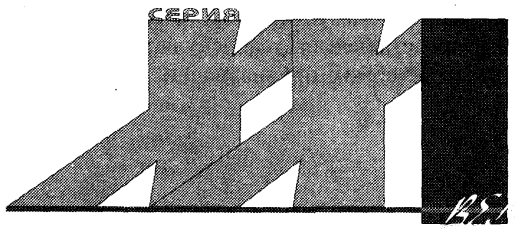
БИОХИМИЯ

УЧЕБНИК ДЛЯ ВУЗОВ

Под редакцией чл.-корр. РАН, проф. Е.С. Северина

2-е издание, исправленное

Рекомендовано УМО по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебника для студентов медицинских вузов



МОСКВА
ИЗДАТЕЛЬСКИЙ ДОМ
ГЭОТАР-МЕД
2004

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.072я73
Б63

Рецензенты

Зав. кафедрой биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики Астраханской государственной медицинской академии, канд. мед. наук, проф. *Д.М. Никулина*

Зав. кафедрой общей и клинической биохимии №1 Ростовского государственного медицинского университета, докт. биол. наук, проф. *З.И. Микашинович*

Зав. кафедрой общей и клинической биохимии №2 Ростовского государственного медицинского университета *Л.М. Пустовалова*

Авторский коллектив

Алейникова Т.Л., Авдеева Л.В., Андрианова Л.Е., Белушкина Н.Н., Волкова Н.П., Воробьева С.А., Голенченко В.А., Губарева А.Е., Корлякова О.В., Лихачева Н.В., Павлова Н.А., Рубцова Г.В., Силаева С.А., Силуянова С.Н., Титова Т.А

Б63 **Биохимия**: Учебник / Под ред. Е.С. Северина. – 2-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 784 с.: ил. – (Серия «XXI век»).

ISBN 5-9231-0390-7

В учебнике рассмотрены основные положения классической биохимии. Приведены сведения о структуре и свойствах биомолекул, биоэнергетике, молекулярных основах физиологических функций человека. Рассмотрены биохимические особенности важнейших органов и тканей. Изложены современные представления о молекулярных основах нарушений при ряде патологических состояний и болезней.

Учебник предназначен для студентов медицинских вузов, аспирантов.

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.072я73

ISBN 5-9231-0390-7

АВТОРЫ

Северин Евгений Сергеевич, докт. хим. наук, проф., чл.-корр. РАН, зав. кафедрой биохимии ММА им. И.М. Сеченова, ген. директор ОАО «Всесоюзный научный центр молекулярной диагностики и лечения», редактор издания.

Алейникова Татьяна Леонидовна, канд. биол. наук, доц. кафедры биохимии ММА им. И.М. Сеченова (раздел 7), ответственный автор издания.

Авдеева Людмила Викторовна, канд. биол. наук, доц. кафедры биологической химии ММА им. И.М. Сеченова (разделы 6, 11).

Андрианова Людмила Евгеньевна, канд. биол. наук, старший преподаватель кафедры биологической химии ММА им. И.М. Сеченова (разделы 12, 15).

Белушкина Наталья Николаевна, доц. кафедры биохимии ММА им. И.М. Сеченова, ученый секретарь НИИ. Молекулярная медицина ММА им. Сеченова (раздел 2).

Волкова Наталья Петровна, канд. мед. наук, доц. кафедры биологической химии ММА им. И.М. Сеченова (раздел 1).

Голенченко Вера Александровна, канд. биол. наук, доц. кафедры биологической химии ММА им. И.М. Сеченова (разделы 4, 5).

Воробьева Светлана Анатольевна, канд. биол. наук, доц. кафедры биологической химии ММА им. И.М. Сеченова (разделы 7, 11).

Губарева Александра Евгеньевна, канд. мед. наук, доц. кафедры биологической химии ММА им. И.М. Сеченова (раздел 8).

Корлякова Ольга Вениаминовна, канд. биол. наук, старший преподаватель кафедры биологической химии ММА им. И.М. Сеченова (раздел 9).

Лихачева Нина Викторовна, канд. биол. наук, доц. кафедры биологической химии ММА им. И.М. Сеченова (раздел 9).

Павлова Нина Александровна, канд. биол. наук, доц. кафедры биологической химии ММА им. И.М. Сеченова (разделы 3, 6).

Рубцова Галина Васильевна, канд. биол. наук, доц. кафедры биологической химии ММА им. И.М. Сеченова (разделы 3, 6).

Силаева Светлана Алексеевна, докт. биол. наук, проф. кафедры биологической химии ММА им. И.М. Сеченова (разделы 4, 10, 16).

Силуянова Светлана Николаевна, канд. биол. наук, доц. кафедры биологической химии ММА им. И.М. Сеченова (разделы 12, 13, 15).

Титова Татьяна Алексеевна, канд. биол. наук, старший преподаватель кафедры биологической химии ММА им. И.М. Сеченова (разделы 13, 14).

ПРЕДИСЛОВИЕ

Биохимия — сравнительно молодая наука, возникшая на стыке биологии и химии в конце XIX века. Она изучает процессы развития и функционирования организмов на языке молекул, структуру и химические процессы, которые обеспечивают жизнь одно- и многоклеточных существ, населяющих Землю. Выдающиеся открытия в области учения о ферментах, биохимической генетики, молекулярной биологии и биоэнергетики превратили биохимию в фундаментальную дисциплину, позволяющую решать многие важные проблемы биологии и медицины.

Настоящий учебник является результатом многолетней преподавательской работы коллектива кафедры биохимии Московской медицинской академии, и содержит информацию, касающуюся, главным образом, биохимии человека. Учебник предназначен студентам и преподавателям медицинских вузов. По структуре и содержанию он соответствует программе по биохимии для студентов медицинских вузов, утвержденной Министерством здравоохранения РФ.

Учебник знакомит читателей со структурно-функциональными компонентами клеток и процессами, лежащими в основе жизнедеятельности здорового организма, а также с некоторыми нарушениями, которые приводят к возникновению болезней. Для него характерно акцентирование внимания читателя на значении рассматриваемых вопросов для медицины. Книга содержит 16 разделов и приложение, в которое входят список сокращений, предметный указатель, словарь терминов и лабораторные показатели. Первые разделы посвящены структуре и функциям белков, ферментов, витаминов и нуклеиновых кислот. Подробно рассматривается синтез и регуляция информационного потока ДНК→РНК→белок, причины, лежащие в основе биохимической индивидуальности организмов и возникновения наследственных болезней. В разделах по обмену углеводов, липидов и аминокислот внимание читателей фокусируется на процессах, обеспечивающих образование и потребление энергии в тканях организма и участие этих соединений в формировании

структурных компонентов клеток. В книге обсуждается ключевая роль гормонов в межклеточных взаимодействиях и регуляции обмена веществ. Учебник содержит также ряд специализированных разделов: биохимия межклеточного матрикса, обезвреживание токсических веществ в организме, биохимия крови, онкогенез, представляющих особый интерес для медиков и врачей. Информация, приведенная во всех главах учебника, дана в соответствии с современным уровнем научных знаний в этих областях.

Надеюсь, что учебник заинтересует широкий круг читателей и окажется полезным для студентов, аспирантов и научных сотрудников, работающих в области общей и клинической биохимии, молекулярной биологии и медицины. Большое количество схем и рисунков, которыми снабжена книга, должны облегчить усвоение материала и могут быть использованы в преподавании биохимии. В то же время коллектив авторов готов рассмотреть предложения по улучшению книги и критические замечания читателей, которые можно выслать по электронной почте: **info@geotar.ru**.

Благодарю коллектив авторов и особенно группу в составе Т.Л. Алейниковой, Л.В. Авдеевой, Н.П. Волковой, В.А. Голенченко, А.Е. Губаревой и С.А. Силаевой за помощь в редакционной работе, а также сотрудникам издательского дома «ГЭОТАР-МЕД».

Зав. каф. биохимии ММА им. И.М. Сеченова, чл.-корр. РАН, проф. **Е.С. Северин**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

* *или* # — с последующим кодом из 6 цифр (символы * *или* # указывают на наличие аллелей, разных фенотипов заболевания или же включение в состав нозологической единицы нескольких и разных поражённых генов) — менделевское наследование (по http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/).

⇔ — синоним

ℜ — аутосомное доминантное наследование

ρ — аутосомное рецессивное наследование

ℵ — связанное с Х–хромосомой наследование

В–клетки (В произносят как *бэ*) — В–лимфоциты

С1, С2, С3 (произносят как *си*) и т.д. — компоненты системы комплемента 1, 2, 3 и т.д.

Ca^{2+} — катион(ы) кальция, ион(ы) кальция; ионизированный (свободный) кальций

CD (от cluster of differentiation [произносят как *си ди*], кластер дифференцировки), см. Маркёр

Cl^- — анион(ы) хлора

Fab см. «Фрагмент»

FAD — флавинадениндинуклеотид

FMN — флавинмононуклеотид

H^+ — ион(ы) водорода, протоны

$[H^+]$ — концентрация ионов водорода

Hb — гемоглобин

HbCO — карбоксигемоглобин

HbO_2 — гемоглобин оксигенированный

HLA (произносят как *эйч эль эй*, от human leukocyte antigens), см. «Антиген», см. «MHC»

Ig — иммуноглобулин, иммуноглобулины

IRE — iron-responsive element, железо-чувствительный элемент

K^+ — катион(ы) калия

$[K^+]$ — концентрация ионов калия

LT — leucotrienes, лейкотриены

MetHb — метгемоглобин

MHC (произносят как *эм эйч си*, от major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости)

M_r — кажущаяся молекулярная масса

Na^+ — катион(ы) натрия

$[Na^+]$ — концентрация ионов натрия

NAD — никотинамидадениндинуклеотид

NADP — никотинамидадениндинуклеотидфосфат

NO — оксид азота (NO), вырабатываемый в эндотелии фактор релаксации (вазодилатации)

НТФ — нуклеозидтрифосфаты

p_aCO_2 — парциальное напряжение двуокиси углерода в артериальной крови

pCO_2 — парциальное давление двуокиси углерода

PG — prostaglandins, простагландины

Pi (H_3PO_4) — фосфат неорганический

pO_2 — парциальное давление кислорода

PPi ($H_4P_2O_7$) — пирофосфат неорганический

SAГ — S-аденозилгомоцистеин

SAM — S-аденозилметионин

T_3 — трийодтиронин

T_4 — тетрайодтиронин, тироксин

Т-клетки — Т-лимфоциты

TNF — tumor necrosis factor, фактор некроза опухолей

ТХ — тромбоксаны

VIP (от Vasoactive Intestinal Polypeptide) — вазоактивный интестинальный (кишечный) полипептид (недопустимо написание — ВИП)

Аг — антиген, антигены

АД — артериальное давление
АДГ — антидиуретический гормон (вазопрессин)
АДФ — аденозиндифосфорная кислота, аденозиндифосфаты
АКТГ — адренокортикотропный гормон
АЛТ — аланинаминотрансфераза
АМФ — аденозинмонофосфат(ы)
цАМФ — циклический аденозин-3',5'-монофосфат
апоЛП — аполипопротеин
АПФ — ангиотензин-превращающий фермент
АСТ — аспартатаминотрансфераза
АТ — антитело, антитела
АТФ — аденозинтрифосфорная кислота
АТФ-аза — аденозинтрифосфатаза
АЦ — аденилатциклаза
АХАТ — ацетил-КоА-холестеролацилтрансфераза
ВМК — высокомолекулярные кининогены
ГАМК — γ-аминомасляная кислота
ГДФ — гуанозиндифосфат
ГМК — гладкомышечная клетка
ГМФ — гуанозинмонофосфат
ГПЭТЕ — гидропероксидэйкозатетроеноаты
ГТ — глутатионтрансфераза
ГТФ — гуанозинтрифосфат
ГЭТЕ — гидроксиэйкозатетроеноаты
Д — дальтон (после числового значения)
ДАГ — диацилглицеролы
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОФА — диоксифенилаланин
ДФФ — диизопропилфторфосфат
ЖКТ — желудочно-кишечный тракт
ИЛ — интерлейкин, интерлейкины
ИМФ — инозинмонофосфат
$ИФ_3$ — инозинтрифосфат
ИФН — интерферон, интерфероны
кД — килодальтон
КК — креатинкиназа
КоА — кофермент (коэнзим) А
КоQ — кофермент (коэнзим) Q
КЩР — кислотно-щелочное равновесие
КФ — Классификация Ферментов (<http: //www.expasy.ch/sprot/enzyme.html>). КФ приведены по Enzyme Nomenclature (NC-IUBMB, Комитет по Номенклатуре Международного Союза по Биохимии и Молекулярной Биологии)
ЛГ — лютеинизирующий гормон, лютропин
ЛДГ — лактатдегидрогеназа
ЛП — липопротеины
ЛПВП — липопротеины высокой плотности
ЛП-липаза — липопротеинлипаза
ЛПНП — липопротеины низкой плотности
ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности
ЛППП — липопротеины промежуточной плотности
ЛХАТ — лецитинхолестеролацилтрансфераза
МАГ — моноацеилглицероны
МАО — моноаминооксидаза
ОПК — общий путь катаболизма
мяРНП — малые ядерные рибонуклеопротеины
ПТГ — паратиреоидный гормон
СЕ — субъединица
ПКА — протеинкиназа А
ПКС — протеинкиназа С
ПОЛ — перекисное окисление липидов
ПОМК — проопиомеланокортин
ПФ — пиридоксальфосфат
ПЦР — полимеразная цепная реакция
ПЯЛ — полиморфноядерные лейкоциты
РНК — рибонуклеиновая кислота
мРНК — матричная РНК
рРНК — рибосомная РНК
тРНК — транспортная РНК
РНР — рибонуклеотидредуктаза
РЭС — ретикулоэндотелиальная система
ССС — сердечно-сосудистая система
СТГ — соматотропный гормон
ТАГ — триацилглицеролы
ТДФ — тиаминдифосфат
ТТГ — тиреотропный гормон
УДФ — уридиндифосфат
УМФ — уридинмонофосфат
УТФ — уридинтрифосфат
УФО — ультрафиолетовое облучение
ФАФС — 3-фосфоаденозин-5-фосфосульфат
ФРДФ — фосфорибозилдифосфат
ФСГ — фолликулостимулирующий гормон, фолликотропин
ХГТ — хорионический гонадотропин
ХМ — хиломикроны
ЦДФ — цитидиндифосфат
ЦМФ — цитидинмонофосфат
ЦНС — центральная нервная система
ЦПЭ — цепь переноса электронов
ЦТК — цикл трикарбоновых кислот, цикл Кребса
ЦТФ — цитидинтрифосфат
ЭР — эндоплазматический ретикулум

РАЗДЕЛ 1

СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

В живых клетках происходит синтез множества органических молекул, среди которых главную роль играют полимерные макромолекулы — белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды.

Особая роль в жизнедеятельности живых организмов принадлежит белкам. От родителей детям передаётся генетическая информация о специфической структуре и функциях всех белков данного организма. Синтезированные белки выполняют многообразные функции: ускоряют химические реакции, выполняют транспортную, структурную, защитную функции, участвуют в передаче сигналов от одних клеток другим и таким образом реализуют наследственную информацию. Поэтому белки называют также протеинами (от греч. *proteos* — первый).

На долю белков внутри клетки приходится более половины их сухого вещества. В организме человека насчитывают около 50 000 индивидуальных белков. Видовая и индивидуальная специфичность набора белков в данном организме определяет особенности его строения и функционирования. Набор белков в дифференцирующихся клетках одного организма определяет морфологические и функциональные особенности каждого типа клеток.

Как и любой полимер, белок состоит из мономерных единиц, или «строительных блоков». В белках организма человека такими мономерами служат 20 из нескольких сотен известных в природе аминокислот. Аминокислоты, находящиеся в белках, связаны друг с другом пептидными связями. Линейная последовательность аминокислот в белке уникальна для каждого индивидуального белка; информация о ней содержится в участке молекулы ДНК, называемой геном.

Полипептидные цепи за счёт внутримолекулярных взаимодействий образуют пространственные структуры — конформации белков. На определённом участке белковой молекулы из радикалов аминокислот формируется активный центр, который может специфично (комплементарно) связываться с молекулами-лигандами. Взаимодействие белков с лигандами лежит в основе их функционирования. Изменения последовательности аминокислот в белках могут приводить к изменению пространственной структуры и функций данных белков и развитию заболеваний.

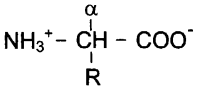
I. СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ БЕЛКОВ. ПЕПТИДНЫЕ СВЯЗИ, СОЕДИНЯЮЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ В ЦЕПИ

Белки — полимерные молекулы, в которых мономерами служат аминокислоты. В составе белков в организме человека встречают только 20 α-аминокислот. Одни и те же аминокислоты присутствуют в различных по структуре и функциям белках. Индивидуальность белковых молекул определяется порядком чередования аминокислот в белке. Аминокислоты можно рассматривать как буквы алфавита, при помощи которых, как в слове, записывается информация. Слово несёт информацию, например о предмете или действии, а последовательность аминокислот в белке несёт информацию о построении пространственной структуры и функции данного белка.

А. Строение и свойства аминокислот

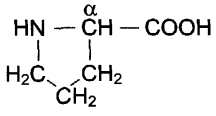
1. Общие структурные особенности аминокислот, входящих в состав белков

Общая структурная особенность аминокислот — наличие амино- и карбоксильной групп, соединённых с одним и тем же α-углеродным атомом. R — радикал аминокислот — в простейшем случае представлен атомом водорода (глицин), но может иметь и более сложное строение.



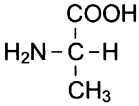
В водных растворах при нейтральном значении pH α-аминокислоты существуют в виде биполярных ионов.

В отличие от 19 остальных α-аминокислот, пролин — иминокислота, радикал которой связан как с α-углеродным атомом, так и с аминогруппой, в результате чего молекула приобретает циклическую структуру.

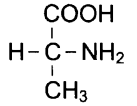


Пролин

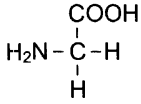
19 из 20 аминокислот содержат в α-положении асимметричный атом углерода, с которым связаны 4 разные замещающие группы. В результате эти аминокислоты в природе могут находиться в двух разных изомерных формах — L и D. Исключение составляет глицин, который не имеет асимметричного α-углеродного атома, так как его радикал представлен только атомом водорода. В составе белков присутствуют только L-изомеры аминокислот.



L-Аланин



D-Аланин



Глицин (не имеет изомерных форм)

Чистые L- или D-стереоизомеры могут за длительный срок самопроизвольно и неферментативно превращаться в эквимолярную смесь L- и D-изомеров. Этот процесс называют рацемизацией. Рацемизация каждой L-аминокислоты при данной температуре идёт с определённой скоростью. Это обстоятельство можно использовать для установления возраста людей и животных. Так, в твёрдой эмали зубов имеется белок дентин, в котором L-аспартат переходит в D-изомер при температуре тела человека со скоростью 0,01% в год. В период формирования зубов в дентине содержится только L-изомер, поэтому по содержанию D-аспартата можно рассчитать возраст обследуемого.

Все 20 аминокислот в организме человека различаются по строению, размерам и физико-химическим свойствам радикалов, присоединённых к α-углеродному атому.

2. Классификация аминокислот по химическому строению радикалов

По химическому строению аминокислоты можно разделить на алифатические, ароматические и гетероциклические (табл. 1-1).

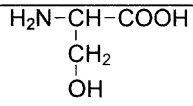
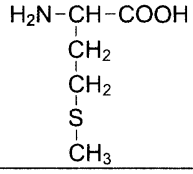
В составе алифатических радикалов могут находиться функциональные группы, придающие им специфические свойства: карбоксильная (-COOH), амино (-NH_2), тиольная (-SH), амидная (-CO-NH_2), гидроксильная (-OH) и гуанидиновая (-NH-C(=NH)-NH_2) группы.

Названия аминокислот можно построить по заместительной номенклатуре, но обычно используют тривиальные названия (табл. 1-2).

Таблица 1-1. Классификация основных аминокислот белков по их химическому строению

Тривиальные названия аминокислот	Сокращённые названия		Строение радикалов
	русские	латинские	
I. Аминокислоты с алифатическими радикалами			
1. Глицин	Гли	Gly G	-H
2. Аланин	Ала	Ala A	$-CH_3$
3. Валин	Вал	Val V	$-CH<^{CH_3}_{CH_3}$
4. Лейцин	Лей	Leu L	$-CH_2-CH<^{CH_3}_{CH_3}$
5. Изолейцин	Иле	Ile I	$-\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{CH}}-CH_2-CH_3$
II. Аминокислоты, содержащие в алифатическом радикале дополнительную функциональную группу			
	Гидроксильную группу		
6. Серин	Сер	Ser S	$-CH_2-OH$
7. Треонин	Тре	Thr T	$-CHOH-CH_3$
	Карбоксильную группу		
8. Аспарагиновая кислота	Асп	Asp D	$-CH_2-COOH$
9. Глутаминовая кислота	Глу	Glu E	$-CH_2-CH_2-COOH$
	Амидную группу		
10. Аспарагин	Асн	Asn N	$-CH_2-CO-NH_2$
11. Глутамин	Глн	Gln Q	$-CH_2-CH_2-CO-NH_2$
	Аминогруппу		
12. Лизин	Лиз	Lys K	$-(CH_2)_4-NH_2$
	Гуанидиновую группу		
13. Аргинин	Арг	Arg R	$-(CH_2)_3-NH-\underset{\displaystyle NH}{\underset{\|}{C}}-NH_2$
	Серу		
14. Цистеин	Цис	Cys C	$-CH_2-SH$
15. Метионин	Мет	Met M	$-CH_2-CH_2-S-CH_3$
III. Аминокислоты, содержащие ароматический радикал			
16. Фенилаланин	Фен	Phe F	$-CH_2-C_6H_5$
17. Тирозин	Тир	Tyr Y	$-CH_2-C_6H_4-OH$
IV. Аминокислоты с гетероциклическими радикалами			
18. Триптофан	Три	Trp W	$-CH_2-C_8H_6N$
19. Гистидин	Гис	His H	$-CH_2-C_3H_3N_2$
V. Иминокислота			
20. Пролин	Про	Pro P	$C_4H_7N-COOH$ Дана полная формула

Таблица 1-2. Примеры названий аминокислот по заместительной номенклатуре и соответствующие тривиальные названия

Название аминокислоты по заместительной номенклатуре	Формула аминокислоты	Тривиальное название
2-амино-3-гидроксипропановая кислота		Серин
2-амино-4-метилтиомасляная кислота		Метионин

Для записи аминокислотных остатков в молекулах пептидов и белков используют трёхбуквенные сокращения их тривиальных названий, а в некоторых случаях и однобуквенные символы (см. табл. 1-1).

Тривиальные названия часто происходят от названия источника, из которого они впервые были выделены, или от свойств данной аминокислоты. Так, серин впервые был выделен из фиброина шёлка (от лат. *serieum* — шелковистый), а глицин получил свое название из-за сладкого вкуса (от греч. *glykos* — сладкий).

3. Классификация аминокислот по растворимости их радикалов в воде

Все 20 аминокислот в белках организма человека можно сгруппировать по способности их радикалов растворяться в воде. Радикалы можно выстроить в непрерывный ряд, начинающийся полностью гидрофобными и заканчивающийся сильно гидрофильными.

Растворимость радикалов аминокислот определяется полярностью функциональных групп, входящих в состав молекулы (полярные группы притягивают воду, неполярные её отталкивают).

Аминокислоты с неполярными радикалами

К неполярным (гидрофобным) относят радикалы, имеющие алифатические углеводородные цепи (радикалы аланина, валина, лейцина, изолейцина, пролина и метионина) и ароматические кольца (радикалы фенилаланина и триптофана). Радикалы таких аминокислот в воде стремятся друг к другу или к другим гидрофобным молекулам, в результате чего поверхность соприкосновения их с водой уменьшается.

Аминокислоты с полярными незаряженными радикалами

Радикалы этих аминокислот лучше, чем гидрофобные радикалы, растворяются в воде, так как в их состав входят полярные функциональные группы, образующие водородные связи с водой. К ним относят серин, треонин и тирозин, имеющие гидроксильные группы, аспарагин и глутамин, содержащие амидные группы, и цистеин с его тиольной группой.

Цистеин и тирозин содержат соответственно тиольную и гидроксильную группы, способные к диссоциации с образованием H^+, но при pH около 7,0, поддерживаемого в клетках, эти группы практически не диссоциируют.

Аминокислоты с полярными отрицательно заряженными радикалами

К этой группе относят аспарагиновую и глутаминовую аминокислоты, имеющие в радикале дополнительную карбоксильную группу, при pH около 7,0 диссоциирующую с образованием COO^- и H^+. Следовательно, радикалы данных аминокислот — анионы. Ионизированные формы глутаминовой и аспарагиновой кислот называют соответственно глутаматом и аспартатом.

Аминокислоты с полярными положительно заряженными радикалами

Дополнительную положительно заряженную группу в радикале имеют лизин и аргинин. У лизина вторая аминогруппа, способная присо-

единять H^+, располагается в ε-положении алифатической цепи, а у аргинина положительный заряд приобретает гуанидиновая группа. Кроме того, гистидин содержит слабо ионизированную имидазольную группу, поэтому при физиологических колебаниях значений pH (от 6,9 до 7,4) гистидин заряжен либо нейтрально, либо положительно. При увеличении количества протонов в среде имидазольная группа гистидина способна присоединять протон, приобретая положительный заряд, а при увеличении концентрации гидроксильных групп — отдавать протон, теряя положительный заряд радикала. Положительно заряженные радикалы — катионы (см. схему ниже).

Наибольшей растворимостью в воде обладают полярные заряженные радикалы аминокислот.

4. Изменение суммарного заряда аминокислот в зависимости от pH среды

При нейтральных значениях pH все кислотные (способные отдавать H^+) и все основные (способные присоединять H^+) функциональные группы находятся в диссоциированном состоянии.

Поэтому в нейтральной среде аминокислоты, содержащие недиссоциирующий радикал, имеют суммарный нулевой заряд. Аминокислоты, содержащие кислотные функциональные группы, имеют суммарный отрицательный заряд, а аминокислоты, содержащие основные функциональные группы, — положительный заряд (табл. 1-3).

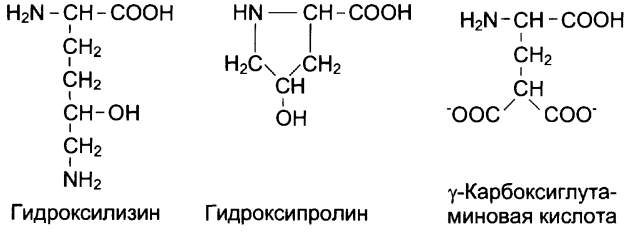
Изменение pH в кислую сторону (т.е. повышение в среде концентрации H^+) приводит к подавлению диссоциации кислотных групп. В сильно кислой среде все аминокислоты приобретают положительный заряд.

Напротив, увеличение концентрации OH^- групп вызывает отщепление H^+ от основных функциональных групп, что приводит к уменьшению положительного заряда. В сильно щелочной среде все аминокислоты имеют суммарный отрицательный заряд.

5. Модифицированные аминокислоты, присутствующие в белках

Непосредственно в синтезе белков организма человека принимают участие только 20 перечисленных аминокислот. Однако в некоторых белках имеются нестандартные модифицированные аминокислоты — производные одной из этих 20 аминокислот. Например, в молекуле коллагена (фибриллярного белка межклеточного матрикса) присутствуют гидроксипроизводные лизина и пролина — 5-гидроксилизин и 4-гидроксипролин.

Модификации аминокислотных остатков осуществляются уже в составе белков, т.е. только после окончания их синтеза. Введение дополнительных функциональных групп в структуру аминокислот придаёт белкам свойства, необхо-



Модифицированные кислоты, найденные в составе белков

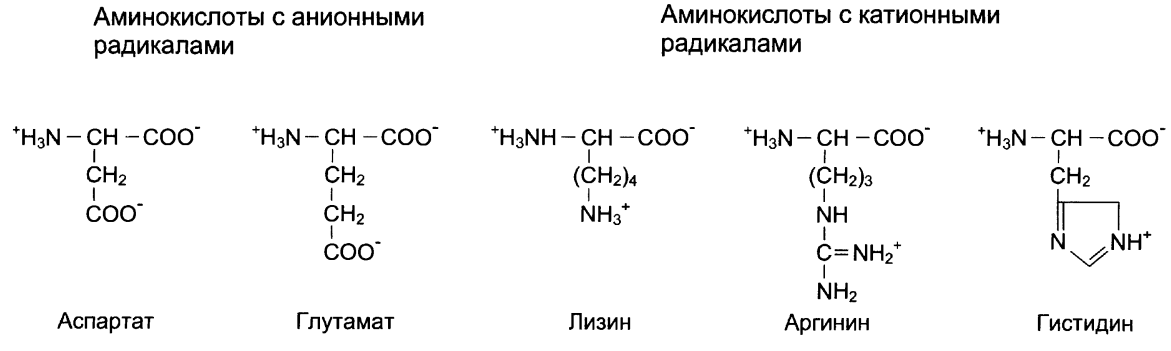
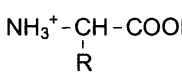
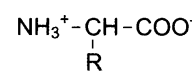
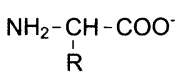
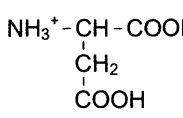
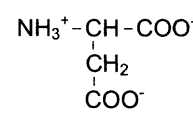
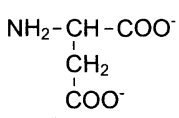
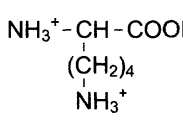
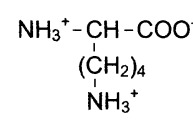
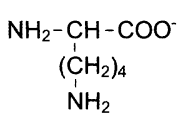


Схема. Структура полярных заряженных аминокислот в диссоциированной форме

Таблица 1-3. Изменение суммарного заряда аминокислот в зависимости от pH среды

Сильно кислая среда	Нейтральная среда	Сильно щелочная среда
1. Аминокислоты с недиссоциирующими радикалами		
		
Суммарный заряд = +1	Суммарный заряд = 0	Суммарный заряд = –1
2. Аминокислоты с анионными группами в радикале		
		
Суммарный заряд = +1	Суммарный заряд = –1	Суммарный заряд = –2
3. Аминокислоты с катионными группами в радикале		
		
Суммарный заряд = +2	Суммарный заряд = +1	Суммарный заряд = –1

димые для выполнения ими специфических функций. Так, γ-карбоксиглутаминовая кислота входит в состав белков, участвующих в свёртывании крови, и две близко лежащие карбоксильные группы в их структуре необходимы для связывания белковых факторов с ионами Ca^{2+}. Нарушение карбоксилирования глутамата приводит к снижению свёртываемости крови.

Значение гидроксильных групп в составе лизина и пролина описано в разделе 15.

6. Химические реакции, используемые для обнаружения аминокислот

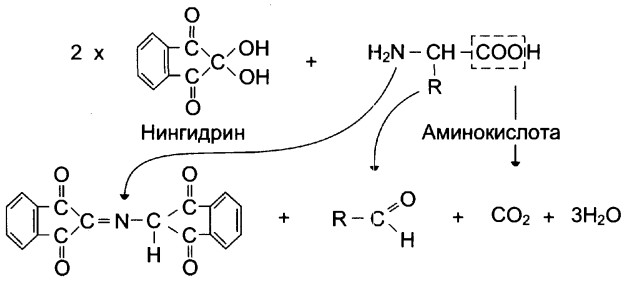
Способность аминокислот вступать в те или иные химические реакции определяется наличием в их составе функциональных групп. Так как все аминокислоты, входящие в состав белков, содержат у α-углеродного атома амино- и карбоксильную группы, они могут вступать в характерные для всех аминокислот химические реакции. Наличие каких-либо функциональных групп в радикалах индивидуальных аминокислот определяет их способность вступать в специфичные для данных аминокислот реакции.

Нингидриновая реакция на α-аминокислоты

Для обнаружения и количественного определения аминокислот, находящихся в растворе, можно использовать нингидриновую реакцию.

Эта реакция основана на том, что бесцветный нингидрин, реагируя с аминокислотой, конденсируется в виде димера через атом азота, отщепляемый от α-аминогруппы аминокислоты. В результате образуется пигмент красно-фиолетового цвета. Одновременно происходит декарбоксилирование аминокислоты, что приводит к образованию CO_2 и соответствующего альдегида. Нингидриновую реакцию широко используют при изучении первичной структуры белков (см. схему ниже).

Так как интенсивность окраски пропорциональна количеству аминокислот в растворе, её используют для измерения концентрации α-аминокислот.



Нингидриновая реакция, используемая для определения α-аминокислот

Специфические реакции на отдельные аминокислоты

Качественное и количественное определение отдельных аминокислот возможно благодаря наличию в их радикалах особенных функциональных групп.

Аргинин определяют с помощью качественной реакции на гуанидиновую группу (реакция Сакагучи), а цистеин выявляют реакцией Фоля, специфичной на SH-группу данной аминокислоты. Наличие ароматических аминокислот в растворе определяют ксантопротеиновой реакцией (реакция нитрования), а наличие гидроксильной группы в ароматическом кольце тирозина — с помощью реакции Миллона.

Б. Пептидная связь. Строение и биологические свойства пептидов

α-Аминокислоты могут ковалентно связываться друг с другом с помощью пептидных связей. Пептидная связь образуется между α-карбоксильной группой одной аминокислоты и α-аминогруппой другой, т.е. является амидной связью. При этом происходит отщепление молекулы воды (см. схему А).

1. Строение пептида

Количество аминокислот в составе пептидов может сильно варьировать. Пептиды, содержащие до 10 аминокислот, называют **олигопептиды**. Часто в названии таких молекул указывают количество входящих в состав олигопептида аминокислот: трипептид, пентапептид, октапептид и т.д.

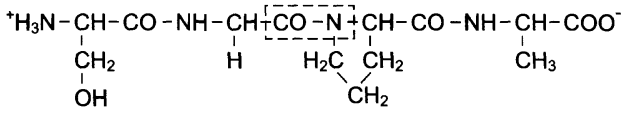
Пептиды, содержащие более 10 аминокислот, называют **«полипептиды»**, а полипептиды, состоящие из более чем 50 аминокислотных остатков, обычно называют белками. Однако эти названия условны, так как в литературе термин «белок» часто употребляют для обозначения полипептида, содержащего менее 50 аминокислотных остатков. Например, гормон глюкагон, состоящий из 29 аминокислот, называют белковым гормоном.

Мономеры аминокислот, входящих в состав белков, называют **«аминокислотные остатки»**. Аминокислотный остаток, имеющий свободную аминогруппу, называется N-концевым и пишется слева, а имеющий свободную α-карбоксильную группу — С-концевым и пишется справа. Пептиды пишутся и читаются с N-конца. Цепь повторяющихся атомов в полипептидной цепи -NH-CH-CO- носит название **«пептидный остов»** (см. схему Б).

При названии полипептида к сокращённому названию аминокислотных остатков добавляют суффикс -ил, за исключением С-концевой аминокислоты. Например, тетрапептид Сер-Гли-Про-Ала читается как серилглицилпролилаланин.

Пептидная связь, образуемая иминогруппой пролина, отличается от других пептидных связей, так как атом азота пептидной группы связан не с водородом, а с радикалом.

Пептиды различаются по аминокислотному составу, количеству и порядку соединения амино-



Серилглицилпролилаланин

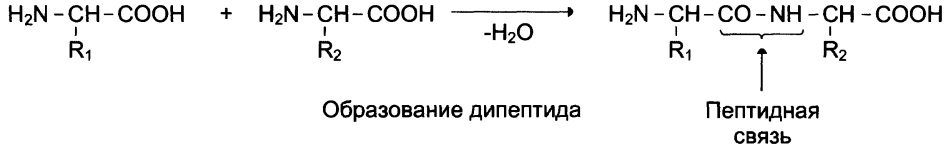


Схема А. Образование дипептида

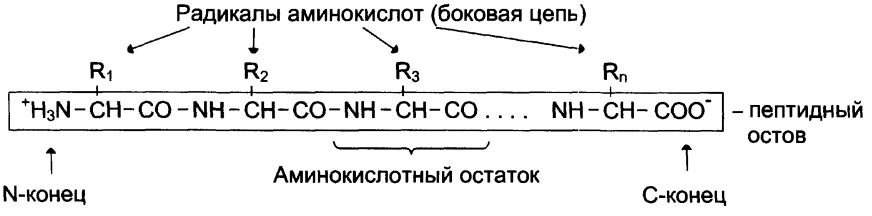


Схема Б. Строение пептидов

кислот. Сер-Гис-Про-Ала и Ала-Про-Гис-Сер — два разных пептида, несмотря на то, что они имеют одинаковые количественный и качественный составы аминокислот.

2. Характеристика пептидной связи

Пептидная связь имеет характеристику частично двойной связи, поэтому она короче, чем остальные связи пептидного остова, и вследствие этого мало подвижна. Электронное строение пептидной связи определяет плоскую жёсткую структуру пептидной группы. Плоскости пептидных групп расположены под углом друг к другу (рис. 1-1).

Связь между α-углеродным атомом и α-аминогруппой или α-карбоксильной группой способна к свободным вращениям (хотя ограничена размером и характером радикалов), что позволяет полипептидной цепи принимать различные конфигурации.

Пептидные связи обычно расположены в транс-конфигурации, т.е. α-углеродные атомы располагаются по разные стороны от пептидной связи. В результате боковые радикалы аминокислот находятся на наиболее удалённом расстоянии друг от друга в пространстве (рис. 1-2).

Пептидные связи очень прочны и самопроизвольно не разрываются при нормальных условиях, существующих в клетках (нейтральная среда, температура тела). В лабораторных условиях гидролиз пептидных связей белков проводят в запаянной ампуле с концентрированной (6 моль/л) соляной кислотой, при температуре более 105 °С, причём полный гидролиз белка до свободных аминокислот проходит примерно за сутки.

В живых организмах пептидные связи в белках разрываются с помощью специальных протеолитических ферментов (от англ. *protein* — белок, *lysis* — разрушение), называемых также протеазами, или пептидгидролазами.

Для обнаружения в растворе белков и пептидов, а также для их количественного определения используют биуретовую реакцию (положительный результат для веществ, содержащих в своём составе не менее двух пептидных связей).

3. Биологическая роль пептидов

В организме человека вырабатывается множество пептидов, участвующих в регуляции различных биологических процессов и обладающих высокой физиологической активностью.

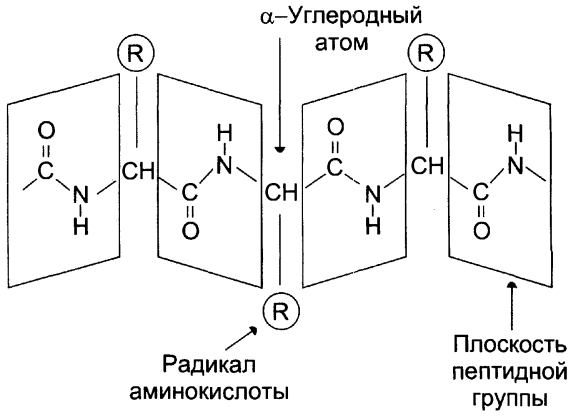


Рис. 1-1. Плоскости расположения пептидных групп и α-углеродных атомов в пространстве.

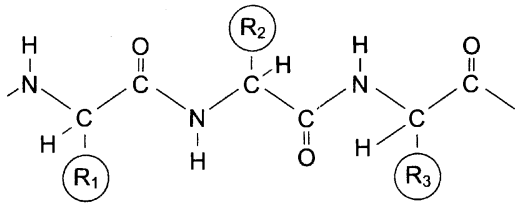


Рис. 1-2. Транс-конфигурация пептидных связей. Функциональные группы –CO– и –NH–, образующие пептидные связи, не ионизированы, но полярны, и могут участвовать в образовании водородных связей.

Количество аминокислотных остатков в структуре биологически активных пептидов может варьировать от 3 до 50. К одним из самых «маленьких» пептидов можно отнести тиреотропин-рилизинг-гормон и глутатион (трипептиды), а также энкефалины, имеющие в своём составе 5 аминокислот. Однако большинство биологически активных пептидов имеет в своём составе более 10 аминокислот, например нейропептид Y (регулятор аппетита) содержит 36 аминокислот, а кортиколиберин — 41 аминокислоту.

Некоторые из пептидов, в частности большинство пептидных гормонов, содержат пептидные связи, образованные α-аминогруппой и α-карбоксильной группой соседних аминокислот. Как правило, они синтезируются из неактивных белковых предшественников, в которых специфические протеолитические ферменты разрушают определённые пептидные связи.

Ангиотензин II — октапептид, образующийся из крупного белка плазмы крови ангиотен-

зиногена в результате последовательного действия двух протеолитических ферментов.

Первый протеолитический фермент ренин отщепляет от ангиотензиногена с N-конца пептид, содержащий 10 аминокислот, называемый ангиотензином I. Второй протеолитический фермент карбоксидипептидилпептидаза отщепляет от С-конца ангиотензина I 2 аминокислоты, в результате чего образуется биологически активный ангиотензин II, участвующий в регуляции АД и водно-солевого обмена в организме (см. схему А).

Однако в некоторых биологически активных пептидах могут содержаться либо необычные аминокислоты, либо существовать необычные связи между аминокислотами, не встречающиеся в белках.

Пример пептида, содержащего необычную для белков связь между аминокислотами, — трипептид глутатион, построенный из глутамата, цистеина и глицина (см. схему Б).

N-концевая аминокислота глутамат связана со второй аминокислотой цистеином не через α-карбоксильную группу, а через γ-карбоксильную группу его радикала. Глутатион — широко распространённый пептид организма человека. Он может быть использован в окислительно-восстановительных реакциях как донор и акцептор водорода и необходим для работы ряда ферментов.

Функции пептидов зависят от их первичной структуры. Ангиотензин I по структуре очень похож на ангиотензин II (имеет только две дополнительные аминокислоты с С-конца), но при этом не обладает биологической активностью.

Изменение в аминокислотном составе пептидов часто приводит к потере одних и возникновению других биологических свойств. В качестве примера можно рассмотреть структуру и свойства двух пептидных гормонов — окситоцина и вазопрессина.

В гипоталамусе окситоцин и вазопрессин образуются в результате частичного (ограниченного) протеолиза более крупных белковых предшественников. Из гипоталамуса по нервным волокнам эти гормоны внутри секреторных гранул перемещаются в нервные окончания аксонов, находящихся в задней доле гипофиза. После действия специфических стимулов эти гормоны выделяются в кровь (см. схему А на с. 13).

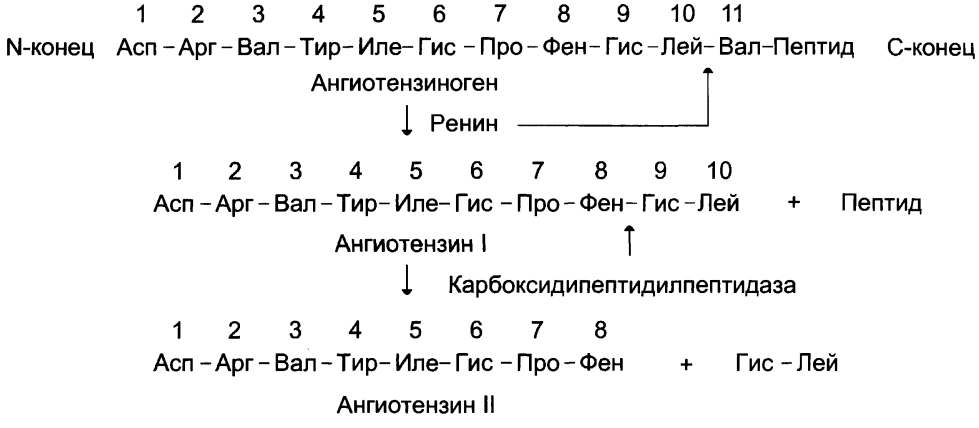


Схема А

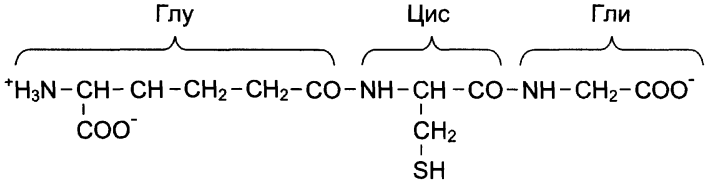


Схема Б. Трипептид глутатион (γ-глутамилцистеинилглицин)

Окситоцин и вазопрессин в своей структуре имеют много общего:

- оба содержат 9 аминокислотных остатков;
- 7 аминокислотных остатков из 9 идентичны;
- 2 остатка цистеина соединены дисульфидной связью;
- на С-конце пептидов α-карбоксильная группа глутамата амидирована.

Несмотря на небольшие отличия в последовательности аминокислот (замены аминокислот в положениях 3 и 8) эти гормоны сильно отличаются по физиологическому действию. Так, окситоцин выделяется в кровь во время кормления ребёнка, вызывает сокращение миоэпителиальных клеток протоков молочных желёз и стимулирует выделение молока. Кроме того, окситоцин влияет на гладкую мускулатуру матки во время родов, вызывая её сокращение.

В отличие от окситоцина, основное физиологическое действие вазопрессина — увеличение реабсорбции воды в почках при уменьшении АД или объёма крови (поэтому другое название этого гормона — антидиуретический). Кроме того, вазопрессин вызывает сужение ГМК сосудов.

Интересно отметить, что наличие в положении 8 основной аминокислоты важно для проявления антидиуретической активности, а аминокислоты с гидрофобным радикалом в положении 3 — для сокращения ГМК.

Так как пептиды — мощные регуляторы биологических процессов, их можно использовать как лекарственные препараты. Основное препятствие для терапевтического использования — их быстрое разрушение в организме. Одним из важнейших результатов исследований является не только изучение структуры пептидов, но и получение синтетических аналогов природных пептидов с целенаправленными изменениями в их структуре и функциях.

Например, синтезирован пептид 1-дезамино-8-D-аргинин-вазопрессин (ДАВ), структура которого представлена на схеме Б.

В структуре этого пептида (по сравнению с вазопрессином) нет аминогруппы на N-конце, и вместо L-аргинина в положении 8 стоит D-аргинин. Такой синтетический пептид обладает только антидиуретической активностью и химически устойчив, т.е. при введении в организм вызывает длительную реакцию. Такой искусственный аналог гормона (по сравнению с природным) более эффективен при лечении гормональной недостаточности.

Открытые и изученные в настоящее время пептиды можно разделить на группы по их основному физиологическому действию:

- пептиды, обладающие гормональной активностью (окситоцин, вазопрессин, рилизинг-гормоны гипоталамуса, меланоцитстимулирующий гормон, глюкагон и др.);

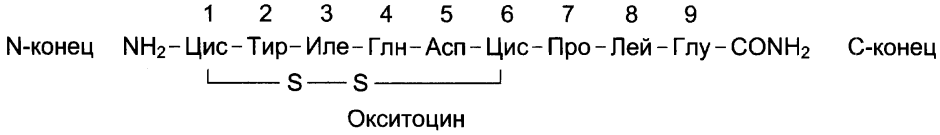


Схема А

Схема Б

- пептиды, регулирующие процессы пищеварения (гастрин, холецистокинин, вазоинтестинальный пептид, желудочный ингибирующий пептид и др.);
- пептиды, регулирующие тонус сосудов и АД (брадикинин, калидин, ангиотензин II);
- пептиды, регулирующие аппетит (лептин, нейропептид Y, меланоцитстимулирующий гормон, β-эндорфины);
- пептиды, обладающие обезболивающим действием (энкефалины и эндорфины и другие опиоидные пептиды). Обезболивающий эффект этих пептидов в сотни раз превосходит анальгезирующий эффект морфина;
- пептиды, участвующие в регуляции высшей нервной деятельности, в биохимических процессах, связанных с механизмами сна, обучения, памяти, возникновения чувства страха и т.д.

Однако такое деление пептидов крайне условно. Появились данные о том, что многие пептиды обладают широким спектром действия. Так, меланоцитстимулирующий гормон, помимо стимуляции пигментообразования, участвует в регуляции аппетита (вместе с лептином подавляет потребление пищи и является антагонистом нейропептида Y). В то же время β-эндорфины, кроме анальгезирующего эффекта, — синергисты нейропептида Y, т.е. усиливают потребление пищи. Описанный выше вазопрессин, кроме антидиуретического и сосудосуживающего действия, имеет свойство улучшать память.

II. СТРУКТУРА БЕЛКОВ

Пептидные цепи содержат десятки, сотни и тысячи аминокислотных остатков, соединённых прочными пептидными связями. За счёт внутримолекулярных взаимодействий белки образуют определённую пространственную структуру, называемую **«конформация белков»**. Линейная последовательность аминокислот в белке содержит информацию о построении трёхмерной пространственной структуры. Различают 4 уровня структурной организации белков, называемых первичной, вторичной, третичной и четвертичной структурами (рис. 1-3). Существуют общие правила, по которым идёт формирование пространственных структур белков.

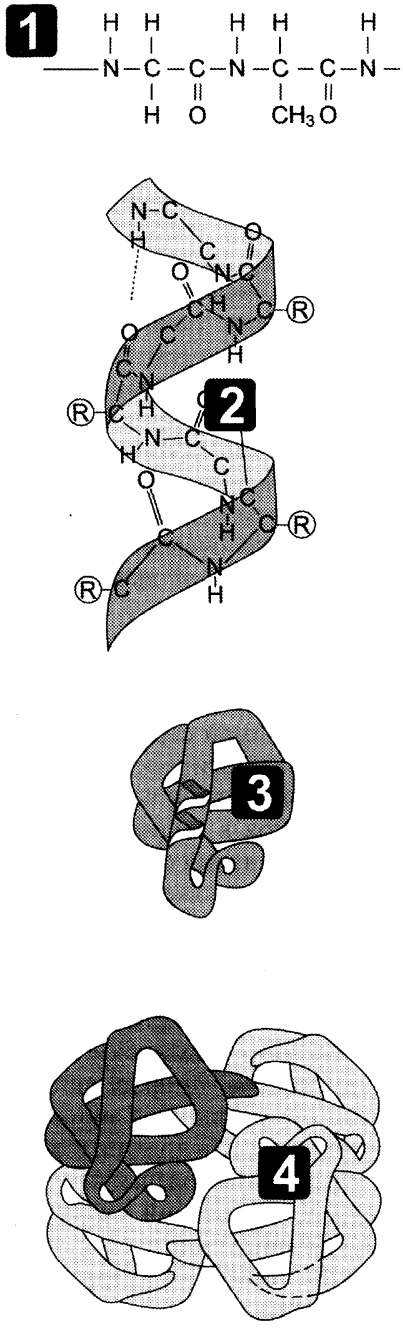


Рис. 1-3. Этапы формирования конформации белков. 1 — первичная структура; 2 — вторичная структура; 3 — третичная структура; 4 — четвертичная структура.

А. Первичная структура

Аминокислотные остатки в пептидной цепи белков чередуются не случайным образом, а расположены в определённом порядке. Линейную последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи называют **«первичная структура белка»**.

Первичная структура каждого индивидуального белка закодирована в участке ДНК, называемом геном. В процессе синтеза белка информация, находящаяся в гене, сначала переписывается на мРНК, а затем, используя мРНК в качестве матрицы, на рибосоме происходит сборка первичной структуры белка (см. раздел 4).

Каждый из 50 000 индивидуальных белков организма человека имеет уникальную для данного белка первичную структуру. Все молекулы данного индивидуального белка имеют одинаковое чередование аминокислотных остатков в белке, что в первую очередь отличает данный индивидуальный белок от любого другого.

Б. Методы изучения первичной структуры белка

Изучение первичной структуры белков имеет важное общебиологическое и медицинское значение. Изучая порядок чередования аминокислотных остатков в индивидуальных белках и сопоставляя эти знания с особенностями пространственного расположения молекулы, можно выявить общие фундаментальные закономерности формирования пространственной структуры белков.

Кроме того, многие генетические болезни — результат нарушения в аминокислотной последовательности белков. Информация о первичной структуре нормального и мутантного белка может быть полезна для диагностики и прогнозирования развития заболевания.

Установление первичной структуры белков включает 2 основных этапа:

- определение аминокислотного состава изучаемого белка;
- определение аминокислотной последовательности в белке.

1. Определение аминокислотного состава белка

Первый этап в определении первичной структуры белков заключается в качественной и количественной оценке аминокислотного состава данного индивидуального белка. Необходимо помнить, что для исследования нужно иметь определённое количество чистого белка, без примесей других белков или пептидов.

Кислотный гидролиз белка

Для определения аминокислотного состава необходимо провести разрушение всех пептидных связей в белке. Анализируемый белок гидролизуют в 6 мол/л HCl при температуре около 110 °С в течение 24 ч. В результате такой обработки разрушаются пептидные связи в белке, а в гидролизате присутствуют только свободные аминокислоты. Кроме того, глутамин и аспарагин гидролизуются до глутаминовой и аспарагиновой кислот (т.е. разрывается амидная связь в радикале и от них отщепляется аминогруппа).

Разделение аминокислот с помощью ионообменной хроматографии

Смесь аминокислот, полученных кислотным гидролизом белков, разделяют в колонке с катионообменной смолой. Такая синтетическая смола содержит прочно связанные с ней отрицательно заряженные группы (например, остатки сульфоновой кислоты $-SO_3^-$), к которым присоединены ионы Na^+ (рис. 1-4).

В катионообменник вносят смесь аминокислот в кислой среде (pH 3,0), где аминокислоты в основном представляют катионы, т.е. несут положительный заряд. Положительно заряженные аминокислоты присоединяются к отрицательно заряженным частицам смолы. Чем больше суммарный заряд аминокислоты, тем прочнее её связь со смолой. Так, аминокислоты лизин, аргинин и гистидин наиболее прочно связываются с катионообменником, а аспарагиновая и глутаминовая кислоты — наиболее слабо.

Высвобождение аминокислот из колонки осуществляют вымыванием (элюированием) их буферным раствором с увеличивающейся ионной силой (т.е. с увеличением концентрации NaCl) и pH. При увеличении pH аминокислоты теряют протон, в результате уменьшается их положительный заряд, а следовательно и прочность связи с отрицательно заряженными частицами смолы.

Каждая аминокислота выходит из колонки при определённом значении pH и ионной силы. Со-

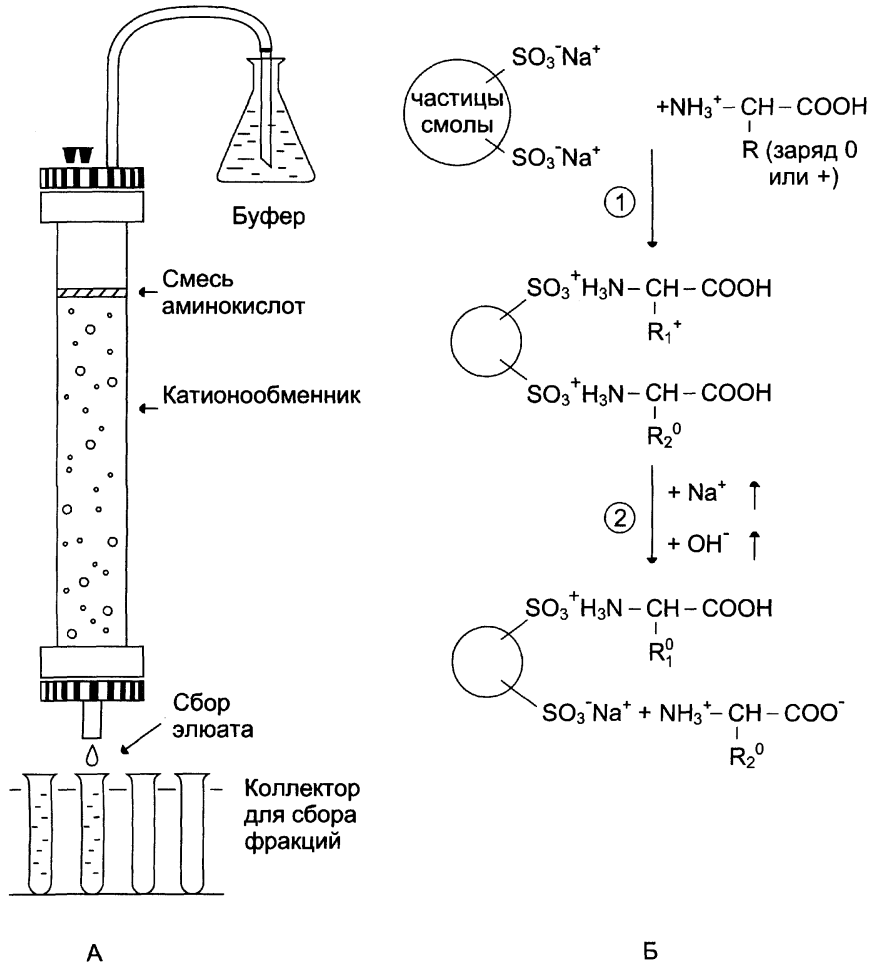


Рис. 1-4. Разделение аминокислот с помощью ионообменной хроматографии. А. Хроматографическая колонка, наполненная катионообменной смолой. Б. Этапы разделения аминокислот: 1 — присоединение аминокислот к частицам смолы; 2 — высвобождение аминокислот при определённом значении pH и концентрации NaCl.

бирая с нижнего конца колонки раствор (элюат) в виде небольших порций, можно получить фракции, содержащие отдельные аминокислоты.

Количественный анализ полученных фракций

Количество каждой из аминокислот в данном белке определяют, нагревая отдельные фракции аминокислот с нингидрином, образующим соединение красно-фиолетового цвета. Интенсивность окраски в пробе пропорциональна количеству находящейся в ней аминокислоты, поэтому по спектрофотометрическому измерению света, поглощённого нингидриновыми производными, можно определить содержание каждой аминокислоты в гидролизате данного белка.

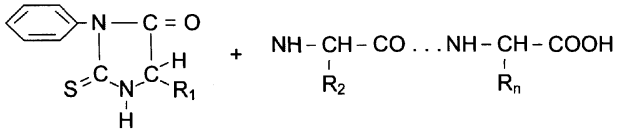
В настоящее время процесс разделения и количественного определения аминокислот в гидролизате белка полностью автоматизирован и осуществляется в специальном приборе — аминокислотном анализаторе.

2. Определение аминокислотной последовательности в белке

Определение N-концевой аминокислоты в белке и последовательности аминокислот в олигопептидах

Фенилизотиоцианат (ФИТЦ) — реагент, используемый для определения N-концевой аминокислоты в пептиде. Он способен реагировать с α-аминогруппой и α-карбоксильной группой свободных аминокислот, а также с N-концевой аминокислотой в пептидах (см. схему ниже).

В результате взаимодействия с N-концевой аминокислотой полипептида образуется фенилтиогидантионовое производное, в котором дестабилизирована пептидная связь между α-карбоксильной группой N-концевой аминокислоты и α-аминогруппой второй аминокислоты в пептиде. Эта связь избирательно гидролизуется без повреждения других пептидных связей.



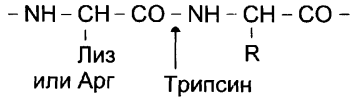
После реакции выделяют комплекс ФИТЦ-$АК_1$, идентифицируют его хроматографическими методами. ФИТЦ можно использовать вновь с укороченным пептидом, полученным в предыдущем цикле, для определения следующей аминокислоты. Этот процесс ступенчатого расщепления пептида с N-конца был автоматизирован и реализован в приборе — секвенаторе, с помощью которого можно определять последовательность аминокислотных остатков в олигопептидах, состоящих из 10—20 аминокислот.

Многие полипептиды имеют первичную структуру, состоящую более чем из 100 аминокислот. Так как с помощью секвенаторов наиболее продуктивно определяют аминокислотную последовательность лишь небольших пептидов, молекулы полипептида расщепляют по специфическим местам на фрагменты.

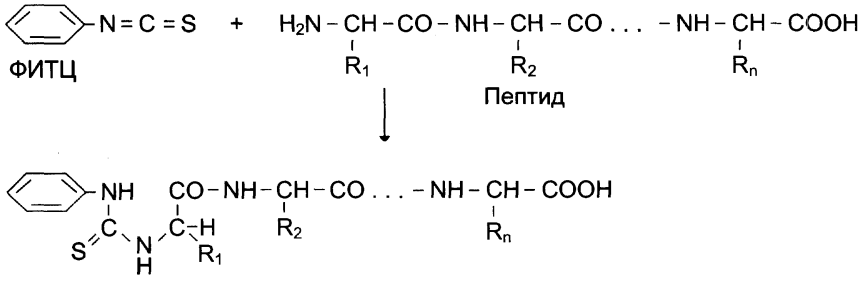
Используя несколько разных расщепляющих агентов (ими могут быть ферменты или химические вещества) в разных пробах очищенного полипептида, можно получить частично перекрывающие друг друга фрагменты с установленной аминокислотной последовательностью. С их помощью можно воссоздать правильный порядок фрагментов и получить полную последовательность аминокислот в полипептидной цепи.

Ферментативное расщепление полипептида по специфическим участкам

Для специфического расщепления пептидных связей в белке можно использовать несколько разных ферментов. Наиболее широко используют ферментативный гидролиз полипептида протеолитическим ферментом — трипсином, который относят к группе пищеварительных ферментов (его вырабатывает поджелудочная железа). Фермент обладает высокой специфичностью действия. Он расщепляет пептидные связи, в образовании которых участвует карбоксильная группа остатков лизина или аргинина.



Исходя из установленного количества остатков лизина и аргинина, можно предсказать количество получаемых при гидролизе трипсином фрагментов. Так, если в полипептидной цепи 6 остатков аргинина и лизина, то при расщеп-



Схема

лении трипсином можно получить 7 фрагментов.

