсин 547, 549
Ориджин 121, 123, 124
Орнитиновый цикл 345
Оротовая кислота 374, 375
Остеопороз 404

П

Пальмитилсинтаза 292, 293, 294
Пантотеновая кислота 76, 77, 184, 293
Паракринная регуляция 192, 384
Паратгормон 423, 424, 425
Пенистые клетки 325, 326
Пентозофосфатный путь 278, 408, 494
Пепсин 331, 332
Пептидгидролазы 79, 331, 447
Пептидная связь 20, 25, 29, 136
Пернициозная анемия см. Злокачественная анемия
Пероксид водорода 78, 361, 457, 495
Пероксидное окисление липидов 454, 456, 529
Пиноцитоз 219
Пиридоксальфосфат 70, 71, 72, 355
Пиридоксин 70, 71, 184
Пиримидиновые нуклеотиды 98, 102, 348, 372, 373
Пировиноградная кислота 72, 74, 235, 236, 258, 336, 529
Пируватдегидрогеназный комплекс 237, 238, 241, 242
Пируваткарбоксилаза 244, 264, 292
Пируваткиназа 34, 255, 274, 275
Пищевые вещества 179, 187, 247
Плазма крови 100, 170, 285, 502
Плазмиды 172, 173
Плазмин 447, 513
Плазминоген 57, 58, 513, 516
Подагра 169, 370, 375
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 147, 173
Полирибосомы 138, 223, 442
Половые гормоны 312, 383
Порфирия 491
Порфобилиноген 490
Постабсорбтивное состояние 267, 269, 308, 323
Праймер 120, 122, 123
Прегненолон 383, 384
Прогестерон 312, 381, 383
Проинсулин 139, 405, 419
Проколлаген 434, 435
Пролин 18, 22, 29, 47, 341
Промотор 127, 142, 145
Проопиомеланокортин 540, 541
Простагландины 385
Простетическая группа 37, 139, 236
Протеинкиназы
- А 94, 213, 269
- С 215, 216
- тирозиновая 217
Протеинфосфатазы 97, 241, 270
Протеогликаны 430, 432, 441, 443
Протеолипосомы 206
Протомеры белков 38, 39, 215
Протонный потенциал 211, 212, 232
Протоонкогены 469, 472
Протопорфирин 490
Протромбин 507, 508, 510, 516
Проферменты 97, 332, 507, 510, 517

Р

Рак 468, 469, 471, 472
Рахит 184, 425
Регуляторные элементы 143, 144
Рекомбинантная ДНК 171, 172, 173, 175
Ренин 393, 394
Репарация ДНК 155, 189
Репликация ДНК 117, 121, 123, 151, 188
Репрессия синтеза белков 141, 315
Рестриктазы 108, 113, 148, 173
Ретикулоциты 131, 489, 493
Ретиналь 546, 547, 548, 549
Ретинол 547, 548, 549
Рецепторы 193, 213, 217, 218, 222, 251, 321, 381
Рибоза 102
Рибозо-5-фосфат 279, 367, 369
Рибонуклеопротеины малые ядерные (МЯРНП) 129
Рибонуклеотидредуктаза 377
Рибонуклеотиды 103
Рибосомные РНК 109, 127, 131
Рибосомы 109, 114, 116, 135, 491
Рибофлавин 75, 184
Рибулозо-5-фосфат 278
Родопсин 184, 217, 546, 547

С

Сайленсер 143, 144, 218
Сакситоксин 536
Саркомер 518, 522
Сахароза 249, 250, 276
Сахарный диабет 405, 411, 412, 418
Свертывание крови 174, 504, 507, 510, 516
Селен 186, 456
Сердечные гликозиды 212
Серин 21, 329, 338, 352, 509
Серин-треонин-дегидратаза 338, 403
Серповидно-клеточная анемия 26, 60, 126, 159, 169
Сиаловая кислота см. N-Ацетилнейраминовая кислота
Симпорт 211, 233, 250, 389
Синапс 52, 192, 523, 539, 543
Синтетазы 68, 80, 234
Сквален 314
Складчатый слой 28, 33
Соединительная ткань 49, 433, 437, 438, 449
Соляная кислота 331, 332, 333
Соматические мутации 485
Соматостатин 174, 542
Соматотропин 174, 382, 409
Сопряженные реакции 66, 68
СПИД 171, 485
Сплайсинг 129, 436, 439
Статины 382, 542
Стеариновая кислота 180, 295
Стеаторея 299
Стерины 312
Стероиды 287, 312, 383
Стеркобилины 461
Стеркобилиногены 461, 463
Стероидные гормоны 218, 383
Строфантин см. Уабаин
Структурные гены 142, 143, 161, 162, 165
Субстратное фосфорилирование 227, 241, 256, 258
Субстратные циклы 265, 274, 275
Суицидный катализ 87, 372
Сукцинат см. Янтарная кислота 76, 230, 239, 340, 435