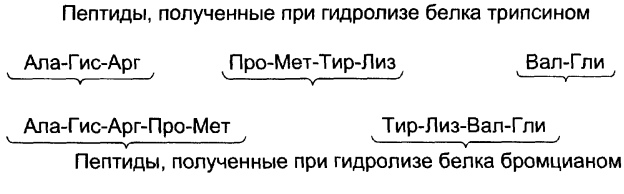
Затем в каждом фрагменте устанавливают аминокислотную последовательность.

Химическое расщепление полипептида по специфическим участкам

В некоторых случаях предпочтителен не ферментативный, а химический гидролиз. Так, реагент бромциан расщепляет только пептидные связи, в которых карбоксильная группа принадлежит остатку метионина. Зная количество остатков метионина в полипептидной цепи, легко установить количество получаемых фрагментов. Далее для каждого фрагмента в секвенаторе также устанавливают аминокислотную последовательность.

Получение аминокислотной последовательности полипептида с помощью перекрывающихся фрагментов

Для успешного установления последовательности полученных фрагментов полипептида необходимо получить пептиды с перекрывающимися аминокислотными последовательностями. Это достигают обработкой отдельных проб данного полипептида разными реагентами, расщепляющими белок в разных местах. Необходимо провести столько расщеплений, чтобы получить набор пептидов, обеспечивающих перекрывание всех участков, необходимых для определения последовательности исходного полипептида.



Установление первичной структуры белка с помощью перекрывающихся пептидных фрагментов.

В. Конформация белков

Линейные полипептидные цепи индивидуальных белков за счёт взаимодействия функциональных групп аминокислот приобретают определённую пространственную трёхмерную структуру, называемую «**конформация**». Все молекулы индивидуальных белков (т.е. имеющих одинаковую первичную структуру) образуют в растворе одинаковую конформацию. Следовательно, вся информация, необходимая для формирования пространственных структур, находится в первичной структуре белков.

В белках различают 2 основных типа конформации полипептидных цепей: вторичную и третичную структуры.

1. Вторичная структура белков

Вторичная структура белков — пространственная структура, образующаяся в результате взаимодействий между функциональными группами, входящими в состав пептидного остова. При этом пептидные цепи могут приобретать регулярные структуры двух типов: α-спираль и β-структура.

α-Спираль

В данном типе структуры пептидный остов закручивается в виде спирали за счёт образования водородных связей между атомами кислорода карбонильных групп и атомами азота аминогрупп, входящих в состав пептидных групп через 4 аминокислотных остатка. Водородные связи ориентированы вдоль оси спирали (рис. 1-5). На один виток α-спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка.

В образовании водородных связей участвуют практически все атомы кислорода и водорода пептидных групп. В результате α-спираль «стягивается» множеством водородных связей. Несмотря на то, что данные связи относят к разряду слабых, их количество обеспечивает максимально возможную стабильность α-спирали. Так как все гидрофильные группы пептидного остова обычно участвуют в образовании водородных связей, гидрофильность (т.е. способность образовывать водородные связи с водой) α-спиралей уменьшается, а их гидрофобность увеличивается.

α-Спиральная структура — наиболее устойчивая конформация пептидного остова, отвечающая минимуму свободной энергии. В результате образования α-спиралей полипептидная цепь укорачивается, но если создать условия для разрыва водородных связей, полипептидная цепь вновь удлинится.

Радикалы аминокислот находятся на наружной стороне α-спирали и направлены от пептидного остова в стороны. Они не участвуют в образова-

нии водородных связей, характерных для вторичной структуры, но некоторые из них могут нарушать формирование α-спирали. К ним относят:

- *пролин*. Его атом азота входит в состав жёсткого кольца, что исключает возможность вращения вокруг -N-CH- связи. Кроме того, у атома азота пролина, образующего пептидную связь с другой аминокислотой, нет атома водорода. В результате пролин не способен образовать водородную связь в данном месте пептидного остова, и α-спиральная структура нарушается. Обычно в этом месте пептидной цепи возникает петля или изгиб;
- участки, где последовательно расположены несколько одинаково заряженных радикалов, между которыми возникают электростатические силы отталкивания;
- участки с близко расположенными объёмными радикалами, механически нарушающими формирование α-спирали, например метионин, триптофан.

β-Структура

β-Структура формируется за счёт образования множества водородных связей между атомами пептидных групп линейных областей одной полипептидной цепи, делающей изгибы, или между разными полипептидными цепями. β-Структура образует фигуру, подобную листу, сложенному «гармошкой», — β-складчатый слой (рис. 1-6).

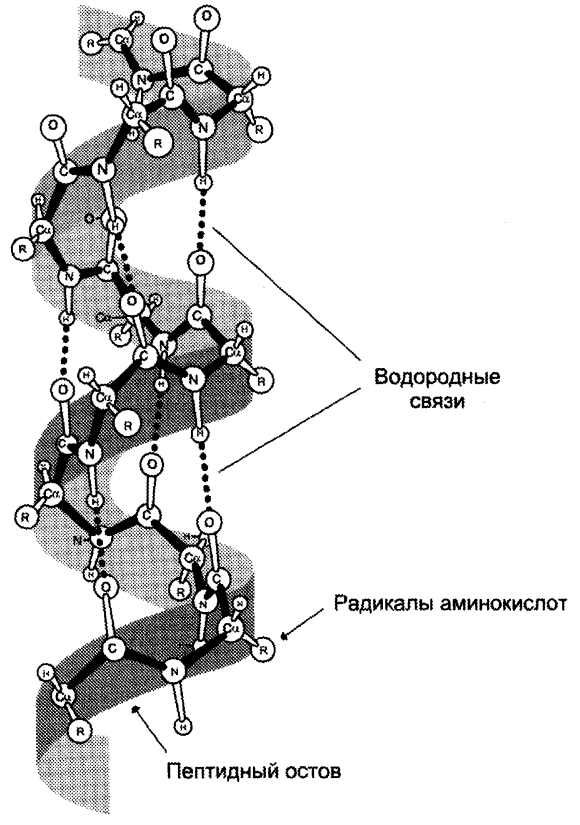


Рис. 1-5. α-Спираль. На рисунке показаны пространственное строение α-спирализованного участка полипептидной цепи и образование водородных связей, участвующих в формировании α-спирали.

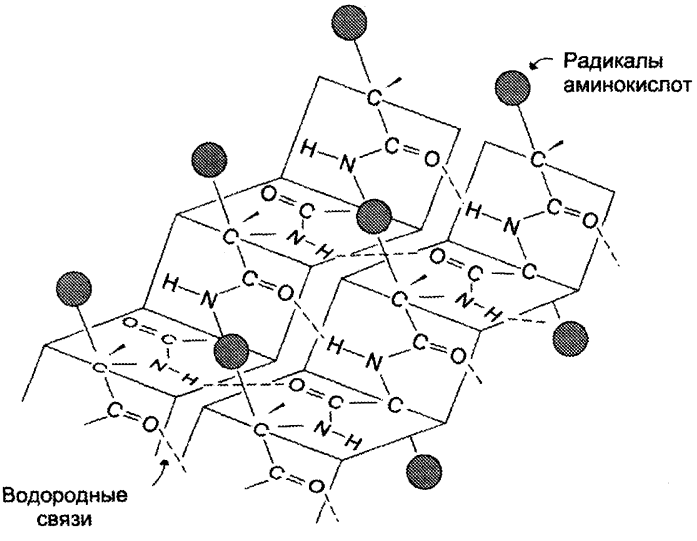


Рис. 1-6. Вторичная структура белков в виде β-складчатого слоя.

Когда водородные связи образуются между атомами пептидного остова различных полипептидных цепей, их называют межцепочечными связями. Водородные связи, возникающие между линейными участками внутри одной полипептидной цепи, называют внутрицепочечными. В β-структурах водородные связи расположены перпендикулярно полипептидной цепи.

Если связанные полипептидные цепи направлены противоположно, возникает антипараллельная β-структура, если же N- и С-концы полипептидных цепей совпадают, образуется структура параллельного β-складчатого слоя (рис. 1-7).

В отличие от α-спиралей, разрыв водородных связей, формирующих β-структуры, не вызывает удлинения данных участков полипептидных цепей.

Как α-спираль, так и β-структуры обнаружены в глобулярных и фибриллярных белках.

Нерегулярные вторичные структуры

В белках отмечают области с нерегулярной вторичной структурой, которые часто называют беспорядочными клубками. Они представлены петлеобразными и кольцеобразными структурами, имеющими меньшую регулярность укладки, чем описанные выше α-спираль и β-структура. Однако и они не так сильно варьируют от одной молекулы белка к другой. В каждом индивидуальном белке они имеют свою фиксированную конформацию, определяемую аминокислотным составом данного участка цепи и окружающих его участков.

Термином «беспорядочный клубок» также часто называют денатурированный белок, образовавшийся после разрыва слабых внутримолекулярных связей и потерявший свою упорядоченную структуру.

Содержание разных типов вторичных структур в белках

Содержание рассмотренных выше типов вторичных структур в разных белках неодинаково. По наличию α-спиралей и β-структур глобулярные белки можно разделить на 4 категории.

- К первой категории относят белки, в структуре которых обнаружены только α-спирали. К ним принадлежат такие белки, как миоглобин и гемоглобин (рис. 1-8).
- Ко второй категории относят белки с α-спиралями и β-структурами, иногда образующими однотипные сочетания, встречающиеся в разных индивидуальных белках (рис. 1-9).

Характерные сочетания α-спиралей и β-структур, обнаруженные во многих ферментах, можно рассмотреть на примере строения доменов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и фосфоглицераткиназы (ФГК). Домен — участок полипептидной цепи, который самостоятельно от других участков той же цепи образует структуру, во многом напоминающую глобулярный белок.

В одном из доменов лактатдегидрогеназы в центре расположены β-структуры полипептидной цепи в виде скрученного листа, и каждая β-структура связана с α-спиральным участком, находящимся на поверхности молекулы. Как видно из рис. 1-9, сходный домен имеется также в молекуле фосфоглицераткиназы.

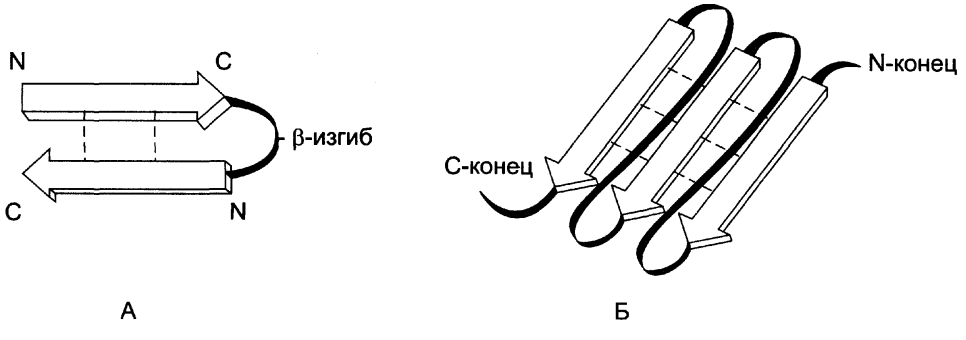


Рис. 1-7. Параллельный и антипараллельный β-складчатые слои. β-Структуры обозначены широкими стрелками. А – антипараллельная β-структура; Б – параллельные β-складчатые структуры.

- В третью категорию включены белки, имеющие только β-структуры. Такие структуры обнаружены в иммуноглобулинах, в ферменте супероксиддисмутазе (рис. 1-10).
- В четвёртую категорию включены белки, имеющие в своём составе лишь незначительное количество регулярных вторичных структур.

2. Третичная структура белков

Третичная структура белков — трёхмерная пространственная структура, образующаяся за счёт взаимодействий между радикалами аминокислот, которые могут располагаться на значительном расстоянии друг от друга в полипептидной цепи.

Связи, участвующие в формировании третичной структуры белков

Гидрофобные взаимодействия

При укладке полипептидная цепь белка стремится принять энергетически выгодную форму, характеризующуюся минимумом свободной энергии. Поэтому гидрофобные радикалы аминокислот стремятся к объединению внутри глобулярной структуры растворимых в воде белков. Между ними возникают так называемые **гидрофобные взаимодействия**, а также силы ван дер Ваальса между близко прилегающими друг к другу атомами. В результате внутри белковой глобулы формируется **гидрофобное ядро**. Гидрофильные группы пептидного остова при формировании вторичной структуры образуют множество водородных связей, благодаря чему исключается связывание с ними воды и разрушение внутренней, плотной структуры белка.

Ионные и водородные связи

Гидрофильные радикалы аминокислот стремятся образовать водородные связи с водой и поэтому в основном располагаются на поверхности белковой молекулы.

Все гидрофильные группы радикалов аминокислот, оказавшиеся внутри гидрофобного ядра, взаимодействуют друг с другом с помощью ионных и водородных связей (рис. 1-11).

Ионные связи могут возникать между отрицательно заряженными (анионными) карбоксильными группами радикалов аспарагиновой и глутаминовой кислот и положительно заряженными (катионными)

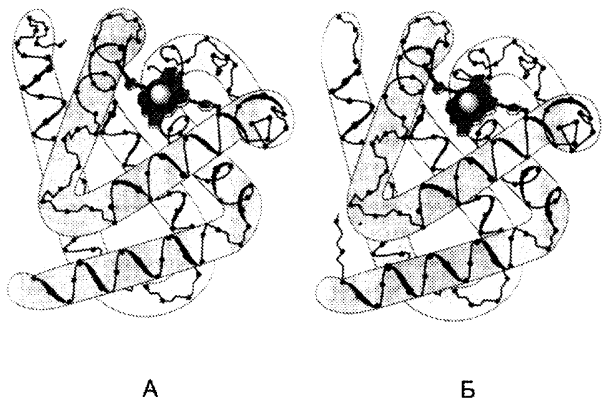


Рис. 1-8. Восемь α-спиралей в структуре миоглобина (А) и β-цепи гемоглобина (Б).

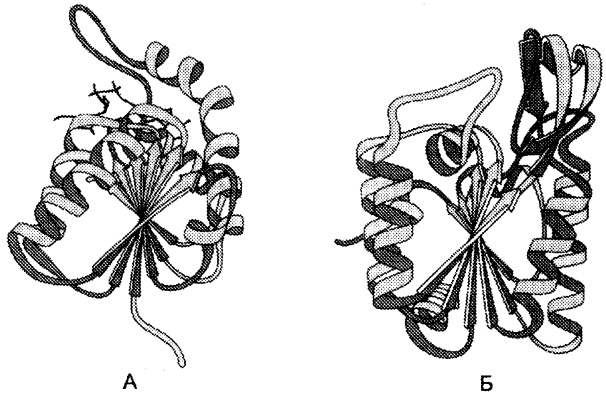


Рис. 1-9. α-Спирали и β-структуры в домене лактатдегидрогеназы (А) и фосфоглицераткиназы (Б).

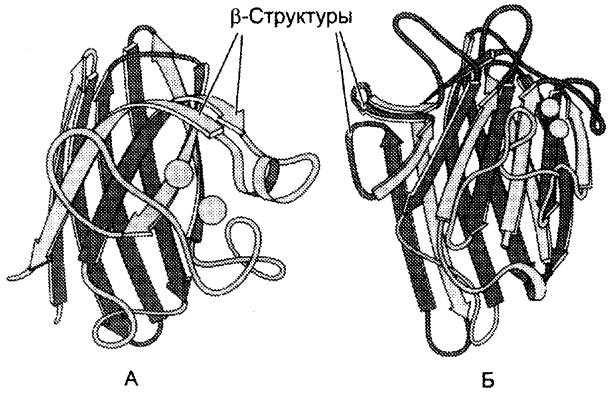


Рис. 1-10. β-Складчатая вторичная структура в константном домене иммуноглобулина (А) и ферменте супероксиддисмутазе (Б).

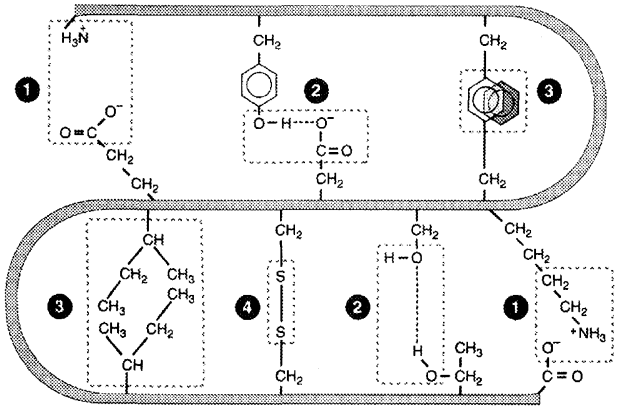


Рис. 1-11. Типы связей, возникающих между радикалами аминокислот при формировании третичной структуры белка. 1 — ионные связи; 2 — водородные связи; 3 — гидрофобные связи; 4 — дисульфидные связи.

группами радикалов лизина, аргинина или гистидина.

Водородные связи возникают между гидрофильными незаряженными группами (такими как -OH, -$CONH_2$, SH-группы) и любыми другими гидрофильными группами.

Белки, функционирующие в неполярном (липидном) окружении, например белки мембран, имеют обратное устройство: гидрофильные радикалы аминокислот расположены внутри белка, в то время как гидрофобные аминокислоты локализованы на поверхности молекулы и контактируют с неполярным окружением. В каждом случае радикалы аминокислот занимают наиболее выгодное биоэнергетическое положение.

Ковалентные связи

Третичную структуру некоторых белков стабилизируют **дисульфидные связи**, образующиеся за счёт взаимодействия SH-групп двух остатков цистеина. Эти два остатка цистеина могут находиться далеко друг от друга в линейной первичной структуре белка, но при формировании третичной структуры они сближаются и образуют прочное ковалентное связывание радикалов (рис. 1-12).

Большинство внутриклеточных белков лишено дисульфидных связей. Однако такие связи распространены в белках, секретируемых клеткой во внеклеточное пространство. Полагают, что эти ковалентные связи стабилизируют конформацию белков вне клетки и предотвращают их денатурацию. К таким белкам относят гормон инсулин и иммуноглобулины.

Инсулин — белковый гормон; содержит 51 аминокислоту, состоит из двух полипептидных цепей (цепь А содержит 21 аминокислоту, цепь В — 30 аминокислот). Инсулин синтезируется в β-клетках поджелудочной железы и секретируется в кровь в ответ на повышение концентрации глюкозы в крови. В структуре инсулина имеются 2 дисульфидные связи, соединяющие 2 полипептидные цепи А и В, и 1 дисульфидная связь внутри цепи А (рис. 1-13). Структура иммуноглобулинов рассмотрена в подразделе 6 Д.

Все белки с одинаковой первичной структурой, находящиеся в одинаковых условиях, приобретают одинаковую, характерную для данного индивидуального белка конформацию, определяющую его специфическую функцию. Функционально активную конформацию белка называют «**нативная структура**».

3. Конформационная лабильность белков

Гидрофобные взаимодействия, а также ионные и водородные связи относят к числу слабых, так как их энергия лишь ненамного превышает энергию теплового движения атомов при комнатной температуре (т.е. уже при данной температуре возможен разрыв таких связей).

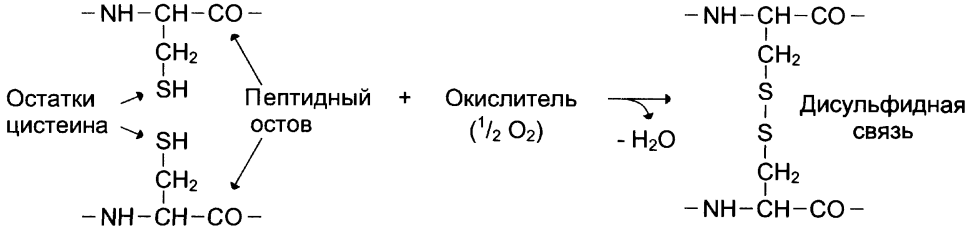


Рис. 1-12. Образование дисульфидной связи в белках.

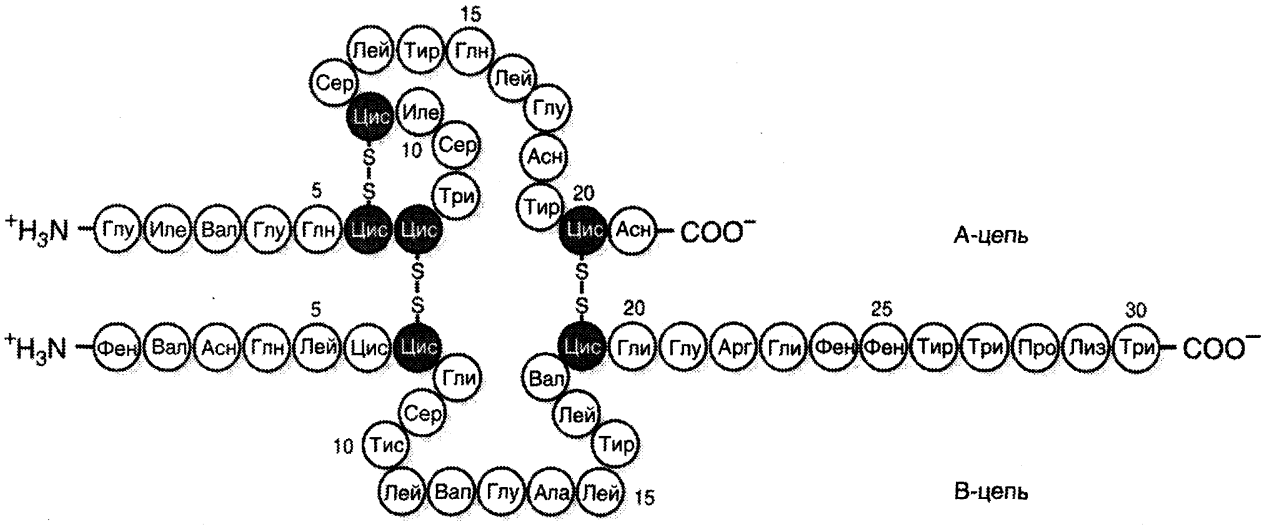


Рис. 1-13. Дисульфидные связи в структуре гормона инсулина.

Поддержание характерной для белка конформации возможно благодаря возникновению множества слабых связей между различными участками полипептидной цепи.

Однако белки состоят из огромного числа атомов, находящихся в постоянном (броуновском) движении, что приводит к небольшим перемещениям отдельных участков полипептидной цепи, которые обычно не нарушают общую структуру белка и его функции. Следовательно, белки обладают конформационной лабильностью — склонностью к небольшим изменениям конформации за счёт разрыва одних и образования других слабых связей. Конформация белка может меняться при изменении химических и физических свойств среды, а также при взаимодействии белка с другими молекулами. При этом происходит изменение пространственной структуры не только участка, контактирующего с другой молекулой, но и конформации белка в целом. Конформационные изменения играют огромную роль в функционировании белков в живой клетке.

4. Денатурация белков

Разрыв большого количества слабых связей в молекуле белка приводит к разрушению её нативной конформации. Так как разрыв связей под действием различных факторов носит случайный характер, то молекулы одного индивидуального белка приобретают в растворе форму случайно сформировавшихся беспорядочных клубков, отличающихся друг от друга трёхмерной структурой. Потеря нативной конформации сопровождается утратой специфической функции белков. Этот процесс носит название денатурации белков. При денатурации белков не происходит разрыва пептидных связей, т.е. первичная структура белка не нарушается.

В денатурированном белке гидрофобные радикалы, которые в нативной структуре молекулы спрятаны внутри гидрофобного ядра, оказываются на поверхности. При достаточно высокой концентрации белка и отсутствии сильного отталкивающего заряда молекулы могут объединяться друг с другом гидрофобными взаимодействиями, при этом растворимость белка снижается и происходит образование осадка.

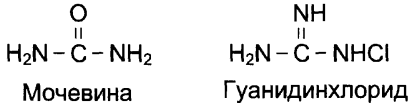
Компактная, плотная пространственная структура нативного белка при денатурации резко увеличивается в размерах и становится легко доступной для расщепления пептидных связей протеолитическими ферментами (рис. 1-14). Термическая обработка мясной пищи перед употреблением не только улучшает её вкусовые качества, но и облегчает её ферментативное переваривание в пищеварительной системе. Кроме того, денатурирующим действием на пищевые белки обладает и кислая среда желудка, вызывающая денатурацию тех белков, которые не подвергались

предварительной температурной обработке, а также оказывает денатурирующее действие на белки микроорганизмов, попавших в желудок с пищей.

5. Факторы, вызывающие денатурацию белков

Денатурацию белков вызывают факторы, способствующие разрыву гидрофобных, водородных и ионных связей, стабилизирующих конформацию белков:

- высокая температура (более 50 °С), увеличивающая тепловое движение атомов в молекуле и приводящая к разрыву слабых связей;
- интенсивное встряхивание раствора, приводящее к соприкосновению белковых молекул с воздушной средой на поверхности раздела фаз и изменению конформации этих молекул;
- органические вещества (например, этиловый спирт, фенол и его производные) способны взаимодействовать с функциональными группами белков, что приводит к их конформационным изменениям. Для денатурации белков в биохимических исследованиях часто используют мочевину или гуанидинхлорид, которые образуют водородные связи с амино- и карбонильными группами пептидного остова и некоторыми функциональными группами радикалов аминокислот. Происходит разрыв связей, участвующих в формировании вторичной и третичной структуры нативных белков, и образование новых связей с химическими реагентами;



- кислоты и щелочи, изменяя pH среды, вызывают перераспределение связей в молекуле белка;
- соли тяжёлых металлов (такие как медь, ртуть, серебро, свинец и др.) образуют прочные связи с важными функциональными группами белков (чаще всего с -SH), изменяя их конформацию и активность;
- детергенты — вещества, содержащие гидрофобный углеводородный радикал и гидрофильную функциональную группу (такие вещества называют амфифильными). Гидрофобные радикалы белков взаимодействуют с гидрофобными частями детергентов, что изменяет конформацию белков. Денатурированный под действием детергентов белок обычно остаётся в растворённом виде, так как гидрофильные части денатурирующего вещества удерживают его в растворе. К наиболее известным детергентам относят различные мыла (рис. 1-15).

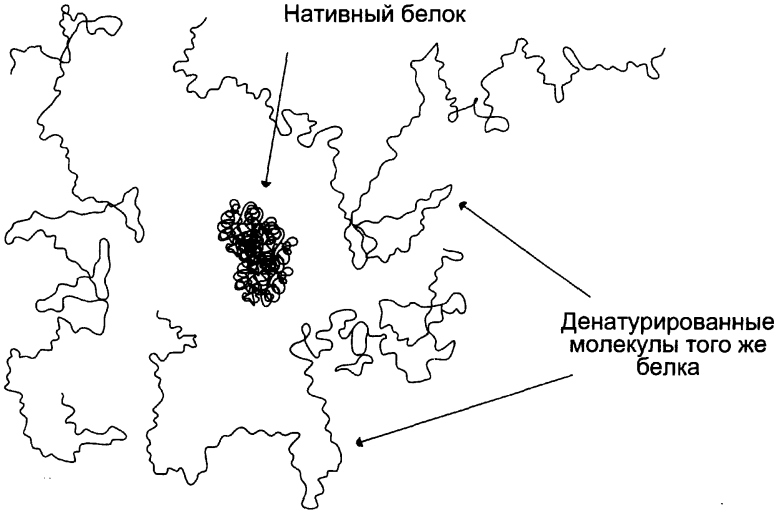


Рис. 1-14. Структура нативной молекулы белка (в центре) и трёх денатурированных молекул этого же белка.

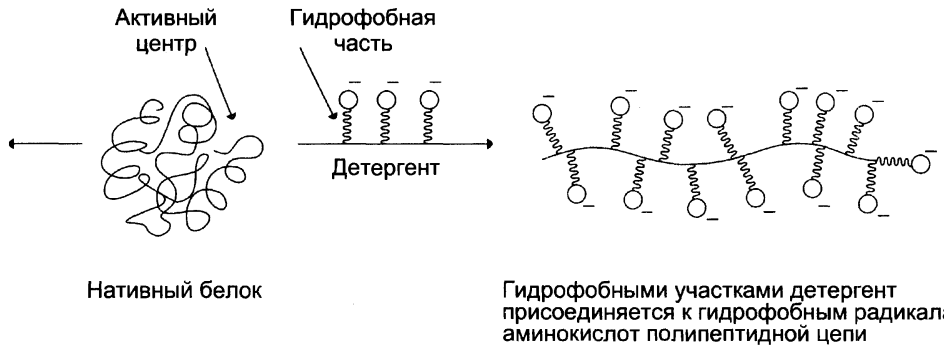


Рис. 1-15. Денатурация белков с помощью детергентов.

6. Медицинские аспекты конформационной лабильности белков

Склонность большинства белков к денатурации в процессе их выделения, хранения и использования серьёзно затрудняет их получение и применение в медицине.

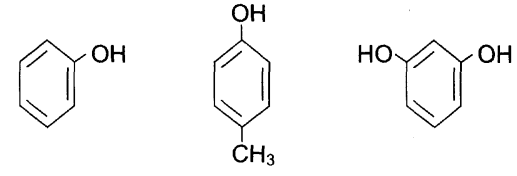
Для правильного обращения с белковыми лекарственными препаратами к ним прикладывают инструкцию, в которой указывают условия их хранения и использования. Так, большинство белковых препаратов необходимо хранить в холодильнике при температуре не выше 10 °С, растворять сухие препараты охлаждённой до комнатной температуры кипячёной водой во избежание их денатурации.

7. Применение денатурирующих агентов в биологических исследованиях и медицине

В биохимических исследованиях перед определением в биологическом материале низкомолекулярных соединений из раствора обычно удаляют белки. Для этой цели чаще всего используют трихлоруксусную кислоту. После её добавления в раствор денатурированные белки выпадают в осадок и легко удаляются фильтрованием. Трихлоруксусную кислоту можно также использовать для денатурации ферментов в целях прекращения ферментативной реакции.

В медицине денатурирующие агенты часто используют для стерилизации медицинских инструментов и материала, а также в качестве антисептиков. Например, в автоклавах при высокой температуре стерилизуют медицинские инструменты и материалы.

Фенол и его производные (крезол, резорцин) относят к известным антисептикам ароматического ряда. Обладающие высокой гидрофобностью, они эффективно действуют на вегетативные формы бактерий и грибы, вызывая денатурацию их белков. Эффективность антисептических свойств уменьшается с увеличением растворимости препарата в воде.



Фенол Крезол Резорцин

Раствор крезола в калийном мыле известен как препарат лизол, применяемый в качестве дезинфицирующего средства.

Берёзовый дёготь — одна из основных составных частей мази Вишневского, содержит в своем составе фенол. Препарат, используемый для лечения ран, обладает высоким антимикробным действием.

Значительное количество антисептиков представлено солями тяжёлых металлов. Их антимикробное действие связано с тем, что уже в довольно низких концентрациях они взаимодействуют с белками микроорганизмов, блокируют их SH-группы и изменяют их конформацию. Из-за высокой токсичности большинство лекарств, содержащих соли тяжёлых металлов, применяют в качестве поверхностных антисептиков.

Так, высокой антимикробной активностью обладает сулема — дихлорид ртути ($HgCl_2$). Её используют для обработки рук и дезинфекции помещений. Случайное или преднамеренное от-

равление препаратами ртути вызывает тяжёлые некротические поражения слизистой оболочки пищеварительного тракта и некротические изменения в почках. Антимикробными свойствами обладают и препараты серебра, такие как ляпис ($AgNO_3$), колларгол (серебро коллоидальное), применяемые для обработки слизистых оболочек при инфекционных заболеваниях.

Г. Супервторичная структура белков

Пространственная структура каждого белка индивидуальна и определяется его первичной структурой. Однако сравнение конформаций разных по структуре и функциям белков выявило наличие у них похожих сочетаний элементов вторичной структуры. Такой специфический порядок формирования вторичных структур называют супервторичной структурой белков. Супервторичная структура формируется за счёт межрадикальных взаимодействий.

Определённые характерные сочетания α-спиралей и β-структур часто обозначают как «структурные мотивы». Они имеют специфические названия: «α-спираль—поворот—α-спираль», «структура β-бочонка», «лейциновая застёжка-молния», «цинковый палец» и др. Специфическое пространственное расположение α-спиралей и β-структур формируется за счёт межрадикальных взаимодействий.

1. Супервторичная структура типа β-бочонка

Такая структура действительно напоминает бочонок, где каждая β-структура (обозначенная на рис. 1-16 стрелкой) расположена внутри и связана с α-спиральным участком полипептидной цепи, находящимся на поверхности молекулы.

Супервторичную структуру в виде β-бочонка имеют некоторые ферменты, например триозофосфатизомераза и один домен пируваткиназы (рис. 1-16).

2. Структурный мотив «α-спираль—поворот—α-спираль»

Этот «структурный мотив» обнаружен во многих ДНК-связывающих белках. Двухспиральная структура ДНК имеет две бороздки — большую и малую. Большая бороздка хорошо приспособлена для связывания белков, имеющих небольшие спиральные участки.

В данный структурный мотив входят две α-спирали: одна более короткая, другая более длинная, которые соединены поворотом полипептидной цепи. Более короткая α-спираль располагается поперёк бороздки, а более длинная α-спираль — в большой бороздке, образуя нековалентные специфические связи радикалов аминокислот с нуклеотидами ДНК (рис. 1-17).

3. Супервторичная структура в виде «цинкового пальца»

Этот вид супервторичной структуры также часто отмечают в ДНК-связывающих белках. «Цинковый палец» — фрагмент белка, содержащий около 20 аминокислотных остатков, в котором атом цинка связан с радикалами четырёх аминокислот: обычно с двумя остатками

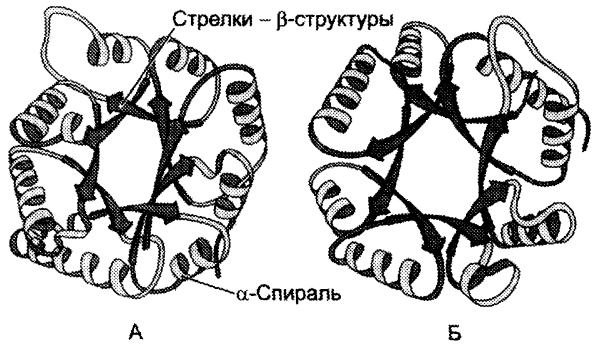


Рис. 1-16. Супервторичная структура в виде β-бочонка. А – триозофосфатизомераза; Б – домен пируваткиназы.

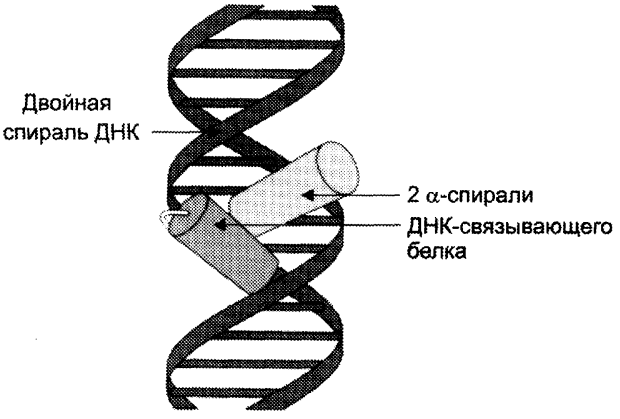


Рис. 1-17. Связывание супервторичной структуры «α-спираль–поворот–α-спираль» ДНК-связывающего белка в большой бороздке ДНК.

цистеина и двумя — гистидина. В некоторых случаях вместо остатков гистидина также находятся остатки цистеина (рис. 1-18).

Два близко лежащих остатка цистеина отделены от двух других остатков гистидина (или цистеина) аминокислотной последовательностью, состоящей примерно из 12 аминокислотных остатков. Этот участок белка образует α-спираль, которая может специфично связываться с регуляторными участками большой бороздки ДНК. Специфичность взаимодействия ДНК-связывающего белка с определённой областью ДНК зависит от последовательности аминокислотных остатков, расположенных в области «цинкового пальца».

4. Супервторичная структура в виде «лейциновой застёжки-молнии»

Некоторые ДНК-связывающие белки олигомерны, т.е. содержат в своём составе несколько полипептидных цепей. Кроме того, существуют белки, которые функционируют в комплексе с другими белками. Объединение протомеров или отдельных белков в комплексы иногда осуществляется с помощью структурных мотивов, называемых «лейциновая застёжка-молния».

На поверхности каждой из двух взаимодействующих полипептидных цепей или белков имеется α-спиральный участок, содержащий по крайней мере 4 остатка лейцина. Лейциновые остатки располагаются через каждые 6 аминокислот один от другого. Так как каждый виток α-спирали содержит 3,6 аминокислотных остатка, радикалы лейцина находятся на поверхности каждого второго витка.

Лейциновые остатки α-спирали одного белка могут взаимодействовать с лейциновыми остатками другого белка с помощью гидрофобных взаимодействий, соединяя их вместе (рис. 1-19).

Примером соединения белков с помощью «лейциновой застёжки-молнии» могут служить гистоны. Гистоны — ядерные белки, в состав которых входит большое количество положительно заряженных аминокислот — аргинина и лизина. Молекулы гистонов объединяются в комплексы, состоящие из 8 мономерных белков с помощью «лейциновых застёжек», несмотря на то, что все мономеры имеют сильный положительный заряд.

Д. Доменная структура белков

Если полипептидная цепь белка содержит более 200 аминокислот, как правило, её пространственная структура сформирована в виде двух или более доменов. **Домен** — участок полипептидной цепи, который в процессе формирования пространственной структуры приобрёл независимо от других участков той же цепи конформацию глобулярного белка. Так, лёгкая цепь иммуноглобулина G состоит из двух доменов. В некоторых случаях доменами называют отдельные структурные участки полипептидной цепи.

Домены обычно можно выделить, действуя на белок протеолитическими ферментами, легко разрывающими пептидные связи на участке полипептидной цепи, расположенной между доменами. После этого некоторые домены могут сохранять свои биологические свойства.

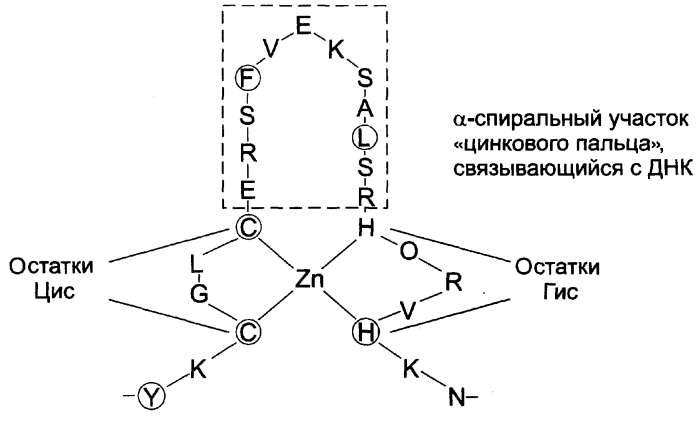


Рис. 1-18. Фрагмент ДНК-связывающего белка в форме «цинкового пальца».

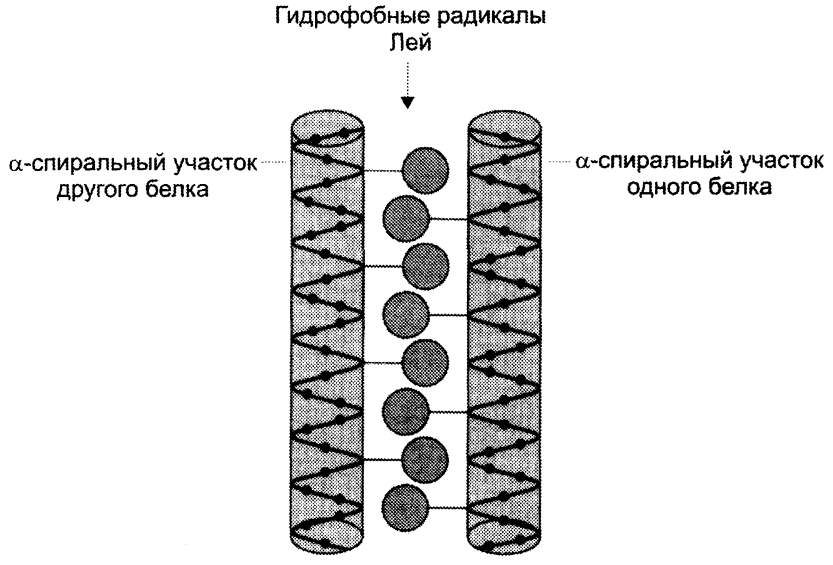


Рис. 1-19. «Лейциновая застёжка-молния» между α-спиральными участками двух белков.

Е. Четвертичная структура белков

Многие белки содержат в своём составе только одну полипептидную цепь. Такие белки называют мономерами. К мономерным относят и белки, состоящие из нескольких цепей, но соединённых ковалентно, например дисульфидными связями (поэтому инсулин следует рассматривать как мономерный белок).

В то же время существуют белки, состоящие из двух и более полипептидных цепей. После формирования трёхмерной структуры каждой полипептидной цепи они объединяются с помощью тех же слабых взаимодействий, которые участвовали в образовании третичной структуры: гидрофобных, ионных, водородных.

Количество и взаиморасположение полипептидных цепей в пространстве называют **«четвертичная структура белков»**. Отдельные полипептидные цепи в таком белке носят название протомеров, или субъединиц. Белок, содержащий в своём составе несколько протомеров, называют олигомерным.

1. Количество протомеров в структуре олигомерных белков

В состав олигомерных белков может входить от двух до нескольких десятков протомеров, хотя наиболее часто встречают белки, содержащие от двух до четырёх полипептидных цепей (димерные, тетрамерные белки).

Так, фермент гексокиназа содержит в своём составе 2 протомера; белок эритроцитов гемоглобин и фермент лактатдегидрогеназа — 4 протомера; фермент внутренней мембраны митохондрий цитохромоксидаза — 13 протомеров, а глутаминсинтетаза — 12 протомеров (рис. 1-20). Имеются также крупные многофункциональные комплексы, содержащие в своём составе несколько десятков полипептидных цепей, например пируватдегидрогеназный комплекс состоит из 312 протомеров.

Некоторые олигомерные белки содержат идентичные протомеры (например, гексокиназа), другие состоят из разных протомеров. Так, в составе гемоглобина присутствуют 2 α-

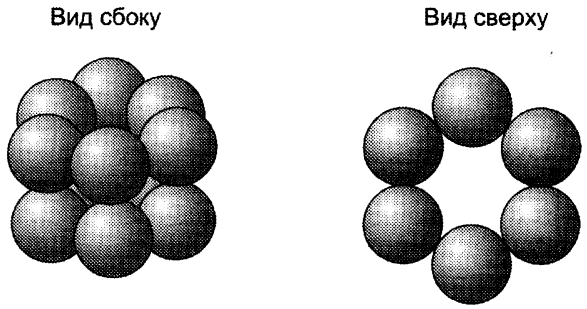


Рис. 1-20. Субъединичная структура глутаминсинтетазы.

и 2 β-протомера, а в составе лактатдегидрогеназы, имеющей 4 протомера, 2 типа мономеров (Н и М) в разных тканях могут находиться в разных сочетаниях (например, 4Н либо 3Н+1М и т.д.).

Олигомерные белки имеют большую молекулярную массу. Белки с молекулярной массой более 50 000 Д практически всегда содержат несколько мономерных полипептидных цепей. По сравнению с индивидуальными мономерными белками олигомеры выполняют более сложные функции.

2. Сборка протомеров в олигомерный белок. Комплементарность протомеров

«Узнавание» и присоединение отдельных протомеров олигомерного белка происходят благодаря формированию на их поверхности контактных участков. Последние состоят из радикалов аминокислот, собранных в данном месте в процессе образования третичной структуры белка. Совокупность этих радикалов формирует уникальные поверхности, способные с высокой специфичностью объединяться друг с другом.

Специфичность связывания контактных участков определяется их комплементарностью. **Комплементарность** — пространственное и химическое соответствие взаимодействующих поверхностей. Впадины и выступы на поверхности одной молекулы должны совпадать с выступами и впадинами на поверхности другой молекулы, как два куска неровно разорванной бумаги. Кроме того, функциональные группы радикалов аминокислот на одной контактирующей поверхности должны образовывать слабые химические связи с радикалами аминокислот на другой поверхности (рис. 1-21). В области контактных поверхностей обычно содержится много гидрофобных радикалов аминокислот, в результате объединения которых формируется гидрофобное ядро олигомерного белка. Гидрофильные радикалы могут образовывать водородные и ионные связи.

Таким образом, взаимодействие протомеров осуществляется во многих точках контактирующих поверхностей, с образованием десятков слабых связей. Благодаря этому контактные поверхности соединяются с высокой специфичностью, и ошибки формирования четвертичной структуры белков практически исключены.

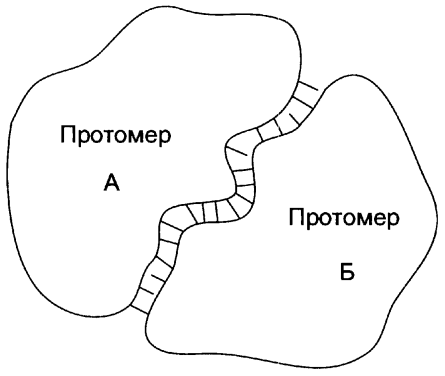


Рис. 1-21. Схема образования димерной белковой молекулы. Между протомерами А и Б образуется множество слабых связей, обозначенных на рисунке чёрточками.

Комплементарность — универсальный принцип, свойственный живой природе и лежащий в основе узнавания и соединения не только протомеров, но и других (не обязательно белковых) молекул.

III. ФОРМИРОВАНИЕ ТРЁХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА В КЛЕТКЕ

Формирование трёхмерной структуры белков — важнейший биологический процесс, так как от пространственной структуры белков зависит их биологическая функция.

Процесс сворачивания полипептидной цепи в правильную пространственную структуру получил название «**фолдинг белков**». Индивидуальные белки, продукты одного гена, имеют идентичную аминокислотную последовательность и приобретают в одинаковых условиях клетки одинаковую конформацию и функцию. Это положение подтверждается способностью некоторых белков после денатурации (при которой происходит разрыв слабых связей, но не повреждается первичная структура белков) спонтанно восстанавливать свою уникальную конформацию и функцию.

Однако в клетке концентрация белков настолько высока, что существует большая вероятность взаимодействия белков с несформированной конформацией. На их поверхности располагаются гидрофобные радикалы, склон-

ные к объединению. Поэтому для многих белков, имеющих высокую молекулярную массу и сложную пространственную структуру, фолдинг протекает при участии специальной группы белков, которые называют **«шапероны»** (от франц. *shaperon* — няня).

А. Ренативация белков

Долгое время считалось, что процесс денатурации белков необратим. Однако оказалось, что некоторые очищенные и денатурированные белки способны в опытных условиях восстанавливать конформацию при удалении денатурирующих агентов.

Ренативация рибонуклеазы

В начале 60-х г. XX века обнаружили, что процесс денатурации белков может быть обратимым. Это открытие было сделано при изучении денатурации рибонуклеазы — фермента, расщепляющего связи между нуклеотидами в РНК. Рибонуклеаза — глобулярный белок, содержащий одну полипептидную цепь, состоящую из 124 аминокислотных остатков. Его конформацию стабилизируют 4 дисульфидные и множество слабых связей.

Обработка рибонуклеазы β-меркаптоэтанолом (формула β-меркаптоэтанола — $HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}SH$) приводит к разрыву дисульфидных связей и восстановлению SH-групп цистеиновых остатков, что нарушает компактную структуру белка. Добавление 8 М раствора мочевины или 6 М раствора гуанидинхлорида, вызывающих разрыв слабых связей в белке и образование новых водородных связей с денатурирующими агентами, приводит к образованию случайным образом свёрнутых полипептидных цепей рибонуклеазы, лишённых ферментативной активности, т.е. к денатурации фермента. Денатурирующие агенты не разрушают первичную структуру белка.

Однако если путём диализа очистить рибонуклеазу от денатурирующих агентов и β-меркап-тоэтанола, ферментативная активность белка постепенно восстанавливается. Этот процесс называется ренатурацией, или ренативацией белка. Сульфгидрильные группы денатурированного фермента под действием кислорода воздуха окисляются, в результате вновь возникают 4 дисульфидные связи, характерные для нативной структуры белка. Из 105 возможных способов связывания восьми SH-групп остатков цистеина реализуется только один вариант, характерный для нативной конформации белка (рис. 1-22).

Возможность ренативации впоследствии была доказана и для других белков, в частности миоглобина. Сохранность первичной структуры белка — необходимое условие для восстановления его конформации. На основании этих опытов был выведен фундаментальный принцип молекулярной биологии: аминокислотная последовательность белков определяет их конформацию и специфическую функцию.

Формирование пространственной структуры белка — самопроизвольный процесс, при котором белок стремится принять в данных условиях конформацию с наименьшей свободной энергией. Изменение условий окружающей среды или изменение первичной структуры данного белка могут привести к изменению его конформации и функции.

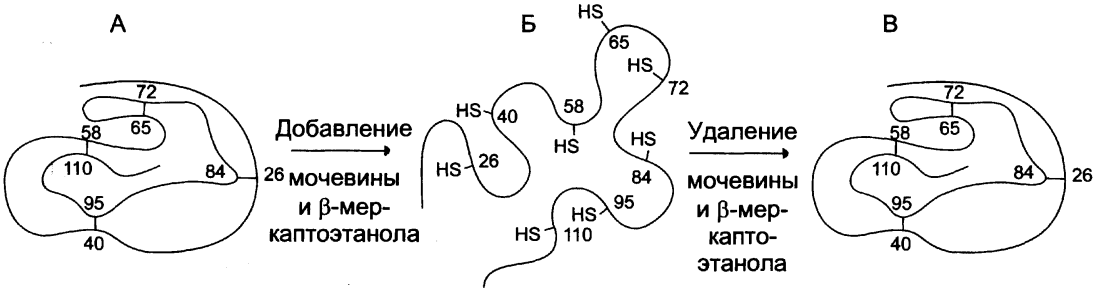


Рис. 1-22. Денатурация и ренативация рибонуклеазы. А – нативная молекула рибонуклеазы, в третичной структуре которой имеются 4 дисульфидные связи; Б – денатурированная молекула рибонуклеазы; В – нативная молекула рибонуклеазы, в структуре которой вновь образованы 4 дисульфидные связи между теми же остатками цистеина.

Б. Структура и функциональная роль шаперонов в фолдинге белков

В процессе синтеза полипептидных цепей, транспорта их через мембраны, при сборке олигомерных белков возникают промежуточные нестабильные конформации, склонные к агрегации. На вновь синтезированном полипептиде имеется множество гидрофобных радикалов, которые в трёхмерной структуре спрятаны внутри молекулы. Поэтому на время формирования нативной конформации реакционноспособные аминокислотные остатки одних белков должны быть отделены от таких же групп других белков.

Во всех известных организмах от прокариотов до высших эукариотов обнаружены белки, способные связываться с белками, находящимися в неустойчивом, склонном к агрегации состоянии. Они способны стабилизировать их конформацию, обеспечивая фолдинг белков. Эти белки получили название «**шапероны**».

1. Классификации шаперонов (Ш)

В соответствии с молекулярной массой все шапероны можно разделить на 6 основных групп:

- высокомолекулярные, с молекулярной массой от 100 до 110 кД;
- Ш-90 — с молекулярной массой от 83 до 90 кД;
- Ш-70 — с молекулярной массой от 66 до 78 кД;
- Ш-60;
- Ш-40;
- низкомолекулярные шапероны с молекулярной массой от 15 до 30 кД.

Среди шаперонов различают: конститутивные белки (высокий базальный синтез которых не зависит от стрессовых воздействий на клетки организма), и индуцибельные, синтез которых в нормальных условиях идёт слабо, но при стрессовых воздействиях на клетку резко увеличивается. Индуцибельные шапероны относят к «белкам теплового шока», быстрый синтез которых отмечают практически во всех клетках, которые подвергаются любым стрессовым воздействиям. Название «белки теплового шока» возникло в результате того, что впервые эти белки были обнаружены в клетках, которые подвергались воздействию высокой температуры.

2. Роль шаперонов в фолдинге белков

При синтезе белков N-концевая область полипептида синтезируется раньше, чем С-концевая область. Для формирования конформации белка нужна его полная аминокислотная последовательность. Поэтому в период синтеза белка на рибосоме защиту реакционно-способных радикалов (особенно гидрофобных) осуществляют Ш-70.

Ш-70 — высококонсервативный класс белков, который присутствует во всех отделах клетки: цитоплазме, ядре, ЭР, митохондриях. В области карбоксильного конца единственной полипептидной цепи шаперонов есть участок, образованный радикалами аминокислот в форме бороздки. Он способен взаимодействовать с участками белковых молекул и развёрнутых полипептидных цепей длиной в 7–9 аминокислот, обогащённых гидрофобными радикалами. В синтезирующейся полипептидной цепи такие участки встречают примерно через каждые 16 аминокислот.

Фолдинг многих высокомолекулярных белков, имеющих сложную конформацию (например, доменное строение), осуществляется в специальном пространстве, сформированном Ш-60. Ш-60 функционируют в виде олигомерного комплекса, состоящего из 14 субъединиц (рис. 1-23).

Ш-60 образуют 2 кольца, каждое из которых состоит из 7 субъединиц, соединённых друг с другом. Субъединица Ш-60 состоит из 3 доменов: апикального (верхушечного), промежуточного и экваториального. Верхушечный домен имеет ряд гидрофобных остатков, обращённых в полость кольца, сформированного субъединицами. Экваториальный домен имеет участок связывания с АТФ и обладает АТФ-азной активностью, т.е. способен гидролизовать АТФ до АДФ и H_3PO_4.

Шапероновый комплекс имеет высокое сродство к белкам, на поверхности которых есть элементы, характерные для несвёрнутых молекул (прежде всего участки, обогащённые гидрофобными радикалами). Попадая в полость шаперонового комплекса, белок связывается с гидрофобными радикалами апикальных участков Ш-60. В специфической среде этой полости, в изоляции от других молекул клетки происходит перебор возможных конформаций белка, пока не будет найдена единственная, энергетически наиболее выгодная конформация.

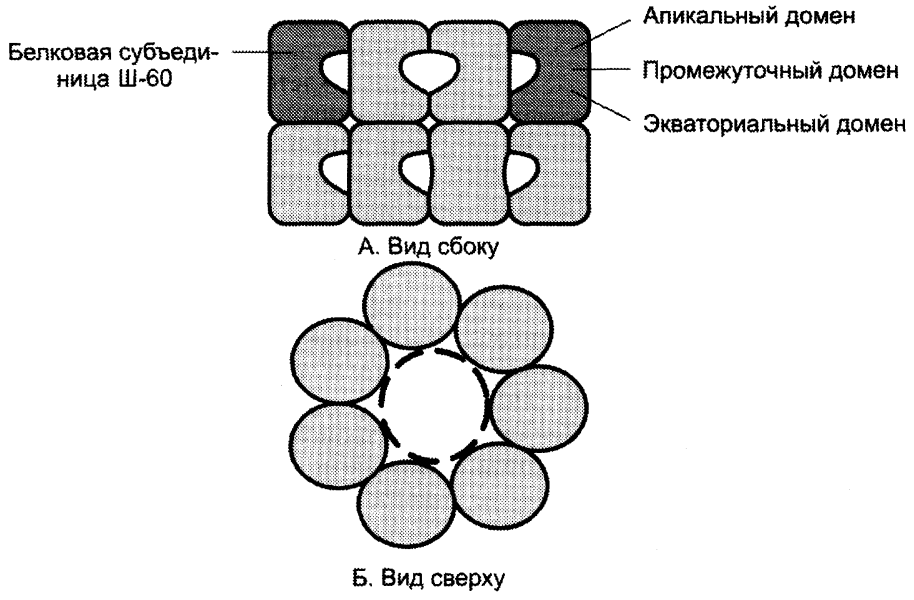


Рис. 1-23. Структура шаперонового комплекса, состоящего из 14 белковых молекул Ш-60.

Высвобождение белка со сформированной нативной конформацией сопровождается гидролизом АТФ в экваториальном домене. Если белок не приобрёл нативной конформации, то он вступает в повторную связь с шапероновым комплексом. Такой шаперонзависимый фолдинг белков требует затрат большого количества энергии.

Таким образом, синтез и фолдинг белков протекают при участии разных групп шаперонов, препятствующих нежелательным взаимодействиям белков с другими молекулами клетки и сопровождающих их до окончательного формирования нативной структуры (рис. 1-24).

3. Роль шаперонов в защите белков клеток от денатурирующих стрессовых воздействий

Шапероны, участвующие в защите клеточных белков от денатурирующих воздействий, как уже говорилось выше, относят к белкам теплового шока (БТШ) и в литературе часто обозначают как HSP (от англ. *heat shock protein*).

При действии различных стрессовых факторов (высокая температура, гипоксия, инфекция, УФО, изменение pH среды, изменение молярности среды, действие токсичных химических веществ, тяжёлых металлов и т.д.) в клетках усиливается синтез БТШ. Имея высокое сродство к гидрофобным участкам частично денатуриро-

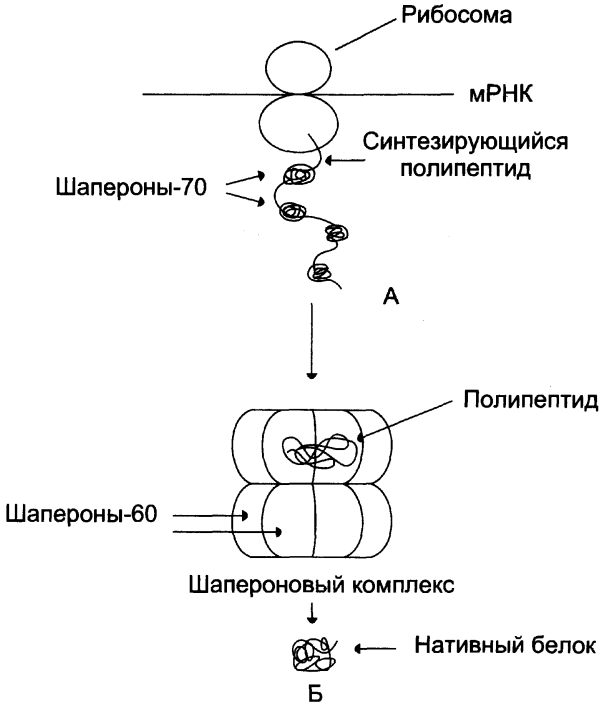


Рис. 1-24. Участие шаперонов в фолдинге белков. А – участие шаперонов-70 в предотвращении гидрофобных взаимодействий между участками синтезирующегося полипептида; Б – формирование нативной конформации белка в шапероновом комплексе.

ванных белков, они могут препятствовать их полной денатурации и восстанавливать нативную конформацию белков.

Установлено, что кратковременные стрессовые воздействия увеличивают выработку БТШ и повышают устойчивость организма к длительным стрессовым воздействиям. Так, кратковременная ишемия сердечной мышцы в период бега при умеренных тренировках значительно повышает устойчивость миокарда к длительной ишемии, вызванной стенокардией или закупоркой сосудов сердца тромбом. В настоящее время перспективными исследованиями в медицине считают поиски фармакологических и молекулярно-биологических способов активации синтеза БТШ в клетках.

4. Болезни, связанные с нарушением фолдинга белков

Расчёты показали, что лишь небольшая часть теоретически возможных вариантов полипептидных цепей может принимать одну стабильную пространственную структуру. Большинство же таких белков может принимать множество конформаций с примерно одинаковой энергией Гиббса, но с различными свойствами. Первичная структура большинства известных белков, отобранных эволюцией, обеспечивает исключительную стабильность одной конформации.

Однако некоторые растворимые в воде белки при изменении условий могут приобретать конформацию плохо растворимых, способных к агрегации молекул, образующих в клетках фибриллярные отложения, именуемые амилоидом (от лат. *amylum* — крахмал). Так же как и крахмал, амилоидные отложения выявляют при окраске ткани йодом. Это может происходить:

- при гиперпродукции некоторых белков, в результате чего увеличивается их концентрация в клетке;
- при попадании в клетки или образовании в них белков, способных влиять на конформацию других молекул белка;
- при активации протеолиза нормальных белков организма, с образованием нерастворимых, склонных к агрегации фрагментов;
- в результате точечных мутаций в структуре белка.

В результате отложения амилоида в органах и тканях нарушаются структура и функция клеток, наблюдают их дегенеративные изменения и разрастание соединительнотканных или глиальных клеток. Развиваются болезни, называемые амилоидозами. Для каждого вида амилоидоза характерен определённый тип амилоида. В настоящее время описано более 15 таких болезней.

Болезнь Альцхаймера

Болезнь Альцхаймера — наиболее часто отмечаемый β-амилоидоз нервной системы, как правило, поражающий лиц преклонного возраста и характеризующийся прогрессирующим расстройством памяти и полной деградацией личности. В ткани мозга откладывается β-амилоид — белок, образующий нерастворимые фибриллы, нарушающие структуру и функции нервных клеток. β-амилоид — продукт изменения конформации нормального белка организма человека. Он образуется из более крупного предшественника частичным протеолизом и синтезируется во многих тканях. β-Амилоид, в отличие от своего нормального предшественника, содержащего много α-спиральных участков, имеет вторичную β-складчатую структуру, агрегирует с образованием нерастворимых фибрилл, устойчив к действию протеолитических ферментов.

Причины нарушения фолдинга нативных белков в ткани мозга ещё предстоит выяснить. Возможно, с возрастом уменьшается синтез шаперонов, способных участвовать в формировании и поддержании нативной конформации белков, или увеличивается активность протеаз, что приводит к увеличению концентрации белков, склонных изменять конформацию.

Прионовые болезни

Прионы — особый класс белков, обладающих инфекционными свойствами. Попадая в организм человека или спонтанно возникая в нём, они способны вызывать тяжёлые неизлечимые заболевания ЦНС, называемые прионовыми болезнями. Название «прионы» происходит от аббревиатуры английской фразы *proteinaceous infectious particle* — белковая инфекционная частица.

Прионовый белок кодируется тем же геном, что и его нормальный аналог, т.е. они имеют идентичную первичную структуру. Однако два белка обладают различной конформацией: при-

оновый белок характеризуется высоким содержанием β-слоёв, в то время как нормальный белок имеет много α-спиральных участков. Кроме того, прионовый белок обладает устойчивостью к действию протеаз и, попадая в ткань мозга или образуясь там спонтанно, способствует превращению нормального белка в прионовый в результате межбелковых взаимодействий. Образуется так называемое «ядро полимеризации», состоящее из агрегированных прионовых белков, к которому способны присоединяться новые молекулы нормального белка. В результате в их пространственной структуре происходят конформационные перестройки, характерные для прионовых белков.

Известны случаи наследственных форм прионовых болезней, вызванных мутациями в структуре данного белка. Однако возможно и заражение человека прионовыми белками, в результате чего возникает заболевание, приводящее к гибели больного. Так, куру — прионовая болезнь аборигенов Новой Гвинеи, эпидемический характер которой связан с традиционным каннибализмом в этих племенах и передачей инфекционного белка от одной особи к другой. В связи с изменением образа их жизни данное заболевание практически исчезло.

В настоящее время интерес к прионовым болезням возрос в связи с заражением людей прионами при употреблении мясопродуктов, полученных от животных, являющихся носителями прионов, вызывающих «бешенство коров» (болезнь Кройтцфельдта—Якоба). Несмотря на то, что прионовые белки человека и животных различаются лишь незначительно, долгое время полагали, что существуют межвидовые барьеры на пути передачи болезни. Однако последние данные показали, что эти барьеры не абсолютны, и что существует принципиальная возможность передачи болезни от одного вида другому. Так, в Великобритании к середине 1999 г. было зарегистрировано около 40 случаев данного заболевания. Прогноз не исключает развития эпидемии прионовой болезни в ближайшие 10—15 лет.

IV. ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Каждый индивидуальный белок, имеющий уникальную первичную структуру и конформацию, обладает и уникальной функцией, отличающей его от всех остальных белков. Набор индивидуальных белков выполняет в клетке множество разнообразных и сложных функций.

Необходимое условие для функционирования белков — присоединение к нему другого вещества, которое называют «**лиганд**». Лигандами могут быть как низкомолекулярные вещества, так и макромолекулы. Взаимодействие белка с лигандом высокоспецифично, что определяется строением участка белка, называемого центром связывания белка с лигандом или активным центром.

А. Активный центр белков и избирательность связывания его с лигандом

Активный центр белков — определённый участок белковой молекулы, как правило, находящийся в её углублении («кармане»), сформированный радикалами аминокислот, собранных на определённом пространственном участке при формировании третичной структуры и способный комплементарно связываться с лигандом. В линейной последовательности полипептидной цепи радикалы, формирующие активный центр, могут находиться на значительном расстоянии друг от друга.

Высокая специфичность связывания белка с лигандом обеспечивается комплементарностью структуры активного центра белка структуре лиганда (рис. 1-25).

Под комплементарностью понимают пространственное и химическое соответствие взаимодействующих молекул. Лиганд должен обладать способностью входить и пространственно совпадать с конформацией активного центра. Это совпадение может быть неполным, но благодаря конформационной лабильности белка активный центр способен к небольшим изменениям и «подгоняется» под лиганд. Кроме того, между функциональными группами лиганда и радикалами аминокислот, образующих активный центр, должны возникать связи, удерживающие лиганд в активном центре. Связи между лигандом и активным центром белка могут быть как нековалентными (ионными, водородными, гидрофобными), так и ковалентными.

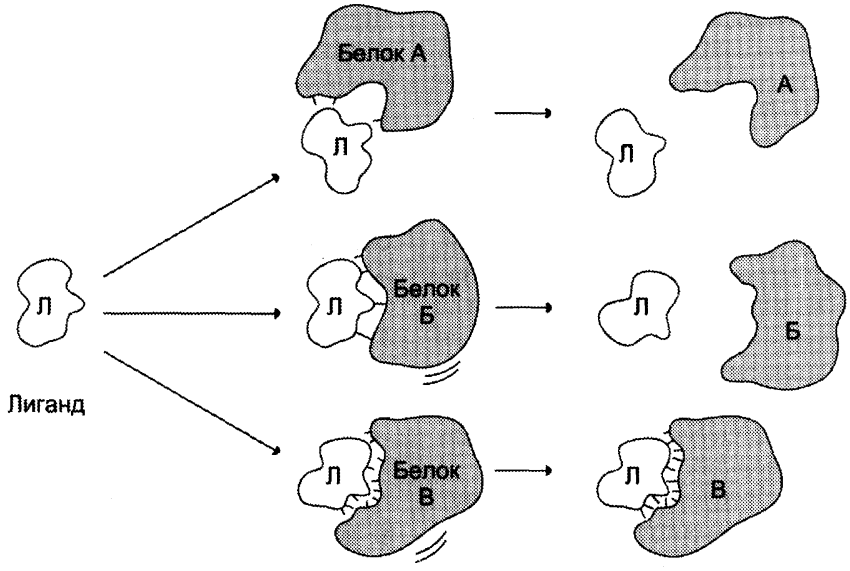


Рис. 1-25. Взаимодействие белка с лигандом. А и Б – некомплементарное взаимодействие и разрушение связей между белком и лигандом; В – комплементарное взаимодействие белка с лигандом.

1. Характеристика активного центра

Активный центр белка — относительно изолированный от окружающей белок среды участок, сформированный аминокислотными остатками. В этом участке каждый остаток благодаря своему индивидуальному размеру и функциональным группам формирует «рельеф» активного центра.

Объединение таких аминокислот в единый функциональный комплекс изменяет реакционную способность их радикалов, подобно тому, как меняется звучание музыкального инструмента в ансамбле. Поэтому аминокислотные остатки, входящие в состав активного центра, часто называют «ансамблем» аминокислот.

Уникальные свойства активного центра зависят не только от химических свойств формирующих его аминокислот, но и от их точной взаимной ориентации в пространстве. Поэтому даже незначительные нарушения общей конформации белка в результате точечных изменений его первичной структуры или условий окружающей среды могут привести к изменению химических и функциональных свойств радикалов, формирующих активный центр, нарушать связывание белка с лигандом и его функцию. При денатурации активный центр белков разрушается, и происходит утрата их биологической активности.

Часто активный центр формируется таким образом, что доступ воды к функциональным группам его радикалов ограничен, т.е. создаются условия для связывания лиганда с радикалами аминокислот.

В некоторых случаях лиганд присоединяется только к одному из атомов, обладающему определённой реакционной способностью, например присоединение O_2 к железу миоглобина или гемоглобина. Однако свойства данного атома избирательно взаимодействовать с O_2 определяются свойствами радикалов, окружающих атом железа в составе гема. Гем содержится и в других белках, таких как цитохромы. Однако функция атома железа в цитохромах иная, он служит посредником для передачи электронов от одного вещества другому, при этом железо становится то двух-, то трёхвалентным.

Центр связывания белка с лигандом часто располагается между доменами. Например, протеолитический фермент трипсин, участвующий в гидролизе пептидных связей пищевых белков в кишечнике, имеет 2 домена, разделённых бороздкой. Внутренняя поверхность бороздки формируется аминокислотными радикалами этих

доменов, стоящими в полипептидной цепи далеко друг от друга ($Сер_{177}$, $Гис_{40}$, $Асп_{85}$).

Разные домены в белке могут перемещаться друг относительно друга при взаимодействии с лигандом, что облегчает дальнейшее функционирование белка. В качестве примера можно рассмотреть работу гексокиназы, фермента, катализирующего перенос фосфорного остатка с АТФ на молекулу глюкозы (при её фосфорилировании). Активный центр гексокиназы располагается в расщелине между двумя доменами (рис. 1-26) При связывании гексокиназы с глюкозой окружающие её домены сближаются, и субстрат оказывается в «ловушке», что облегчает его дальнейшее фосфорилирование.

Основное свойство белков, лежащее в основе их функций, — избирательность присоединения к определённым участкам белковой молекулы специфических лигандов.

2. Многообразие лигандов

- Лигандами могут быть неорганические (часто ионы металлов) и органические вещества, низкомолекулярные и высокомолекулярные вещества;
- существуют лиганды, которые изменяют свою химическую структуру при присоединении к активному центру белка (изменения субстрата в активном центре фермента);
- существуют лиганды, присоединяющиеся к белку только в момент функционирования (например, O_2, транспортируемый гемоглобином), и лиганды, постоянно связанные с белком, выполняющие вспомогательную роль при функционировании белков (например, железо, входящее в состав гемоглобина).

В тех случаях, когда аминокислотные остатки, формирующие активный центр, не могут обеспечить функционирование данного белка, к определённым участкам активного центра могут присоединяться небелковые молекулы. Так, в активном центре многих ферментов присутствует ион металла (кофактор) или органическая небелковая молекула (кофермент). Небелковую часть, прочно связанную с активным центром белка и необходимую для его функционирования, называют **«простетическая группа»**. Миоглобин, гемоглобин и цитохромы имеют в активном центре простетическую группу — гем, содержащий железо (более подробно гемсодержащие белки описаны в разделе 4, а кофакторы и коферменты — в разделе 2).

Соединение протомеров в олигомерном белке — пример взаимодействия высокомолекулярных лигандов. Каждый протомер, соединённый с другими протомерами, служит для них лигандом, так же как они для него.

Иногда присоединение какого-либо лиганда изменяет конформацию белка, в результате чего формируется центр связывания с другими лигандами. Например, белок кальмодулин после связывания с четырьмя ионами Ca^{2+} в специфических участках приобретает способность взаимодействовать с некоторыми ферментами, меняя их активность.

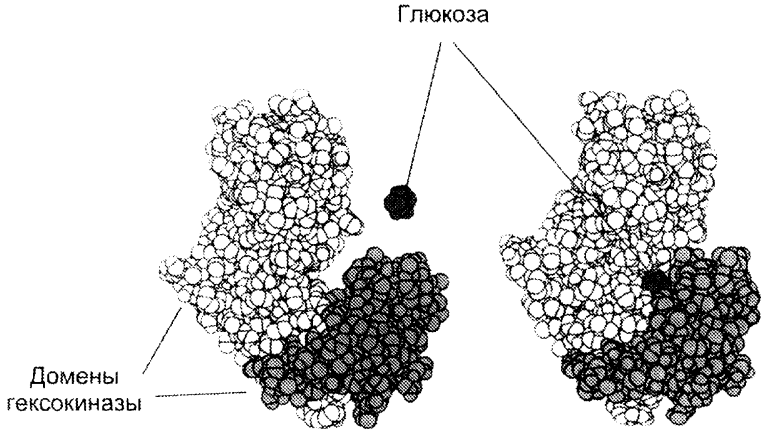


Рис. 1-26. Связывание гексокиназы с глюкозой.

3. Сродство активного центра лиганду

Скорость взаимодействия белка с лигандом определяется концентрациями белка и лиганда в растворе, а также степенью комплементарности белка и лиганда.

Константа диссоциации — характеристика сродства активного центра лиганду.

Так как взаимодействие белка с лигандом — обратимый процесс, то его можно описать следующим уравнением:

$$P + L \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} PL,$$

где P — белок, L — лиганд, PL — комплекс белка с лигандом, K_1 — константа скорости связывания белка с лигандом, K_{-1} — константа скорости распада комплекса PL.

Когда скорости образования и распада комплекса равны, говорят о том, что система находится в состоянии равновесия:

$$[P]\,[L]\,K_1 = [PL]\,K_{-1}.$$

Отсюда:

$$K_{дисс} = \frac{K_{-1}}{K_1} = \frac{[P]\,[L]}{[PL]}.$$

Соотношение констант распада [PL] комплекса и его образования называется константой диссоциации ($K_{дисс}$) комплекса [PL]. Чем меньше $K_{дисс}$, тем больше молекул лиганда связано с белком, тем больше комплементарность между P и L и тем больше сродство лиганда к белку. То есть между $K_{дисс}$ и сродством лиганда к белку имеется обратно пропорциональная связь.

Иногда при описании процесса связывания белка с лигандом используют величину, обратную $K_{дисс}$, называемую константой связывания ($K_{св}$) или ассоциации.

$$K_{св} = \frac{1}{K_{дисс}} = \frac{[PL]}{[P]\,[L]}.$$

Между $K_{св}$. и сродством лиганда к белку существует прямо пропорциональная зависимость.

Зависимость насыщения белка лигандом от концентрации лиганда при постоянной концентрации белка

При постоянной концентрации белка увеличение концентрации лиганда приводит к росту концентрации комплекса [PL]. Эта зависимость носит характер гиперболической кривой (рис. 1-27). Кривая стремится к максимуму, когда при некоторой концентрации лиганда все молекулы белка находятся в связанном с лигандом состоянии (происходит насыщение белка лигандом). Степень насыщения белка лигандом можно выразить следующим уравнением: степень насыщения = $[PL]/[P_0]\times 100$ (где P_0 — концентрация белка до добавления лиганда).

При полунасыщении белка лигандом концентрации [PL] и [P] равны, и из уравнения $K_{дисс}$, приведённого выше, следует, что $K_{дисс} = [L]$, т.е. $K_{дисс}$ численно равна концентрации лиганда, при которой 50% белка находится в комплексе с лигандом. Поэтому по кривой насыщения можно найти $K_{дисс}$ и оценить сродство данного белка лиганду.

Зависимость между образованием комплекса [PL] и концентрацией белка при избытке лиганда

Как было сказано выше, при возрастающей концентрации лиганда насыщение белка ограничено его концентрацией. При избытке лиганда все молекулы белка находятся в составе комплекса [PL]. Однако, если увеличивать концентрацию белка, то количество [PL] начнёт увеличиваться пропорционально концентрации белка. Концентрацию комплекса [PL] можно регистрировать, напри-

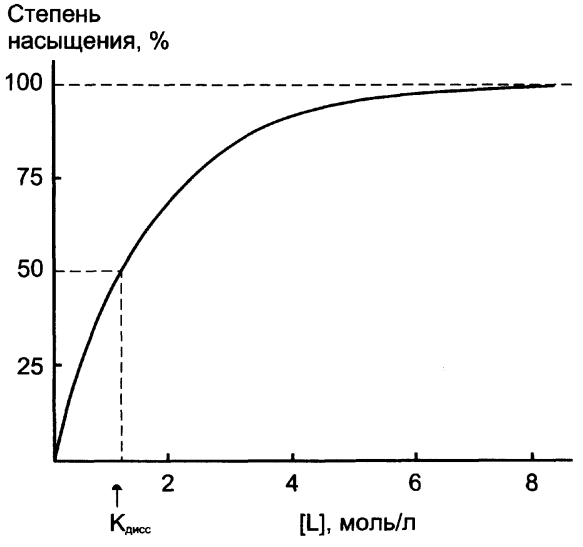


Рис. 1-27. График насыщения белка лигандом.

мер с помощью измерения поглощения света. Учитывая, что его количество пропорционально концентрации белка, можно на основании построенного графика определять концентрацию белка в растворе (рис. 1-28).

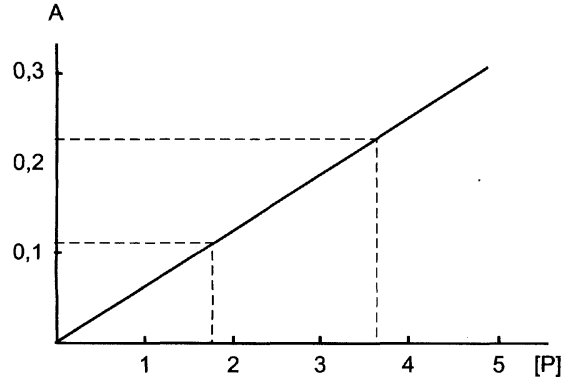
Б. Вещества, влияющие на функционирование белков

Хотя взаимодействие лиганда с активным центром белка высокоспецифично, всегда можно подобрать другое вещество, которое так же будет взаимодействовать с белком. Лиганд, взаимодействующий с белком и нарушающий его функцию, называют «**ингибитор белка**». Если это вещество по структуре похоже на лиганд, его называют структурным аналогом лиганда; оно также взаимодействует с активным центром белка. Аналог, замещающий естественный лиганд в активном центре белка и снижающий его функцию, называют «**конкурентный ингибитор белка**».

1. Лекарственные препараты как модуляторы белковых функций

Аналоги естественных лигандов белков используют в медицине в качестве лекарственных средств. Широкое применение такие лекарства нашли в регуляции передачи возбуждения через синапсы.

Передача сигнала от нерва к нерву или от нерва к эффекторному органу осуществляется через синапсы с помощью химических молекул, называемых нейромедиаторами. Нейромедиатор, выделяемый при прохождении импульса нервными окончаниями, должен высокоспецифично взаимодействовать с белками-рецепторами на постсинаптической мембране. Однако, модифицируя химическую структуру нейромедиатора, можно получить вещества, которые также связывались бы с рецептором, но при этом менялся физиологический эффект: уменьшался или усиливался. В фармакологии такие вещества называют «**антагонисты**» и «**агонисты**» соответственно.



На оси A регистрируют изменение, например поглощения света, вызванное образованием комплекса [PL]

Рис. 1-28. График зависимости изменения поглощения света, отражающего концентрацию комплекса [PL] от концентрации белка P.

Ингибиторы белков-рецепторов в холинэргических синапсах

В качестве примера можно рассмотреть лекарства, нарушающие проведение нервного импульса через холинергические синапсы, где в качестве нейромедиатора используется ацетилхолин. Холинергические белки-рецепторы неоднородны по своей структуре и способны связываться с другими, кроме ацетилхолина, лигандами. Их делят на 2 большие группы:

- М-холинорецепторы, названные так из-за их способности избирательно взаимодействовать с мускарином (токсин мухомора);
- Н-холинорецепторы, избирательно связывающие никотин.

В нервно-мышечных синапсах присутствуют Н-холинорецепторы, взаимодействие которых с ацетилхолином вызывает сокращение мышц. Для расслабления мышц в эндоскопических исследованиях, а также при разнообразных хирургических операциях используют структурные аналоги ацетилхолина, служащие ингибиторами данных рецепторов. Пример такого вещества — дитилин, относящийся к группе лекарственных веществ, называемых миорелаксантами (вызывающими мышечное расслабление). Первоначально эти свойства были обнаружены у яда кураре, в связи с чем данные препараты называют также курареподобными (см. схему А на с. 44).

Наиболее известный специфический ингибитор М-холинорецепторов — атропин. Атропин — алкалоид, содержащийся в некоторых растениях: красавке, белене, дурмане. Он присоединяется к М-холинорецепторам, находящимся на мембране эффекторных клеток, в области окончаний парасимпатических нервов. Атропин препятствует их взаимодействию с ацетилхолином (антагонист природного лиган-

да), тем самым устраняя эффекты раздражения парасимпатических нервов.

Так как ацетилхолин, связываясь с М-холинорецепторами, вызывает сокращение многих гладких мышц, атропин (как лекарственный препарат) снимает мышечные спазмы (спазмолитик). Кроме того, он снижает стимулируемую ацетилхолином секрецию желёз (бронхиальных, пищеварительных, потовых).

М-холинорецепторы присутствуют в разных отделах ЦНС. Передозировка атропина может вызвать двигательное и речевое возбуждение.

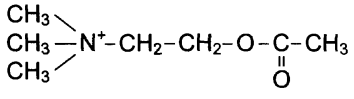
Лекарственные вещества — стимуляторы белковых функций

Однако некоторые структурные аналоги лигандов рецепторных белков не являются ингибиторами, а вызывают такие же или более сильные физиологические эффекты, чем природные лиганды. Их более сильный и длительный эффект часто связан с тем, что модифицированные лиганды медленнее инактивируются и разрушаются в организме. Например, мезатон по структуре похож на нейромедиаторы симпатической нервной системы (норадреналин и адреналин). Мезатон повышает тонус сосудов и АД, поэтому его используют при гипотонии и коллапсе. Он менее подвержен действию инактивирующих его ферментов, поэтому оказывает более длительный и сильный эффект, чем его природные аналоги (см. схему Б).

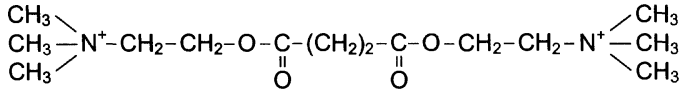
2. Яды — специфические лиганды определённых белков

Некоторые яды, попадая в организм человека, прочно связываются с определёнными белками, ингибируют их и тем самым вызывают нарушения биологических функций.

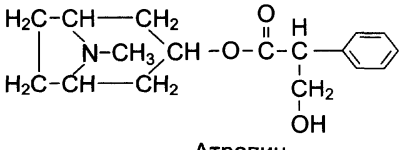
Например, α-нейротоксины кобры и крайта специфически взаимодействуют с холинергическими рецепторами постсинаптических мембран, блокируя их работу, и оказывают курареподобное действие. α-Нейротоксины — небольшие белки с молекулярной массой около 7000 Д (65–70 аминокислотных остатков). Их третичную структуру стабилизируют 4 или 5 специфических дисульфидных связей (в зависимости от вида токсина). Сродство нейротоксинов к холинергическим рецепторам очень высоко ($K_{дисс} = 10^{-11}$). Очевидно, между токси-



Ацетилхолин

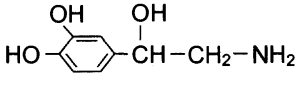


Дитилин

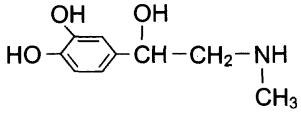


Атропин

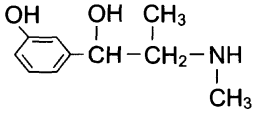
Схема А



Норадреналин



Адреналин



Мезатон

Схема Б

ном и рецептором образуется множество связей, что и приводит к их практически необратимому соединению.

Необходимо помнить, что между лекарствами и ядами часто существует прозрачная граница, и эффект их действия зависит от дозы вводимого вещества. Так, лекарства, назначаемые в дозах, больших чем терапевтические, могут действовать как яды, т.е. вызывать серьёзные нарушения обмена веществ и функций организма, а яды в микродозах часто используют как лекарственные препараты. Например, атропин, широко применяемый для снятия спазмов гладких мышц, в больших дозах вызывает возбуждение ЦНС, а в ещё больших дозах — сон, переходящий в кому. Известное гипотензивное средство клофелин при передозировке вызывает коллапс.

V. ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ОЛИГОМЕРНЫХ БЕЛКОВ НА ПРИМЕРЕ ГЕМОГЛОБИНА

Олигомерные белки проявляют свойства, отсутствующие у мономерных белков. Влияние четвертичной структуры на функциональные свойства белка можно рассмотреть, сравнивая строение и функции двух родственных гемсодержащих белков: миоглобина и гемоглобина. Оба белка имеют общее эволюционное происхождение, сходную конформацию отдельных полипептидных цепей и сходную функцию (участвуют в транспорте кислорода), но миоглобин — мономерный белок, а гемоглобин — тетрамер. Наличие четвертичной структуры у гемоглобина придаёт этому белку свойства, отсутствующие у миоглобина.

А. Структура и функции миоглобина

Миоглобин относят к классу гемсодержащих белков, т.е. он содержит простетическую группу — гем, довольно прочно связанную с белковой частью. Миоглобин относят к глобулярным белкам; он имеет только одну полипептидную цепь.

1. Клеточная локализация и функция

Миоглобин содержится в красных мышцах и участвует в запасании кислорода. В условиях интенсивной мышечной работы, когда парциальное давление кислорода в ткани падает, O_2 освобождается из комплекса с миоглобином и используется в митохондриях клеток для получения необходимой для работы мышц энергии.

2. Строение миоглобина

Миоглобин содержит небелковую часть (гем) и белковую часть (апомиоглобин).

Гем — молекула, имеющая структуру циклического тетрапиррола, где 4 пиррольных кольца соединены метиленовыми мостиками и содержат 4 метильные, 2 винильные и 2 пропионатные боковые цепи. Эта органическая часть гема называется протопорфирином. Возможны 15 вариантов расположения боковых цепей, но в составе гемопротеинов присутствует только один изомер, называемый протопорфирин IX. В геме 4 атома азота пиррольных колец протопорфирина IX связаны четырьмя координационными связями с Fe^{2+}, находящимся в центре молекулы (рис. 1-29).

Апомиоглобин — белковая часть миоглобина; первичная структура представлена последовательностью из 153 аминокислот, которые во вторичной структуре уложены в 8 α-спиралей. α-Спирали обозначают латинскими буквами от A до H, начиная с N-конца полипептидной цепи, и содержат от 7 до 23 аминокислот. Для обозначения индивидуальных аминокислот в первичной структуре апомиоглобина используют либо написание их порядкового номера от N-конца (например, $Гис_{64}$, $Фен_{138}$), либо букву α-спирали и порядковый номер данной аминокислоты в этой спирали, начиная с N-конца (например, Гис F_8).

Третичная структура имеет вид компактной глобулы (внутри практически нет свободного места), образованной за счёт петель и поворотов в области неспирализованных участков белка. Внутренняя часть молекулы почти целиком состоит из гидрофобных радикалов, за исключением двух остатков Гис, располагающихся в активном центре.

3. Связывание гема с апомиоглобином

Гем — специфический лиганд апомиоглобина, присоединяющийся к белковой части в уг-

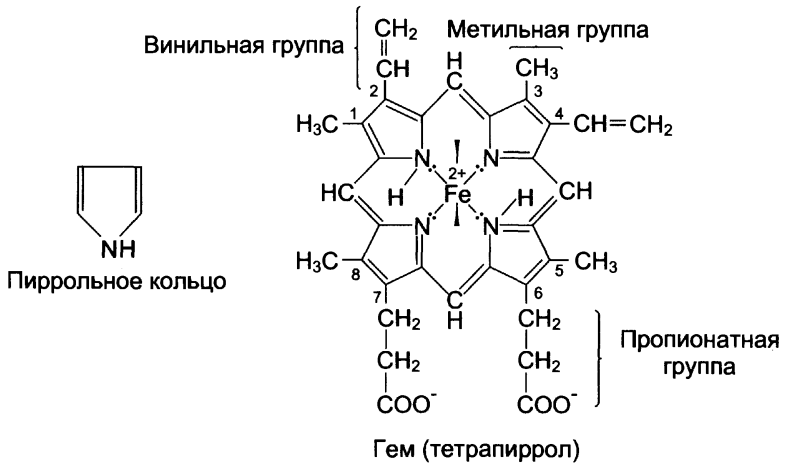


Рис. 1-29. Строение гема, входящего в состав миоглобина и гемоглобина.

лублении между двумя α-спиралями F и E. Центр связывания с гемом образован преимущественно гидрофобными остатками аминокислот, окружающими гидрофобные пиррольные кольца гема. Две боковые группы пропионовых кислот, ионизированные при физиологических значениях pH, выступают на поверхности молекулы.

В активный центр апомиоглобина кроме гидрофобных аминокислот входят также 2 остатка Гис (Гис$_{64}$ и Гис$_{93}$ или Гис E_7 и Гис F_8), играющие важную роль в функционировании белка. Они расположены по разные стороны от плоскости гема и входят в состав спиралей F и E, между которыми располагается гем. Атом железа в геме может образовывать 6 координационных связей, 4 из которых удерживают Fe^{2+} в центре протопорфирина IX (соединяя его с атомами азота пиррольных колец), а 5-я связь возникает между Fe^{2+} и атомом азота имидазольного кольца Гис F_8 (рис. 1-30).

Гис E_7 хотя и не связан с гемом, но необходим для правильной ориентации и присоединения другого лиганда — O_2 к миоглобину.

Аминокислотное окружение гема создаёт условия для довольно прочного, но обратимого связывания O_2 с Fe^{2+} миоглобина. Гидрофобные остатки аминокислот, окружающие гем, препятствуют проникновению в центр связывания миоглобина воды и окислению Fe^{2+} в Fe^{3+}. Трёхвалентное железо в составе гема не способно присоединять O_2.

Б. Структура и функции гемоглобина

Гемоглобины — родственные белки, находящиеся в эритроцитах человека и позвоночных животных. Эти белки выполняют 2 важные функции:

- перенос O_2 из лёгких к периферическим тканям;
- участие в переносе CO_2 и протонов из периферических тканей в лёгкие для последующего выведения из организма.

Кровь ежедневно должна переносить из лёгких в ткани около 600 л O_2. Так как O_2 плохо растворим в воде, то практически весь кислород в крови связан с гемоглобином эритроцитов.

От способности гемоглобина насыщаться O_2 в лёгких и относительно легко отдавать его в

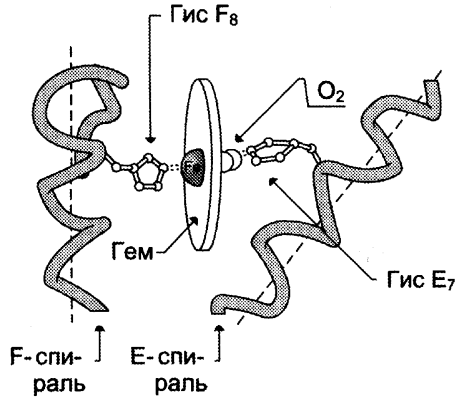


Рис. 1-30. Расположение гема в активном центре апомиоглобина и протомеров апогемоглобина.

капиллярах тканей зависят количество получаемого тканями O_2 и интенсивность метаболизма. С другой стороны, O_2 — сильный окислитель, избыток поступления O_2 в ткани может привести к повреждению молекул и нарушению структуры и функций клеток. Поэтому важнейшая характеристика гемоглобина — его способность регулировать сродство к O_2 в зависимости от тканевых условий.

Гемоглобины, так же как миоглобин, относят к гемопротеинам, но они имеют четвертичную структуру (состоят из 4 полипептидных цепей), благодаря которой возникает возможность регуляции их функций.

1. Гемоглобины человека

Гемоглобины взрослого человека

В эритроцитах взрослого человека гемоглобин составляет 90% от всех белков данной клетки.

Гемоглобин А — основной гемоглобин взрослого организма, составляет около 98% от общего количества гемоглобина, тетрамер, состоит из 2 полипептидных цепей α и 2 β ($2\alpha2\beta$).

Гемоглобин A_2 находится в организме взрослого человека в меньшей концентрации, на его долю приходится около 2% общего гемоглобина. Он состоит из 2 α- и 2 δ-цепей.

Гемоглобин A_{1c} — гемоглобин А, модифицированный ковалентным присоединением к нему глюкозы (так называемый гликозилированный гемоглобин).

Гемоглобины, синтезирующиеся в период внутриутробного развития плода:

Эмбриональный гемоглобин синтезируется в эмбриональном желточном мешке через несколько недель после оплодотворения. Представляет собой тетрамер $2\xi2\varepsilon$. Через 2 нед после формирования печени плода в ней начинает синтезироваться гемоглобин F, который к 6 мес замещает эмбриональный гемоглобин.

Гемоглобин F — фетальный гемоглобин, синтезируется в печени и костном мозге плода до периода его рождения. Имеет тетрамерную структуру, состоящую из 2 α- и 2 γ-цепей. После рождения ребёнка постепенно замещается на гемоглобин А, который начинает синтезироваться в клетках костного мозга уже на 8-м месяце развития плода.

2. Строение гемоглобина А

Строение протомеров гемоглобина

Конформация отдельных протомеров гемоглобина удивительно напоминает конформацию миоглобина, несмотря на то, что в первичной структуре их полипептидных цепей идентичны только 24 аминокислотных остатка. Протомеры гемоглобина, так же как и апомиоглобин, состоят из 8 спиралей, свёрнутых в плотную глобулярную структуру, содержащую внутреннее гидрофобное ядро и «карман» для связывания гема. Соединение гема с глобином (белковой частью) аналогично таковому у миоглобина — гидрофобное окружение гема, за исключением 2 остатков Гис E_7 и Гис F_8 (рис. 1-31). Однако тетрамерная структура гемоглобина представляет собой более сложный структурно-функциональный комплекс, чем миоглобин.

Роль гистидина E_7 в функционировании миоглобина и гемоглобина

Гем имеет высокое сродство к оксиду углерода (CO). В водной среде свободный от белковой части гем связывается с CO в 25 000 раз сильнее, чем O_2. Высокая степень сродства гема к CO по сравнению с O_2 объясняется разным пространственным расположением комплексов Fe^{2+} гема с CO и O_2 (рис. 1-31, А).

В комплексе Fe^{2+} гема с CO атомы Fe^{2+}, углерода и кислорода расположены на одной прямой, а в комплексе Fe^{2+} гема с O_2 атомы железа и кислорода расположены под углом, что отражает их оптимальное пространственное расположение.

В миоглобине и гемоглобине над Fe^{2+} в области присоединения O_2 расположен Гис E_7, нарушающий оптимальное расположение CO в центре связывания белков и ослабляющий его взаимодействие с гемом. Напротив, тот же *Гис* E_7 создаёт оптимальные условия для связывания O_2 (рис. 1-31, Б). В результате сродство гема к CO в белках всего в 200 раз превышает его сродство к O_2.

Снижение сродства гемсодержащих белков к CO имеет важное биологическое значение. CO образуется в небольших количествах при катаболизме некоторых веществ, в частности

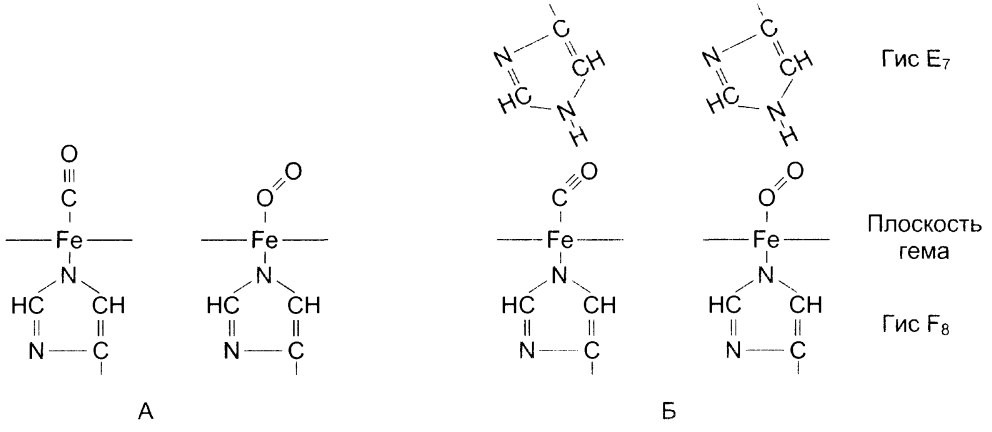


Рис. 1-31. Пространственное расположение CO и O_2, связанных со свободным гемом (А) и гемом в составе гемоглобина или миоглобина (Б).

гема. Этот эндогенно образующийся CO блокирует около 1% гемсодержащих белков. Если бы сродство гема к CO не уменьшалось под влиянием белкового окружения, эндогенный оксид углерода мог бы вызывать серьёзные отравления.

Четвертичная структура гемоглобина

Четыре полипептидные цепи, соединённые вместе, образуют почти правильную форму шара, где каждая α-цепь контактирует с двумя β-цепями (рис. 1-32).

Так как в области контакта между α_1- и β_1-, а также между α_2- и β_2-цепями находится много гидрофобных радикалов, то между этими полипептидными цепями формируется сильное соединение за счёт возникновения в первую очередь гидрофобных, а также ионных и водородных связей. В результате образуются димеры $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$. Между этими димерами в тетрамерной молекуле гемоглобина возникают в основном полярные (ионные и водородные) связи, поэтому при изменении pH среды в кислую или щелочную сторону в первую очередь разрушаются связи между димерами. Кроме того, димеры способны легко перемещаться относительно друг друга.

Так как поверхность протомеров неровная, полипептидные цепи в центральной области не могут плотно прилегать друг к другу, в результате в центре формируется «центральная полость», проходящая сквозь всю молекулу гемоглобина.

3. Связывание гемоглобина с O_2 в лёгких и его диссоциация из комплекса в тканях

Основная функция гемоглобина — доставка O_2 от лёгких к тканям. Олигомерная структура гемоглобина обеспечивает быстрое насыщение его кислородом в лёгких (образование оксигемоглобина — $Hb(O_2)_4$), возможность отщепления кислорода от гемоглобина в капиллярах тканей при относительно высоком парциальном давлении O_2, а также возможность регуляции сродства гемоглобина к O_2 в зависимости от потребностей тканей в кислороде.

Кооперативные изменения конформации протомеров

O_2 связывается с протомерами гемоглобина через Fe^{2+}, который соединён с четырьмя атомами азота пиррольных колец гема и атомом азота

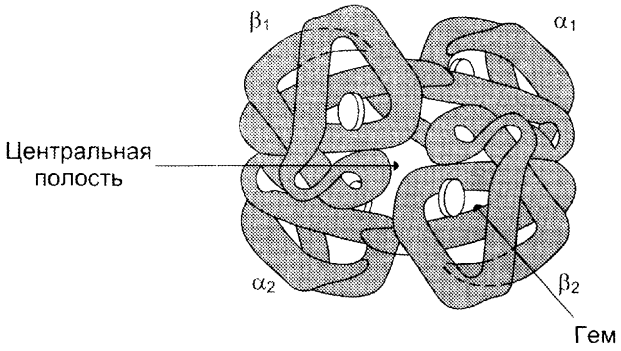


Рис. 1-32. Строение гемоглобина.

Гис F_8 белковой части протомера. Связывание O_2 с оставшейся свободной координационной связью Fe^{2+} происходит по другую сторону от плоскости гема в области Гис E_7 (аналогично тому, как это происходит у миоглобина). Гис E_7 не взаимодействует с O_2, но обеспечивает оптимальные условия для его связывания (рис. 1-33).

В дезоксигемоглобине благодаря ковалентной связи с белковой частью атом Fe^{2+} выступает из плоскости гема в направлении Гис F_8. Присоединение O_2 к атому Fe^{2+} одного протомера вызывает его перемещение в плоскость гема, за ним перемещаются остаток Гис F_8 и полипептидная цепь, в состав которой он входит. Так как протомер связан с остальными протомерами, а белки обладают конформационной лабильностью, происходит изменение конформации всего белка. Конформационные изменения, произошедшие в других протомерах, облегчают присоединение следующей молекулы O_2, что вызывает новые конформационные изменения в белке и ускорение связывания следующей молекулы O_2. Четвёртая молекула O_2 присоединяется к гемоглобину в 300 раз легче, чем первая молекула (рис. 1-34).

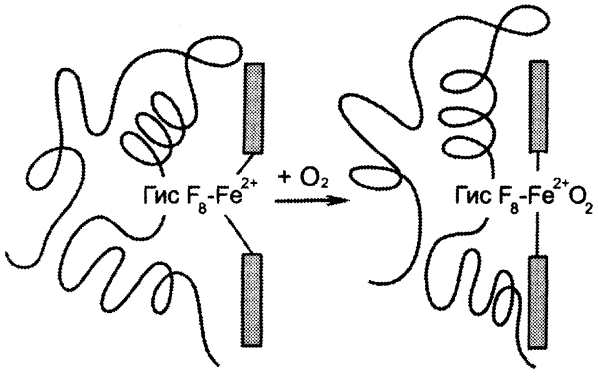


Рис. 1-33. Изменение положения Fe^{2+} и белковой части гемоглобина при присоединении O_2.

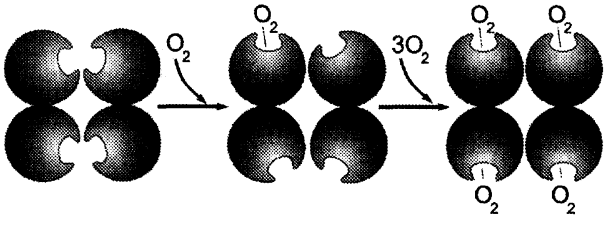


Рис. 1-34. Кооперативные изменения конформации протомеров гемоглобина при присоединении O_2.

Изменение конформации (а следовательно и функциональных свойств) всех протомеров олигомерного белка при присоединении лиганда только к одному из них носит название кооперативных изменений конформации протомеров.

Аналогичным образом в тканях диссоциация каждой молекулы O_2 изменяет конформацию всех протомеров и облегчает отщепление последующих молекул O_2.

Кривые диссоциации O_2 для миоглобина и гемоглобина

Кооперативность в работе протомеров гемоглобина можно наблюдать и на кривых диссоциации O_2 для миоглобина и гемоглобина (рис. 1-35).

Отношение занятых O_2 участков связывания белка к общему числу таких участков, способных к связыванию, называется степенью насыщения этих белков кислородом. Кривые диссоциации показывают, насколько насыщены данные белки O_2 при различных значениях парциального давления кислорода.

Кривая диссоциации O_2 для миоглобина имеет вид простой гиперболы. Это указывает на то, что миоглобин обратимо связывается с лигандом, и на это не оказывают влияние никакие посторонние факторы (схема ниже).

$$Мв + O_2 \rightleftarrows МвO_2$$

Дезоксимиоглобин Оксимиоглобин

Схема

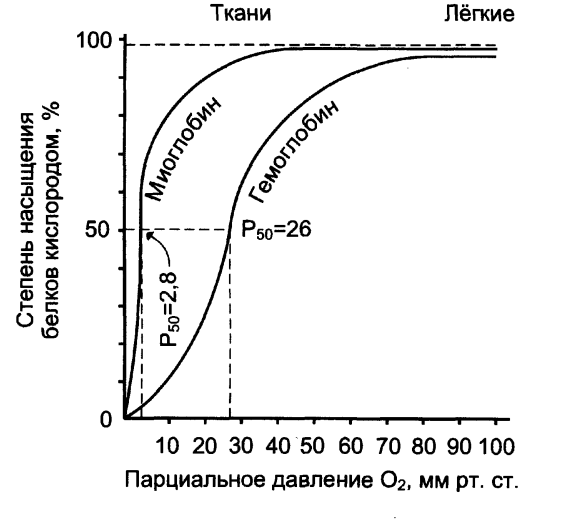


Рис. 1-35. Кривые диссоциации кислорода для миоглобина и гемоглобина в зависимости от парциального давления кислорода.

Процессы образования и распада оксимиоглобина находятся в равновесии, и это равновесие смещается влево или вправо в зависимости от того, добавляется или удаляется кислород из системы. Миоглобин связывает кислород, который в капиллярах тканей высвобождает гемоглобин, и сам миоглобин может освобождать O_2 в ответ на возрастание потребностей в нём мышечной ткани и при интенсивном использовании O_2 в результате физической нагрузки.

Миоглобин имеет очень высокое сродство к O_2. Даже при парциальном давлении O_2, равном 1–2 мм рт. ст., миоглобин остаётся связанным с O_2 на 50%.

Кривая диссоциации O_2 для гемоглобина. Из графика на рис. 1-35 видно, что гемоглобин имеет значительно более низкое сродство к O_2; полунасыщение гемоглобина O_2 наступает при более высоком давлении O_2 (около 26 мм рт. ст.).

Кривая диссоциации для гемоглобина имеет сигмоидную форму (S-образную). Это указывает на то, что протомеры гемоглобина работают кооперативно: чем больше O_2 отдают протомеры, тем легче идёт отщепление последующих молекул O_2.

В капиллярах покоящихся мышц, где давление O_2 составляет около 40 мм рт. ст., большая часть кислорода возвращается в составе оксигемоглобина обратно в лёгкие. При физической работе давление O_2 в капиллярах мышц падает до 10–20 мм рт. ст. Именно в этой области (от 10 до 40 мм рт. ст.) располагается «крутая часть» S-образной кривой, где в наибольшей степени проявляется свойство кооперативной работы протомеров.

Следовательно, благодаря уникальной структуре каждый из рассмотренных белков приспособлен выполнять свою функцию: миоглобин — *присоединять* O_2, высвобождаемый гемоглобином, накапливать в клетке и отдавать в случае крайней необходимости; гемоглобин — присоединять O_2 в лёгких, где его насыщение доходит до 100%, и отдавать O_2 в капиллярах тканей в зависимости от изменения в них давления O_2.

4. Перенос H^+ и CO_2 из тканей в лёгкие с помощью гемоглобина. Эффект Бора

Окисление органических веществ с целью получения энергии происходит в митохондриях клеток с использованием O_2, доставляемого гемоглобином из лёгких. В результате окисления веществ образуются конечные продукты распада — CO_2 и H_2O, количество которых пропорционально интенсивности процессов окисления.

CO_2, образовавшийся в тканях, транспортируется в эритроциты. Там под действием фермента карбангидразы происходит увеличение скорости образования H_2CO_3. Слабая угольная кислота может диссоциировать на H^+ и HCO_3^-

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-.$$

Равновесие реакции в эритроцитах, находящихся в капиллярах тканей, смещается вправо, так как образующиеся в результате диссоциации угольной кислоты протоны могут присоединяться к специфическим участкам молекулы гемоглобина: к радикалам $Гис_{146}$ двух β-цепей, радикалам $Гис_{122}$ и концевым α-аминогруппам двух α-цепей. Все эти 6 участков при переходе гемоглобина от окси- к дезоксиформе приобретают большее сродство к H^+ в результате локального изменения аминокислотного окружения вокруг этих участков (приближения к ним отрицательно заряженных карбоксильных групп аминокислот).

Присоединение 3 пар протонов к гемоглобину уменьшает его сродство к O_2 и усиливает транспорт O_2 в ткани, нуждающиеся в нём (рис. 1-36, А). Увеличение освобождения O_2 гемоглобином в зависимости от концентрации H^+ называют эффектом Бора (по имени датского физиолога Христиана Бора, впервые открывшего этот эффект).

В капиллярах лёгких высокое парциальное давление O_2 приводит к оксигенированию гемоглобина и удалению 6 протонов. Реакция $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$ сдвигается влево и образующийся CO_2 выделяется в альвеолярное пространство и удаляется с выдыхаемым воздухом (рис. 1-36, Б).

Следовательно, молекула гемоглобина в ходе эволюции приобрела способность воспринимать и реагировать на информацию, получаемую из окружающей среды. Увеличение концентрации протонов в среде снижает сродство O_2 к гемоглобину и усиливает его транспорт в ткани (рис. 1-37).

Большая часть CO_2 транспортируется кровью в виде бикарбоната HCO_3^-. Небольшое количе-

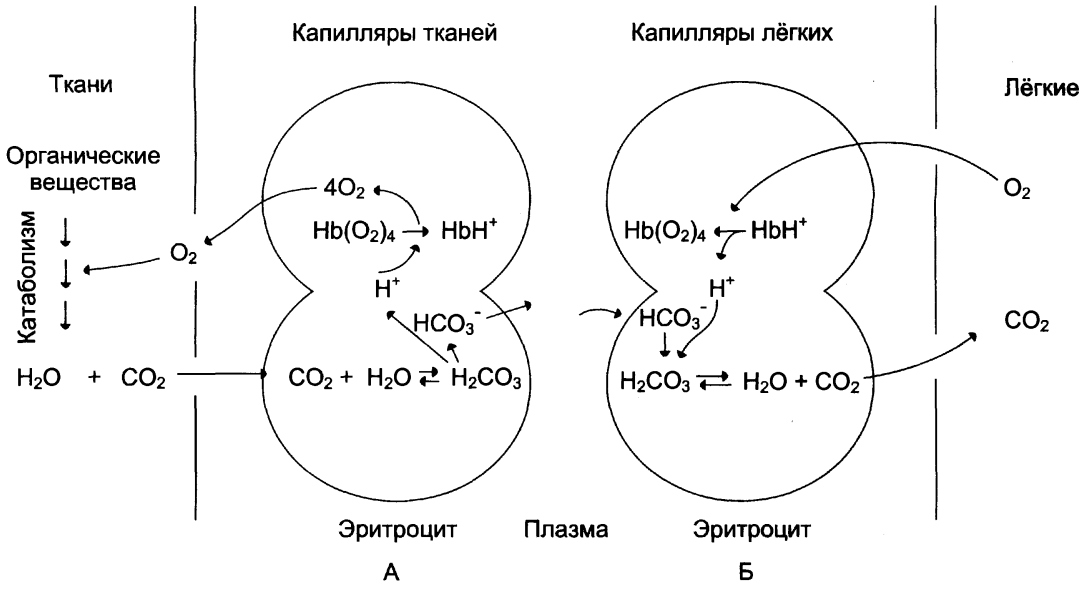


Рис. 1-36. Перенос H^+ и CO_2 с кровью. Эффект Бора. А – влияние концентрации CO_2 и H^+ на высвобождение O_2 из комплекса с гемоглобином в тканях (эффект Бора); Б – оксигенирование дезоксигемоглобина в лёгких, образование и выделение CO_2.

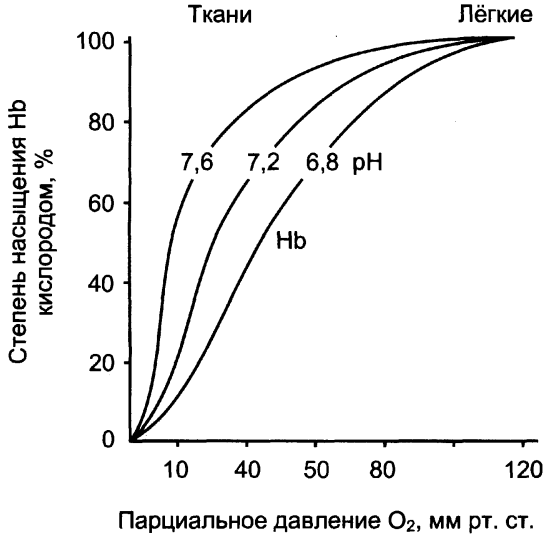
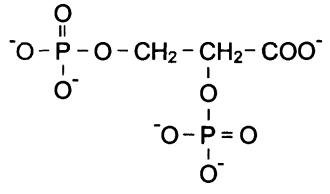


Рис. 1-37. Влияние pH на кривую диссоциации O_2 для гемоглобина.

ство CO_2 (около 15—20%) может переноситься в лёгкие, обратимо присоединяясь к неионизированным концевым α-аминогруппам. $R\text{-}NH_2 + CO_2 = R\text{-}NH\text{-}COO^- + H^+$, в результате образуется карбогемоглобин, где R — полипептидная цепь гемоглобина. Присоединение CO_2 к гемоглобину также снижает его сродство к O_2.

5. 2,3-Бифосфоглицерат — аллостерический регулятор сродства гемоглобина к O_2

2,3-Бифосфоглицерат (БФГ) — вещество, синтезируемое в эритроцитах из промежуточного продукта окисления глюкозы 1,3-бифосфоглицерата.



2,3-Бифосфоглицерат

Регуляция с помощью 2,3-бифосфоглицерата сродства гемоглобина к O_2

В нормальных условиях 2,3-бифосфоглицерат присутствует в эритроцитах примерно в той же концентрации, что и гемоглобин. БФГ, присоединяясь к гемоглобину, также может менять его сродство к O_2.

В центре тетрамерной молекулы гемоглобина есть полость, образованная аминокислотными остатками всех четырёх протомеров.

Центральная полость — место присоединения БФГ.

Размеры центральной полости могут меняться: отщепление O_2 от оксигемоглобина вызывает его конформационные изменения, которые способствуют образованию дополнительных ионных связей между димерами $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$. В результате пространственная структура дезоксигемоглобина становится более жёсткой, напряжённой, а центральная полость расширяется.

Поверхность полости ограничена остатками аминокислот, в числе которых имеются положительно заряженные радикалы $Лиз_{82}$, $Гис_{143}$ β-цепей и положительно заряженные α-аминогруппы N-концевого валина β-цепей. В расширенную полость дезоксигемоглобина БФГ, имеющий сильный отрицательный заряд, присоединяется с помощью ионных связей, образующихся с положительно заряженными функциональными группами двух β-цепей гемоглобина. Присоединение БФГ ещё сильнее стабилизирует жёсткую структуру дезоксигемоглобина и снижает сродство белка к O_2 (рис. 1-38).

Присоединение БФГ к дезоксигемоглобину происходит в участке, ином по сравнению с гемом, где происходит связывание O_2. Такой лиганд называется «**аллостерический**», а центр, где связывается аллостерический лиганд, — «**аллостерический центр**» (от греч. «аллос» — другой, иной, «стерос» — пространственный).

В лёгких высокое парциальное давление O_2 приводит к оксигенированию гемоглобина. Разрыв ионных связей между димерами $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$ приводит к «расслаблению» белковой молекулы, уменьшению центральной полости и вытеснению БФГ.

$$Hв(O_2)_4 + БФГ \underset{Лёгкие}{\overset{Ткани}{\rightleftarrows}} Hв\text{-}БФГ + 4O_2$$

Изменение концентрации БФГ как механизм адаптации организма к гипоксии. Концентрация БФГ в эритроцитах людей, живущих в определённых климатических условиях, — величина постоянная. Однако в период адаптации к высокогорью, когда человек поднимается на высоту более 4000 м над уровнем моря, концентрация БФГ уже через 2 дня возрастает почти в 2 раза (от 4,5 до 7,0 мМ). Это снижает сродство гемоглобина к O_2 и увеличивает количество O_2, транспортируемого в ткани (рис. 1-39).

Такую же адаптацию наблюдают у больных с заболеваниями лёгких, при которых развивается общая гипоксия тканей. Так, у больных с тяжёлой обструктивной эмфиземой лёгких парциальное давление в них снижается от 100 до 50 мм рт. ст. Но при этом в эритроцитах усиливается выработка БФГ, и его концентрация повышается с 4,5 до 7,0 мМ, что существенно увеличивает доставку O_2 в ткани.

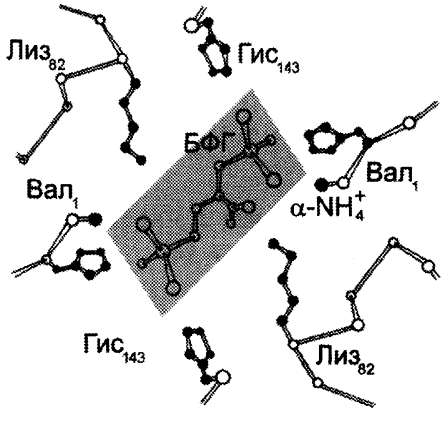


Рис. 1-38. Взаимодействие 2,3-бифосфоглицерата с аминокислотными остатками центральной полости дезоксигемоглобина.

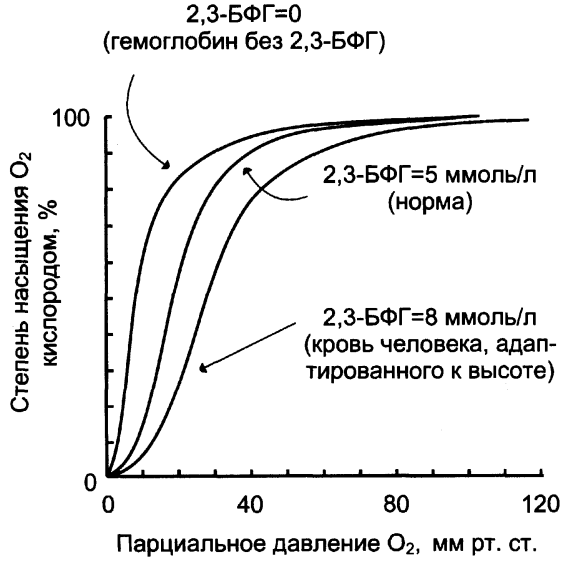


Рис. 1-39. Влияние различных концентраций 2,3-бифосфоглицерата на сродство гемоглобина к O_2.

Клиническое значение концентрации БФГ в консервированной крови

В крови, консервированной в некоторых средах, например цитрат-декстрозной, за 10 дней концентрация БФГ снижается с 4,5 до 0,5 мМ. Гемоглобин такой крови имеет очень высокое сродство к O_2. Если кровь со сниженной концентрацией БФГ переливать тяжелобольным, возникает опасность развития гипоксии тканей. Введённые с кровью эритроциты за 24 ч могут восстановить лишь половину нормальной концентрации БФГ. Добавлением в кровь БФГ нельзя восстановить нормальную концентрацию его в эритроцитах, так как, имея высокий отрицательный заряд, БФГ не может проникать через мембраны эритроцитов. Поэтому в настоящее время в кровь добавляют вещества, способные проникать через мембрану эритроцитов и поддерживать в них нормальную концентрацию БФГ.

6. Регуляторные свойства олигомерного белка гемоглобина

Таким образом, олигомерный белок гемоглобин, в отличие от мономерного родственного белка миоглобина, способен присоединять к специфическим участкам 4 различных лиганда: O_2, H^+, CO_2 и БФГ. Все эти лиганды присоединяются к пространственно разобщённым участкам, но конформационные изменения белка в месте присоединения одного лиганда передаются на весь олигомерный белок и изменяют сродство к нему других лигандов. Так, количество поступающего в ткани O_2 зависит не только от парциального давления O_2, но и концентрации аллостерических лигандов, что увеличивает возможность регуляции функций гемоглобина.

Как мы уже рассматривали выше, в капиллярах работающей мышцы увеличение концентрации CO_2 и H^+ уменьшает сродство гемоглобина к O_2 и увеличивает отдачу его в ткани. При длительной гипоксии усиливается синтез 2,3-БФГ в эритроцитах, что также снижает сродство гемоглобина к O_2 и при том же парциальном давлении O_2 увеличивает его транспорт в ткани.

Следовательно, благодаря воздействию регуляторных лигандов олигомерные белки способны приспосабливать свою конформацию и функцию к изменениям, происходящим в окружающей среде.

7. Особенности строения и функционирования гемоглобина плода

Фетальный гемоглобин (HbF) заменяет эмбриональный гемоглобин, начиная синтезироваться в печени через 2 нед после её формирования у плода. С 6 мес развития плода до его рождения это основной гемоглобин эритроцитов. После рождения ребёнка он интенсивно начинает замещаться на гемоглобин А.

В физиологических условиях HbF имеет более высокое сродство к O_2, чем HbA, что создаёт оптимальные условия для транспорта O_2 из крови матери в кровь плода. Это свойство HbF обусловлено тем, что он слабее, чем HbA связывается с 2,3-БФГ. Физиологические особенности HbF связаны с особенностями его строения: вместо β-глобиновых цепей в HbA, он содержит две γ-цепи (β-подобные). Связывание 2,3-БФГ с HbA происходит при участии положительно заряженных радикалов аминокислот двух β-цепей, некоторые из которых отсутствуют в первичной структуре γ-цепей. В среде, лишённой 2,3-БФГ, HbA и HbF проявляют одинаковое высокое сродство к O_2.

В. Наследственные нарушения первичной структуры и функций гемоглобина А — наследственные гемоглобинопатии

Важность первичной структуры белков для формирования их конформации и функции можно проследить на примерах наследственных заболеваний, связанных с изменением первичной структуры гемоглобина. В настоящее время известно около 300 вариантов HbA, имеющих в первичной структуре α- или β-цепей лишь небольшие изменения. Некоторые из них почти не влияют на функцию белка и здоровье человека, другие снижают функцию белка и особенно в экстремальных ситуациях снижают возможность адаптации человека, третьи — вызывают значительные нарушения функций HbA и развитие анемии, что приводит к тяжёлым клиническим последствиям.

В аномальных гемоглобинах изменения могут затрагивать аминокислоты:

- находящиеся на поверхности белка;
- участвующие в формировании активного центра;
- замена которых нарушает общую трёхмерную конформацию молекулы;
- изменяющие четвертичную структуру белка и его регуляторные свойства.

1. Замена аминокислоты на поверхности гемоглобина А

Ещё в 1904 г. чикагский врач Джеймс Херрик описал у студента тяжёлую анемию с обнаружением в его крови множества удлинённых, похожих на полумесяц, эритроцитов. Заболевание получило название «серповидно-клеточной анемии», и только в 1949 г. Лайнус Полинг и его сотрудники доказали, что оно вызвано изменением первичной структуры HbA.

В молекуле гемоглобина S (так назван аномальный гемоглобин) мутантными оказались 2 β-цепи, в которых глутамат, высокополярная отрицательно заряженная аминокислота в положении 6 была заменена валином, содержащим гидрофобный радикал.

	1	2	3	4	5	6	7	8
HbA β-цепь	Вал	Гис	Лей	Тре	Про	Глу	Глу	Лиз
HbS β-цепь	Вал	Гис	Лей	Тре	Про	Вал	Глу	Лиз

В дезоксигемоглобине S имеется участок, комплементарный другому участку таких же молекул, содержащему изменённую аминокислоту. В результате молекулы дезоксигемоглобина начинают «слипаться», образуя удлинённые фибриллярные агрегаты, деформирующие эритроцит и приводящие к образованию аномальных эритроцитов в виде серпа (рис. 1-40).

В оксигемоглобине S комплементарный участок «замаскирован» в результате изменения конформации белка. Недоступность участка препятствует соединению молекул оксигемоглобина S друг с другом. Следовательно, образованию агрегатов HbS способствуют условия, повышающие концентрацию дезоксигемоглобина в клетках (физическая работа, гипоксия, уменьшение pH, условия высокогорья, полёт на самолёте).

Так как «серповидные» эритроциты плохо проходят через капилляры тканей, они часто закупоривают сосуды и создают тем самым локальную гипоксию. Это повышает концентрацию дезоксигемоглобина S в эритроцитах, скорость образования агрегатов гемоглобина S и ещё большую деформацию эритроцитов. Нарушение доставки O_2 в ткани вызывает боли и даже некроз клеток в данной области.