Сукцинатдегидрогеназа 76, 230, 239, 241
Сукцинил-КоА 76, 239, 243, 340, 489
Сульфаниламиды 185, 357, 358
Сульфгидрильные группы 30, 88, 493
Супервторичная структура 34, 115, 116, 144
Супероксиддисмутаза 455
Супероксидный анион 452, 453
Сфингозин 200, 202, 326
Сфингофосфолипиды 200, 326, 328

Т

Таурин 317, 330
Таурохолевая кислота 298
Теплопродукция 187, 191, 245, 246
Терминирующие кодоны 159
Тестостерон 381, 384
Тетрагидрофолиевая кислота 351, 352, 353, 361
Тетродотоксин 536
Тиамин 184, 236
Тиаминдифосфат 236, 237
Тимин 102, 103, 105
Тимидилатсинтетаза 376, 377, 378
Тимидиловая кислота 107, 155, 353, 357, 376
Тимидин 105, 171
Тиоредоксин 375, 376
Тиреоглобулин 427
Тиреотоксикоз 429, 430
Тиреотропин 429
Тирозин 21, 53, 79, 125, 217, 340, 358, 427
Тирозиназа 361
Тироксин 218, 358, 380, 409, 427
Тканевое дыхание 225
Токоферол 184, 456
Трансаминирование 70, 72, 243, 266, 335, 345, 464
Трансглутаминаза 439, 506
Транскрипт первичный 113, 127, 129, 131, 141
Транскрипция 117, 126, 127, 128, 138, 141, 218, 322, 381, 429, 483, 549
Транслоказы 207, 233, 241, 292
Трансляция 117, 125, 131, 132, 135, 138, 490
Трансмембранный электрохимический потенциал 187, 208, 209, 234, 534
Трансметилирование 183, 329, 353, 354
Транспозиция генов 479
Транспортные АТФазы 208, 211, 233, 246, 493
Транспортные белки 49, 180, 389, 429
Трансферазы 78, 79, 104, 282
Трансферрин 49, 55, 492, 493
Трансэлементы 143, 144, 145
Треонин 22, 38, 79, 94, 281, 338, 341
Триацилглицерины 65, 100, 287, 297, 300, 301, 321, 413
Триозофосфатизомераза 80, 87
Трипсин 17, 36, 44, 79, 163, 333, 512
Трипсиноген 333
Триптофан 22, 53, 186, 340, 341, 513
Тромбин 163, 386, 505, 508, 514, 516
Тромбоксаны 385, 386
Тромбомодулин 505, 515, 516
Тромбопластин НЕТ
Тромбоциты 325, 326, 386, 450, 488, 504, 526
Тропоколлаген 47, 436
Тропомиозин 520, 521, 522
Тропонин 216, 521, 522
Тубулин 40, 220, 532

У

Уабаин 212, 213, 536
Убиквитин 335
Убихинон 70, 76, 229, 230, 232
Угольная кислота 343, 396, 498, 501
УДФ-Глюкоза 261
УДФ-Глюкуронилтрансфераза 460, 464, 466
УДФ-Глюкуроновая кислота 460
Урацил 102, 105, 158, 375
Уридиловая кислота 102, 103, 373
Урикемия 370, 372
Уробилиногены 461, 463
Уробилины 398, 461
Уроканиновая кислота 361
Урокиназа 174, 513