Серповидно-клеточная анемия — гомозиготное рецессивное заболевание; проявляется только в том случае, когда от обоих родителей наследуются 2 мутантных гена β-цепей глобина. После рождения ребёнка болезнь не проявляется до тех пор, пока значительные количества HbF не заместятся на HbS. У больных выявляют клинические симптомы, характерные для анемии: головокружение и головные боли, одышка, учащённое сердцебиение, боли в конечностях, повышенную восприимчивость к инфекционным заболеваниям.

Гетерозиготные индивидуумы, имеющие один нормальный ген HbA, а другой ген HbS, в крови имеют лишь следовые количества серповидных клеток и нормальную продолжительность жизни; клинические симптомы болезни у них обычно не проявляются.

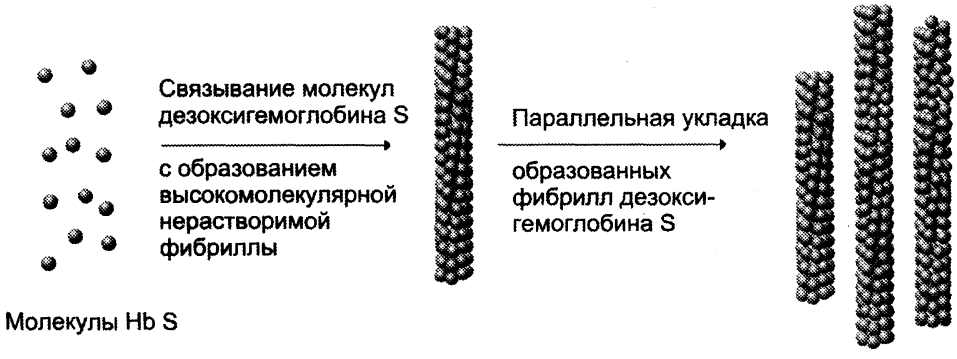


Рис. 1-40. Ассоциация молекул дезоксигемоглобина S.

Для диагностики наличия HbS в эритроцитах человека используют метод электрофореза, основанного на движении заряженных белков в электрическом поле. Так как в HbS отрицательно заряженные группы глутамата в β-цепях заменены незаряженным валином, HbS в щелочной среде будет двигаться медленнее, чем HbA.

Высокая частота гена HbS среди жителей Африки (до 40% населения в некоторых районах) обусловлена тем, что гетерозиготы менее чувствительны к малярии, чем люди с нормальным гемоглобином А. *Plasmodium falciparum* — возбудитель малярии, облигатную часть своего жизненного цикла он проводит в эритроцитах. Так как эритроциты гетерозиготных по HbS людей имеют более короткий срок жизни, чем нормальные эритроциты, возбудитель малярии не успевает закончить необходимую стадию развития. Это создаёт избирательное преимущество для гетерозиготных по HbS людей в тех областях, где малярия вызывает гибель многих людей.

Серповидно-клеточная анемия — первый описанный пример молекулярной болезни.

Почти все встречающиеся замены аминокислот на поверхности молекулы гемоглобина безвредны. Гемоглобин S — редкое исключение.

2. Изменения аминокислотного состава в области активного центра гемоглобина

Между гемом и белковой частью гемоглобина существует около 60 межатомных контактов. Большинство мутаций, нарушающих в той или иной мере эти контакты, приводят к развитию гемоглобинопатии и анемии.

Гемоглобин М — вариант гемоглобина А, где в результате мутации в гене α- или β-цепи происходит замена Гис E_7 или Гис F_8 тирозином. В результате Fe^{2+} окисляется в Fe^{3+} и стабилизируется в этой форме. Гемоглобин, содержащий в геме Fe^{3+}, называют метгемоглобином (отсюда и название — гемоглобин М). Вместо O_2 к Fe^{3+} присоединяется H_2O. Обычно изменения затрагивают либо α-, либо β-цепи, в результате гемоглобин может переносить не более двух молекул O_2. У гетерозиготных людей отмечают цианоз, связанный с нарушением транспорта O_2, а гомозиготность по этому гену приводит к летальному исходу.

Гемоглобин Хаммерсмита — вариант гемоглобина А, где в положении D_1 вместо фенил-аланина (гидрофобной аминокислоты) находится серин (гидрофильная аминокислота). Фен D_1 входит в неполярное окружение гема. Замена его на гидрофильную аминокислоту приводит к нарушению прочности связывания гема с глобином; в «гидрофобный карман», где размещается гем, способна проникать вода, окисляющая Fe^{2+} до Fe^{3+}, в результате чего развивается анемия.

3. Изменения аминокислотного состава, деформирующие третичную структуру гемоглобина

Во всех нормальных гемоглобинах и в миоглобине в месте пересечения двух α-спиралей В и Е находится аминокислота глицин. Так как глицин вместо радикала содержит атом водорода, в этом месте две спирали плотно прилегают друг к другу.

В гемоглобине Ривердейла–Бронкса (вариант гемоглобина А) вместо глицина в положении B_6 находится аминокислота аргинин, имеющая объёмный радикал. В результате он не умещается в столь узком пространстве, молекула меняет конформацию и становится нестабильной.

4. Замены аминокислот в области контактов димеров $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_2$, нарушающие аллостерические регуляторные функции гемоглобина

Почти все варианты гемоглобина А, где происходит замена аминокислот в области контакта димеров α_1,β_1, α_2,β_2, проявляют пониженную кооперативность и нарушенное сродство гемоглобина к O_2.

Так, гемоглобин Кемпси — вариант гемоглобина А, где в положении G_1 β-цепи аспарагиновая кислота заменена на аспарагин. В норме аспарагиновая кислота участвует в образовании водородной связи, стабилизирующей дезоксигемоглобин. В результате замены эта связь не образуется, что нарушает стабильность конформации дезоксигемоглобина, и сродство гемоглобина к O_2 повышается. У больных развивается анемия с выраженным цианозом.

Таким образом, первичная структура белка определяет особенности его конформации, строения активного центра и функций. Изменение одной аминокислоты только в одном белке может быть причиной нарушений функций данного белка и развития наследственной патологии.

VI. МНОГООБРАЗИЕ БЕЛКОВ

В организме человека содержится свыше 50 000 индивидуальных белков, отличающихся первичной структурой, конформацией, строением активного центра и функциями. Белки построены из 20 химически различных аминокислот, каждая из которых может занимать любое положение в полипептидной цепи. Кроме того, белки различаются количеством аминокислот, из которых они построены.

Однако большинство таких белков в среде должны принимать множество конформаций с приблизительно одинаковой энергией, но разными химическими свойствами и функциями. Поэтому в эволюции, по-видимому, была отобрана лишь небольшая часть возможных вариантов белков, которые способны принимать единственную стабильную конформацию.

Таким образом, первичная структура известных белков, отобранных эволюцией, обеспечивает исключительную стабильность одной из возможных конформаций, которая и определяет особенности функционирования данного белка.

Возникновение новых белков часто связано с незначительными изменениями в структуре уже имеющихся белков. Кроме того, благодаря генетическим механизмам, о которых будет сказано в разделе 4, белок с полезными свойствами или основная структурная часть этого белка могут входить в состав других белков. Такие белки, имеющие схожую последовательность аминокислот и родственные функции, объединяют в семейства родственных белков.

А. Классификации белков

До настоящего времен нет единой и стройной классификации, учитывающей различные параметры белков. В основе имеющихся классификаций обычно лежит один признак. Так, белки можно классифицировать:

- по форме молекул (глобулярные или фибриллярные);
- по молекулярной массе (низкомолекулярные, высокомолекулярные и др.);
- по химическому строению (наличие или отсутствие небелковой части);
- по выполняемым функциям (транспортные, защитные, структурные белки и др.);
- по локализации в клетке (ядерные, цитоплазматические, лизосомальные и др.);
- по локализации в организме (белки крови, печени, сердца и др.);
- по возможности адаптивно регулировать количество данных белков: белки, синтезирующиеся с постоянной скоростью (конститутивные), и белки, синтез которых может усиливаться при воздействии факторов среды (индуцибельные);
- по продолжительности жизни в клетке (от очень быстро обновляющихся белков, с $T_{1/2}$ менее 1 ч, до очень медленно обновляющихся белков, $T_{1/2}$ которых исчисляют неделями и месяцами);
- по схожим участкам первичной структуры и родственным функциям (семейства белков).

Б. Классификация белков по форме молекул

Это одна из самых старых классификаций, которая делит белки на 2 группы: **глобулярные** и **фибриллярные**. К глобулярным относят белки, соотношение продольной и поперечной осей которых не превышает 1:10, а чаще составляет 1:3 или 1:4, т.е. белковая молекула имеет форму эллипса. Большинство индивидуальных белков человека относят к глобулярным белкам. Они имеют компактную структуру и многие из них, за счёт удаления гидрофобных радикалов внутрь молекулы, хорошо растворимы в воде. Наглядные примеры строения и функционирования глобулярных белков — рассмотренные выше миоглобин и гемоглобины.

Фибриллярные белки имеют вытянутую, нитевидную структуру, в которой соотношение продольной и поперечной осей составляет более 1:10. К фибриллярным белкам относят коллагены, эластин, кератин, выполняющие в организме человека структурную функцию, а также миозин, участвующий в мышечном сокращении, и фибрин — белок свёртывающей системы крови. На примере коллагенов и эластина рассмотрим особенности строения этих белков и связь их строения с функцией.

1. Строение и функции коллагенов

Коллагены — семейство родственных фибриллярных белков, секретируемых клетками соединительной ткани. Коллагены — самые распространённые белки не только межклеточного матрикса, но и организма в целом, они со-

ставляют около 1/4 всех белков организма человека. В межклеточном матриксе молекулы коллагена образуют полимеры, называемые фибриллами коллагена (более подробно это описано в разделе 15). Фибриллы коллагена обладают огромной прочностью и практически нерастяжимы. Они могут выдерживать нагрузку, в 10 000 раз превышающую их собственный вес. По прочности коллагеновые фибриллы превосходят прочность стальной проволоки того же сечения. Именно поэтому большое количество коллагеновых волокон, состоящих из коллагеновых фибрилл, входит в состав кожи, сухожилий, хрящей и костей.

Необычные механические свойства коллагенов связаны с их первичной и пространственной структурами. Молекулы коллагена состоят из трёх полипептидных цепей, называемых α-цепями. Идентифицировано более 20 α-цепей, большинство которых имеет в своём составе 1000 аминокислотных остатков, но цепи несколько отличаются аминокислотной последовательностью. В состав коллагенов могут входить три одинаковые или разные цепи.

Первичная структура α-цепей коллагена необычна, так как каждая третья аминокислота в полипептидной цепи представлена глицином, около 1/4 аминокислотных остатков составляют пролин или 4-гидроксипролин, около 11% — аланин. В коллагене отсутствуют такие аминокислоты, как цистеин и триптофан, а гистидин, метионин и тирозин находятся лишь в очень небольшом количестве. В составе первичной структуры α-цепи коллагена содержится также необычная аминокислота — гидроксилизин. Полипептидную цепь коллагена можно представить как последовательность триплетов Гли-X-Y, где X и Y могут быть любыми аминокислотами, но чаще в положении X стоит пролин, а в положении Y — гидроксипролин или гидроксилизин. Каждая из этих аминокислот имеет большое значение для формирования коллагеновых фибрилл.

Пролин благодаря своей структуре вызывает изгибы в полипептидной цепи, стабилизируя левозакрученную спиральную конформацию. На один виток спирали приходится 3 аминокислотных остатка, а не 3,6, как это характерно для вторичной структуры глобулярных белков. Спираль пептидной цепи коллагена стабилизирована не за счёт водородных связей (так как пролин их не образует), а силами стерического отталкивания пирролидиновых колец в остатках пролина. В результате расстояние между аминокислотными остатками по оси спирали увеличивается, и она оказывается более развёрнутой по сравнению с туго закрученной α-спиралью глобулярных белков.

Спирализованные полипептидные цепи, перевиваясь друг около друга, образуют трёхцепочечную правозакрученную суперспиральную молекулу, часто называемую тропоколлагеном (рис. 1-41). Цепи удерживаются друг около друга за счёт водородных связей, возникающих между амино- и карбоксильными группами пептидного остова разных полипептидных цепей, входящих в состав трёхспиральной молекулы. «Жёсткие» аминокислоты — пролин и гидроксипролин — ограничивают вращение полипептидного стержня и увеличивают тем самым стабильность тройной спирали. Глицин, имеющий вместо радикала атом водорода, всегда находится в месте пересечения цепей; отсутствие радикала позволяет цепям плотно прилегать друг к другу.

В результате такого скручивания пептидных остовов полипептидных цепей и наличия удлинённой структуры два других радикала из триады аминокислот Гли-X-Y оказываются на наружной поверхности молекулы тропоколлагена. Некоторые комплементарные участки молекул тропоколлагена могут объединяться друг с другом, формируя коллагеновые фибриллы, причём эти участки расположены таким образом, что одна нить тропоколлагена сдвинута по отношению к другой примерно на 1/4 (рис. 1-42). Между радикалами аминокислот возникают ионные, водородные и гидрофобные связи.

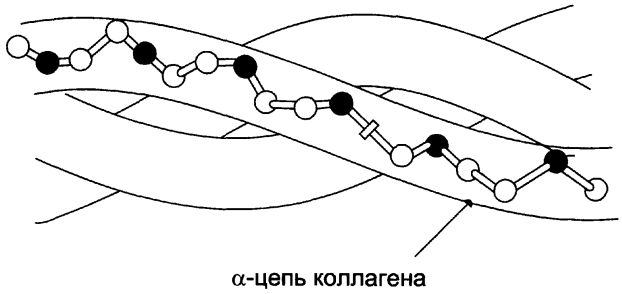


Рис. 1-41. Строение молекулы тропоколлагена (фрагмент).

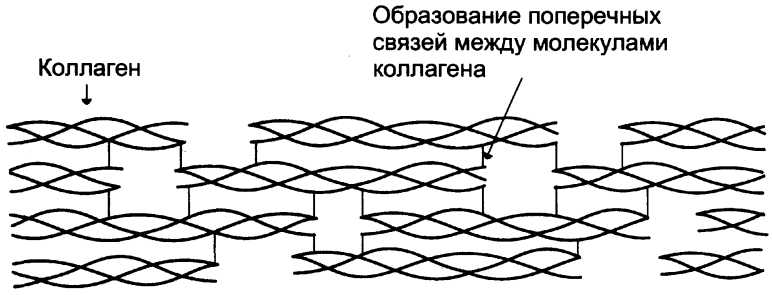


Рис. 1-42. Строение коллагеновой фибриллы (фрагмент).

Важную роль в формировании коллагеновых фибрилл играют модифицированные аминокислоты: гидроксипролин и гидроксилизин. Гидроксильные группы гидроксипролина соседних цепей тропоколлагена образуют водородные связи, укрепляющие структуру коллагеновых фибрилл. Радикалы лизина и гидроксилизина необходимы для образования прочных поперечных сшивок между молекулами тропоколлагена, ещё сильнее укрепляющие структуру коллагеновых фибрилл. Кроме того, к гидроксильной группе гидроксилизина могут присоединяться углеводные остатки (гликозилирование коллагена), функция которых пока неясна.

Таким образом, аминокислотная последовательность полипептидных цепей коллагена позволяет сформировать уникальную по своим механическим свойствам структуру, обладающую огромной прочностью. Изменение в первичной структуре коллагена может приводить к развитию наследственных болезней (см. раздел 15).

2. Строение и функция эластина

В отличие от коллагена, образующего прочные фибриллы, способные выдержать большие нагрузки, эластин (также белок межклеточного матрикса) обладает резиноподобными свойствами. Нити эластина, содержащиеся в тканях лёгких, в стенках сосудов, в эластичных связках, могут быть растянуты в несколько раз по сравнению с их обычной длиной, но после снятия нагрузки они возвращаются к свёрнутой конформации.

Эластин содержит в составе около 800 аминокислотных остатков, среди которых преобладают аминокислоты с неполярными радикалами, такие как глицин, валин, аланин. Эластин содержит довольно много пролина и лизина, но лишь немного гидроксипролина; полностью отсутствует гидроксилизин.

Наличие большого количества гидрофобных радикалов препятствует созданию стабильной глобулы, в результате полипептидные цепи эластина не формируют регулярные вторичную и третичную структуры, а принимают в межклеточном матриксе разные конформации с примерно равной свободной энергией (рис. 1-43). Это как раз тот случай строения первичной структуры, когда отсутствие одной стабильной упорядоченной конформации приводит к возникновению необходимых белку свойств.

Более подробно особенности строения и функционирования эластина рассмотрены в разделе 15.

В. Классификация белков по химическому строению

1. Простые белки

Некоторые белки содержат в своём составе только полипептидные цепи, состоящие из аминокислотных остатков. Их называют «**простые белки**». Примером простых белков могут служить основные белки хроматина — гистоны; в их составе содержится много аминокислотных остатков лизина и аргинина, радикалы которых имеют положительный заряд (более подробно

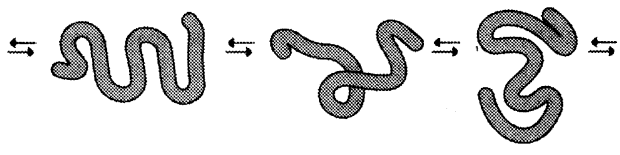


Рис. 1-43. Случайные конформации молекулы эластина.

гистоны описаны в разделе 4). Рассмотренный выше белок межклеточного матрикса эластин также относят к простым белкам.

2. Сложные белки

Однако очень многие белки, кроме полипептидных цепей, содержат в своём составе небелковую часть, присоединённую к белку слабыми или ковалентными связями. Небелковая часть может быть представлена ионами металлов, какими-либо органическими молекулами с низкой или высокой молекулярной массой. Такие белки называют «**сложные белки**». Прочно связанная с белком небелковая часть носит название простетической группы.

Простетическая группа может быть представлена веществами разной природы. Например, белки, соединённые с гемом, носят название гемопротеины. В состав гемопротеинов, кроме уже рассмотренных выше белков гемоглобинов и миоглобина, входят ферменты — цитохромы, каталаза и пероксидаза. Гем, присоединённый к разным белковым структурам, выполняет в них характерные для каждого из белков функции (например, в составе гемоглобина переносит O_2, а в составе цитохромов — электроны).

Белки, соединённые с остатком фосфорной кислоты, называют фосфопротеинами. Фосфорные остатки присоединяются сложноэфирной связью к гидроксильным группам серина, треонина или тирозина при участии ферментов, называемых протеинкиназами.

В состав белков часто входят углеводные остатки, придающие белкам дополнительную специфичность и часто уменьшающие скорость их ферментативного протеолиза. Такие белки носят название гликопротеинов. Многие белки крови, а также рецепторные белки клеточной поверхности относят к гликопротеинам.

Белки, функционирующие в комплексе с липидами, называют липопротеинами, а в комплексе с металлами — металлопротеинами.

Сложный белок, состоящий из белковой части (**апопротеин**) и небелковой части (простетическая группа), называют «**холопротеин**».

Г. КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ ПО ФУНКЦИЯМ

Белки выполняют в клетках множество биологических функций. По признаку сходства выполняемых белками функций их можно разделить на следующие большие группы.

1. Ферменты

Ферменты — специализированные белки, ускоряющие течение химических реакций. Благодаря ферментам в клетке скорости химических реакций возрастают в миллионы раз. Так как ферменты, как и любые белки, имеют активный центр, они специфически связывают определённый лиганд (или группу похожих лигандов) и катализируют определённый тип химического превращения данной молекулы. В настоящее время известно около 2000 различных ферментов, ускоряющих различные химические реакции. Например, протеолитический фермент трипсин разрушает в белках пептидные связи, образованные карбоксильной группой основных аминокислот — аргинина или лизина. Фермент рибонуклеаза расщепляет фосфоэфирную связь между нуклеотидами в полинуклеотидной цепи.

Благодаря набору ферментов в клетках превращения поступающих в них веществ протекают не хаотично, а в строго определённых направлениях.

2. Регуляторные белки

К регуляторным белкам относят большую группу белковых гормонов, участвующих в поддержании постоянства внутренней среды организма, которые воздействуют на специфические клетки-мишени. Например, гормон инсулин выделяется в кровь при повышении концентрации глюкозы в крови после еды и, стимулируя использование глюкозы клетками, снижает концентрацию глюкозы до нормы, т.е. восстанавливает гомеостаз.

Кроме того, к регуляторным относят белки, присоединение которых к другим белкам или иным структурам клетки регулирует их функцию. Например, белок кальмодулин в комплексе с четырьмя ионами Ca^{2+} может присоединяться к некоторым ферментам, меняя их активность.

Регуляторные ДНК-связывающие белки, присоединяясь в определённые моменты к специфичным участкам ДНК, могут регулировать скорость считывания генетической информации (они описаны в разделе 4).

3. Рецепторные белки

Сигнальные молекулы (гормоны, нейромедиаторы) действуют на внутриклеточные процес-

сы через взаимодействие со специфическими белками-рецепторами. Так, гормоны, циркулирующие в крови, находят клетки-мишени и воздействуют на них, специфично связываясь с белками-рецепторами, обычно встроенными в клеточную мембрану. Для гидрофобных регуляторных молекул, проходящих через клеточную мембрану, рецепторы локализуются в цитоплазме клеток.

4. Транспортные белки

Многие белки крови участвуют в переносе специфических лигандов из одного органа к другому. Часто в комплексе с белками переносятся молекулы, плохо растворимые в воде. Так, белок плазмы крови альбумин переносит жирные кислоты и билирубин (продукт распада гема), а гемоглобин эритроцитов участвует в переносе O_2 от лёгких к тканям. Стероидные гормоны переносятся в крови специфическими транспортными белками.

Транспортные белки участвуют также в переносе гидрофильных веществ через гидрофобные мембраны. Так как транспортные белки обладают свойством специфичности взаимодействия с лигандами, их набор в клеточной мембране определяет, какие гидрофильные молекулы могут пройти в данную клетку. С помощью белков-переносчиков в клетку проникают глюкоза, аминокислоты, ионы и другие молекулы.

5. Структурные белки

Некоторые белки, расположенные определённым образом в тканях, придают им форму, создают опору, определяют механические свойства данной ткани. Например, как уже говорилось выше, главным компонентом хрящей и сухожилий является фибриллярный белок коллаген, имеющий высокую прочность. Другой структурный белок (эластин) благодаря своему уникальному строению обеспечивает определённым тканям свойство растягиваться во всех направлениях (сосуды, лёгкие).

6. Защитные белки

Некоторые белки, в частности иммуноглобулины, обладают способностью узнавать и связывать чужеродные молекулы, вирусные частицы и бактерии, в результате чего происходит их нейтрализация. Кроме того, комплекс чужеродной частицы с иммуноглобулином легко узнаётся и уничтожается клетками иммунной системы.

Защитными свойствами обладают белки свёртывающей системы крови, например фибриноген, тромбин. Они участвуют в формировании тромба, который закупоривает повреждённый сосуд и препятствует потере крови.

7. Сократительные белки

Некоторые белки при выполнении своих функций наделяют клетку способностью либо сокращаться, либо передвигаться. К таким белкам относят актин и миозин — фибриллярные белки, участвующие в сокращении скелетных мышц. Другой пример таких белков — тубулин, из которого построены клеточные органеллы — микротрубочки. Микротрубочки в период деления клетки регулируют расхождение хроматид. Микротрубочки — важные элементы ресничек и жгутиков, с помощью которых клетки передвигаются.

Однако существует большое количество белков, имеющих уникальные функции, которые не вошли в эту довольно простую классификацию.

Д. Семейства родственных белков

В ходе эволюции в пределах одного биологического вида замены аминокислотных остатков могут приводить к возникновению разных белков, выполняющих родственные функции и имеющих гомологичные последовательности аминокислот. Гомологичными называют последовательности, имеющие много сходных черт. Они содержат во многих положениях одни и те же аминокислоты, называемые инвариантными, а в некоторых положениях могут находиться разные, но близкие по физико-химическим свойствам аминокислотные остатки.

Эти белки имеют поразительно схожие конформации: количество и взаиморасположение α-спиралей и/или β-структур, большинство поворотов и изгибов полипептидных цепей сходно или идентично. Такие белки, имеющие гомологичные участки полипептидной цепи, сходную конформацию и родственные функции, выделяют в семейства белков.

Пример семейства родственных белков — семейство миоглобина, куда включены, кроме самого миоглобина, и все виды гемоглобина.

1. Семейство сериновых протеаз

К семейству родственных белков относят сериновые протеазы. Это семейство ферментов, которые используют уникально активированный остаток серина, расположенный в активном центре, для связывания и каталитического гидролиза пептидных связей в белковых субстратах. Мишени для сериновых протеаз — специфические пептидные связи в белках (часто в других сериновых протеазах).

Для всех белков этого семейства характерно наличие в активном центре остатков $Сер_{195}$, $Гис_{57}$, $Асп_{102}$ (эту нумерацию используют независимо от их точного расположения в первичной структуре определённых сериновых протеаз). Выявлена также высокая схожесть их пространственных структур, несмотря на то, что только в 40% положений они содержат идентичные аминокислоты (рис. 1-44). Каталитический участок сериновых протеаз расположен в расщелине между двумя доменами.

Некоторые аминокислотные замены привели к изменению субстратной специфичности этих белков и к возникновению функционального многообразия внутри этого семейства. Так, пищеварительные сериновые протеазы участвуют в переваривании (гидролитическом расщеплении пептидных связей) денатурированных пищевых белков. К ним относят трипсин, химотрипсин, эластазу, но каждый из этих ферментов предпочитает разрывать пептидные связи, образованные определёнными аминокислотами.

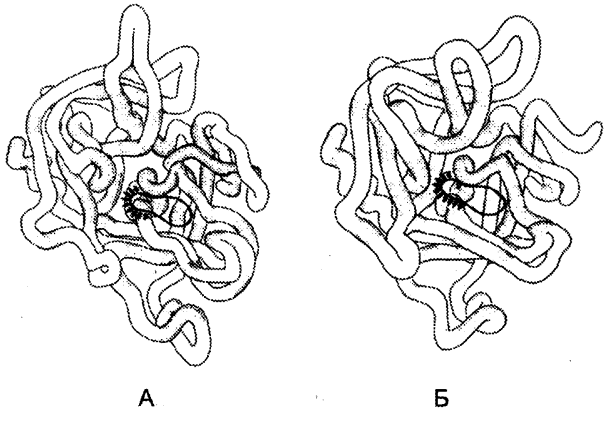


Рис. 1-44. Пространственные структуры эластазы (А) и химотрипсина (Б).

Ещё большей субстратной специфичностью обладают сериновые протеазы, участвующие в тщательно контролируемых физиологических процессах, таких как активация каскада белков свёртывания крови, фибринолиза, активация белков системы комплемента, образования белковых гормонов. В процессе активации нативных белков сериновые протеазы гидролизуют одну или две особенные пептидные связи из сотен связей, имеющихся в белковом субстрате. Это связано с тем, что в нативном белке фермент узнаёт не только аминокислоты, непосредственно формирующие пептидную связь, но и некоторые аминокислотные остатки, окружающие связь, подвергающуюся ферментативному гидролизу.

Более подробно о сериновых протеазах можно прочесть в разделах 9, 14.

2. Суперсемейство иммуноглобулинов

В работе иммунной системы огромную роль играют белки, относящиеся к суперсемейству иммуноглобулинов. Это суперсемейство включает по крайней мере три больших семейства белков, участвующих в иммунной защите организма: семейство иммуноглобулинов, семейство Т-клеточных антигенраспознающих рецепторов и белки главного комплекса гистосовместимости I и II классов, которые в литературе обозначают MHC (от англ. *major histocompatibility complex*). В это суперсемейство включено также семейство адгезивных белков, участвующих в узнавании определённых типов клеток и их межклеточных взаимодействиях.

Основной критерий включения белков в суперсемейство иммуноглобулинов — их доменная организация, достоверная гомология аминокислотных последовательностей и пространственных структур отдельных доменов. Кроме того, белки этого суперсемейства имеют схожие функции: иммуноглобулины взаимодействуют с чужеродными структурами, находящимися в крови, лимфе, межклеточной жидкости или секретах желёз, а рецепторы Т-лимфоцитов и белки главного комплекса гистосовместимости — с антигенами, находящимися на поверхности клеток данного организма.

3. Семейство иммуноглобулинов

Иммуноглобулины, или антитела, — специфические белки, вырабатываемые В-лимфоцитами

в ответ на попадание в организм чужеродных структур, называемых антигенами. В организме человека вырабатывается около 10^7 клонов В-лимфоцитов, каждый из которых специализирован на выработке одного из 10^7 видов иммуноглобулинов.

Все иммуноглобулины характеризуются общим планом строения, который мы рассмотрим на примере строения IgG.

Молекула IgG состоит из четырёх полипептидных цепей: двух идентичных лёгких (L — от англ. *light*), содержащих около 220 аминокислотных остатков, и двух тяжёлых (H — от англ. *heavy*), состоящих из 440 аминокислот каждая. Все 4 цепи соединены друг с другом множеством нековалентных и четырьмя дисульфидными связями. Поэтому молекулу IgG относят к мономерам.

Лёгкие цепи IgG состоят из 2 доменов: вариабельного (V_L), находящегося в N-концевой области полипептидной цепи, и константного (C_L), расположенного на С-конце. Каждый из доменов состоит из 2 слоёв с β-складчатой структурой, где участки полипептидной цепи лежат антипараллельно. β-Слои связаны ковалентно дисульфидной связью примерно в середине домена (рис. 1-45).

Тяжёлые цепи IgG имеют 4 домена: один вариабельный (V_H), находящийся на N-конце, и три константных (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}). Домены тяжёлых цепей IgG имеют гомологичное строение с доменами лёгких цепей. Между двумя константными доменами тяжёлых цепей C_{H1} и C_{H2} есть участок, содержащий большое количество остатков пролина, которые препятствуют формированию вторичной структуры и взаимодействию соседних Н-цепей на этом отрезке. Этот участок называют «шарнирной областью»; он придаёт молекуле гибкость.

Между вариабельными доменами тяжёлых и лёгких цепей находятся два идентичных участка, связывающих два одинаковых специфических антигена; поэтому такие антитела часто называют **«биваленты»**. В связывании антигена с антителом участвует не вся аминокислотная последовательность вариабельных доменов обеих цепей, а всего лишь 20–30 аминокислот, расположенных в гипервариабельных областях каждой цепи. Именно эти области определяют уникальные способности каждого клона антител взаимодействовать с соответствующим (комплементарным) антигеном.

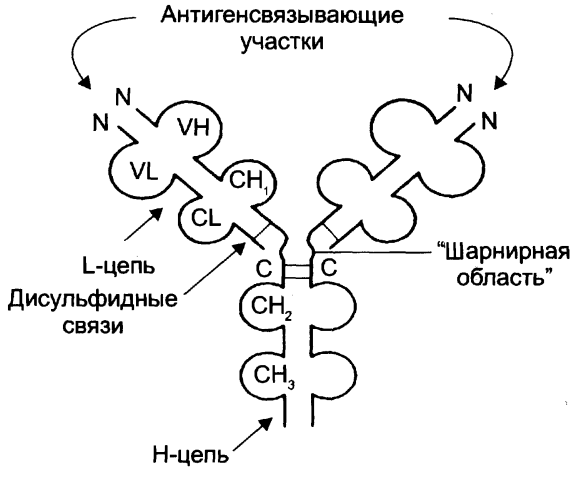


Рис. 1-45. Строение иммуноглобулина G.

Основные функции антител — обнаружение и связывание чужеродных антигенов, находящихся в организме вне его клеток (в крови, лимфе, межклеточной жидкости, в слизистых секретах). Это происходит с помощью специфических антигенсвязывающих участков разных клонов иммуноглобулинов. Кроме того, благодаря связыванию антигена с антителом облегчается процесс дальнейшего разрушения чужеродных веществ. Специфичность пути разрушения комплекса антиген–антитело зависит от класса антител.

Классы иммуноглобулинов. Существует 5 классов тяжёлых цепей иммуноглобулинов, отличающихся по строению константных доменов: α, δ, ε, γ и μ. В соответствии с ними различают 5 классов иммуноглобулинов: A, D, E, G и M. Особенности строения тяжёлых цепей придают их «шарнирным участкам» и С-концевым областям характерную для каждого класса конформацию. Связывание антигена с антителом изменяет конформацию константных доменов тяжёлых цепей, что определяет путь разрушения комплекса в организме (связывание с белками системы комплемента или поглощение комплекса фагоцитирующими клетками).

Иммуноглобулины M — первый класс антител, синтезирующийся в развивающихся В-лимфоцитах. Различают 2 формы иммуноглобулинов M: мономерная, мембранно-связанная

форма и пентамерная, секретируемая В-лимфоцитами в кровь.

Мембранно-связанная форма иммуноглобулинов М. Созревающие В-лимфоциты синтезируют мономерные бивалентные молекулы IgM, по структуре похожие на рассматриваемые выше IgG, которые встраиваются в плазматическую мембрану клеток и играют роль первых антиген-распознающих рецепторов. Прикрепление IgM к мембране осуществляется с помощью гидрофобного участка, находящегося в С-концевой («хвостовой») области тяжёлых цепей, содержащей 25 гидрофобных аминокислотных остатков.

Взаимодействие антигена с рецептором на поверхности В-лимфоцита вызывает его размножение и образование целого клона лимфоцитов, происходящих из одной, стимулированной антигеном клетки. Этот клон В-лимфоцитов будет вырабатывать иммуноглобулины с одинаковыми антигенсвязывающими участками. Однако В-лимфоциты способны переключаться на выработку других классов антител.

Секреторная форма иммуноглобулинов М. Когда В-лимфоциты впервые встречаются в жидкостях организма с неизвестным ранее антигеном, они синтезируют и секретируют в кровь IgM, которые содержат пять мономерных субъединиц, связанных друг с другом дисульфидными связями и дополнительной полипептидной J-цепью (рис. 1-46).

В тяжёлых цепях их мономеров отсутствует гидрофобная «хвостовая» часть. Пентамерная молекула содержит 10 участков связывания с антигеном, что облегчает вероятность прикрепления неизвестного ранее антигена к иммуноглобулину (рис. 1-47).

Взаимодействие антигена с IgM изменяет его конформацию и индуцирует связывание его «хвостовой» области с первым компонентом системы комплемента. Если антиген расположен на поверхности микроорганизма, активирование системы комплемента вызывает нарушение целостности клеточной мембраны и гибель бактериальной клетки.

Иммуноглобулины G. В количественном отношении IgG доминируют в крови и составляют около 75% от общего количества этих белков. Строение IgG подробно описано выше. В крови IgG обнаруживают только в мономерной форме; он секретируется активированными В-лимфоцитами в больших количествах при вторичном иммунном ответе, когда антиген повторно попадает в организм.

У человека обнаружено 4 подкласса IgG: $IgGg_1$, $IgGg_2$, $IgGg_3$, $IgGg_4$. Порядковый номер указывает на количественное содержание каждого подкласса в сыворотке (в наибольшем количестве содержится $IgGg_1$, а в наименьшем —

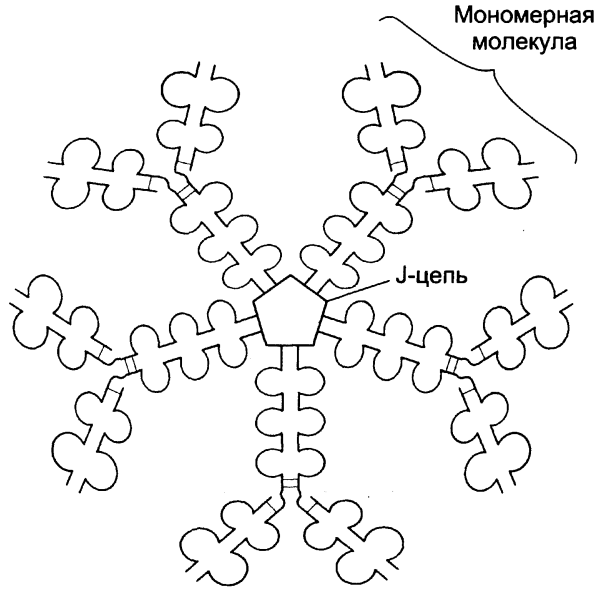


Рис. 1-46. Строение пентамерной секреторной молекулы иммуноглобулина М.

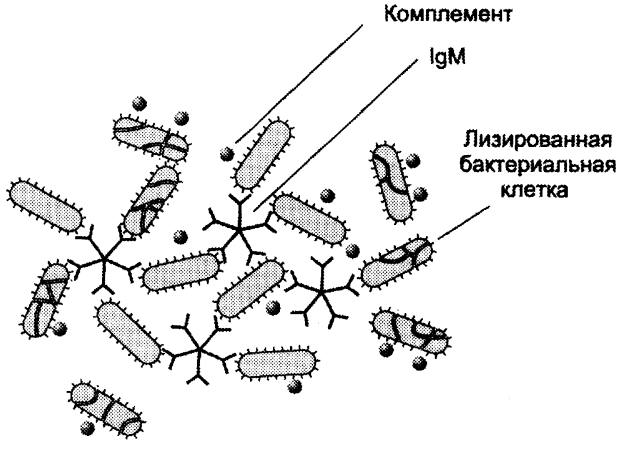


Рис. 1-47. Связывание IgM с антигенами бактериальных клеток и их разрушение активированными белками системы комплемента.

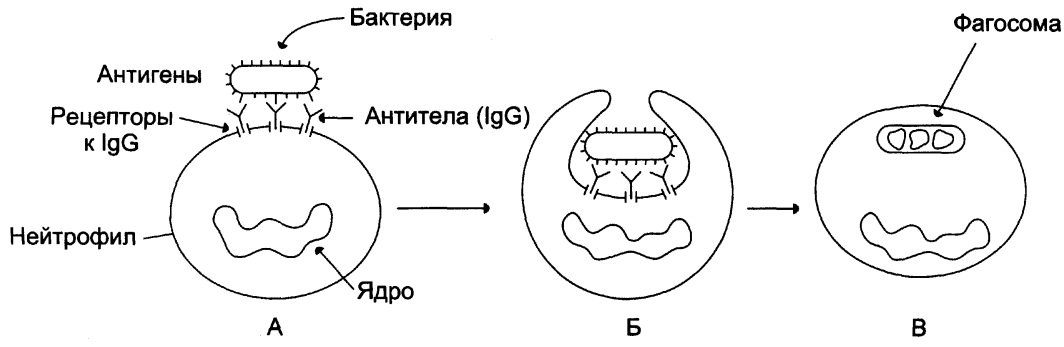


Рис. 1-48. Фагоцитоз комплекса антиген–антитело нейтрофилом. А – взаимодействие бактерии, покрытой IgG, с рецепторами нейтрофилов; Б – поглощение бактерии нейтрофилом; В – переваривание бактерии внутри фагосомы нейтрофила.

$IgGg_4$). Степень гомологии между этими подклассами очень высока (около 90–95%).

IgG не только эффективно связывают и инактивируют чужеродные молекулы и клетки, попавшие в организм, но также облегчают их дальнейшее уничтожение. Конформационные изменения в «хвостовой» области IgG после его взаимодействия с антигеном приводят к связыванию и активации белков системы комплемента. Кроме того, С-концевая область IgG способна взаимодействовать со специфическими рецепторами макрофагов и нейтрофилов, что приводит к фагоцитозу комплексов антиген–антитело и разрушению их в фагосомах (рис. 1-48).

IgG — единственный класс антител, способный проникать через плацентарный барьер и обеспечивать внутриутробную защиту плода от инфекций.

Иммуноглобулины А. Основной класс антител, присутствующий в секретах желёз организма (слюны, молока, пищеварительного сока, секретов дыхательных путей). В сыворотке крови его содержание не превышает 10–15% от общего количества иммуноглобулинов. Мономерная форма по строению напоминает IgG. Однако в секретах IgA находится в основном в форме димера, где мономеры соединены дополнительной пептидной цепью J (рис. 1-49).

На базальной поверхности эпителиальных клеток димер IgA специфически взаимодействует с белками клеточной поверхности, называемыми секреторным компонентом. Образующийся комплекс посредством эндоцитоза поглощается внутрь клетки и перемещается к апикальной части. Здесь комплекс подвергается действию протеолитических ферментов, и свободный димер высвобождается во внеклеточное пространство (рис. 1-50).

Образующийся при взаимодействии IgA с антигеном комплекс не взаимодействует с белками системы комплемента и фагоцитирующими клетками, но препятствует прикреплению антигенов к поверхности эпителиальных клеток и проникновению их в организм.

Иммуноглобулины Е. Содержание этого класса иммуноглобулинов в крови крайне мало. IgE — мономеры, но, в отличие от IgG, их тяжёлые цепи е содержат не 3, а 4 константных домена. После синтеза и секреции в кровь В-лимфоцитами IgE

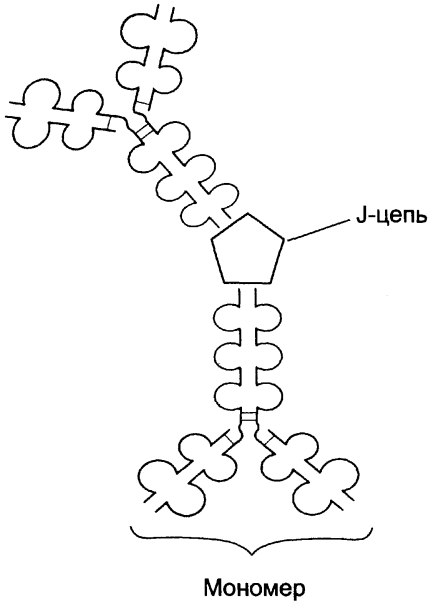


Рис. 1-49. Строение димерной молекулы иммуноглобулина А.

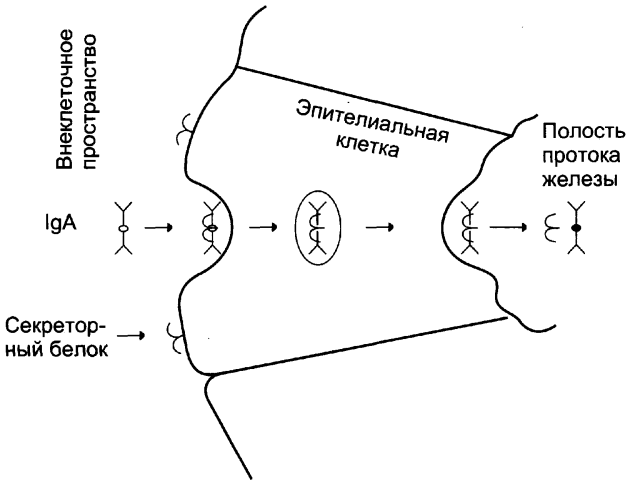


Рис. 1-50. Транспорт иммуноглобулинов А через эпителиальные клетки в протоки желёз.

связываются своими С-концевыми участками с соответствующими рецепторами на поверхности тучных клеток и базофилов. В результате они становятся рецепторами антигенов на поверхности данных клеток (рис. 1-51).

После присоединения антигена хотя бы к двум антигенсвязывающим участкам двух соседних IgE клетка получает сигнал к секреции биологически активных веществ (серотонина, гистамина), хранящихся в секреторных пузырьках. Выброс этих веществ в значительной мере ответственен за развитие воспалительной реакции, а также таких аллергических реакций, как бронхиальная астма, крапивница, сенная лихорадка. Увеличение количества IgE может предшествовать развитию аллергических реакций.

Иммуноглобулины D. IgD обнаружены в крови в очень малых количествах. Мономерные белки играют роль рецепторов В-лимфоцитов; других функций у IgD пока не выявлено.

4. Семейство Т-клеточных антигенраспознающих рецепторов

Если антитела, вырабатываемые В-лимфоцитами, связывают антигены в жидкостях организма (так называемый гуморальный иммунитет), то Т-лимфоциты взаимодействуют с антигенами на поверхности заражённых вирусами и изменённых в результате опухолевой трансформации собственных клеток организма (клеточный иммунитет). Т-лимфоциты узнают антигены только в комплексе с молекулами MHC I или II класса, также присутствующими на клеточной поверхности.

Рецепторы Т-лимфоцитов — гетеродимеры, т.е. состоят из α- и β-цепей. Каждая цепь имеет два

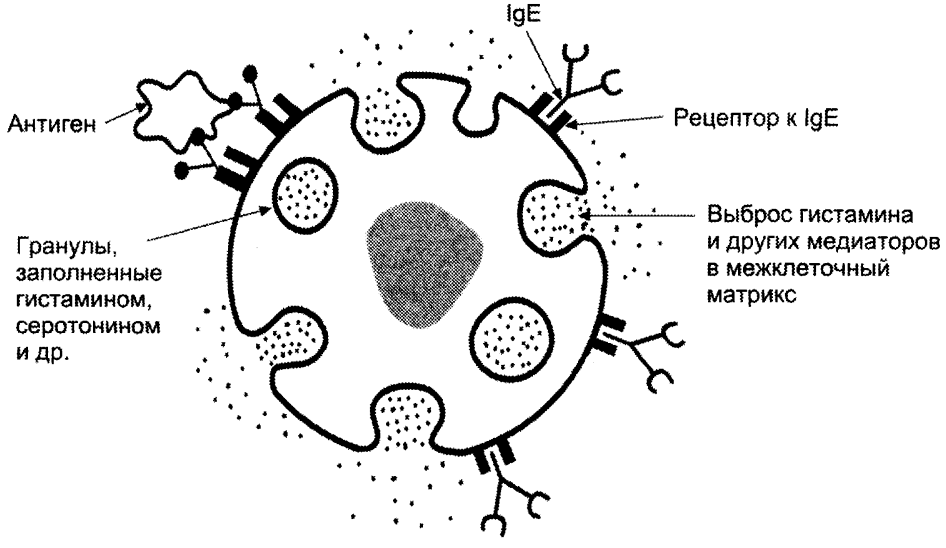


Рис. 1-51. Выброс биологически активных веществ тучной клеткой в результате присоединения антигена к фиксированным на её поверхности IgE.

иммуноглобулиноподобных домена: вариабельный (V) и константный (C) (рис. 1-52). С-концевые участки каждой цепи встроены в плазматическую мембрану. Единственный антигенсвязывающий участок располагается между двумя вариабельными доменами Vα и Vβ. Количество рецепторов Т-лимфоцитов с разными антигенсвязывающими участками сопоставимо с разнообразием иммуноглобулинов.

Семейство белков главного комплекса гистосовместимости

Белки главного комплекса гистосовместимости были открыты при изучении вопросов внутривидовой пересадки тканей, откуда и произошло их название. Их называют также белками MHC (см. выше), или белками HLA (от англ. *human lymphocyte antigen* — человеческие лимфоцитарные антигены), так как впервые они были обнаружены на лимфоцитах человека.

Существует два основных класса молекул MHC: I и II. Молекулы MHC класса I расположены на поверхности практически всех клеток организма человека, а белки MHC класса II только на определённых клетках иммунной системы, называемых антигенпредставляющими клетками. К ним, в первую очередь, относят макрофаги и В-лимфоциты, контактировавшие с антигеном.

Молекулы MHC класса I — гетеродимеры. Они имеют одну полипептидную α-цепь, связанную нековалентными связями с небольшим внеклеточным белком β_2-микроглобулином. Полипептидная α-цепь имеет три внеклеточных глобулярных домена (α_1, α_2, α_3), трансмембранный участок и карбоксильный конец, локализованный в цитоплазме (рис. 1-53, А). α_3-Домен и β_2-микроглобулин имеют конформацию, напоминающую структуру иммуноглобулинов. Домены α_1 и α_2 содержат вариабельные участки, способные связывать «развёрнутый» антиген (чаще всего пептидный фрагмент чужеродного белка), расположенный на поверхности клеток.

Молекулы MHC класса II — также гетеродимеры. Они состоят из двух полипептидных цепей — α и β, имеющих по одному консервативному иммуноглобулинподобному домену и по одному вариабельному домену на N-концевых участках. Связывание антигенов происходит в области вариабельных доменов α- и β-цепей (рис. 1-53, Б).

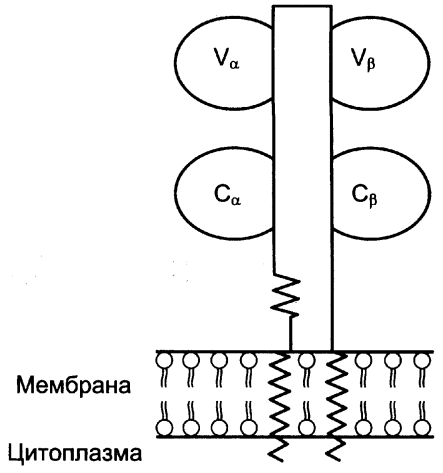


Рис. 1-52. Строение рецептора Т-лимфоцитов.

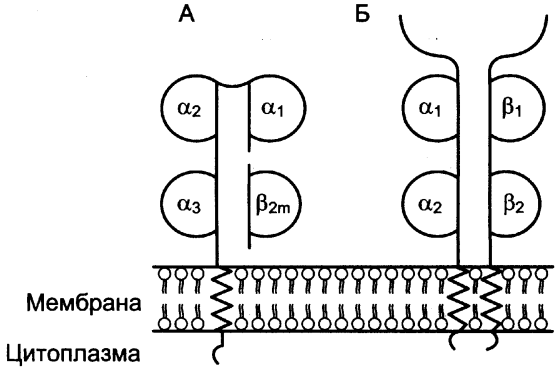


Рис. 1-53. Строение белков главного комплекса гистосовместимости: MHC класса I (А) и MHC класса II (Б).

Чужеродные белки в клетке человека (например, белки вирусных частиц), в лизосомах подвергаются ограниченному протеолизу, и небольшие фрагменты этих белков вместе с белками MHC класса I или II экспонируются на поверхности клеточной мембраны.

Комплексы пептид–белок MHC узнаются рецепторами Т-лимфоцитов. В результате происходит специфическое взаимодействие (рис. 1-54), активация Т-лимфоцита и развитие иммунной реакции. Так, взаимодействие цитотоксического Т-лимфоцита с комплексом антиген–MHC I на поверхности заражённой вирусом клетки приводит к высвобождению лимфоцитом специаль-

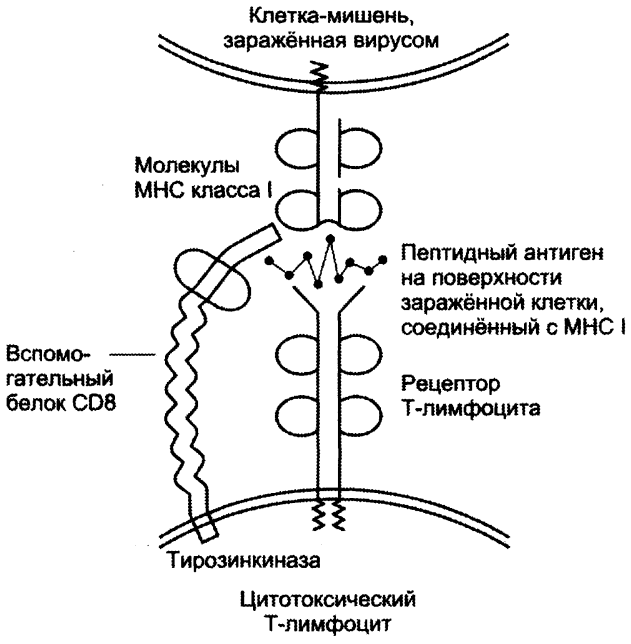


Рис. 1-54. Специфическое взаимодействие рецептора цитотоксического Т-лимфоцита с комплексом антиген–MHC I белком.

ных белков, вызывающих повреждение и гибель заражённой клетки.

Е. Изофункциональные белки

Изофункциональные белки — семейства белков, выполняющих почти одинаковую или близкую функцию, но небольшие особенности строения и функционирования некоторых членов этого семейства могут иметь важное физиологическое значение. Пример таких белков — изоформы гемоглобина человека: HbA, HbA_2, HbF и другие, рассмотренные выше. Все они представляют собой тетрамеры, но состоят из разного набора протомеров α, β, γ, δ. Гемоглобины выполняют одинаковую функцию — присоединяют O_2 и переносят его в ткани. Однако каждый из них обладает функциональными особенностями. Так, гемоглобин F имеет большее сродство к O_2, чем HbA, и благодаря этому обеспечивает диффузию O_2 от HbA из крови матери к HbF в крови плода.

Изобелки — множественные формы белка, обнаруживаемые в организмах одного вида. Белки, выполняющие одинаковые функции в организмах разных биологических видов, носят название «**гомологичные белки**». Например, цитохром С — митохондриальный белок, участвующий в биологическом окислении, присутствует у многих видов животных. Цитохромы С курицы и утки отличаются лишь двумя аминокислотными остатками в первичной структуре, выполняют одинаковую функцию, но так как они принадлежат разным видам, то их относят к гомологичным белкам.

К изобелкам относят также множество изоформ структурного белка коллагена (см. раздел 15). Многие ферменты имеют несколько изоформ и носят название изоферментов (см. раздел 2).

VII. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ И МЕТОДЫ ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ

Важное место в биохимических исследованиях занимает выделение индивидуальных белков из органов и тканей. Очищенные индивидуальные белки нужны для изучения их первичной структуры, получения кристаллов белков с целью исследования их пространственной структуры методом рентгеноструктурного анализа, установления взаимосвязи между первичной, пространственной структурой белка и его функцией.

Некоторые очищенные индивидуальные белки используют в медицине как лекарственные препараты, например гормон инсулин применяют для лечения сахарного диабета, а пищеварительные ферменты поджелудочной железы назначают при нарушении её функций в качестве заместительной терапии. Кроме того, очищенные ферменты часто используют в биохимических исследованиях в качестве химических реактивов для определения веществ в биологических жидкостях.

Большинство методов, используемых для очистки индивидуальных белков, основано на различиях их физико-химических свойств, а также возможности специфично связываться с лигандом.

А. Физико-химические свойства белков

Индивидуальные белки различаются по своим физико-химическим свойствам: форме молекул, молекулярной массе, суммарному заряду

молекулы, соотношению полярных и неполярных групп на поверхности нативной молекулы белка, растворимости белков, а также степени устойчивости к воздействию денатурирующих агентов.

1. Различия белков по форме молекул

Как уже говорилось выше, по форме молекул белки делят на глобулярные и фибриллярные. Глобулярные белки имеют более компактную структуру, их гидрофобные радикалы в большинстве своём спрятаны в гидрофобное ядро, и они значительно лучше растворимы в жидкостях организма, чем фибриллярные белки (исключение составляют мембранные белки).

2. Различия белков по молекулярной массе

Белки — высокомолекулярные соединения, но могут сильно отличаться по молекулярной массе, которая колеблется от 6000 до 1 000 000 Д и выше. Молекулярная масса белка зависит от количества аминокислотных остатков в полипептидной цепи, а для олигомерных белков — и от количества входящих в него протомеров (или субъединиц).

3. Суммарный заряд белков

Белки имеют в своём составе радикалы лизина, аргинина, гистидина, глутаминовой и аспарагиновой кислот, содержащие функциональные группы, способные к ионизации (ионогенные группы). Кроме того, на N- и С-концах полипептидных цепей имеются α-амино- и α-карбоксильная группы, также способные к ионизации. Суммарный заряд белковой молекулы зависит от соотношения ионизированных анионных радикалов Глу и Асп и катионных радикалов Лиз, Арг и Гис.

Степень ионизации функциональных групп этих радикалов зависит от pH среды. При pH раствора около 7 все ионогенные группы белка находятся в ионизированном состоянии. В кислой среде увеличение концентрации протонов (H^+) приводит к подавлению диссоциации карбоксильных групп и уменьшению отрицательного заряда белков: $-COO^- + H^+ \rightarrow -COOH$. В щелочной среде связывание избытка OH^- с протонами, образующимися при диссоциации NH_3^+ с образованием воды, приводит к уменьшению положительного заряда белков:

$$-NH_3^+ + OH^- \rightarrow -NH_2 + H_2O.$$

Значение pH, при котором белок приобретает суммарный нулевой заряд, называют «**изоэлектрическая точка**» и обозначают как pI. В изоэлектрической точке количество положительно и отрицательно заряженных групп белка одинаково, т.е. белок находится в изоэлектрическом состоянии.

Так как большинство белков в клетке имеет в своём составе больше анионогенных групп ($-COO^-$), то изоэлектрическая точка этих белков лежит в слабокислой среде. Изоэлектрическая точка белков, в составе которых преобладают катионогенные группы, находится в щелочной среде. Наиболее яркий пример таких внутриклеточных белков, содержащих много аргинина и лизина, — гистоны, входящие в состав хроматина.

Белки, имеющие суммарный положительный или отрицательный заряд, лучше растворимы, чем белки, находящиеся в изоэлектрической точке. Суммарный заряд увеличивает количество диполей воды, способных связываться с белковой молекулой, и препятствует контакту одноимённо заряженных молекул, в результате растворимость белков увеличивается. Заряженные белки могут двигаться в электрическом поле: анионные белки, имеющие отрицательный заряд, будут двигаться к положительно заряженному аноду (+), а катионные белки — к отрицательно заряженному катоду (−). Белки, находящиеся в изоэлектрическом состоянии, не перемещаются в электрическом поле.

4. Соотношение полярных и неполярных групп на поверхности нативных молекул белков

На поверхности большинства внутриклеточных белков преобладают полярные радикалы, однако соотношение полярных и неполярных групп отлично для разных индивидуальных белков. Так, протомеры олигомерных белков в области контактов друг с другом часто содержат гидрофобные радикалы. Поверхности белков, функционирующих в составе мембран или прикрепляющиеся к ним в процессе функционирования, также обогащены гидрофобными радикалами. Такие белки лучше растворимы в липидах, чем в воде.

5. Растворимость белков

Растворимость белков в воде зависит от всех перечисленных выше свойств белков: формы, молекулярной массы, величины заряда, соотношения полярных и неполярных функциональных групп на поверхности белка. Кроме этого, растворимость белка определяется составом растворителя, т.е. наличием в растворе других растворённых веществ. Например, некоторые белки легче растворяются в слабом солевом растворе, чем в дистиллированной воде. С другой стороны, увеличение концентрации нейтральных солей может способствовать выпадению определённых белков в осадок. Денатурирующие агенты, присутствующие в растворе, также снижают растворимость белков.

Б. Методы выделения и очистки белков

Получение индивидуальных белков из биологического материала (тканей, органов, клеточных культур) требует проведения последовательных операций, включающих:

- дробление биологического материала и разрушение клеточных мембран;
- фракционирование органелл, содержащих те или иные белки;
- экстракцию белков (перевод их в растворённое состояние);
- разделение смеси белков на индивидуальные белки.

1. Методы разрушения тканей и экстракции белков

Для разрушения биологического материала используют методы: гомогенизации ткани, метод попеременного замораживания и оттаивания, а также обработку клеток ультразвуком.

Гомогенизация биологического материала

Ткань, находящуюся в буферном растворе с определённым значением pH и концентрацией солей, помещают в стеклянный сосуд (гомогенизатор) с пестиком. Вращающийся пестик измельчает и растирает ткань о притёртые стенки сосуда.

Метод замораживания и оттаивания ткани

В результате попеременного замораживания и оттаивания образующиеся кристаллы льда разрушают оболочки клеток.

После разрушения ткани нерастворимые части осаждают центрифугированием. Последующее центрифугирование гомогената с разной скоростью позволяет получить отдельные фракции, содержащие клеточные ядра, митохондрии и другие органеллы, а также надосадочную жидкость, в которой находятся растворимые белки цитозоля клетки. Искомый белок будет содержаться в одной из этих фракций.

Экстракция белков, связанных с мембранами, и разрушение олигомерных белков на протомеры

Если искомый белок прочно связан с какими-либо структурами клетки, его необходимо перевести в раствор. Так, для разрушения гидрофобных взаимодействий между белками и липидами мембран в раствор добавляют детергенты; чаще всего используют тритон X-100 или додецилсульфат натрия.

Механизм действия детергентов описан в разделе «Денатурация белков» (см. рис. 1-15). При действии детергентов обычно разрушаются и гидрофобные взаимодействия между протомерами в олигомерных белках.

Удаление из раствора небелковых веществ

Нуклеиновые кислоты, липиды и другие небелковые вещества можно удалить из раствора, используя их особенные физико-химические свойства. Так, липиды легко удаляются из раствора добавлением органических растворителей, например ацетона. Однако воздействие должно быть кратковременным, так как ацетон вызывает денатурацию некоторых белков. Нуклеиновые кислоты осаждают добавлением в раствор стрептомицина.

2. Методы очистки белков

Наиболее трудоёмкий этап получения индивидуальных белков — их очистка от других белков, находящихся в растворе, полученном из данной ткани. Часто изучаемый белок присутствует в небольших количествах, составляющих доли процента от всех белков раствора.

Так как белки обладают конформационной лабильностью, при работе с белками следует избегать денатурирующих воздействий, поэтому выделение и очистка белков происходят при низких температурах.

На первых стадиях очистки белков целесообразно использовать методы, учитывающие какую-либо характерную особенность данного белка, например термостабильность или устойчивость в кислых растворах. Первыми методами очистки необходимо удалить из раствора основную массу балластных белков, которые значительно отличаются от выделяемого белка физико-химическими свойствами. Впоследствии применяют всё более тонкие методы очистки белка.

Очистка белков избирательной денатурацией

Большинство белков денатурирует и выпадает в осадок уже при кратковременном нагревании раствора до 50–70 °С или подкислении раствора до pH 5. Если выделяемый белок выдерживает эти условия, то с помощью избирательной денатурации можно удалить большую часть посторонних белков, отфильтровав выпавшие в осадок белки, или осадить их центрифугированием.