Ф

Фагоцитоз 219, 221, 457, 477, 478, 480
Фактор Касла 183, 284
Факторы свертывания крови 504, 505, 509, 510
Фенамин 545
Фенилаланин 53, 132, 340, 358
Фенилаланингидроксилаза 359
Фенилкетонурия 359, 360
Фенилмолочная кислота 359
Фенилпировиноградная кислота 359
Фенилтиогидантоины аминокислот 24
Фенобарбитал 464, 465, 466
Ферритин 492, 493
Феррохелатаза 490
Фетальный гемоглобин 51, 163
Фибриллярные белки 30, 47
Фибрин 505, 506, 513
Фибриноген 504, 505, 506
Фибринолиз 513, 516
Фибробласты 220, 284, 322, 433, 450, 526
Фиброз 417, 451
Фибронектин 439, 449, 506
Флавинадениндинуклеотид (ФАД) 75, 226, 366, 525
Флавинмононуклеотид (ФМН) 75, 77, 229, 339, 525
Фолиевая кислота 184, 351, 356, 489
Фолликулостимулирующий гормон 382
Фосфатидилинозитол 199, 215
Фосфатидилсерины 199, 327, 509
Фосфатидилхолины 199, 205, 327
Фосфатидилэтаноламины 199,
Фосфатидная кислота 77, 198, 300
3-Фосфоаденозин-5-фосфосульфат 460
2-Фосфоглицерат 255
3-Фосфоглицерат 255, 264,
Фосфоглицераткиназа 33, 255
Фосфодиэстераза 214, 366
3“-5“-Фосфодиэфирная связь 105, 108, 121
Фосфоенолпируват 255, 265, 340
Фосфоенолпируваткарбоксикиназа 403
Фосфолипаза А 385
Фосфолипаза С 214, 215, 217
Фосфолипиды 198, 201, 202, 326, 509, 514
Фосфопротеины 38, 92, 94
Фосфопротеинфосфатазы 94
Фосфорибозилдифосфат 369
Фосфорилаза гликогена 262, 269
Фосфорилирование
- белков 94, 306
- моносахаридов 252, 253
- окислительное 226, 234
- субстратное 227, 241, 256, 258

Фосфоролиз 129, 262
Фосфосерин 200, 352
Фосфофруктокиназа 255, 275, 527
Фруктоза 253, 276
Фруктоземия 277
Фруктозо-1,6-бисфосфат 255, 264, 275
Фруктозо-2,6-бисфосфат 275
Фтордезоксиуридин 378
Фумараза 65, 80, 84
Фумарилацетоацетат 359
Фумаровая кислота 65, 66, 239

Х

Хенодезоксихолевая кислота 317, 320
Хиломикроны 301, 302, 303, 321
Химотрипсин 87, 333
Хлодитан 405
Холевая кислота 317, 320
Холекальциферол 424
Холерный токсин 395
Холестерин 194, 202, 312, 320
Холин 198, 327
Холинэстераза 79, 170
Холопротеин 38
Холофермент 70
Хондроитинсульфаты 398, 441
Хроматин 46, 102, 114, 424
Хромосомы 101, 114, 118, 146, 164

Ц

Церамиды 200, 202, 281
Цереброзиды 200, 327
Церулоплазмин 55, 284
Цветовое зрение 546, 549
ЦДФ-Холин 328
ЦДФ-Этаноламин 327, 328
Цикл АДФ/АТФ 187, 226, 234
Цикл НАД/НАДН 226
Циклины 124, 472
3“-5“-Циклоаденозинмонофосфат (цАМФ) 95, 213, 272, 390
Циклооксигеназа 385, 386
Цинга 181, 184
Цинк 115, 163, 186, 447
Цинковый палец 115, 116, 144
Цирроз см. Фиброз
Цистатионин 355
Цистеин 30, 144, 340, 355
Цистин 30, 398
Цистрон 142
Цис-элементы 143
Цитидиловая кислота 374
Цитозин 102, 156, 158
Цитокины 192, 384
Цитохром Р450 459, 466
Цитохромы 49, 161, 229, 459
Цитохромоксидаза 230, 232
Цитрат 238, 292, 306
Цитратлиаза 292
Цитратный цикл 235, 238, 242
Цитратсинтаза 238
Цитруллин 343

Ч

Челночные механизмы 257, 292, 336
Четвертичная структура белков 38, 41, 69
Число оборотов 85

Ш

Шапероны 37, 138, 189

Э

Эйкозаноиды 192, 287, 295, 385
Экзергонические реакции 67
Экзоны 129
Экзонуклеазы 105, 157
Экзопептидазы 334
Экзоцитоз 219, 221, 223
Эластин 416, 437
Эластаза 163, 333
Электрофорез 46, 55, 109
Электрохимический потенциал 210, 211, 232
Элонгация 128, 136, 153
Эмульгирование жиров 298, 305, 318
Эндергонические реакции 67, 68, 186
Эндокринная регуляция 380
Эндонуклеазы 105, 156, 157
Эндопептидазы 139, 333, 447
Эндорфины 540, 541
Эндоцитоз 219, 322
Энергетический заряд 243
Энергетический обмен 187, 224, 240, 245
Энергия активации 63, 64
Энергия Гиббса 64, 66, 227
Энкефалины 540, 545, 546
Энтеропептидаза 333
Энхансеры 143, 145
Эритроцит 182, 283, 356, 493
Эстрадиол 381, 383
Эстрогены 312
Этаноламин 199, 327, 329
Этиловый алкоголь 259, 277
Эумеланины 361

Ю

Юкстагломерулярные клетки 393

Я

Янтарная кислота 76, 239