Высаливание

Метод очистки белков, основанный на различиях в их растворимости при разной концентрации соли в растворе. Соли щелочных и щёлочно-земельных металлов вызывают обратимое осаждение белков, т.е. после их удаления белки вновь приобретают способность растворяться, сохраняя при этом свои нативные свойства.

Чаще всего для разделения белков методом высаливания используют разные концентрации солей сульфата аммония — $(NH_4)_2SO_4$. Чем выше растворимость белка, тем большая концентрация соли необходима для его высаливания.

Гель-фильтрация, или метод молекулярных сит

Для разделения белков часто используют хроматографические методы, основанные на распределении веществ между двумя фазами, одна из которых подвижная, а другая неподвижная. В основу хроматографических методов положены разные принципы: гель-фильтрации, ионного обмена, адсорбции, биологического сродства.

Метод разделения белков с помощью гель-фильтрационной хроматографии основан на том, что вещества, отличающиеся молекулярной массой, по-разному распределяются между неподвижной и подвижной фазами. Хроматографическая колонка заполняется гранулами пористого вещества (сефадекс, агароза и др.). В структуре полисахарида образуются поперечные связи и формируются гранулы с «порами», через которые легко проходят вода и низкомолекулярные вещества. В зависимости от условий можно формировать гранулы с разной величиной «пор».

Неподвижная фаза — жидкость внутри гранул, в которую способны проникать низкомолекулярные вещества и белки с небольшой молекулярной массой. Смесь белков, нанесённую на хроматографическую колонку, вымывают (элюируют), пропуская через колонку растворитель. Вместе с фронтом растворителя движутся и самые крупные молекулы.

Более мелкие молекулы диффундируют внутрь гранул сефадекса и на некоторое время попадают в неподвижную фазу, в результате чего их движение задерживается. Величина пор определяет размер молекул, способных проникать внутрь гранул (рис. 1-55).

Так как гелевая структура сефадекса легко деформируется под давлением, гели стали заменять более жёсткими матрицами (сефактил, тойоперл), представляющими сферические гранулы с разными размерами пор. Выбор размеров пор в гранулах зависит от целей хроматографии (о других хроматографических методах будет сказано ниже).

Ультрацентрифугирование

Метод разделения также основан на различии в молекулярных массах белков. Скорость седиментации веществ в процессе вращения в ультрацентрифуге, где центробежное ускорение достигает 100 000–500 000 g, пропорционально их молекулярной массе. На поверхность буферного раствора, помещённого в кювету, наносят тонкий слой смеси белков. Кювету помещают в ротор ультрацентрифуги. При вращении ротора в течение 10–12 ч более крупные молекулы (с большей молекулярной массой) оседают в буферном растворе с большей скоростью. В результате в кювете происходит расслоение смеси белков на отдельные фракции с разной молекулярной массой (рис. 1-56). После расслоения белковых фракций дно кюветы прокалывают иглой и по каплям собирают содержимое небольшими порциями в пробирки.

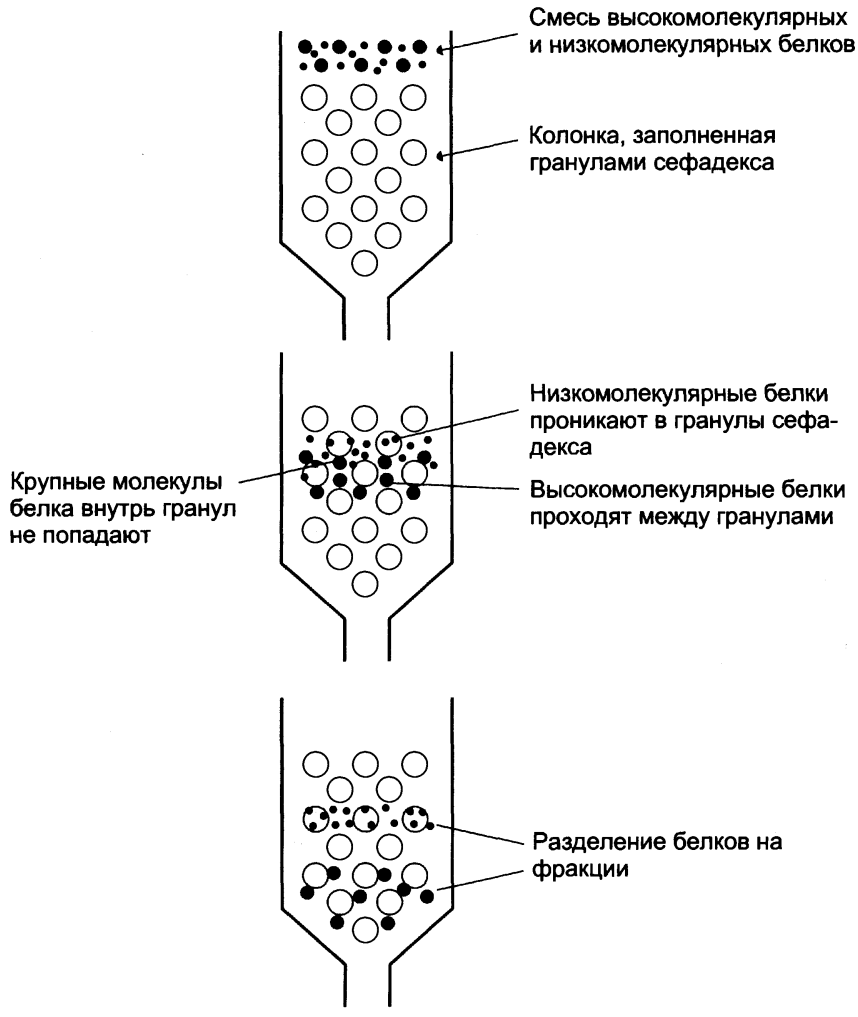


Рис. 1-55. Разделение смеси белков методом гель-фильтрации.

Рис. 1-56. Кювета, заполненная буферным раствором с разделёнными белковыми фракциями.

Электрофорез белков

Метод основан на том, что при определённом значении pH и ионной силы раствора белки двигаются в электрическом поле со скоростью, пропорциональной их суммарному заряду. Белки, имеющие суммарный отрицательный заряд, двигаются к аноду (+), а положительно заряженные белки — к катоду (−).

Электрофорез проводят на различных носителях: бумаге, крахмальном геле, полиакриламидном геле и др. В отличие от электрофореза на бумаге, где скорость движения белков пропорциональна только их суммарному заряду, в полиакриламидном геле скорость движения белков пропорциональна их молекулярным массам.

Разрешающая способность электрофореза в полиакриламидном геле выше, чем на бумаге. Так,

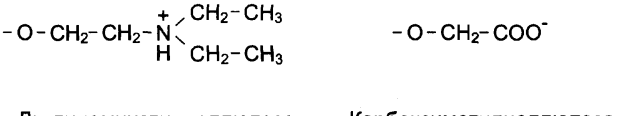
при электрофорезе белков сыворотки крови человека на бумаге обнаруживают только 5 главных фракций: альбумины, α_1-глобулины, α_2-глобулины, β-глобулины и γ-глобулины (рис. 1-57). Электрофорез тех же белков в полиакриламидном геле позволяет получить до 18 различных фракций. Для обнаружения белковых фракций полоски бумаги или столбики геля обрабатывают красителем (чаще всего бромфеноловым синим или амидовым чёрным). Окрашенный комплекс белков с красителем выявляет расположение различных фракций на носителе.

Ионообменная хроматография

Так же как и электрофорез, метод основан на разделении белков, различающихся суммарным зарядом при определённых значениях pH и ионной силы раствора. При пропускании раствора белков через хроматографическую колонку, заполненную твёрдым пористым заряженным материалом, часть белков задерживается на нём в результате электростатических взаимодействий.

В качестве неподвижной фазы используют ионообменники — полимерные органические вещества, содержащие заряженные функциональные группы.

Различают положительно заряженные анионообменники, среди которых наиболее часто используют диэтиламиноэтилцеллюлозу (ДЭАЭ-целлюлозу), содержащую катионные группы, и отрицательно заряженные катионообменники, например карбоксиметилцеллюлозу (КМ-целлюлозу), содержащую анионные группы.



Диэтиламинэтилцеллюлоза Карбоксиметилцеллюлоза

Выбор ионообменника определяется зарядом выделяемого белка. Так, для выделения отрицательно заряженного белка используют анионообменник. При пропускании раствора белка через колонку прочность связывания белка с анионообменником зависит от количества отрицательно заряженных карбоксильных групп в молекуле. Белки, адсорбированные на анионообменнике, можно смыть (элюировать) буферными растворами с различной концентрацией соли, чаще всего NaCl, и разными значениями pH. Ионы хлора связываются с положительно заряженными функциональными группами анионообменника и вытесняют карбоксильные группы белков. При низких концентрациях соли элюируются белки, слабо связанные с анионообменником. Постепенное увеличение концентрации соли или изменение pH, что меняет заряд белковой молекулы, приводит к выделению белковых фракций, в одной из которых находится искомый белок.

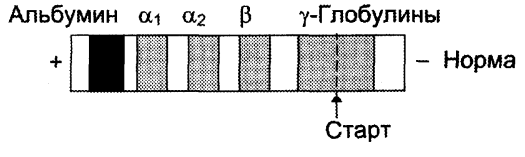


Рис. 1-57. Электрофорез белков сыворотки крови здорового человека на бумаге.

Аффинная хроматография, или хроматография по сродству

Это наиболее специфичный метод выделения индивидуальных белков, основанный на избирательном взаимодействии белков с лигандами, прикреплёнными (иммобилизированными) к твёрдому носителю. В качестве лиганда может быть использован субстрат или кофермент, если выделяют какой-либо фермент, антигены для выделения антител и т.д. Через колонку, заполненную иммобилизованным лигандом, пропускают раствор, содержащий смесь белков. К лиганду присоединяется только белок, специфично взаимодействующий с ним; все остальные белки выходят с элюатом (рис. 1-58). Белок, адсорбированный на колонке, можно снять, промыв её раствором с изменённым значением pH или изменённой ионной силой. В некоторых случаях используют раствор детергента, разрывающий гидрофобные связи между белком и лигандом.

Аффинная хроматография отличается высокой избирательностью и помогает очистить выделяемый белок в тысячи раз.

3. Очистка белков от низкомолекулярных примесей

Для удаления низкомолекулярных соединений, в частности сульфата аммония после высаливания, применяют диализ. Метод основан на том, что через полупроницаемую мембрану,

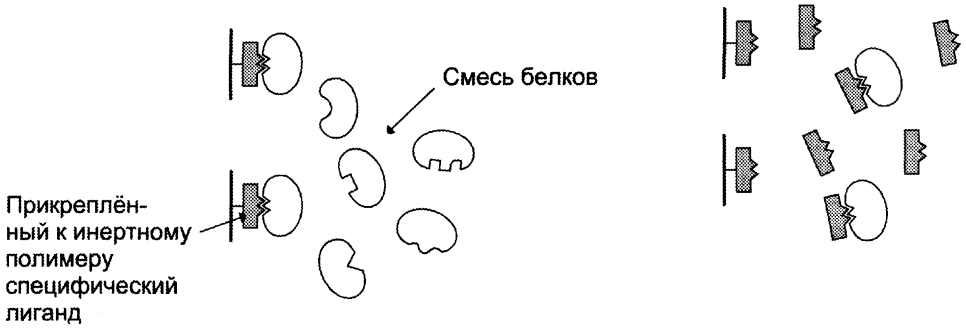


Рис. 1-58. Аффинная хроматография.

пропускающую низкомолекулярные вещества, не проходят белки, имеющие более высокую молекулярную массу. В стакан большой ёмкости (около 1 л) с буферным раствором помещают полупроницаемый мешочек, заполненный раствором белка с солью.

Скорость выхода соли из мешочка в буферный раствор пропорциональна градиенту его концентраций по обе стороны от мембраны. По мере выхода соли из мешочка буферный раствор в стакане меняют.

Для очистки белков от низкомолекулярных примесей используют также метод гель-фильтрации (см. выше).

Для определения частоты (гомогенности) выделенного белка применяют методы с высокой разрешающей способностью, например электрофорез в полиакриламидном геле, высокоэффективная хроматография высокого давления. От чистоты лекарственного белкового препарата зависят его биологическая эффективность и аллергенность (т.е. способность вызывать аллергические реакции). Чем качественнее очищен препарат, тем меньше вероятность осложнений при его применении.

VIII. ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ОРГАНИЗМА

Белковый состав организма здорового взрослого человека относительно постоянен, хотя возможны изменения количества отдельных белков в органах и тканях в зависимости от состава пищи и режима питания, от физиологической активности человека, биологических ритмов.

А. Изменение белкового состава клеток в процессе их дифференцировки

В процессе развития многоклеточного организма, особенно на стадиях дифференцировки клеток, белковый состав значительно изменяется. Для каждого типа специализированных клеток характерно появление специфических белков, которые определяют особенности их биологических функций. Так, только в эритроцитах есть гемоглобин, осуществляющий транспорт кислорода к тканям, а в клетках сетчатки глаза — белок родопсин, необходимый для улавливания фотонов света. Кроме того, специализированные клетки отличаются и количеством белков, присутствующих практически во всех или во многих клетках организма.

При различных заболеваниях происходит изменение белкового состава тканей. Эти изменения называются протеинопатиями. Различают наследственные и приобретённые протеинопатии.

Б. Наследственные протеинопатии

Наследственные протеинопатии развиваются в результате повреждений в генетическом аппарате данного индивидуума. Какой-либо белок не синтезируется вовсе или синтезируется, но его первичная структура изменена. Примеры наследственных протеинопатий — гемоглобинопатии, рассмотренные выше. В зависимости от роли дефектного белка в жизнедеятельности организма, от степени нарушения конформации и функции белков, от гомо- или гетерозиготности индивидуума по этому белку наследственные протеинопатии могут вызывать

болезни, протекающие с различной степенью тяжести, вплоть до летального исхода ещё до рождения или в первые месяцы после рождения.

В. Приобретенные протеинопатии

Любая болезнь сопровождается изменением белкового состава организма, т.е. развивается приобретённая протеинопатия. При этом первичная структура белков не нарушается, а обычно происходит количественное изменение белков, особенно в тех органах и тканях, в которых развивается патологический процесс. Например, при панкреатитах снижается выработка ферментов, необходимых для переваривания пищевых веществ в ЖКТ.

В некоторых случаях приобретённые протеинопатии развиваются в результате изменения условий, в которых функционируют белки. Так, при изменении pH среды в щелочную сторону (алкалозы различной природы) изменяется конформация гемоглобина, увеличивается его сродство к O_2 и снижается доставка O_2 тканям (гипоксия тканей).

Иногда в результате болезни повышается уровень метаболитов в клетках и сыворотке крови, что приводит к модификации некоторых белков и нарушению их функции. Так, повышенные концентрации глюкозы в крови при сахарном диабете приводят к неферментативному присоединению её к белкам (гликозилированию белков). Примером может служить повышение уровня гликозилированного гемоглобина в эритроцитах, что увеличивает его сродство к O_2 и снижает транспорт O_2 в ткани. Гликозилирование белков хрусталика глаза (кристаллинов) приводит к его помутнению и развитию катаракты.

Кроме того, из клеток повреждённого органа в кровь могут выходить белки, которые в норме определяются там лишь в следовых количествах. При различных заболеваниях часто используют биохимические исследования белкового состава крови для уточнения клинического диагноза. Например, при панкреатите в крови повышается активность панкреатической амилазы (фермента, участвующего в расщеплении крахмала), которая в норме не должна попадать в кровь, а по протоку поджелудочной железы выделяется при пищеварении в двенадцатиперстную кишку (см. раздел 2).

В некоторых случаях биохимические данные об изменении белкового состава крови или мочи могут стать ведущими при постановке диагноза. Например, при миеломе (злокачественном перерождении плазматических клеток, синтезирующих иммуноглобулины) в крови и моче появляются белки Бенс-Джонса, которые в низких концентрациях присутствуют и в крови здоровых людей. Эти белки представляют собой лёгкие цепи иммуноглобулина G, синтез которых усиливается в злокачественно перерождённых клетках.

РАЗДЕЛ 2

ЭНЗИМОЛОГИЯ

Основу жизнедеятельности любого организма составляют химические процессы. Практически все реакции в живом организме протекают с участием природных биокатализаторов, называемых ферментами, или энзимами. Среди множества энергетически возможных реакций ферменты избирательно преобразуют реагенты, называемые субстратами, по физиологически полезному пути. Таким образом, ферменты управляют всеми метаболическими процессами организма.

В научной литературе на русском языке утвердились оба термина: «ферменты» и «энзимы», но предпочтение отдают термину «фермент», хотя наука о ферментах называется энзимология. Слово «фермент» происходит от лат. *fermentum* — закваска, а «энзим» — от греч. *en* — в, внутри и *zyme* — дрожжи. Данная терминология возникла исторически при изучении ферментативных процессов спиртового брожения.

Становление энзимологии как науки произошло в начале XIX века. Активное её развитие продолжается до настоящего времени. В задачи этой науки входят определение роли отдельных ферментов в ускорении химических реакций, протекающих в организме, выделение и очистка ферментов, установление их структуры, исследование механизма действия, изучение кинетических характеристик и особенностей регуляции активности *in vivo*.

Для практической медицины важность энзимологии обусловлена тем, что она даёт фармакологам инструмент направленного изменения метаболизма клетки путём воздействия определёнными химическими веществами на активность ферментов. Огромное количество фармацевтических препаратов — ингибиторы ферментов. Другая, не менее важная задача энзимологии для практической медицины — использование методов определения активности ферментов в биологических жидкостях для диагностики заболеваний. Кроме того, выделенные и очищенные ферменты могут использоваться в качестве терапевтических средств.

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ КАК БИОЛОГИЧЕСКИХ КАТАЛИЗАТОРОВ

Ферменты, как было установлено ещё в 1922 г., являются белками. Их роль уникальна: они увеличивают скорость протекания химической реакции, однако при этом не расходуются. В 1926 г. был впервые очищен и выделен в виде белковых кристаллов фермент уреаза, катализирующий реакции расщепления мочевины до аммиака и диоксида углерода. К настоящему времени в кристаллическом виде получены сотни различных ферментов, расшифрованы их аминокислотные последовательности, изучается их роль в метаболических превращениях.

В роли биокатализаторов могут выступать и небелковые соединения. Например, некоторые типы РНК вызывают гидролиз фосфодиэфирных связей нуклеиновых кислот. Такие молекулы РНК с каталитической активностью называют рибозимами, однако их значение в химическом превращении соединений намного меньше, чем у ферментов.

Поскольку ферменты — белковые молекулы, следовательно, они обладают всеми свойствами, характерными для белков. В то же время они имеют особенности строения, характеризующие их как катализаторы. Рассмотрим основные свойства ферментов как биологических катализаторов.

А. Специфичность

Биологическая функция фермента, как и любого белка, обусловлена наличием в его структуре активного центра. Лиганд, взаимодействующий с активным центром фермента, называют субстратом. В активном центре фермента есть аминокислотные остатки, функциональные группы которых обеспечивают связывание субстрата, и аминокислотные остатки, функциональные группы которых осуществляют химическое превращение субстрата. Условно эти группы обозначают как участок связывания субстрата и каталитический участок, однако следует помнить, что не всегда эти участки имеют чёткое пространственное разделение и иногда могут «перекрываться» (рис. 2-1).

В участке связывания субстрат при помощи нековалентных связей взаимодействует (связывается) с ферментом, формируя фермент-субстратный комплекс. В каталитическом участке субстрат претерпевает химическое превращение в продукт, который затем высвобождается из активного центра фермента. Схематично процесс катализа можно представить следующим уравнением:

$$E + S \leftrightarrow ES \leftrightarrow EP \leftrightarrow E + P,$$

где E — фермент (энзим), S — субстрат, P — продукт. Данные обозначения общеприняты и происходят от английских слов *enzyme*, *substrat*, *product*.

Специфичность — наиболее важное свойство ферментов, определяющее биологическую значимость этих молекул. Различают субстратную и каталитическую специфичности фермента, определяемые строением активного центра (рис. 2-2).

1. Субстратная специфичность

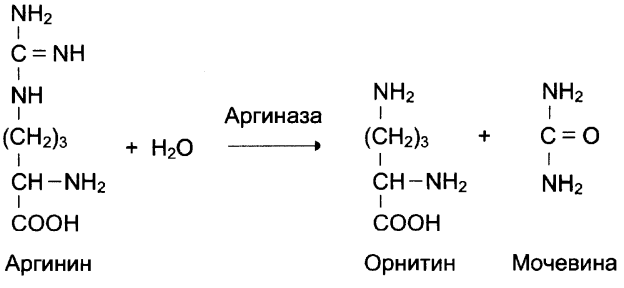
Под субстратной специфичностью понимают способность каждого фермента взаимодействовать лишь с одним или несколькими определёнными субстратами. Различают:

- абсолютную субстратную специфичность;
- групповую субстратную специфичность;
- стереоспецифичность.

Абсолютная субстратная специфичность

Активный центр ферментов, обладающих абсолютной субстратной специфичностью, комплементарен только одному субстрату. Следует отметить, что таких ферментов в живых организмах мало.

Пример фермента с абсолютной субстратной специфичностью — аргиназа, катализирующая реакцию расщепления аргинина до мочевины и орнитина:



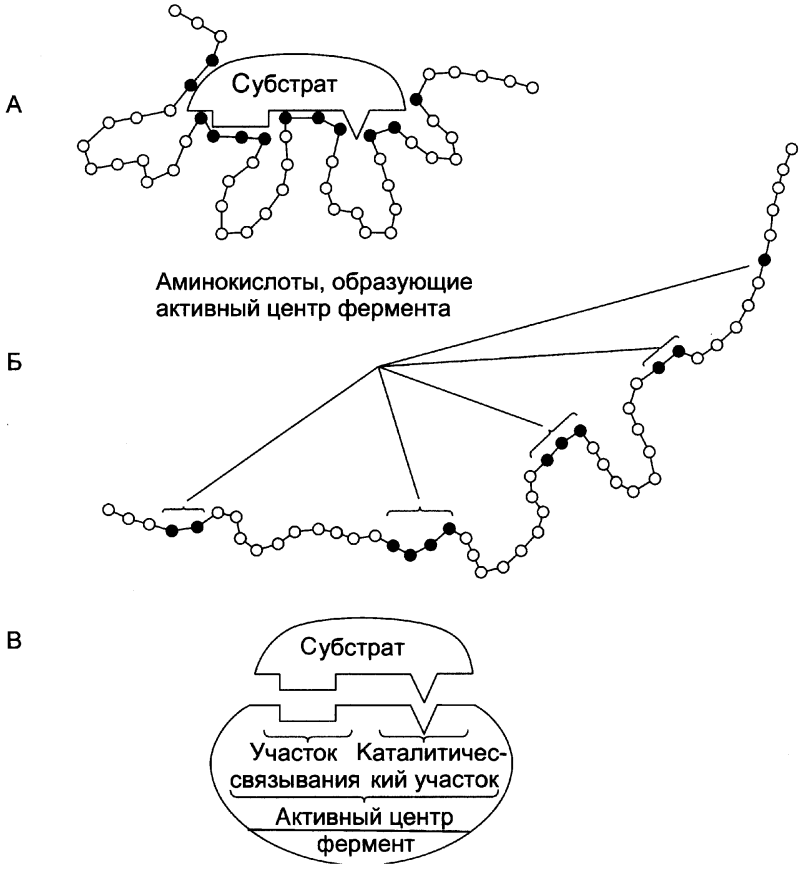
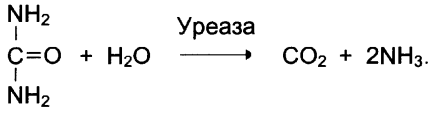


Рис. 2-1. Строение активного центра фермента. А – присоединение субстрата к ферменту в активном центре; Б – положение аминокислотных остатков, формирующих активный центр фермента, в первичной структуре белка; В – активный центр фермента условно разделяется на участок связывания и каталитический участок. Участок связывания представлен радикалами аминокислот, функциональные группы которых обеспечивают связывание субстрата. Каталитический участок образован радикалами аминокислотных остатков, функциональные группы которых обеспечивают химическое превращение субстрата.

Другой пример фермента с абсолютной субстратной специфичностью — уреаза, катализирующая гидролиз мочевины до диоксида углерода и аммиака.



Групповая субстратная специфичность

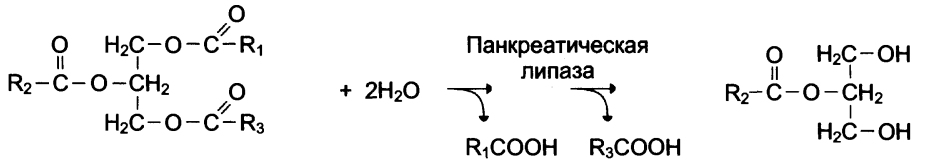
Большинство ферментов катализирует однотипные реакции с небольшим количеством (группой) структурно похожих субстратов.

Так, фермент панкреатическая липаза катализирует гидролиз жиров в двенадцатиперстной кишке человека, катализируя превращение любой молекулы жира (триацилглицерола) до молекулы моноацилглицерола и двух молекул высших жирных кислот. Панкреатическая липаза гидролизует эфирную связь у α-атомов углерода глицерола, независимо от того, какие жирные кислоты входят в состав молекулы жира (см. схему на с. 4).

Большинство протеолитических ферментов, осуществляющих гидролиз белков, имеет групповую субстратную специфичность, гидролизуя пептидные связи, образованные разными аминокислотами.

Стереоспецифичность

При наличии у субстрата нескольких стереоизомеров фермент проявляет абсолютную спе-



Триацилглицерол

2-Моноацилглицерол

Схема

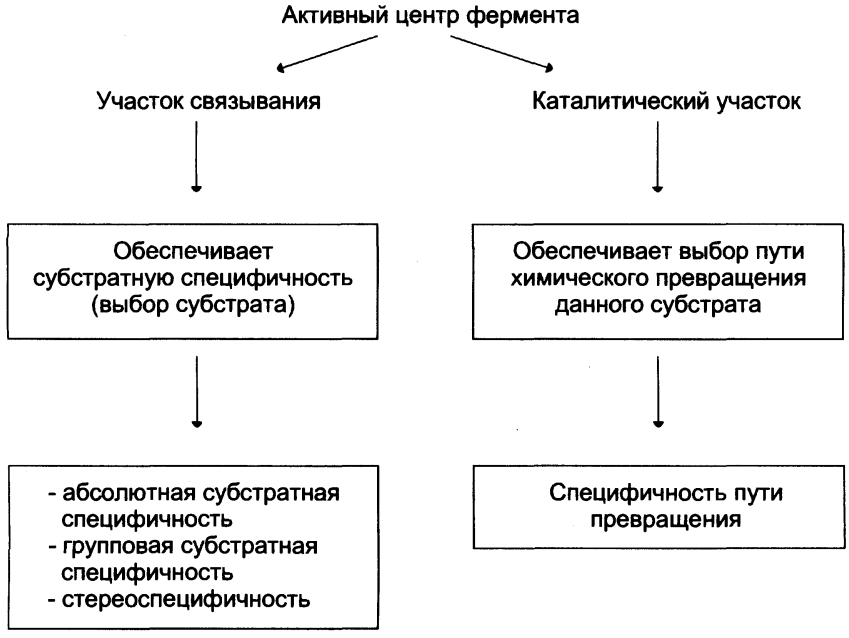
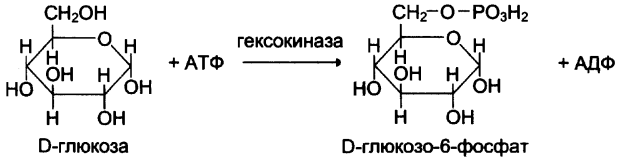


Рис. 2-2. Функциональная значимость отдельных участков активного центра фермента.

цифичность к одному из них. В организме человека наблюдают специфичность ферментов к следующим стереоизомерам.

Стереоспецифичность к D-сахарам. Большинство моносахаридов и продуктов их обмена в организме человека и других млекопитающих относят к D-стереоизомерам. Ферменты, осуществляющие их метаболизм, имеют специфичность к D-, а не к L-сахарам.

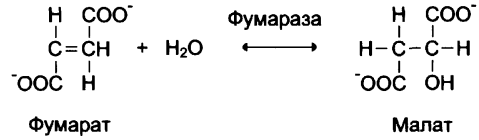


D-глюкоза

D-глюкозо-6-фосфат

Стереоспецифичность к L-аминокислотам. Белки человека состоят из аминокислот L-ряда. Большинство ферментов, обеспечивающих превращение аминокислот, имеет стереоспецифичность к L-аминокислотам.

Стереоспецифичность к цис-транс-изомерам. Фермент фумараза оказывает действие только на фумарат. Малеинат (цис-изомер фумарата) не является субстратом фумаразы.



Фумарат

Малат

Малеинат

Исключение составляют только ферменты эпимеразы (рацемазы), катализирующие превращение оптических изомеров.

Стереоспецифичность к α- и β-гликозидным связям. Фермент амилаза действует только на α-гликозидные связи, что позволяет гидролизовать крахмал и гликоген (полимеры глюкозы), остатки глюкозы в которых соединены α-гликозидными связями. Целлюлоза — также полимер глюкозы, однако остатки глюкозы в нём связаны β-гликозидными связями. В результате отсутствия у человека ферментов, специфичных к β-гликозидной связи, целлюлоза не гидролизуется в кишечнике человека и не может служить источником глюкозы.

2. Каталитическая специфичность

Фермент катализирует превращение присоединённого субстрата по одному из возможных путей его превращения. Это свойство обеспечивается строением каталитического участка активного центра фермента и называется каталитической специфичностью, или специфичностью пути превращения субстрата. Так, молекула глюкозо-6-фосфата в клетках печени человека — субстрат 4 различных ферментов: фосфоглюкомутазы, глюкозо-6-фосфатфосфатазы, фосфоглюкоизомеразы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Однако из-за особенностей строения каталитических участков этих ферментов происходит различное превращение этого соединения с образованием 4 различных продуктов (см. схему ниже).

Б. Каталитическая эффективность

Большинство катализируемых ферментами реакций высокоэффективны, они протекают в 10^8—10^{14} раз быстрее, чем некатализируемые реакции. Каждая молекула фермента способна за секунду трансформировать от 100 до 1000 молекул субстрата в продукт.

Количество молекул субстрата, превращённых в продукт с помощью одной молекулы фермента за 1 с, называют числом оборотов фермента, или молярной активностью.

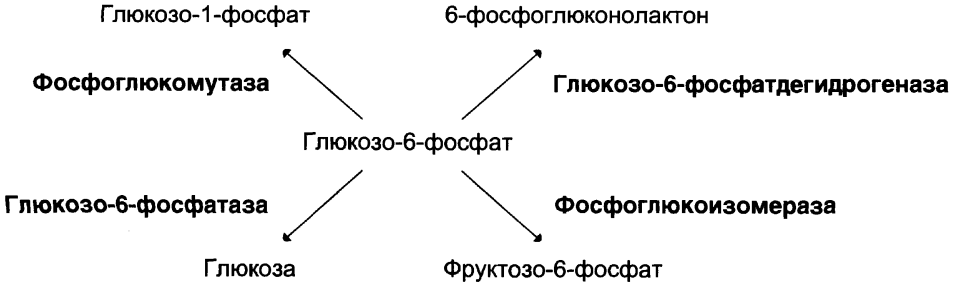
В. Лабильность ферментов

Каталитическая эффективность фермента, как и любой белковой молекулы, зависит от его конформации, и в частности от конформации активного центра.

Для ферментов характерна конформационная лабильность — способность к небольшим изменениям нативной конформации вследствие разрыва слабых связей. Поэтому воздействие денатурирующих агентов, способных изменять конформацию молекулы фермента, приводит к изменению конформации активного центра и снижению способности присоединять субстрат. В результате этого уменьшается каталитическая эффективность фермента.

Г. Способность ферментов к регуляции

Активность ферментов в клетке зависит от количества молекул субстрата, продукта, наличия кофакторов и коферментов. Действие ферментов в клетке, как правило, строго упорядочено: продукт одной ферментативной реакции является субстратом другой, образуя таким образом «метаболические пути». Среди множества ферментов практически каждого метаболического пути различают ключевые, или регуляторные, ферменты, активность которых может изменяться в зависимости от потребности клетки в конечном продукте метаболического пути. Регуляторные ферменты расположены, как правило, в начале и/или в месте разветвления метаболического пути. Они катализируют либо



самые медленные (скорость-лимитирующие реакции), либо необратимые реакции. Подробно о том, как осуществляется контроль метаболизма путём регуляции активности ферментов, описано в подразделе VII.

II. КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

Каждый фермент имеет 2 названия. Первое — короткое, так называемое рабочее, удобное для повседневного использования. Второе (более полное) — систематическое, применяемое для однозначной идентификации фермента.

А. Рабочее название

В названии большинства ферментов содержится суффикс «аза», присоединённый к названию субстрата реакции, например уреаза, сахараза, липаза, нуклеаза или к названию химического превращения определённого субстрата, например лактатдегидрогеназа, аденилатциклаза, фосфоглюкомутаза, пируваткарбоксилаза. Согласно российской классификации ферментов (КФ), названия ферментов пишутся слитно. Однако в употреблении сохранился ряд тривиальных, исторически закреплённых названий ферментов, которые не дают представления ни о субстрате, ни о типе химического превращения, например трипсин, пепсин, ренин, тромбин.

Б. Классы ферментов

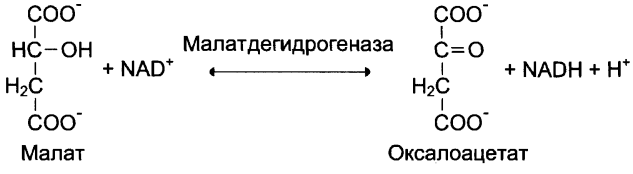
Международный союз биохимии и молекулярной биологии в 1961 г. разработал систематическую номенклатуру, согласно которой все ферменты разбиты на 6 основных классов в зависимости от типа катализируемой химической реакции. Каждый класс состоит из многочисленных подклассов и подподклассов с учётом преобразуемой химической группы субстрата, донора и акцептора преобразуемых группировок, наличия дополнительных молекул и т.д. Каждый из 6 классов имеет свой порядковый номер, строго закреплённый за ним.

1. Оксидоредуктазы

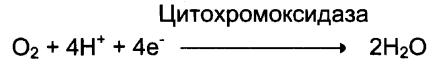
Катализируют различные окислительно-восстановительные реакции с участием 2 субстратов (перенос e^- или атомов водорода с одного субстрата на другой).

Систематическое наименование ферментов составляют по формуле «донор: акцептор—оксидоредуктаза», рабочее — субстрат—подкласс оксидоредуктаз.

Дегидрогеназы. В этот подкласс входят ферменты, катализирующие реакции дегидрирования (отщепления водорода). В качестве акцепторов электронов используются коферменты NAD^+, $NADP^+$, FAD, FMN (см. ниже). Все ферменты этой группы обладают высокой субстратной специфичностью. Пример реакции:



Оксидазы. Акцептором электрона служит молекулярный кислород. Пример реакции, катализируемой цитохромоксидазой:



Оксигеназы (гидроксилазы) — атом кислорода из молекулы кислорода присоединяется к субстрату. Пример реакции:

2. Трансферазы

Катализируют перенос функциональных групп от одного соединения к другому. Подразделяют в зависимости от переносимой группы.

Название этих ферментов составляют по формуле «донор: акцептор—транспортируемая группа-трансфераза». К классу трансфераз относят аминотрансферазы, ацилтрансферазы, метилтрансферазы, гликозилтрансферазы, киназы (фосфотрансферазы). Примеры реакций (см. схему А).

3. Гидролазы

Катализируют реакции гидролиза (расщепления ковалентной связи с присоединением молекулы воды по месту разрыва). Подразделяют в зависимости от расщепляемой связи.

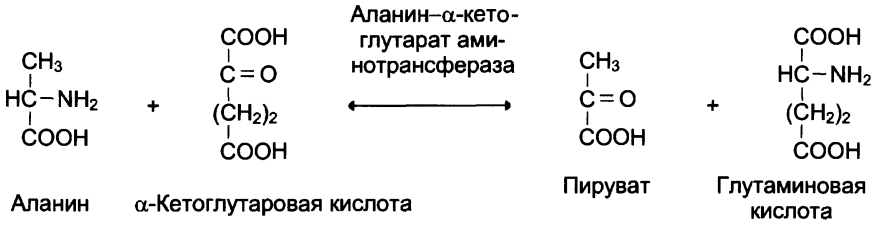
Наименование ферментов составляют по формуле «субстрат—гидролаза» или прямым присоединением к названию субстрата суффикса «аза», например протеаза, липаза, фосфолипаза, рибонуклеаза. Пример реакции (см. схему Б).

Для отдельных классов гидролаз применимы специальные термины, характеризующие гидролиз определённой химической связи: эстеразы, фосфатазы и др.

4. Лиазы

К лиазам относят ферменты, отщепляющие от субстратов негидролитическим путём определённую группу (при этом могут отщепляться CO_2, H_2O, NH_2, SH_2 и др.) или присоединяющие чаще всего молекулу воды по двойной связи.

Наименование ферментов составляют по формуле «субстрат—отщепляемая или присоединяемая группировка». Примеры реакций (см. схему В).



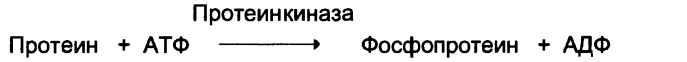


Схема А

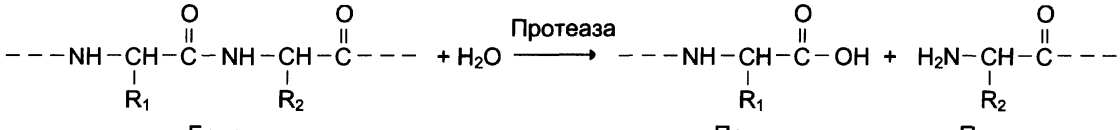


Схема Б

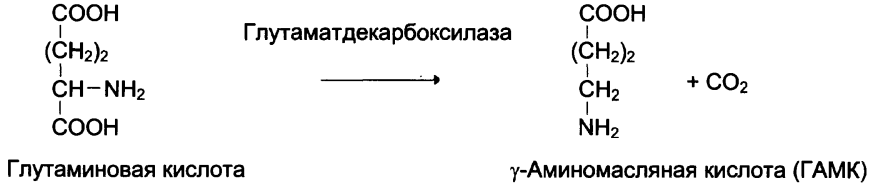


Схема В

5. Изомеразы

Катализируют различные внутримолекулярные превращения. Подразделяют в зависимости от типа реакции изомеризации.

Как общее название ферментов этого класса применяют термин «изомеразы», например (см. схему А).

Изомеразы могут катализировать внутримолекулярные окислительно-восстановительные реакции, осуществляя взаимопревращения альдоз и кетоз, кетонных и енольных групп, перемещения двойных связей внутри молекулы (см. схему Б).

Когда изомеризация состоит во внутримолекулярном переносе группы, фермент называют «мутазой», например (см. схему В).

6. Лигазы (синтетазы)

Катализируют реакции присоединения друг к другу двух молекул с образованием ковалентной связи. Этот процесс сопряжён с разрывом фосфоэфирной связи в молекуле АТФ (или других нуклеозидтрифосфатов) или с разрывом макроэргических связей других соединений. В первом случае (при использовании энергии гидролиза АТФ) такие ферменты называют лигазами, или синтетазами (см. схему Г).

В случае, когда источником энергии служит любое другое макроэргическое соединение (не АТФ), ферменты называют синтазами (см. схему на с. 83).

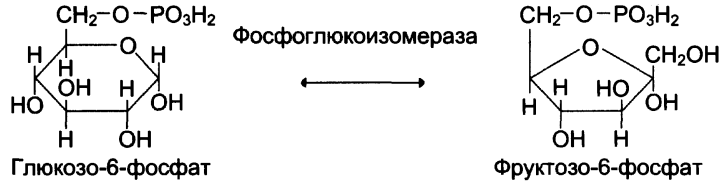


Схема А

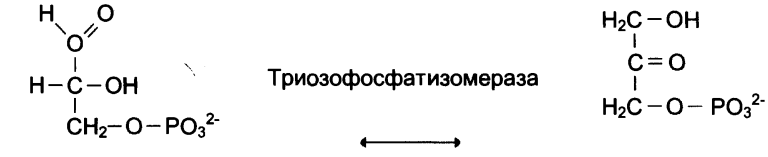


Схема Б

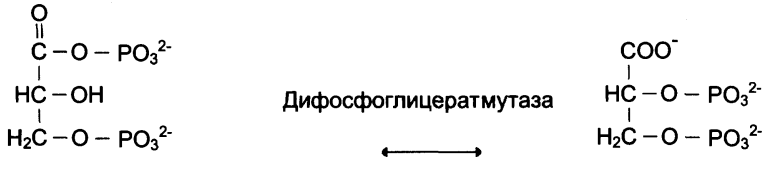
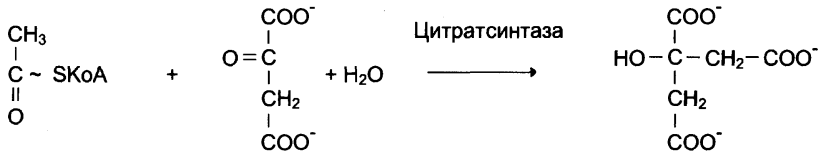


Схема В

Схема Г



Ацетил-КоА Оксалоацетат Цитрат

Схема

В. Систематическое название

В соответствии с классификацией каждый фермент получил систематическое название, однозначно характеризующее катализируемую им химическую реакцию. Например, D-глицеральдегид-3-фосфат: NAD—оксидоредуктаза (рабочее название — глицеральдегидфосфат дегидрогеназа). Из названия фермента следует, что субстратом этого фермента служит D-глицеральдегид-3-фосфат, тип катализируемой реакции — окислительно-восстановительная в присутствии кофермента NAD^+.

В 1972 г. комиссией по номенклатуре биохимических соединений Международного союза теоретической и прикладной химии были предложены «Правила номенклатуры ферментов», имеющие кодовое четырёхзначное цифровое обозначение, где первая цифра обозначает класс фермента, вторая цифра (подкласс) уточняет преобразуемую группировку, третья (подподкласс) — уточняет дополнительных участников реакции (например, донора и акцептора) и четвёртая — порядковый номер фермента в данной подгруппе. Так, фермент малатдегидрогеназа имеет систематическое название L-малат: NAD-оксидоредуктаза и кодовый шифр 1.1.1.38. Шифр означает, что этот фермент относят к первому классу ферментов — оксидоредуктаз, окисляемая группа — гидроксильная группировка (1) в присутствии кофермента NAD^+ (1) и порядковый номер фермента в этой подгруппе — 38. Кодовую номенклатуру ферментов в основном используют в научной литературе.

III. КОФАКТОРЫ И КОФЕРМЕНТЫ

Большинство ферментов для проявления ферментативной активности нуждается в низкомолекулярных органических соединениях небелковой природы (коферментах) и/или в ионах металлов (кофакторах).

Термин «кофермент» был введён в начале XX века и обозначал часть некоторых ферментов, которая легко отделялась от белковой молекулы фермента и удалялась через полупроницаемую мембрану при диализе. Несколько позже было выяснено, что большинство ферментов состоит из термолабильной белковой части и термостабильного небелкового фактора — кофермента. Белковая часть получила название «апофермент», который в отсутствие кофермента не обладает каталитической активностью. Кофермент с белковой молекулой (апоферментом) формируют молекулу холофермента, обладающую каталитической активностью.

А. Кофакторы

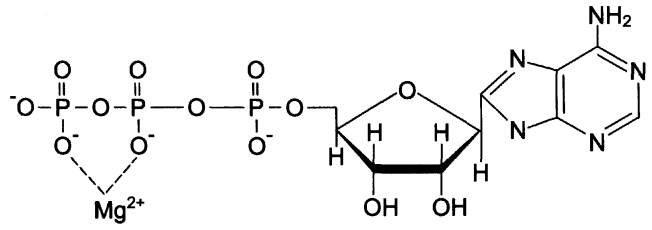
Более 25% всех ферментов для проявления полной каталитической активности нуждается в ионах металлов. Рассмотрим роль кофакторов в ферментативном катализе.

1. Роль металлов в присоединении субстрата в активном центре фермента

Ионы металла выполняют функцию стабилизаторов молекулы субстрата, активного центра фермента и конформации белковой молекулы фермента, а именно третичной и четвертичной структур.

Ионы металлов — стабилизаторы молекулы субстрата

Для некоторых ферментов субстратом служит комплекс превращаемого вещества с ионом металла. Например, для большинства киназ в качестве одного из субстратов выступает не молекула АТФ, а комплекс Mg^{2+}-АТФ. В этом случае ион Mg^{2+} не взаимодействует непосредственно с ферментом, а участвует в стабилизации молекулы АТФ и нейтрализации отрицательного заряда субстрата, что облегчает его присоединение к активному центру фермента (см. схему на с. 84).



Схема

Схематично роль кофактора при взаимодействии фермента и субстрата можно представить как комплекс E-S-Me, где E — фермент, S — субстрат, Me — ион металла.

В качестве примера можно привести расположение субстратов в активном центре гексокиназы (рис. 2-3).

Гексокиназа катализирует перенос концевого, γ-фосфатного остатка молекулы АТФ на глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата:

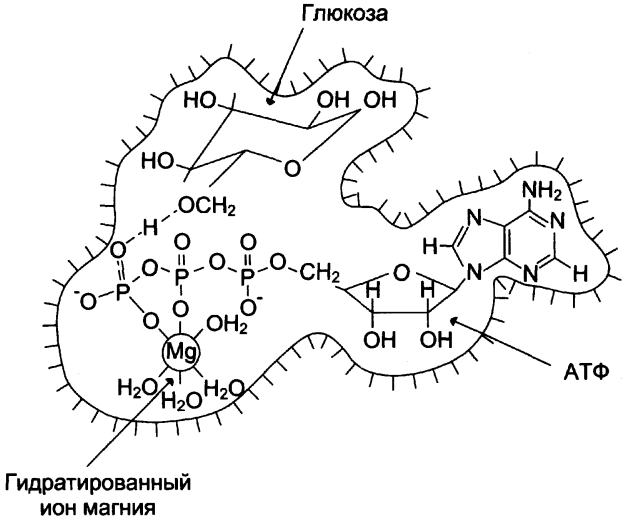


Рис. 2-3. Участие ионов магния в присоединении субстрата в активном центре гексокиназы. В активном центре гексокиназы есть участки связывания для молекулы глюкозы и комплекса Mg^{2+}-АТФ. В результате ферментативной реакции происходит перенос концевого, γ-фосфатного остатка молекулы АТФ на глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата.

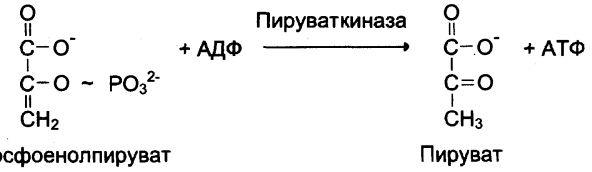
Ион Mg^{2+} участвует в присоединении и «правильной» ориентации молекулы АТФ в активном центре фермента, ослабляя фосфоэфирную связь и облегчая перенос фосфата на глюкозу.

Ионы металла — стабилизаторы активного центра фермента

В некоторых случаях ионы металла служат «мостиком» между ферментом и субстратом. Они выполняют функцию стабилизаторов активного центра, облегчая присоединение к нему субстрата и протекание химической реакции. В ряде случаев ион металла может способствовать присоединению кофермента. Перечисленные выше функции выполняют такие металлы, как Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Mo^{2+}. В отсутствие металла эти ферменты активностью не обладают. Такие ферменты получили название «металлоэнзимы». Схематично данный процесс взаимодействия фермента, субстрата и металла можно представить следующим образом:

E-Me-S

К металлоэнзимам относят, например, фермент пируват киназу (рис. 2-4), катализирующий реакцию:



2. Роль металлов в стабилизации третичной и четвертичной структуры фермента

Ионы металлов обеспечивают сохранение вторичной, третичной, четвертичной структуры молекулы фермента. Такие ферменты в отсутствие

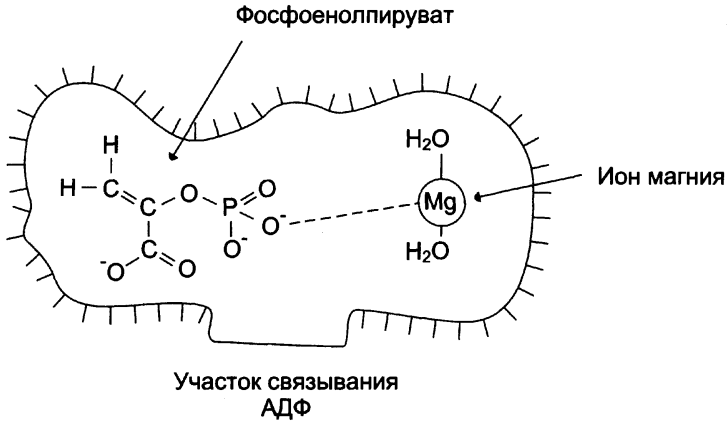


Рис. 2-4. Участие ионов магния в присоединении субстрата в активном центре пируваткиназы. Активный центр пируваткиназы имеет участки связывания для фосфоенолпирувата и АДФ. Mg^{2+} участвует в стабилизации активного центра, что облегчает присоединение фосфоенолпирувата. В ходе ферментативной реакции образуется пируват и АТФ.

ионов металлов способны к химическому катализу, однако они нестабильны. Их активность снижается и даже полностью исчезает при небольших изменениях pH, температуры и других незначительных изменениях внешнего окружения. Таким образом, ионы металлов выполняют функцию стабилизаторов оптимальной конформации белковой молекулы.

Иногда в стабилизации вторичной и третичной структуры принимают участие ионы щёлочно-земельных металлов. Так, для поддержания третичной конформации пируваткиназы необходимы ионы K^+.

Для стабилизации четвертичной структуры алкогольдегидрогеназы, катализирующей реакцию окисления этанола, необходимы ионы цинка. Алкогольдегидрогеназа состоит из 4 субъединиц с молекулярной массой 151 кД. В состав фермента входят 4 атома Zn^{2+}. Удаление Zn^{2+} приводит к потере активности фермента за счёт диссоциации на 4 неактивные субъединицы с молекулярной массой 36 кД (рис. 2-5).

3. Роль металлов в ферментативном катализе

Не менее важную роль отводят ионам металлов в осуществлении ферментативного катализа.

Участие в электрофильном катализе

Наиболее часто эту функцию выполняют ионы металлов с переменной валентностью, имеющие свободную d-орбиталь и выступаю-

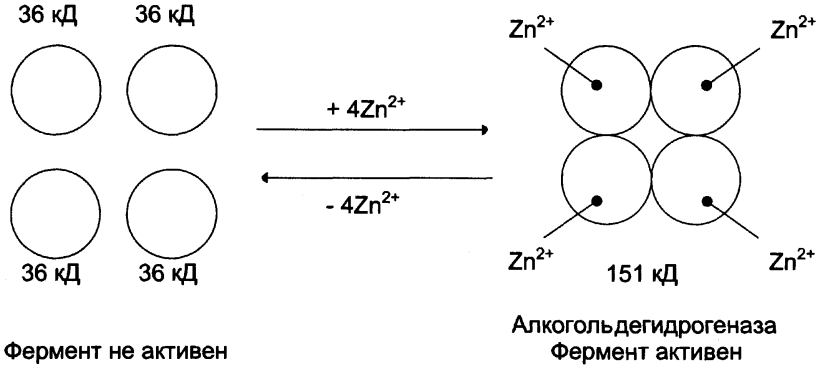
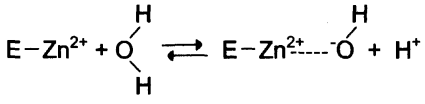


Рис. 2-5. Роль ионов цинка в стабилизации четвертичной структуры алкогольдегидрогеназы.

щие в качестве электрофилов. Это, в первую очередь, такие металлы, как Zn^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}. Ионы щёлочно-земельных металлов, такие как Na^+ и K^+, не обладают этим свойством. В качестве примера можно рассмотреть функционирование фермента карбоангидразы. Карбоангидраза — цинксодержащий фермент, катализирующий реакцию образования угольной кислоты:

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3.$$

Ион Zn^{2+} в результате электрофильной атаки участвует в образовании H^+ и OH^- ионов из молекулы воды:

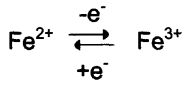


Протон и гидроксильная группа последовательно присоединяются к диоксиду углерода с образованием угольной кислоты (см. схему А).

В ходе электрофильного катализа ионы металлов часто участвуют в стабилизации промежуточных соединений.

Участие в окислительно-восстановительных реакциях

Ионы металлов с переменной валентностью могут также участвовать в переносе электронов. Например, в цитохромах (гемсодержащих белках) ион железа способен присоединять и отдавать один электрон:



Благодаря этому свойству цитохромы участвуют в окислительно-восстановительных реакциях.

Другой пример участия ионов металлов в окислительно-восстановительных реакциях — работа фермента дофамингидроксилазы, катализирующего реакцию образования норадреналина при участии витамина С (см. схему Б).

За окислительно-восстановительные свойства у дофамингидроксилазы отвечает ион меди (рис. 2-6).

Фермент, содержащий ион Cu^{2+}, не вступает в реакцию с молекулой кислорода. При восстановлении Cu^{2+} до Cu^+ с помощью аскорбиновой кислоты образуется ион меди, способный взаимодействовать с кислородом с образованием перекисного соединения. Далее гидроксильная группа переносится на молекулу дофамина с образованием норадреналина.

4. Роль металлов в регуляции активности ферментов

Иногда ионы металлов выступают в роли регуляторных молекул. Например, ионы Ca^{2+} служат активаторами фермента протеинкиназы С,

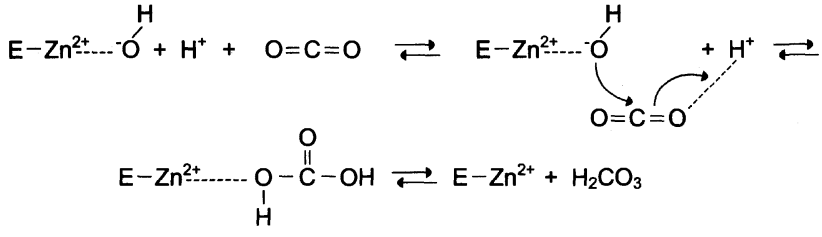
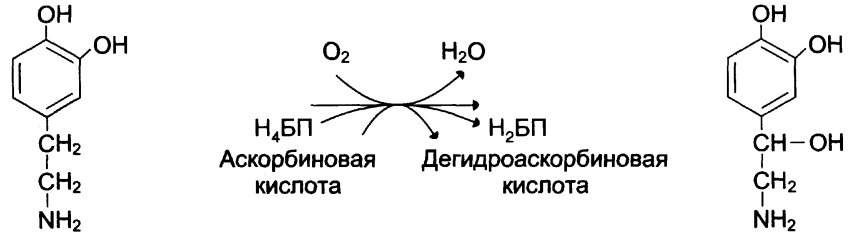


Схема А



Дофамин

Норадреналин

Схема Б

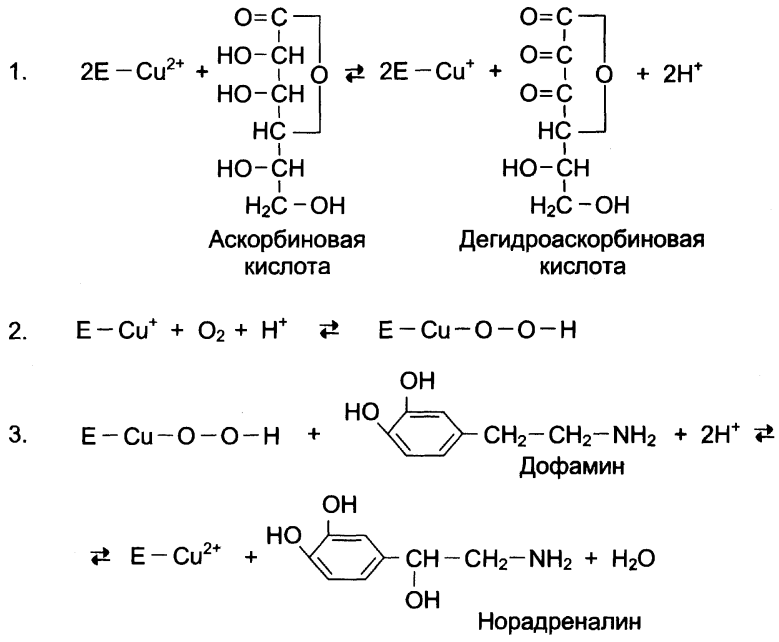


Рис. 2-6. Участие иона меди в активации молекулы кислорода при функционировании дофамингидроксилазы. 1 – восстановление Cu^{2+}, входящего в состав активного центра дофамингидроксилазы, до Cu^{+} с помощью аскорбиновой кислоты; 2 – взаимодействие Cu^{+} с кислородом с образованием перекисного соединения; 3 – перенос гидроксильной группы на молекулу дофамина с образованием норадреналина.

катализирующего реакции фосфорилирования белков (см. раздел 5). Ионы Ca^{2+} также изменяют активность ряда кальций-кальмодулинзависимых ферментов (см. подраздел V).

Б. Коферменты

Как уже было сказано, для проявления каталитической активности большинству ферментов необходимо наличие кофермента. Исключение составляют гидролитические ферменты (например, протеазы, липазы, рибонуклеаза), выполняющие свою функцию в отсутствие кофермента.

Кофермент, локализуясь в каталитическом участке активного центра, принимает непосредственное участие в химической реакции, выступая в качестве акцептора и донора химических группировок, атомов, электронов. Кофермент может быть связан с белковой частью молекулы ковалентными и нековалентными связями. В первом случае он называется простетической группой (например, FAD, FMN, биотин, липоевая кислота). Вместе с тем известны примеры, когда кофермент присоединяется к ферменту нековалентными связями настолько прочно, что не диссоциирует от белковой молекулы, например тиаминдифосфат.

Во втором случае кофермент взаимодействует с ферментом только на время химической реакции и может рассматриваться в качестве второго субстрата. Примеры — NAD^{+}, $NADP^{+}$.

Апофермент обеспечивает специфичность действия и отвечает за выбор типа химического превращения субстрата. Один и тот же кофермент, взаимодействуя с различными апоферментами, может участвовать в разных химических превращениях субстрата. Например, пиридоксальфосфат в зависимости от того, с каким апоферментом взаимодействует, участвует в реакциях трансаминирования или декарбоксилирования аминокислот.

Химическая природа коферментов, их функции в ферментативных реакциях чрезвычайно разнообразны. Традиционно к коферментам относят производные витаминов, хотя помимо них есть значительный класс небелковых соединений, принимающих участие в

проявлении каталитической функции ферментов.

К коферментам относят следующие соединения:

- производные витаминов;
- гемы, входящие в состав цитохромов, каталазы, пероксидазы, гуанилатциклазы, NO-синтазы и являющиеся простетической группой ферментов;
- нуклеотиды — доноры и акцепторы остатка фосфорной кислоты;
- убихинон, или кофермент Q, участвующий в переносе электронов и протонов в ЦПЭ;
- фосфоаденозилфосфосульфат, участвующий в переносе сульфата;
- S-аденозилметионин (SAM) — донор метильной группы;
- глутатион, участвующий в окислительно-восстановительных реакциях.

Строение и функции этих коферментов подробно рассмотрены в соответствующих разделах учебника.

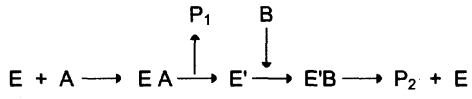
В. Мультисубстратные реакции

Большинство ферментов катализирует реакции, в которых участвует более чем один субстрат. В случае если кофермент не является простетической группой, его также можно рассматривать как ещё один субстрат. Следовательно, участников ферментативной реакции может быть несколько: непосредственно фермент, несколько субстратов и кофермент.

В этих случаях механизм ферментативной реакции, как правило, может идти по одному из двух путей: по механизму «пинг-понг» (механизму двойного замещения) или последовательному. Рассмотрим оба механизма.

1. Механизм «пинг-понг»

Схематично механизм «пинг-понг» может быть представлен следующим образом:



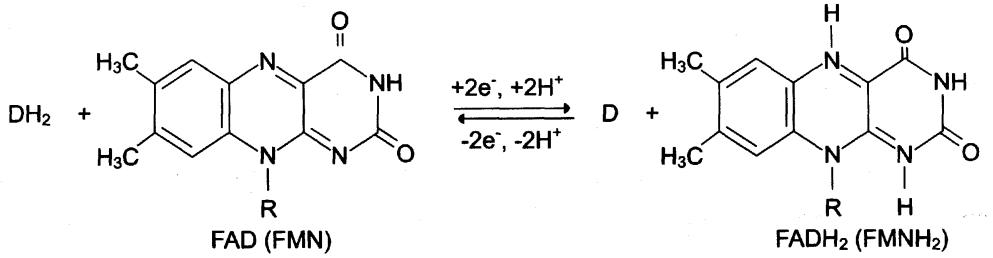
Субстрат А, взаимодействуя с ферментом (Е), превращается в продукт (P_1). Фермент остаётся в результате этого преобразования не в нативной форме, а в изменённой (Е′) в результате модификации кофермента. Далее к активному центру Е′ присоединяется субстрат В, подвергающийся преобразованию в продукт (P_2) с высвобождением нативной формы фермента (Е).

Хороший пример механизма «пинг-понг» — реакции трансаминирования с участием ферментов аминотрансфераз (кофермент пиридоксальфосфат). Аминотрансферазы, открытые отечественным учёным А.Е. Брауншгейном, катализируют обратимые реакции переноса аминогруппы с аминокислоты на кетокислоту. Механизм «пинг-понг» данной реакции схематично представлен на рис. 2-7.

Другой пример механизма «пинг-понг» — реакции дегидрирования с участием кофермента FAD (флавинадениндинуклеотид) или FMN (флавинмононуклеотид), которые прочно связаны с ферментом и, следовательно, не могут рассматриваться в качестве второго субстрата.

Схематично структура этих коферментов и соответствующие им химические формулы представлены на рис. 2-8.

FMN и FAD участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, акцептируя 2 e^- и 2 H^+ в изоаллаксазиновом кольце (см. схему ниже).



FAD (FMN)
окисленная форма

$FADH_2$ ($FMNH_2$)
восстановленная форма

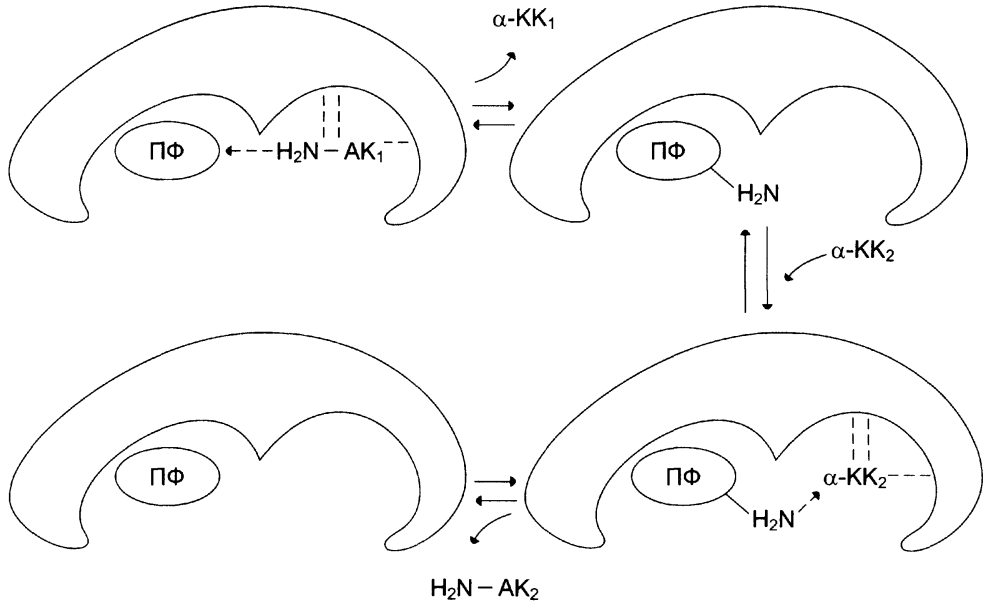
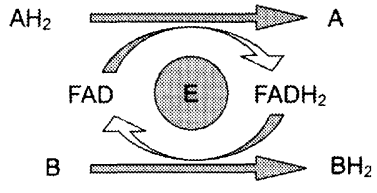


Рис. 2-7. События в активном центре аминотрансферазы как пример механизма «пинг-понг». Кофермент пиридоксальфосфат (ПФ), связанный с ферментом, принимает α-аминогруппу от первой аминокислоты (AK_1), которая при этом превращается в α-кетокислоту 1 (KK_1) и высвобождается из активного центра фермента. Далее в активный центр фермента присоединяется α-кетокислота 2 (KK_2), которая забирает аминогруппу от кофермента и превращается в α-аминокислоту (AK_2).

Схему реакции дегидрирования (как пример механизма «пинг-понг» с участием коферментов FMN и FAD) можно представить в следующем виде:



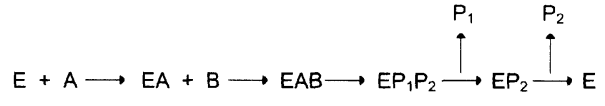
где AH_2 — донор водорода, окисляемый субстрат 1; A — окисленная форма субстрата 1; B — акцептор водорода — субстрат 2; BH_2 — восстановленная форма субстрата 2; E (FAD), E ($FADH_2$) — окисленная и восстановленная формы кофермента FAD, входящего в состав фермента E.

В качестве примера FAD-зависимой реакции можно привести сукцинатдегидрогеназную реакцию. В этой реакции в качестве второго субстрата участвует убихинон — один из посредников ЦПЭ (см. схему на с. 90).

2. Последовательный механизм

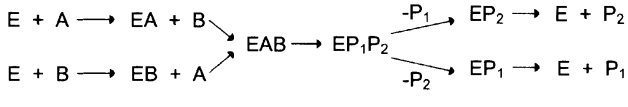
В случае последовательного механизма для протекания ферментной реакции требуется одновременно взаимодействие двух субстратов. В этом случае возможно присоединение субстратов двумя различными путями:

Механизм упорядоченного взаимодействия субстрата с активным центром фермента:



Первым в активный центр фермента присоединяется субстрат A, облегчая присоединение субстрата B. После химической модификации также наблюдают определённый порядок высвобождения продуктов реакции.

Механизм случайного взаимодействия субстрата с активным центром фермента:



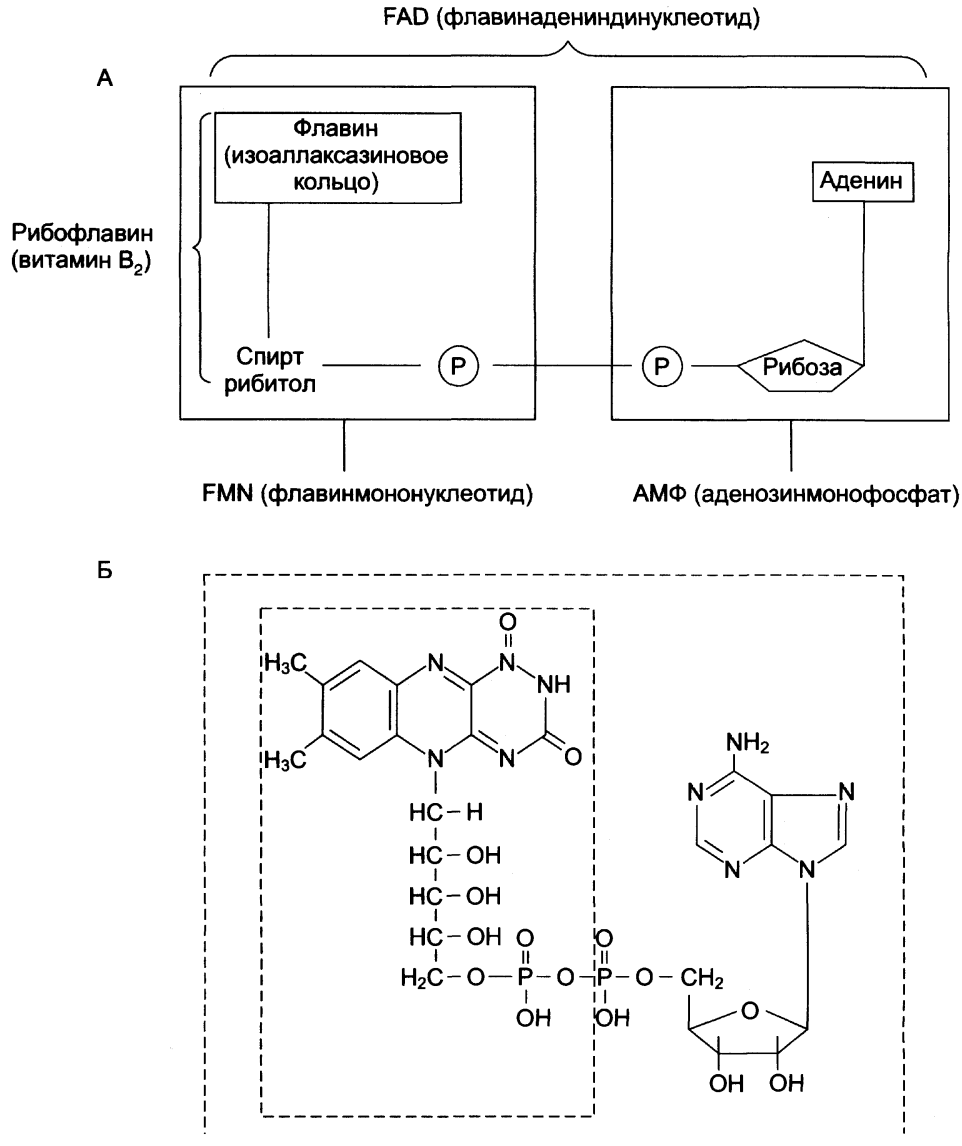
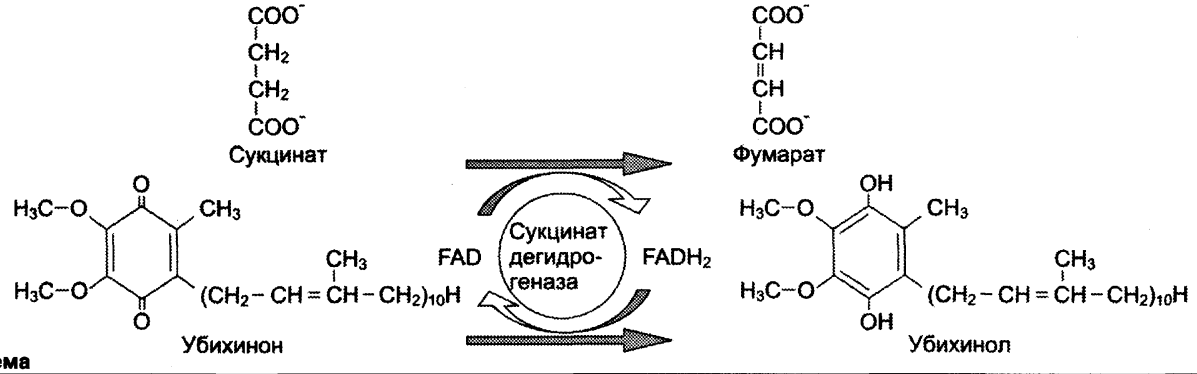


Рис. 2-8. Структура (А) и химическое строение (Б) коферментов FMN и FAD.



Схема

Приоритетности за взаимодействие субстратов А и В в активном центре фермента нет (каждый субстрат имеет свой центр связывания в активном центре). Также нет строгой закономерности высвобождения продуктов реакции.

Примером последовательного упорядоченного механизма может быть реакция дегидрирования с участием коферментов NAD^+, $NADP^+$.

Схематично структура и химические формулы этих коферментов представлены на рис. 2-9.

Оба кофермента функционируют как посредники переноса двух электронов и одного протона от донора к акцептору, другого протона — в среду (см. схему А на с. 92).

Донор и акцептор не обязательно участвуют в одном метаболическом пути. Другими словами, восстановленная форма этих нуклеотидов действует как общий пул электронов, образованный в результате окислительных реакций, и может быть использована в различных восстановительных реакциях. Такие реакции называют сопряжёнными (см. схему Б на с. 92).

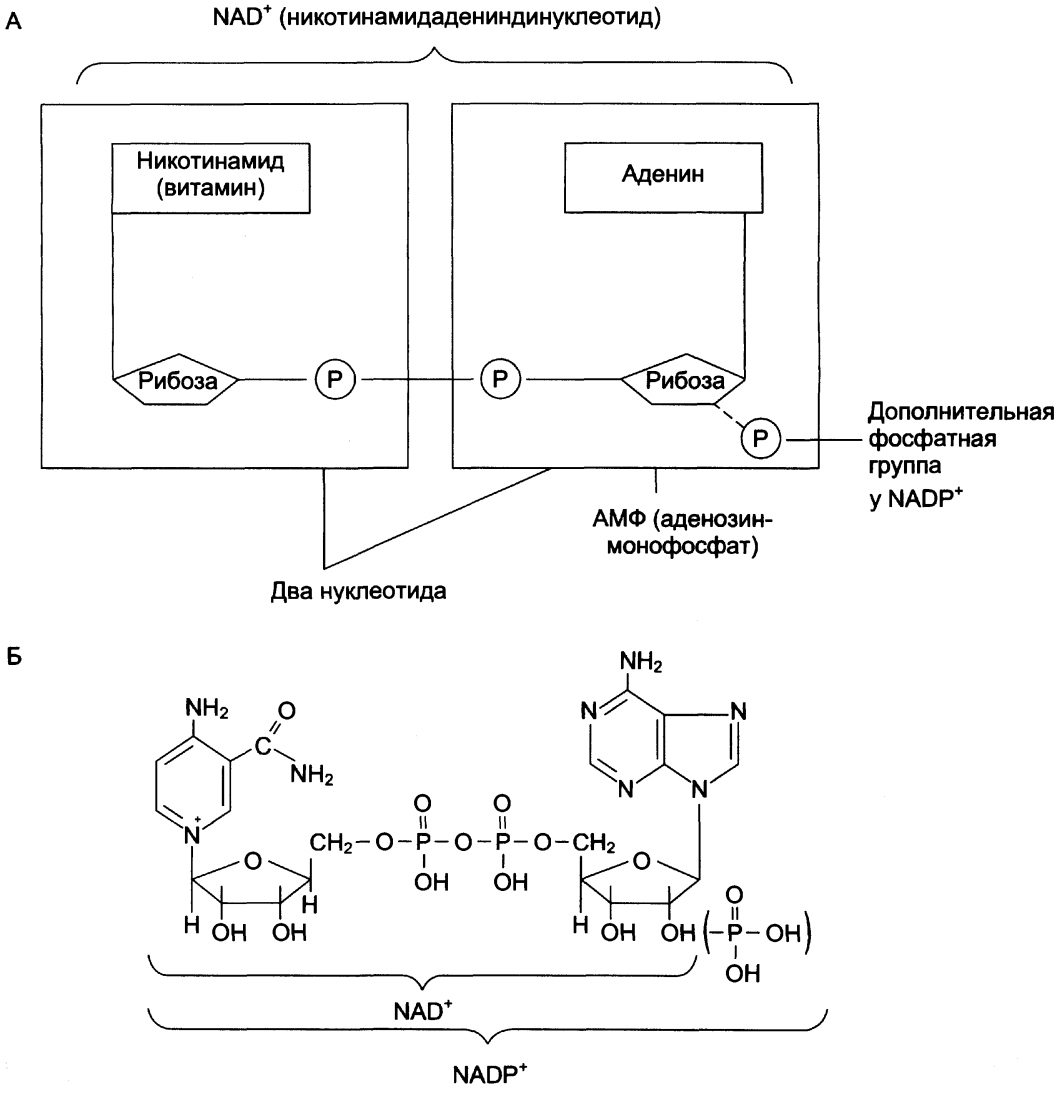


Рис. 2-9. Структура (А) и химическое строение (Б) коферментов NAD^+ и $NADP^+$.

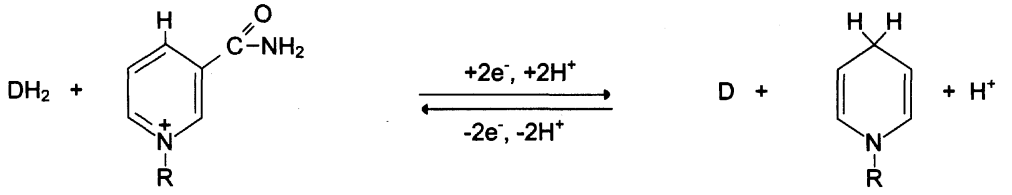


Схема А

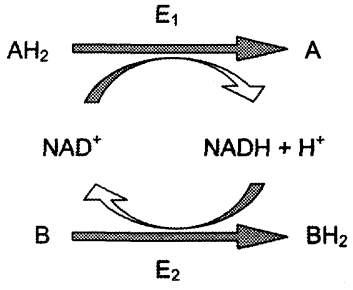


Схема Б

где AH_2 — донор водорода, восстановленная форма субстрата 1; A — окисленная форма субстрата 1; B — акцептор водорода — второй субстрат; BH_2 — восстановленная форма субстрата 2; NAD^+, NADH — окисленная и восстановленная формы кофермента; E_1 и E_2 — ферменты.

Две ферментативные реакции, катализируемые ферментами E_1 и E_2, сопряжены друг с другом посредством кофермента NAD^+, служащего в каждом из этих случаев субстратом. Для первого фермента субстратом служит окисленная форма NAD, в качестве второго субстрата выступает донор водорода — пример последовательных реакций, продуктом — восстановленная форма NAD, для фермента E_2 — наоборот.

В качестве примера можно рассмотреть следующие сопряжённые реакции (см. схему на с. 93), где E_1 — глицеральдегидфосфат дегидрогеназа; E_2 — лактатдегидрогеназа.

IV. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Механизм действия ферментов может быть рассмотрен с двух позиций: с точки зрения изменения энергетики химических реакций и с точки зрения событий в активном центре.

А. Энергетические изменения при химических реакциях

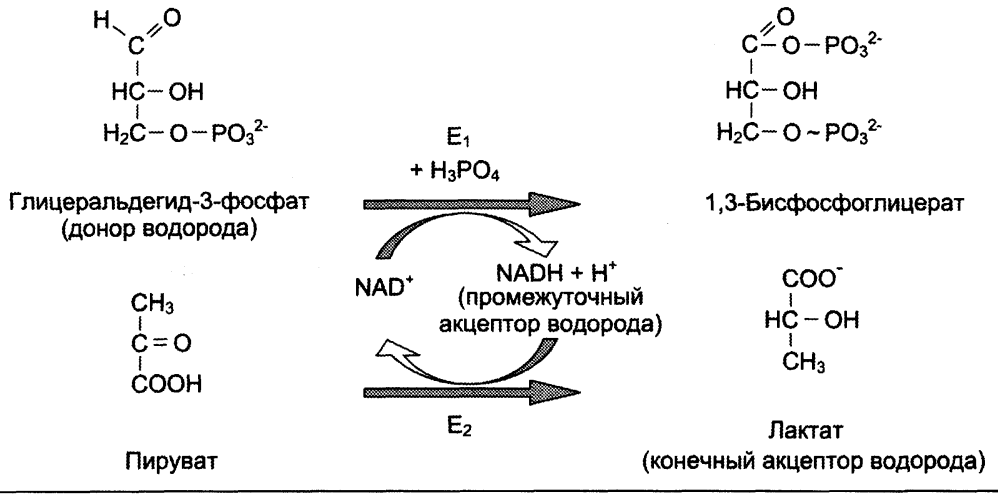
Любые химические реакции протекают, подчиняясь двум основным законам термодинамики: закону сохранения энергии и закону энтропии. Согласно этим законам, общая энергия химической системы и её окружения остаётся постоянной, при этом химическая система стремится к снижению упорядоченности (увеличению энтропии). Для понимания энергетики химической реакции недостаточно знать энергетический баланс входящих и выходящих из реакции реагентов, необходимо учитывать изменения энергии в процессе данной химической реакции и роль ферментов в динамике этого процесса. Рассмотрим реакцию разложения угольной кислоты:

$$H_2CO_3 \rightarrow H_2O + CO_2.$$

Угольная кислота слабая; реакция её разложения пойдёт при обычных условиях, если молекулы угольной кислоты имеют энергию, превышающую определённый уровень, называемый энергией активации E_a (рис. 2-10).

Энергией активации называют дополнительное количество кинетической энергии, необходимое молекулам вещества, чтобы они вступили в реакцию.

При достижении этого энергетического барьера в молекуле происходят изменения, вызывающие перераспределение химических связей и образование новых соединений. Говорят, что молекулы, обладающие E_a, находятся в переходном состоянии. Разницу энергий между исходным реагентом H_2CO_3 и конечными соединениями H_2O и CO_2 называют изменением свободной



Схема

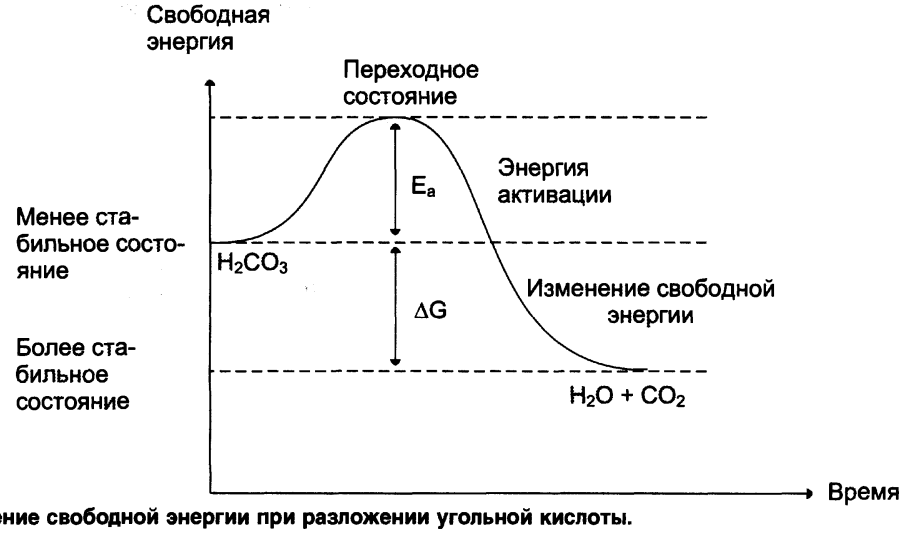


Рис. 2-10. Изменение свободной энергии при разложении угольной кислоты.

энергии реакции DG. Молекулы H_2O и CO_2 — более стабильные вещества, чем H_2CO_3, т.е. обладают меньшей энергией и при обычных условиях практически не реагируют. Выделившаяся энергия в результате этой реакции рассеивается в виде тепла в окружающую среду.

Чем больше молекул обладает энергией, превышающей уровень E_a, тем выше скорость химической реакции. Повысить скорость химической реакции можно нагреванием. При этом увеличивается энергия реагирующих молекул. Однако для живых организмов высокие температуры губительны, поэтому в клетке для ускорения химических реакций используются ферменты. Ферменты обеспечивают высокую скорость реакций при оптимальных условиях, существующих в клетке, путём понижения уровня E_a. Таким образом, ферменты снижают высоту энергетического барьера, в результате возрастает количество реакционно-способных молекул, следовательно, увеличивается скорость реакции.

В механизме ферментативного катализа решающее значение имеет образование нестойких промежуточных соединений — фермент-субстратный комплекс ES, подвергающийся превращению в нестабильный переходный комплекс EP, который почти мгновенно распадается на свободный фермент и продукт реакции.

Таким образом, биологические катализаторы (ферменты) не изменяют свободную энер-

гию субстратов и продуктов и поэтому не меняют равновесие реакции (рис. 2-11).

Фермент, выполняя функцию катализатора химической реакции, подчиняется общим законам катализа и обладает всеми свойствами, характерными для небиологических катализаторов, однако имеет и отличительные свойства, связанные с особенностями строения ферментов.

Сходство ферментов с небиологическими катализаторами заключается в том, что:

- ферменты катализируют энергетически возможные реакции;
- энергия химической системы остаётся постоянной;
- в ходе катализа направление реакции не изменяется;
- ферменты не расходуются в процессе реакции.

Отличия ферментов от небиологических катализаторов заключаются в том, что:

- скорость ферментативных реакций выше, чем реакций, катализируемых небелковыми катализаторами;
- ферменты обладают высокой специфичностью;
- ферментативная реакция проходит в клетке, т.е. при температуре 37 °С, постоянном атмосферном давлении и физиологическом значении pH;
- скорость ферментативной реакции может регулироваться.

Б. Этапы ферментативного катализа

1. Формирование фермент-субстратного комплекса

Тот факт, что ферменты обладают высокой специфичностью, позволил в 1890 г. выдвинуть гипотезу, согласно которой активный центр фермента комплементарен субстрату, т.е. соответствует ему как «ключ замку». После взаимодействия субстрата («ключ») с активным центром («замок») происходят химические превращения субстрата в продукт. Активный центр при этом рассматривался как стабильная, жёстко детерминированная структура.

В 1959 г. был предложен другой вариант гипотезы «ключ–замок», объясняющий события в активном центре фермента. По этой гипотезе активный центр является гибкой структу-

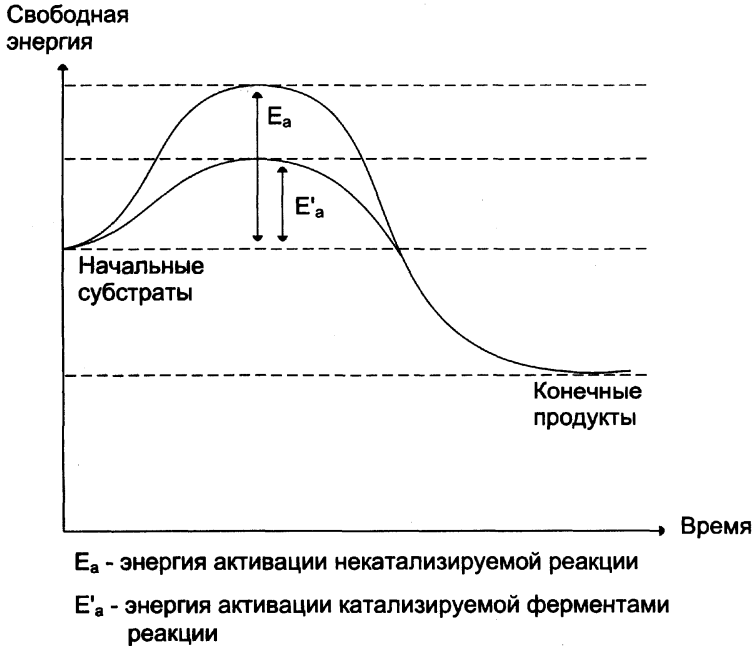


Рис. 2-11. Изменение свободной энергии в ходе химической реакции, некатализируемой и катализируемой ферментами. Фермент понижает энергию активации E_a, т.е. снижает высоту энергетического барьера, в результате возрастает доля реакционно-способных молекул, следовательно, увеличивается скорость реакции.

рой по отношению к субстрату. Субстрат, взаимодействуя с активным центром фермента, вызывает изменение его конформации, приводя к формированию фермент-субстратного комплекса, благоприятного для химических модификаций субстрата. При этом молекула субстрата также изменяет свою конформацию, что обеспечивает более высокую эффективность ферментативной реакции. Эта «гипотеза индуцированного соответствия» впоследствии получила экспериментальное подтверждение.

2. Последовательность событий в ходе ферментативного катализа

Процесс ферментативного катализа условно можно разделить на следующие этапы (рис. 2-12).

Первый, второй и четвёртый этапы катализа непродолжительны и зависят от концентрации субстрата (для первого этапа) и констант связывания лигандов в активном центре фермента (для первого и третьего этапов). Изменения энергетики химической реакции на этих стадиях незначительны.

Третий этап наиболее медленный; длительность его зависит от энергии активации химической реакции. На этой стадии происходят разрыв связей в молекуле субстрата, образование новых связей и формирование молекулы продукта.

3. Роль активного центра в ферментативном катализе

В результате исследований было показано, что молекула фермента, как правило, во много раз больше молекулы субстрата, подвергающегося химическому превращению этим ферментом. В контакт с субстратом вступает лишь небольшая часть молекулы фермента, обычно от 5 до 10 аминокислотных остатков, формирующих активный центр фермента. Роль остальных аминокислотных остатков состоит в обеспечении правильной конформации молекулы фермента для оптимального протекания химической реакции.

Активный центр на всех этапах ферментативного катализа нельзя рассматривать как пассивный участок для связывания субстрата. Это комплексная молекулярная «машина», использующая разнообразные химические механизмы, способствующие превращению субстрата в продукт.

В активном центре фермента субстраты располагаются таким образом, чтобы участвующие в реакции функциональные группы субстратов находились в непосредственной близости друг к другу. Это свойство активного центра называют эффектом сближения и ориентации реагентов. Такое упорядоченное расположение субстратов вызывает уменьшение энтропии и, как следствие, снижение энергии активации (E_a), что определяет каталитическую эффективность ферментов.

Активный центр фермента также способствует дестабилизации межатомных связей в молекуле субстрата, что облегчает протекание химической реакции и образование продуктов. Это свойство активного центра называют эффектом деформации субстрата (рис. 2-12).

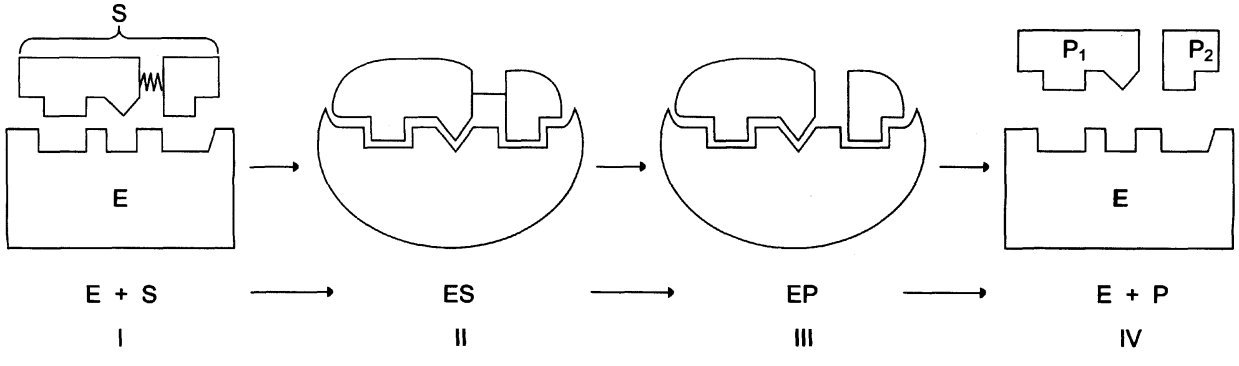


Рис. 2-12. Этапы ферментативного катализа. I – этап сближения и ориентации субстрата относительно активного центра фермента; II – образование фермент-субстратного комплекса (ES) в результате индуцированного соответствия; III – деформация субстрата и образование нестабильного комплекса фермент-продукт (EP); IV – распад комплекса (EP) с высвобождением продуктов реакции из активного центра фермента и освобождением фермента.

В. Молекулярные механизмы ферментативного катализа

Механизмы ферментативного катализа определяются ролью функциональных групп активного центра фермента в химической реакции превращения субстрата в продукт. Выделяют 2 основных механизма ферментативного катализа: кислотно-основной катализ и ковалентный катализ.

1. Кислотно-основной катализ

Концепция кислотно-основного катализа объясняет ферментативную активность участием в химической реакции кислотных групп (доноры протонов) и/или основных групп (акцепторы протонов). Кислотно-основной катализ — часто встречающееся явление. Аминокислотные остатки, входящие в состав активного центра, имеют функциональные группы, проявляющие свойства как кислот, так и оснований.

К аминокислотам, участвующим в кислотно-основном катализе, в первую очередь относят Цис, Тир, Сер, Лиз, Глу, Асп и Гис. Радикалы этих аминокислот в протонированной форме — кислоты (доноры протона), в депротонированной — основания (акцепторы протона). Благодаря этому свойству функциональных групп активного центра ферменты становятся уникальными биологическими катализаторами, в отличие от небиологических катализаторов, способных проявлять либо кислотные, либо основные свойства.

Примером кислотно-основного катализа, в котором кофакторами являются ионы Zn^{2+}, а в качестве кофермента используется молекула NAD^+, можно привести фермент алкогольдегидрогеназу печени, катализирующую реакцию окисления спирта (рис. 2-13):

$$C_2H_5OH + NAD^+ \rightarrow CH_3\text{-}COH + NADH + H^+.$$

2. Ковалентный катализ

Ковалентный катализ основан на атаке нуклеофильных (отрицательно заряженных) или электрофильных (положительно заряженных) групп активного центра фермента молекулами субстрата с формированием ковалентной связи между субстратом и коферментом или функциональной группой аминокислотного остатка (как правило, одной) активного центра фермента.

Действие сериновых протеаз, таких как трипсин, химотрипсин и тромбин, — пример механизма ковалентного катализа, когда ковалентная связь образуется между субстратом и аминокислотным остатком серина активного центра фермента. Термин «сериновые протеазы» связан с тем, что аминокислотный остаток серина входит в состав активного центра всех этих ферментов и участвует непосредственно в катализе. Рассмотрим механизм ковалентного катализа на примере химотрипсина, осуществляющего гидролиз пептидных связей при переваривании белков в двенадцатиперстной кишке (см. раздел 9). Субстратами химотрипсина служат пептиды, содержащие аминокислоты с ароматическими и циклическими

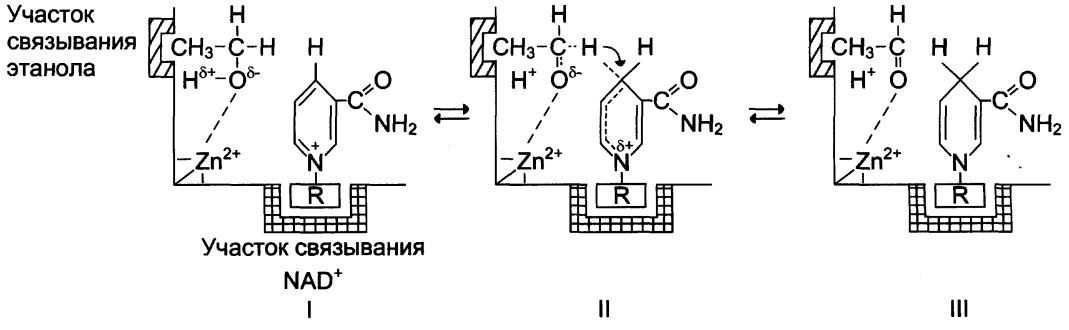


Рис. 2-13. Механизм кислотно-основного катализа на примере алкогольдегидрогеназы печени. I – молекула этилового спирта имеет центр связывания, обеспечивающий гидрофобное взаимодействие активного центра и метильной группы спирта; II – положительно заряженный атом цинка способствует отщеплению протона от спиртовой группы этанола с образованием отрицательно заряженного атома кислорода. Отрицательный заряд перераспределяется между атомом кислорода и соседним атомом водорода, который затем в виде гидрит-иона переносится на четвёртый углеродный атом никотинамида кофермента NAD^+; III – в результате формируется восстановленная форма NADH и уксусный альдегид.

гидрофобными радикалами (Фен, Тир, Три), что указывает на участие гидрофобных сил в формировании фермент-субстратного комплекса. Механизм ковалентного катализа химотрипсина рассмотрен на рис. 2-14.

Радикалы $Асп_{102}$, $Гис_{57}$ и $Сер_{195}$ участвуют непосредственно в акте катализа. Вследствие нуклеофильной атаки пептидной связи субстрата происходит разрыв этой связи с образованием ковалентно-модифицированного серина — ацилхимотрипсина. Другой пептидный фрагмент высвобождается в результате разрыва водородной связи между пептидным фрагментом и $Гис_{57}$ активного центра химотрипсина. Заключительный этап гидролиза пептидной связи белков — деацилирование химотрипсина в присутствии молекулы воды с высвобождением второго фрагмента гидролизуемого белка и исходной формы фермента.

V. ОСНОВЫ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Кинетика ферментативных реакций — раздел энзимологии, изучающий зависимость скорости химических реакций, катализируемых ферментами, от химической природы реагирующих веществ, а также от факторов окружающей среды.

Для измерения каталитической активности ферментов используют такие показатели, как скорость реакции или активность фермента. Скорость ферментативной реакции определяется изменением количества молекул субстрата или продукта за единицу времени. Скорость ферментативной реакции — мера каталитической активности фермента, её обозначают как активность фермента.

Математически скорость ферментативной реакции выражается в изменении концентрации субстрата (уменьшение) или продукта (увеличение) за единицу времени:

$$V = D[S]/t = D[P]/t.$$

На начальном этапе $[0 - t_0]$ скорость реакции прямо пропорциональна времени и имеет линейную зависимость. Графически изменение скорости ферментативной реакции определяется тангенсом угла наклона касательной к кривой профиля реакции. Чем больше угол

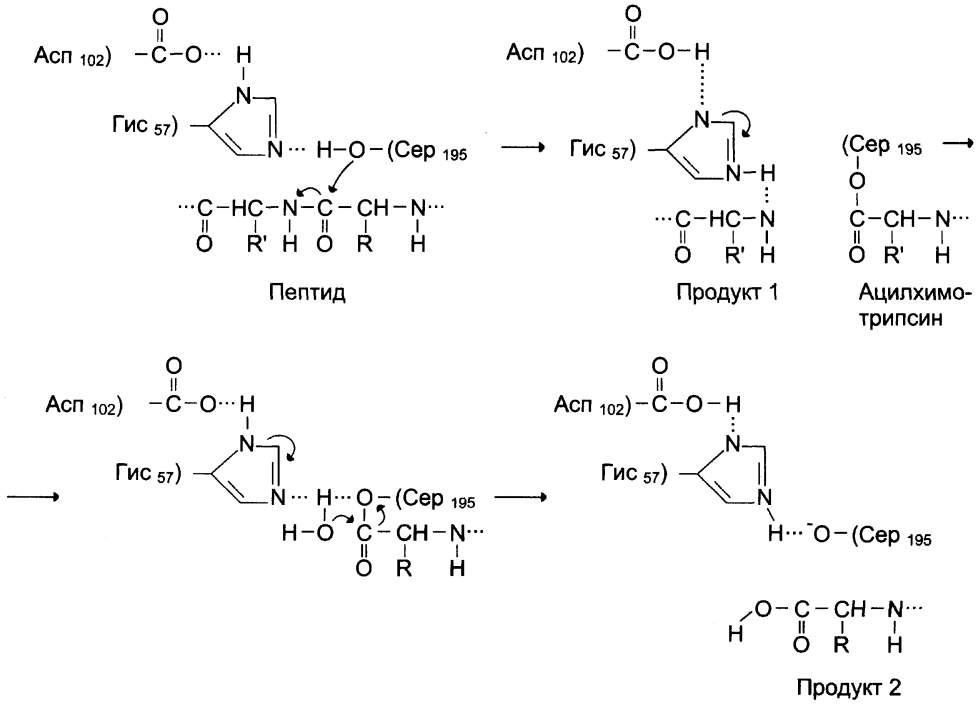


Рис. 2-14. Механизм ковалентного катализа в активном центре химотрипсина.

наклона, тем больше изменение скорости реакции (рис. 2-15).

С течением времени изменение скорости ферментативной реакции в экспериментальных условиях уменьшается, об этом свидетельствует уменьшение угла наклона касательной в момент времени t. Снижение скорости ферментативной реакции может происходить за счёт ряда факторов: уменьшения концентрации субстрата, увеличения концентрации продукта, который может оказывать ингибирующее действие, могут происходить изменения pH раствора, инактивация фермента и т.д.

На этапе $[t_1 - t_x]$ скорость реакции изменяется нелинейно в зависимости от времени. Поэтому для определения скорости ферментативной реакции чаще всего исследуют изменение скорости на начальном этапе $[t_0 - t_1]$, где наблюдают линейное изменение концентрации продукта (или субстрата).

Скорость ферментативной реакции зависит от ряда факторов, таких как количество и активность ферментов, концентрация субстрата, температура среды, pH раствора, присутствие регуляторных молекул (активаторов и ингибиторов). Рассмотрим влияние этих факторов на скорость ферментативной реакции.

А. Зависимость скорости ферментативной реакции от количества ферментов

При проведении ферментативной реакции в условиях избытка субстрата скорость реакции будет зависеть от концентрации фермента. Графическая зависимость такой реакции имеет вид прямой линии (рис. 2-16). Однако количество фермента часто невозможно определить в абсолютных величинах, поэтому на практике пользуются условными величинами, характеризующими активность фермента: одна международная единица активности (МЕ) соответствует такому количеству фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при оптимальных условиях проведения ферментативной реакции. Оптимальные условия индивидуальны для каждого фермента и зависят от температуры среды, pH раствора, при отсутствии активаторов и ингибиторов.

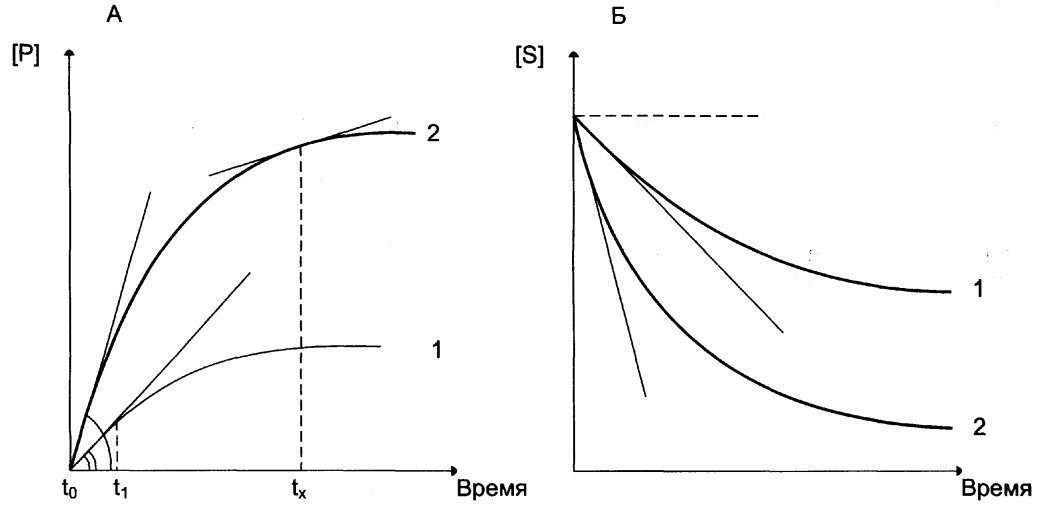


Рис. 2-15. Зависимость накопления продукта (А) и убыли субстрата (Б) от времени (продолжительности) протекания реакции. Скорость ферментативной реакции определяется изменением концентрации продукта или субстрата за единицу времени. В реакциях, катализируемых ферментами 1 и 2, начальная скорость реакции, катализируемой ферментом 1, ниже, чем скорость реакции, катализируемой ферментом 2, так как тангенс угла наклона касательной к кривой профиля реакции, проведённой из «0» точки у второго фермента выше, как в случае накопления продукта (А), так и убыли субстрата (Б). Скорость в любой момент времени t определяется тангенсом угла наклона касательной к профилю реакции в момент времени t. Период времени ферментативной реакции $[t_0 - t_1]$ характеризуется линейным накоплением продукта (или убылью субстрата) в зависимости от длительности реакции. Период ферментативной реакции $[t_1 - t_x]$ характеризуется нелинейным накоплением продукта (или убылью субстрата) в зависимости от времени реакции.

$$1\ \text{МЕ} = \frac{1\ \text{мкмоль превращённого субстрата}}{1\ \text{мин}}$$

Количество единиц активности nME определяют по формуле:

$$\text{n МЕ} = \frac{\text{Количество превращённого субстрата (мкмоль)}}{\text{Время (мин)}}$$

В 1973 г. была принята новая единица активности ферментов: 1 катал (кат), соответствующий такому количеству катализатора, которое превращает 1 моль субстрата за 1 с. Количество каталов определяют по формуле:

$$\text{n катал} = \frac{\text{Количество превращённого субстрата (моль)}}{\text{Время (с)}}$$

Международная единица ферментативной активности МЕ связана с каталом следующими равенствами:

1 кат = 1 моль S/с = 60 моль S/мин = 60×10^6 мкмоль/мин = 6×10^7 МЕ,

1 МЕ = 1 мкмоль/мин = 1/60 мкмоль/с = 1/60 мккат = 16,67 нкат.

В медицинской и фармацевтической практике для оценки активности ферментов часто используют международные единицы активности — МЕ. Для оценки количества молекул фермента среди других белков данной ткани определяют удельную активность (уд. ак.) фермента, численно равную количеству единиц активности фермента (nME) в образце ткани, делённому на массу (мг) белка в этой ткани:

$$\text{Уд. ак.} = \frac{\text{Количество превращённого субстрата (мкмоль)}}{\text{Время (мин)} \times \text{количество белка (мг)}}$$

По удельной активности судят об очистке фермента: чем меньше посторонних белков, тем выше удельная активность.

Б. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры среды

Повышение температуры до определённых пределов оказывает влияние на скорость ферментативной реакции, подобно влиянию температуры на любую химическую реакцию. С повышением температуры ускоряется движение молекул, что приводит к повышению вероятности взаимодействия реагирующих веществ. Кроме того, температура может повышать энергию реагирующих молекул, что также приводит к ускорению реакции. Однако скорость химической реакции, катализируемая ферментами, имеет свой температурный оптимум, превышение которого сопровождается понижением ферментативной активности, возникающим из-за термической денатурации белковой молекулы (рис. 2-17).

Рис. 2-16. Зависимость скорости ферментативной реакции (V) от концентрации фермента.

Для большинства ферментов человека оптимальна температура 37–38 °С. Однако в природе существуют и термостабильные ферменты. Например, Taq–полимераза, выделенная из микроорганизмов, живущих в горячих источниках, не инактивируется при повышении температуры до 95 °С. Этот фермент используют в научно-практической медицине для молекулярной диагностики заболеваний с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

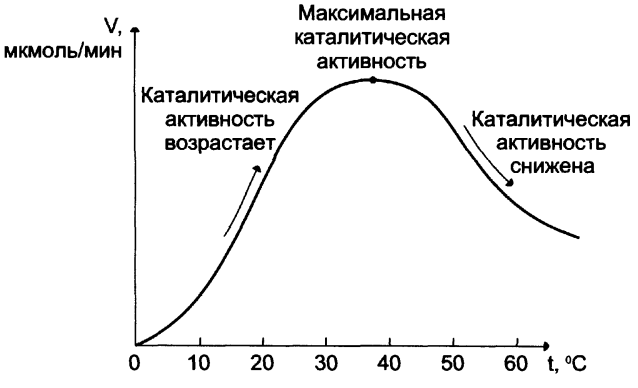


Рис. 2-17. Зависимость скорости ферментативной реакции (V) от температуры.

В. Зависимость скорости ферментативной реакции от pH среды

Активность ферментов зависит от pH раствора, в котором протекает ферментативная реакция. Для каждого фермента существует значение pH, при котором наблюдается его максимальная активность. Отклонение от оптимального значения pH приводит к понижению ферментативной активности.

Влияние pH на активность ферментов связано с ионизацией функциональных групп аминокислотных остатков данного белка, обеспечивающих оптимальную конформацию активного центра фермента. При изменении pH от оптимальных значений происходит изменение ионизации функциональных групп молекулы белка. Например, при закислении среды происходит протонирование свободных аминогрупп (NH_3^+), а при защелачивании происходит отщепление протона от карбоксильных групп (COO^-). Это приводит к изменению конформации молекулы фермента и конформации активного центра; следовательно, нарушается присоединение субстрата, кофакторов и коферментов к активному центру. Кроме того, pH среды может влиять на степень ионизации или пространственную организацию субстрата, что также влияет на сродство субстрата к активному центру. При значительном отклонении от оптимального значения pH может происходить денатурация белковой молекулы с полной потерей ферментативной активности.

Оптимум значения pH у разных ферментов различный (рис. 2-18). Ферменты, работающие в кислых условиях среды (например, пепсин в желудке или лизосомальные ферменты), эволюционно приобретают конформацию, обеспечивающую работу фермента при кислых значениях pH. Однако большая часть ферментов организма человека имеет оптимум pH, близкий к нейтральному, совпадающий с физиологическим значением pH (табл. 2-1).

Таблица 2-1. Оптимальные значения pH для некоторых ферментов

Фермент	Оптимальное значение pH
Пепсин	1,5–2
Пируват-карбоксилаза	4,8
Каталаза	6,8–7
Фумараза	6,5
Уреаза	6,8–7,2
Кабоксипептидаза	7,5
Трипсин	6,5–7,5
Аргиназа	9,5–9,9

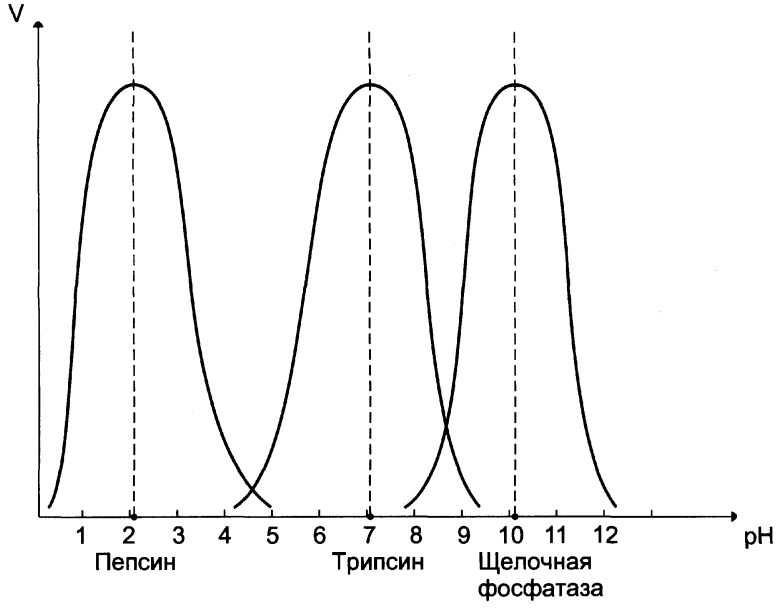


Рис. 2-18. Зависимость скорости ферментативной реакции (V) от pH среды.

Г. Зависимость скорости ферментативной реакции от количества субстрата

Если концентрацию ферментов оставить постоянной, изменяя только количество субстрата, то график скорости ферментативной реакции описывают гиперболой (рис. 2-19).

При увеличении количества субстрата начальная скорость возрастает. Когда фермент становится полностью насыщенным субстратом, т.е. происходит максимально возможное при данной концентрации фермента формирование фермент-субстратного комплекса, наблюдают наибольшую скорость образования продукта. Дальнейшее повышение концентрации субстрата не приводит к увеличению образования продукта, т.е. скорость реакции не возрастает. Данное состояние соответствует максимальной скорости реакции V_{max}.

Таким образом, концентрация фермента — лимитирующий фактор в образовании продукта. Это наблюдение легло в основу ферментативной кинетики, разработанной учёными Л. Михаэлисом и М. Ментен в 1913 г.

Ферментативный процесс можно выразить следующим уравнением:

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

где k_1 — константа скорости образования фермент-субстратного комплекса; k_{-1} — константа скорости обратной реакции, распада фермент-субстратного комплекса; k_2 — константа скорости образования продукта реакции.

Следующее соотношение констант скоростей $(k_{-1} + k_2)/k_1$ называют константой Михаэлиса и обозначают K_m.

Скорость реакции пропорциональна концентрации фермент-субстратного комплекса ES, а скорость образования ES зависит от концентрации субстрата и концентрации свободного фермента. На концентрацию ES влияет скорость формирования и распада ES.

Наибольшая скорость реакции наблюдается в том случае, когда все молекулы фермента находятся в комплексе с субстратом, т.е. в фермент-субстратном комплексе ES, т.е. [E] = [ES].

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата выражается следующим уравнением (математическое выведение этой формулы можно найти в пособиях по ферментативной кинетике):

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Это уравнение получило название уравнения Михаэлиса–Ментен.

В случае, когда скорость реакции равна половине максимальной, $K_m = [S]$ (рис. 2-19). Таким образом, константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой достигается половина максимальной скорости.

Уравнение Михаэлиса–Ментен — основное уравнение ферментативной кинетики, описывающее зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.

Если концентрация субстрата значительно больше K_m $(S>>K_m)$, то увеличение концентрации субстрата на величину K_m практически не влияет на сумму $(K_m + S)$ и её можно считать равной концентрации субстрата. Следовательно, скорость реакции становится равной максимальной скорости: $V = V_{max}$. В этих условиях реакция имеет нулевой порядок, т.е. не зависит от концентрации субстрата. Можно сделать вывод, что V_{max} — величина постоянная для данной концентрации фермента, не зависящая от концентрации субстрата.

Если концентрация субстрата значительно меньше K_m $(S<<K_m)$, то сумма $(K_m + S)$ примерно равна K_m, следовательно, $V = V_{max}[S]/K_m$, т.е. в данном случае скорость реакции прямо про-

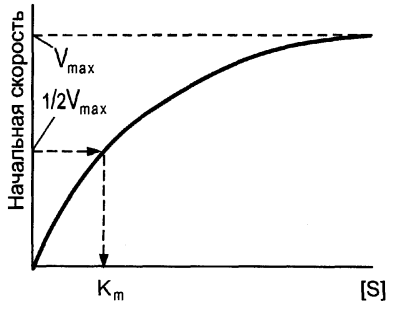


Рис. 2-19. Зависимость скорости реакции (V) от концентрации субстрата S. V_{max} — максимальная скорость реакции при данной концентрации фермента в оптимальных условиях проведения реакции. K_m — константа Михаэлиса.

порциональна концентрации субстрата (реакция имеет первый порядок).

V_{max} и K_m — кинетические характеристики эффективности фермента.

V_{max} даёт характеристику каталитической активности фермента и имеет размерность скорости ферментативной реакции моль/л, т.е. определяет максимальную возможность образования продукта при данной концентрации фермента и в условиях избытка субстрата.

K_m характеризует сродство данного фермента к данному субстрату и является величиной постоянной, не зависящей от концентрации фермента. Чем меньше K_m, тем больше сродство фермента к данному субстрату, тем выше начальная скорость реакции и наоборот, чем больше K_m, тем меньше начальная скорость реакции, тем меньше сродство фермента к субстрату.

На рис. 2-20 представлена зависимость скорости двух ферментативных реакций (1 и 2) от концентрации субстрата. Константа Михаэлиса первого фермента меньше константы Михаэлиса второго фермента ($K_{m1}<K_{m2}$). Следовательно, сродство первого фермента к субстрату выше, чем у второго фермента, и начальная скорость реакции, катализируемой первым ферментом, выше в сравнении со вторым ферментом.

VI. ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Под термином «ингибирование ферментативной активности» понимают снижение каталитической активности в присутствии определённых веществ — ингибиторов. К ингибиторам следует относить вещества, вызывающие снижение активности фермента. Следует отметить, что все денатурирующие агенты также вызывают уменьшение скорости любой ферментативной реакции, вследствие неспецифической денатурации белковой молекулы, поэтому денатурирующие агенты к ингибиторам не относят.

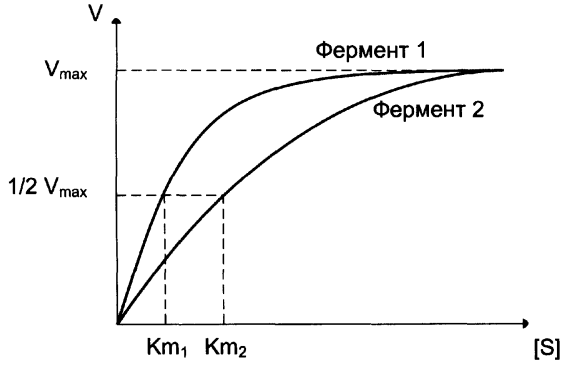


Рис. 2-20. Влияние различных концентраций субстрата на скорость реакции, катализируемой ферментами 1 и 2.

Ингибиторы вызывают большой интерес для выяснения механизмов ферментативного катализа, помогают установить роль отдельных ферментов в метаболических путях организма. В основе действия многих лекарственных препаратов и ядов лежит ингибирование активности ферментов, поэтому знание механизмов этого процесса крайне важно для молекулярной фармакологии и токсикологии.

Ингибиторы способны взаимодействовать с ферментами с разной степенью прочности. На основании этого различают обратимое и необратимое ингибирование. По механизму действия ингибиторы подразделяют на конкурентные и неконкурентные.

А. Обратимое ингибирование

Обратимые ингибиторы связываются с ферментом слабыми нековалентными связями и при определённых условиях легко отделяются от фермента. Обратимые ингибиторы бывают конкурентными и неконкурентными.

1. Конкурентное ингибирование

К конкурентному ингибированию относят обратимое снижение скорости ферментативной реакции, вызванное ингибитором, связывающимся с активным центром фермента и препятствующим образованию фермент-субстратного комплекса. Такой тип ингибирования наблюдают, когда ингибитор — структурный аналог субстрата, в результате возникает конкуренция молекул субстрата и ингибитора за место в активном центре фермента. В этом случае с ферментом взаимодействует либо субстрат, либо ингибитор, образуя комплексы фермент-субстрат (ES) или фермент-ингибитор (EI). При формировании комплекса фермента и ингибитора (EI) продукт реакции не образуется (рис. 2-21).

Для конкурентного типа ингибирования справедливы следующие уравнения:

$$E + S \Leftrightarrow ES \rightarrow E + P,$$

$$E + I \Leftrightarrow EI.$$

Классический пример конкурентного ингибирования — ингибирование сукцинатдегидрогеназной реакции малоновой кислотой (рис. 2-22). Малоновая кислота — структурный аналог сукцината (наличие двух карбоксильных групп) и может также взаимодействовать с активным центром сукцинат дегидрогеназы. Однако отщепление двух атомов водорода от малоновой кислоты невозможно; следовательно, скорость реакции снижается.

Кинетические зависимости

Конкурентные ингибиторы уменьшают скорость химической реакции. Конкурентный ингибитор повышает K_m для данного субстрата (уменьшает сродство субстрата к ферменту). Это означает, что в присутствии конкурентного ин-

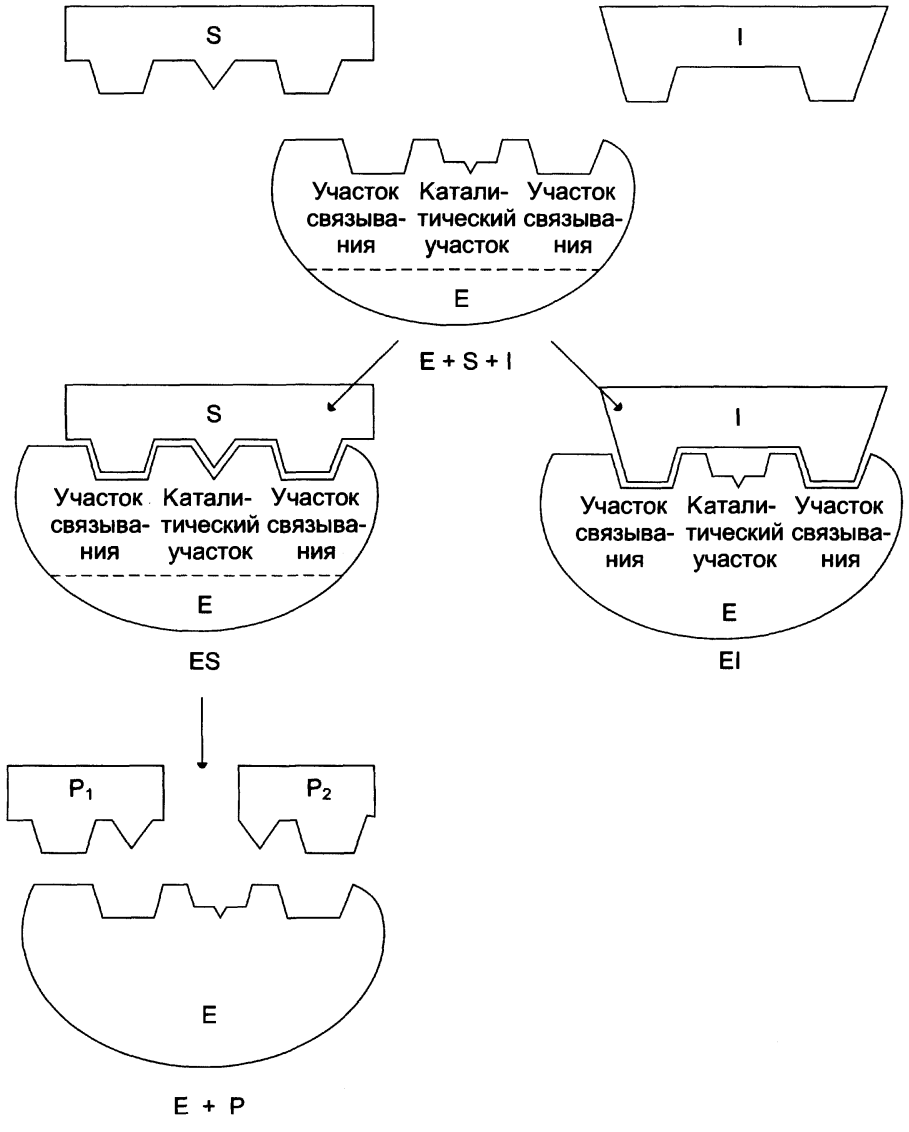


Рис. 2-21. Схема конкурентного ингибирования активности фермента.

гибитора необходима большая концентрация субстрата для достижения 1/2 V_{max}.

Увеличение соотношения концентрации субстрата и ингибитора снижает степень ингибирования. При значительно более высоких концентрациях субстрата ингибирование полностью исчезает, потому что активные центры всех молекул фермента будут находиться преимущественно в комплексе с субстратом.

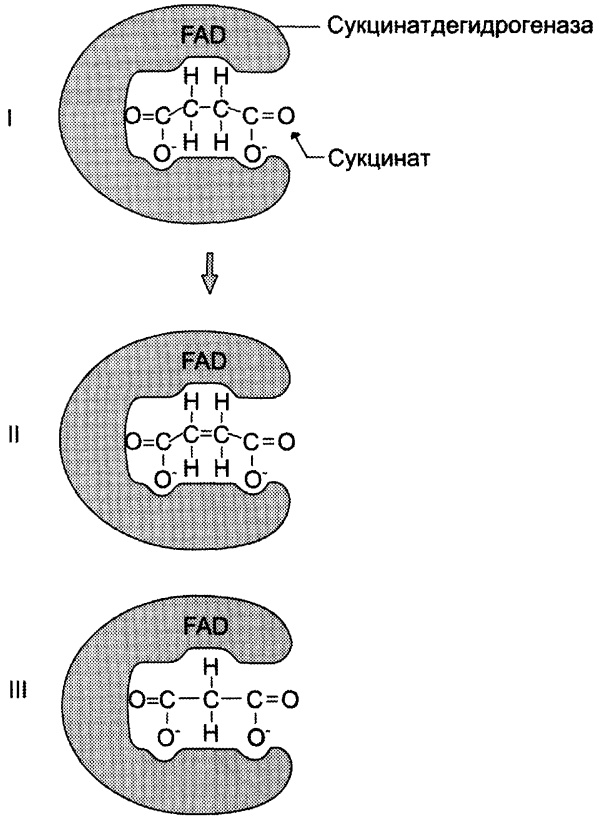


Рис. 2-22. Пример конкурентного ингибирования сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой. I – сукцинат связывается с активным центром фермента сукцинатдегидрогеназы; II – в ходе ферментативной реакции происходит отщепление двух атомов водорода от сукцината и присоединение их к коферменту FAD. В результате образуется фумарат, который высвобождается из активного центра сукцинатдегидрогеназы; III – малоновая кислота — структурный аналог сукцината, она также связывается с активным центром сукцинатдегидрогеназы. При этом химическая реакция не идёт.

Лекарственные препараты как конкурентные ингибиторы

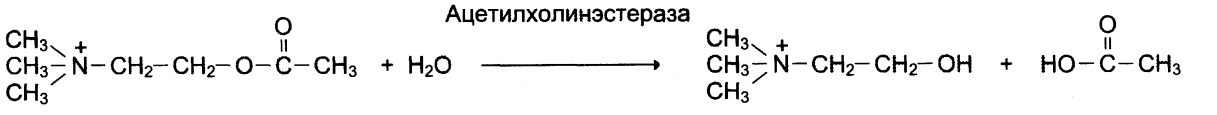
Многие лекарственные препараты оказывают своё терапевтическое действие по механизму конкурентного ингибирования. Например, четвертичные аммониевые основания ингибируют ацетилхолинэстеразу, катализирующую реакцию гидролиза ацетилхолина на холин и уксусную кислоту (см. схему ниже)

При добавлении ингибиторов активность ацетилхолинэстеразы уменьшается, концентрация ацетилхолина (субстрата) увеличивается, что сопровождается усилением проведения нервного импульса. Ингибиторы холинэстеразы используют при лечении мышечных дистрофий. Эффективные антихолинэстеразные препараты — прозерин, эндрофоний и др. (рис. 2-23).

Антиметаболиты как лекарственные препараты

В качестве ингибиторов ферментов по конкурентному механизму в медицинской практике используют вещества, называемые антиметаболитами. Эти соединения, будучи структурными аналогами природных субстратов, вызывают конкурентное ингибирование ферментов, с одной стороны, и, с другой — могут использоваться этими же ферментами в качестве псевдосубстратов, что приводит к синтезу аномальных продуктов. Аномальные продукты не обладают функциональной активностью; в результате наблюдают снижение скорости определённых метаболических путей.

В качестве лекарственных препаратов используют следующие антиметаболиты: сульфаниламидные препараты (аналоги пара-аминобензойной кислоты), применяемые для лечения инфекционных заболеваний (см. раздел 9), аналоги нуклеотидов для лечения онкологических заболеваний (см. раздел 10).



Схема

2. Неконкурентное ингибирование

Неконкурентным называют такое ингибирование ферментативной реакции, при котором ингибитор взаимодействует с ферментом в участке, отличном от активного центра (рис. 2-24). Неконкурентные ингибиторы не являются структурными аналогами субстрата.

Неконкурентный ингибитор может связываться либо с ферментом, либо с фермент-субстратным комплексом, образуя неактивный комплекс. Присоединение неконкурентного ингибитора вызывает изменение конформации молекулы фермента таким образом, что нарушается взаимодействие субстрата с активным центром фермента, что приводит к снижению скорости ферментативной реакции.

Кинетические зависимости

Кинетическая зависимость неконкурентного ингибирования представлена на рис. 2-25. Этот тип ингибирования характеризуется снижением V_{max} ферментативной реакции и уменьшением сродства субстрата к ферменту, т.е. увеличением K_m.

Б. Необратимое ингибирование

Необратимое ингибирование наблюдают в случае образования ковалентных стабильных связей между молекулой ингибитора и фермента. Чаще всего модификации подвергается активный центр фермента. В результате фермент не может выполнять каталитическую функцию.

К необратимым ингибиторам относят ионы тяжёлых металлов, например ртути (Hg^{2+}), серебра (Ag^{+}) и мышьяка (As^{3+}), которые в малых концентрациях блокируют сульфгидрильные группы активного центра. Субстрат при этом не может подвергаться химическому превращению (рис. 2-26). При наличии реактиваторов ферментативная функция восстанавливается. В больших концентрациях ионы тяжёлых металлов вызывают денатурацию белковой молекулы фермента, т.е. приводят к полной инактивации фермента.

1. Специфические и неспецифические ингибиторы

Использование необратимых ингибиторов представляет большой интерес для выяснения механизма действия ферментов. С этой целью применяют вещества, блокирующие определённые группы активного центра ферментов. Такие ингибиторы называют специфическими. Ряд соединений легко вступает в реакции с опреде-

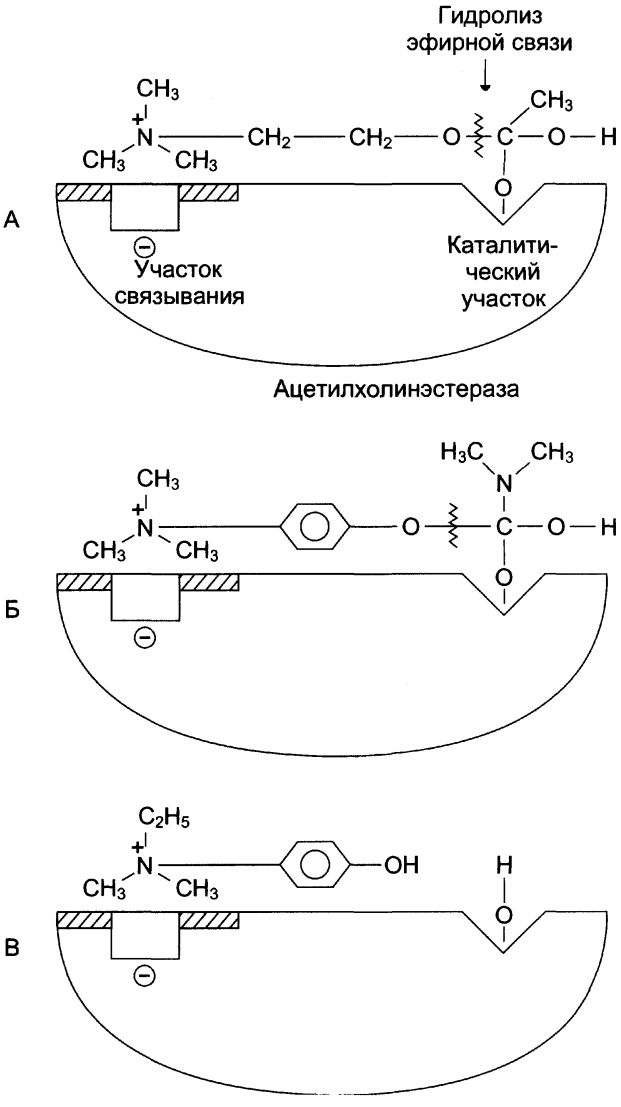


Рис. 2-23. Схема активного центра ацетилхолинэстеразы. А – присоединение ацетилхолина в активном центре фермента. Стрелкой указано место гидролиза эфирной связи в молекуле ацетилхолина; Б – присоединение конкурентного ингибитора — прозерина в активном центре фермента. Указано место гидролиза прозерина, однако реакция идёт намного медленнее, чем с ацетилхолином; В – присоединение конкурентного ингибитора в активном центре фермента — эндрофония. Эндрофоний связывается в активном центре ацетилхолинэстеразы, препятствуя присоединению ацетилхолина.

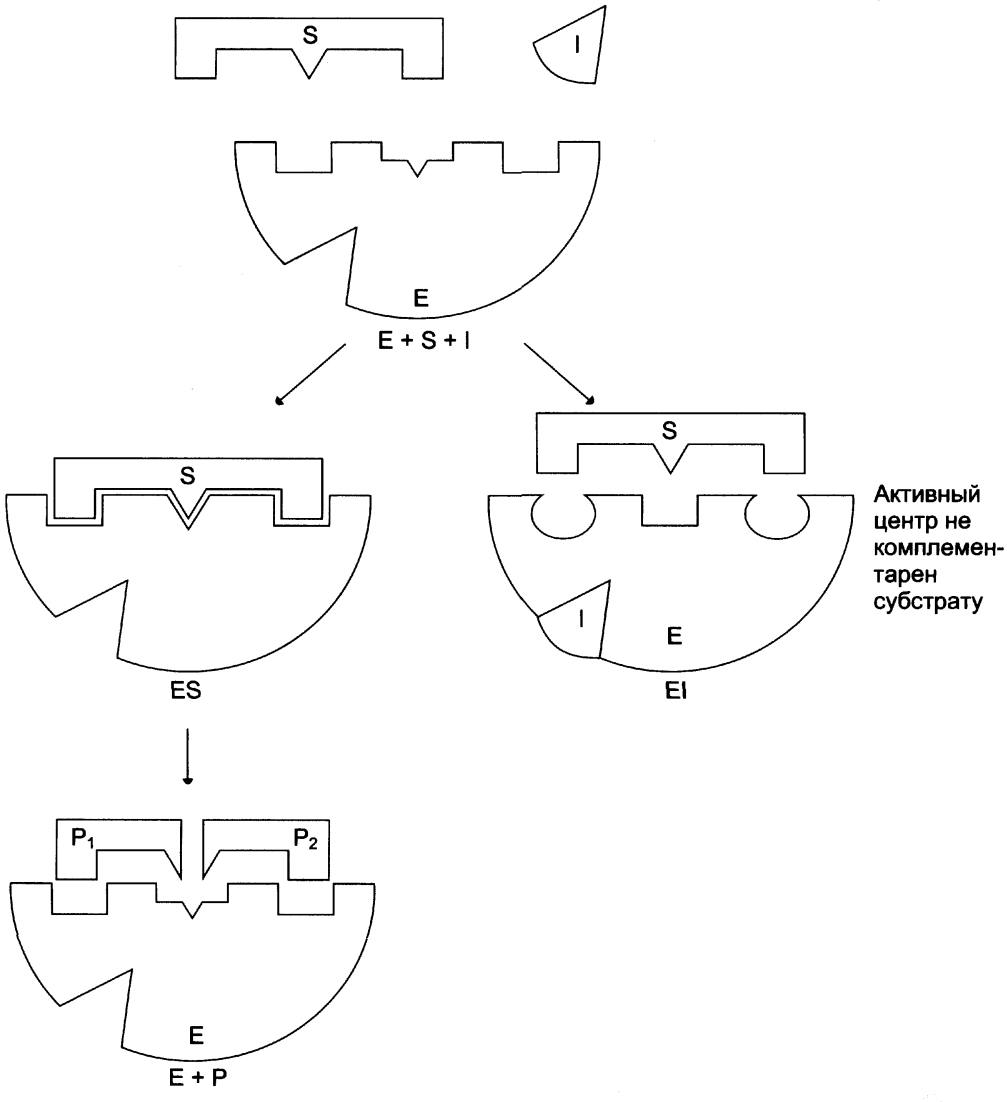


Рис. 2-24. Схема неконкурентного ингибирования активности фермента.

лёнными химическими группами. Если эти группы участвуют в катализе, то происходит полная инактивация фермента.

Роль гидроксильных групп серина в механизме катализа исследуют с помощью фторфосфатов, например диизопропилфторфосфата. Диизопропилфторфосфат (ДФФ) специфически реагирует лишь с одним из многих остатков серина в активном центре фермента. Остаток Сер, способный реагировать с ДФФ, имеет идентичное или очень сходное аминокислотное окружение (табл. 2-2). Высокая реакционная способность этого остатка по сравнению с другими остатками Сер обусловлена аминокислотными остатками, также входящими в активный центр ферментов.

ДФФ относят к специфическим необратимым ингибиторам «сериновых» ферментов, так как он образует ковалентную связь с гидроксильной группой серина, находящегося в активном центре и играющего ключевую роль в процессе катализа (рис. 2-27).

Ацетат йода, п-хлормеркурибензоат легко вступают в реакции с SH-группами остатков цистеина белков (рис. 2-28). Эти ингибиторы не относят к специфичным, так как они

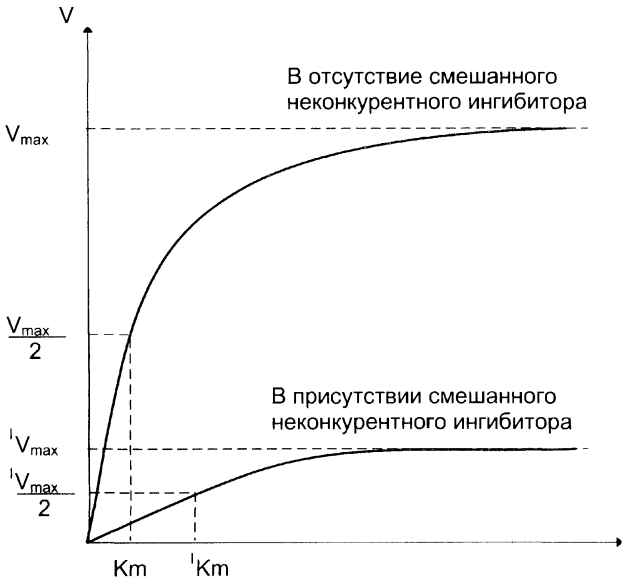


Рис. 2-25. Влияние неконкурентного ингибитора на скорость ферментативной реакции в зависимости от концентрации субстрата. V_{max} — максимальная скорость реакции в отсутствие ингибитора; ${}^{I}V_{max}$ — максимальная скорость реакции в присутствии ингибитора; K_m — константа Михаэлиса в отсутствие ингибитора; ${}^{I}K_m$ — константа Михаэлиса в присутствии ингибитора.

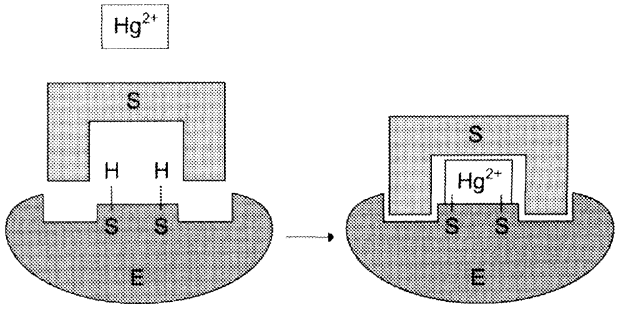


Рис. 2-26. Механизм действия ионов ртути как необратимого ингибитора. Ионы ртути в малых концентрациях блокируют сульфгидрильные группы активного центра, что приводит к снижению скорости ферментативной реакции.

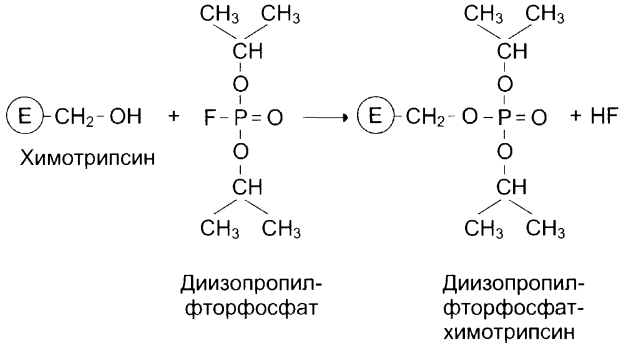


Рис. 2-27. Ингибирование активности химотрипсина с помощью диизопропилфторфосфата.

Таблица 2-2. Исследование последовательности аминокислотных остатков вокруг реакционно-способного остатка серина, взаимодействующего с ДФФ

Фермент	Функция ферментов (подкласс ферментов)	Аминокислотные остатки, находящиеся в окружении реакционно-способного серина в активном центре
Химотрипсин	Протеолитические ферменты	Асп Сер Глу
Трипсин		Асп Сер Глу
Тромбин		Асп Сер Глу
Эластаза		Асп Сер Глу
Холинэстераза	Эстеразы (гидролиз эфирной связи)	Глу Сер Ала
Щелочная фосфатаза		Глу Сер Ала

реагируют с любыми свободными SH-группами белков и называются неспецифическими ингибиторами. Если SH-группы принимают участие непосредственно в катализе, то с помощью этих ингибиторов представляется возможным выявление роли SH-групп фермента в катализе.

2. Необратимые ингибиторы ферментов как лекарственные препараты

Пример лекарственного препарата, действие которого основано на необратимом ингибировании ферментов, — широко используемый препарат аспирин. Противовоспалительный нестероидный препарат аспирин обеспечивает фармакологическое действие за счёт ингибирования фермента циклооксигеназы, катализирующего реакцию образования простагландинов из арахидоновой кислоты. В результате химической реакции ацетильный остаток аспирина присоединяется к свободной концевой NH_2-группе одной из субъединиц циклооксигеназы (см. схему ниже).

Это вызывает снижение образования продуктов реакции простагландинов (см. раздел 8), которые обладают широким спектром биологических функций, в том числе являются медиаторами воспаления.

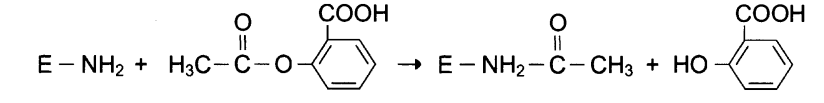
VII. РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Живая клетка — открытая система, постоянно обменивающаяся с внешней средой веществами и энергией: в неё поступают питательные вещества, которые подвергаются превращениям и используются в качестве строительного и энергетического материала, из клетки выводятся конечные продукты метаболизма. В многоклеточном организме клетка реагирует не только на изменение окружающей среды, но и на функциональную активность соседних клеток. При этом она стремится сохранить неизменным свой внутренний состав. Это состояние называют стационарным или клеточным гомеостазом.

В клетке постоянно происходит большое количество разнообразных химических реакций, которые формируют метаболические пути — последовательное превращение одних соединений в другие. Метаболизм — совокупность всех метаболических путей, протекающих в клетках организма.

Среди всех метаболических путей, протекающих в организме, выделяют противоположно направленные процессы: катаболизм и анаболизм. Катаболизм — распад сложных веществ до простых с высвобождением энергии. Анабо-

Схема



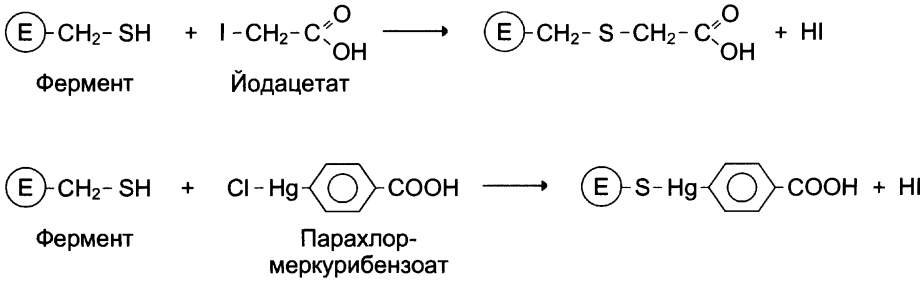


Рис. 2-28. Ингибирование активности ферментов вследствие ковалентной модификации остатков цистеина.

лизм — синтез из простых более сложных веществ. Метаболические пути согласованы между собой по месту, времени и интенсивности протекания. Эта согласованность протекания всех процессов обеспечивается сложными и многообразными механизмами регуляции.

А. Организация химических реакций в метаболические пути

Оптимальная активность ферментов, катализирующих реакции одного метаболического пути, достигается благодаря определённой пространственной организации в клетке.

1. Пространственная локализация ферментов

Большинство ферментов имеет внутриклеточную локализацию и распределены в организме неравномерно. Все ферменты одного метаболического пути, как правило, находятся в одном отделе клетки. Особенно разделение метаболических путей важно для противоположно направленных катаболических и анаболических процессов. Например, синтез жирных кислот происходит в цитоплазме, а их распад в митохондриях. Если бы такого разделения не существовало, образовывались бы бесполезные с функциональной и энергетической точки зрения пути.

В метаболических путях продукт первой ферментативной реакции служит субстратом второй и так далее до формирования конечного продукта. Промежуточные продукты метаболического пути могут высвобождаться из последовательности реакций и использоваться в других метаболических путях, т.е. метаболические пути связаны между собой промежуточными продуктами.

В ряде случаев пространственная организация ферментов настолько сильно выражена, что продукт реакции ни при каких условиях не может быть вычленен из метаболического пути и обязательно служит субстратом следующей реакции. Такая организация метаболического пути носит название мультиферментного комплекса и возникает в результате структурно-функциональной организации ферментов. Обычно такие комплексы связаны с мембранами. В качестве примеров мультиферментных комплексов можно привести пируватдегидрогеназный комплекс, под действием которого происходит окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты (пирувата) (см. раздел 6), синтазу жирных кислот, катализирующую синтез пальмитиновой кислоты (см. раздел 8).

2. Структура метаболических путей

Структура метаболических путей в клетке крайне разнообразна (см. табл. 2-3). В случае, когда субстрат в результате ряда ферментативных процессов превращается в один продукт, такой путь носит название линейного метаболического пути. Часто встречаются разветвлённые метаболические пути, приводящие к синтезу различных конечных продуктов в зависимости от потребности клетки. В процессе изучения курса биологической химии вы также познакомитесь с циклическими и спиральными метаболическими путями.

Органоспецифичность

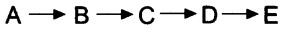
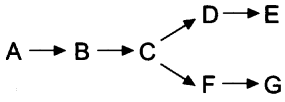
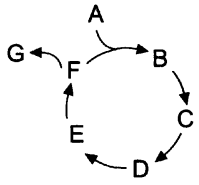
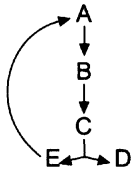
Ферментный состав различных клеток неодинаков. Ферменты, выполняющие функцию жизнеобеспечения клетки, находятся во всех клетках организма. В процессе дифференцировки клеток происходит изменение ферментного состава клеток. Так, фермент аргиназа, участвующий в синтезе мочевины, находится только в клетках печени, а кислая фосфатаза, участвующая в гидролизе моноэфиров ортофосфорной кислоты, — в клетках простаты. Это так называемые органоспецифичные ферменты.

Если говорить об узко специализированных клетках, то ферментов, выполняющих функции в этих клетках, находится больше, чем в других клетках. Например, в клетках сердечной мышцы имеется повышенное количество ферментов креатинкиназы и аспартатаминотрансферазы, в клетках печени — аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы, в остеобластах — щелочной фосфатазы и т.д.

Компартментализация

Клетка — сложнофункциональная система, регулирующая своё жизнеобеспечение. Многообразие функций клетки обеспечивается пространственной и временной (в первую очередь, в зависимости от ритма питания) регуляцией определённых метаболических путей. Пространственная регуляция связана со строгой локализацией определённых ферментов в различных

Таблица 2-3. Типы метаболических путей

Схема	Название	Пример
	Линейный	Гликолиз
	Разветвлённый	Синтез нуклеотидов
	Циклический	Цикл трикарбоновых кислот
		Синтез мочевины
	Спиральный	β-окисление жирных кислот

органеллах. Так, в ядре находятся ферменты, связанные с синтезом молекул ДНК и РНК, в цитоплазме — ферменты гликолиза, в лизосомах — гидролитические ферменты, в матриксе митохондрий — ферменты ЦТК, во внутренней мембране митохондрий — ферменты цепи переноса электронов и т.д. (рис. 2-29). Такая субклеточная локализация ферментов способствует упорядоченности биохимических процессов и увеличивает скорость обмена веществ.

Б. Принципы регуляции метаболических путей

Все химические реакции в клетке протекают при участии ферментов. Поэтому, чтобы воздействовать на скорость протекания метаболического пути, достаточно регулировать количество или активность ферментов. Обычно в метаболических путях есть ключевые ферменты, благодаря которым происходит регуляция скорости всего пути. Эти ферменты (один или несколько в метаболическом пути) называются регуляторными ферментами; они катализируют, как правило, начальные реакции метаболического пути, необратимые реакции, скорость-лимитирующие реакции (самые медленные) или реакции в месте переключения метаболического пути (точки ветвления).

Регуляция скорости ферментативных реакций осуществляется на 3 независимых уровнях:

- изменением количества молекул фермента;
- доступностью молекул субстрата и кофермента;
- изменением каталитической активности молекулы фермента.

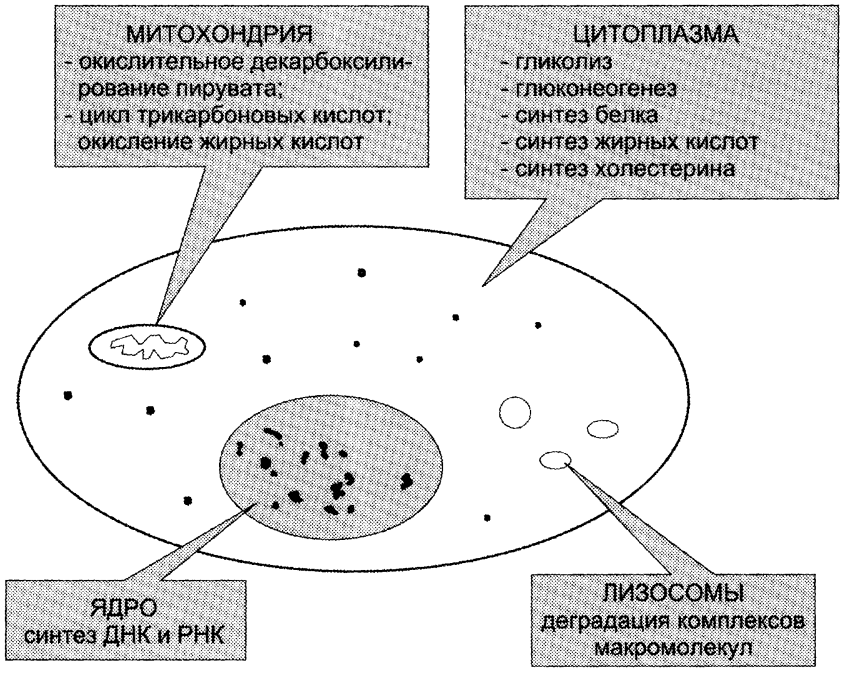


Рис. 2-29. Внутриклеточная локализация ферментов.

1. Регуляция количества молекул фермента в клетке

Известно, что белки в клетке постоянно обновляются. Количество молекул фермента в клетке определяется соотношением 2 процессов — синтеза и распада белковой молекулы фермента:

Синтез и фолдинг белка — многостадийный процесс. Регуляция синтеза белка может происходить на любой стадии формирования белковой молекулы. Наиболее изучен механизм регуляции синтеза белковой молекулы на уровне транскрипции, который осуществляется определёнными метаболитами, гормонами и рядом биологически активных молекул (см. раздел 4).

Что касается распада ферментов, то регуляция этого процесса менее изучена. Можно только предполагать, что это не просто процесс протеолиза (разрушения белковой молекулы), а сложный механизм, возможно, определяемый на генетическом уровне.

2. Регуляция скорости ферментативной реакции доступностью молекул субстрата и коферментов

Важный параметр, контролирующий протекание метаболического пути, — наличие субстратов, и главным образом — наличие первого субстрата. Чем больше концентрация исходного субстрата, тем выше скорость метаболического пути.

Другой параметр, лимитирующий протекание метаболического пути, — наличие регенерированных коферментов. Например, в реакциях дегидрирования коферментом дегидрогеназ служат окисленные формы NAD^+, FAD, FMN, которые восстанавливаются в ходе реакции. Чтобы коферменты вновь участвовали в реакции, необходима их регенерация, т.е. превращение в окисленную форму.

3. Регуляция каталитической активности ферментов

Важнейшее значение в изменении скорости метаболических путей играет регуляция ката-

литической активности одного или нескольких ключевых ферментов данного метаболического пути. Это высокоэффективный и быстрый способ регуляции метаболизма.

Основные способы регуляции активности ферментов:

- аллостерическая регуляция;
- регуляция с помощью белок-белковых взаимодействий;
- регуляция путём фосфорилирования/дефосфорилирования молекулы фермента;
- регуляция частичным (ограниченным) протеолизом.

Аллостерическая регуляция

Аллостерическими ферментами называют ферменты, активность которых регулируется не только количеством молекул субстрата, но и другими веществами, называемыми эффекторами. Участвующие в аллостерической регуляции эффекторы — клеточные метаболиты часто именно того пути, регуляцию которого они осуществляют.

Роль аллостерических ферментов в метаболизме клетки. Аллостерические ферменты играют важную роль в метаболизме, так как они чрезвычайно быстро реагируют на малейшие изменения внутреннего состояния клетки. Аллостерическая регуляция имеет большое значение в следующих ситуациях:

- при анаболических процессах. Ингибирование конечным продуктом метаболического пути и активация начальными метаболитами позволяют осуществлять регуляцию синтеза этих соединений;
- при катаболических процессах. В случае накопления АТФ в клетке происходит ингибирование метаболических путей, обеспечивающих синтез энергии. Субстраты при этом расходуются на реакции запасания резервных питательных веществ;
- для координации анаболических и катаболических путей. АТФ и АДФ — аллостерические эффекторы, действующие как антагонисты;
- для координации параллельно протекающих и взаимосвязанных метаболических путей (например, синтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, используемых для синтеза нуклеиновых кислот). Таким образом, конечные продукты одного метаболического пути могут быть аллостерическими эффекторами другого метаболического пути.

Аллостерические эффекторы. Эффектор, вызывающий снижение (ингибирование) активности фермента, называют отрицательным эффектором, или ингибитором. Эффектор, вызывающий повышение (активацию) активности ферментов, называют положительным эффектором, или активатором.

Аллостерическими эффекторами часто служат различные метаболиты. Конечные продукты метаболического пути — часто ингибиторы аллостерических ферментов, а исходные вещества — активаторы. Это так называемая гетеротропная регуляция. Такой вид аллостерической регуляции очень распространён в биологических системах.

Более редкий случай аллостерической регуляции, когда сам субстрат может выступать в качестве положительного эффектора. Такая регуляция называется гомотропной (эффектор и субстрат — одно и то же вещество). Эти ферменты имеют несколько центров связывания для субстрата, которые могут выполнять двойную функцию: каталитическую и регуляторную. Аллостерические ферменты такого типа используются в ситуации, когда субстрат накапливается в избытке и должен быстро преобразоваться в продукт.

Выявить ферменты с аллостерической регуляцией можно, изучая кинетику этих ферментов. Эти ферменты не подчиняются законам Михаэлиса–Ментен, они имеют характерную S-образную кривую зависимости скорости реакции от концентрации субстрата.

Особенности строения и функционирования аллостерических ферментов:

- обычно это олигомерные белки, состоящие из нескольких протомеров или имеющие доменное строение;
- они имеют аллостерический центр, пространственно удалённый от каталитического активного центра;
- эффекторы присоединяются к ферменту нековалентно в аллостерических (регуляторных) центрах;
- аллостерические центры, так же, как и каталитические, могут проявлять различную

специфичность по отношению к лигандам: она может быть абсолютной и групповой. Некоторые ферменты имеют несколько аллостерических центров, одни из которых специфичны к активаторам, другие — к ингибиторам.

- протомер, на котором находится аллостерический центр, — регуляторный протомер, в отличие от каталитического протомера, содержащего активный центр, в котором проходит химическая реакция;
- аллостерические ферменты обладают свойством кооперативности: взаимодействие аллостерического эффектора с аллостерическим центром вызывает последовательное кооперативное изменение конформации всех субъединиц, приводящее к изменению конформации активного центра и изменению сродства фермента к субстрату, что снижает или увеличивает каталитическую активность фермента (рис. 2-30);
- регуляция аллостерических ферментов обратима: отсоединение эффектора от регуляторной субъединицы восстанавливает исходную каталитическую активность фермента;
- аллостерические ферменты катализируют ключевые реакции данного метаболического пути.

Локализация аллостерических ферментов в метаболическом пути. Скорость метаболических процессов зависит от концентрации веществ, использующихся и образующихся в данной цепи реакций. Такая регуляция представля-

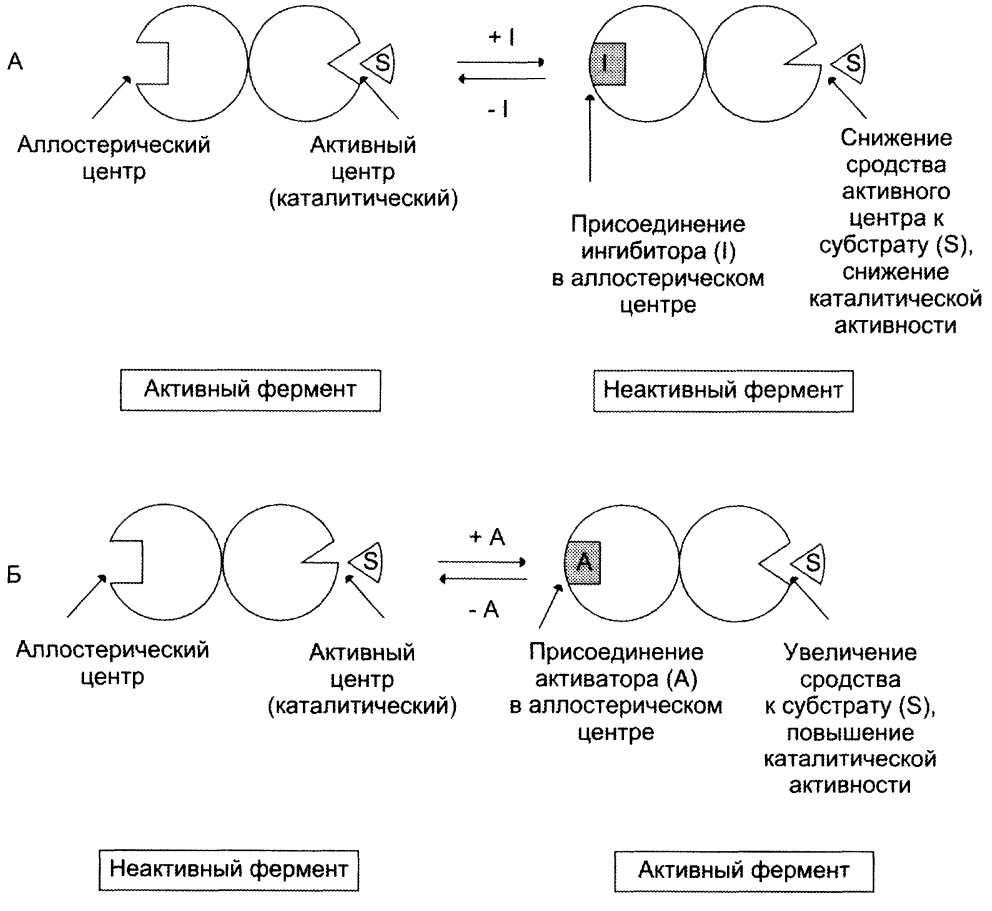
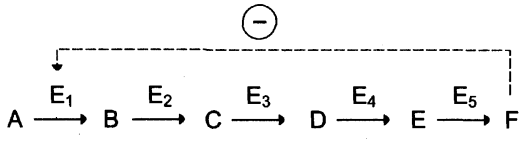


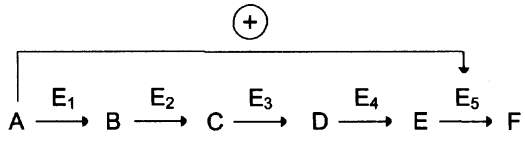
Рис. 2-30. Схема, поясняющая работу аллостерического фермента. А — действие отрицательного эффектора (ингибитора); Б — действие положительного эффектора (активатора).

ется логичной, так как при накоплении конечного продукта он (конечный продукт) может действовать как аллостерический ингибитор фермента, катализирующего чаще всего начальный этап данного метаболического пути:



Фермент, катализирующий превращение субстрата A в продукт B, имеет аллостерический центр для отрицательного эффектора, которым служит конечный продукт метаболического пути F. Если концентрация F увеличивается (т.е. вещество F синтезируется быстрее, чем расходуется), ингибируется активность одного из начальных ферментов. Такую регуляцию называют отрицательной обратной связью, или ретроингибированием. Отрицательная обратная связь — часто встречающийся механизм регуляции метаболизма в клетке.

В центральных метаболических путях исходные вещества могут быть активаторами ключевых ферментов метаболического пути. Как правило, при этом аллостерической активации подвергаются ферменты, катализирующие ключевые реакции заключительных этапов метаболического пути:



В качестве примера можно рассмотреть принципы регуляции гликолиза — специфического (начального) пути распада глюкозы (рис. 2-31). Один из конечных продуктов распада глюкозы — молекула АТФ. При избытке в клетке АТФ происходит ретроингибирование аллостерических ферментов фосфофруктокиназы и пируваткиназы. При образовании большого количества фруктозо-1,6-бисфосфата наблюдают аллостерическую активацию фермента пируваткиназы.

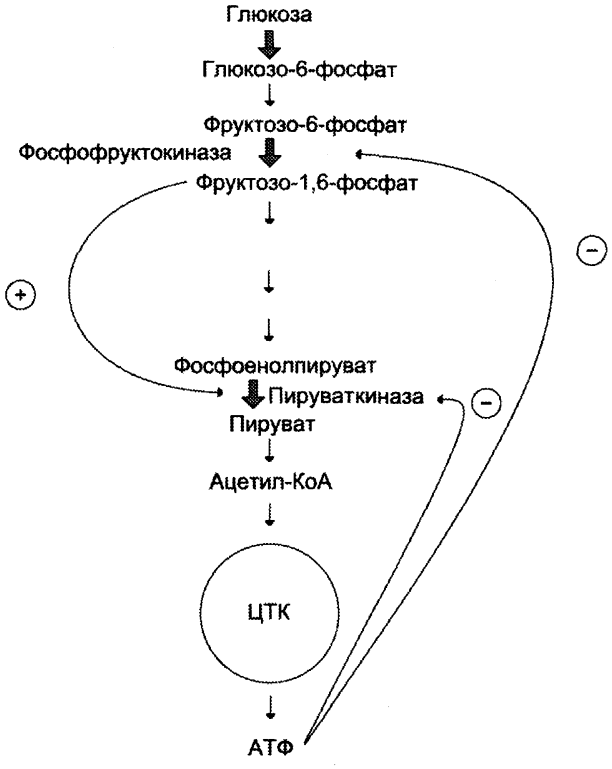


Рис. 2-31. Схема положительной и отрицательной регуляции катаболизма глюкозы. Молекула АТФ участвует в ретроингибировании аллостерических ферментов фосфофруктокиназы и пируваткиназы. Фруктозо-1,6-бисфосфат — активатор метаболического пути распада глюкозы. Плюсами отмечена активация, минусами — ингибирование ферментов.

Благодаря такой регуляции осуществляется слаженность протекания метаболического пути распада глюкозы.

Регуляция каталитической активности ферментов белок-белковыми взаимодействиями. Некоторые ферменты изменяют свою каталитическую активность в результате белок-белковых взаимодействий. Рассмотрим 2 механизма активации ферментов с помощью белок-белковых взаимодействий:

- активация ферментов в результате присоединения регуляторных белков;
- изменение каталитической активности ферментов вследствие ассоциации или диссоциации протомеров фермента.

Активация ферментов в результате присоединения регуляторных белков. Этот тип регуляции можно рассмотреть на примере активации

фермента аденилатциклазы, локализованной в плазматической мембране клетки.

Активный центр аденилатциклазы локализован на цитоплазматической стороне плазматической мембраны. Активированная аденилатциклаза катализирует реакцию образования из АТФ циклического 3′,5′-АМФ (цАМФ) — вторичного, внутриклеточного посредника действия гормонов (см. схему ниже).

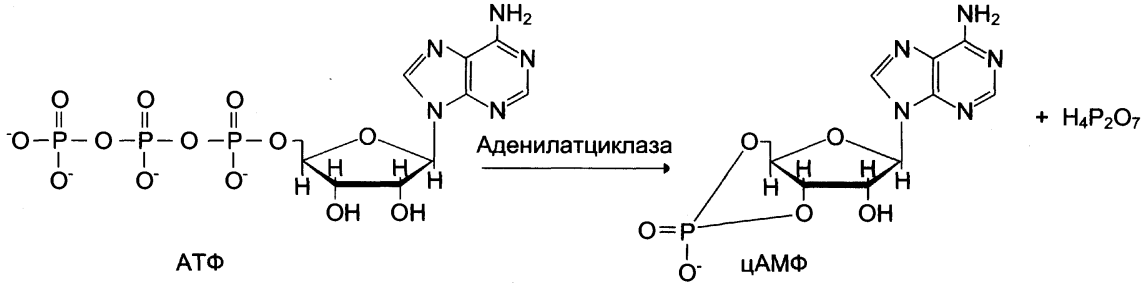
В мембране аденилатциклаза функционирует в комплексе с другими белками:

- рецептором гормона, выступающего во внеклеточную среду и взаимодействующего с гормонами;
- с G-белком, занимающим промежуточное положение между рецептором и ферментом аденилатциклазой. G-белок — олигомерный белок, состоящий из 3 субъединиц — α, β, γ. α-Субъединица имеет центр связывания и расщепления ГТФ. Поэтому этот белок называется ГТФ-связывающим белком, или G-белком;
- в результате связывания гормона с рецептором происходит изменение конформации G-белка, уменьшение его сродства к молекуле ГДФ, с которой он связан в отсутствие гормонального сигнала, и увеличение сродства к ГТФ. Присоединение ГТФ вызывает конформационные изменения в G-белке и диссоциацию его на субъединицы: субъединицу α, связанную с ГТФ (α-ГТФ), димер βγ;
- α-ГТФ имеет высокое сродство к аденилатциклазе, его присоединение приводит к активации последней, поэтому α-ГТФ — регуляторный белок, а данный механизм активации аденилатциклазы называют активацией ферментов в результате присоединения регуляторных белков (рис. 2-32).

Регуляция каталитической активности ферментов ассоциацией/диссоциацией протомеров

Протеинкиназы — группа ферментов, катализирующих перенос остатка фосфорной кислоты с АТФ на специфические ОН-группы аминокислотных остатков белков (вызывают фосфорилирование белков). Механизмы активации различных протеинкиназ неодинаковы. В качестве примера регуляции каталитической активности ферментов ассоциацией или диссоциацией протомеров можно привести регуляцию активности фермента протеинкиназы А.

Протеинкиназа А (цАМФ-зависимая) состоит из 4 субъединиц 2 типов: 2 регуляторных (R) и 2 каталитических (C). Такой тетрамер не обладает каталитической активностью. Регуляторные субъединицы имеют участки связывания для циклического 3′,5′-АМФ (цАМФ), по 2 на каждую субъединицу. Присоединение 4 молекул цАМФ к 2 регуляторным субъединицам приводит к изменению конформации регуляторных протомеров и к диссоциации тетрамерного комплекса, при этом высвобождаются 2 активные каталитические субъединицы (рис. 2-32). Такой механизм регуляции обратим. Отщепление молекул цАМФ от регуляторных субъединиц приведёт к ассоциации регуляторных и каталитических субъединиц протеинкиназы А с образованием неактивного комплекса.



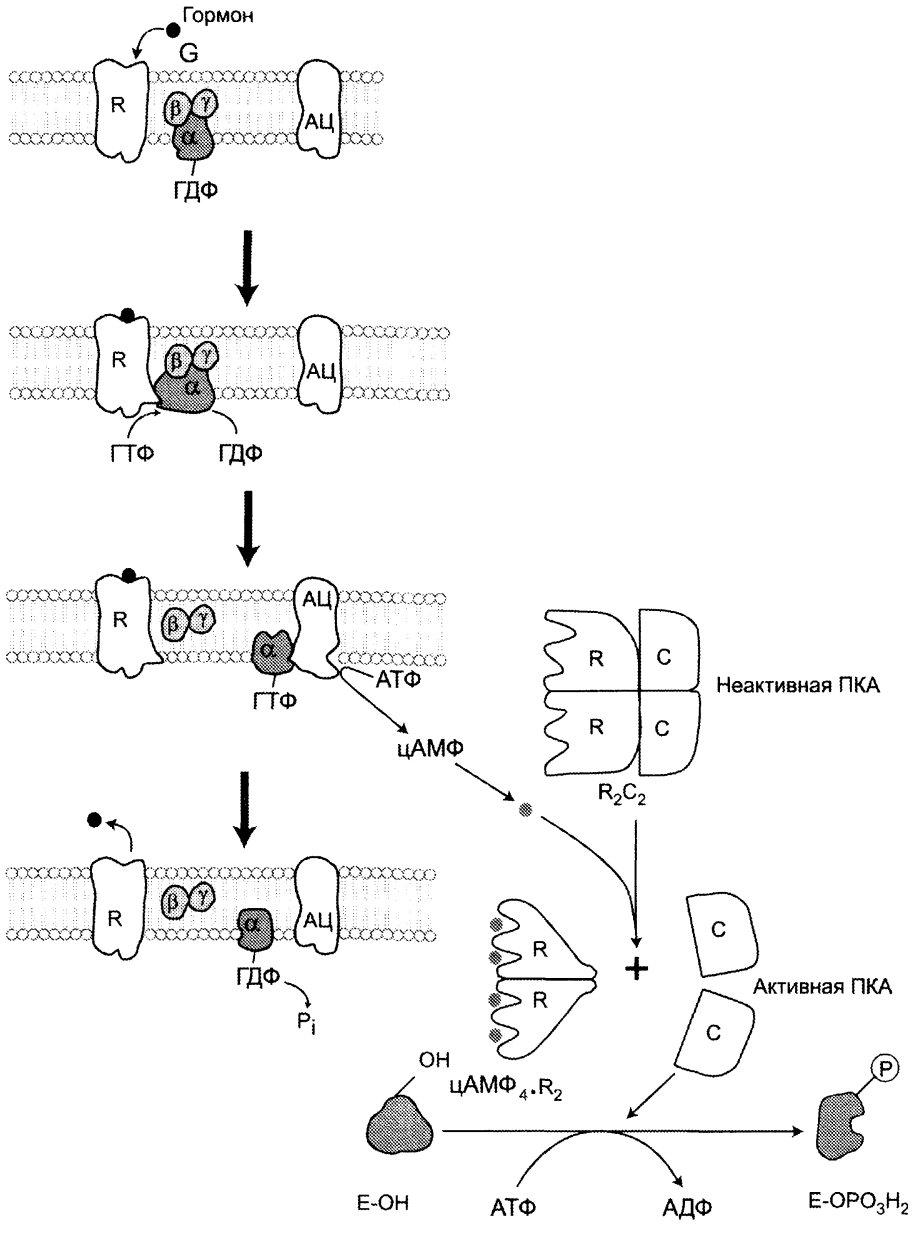


Рис. 2-32. Регуляция активности аденилатциклазы. Гормон (Г), взаимодействуя с рецептором (R) на поверхности клеток, приводит к уменьшению сродства ГТФ-связывающего белка (G-белка, состоящего из протомеров α, β, γ) к ГТФ и увеличению сродства к ГТФ. Присоединение молекулы ГТФ к активному центру G-белка вызывает диссоциацию комплекса на субъединицы α-ГТФ и димер βγ. Комплекс α-ГТФ активирует аденилатциклазу, что способствует синтезу из АТФ внутриклеточных регуляторных молекул цАМФ. АЦ — аденилатциклаза, ПКА — протеинкиназа А, P_i — H_3PO_4.

Регуляция каталитической активности ферментов путём фосфорилирования/дефосфорилирования

В биологических системах часто встречается механизм регуляции активности ферментов с помощью ковалентной модификации аминокислотных остатков. Быстрый и широко распространённый способ химической модификации ферментов — фосфорилирование/дефосфорилирование. Модификации подвергаются ОН-группы фермента. Фосфорилирование осуществляется ферментами протеинкиназами, а дефосфорилирова-

ние — фосфопротеинфосфатазами. Присоединение остатка фосфорной кислоты приводит к изменению конформации активного центра и его каталитической активности. При этом результат может быть двояким: одни ферменты при фосфорилировании активируются, другие, напротив, становятся менее активными (рис. 2-33).

Изменение активности фермента, вызванное фосфорилированием, обратимо. Отщепление остатка фосфорной кислоты осуществляется ферментами фосфопротеинфосфатазами. Активность протеинкиназ и фосфопротеинфосфатаз регулируется гормонами, что позволяет быстро изменять активность ключевых ферментов метаболических путей в зависимости от условий внешней среды. Антагонистичные по функции гормоны противоположным образом влияют на фосфорилирование/дефосфорилирование ферментов, вызывая противоположные эффекты изменения метаболизма клетки.

Например, под действием глюкагона (в период между приёмами пищи) в клетках происходит уменьшение синтеза энергетического материала — жира, гликогена и усиление его распада (мобилизация), вызванного фосфорилированием ключевых ферментов этих процессов. А под действием инсулина (во время пищеварения), наоборот, активируется синтез гликогена и ингибируется его распад, так как взаимодействие инсулина с рецептором активирует сигнальный путь, приводящий к дефосфорилированию тех же ключевых ферментов.

Регуляция каталитической активности ферментов частичным (ограниченным) протеолизом

Некоторые ферменты, функционирующие вне клеток (в ЖКТ или в плазме крови), синтезируются в виде неактивных предшественников и активируются только в результате гидролиза одной или нескольких определённых пептидных связей, что приводит к отщеплению части белковой молекулы предшественника. В результате в оставшейся части белковой молекулы происходит конформационная перестройка и формируется активный центр фермента.

Рассмотрим механизм частичного протеолиза на примере активации протеолитического фермента трипсина (рис. 2-34). Трипсиноген, синтезируемый в поджелудочной железе, при пищеварении по протокам поджелудочной железы поступает в двенадцатиперстную кишку, где и активируется путём частичного протеолиза под действием фермента кишечника энтеропептидазы. В результате отщепления гексапептида с N-конца формируется активный центр в оставшейся части молекулы. Следует напом-

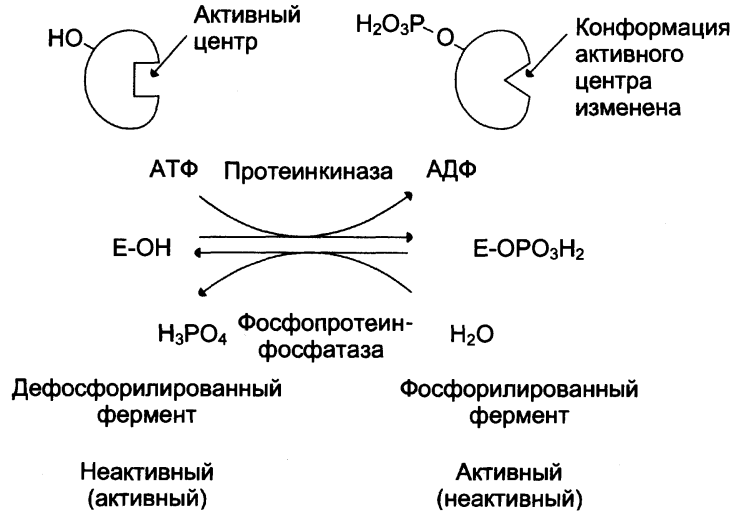


Рис. 2-33. Регуляция активности ферментов фосфорилированием/дефосфорилированием.

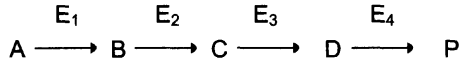
нить, что трипсин относят к семейству «сериновых» протеаз — активный центр фермента содержит функционально важный остаток Сер.

Частичный протеолиз — пример регуляции, когда активность фермента изменяется необратимо. Такие ферменты функционируют, как правило, в течение короткого времени, определяемого временем жизни белковой молекулы. Частичный протеолиз лежит в основе активации протеолитических ферментов, белков свёртывающей системы крови и фибринолиза, белков системы комплемента, а также пептидных гормонов.

VIII. ЭНЗИМОПАТИИ

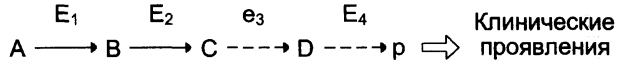
В основе многих заболеваний лежат нарушения функционирования ферментов в клетке — энзимопатии. Различают первичные (наследственные) и вторичные (приобретённые) энзимопатии. Приобретённые энзимопатии, как и вообще протеинопатии, по-видимому, наблюдают при всех болезнях.

При первичных энзимопатиях дефектные ферменты наследуются, в основном, по аутосомно-рецессивному типу. Гетерозиготы, чаще всего, не имеют фенотипических отклонений. Первичные энзимопатии обычно относят к метаболическим болезням, так как происходит нарушение определённых метаболических путей. При этом развитие заболевания может протекать по одному из ниже перечисленных «сценариев». Рассмотрим условную схему метаболического пути:



Вещество А в результате последовательных ферментативных реакций превращается в продукт Р. При наследственной недостаточности какого-либо фермента, например фермента E_3, возможны разные нарушения метаболических путей:

Нарушение образования конечных продуктов. Недостаток конечного продукта этого метаболического пути (Р) (при отсутствии альтернативных путей синтеза) может приводить к развитию клинических симптомов, характерных для данного заболевания:



Клинические проявления. В качестве примера можно рассмотреть альбинизм. При альбинизме нарушен синтез в меланоцитах пигментов — меланинов. Меланин находится в коже, волосах, радужке, пигментном эпителии сетчатки глаза и влияет на их окраску. При альбинизме наблюдают слабую пигментацию кожи, светлые волосы, красноватый цвет радужки глаза из-за просвечивающих капилляров. Проявление альбинизма связано с недостаточностью фермента тирозингидроксилазы (тирозиназы) — одного из ферментов, катализирующего метаболический путь образования меланинов (см. раздел 9).

Накопление субстратов—предшественников. При недостаточности фермента E_3 будут накапливаться вещество С, а также во многих случаях и предшествующие соединения. Увеличение субстратов—предшественников дефектного фермента — ведущее звено развития многих заболеваний:

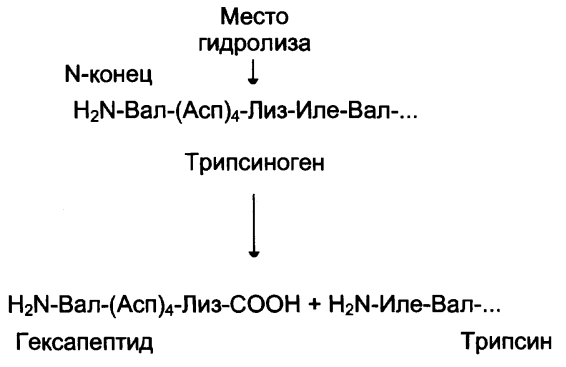
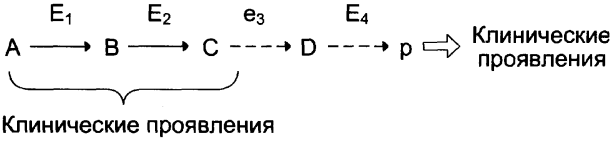


Рис. 2-34. Активация трипсина частичным протеолизом. Под действием фермента кишечника энтеропептидазы происходит гидролиз пептидной связи Лиз-Иле. В результате отщепления гексапептида с N-конца формируется активный центр в оставшейся части молекулы.

Клинические проявления. Известно заболевание алкаптонурия, при котором нарушено окисление гомогентизиновой кислоты в тканях (гомогентизиновая кислота — промежуточный метаболит катаболизма тирозина). У таких больных наблюдают недостаточность фермента окисления гомогентизиновой кислоты — диоксигеназы гомогентизиновой кислоты, приводящей к развитию заболевания. В результате увеличиваются концентрация гомогентизиновой кислоты и выведение её с мочой. В присутствии кислорода гомогентизиновая кислота превращается в соединение чёрного цвета — алкаптон. Поэтому моча таких больных на воздухе окрашивается в чёрный цвет. Алкаптон также образуется и в биологических жидкостях, оседая в тканях, коже, сухожилиях, суставах. При значительных отложениях алкаптона в суставах нарушается их подвижность.

Нарушение образования конечных продуктов и накопление субстратов предшественников. Отмечают заболевания, когда одновременно недостаток продукта и накопление исходного субстрата вызывают клинические проявления.



Клинические проявления. Например, у людей с болезнью Гирке (гликогеноз I типа) наблюдают снижение концентрации глюкозы в крови (гипогликемия) в перерывах между приёмами пищи. Это связано с нарушением распада гликогена в печени и выходом из неё глюкозы вследствие дефекта фермента глюкозо-6-фосфатфосфатазы (см. раздел 7). Одновременно у таких людей увеличиваются размеры печени (гепатомегалия) вследствие накопления в ней не используемого гликогена.

IX. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ

Ферментные препараты широко используют в медицине. Ферменты в медицинской практике находят применение в качестве диагностических (энзимодиагностика) и терапевтических (энзимотерапия) средств. В этом разделе мы остановимся на основных принципах энзимодиагностики и энзимотерапии.

Кроме того, ферменты используют в качестве специфических реактивов для определения ряда веществ. Так, глюкозооксидазу применяют для количественного определения глюкозы в моче и крови. Фермент уреазу используют для определения содержания количества мочевины в крови и моче. С помощью различных дегидрогеназ обнаруживают соответствующие субстраты, например пируват, лактат, этиловый спирт и др.

А. Энзимодиагностика

Энзимодиагностика заключается в постановке диагноза заболевания (или синдрома) на основе определения активности ферментов в биологических жидкостях человека. Принципы энзимодиагностики основаны на следующих позициях:

- при повреждении клеток в крови или других биологических жидкостях (например, в моче) увеличивается концентрация внутриклеточных ферментов повреждённых клеток;
- количество высвобождаемого фермента достаточно для его обнаружения;
- активность ферментов в биологических жидкостях, обнаруживаемых при повреждении клеток, стабильна в течение достаточно длительного времени и отличается от нормальных значений;
- ряд ферментов имеет преимущественную или абсолютную локализацию в определённых органах (органоспецифичность);
- существуют различия во внутриклеточной локализации ряда ферментов.

1. Причины, приводящие к увеличению количества ферментов в крови

Ферменты плазмы крови можно разделить на 2 группы. Первая, относительно небольшая группа ферментов активно секретируется в плазму крови определёнными органами. Например, печень синтезирует неактивные предшественники ферментов свёртывающей системы крови. Ко второй относят большую группу ферментов, высвобождающихся из клеток во время их

нормального функционирования. Обычно эти ферменты выполняют свою функцию внутри клетки и не имеют физиологического значения в плазме крови. У здорового человека активность этих ферментов в плазме низкая и достаточно постоянная, так как постоянно соотношение скоростей высвобождения их из клеток и скоростей разрушения.

При многих заболеваниях происходит повреждение клеток, и их содержимое, в том числе и ферменты, высвобождаются в кровь. К причинам, вызывающим высвобождение внутриклеточного содержимого в кровь, относят нарушение проницаемости мембраны клеток (при воспалительных процессах) или нарушение целостности клеток (при некрозе). Определение в крови активности ряда ферментов хорошо налажено в биохимических лабораториях, что используют для диагностики заболеваний сердца, печени, скелетной мускулатуры и других тканей. Уровень активности ферментов в плазме коррелирует со степенью повреждения клеток.

Для энзимодиагностики имеют большое значение знания о субклеточной локализации ферментов. Так, появление в плазме крови ферментов, имеющих только цитозольную локализацию, свидетельствует о воспалительном процессе; при обнаружении митохондриальных или ядерных ферментов можно говорить о более глубоких повреждениях клетки, например о некрозе.

Однако повышение концентрации ферментов не всегда связано с повреждением тканей. При избыточной клеточной пролиферации, например при онкопролиферативных процессах, при повышенной скорости синтеза некоторых ферментов в клетках или при нарушенном клиренсе (способности выводиться почками) наблюдают повышение концентрации в крови определённых ферментов. Врачам следует учитывать, что нормальные значения активности ферментов в крови детей и беременных женщин отличаются от показателей, характерных для взрослых здоровых людей.

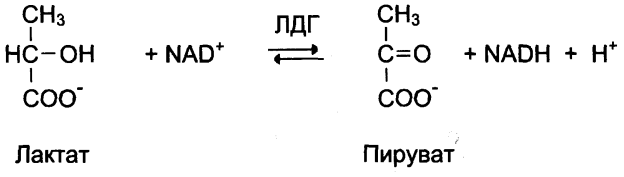
2. Изоферменты

Ферменты, катализирующие одну и ту же химическую реакцию, но отличающиеся по первичной структуре белка, называют изоферментами, или изоэнзимами. Они катализируют один и тот же тип реакции с принципиально одинаковым механизмом, но отличаются друг от друга кинетическими параметрами, условиями активации, особенностями связи апофермента и кофермента.

Природа появления изоферментов разнообразна, но чаще всего обусловлена различиями в структуре генов, кодирующих эти изоферменты. Следовательно, изоферменты различаются по первичной структуре белковой молекулы и, соответственно, по физико-химическим свойствам. На различиях в физико-химических свойствах основаны методы определения изоферментов.

По своей структуре изоферменты в основном являются олигомерными белками. Причём та или иная ткань преимущественно синтезирует определённые виды протомеров. В результате определённой комбинации этих протомеров формируются ферменты с различной структурой — изомерные формы. Обнаружение определённых изоферментных форм ферментов позволяет использовать их для диагностики заболеваний.

Изоформы лактатдегидрогеназы. Фермент лактатдегидрогеназа (ЛДГ) катализирует обратимую реакцию окисления лактата (молочной кислоты) до пирувата (пировиноградной кислоты) (см. раздел 7).



Лактатдегидрогеназа — олигомерный белок с молекулярной массой 134 000 Д, состоящий из 4 субъединиц 2 типов: М (от англ. *muscle* — мышца) и Н (от англ. *heart* — сердце). Комбинация этих субъединиц лежит в основе формирования 5 изоформ лактатдегидрогеназы (рис. 2-35, А). $ЛДГ_1$ и $ЛДГ_2$ наиболее активны в сердечной мышце и почках, $ЛДГ_4$ и $ЛДГ_5$ — в скелетных мышцах и печени. В остальных тканях имеются различные формы этого фермента.

- Изоформы ЛДГ отличаются электрофоретической подвижностью, что позволяет устанавливать тканевую принадлежность изоформ ЛДГ (рис. 2-35, Б).

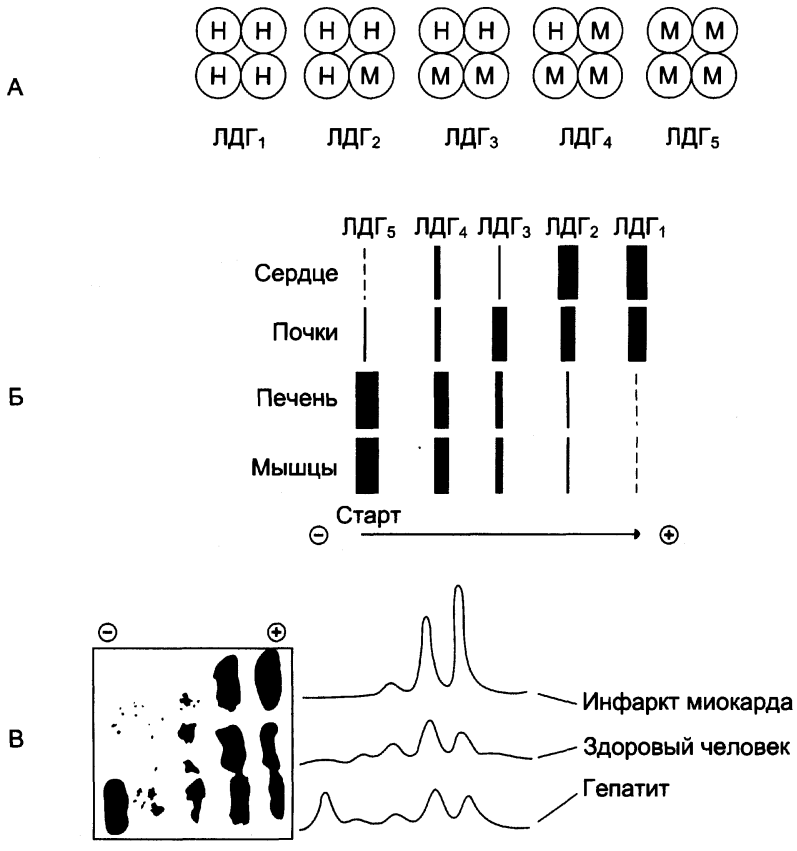
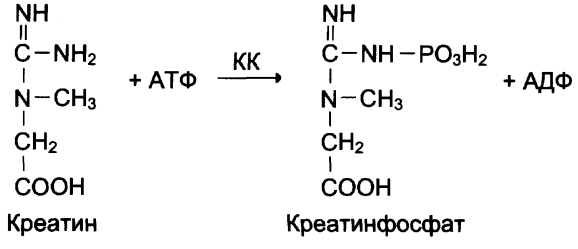


Рис. 2-35. Изоформы лактатдегидрогеназы. А — строение различных изоформ ЛДГ; Б — распределение на электрофореграмме и относительные количества изоформ ЛДГ в различных органах; В — содержание изоформ ЛДГ в плазме крови в норме и при патологии (электрофореграммы — слева и фотометрическое сканирование — справа).

- Появление в эволюции различных изоформ ЛДГ обусловлено особенностями окислительного метаболизма тканей. Изоферменты $ЛДГ_4$ и $ЛДГ_5$ (М-типы ЛДГ) работают эффективно в анаэробных условиях, $ЛДГ_1$ и $ЛДГ_2$ (Н-типы) — в аэробных, когда пируват быстро окисляется до CO_2 и H_2O, а не восстанавливается до молочной кислоты.
- При ряде заболеваний исследуют активность ЛДГ в плазме крови. В норме активность ЛДГ составляет 170–520 ЕД/л. Повышение активности наблюдают при острых поражениях сердца, печени, почек, а также при мегалобластных и гемолитических анемиях. Однако это указывает на повреждение лишь одной из перечисленных тканей.
- Для постановки диагноза необходимо исследование изоформ ЛДГ в плазме крови методом электрофореза. На рис. 2-35, В представлены электрофореграммы плазмы крови здорового человека, больного инфарктом миокарда и больного гепатитом. Выявление в плазме крови тканеспецифических изоформ ЛДГ используют в качестве диагностического теста повреждения данной ткани.

Изоформы креатинкиназы. Креатинкиназа (КК) катализирует реакцию образования креатинфосфата:



Молекула КК — димер, состоящий из субъединиц двух типов: М (от англ. *muscle* — мышца) и В (от англ. *brain* — мозг). Из этих субъединиц образуются 3 изофермента — ВВ, МВ, ММ. Изофермент ВВ находится преимущественно в головном мозге, ММ — в скелетных мышцах и МВ — в сердечной мышце. Изоформы КК имеют разную электрофоретическую подвижность (рис. 2-36).

Активность КК в норме не должна превышать 90 МЕ/л. Определение активности КК в плазме крови имеет диагностическое значение при инфаркте миокарда (происходит повышение уровня МВ-изоформы). Количество изоформы ММ может повышаться при травмах и повреждениях скелетных мышц. Изоформа ВВ не может проникнуть через гематоэнцефалический барьер, поэтому в крови практически не определяется даже при инсультах и диагностического значения не имеет.

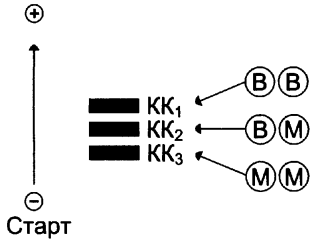


Рис. 2-36. Структура и электрофоретическая подвижность различных изоформ креатинкиназы.

3. Энзимодиагностика при инфаркте миокарда

Примерно 30% больных инфарктом миокарда имеют атипичную клиническую картину этого заболевания. Поэтому необходимо проводить дополнительные методы исследования для подтверждения повреждения сердечной мышцы.

При инфаркте миокарда наблюдают достоверные изменения в крови активности ферментов КК, ЛДГ и аспартатаминотрансферазы — АСТ, которые зависят от времени, прошедшего от начала развития инфаркта и от зоны тканевого повреждения. Типичную кривую изменения активности этих ферментов можно видеть на рис. 2-37. После закупорки (окклюзии) коронарного сосуда в крови вначале отмечают повышение активности КК изоформы МВ, однако фермент быстро удаляется из кровотока. Обнаружение повышенной активности КК в плазме крови — основной энзимодиагностический критерий инфаркта миокарда. Если у пациента с загрудинными болями не обнаружено изменения в активности КК, диагноз инфаркта миокарда маловероятен.

Дополнительным подтверждением диагноза инфаркта миокарда служит обнаружение активностей ферментов АСТ и ЛДГ в крови больных. Динамика изменений этих активностей также представлена на этом рисунке. Активность АСТ в норме составляет 5—40 МЕ/л. При инфаркте миокарда активность АСТ повышается через 4—6 ч; максимум активности наблюдают в течение

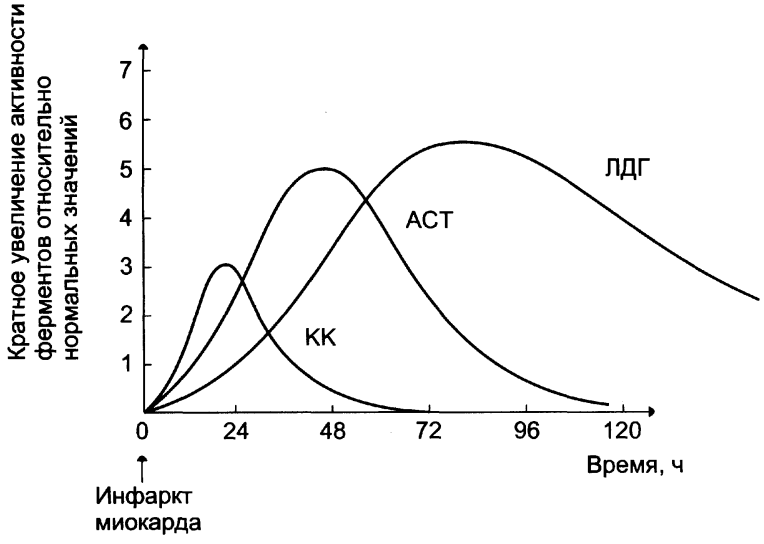


Рис. 2-37. Изменение активности ферментов в плазме крови при инфаркте миокарда.

2–3 дней. Уровень ЛДГ также увеличивается в плазме крови через несколько часов после закупорки кровеносного сосуда; максимум активности наблюдают на 3–4-й день, затем наступает постепенная нормализация активности. Уровень повышения активности ЛДГ коррелирует с размерами повреждения сердечной мышцы.

Б. Применение ферментов в качестве лекарственных средств

Использование ферментов в качестве терапевтических средств имеет много ограничений вследствие их высокой иммуногенности. Тем не менее энзимотерапию активно развивают в следующих направлениях:

- заместительная терапия — использование ферментов в случае их недостаточности;
- элементы комплексной терапии — применение ферментов в сочетании с другой терапией.

Заместительная энзимотерапия эффективна при желудочно-кишечных заболеваниях, связанных с недостаточностью секреции пищеварительных соков. Например, пепсин используют при ахилии, гипо- и анацидных гастритах. Дефицит панкреатических ферментов также в значительной степени может быть компенсирован приёмом внутрь препаратов, содержащих основные ферменты поджелудочной железы (фестал, энзистал, мезим-форте и др.).

В качестве дополнительных терапевтических средств ферменты используют при ряде заболеваний. Протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин) применяют при местном воздействии для обработки гнойных ран с целью расщепления белков погибших клеток, для удаления сгустков крови или вязких секретов при воспалительных заболеваниях дыхательных путей. Ферментные препараты рибонуклеазу и дезоксирибонуклеазу используют в качестве противовирусных препаратов при лечении аденовирусных конъюнктивитов, герпетических кератитов.

Ферментные препараты стали широко применять при тромбозах и тромбоэмболиях. С этой целью используют препараты фибринолизина, стрептолиазы, стрептодеказы, урокиназы.

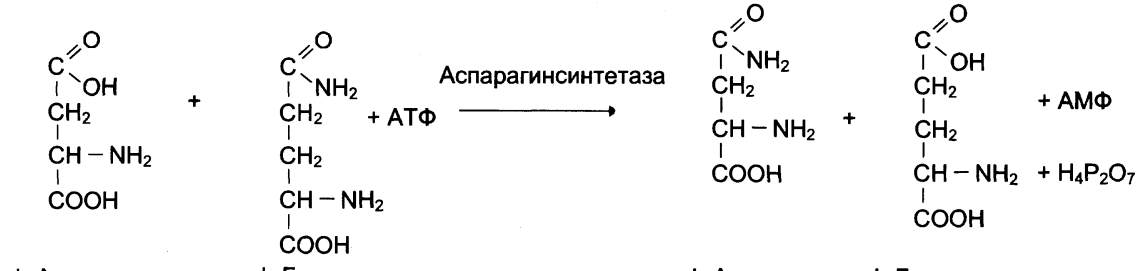
Фермент гиалуронидазу (лидазу), катализирующий расщепление гиалуроновой кислоты, используют подкожно и внутримышечно для рассасывания контрактур рубцов после ожогов и операций (гиалуроновая кислота образует сшивки в соединительной ткани) (см. раздел 8).

Ферментные препараты используют при онкологических заболеваниях. Аспарагиназа, катализирующая реакцию катаболизма аспарагина, нашла применение для лечения лейкозов:

L-Аспарагин — L-Аспарагиновая кислота

Предпосылкой антилейкемического действия аспарагиназы послужило обнаружение в лейкозных клетках дефектного фермента аспарагинсинтетазы, катализирующего реакцию синтеза аспарагина (см. схему ниже).

Лейкозные клетки не могут синтезировать аспарагин и получают его из плазмы крови. Если имеющийся в плазме аспарагин разрушать введением аспарагиназы, то в лейкозных клетках наступит дефицит аспарагина и в результате — нарушение метаболизма клетки.



L-Аспарагиновая кислота + L-Глутамин — L-Аспарагин + L-Глутаминовая кислота

Схема

РАЗДЕЛ 3

ВИТАМИНЫ

Ко второй половине XIX столетия было установлено, что пищевая ценность продуктов питания определяется содержанием в них белков, жиров, углеводов, минеральных солей и воды.

Однако практический опыт врачей и клинические наблюдения, а также история морских и сухопутных путешествий указывали на возникновение ряда специфических заболеваний (цинга, бери-бери), связанных с дефектами питания, хотя последнее полностью отвечало указанным выше требованиям.

Важный вклад в развитие учения о витаминах был сделан отечественным врачом Н.И. Луниным в опытах на мышах. Одна группа мышей (контрольная) получала натуральное молоко, а вторая — смесь компонентов молока: белок, жир, молочный сахар, минеральные соли и вода. Спустя некоторое время мыши опытной группы погибали, а мыши контрольной группы развивались нормально. Отсюда следовал вывод о наличии в молоке дополнительных веществ, необходимых для нормальной жизнедеятельности.

Подтверждением правильности вывода Лунина явилось установление причины бери-бери. Оказалось, что люди, употребляющие в пищу неочищенный рис, оставались здоровыми, в отличие от больных бери-бери, которые питались полированным рисом. В 1911 г. польский учёный К. Функ выделил из рисовых отрубей вещество, которое оказывало хороший лечебный эффект при этом заболевании. Поскольку это органическое вещество содержало в своём составе аминогруппу, Функ назвал это вещество витамином, или амином жизни (от лат. *vita* — жизнь). В настоящее время известно около двух десятков витаминов, которые обеспечивают нормальный рост организма и нормальное протекание физиологических и биохимических процессов. Многие из них входят в состав коферментов (B_1, B_2, PP и другие); некоторые витамины выполняют специализированные функции (витамины A, D, E, K).

Витамины — низкомолекулярные органические соединения различной химической природы и различного строения, синтезируемые главным образом растениями, частично — микроорганизмами. Для человека витамины — незаменимые пищевые факторы.

Недостаток поступления витаминов с пищей, нарушение их всасывания или нарушение их использования организмом приводит к

развитию патологических состояний, называемых гиповитаминозами.

Основные причины гиповитаминозов

- Недостаток витаминов в пище;
- Нарушение всасывания в ЖКТ;
- Врождённые дефекты ферментов, участвующих в превращениях витаминов;
- Действие структурных аналогов витаминов (антивитамины).

Потребность человека в витаминах зависит от пола, возраста, физиологического состояния и интенсивности труда. Существенное влияние на потребность человека в витаминах оказывают характер пищи (преобладание углеводов или белков в диете, количество и качество жиров), а также климатические условия.

КЛАССИФИКАЦИЯ ВИТАМИНОВ

По химическому строению и физико-химическим свойствам (в частности, по растворимости) витамины делят на 2 группы.

А. Водорастворимые

Витамин B_1 (тиамин);
Витамин B_2 (рибофлавин);
Витамин PP (никотиновая кислота, никотинамид, витамин B_3);
Пантотеновая кислота (витамин B_5);
Витамин B_6 (пиридоксин);
Биотин (витамин H);
Фолиевая кислота (витамин B_c, B_9);
Витамин B_{12} (кобаламин);
Витамин C (аскорбиновая кислота);
Витамин P (биофлавоноиды).

Б. Жирорастворимые

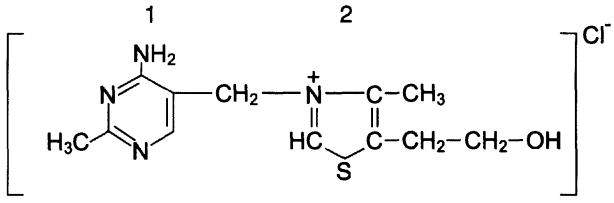
Витамин A (ретинол);
Витамин D (холекальциферол);
Витамин E (токоферол);
Витамин K (филлохинон).

Водорастворимые витамины при их избыточном поступлении в организм, будучи хорошо растворимыми в воде, быстро выводятся из организма.

Жирорастворимые витамины хорошо растворимы в жирах и легко накапливаются в организме при их избыточном поступлении с пищей. Их накопление в организме может вызвать расстройство обмена веществ, называемое гипервитаминозом, и даже гибель организма.

А. Водорастворимые витамины

1. Витамин B_1 (тиамин). Структура витамина включает пиримидиновое и тиазоловое кольца, соединённые метиновым мостиком.



1 – пиримидиновое кольцо; 2 – тиазоловое кольцо

Витамин B_1 (тиамин)

Источники. Витамин B_1 — первый витамин, выделенный в кристаллическом виде К. Функом в 1912 г. Он широко распространён в продуктах растительного происхождения (оболочка семян хлебных злаков и риса, горох, фасоль, соя и др.). В организмах животных витамин B_1 содержится преимущественно в виде дифосфорного эфира тиамина (ТДФ); он образуется в печени, почках, мозге, сердечной мышце путём фосфорилирования тиамина при участии тиаминкиназы и АТФ.

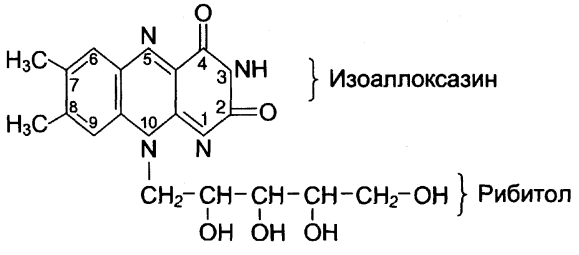
Суточная потребность взрослого человека в среднем составляет 2–3 мг витамина B_1. Но потребность в нём в очень большой степени зависит от состава и общей калорийности пищи, интенсивности обмена веществ и интенсивности работы. Преобладание углеводов в пище повышает потребность организма в витамине; жиры, наоборот, резко уменьшают эту потребность.

Биологическая роль витамина B_1 определяется тем, что в виде ТДФ он входит в состав как минимум трёх ферментов и ферментных комплексов: в составе пируват- и α-кетоглутаратдегидрогеназных комплексов он участвует в окислительном декарбоксилировании пирувата и α-кетоглутарата; в составе транскетолазы ТДФ участвует в

пентозофосфатном пути превращения углеводов.

Основной, наиболее характерный и специфический признак недостаточности витамина B_1 — полиневрит, в основе которого лежат дегенеративные изменения нервов. Вначале развивается болезненность вдоль нервных стволов, затем — потеря кожной чувствительности и наступает паралич (бери-бери). Второй важнейший признак заболевания — нарушение сердечной деятельности, что выражается в нарушении сердечного ритма, увеличении размеров сердца и в появлении болей в области сердца. К характерным признакам заболевания, связанного с недостаточностью витамина B_1, относят также нарушения секреторной и моторной функций ЖКТ; наблюдают снижение кислотности желудочного сока, потерю аппетита, атонию кишечника.

2. Витамин B_2 (рибофлавин). В основе структуры витамина B_2 лежит структура изоаллоксазина, соединённого со спиртом рибитолом.



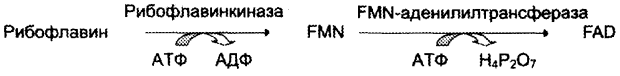
Витамин B_2

Рибофлавин представляет собой кристаллы жёлтого цвета (от лат. *flavos* — жёлтый), слабо растворимые в воде.

Главные источники витамина B_2 — печень, почки, яйца, молоко, дрожжи. Витамин содержится также в шпинате, пшенице, ржи. Частично человек получает витамин B_2 как продукт жизнедеятельности кишечной микрофлоры.

Суточная потребность в витамине B_2 взрослого человека составляет 1,8–2,6 мг.

Биологические функции. В слизистой оболочке кишечника после всасывания витамина происходит образование коферментов FMN и FAD по схеме:



Коферменты FAD и FMN входят в состав флавиновых ферментов, принимающих участие в окислительно-восстановительных реакциях (см. разделы 2, 6, 9, 10).

Клинические проявления недостаточности рибофлавина выражаются в остановке роста у молодых организмов. Часто развиваются воспалительные процессы на слизистой оболочке ротовой полости, появляются длительно незаживающие трещины в углах рта, дерматит носогубной складки. Типично воспаление глаз: конъюнктивиты, васкуляризация роговицы, катаракта. Кроме того, при авитаминозе B_2 развиваются общая мышечная слабость и слабость сердечной мышцы.

3. Витамин PP (никотиновая кислота, никотинамид, витамин B_3)

Никотиновая кислота Никотинамид

Витамин PP

Источники. Витамин PP широко распространён в растительных продуктах, высоко его содержание в рисовых и пшеничных отрубях, дрожжах, много витамина в печени и почках крупного рогатого скота и свиней. Витамин PP может образовываться из триптофана (из 60 молекул триптофана может образоваться 1 молекула никотинамида), что снижает потребность в витамине PP при увеличении количества триптофана в пище.

Суточная потребность в этом витамине составляет для взрослых 15–25 мг, для детей — 15 мг.

Биологические функции. Никотиновая кислота в организме входит в состав NAD и NADP, выполняющих функции коферментов различных дегидрогеназ (см. раздел 2). Синтез NAD в организме протекает в 2 этапа:

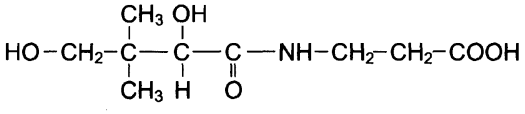
NADP образуется из NAD путём фосфорилирования под действием цитоплазматической NAD-киназы.

$$NAD^+ + АТФ \rightarrow NADP^+ + АДФ$$

Недостаточность витамина РР приводит к заболеванию «пеллагра», для которого характерны 3 основных признака: дерматит, диарея, деменция («три Д»). Пеллагра проявляется в виде симметричного дерматита на участках кожи, доступных действию солнечных лучей, расстройств ЖКТ (диарея) и воспалительных поражений слизистых оболочек рта и языка. В далеко зашедших случаях пеллагры наблюдают расстройства ЦНС (деменция): потеря памяти, галлюцинации и бред.

4. Пантотеновая кислота (витамин B_5)

Пантотеновая кислота состоит из остатков D-2,4-дигидрокси-3,3-диметилмасляной кислоты и β-аланина, соединённых между собой амидной связью:



2,4-Дигидрокси-3,3-диметилмасляная кислота — β-Аланин

Пантотеновая кислота — белый мелкокристаллический порошок, хорошо растворимый в воде. Она синтезируется растениями и микроорганизмами, содержится во многих продуктах животного и растительного происхождения (яйцо, печень, мясо, рыба, молоко, дрожжи, картофель, морковь, пшеница, яблоки). В кишечнике человека пантотеновая кислота в небольших количествах продуцируется кишечной палочкой. Пантотеновая кислота — универсальный витамин, в ней или её производных нуждаются человек, животные, растения и микроорганизмы.

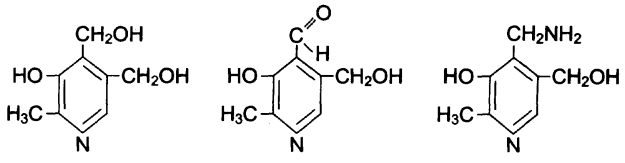
Суточная потребность человека в пантотеновой кислоте составляет 10—12 мг.

Биологические функции. Пантотеновая кислота используется в клетках для синтеза коферментов: 4-фосфопантотеина и КоА (рис. 3-1). 4-фосфопантотеин — кофермент пальмитоилсинтазы. КоА участвует в переносе ацильных радикалов в реакциях общего пути катаболизма (см. раздел 6), активации жирных кислот, синтеза холестерина и кетоновых тел (см. раздел 8), синтеза ацетилглюкозаминов (см. раздел 15), обезвреживания чужеродных веществ в печени (см. раздел 12).

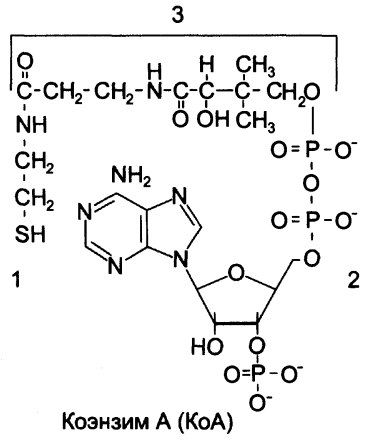
Клинические проявления недостаточности витамина. У человека и животных развиваются дерматиты, дистрофические изменения желёз внутренней секреции (например, надпочечников), нарушение деятельности нервной системы (невриты, параличи), дистрофические изменения в сердце, почках, депигментация и выпадение волос и шерсти у животных, потеря аппетита, истощение. Низкий уровень пантотената в крови у людей часто сочетается с другими гиповитаминозами (B_1, B_2) и проявляется как комбинированная форма гиповитаминоза.

5. Витамин B_6 (пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин)

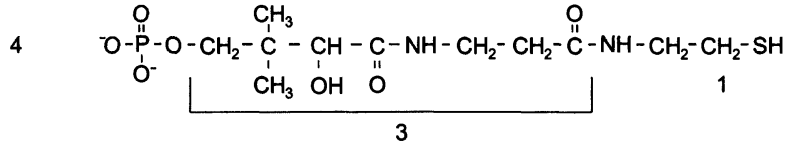
В основе структуры витамина B_6 лежит пиридиновое кольцо. Известны 3 формы витамина B_6, отличающиеся строением замещающей группы у атома углерода в п-положении к атому азота. Все они характеризуются одинаковой биологической активностью.



Пиридоксол (пиридоксин) — Пиридоксаль — Пиридоксамин



Коэнзим А (КоА)



4`-Фосфопантотеин

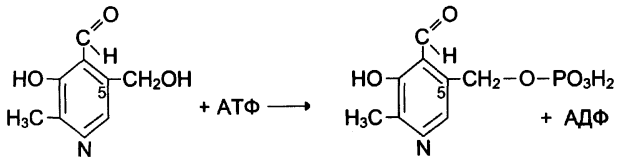
Рис. 3-1. Строение КоА и 4'-фосфопантотеина. 1 — тиоэтаноламин; 2 — аденозил-3'-фосфо-5'-дифосфат; 3 — пантотеновая кислота; 4 — 4'-фосфопантотеин (фосфорилированная пантотеновая кислота, соединённая с тиоэтаноламином).

Все 3 формы витамина — бесцветные кристаллы, хорошо растворимые в воде.

Источники витамина B_6 для человека — такие продукты питания, как яйца, печень, молоко, зёленый перец, морковь, пшеница, дрожжи. Некоторое количество витамина синтезируется кишечной флорой.

Суточная потребность составляет 2—3 мг.

Биологические функции. Все формы витамина B_6 используются в организме для синтеза коферментов: пиридоксальфосфата и пиридоксаминфосфата. Коферменты образуются путём фосфорилирования по гидроксиметильной группе в пятом положении пиримидинового кольца при участии фермента пиридоксалькиназы и АТФ как источника фосфата.



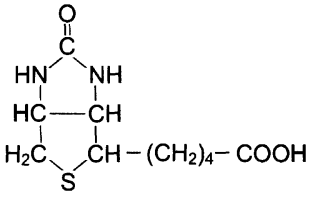
Пиридоксаль (витамин B_6) + АТФ → Пиридоксальфосфат (кофермент) + АДФ

Пиридоксалевые ферменты играют ключевую роль в обмене аминокислот: катализируют реакции трансаминирования и декарбоксилирования аминокислот, участвуют в специфических реакциях метаболизма отдельных аминокислот: серина, треонина, триптофана, серосодержащих аминокислот, а также в синтезе гема (см. разделы 9, 12).

Клинические проявления недостаточности витамина. Авитаминоз B_6 у детей проявляется повышенной возбудимостью ЦНС, периодическими судорогами, что связано, возможно, с недостаточным образованием тормозного медиатора ГАМК (см. раздел 9), специфическими дерматитами. У взрослых признаки гиповитаминоза B_6 наблюдают при длительном лечении туберкулёза изониазидом (антагонист витамина B_6). При этом возникают поражения нервной системы (полиневриты), дерматиты.

6. Биотин (витамин H)

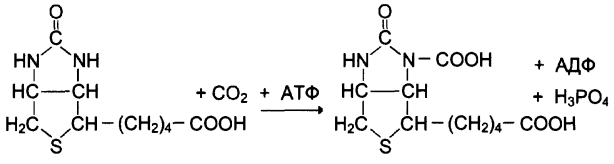
В основе строения биотина лежит тиофеновое кольцо, к которому присоединена молекула мочевины, а боковая цепь представлена валерьяновой кислотой.



Источники. Биотин содержится почти во всех продуктах животного и растительного происхождения. Наиболее богаты этим витамином печень, почки, молоко, желток яйца. В обычных условиях человек получает достаточное количество биотина в результате бактериального синтеза в кишечнике.

Суточная потребность биотина у человека не превышает 10 мкг.

Биологическая роль. Биотин выполняет коферментную функцию в составе карбоксилаз: он участвует в образовании активной формы CO_2.



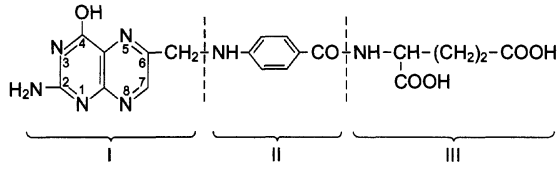
В организме биотин используется в образовании малонил-КоА из ацетил-КоА (см. раздел 8), в синтезе пуринового кольца (см. раздел 10), а также в реакции карбоксилирования пирувата с образованием оксалоацетата (см. раздел 6).

Клинические проявления недостаточности биотина у человека изучены мало, поскольку бактерии кишечника обладают способностью синтезировать этот витамин в необходимых количествах. Поэтому картина авитаминоза проявляется при дисбактериозах кишечника, например, после приёма больших количеств антибиотиков или сульфамидных препаратов, вызывающих гибель микрофлоры кишечника, либо после введения в рацион большого количества сырого яичного белка. В яичном белке содержится гликопротеин авидин, который соединяется с биотином и препятствует всасыванию последнего из кишечника. Авидин (молекулярная масса 70 000 кД) состоит из четырёх идентичных субъединиц, содержащих по 128 аминокислот; каждая субъединица связывает по одной молекуле биотина.

При недостаточности биотина у человека развиваются явления специфического дерматита, характеризующегося покраснением и шелушением кожи, а также обильной секрецией сальных желёз (себорея). При авитаминозе витамина Н наблюдают также выпадение волос и шерсти у животных, поражение ногтей, часто отмечают боли в мышцах, усталость, сонливость и депрессию.

7. Фолиевая кислота (витамин B_c, витамин B_9)

Фолиевая кислота состоит из трёх структурных единиц: остатка птеридина (I), парааминобензойной (II) и глутаминовой (III) кислот.



Витамин, полученный из разных источников, может содержать 3–6 остатков глутаминовой кислоты. Фолиевая кислота была выделена в 1941 г. из зелёных листьев растений, в связи с чем и получила своё название (от лат. *folium* — лист).

Источники. Значительное количество этого витамина содержится в дрожжах, а также в печени, почках, мясе и других продуктах животного происхождения.

Суточная потребность в фолиевой кислоте колеблется от 50 до 200 мкг; однако вследствие плохой всасываемости этого витамина рекомендуемая суточная доза — 400 мкг.

Биологическая роль фолиевой кислоты определяется тем, что она служит субстратом для синтеза коферментов, участвующих в реакциях переноса одноуглеродных радикалов различной степени окисленности: метильных, оксиметильных, формильных и других. Эти коферменты участвуют в синтезе различных веществ: пуриновых нуклеотидов, превращении dУМФ в dТМФ, в обмене глицина и серина (см. разделы 9, 10).

Наиболее характерные признаки авитаминоза фолиевой кислоты — нарушение кроветворения и связанные с этим различные формы малокровия (макроцитарная анемия), лейкопения и задержка роста. При гиповитаминозе фолиевой кислоты наблюдают нарушения регенерации эпителия, особенно в ЖКТ,

обусловленные недостатком пуринов и пиримидинов для синтеза ДНК в постоянно делящихся клетках слизистой оболочки.

Авитаминоз фолиевой кислоты редко проявляется у человека и животных, так как этот витамин в достаточной степени синтезируется кишечной микрофлорой. Однако использование сульфаниламидных препаратов для лечения ряда заболеваний может вызвать развитие авитаминозов. Эти препараты — структурные аналоги парааминобензойной кислоты, ингибирующие синтез фолиевой кислоты у микроорганизмов (см. раздел 2). Некоторые производные птеридина (аминоптерин и метотрексат) тормозят рост почти всех организмов, нуждающихся в фолиевой кислоте. Эти препараты находят применение в лечебной практике для подавления опухолевого роста у онкологических больных.

8. Витамин B_{12} (кобаламин)

Витамин B_{12} был выделен из печени в кристаллическом виде в 1948 г. В 1955 г. Дороти Ходжкен с помощью рентгено-структурного анализа *расшифровала* структуру этого витамина. За эту работу в 1964 г. ей была присуждена Нобелевская премия. Витамин B_{12} — единственный витамин, содержащий в своём составе металл кобальт (рис. 3-2).

Источники. Ни животные, ни растения не способны синтезировать витамин B_{12}. Это единственный витамин, синтезируемый почти исключительно микроорганизмами: бактериями, актиномицетами и сине-зелёными водорослями. Из животных тканей наиболее богаты витамином B_{12} печень и почки. Недостаточность витамина в тканях животных связана с нарушением всасывания кобаламина из-за нарушения синтеза внутреннего фактора Касла, в соединении с которым он и всасывается. Фактор Касла синтезируется обкладочными клетками желудка. Это — гликопротеин с молекулярной массой 93 000 Д. Он соединяется с витамином B_{12} при участии ионов кальция. Гипоавитаминоз B_{12} обычно сочетается с понижением кислотности желудочного сока, что может быть результатом повреждения слизистой оболочки желудка. Гипоавитаминоз B_{12} может развиться также после тотального удаления желудка при хирургических операциях.

Суточная потребность в витамине B_{12} крайне мала и составляет всего 1–2 мкг.

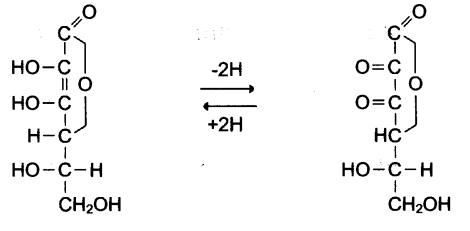
Витамин B_{12} служит источником образования двух коферментов: метилкобаламина в цитоплазме и дезоксиаденозилкобаламина в митохондриях (рис. 3-2).

- Метил-B_{12} — кофермент, участвующий в образовании метионина из гомоцистеина. Кроме того, метил-B_{12} принимает участие в превращениях производных фолиевой кислоты, необходимых для синтеза нуклеотидов — предшественников ДНК и РНК.
- Дезоксиаденозилкобаламин в качестве кофермента участвует в метаболизме жирных кислот с нечётным числом углеродных атомов и аминокислот с разветвлённой углеводородной цепью (см. разделы 8, 9).

Основной признак авитаминоза B_{12} — макроцитарная (мегалобластная) анемия. Для этого заболевания характерны увеличение размеров эритроцитов, снижение количества эритроцитов в кровотоке, снижение концентрации гемоглобина в крови. Нарушение кроветворения связано в первую очередь с нарушением обмена нуклеиновых кислот, в частности синтеза ДНК в быстроделящихся клетках кроветворной системы. Помимо нарушения кроветворной функции, для авитаминоза B_{12} специфично также расстройство деятельности нервной системы, объясняемое токсичностью метилмалоновой кислоты, накапливающейся в организме при распаде жирных кислот с нечётным числом углеродных атомов, а также некоторых аминокислот с разветвлённой цепью.

9. Витамин С (аскорбиновая кислота)

Аскорбиновая кислота — лактон кислоты, близкой по структуре к глюкозе. Существует в двух формах: восстановленной (АК) и окисленной (дегидроаскорбиновой кислотой, ДАК).



Аскорбиновая кислота (АК) Дегидроаскорбиновая кислота (ДАК)

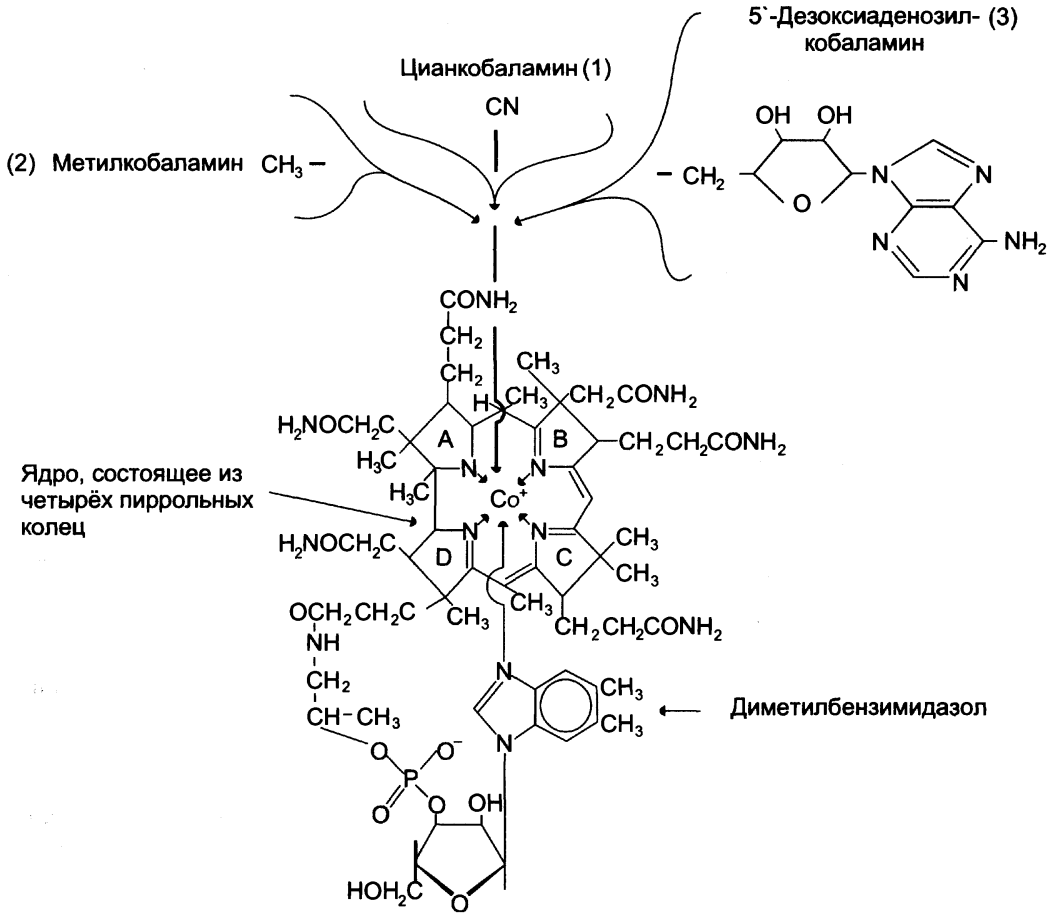


Рис. 3-2. Структура витамина B_{12} (1) и его коферментные формы — метилкобаламин (2) и 5-дезоксиаденозилкобаламин (3).

Обе эти формы аскорбиновой кислоты быстро и обратимо переходят друг в друга и в качестве коферментов участвуют в окислительно-восстановительных реакциях. Аскорбиновая кислота может окисляться кислородом воздуха, пероксидом и другими окислителями. ДАК легко восстанавливается цистеином, глутатионом, сероводородом. В слабощелочной среде происходят разрушение лактонового кольца и потеря биологической активности. При кулинарной обработке пищи в присутствии окислителей часть витамина С разрушается.

Источники витамина С — свежие фрукты, овощи, зелень (табл. 3-1).

Суточная потребность человека в витамине С составляет 50—75 мг.

Биологические функции. Главное свойство аскорбиновой кислоты — способность легко

Таблица 3-1. Содержание аскорбиновой кислоты в некоторых пищевых продуктах и растениях

Продукт	Содержание витамина, мг/100 г
Плоды шиповника	2400
Облепиха	450
Смородина чёрная	300
Лимоны	40
Апельсины	30
Яблоки	30
Картофель свежий	25
Томаты	20
Молоко	2,0
Мясо	0,9

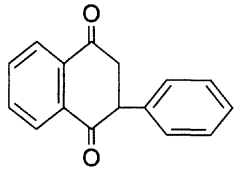
окисляться и восстанавливаться. Вместе с ДАК она образует в клетках окислительно-восстановительную пару с редокс-потенциалом +0,139 В. Благодаря этой способности аскорбиновая кислота участвует во многих реакциях гидроксилирования: остатков Про и Лиз при синтезе коллагена (основного белка соединительной ткани), при гидроксилировании дофамина, синтезе стероидных гормонов в коре надпочечников (см. разделы 9, 11).

В кишечнике аскорбиновая кислота восстанавливает Fe^{3+} в Fe^{2+}, способствуя его всасыванию, ускоряет освобождение железа из ферритина (см. раздел 13), способствует превращению фолата в коферментные формы. Аскорбиновую кислоту относят к природным антиоксидантам (см. раздел 8). Большое значение этой роли витамина С придавал известный американский учёный Л. Полинг, дважды лауреат Нобелевской премии. Он рекомендовал использовать для профилактики и лечения ряда заболеваний (например, простудных) большие дозы аскорбиновой кислоты (2–3 г).

Клинические проявления недостаточности витамина С. Недостаточность аскорбиновой кислоты приводит к заболеванию, называемому цингой (скорбут). Цинга, возникающая у человека при недостаточном содержании в пищевом рационе свежих фруктов и овощей, описана более 300 лет назад, со времени проведения длительных морских плаваний и северных экспедиций. Это заболевание связано с недостатком в пище витамина С. Болеют цингой только человек, приматы и морские свинки. Главные проявления авитаминоза обусловлены в основном нарушением образования коллагена в соединительной ткани. Вследствие этого наблюдают разрыхление дёсен, расшатывание зубов, нарушение целостности капилляров (сопровождающееся подкожными кровоизлияниями). Возникают отёки, боль в суставах, анемия. Анемия при цинге может быть связана с нарушением способности использовать запасы железа, а также с нарушениями метаболизма фолиевой кислоты.

10. Витамин Р (биофлавоноиды)

В настоящее время известно, что понятие «витамин Р» объединяет семейство биофлавоноидов (катехины, флавононы, флавоны). Это очень разнообразная группа растительных полифенольных соединений, влияющих на проницаемость сосудов сходным образом с витамином С.



Флавон

Наиболее богаты витамином Р лимоны, гречиха, черноплодная рябина, чёрная смородина, листья чая, плоды шиповника.

Суточная потребность для человека точно не установлена.

Биологическая роль флавоноидов заключается в стабилизации межклеточного матрикса соединительной ткани и уменьшении проницаемости капилляров. Многие представители группы витамина Р обладают гипотензивным действием.

Клиническое проявление гипоавитаминоза витамина Р характеризуется повышенной кровоточивостью дёсен и точечными подкожными кровоизлияниями, общей слабостью, быстрой утомляемостью и болями в конечностях.

В таблице 3-2 перечислены суточные потребности, коферментные формы, основные биологические функции водорастворимых витаминов, а также характерные признаки авитаминозов.

Б. Жирорастворимые витамины

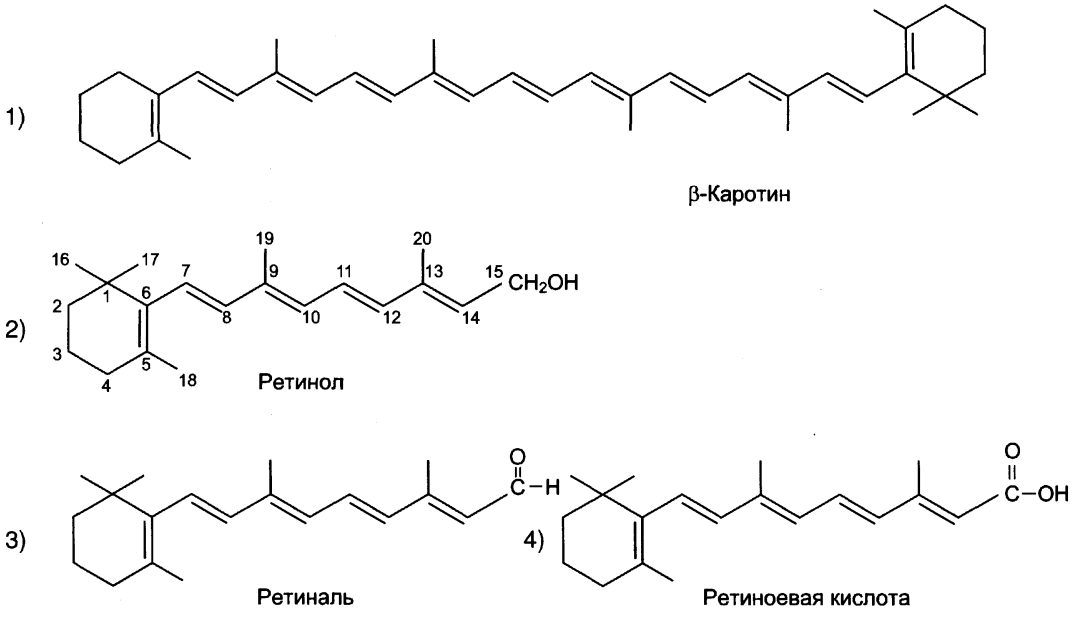
1. Витамин А (ретинол) — циклический, ненасыщенный, одноатомный спирт.

Источники. Витамин А содержится только в животных продуктах: печени крупного рогатого скота и свиней, яичном желтке, молочных продуктах; особенно богат этим витамином рыбий жир. В растительных продуктах (морковь, томаты, перец, салат и др.) содержатся каротиноиды, являющиеся провитаминами А. В слизистой оболочке кишечника и клетках печени содержится специфический фермент каротиндиоксигеназа, превращаю-

Таблица 3-2. Водорастворимые витамины

Название	Суточная потребность, мг	Коферментная форма	Биологические функции	Характерные признаки авитаминозов
B_1 (тиамин)	2–3	ТДФ	Декарбоксилирование α-кетокислот, перенос активного альдегида (транскетолаза)	Полиневрит
B_2 (рибофлавин)	1,8–2,6	FAD FMN	В составе дыхательных ферментов, перенос водорода	Поражение глаз (кератиты, катаракта)
B_5 (пантотеновая кислота)	10–12	KoA-SH	Транспорт ацильных групп	Дистрофические изменения в надпочечниках и нервной ткани
B_6 (пиридоксин)	2–3	ПФ (пиридоксальфосфат)	Обмен аминокислот (трансаминирование, декарбоксилирование)	Повышенная возбудимость нервной системы, дерматиты
PP (ниацин)	15–25	NAD NADP	Акцепторы и переносчики водорода	Симметричный дерматит на открытых участках тела, деменция и диарея
H (биотин)	0,01–0,02	Биотин	Фиксация CO_2, реакции карбоксилирования (например, пирувата и ацетил-КоА)	Дерматиты, сопровождающиеся усиленной деятельностью сальных желёз
B_c (фолиевая кислота)	0,05–0,4	Тетрагидрофолиевая кислота	Транспорт одноуглеродных групп	Нарушения кроветворения (анемия, лейкопении)
B_{12} (кобаламин)	0,001–0,002	Дезоксиаденозил- и метилкобаламин	Транспорт метильных групп	Макроцитарная анемия
C (аскорбиновая кислота)	50–75	–	Гидроксилирование пролина, лизина (синтез коллагена), антиоксидант	Кровоточивость дёсен, расшатывание зубов, подкожные кровоизлияния, отёки
P (рутин)	Не установлена	–	Вместе с витамином С участвует в окислительно-восстановительных процессах, тормозит действие гиалуронидазы	Кровоточивость дёсен и точечные кровоизлияния

Строение провитамина А (1), витамина А (2) и его производных (3, 4)



щий каротиноиды в активную форму витамина А.

Суточная потребность витамина А взрослого человека составляет от 1 до 2,5 мг витамина или от 2 до 5 мг β-каротинов. Обычно активность витамина А в пищевых продуктах выражается в международных единицах; одна международная единица (МЕ) витамина А эквивалентна 0,6 мкг β-каротина и 0,3 мкг витамина А.

Биологические функции витамина А. В организме ретинол превращается в ретиналь и ретиноевую кислоту, участвующие в регуляции ряда функций (в росте и дифференцировке клеток); они также составляют фотохимическую основу акта зрения.

Наиболее детально изучено участие витамина А в зрительном акте (рис. 3-3). Светочувствительный аппарат глаза — сетчатка. Падающий на сетчатку свет адсорбируется и трансформируется пигментами сетчатки в другую форму энергии. У человека сетчатка содержит 2 типа рецепторных клеток: палочки и колбочки. Первые реагируют на слабое (сумеречное) освещение, а колбочки — на хорошее освещение (дневное зрение). Палочки содержат зрительный пигмент родопсин, а колбочки — йодопсин. Оба пигмента — сложные белки, отличающиеся своей белковой частью. В качестве кофермента оба белка содержат 11-цис-ретиналь, альдегидное производное витамина А.

Ретиноевая кислота, подобно стероидным гормонам, взаимодействует с рецепторами в ядре клеток-мишеней. Образовавшийся комплекс связывается с определёнными участками ДНК и стимулирует транскрипцию генов (см. раздел 4). Белки, образующиеся в результате стимуляции генов под влиянием ретиноевой кислоты, влияют на рост, дифференцировку, репродукцию и эмбриональное развитие (рис. 3-4).

Основные клинические проявления гиповитаминоза А. Наиболее ранний и характерный признак недостаточности витамина А у людей и экспериментальных животных — нарушение сумеречного зрения (гемералопия, или «куриная» слепота). Специфично для авитаминоза А поражение глазного яблока — ксерофтальмия, т.е. развитие сухости роговой оболочки глаза как следствие закупорки слёзного канала в связи с ороговением эпителия. Это, в свою очередь, приводит к развитию конъюнктивита, отёку, изъязвлению и размягчению роговой оболочки, т.е. к кератомаляции. Ксерофтальмия и кератомаляция при отсутствии соответствующего лечения могут привести к полной потере зрения.

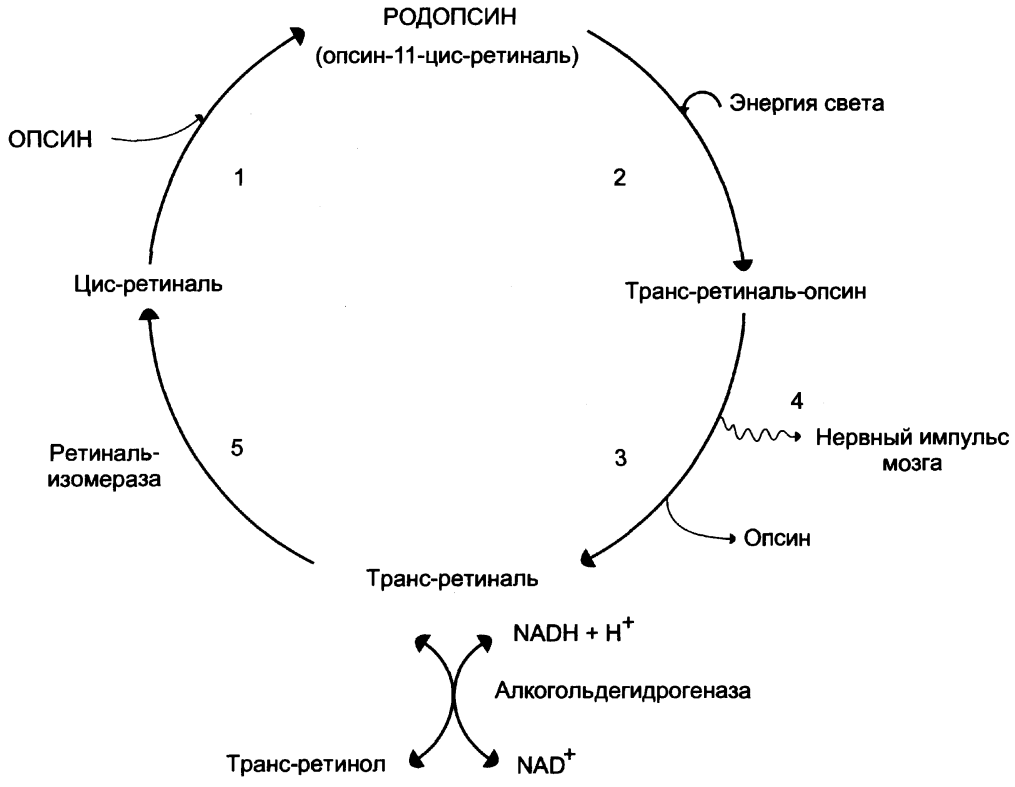


Рис. 3-3. Схема зрительного цикла. 1 – цис-ретиналь в темноте соединяется с белком опсином, образуя родопсин; 2 – под действием кванта света происходит фотоизомеризация 11-цис-ретиналя в транс-ретиналь; 3 – транс-ретиналь-опсин распадается на транс-ретиналь и опсин; 4 – поскольку пигменты встроены в мембраны светочувствительных клеток сетчатки, это приводит к местной деполяризации мембраны и возникновению нервного импульса, распространяющегося по нервному волокну; 5 – заключительный этап этого процесса — регенерация исходного пигмента. Это происходит при участии ретинальизомеразы через стадии: транс-ретиналь → транс-ретинол → цис-ретинол → цис-ретиналь; последний вновь соединяется с опсином, образуя родопсин.

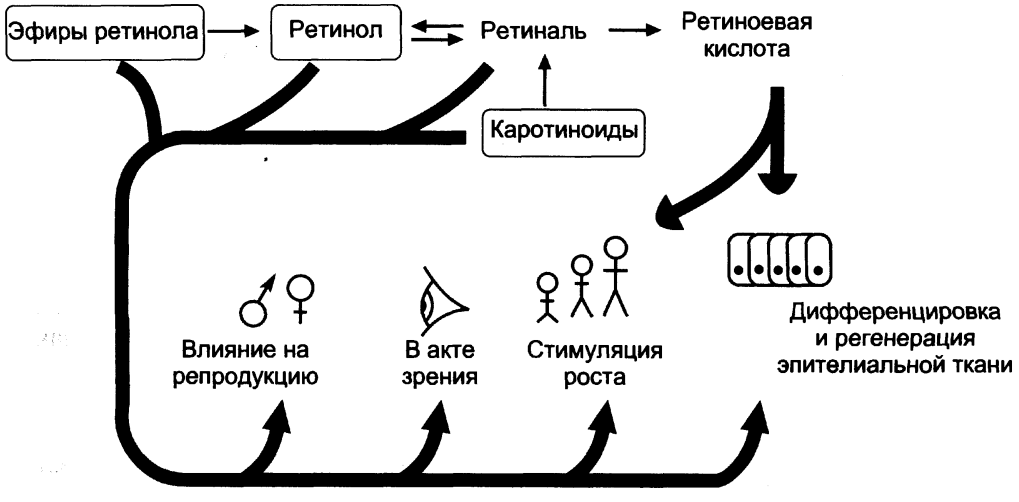


Рис. 3-4. Действие ретиноидов в организме. Вещества (названия в рамках) — компоненты пищи.

У детей и молодых животных при авитаминозе А наблюдают остановку роста костей, кератоз эпителиальных клеток всех органов и, как следствие этого, избыточное ороговение кожи, поражение эпителия ЖКТ, мочеполовой системы и дыхательного аппарата. Прекращение роста костей черепа приводит к повреждению тканей ЦНС, а также к повышению давления спинномозговой жидкости.

2. Витамины группы D (кальциферолы)

Кальциферолы — группа химически родственных соединений, относящихся к производным стеринов. Наиболее биологически активные витамины — D_2 и D_3. Витамин D_2 (эргокальциферол), производное эргостерина — растительного стероида, встречающегося в некоторых грибах, дрожжах и растительных маслах. При облучении пищевых продуктов УФО из эргостерина получается витамин D_2, используемый в лечебных целях. Витамин D_3, имеющийся у человека и животных, — холекальциферол, образующийся в коже человека из 7-дегидрохолестерина под действием УФ-лучей (рис. 3-5).

Витамины D_2 и D_3 — белые кристаллы, жирные на ощупь, нерастворимые в воде, но хоро-

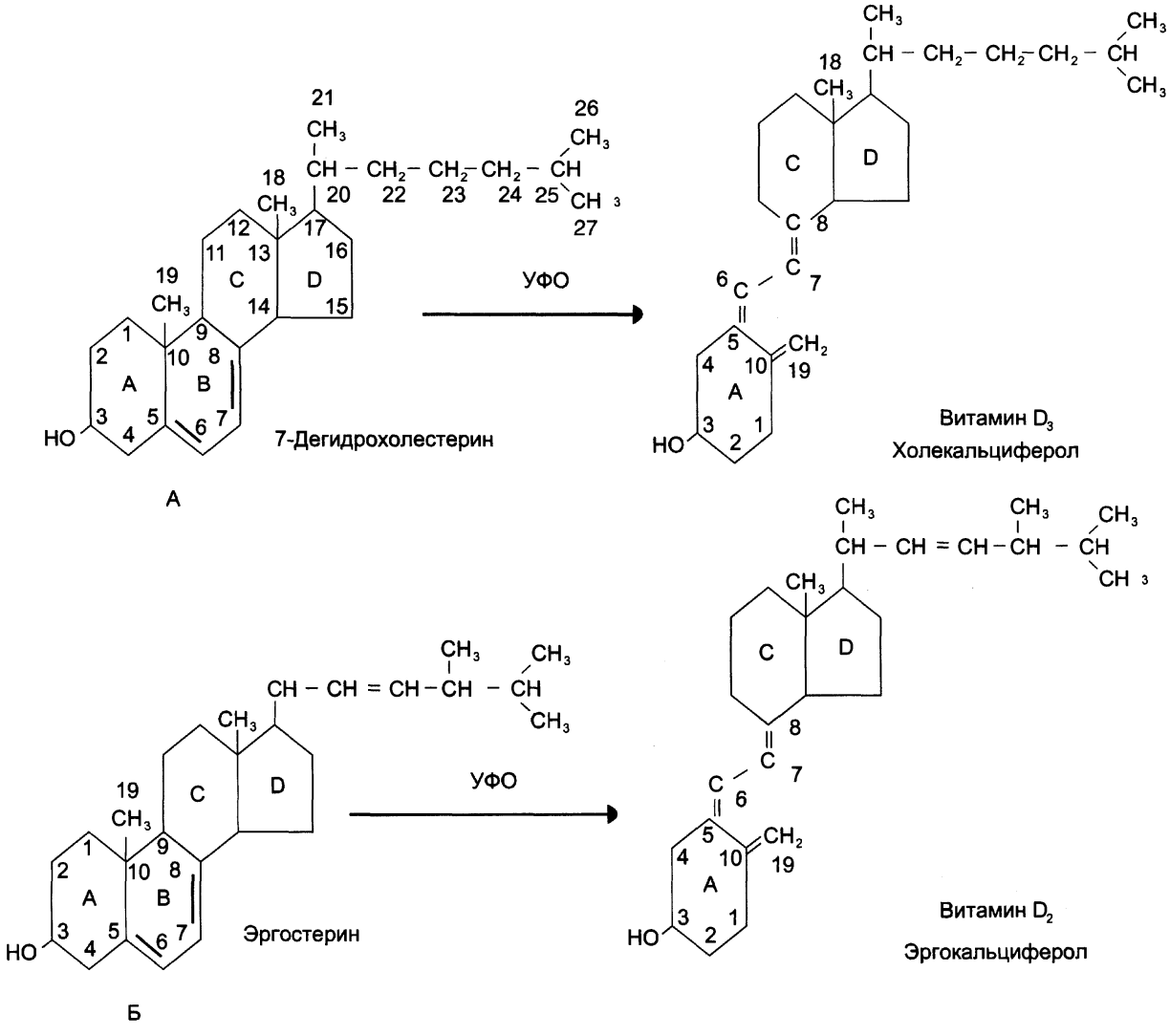


Рис. 3-5. Схема синтеза витаминов D_2 и D_3. Провитамины D_2 и D_3 — стерины, у которых в кольце В две двойные связи. При воздействии света в процессе фотохимической реакции происходит расщепление кольца В. А — 7-дегидрохолестерин, провитамин D_3 (синтезируется из холестерина); Б — эргостерин — провитамин D_2.

шо растворимые в жирах и органических растворителях.

Источники. Наибольшее количество витамина D_3 содержится в продуктах животного происхождения: сливочном масле, желтке яиц, рыбьем жире.

Суточная потребность для детей 12–25 мкг (500–1000 МЕ), для взрослого человека потребность значительно меньше.

Биологическая роль. В организме человека витамин D_3 гидроксилируется в положениях 25 и 1 и превращается в биологически активное соединение 1,25-дигидроксихолекальциферол (кальцитриол). Кальцитриол выполняет гормональную функцию, участвуя в регуляции обмена Ca^{2+} и фосфатов, стимулируя всасывание Ca^{2+} в кишечнике и кальцификацию костной ткани, реабсорбцию Ca^{2+}и фосфатов в почках. При низкой концентрации Ca^{2+} или высокой концентрации D_3 он стимулирует мобилизацию Ca^{2+} из костей (см. раздел 11).

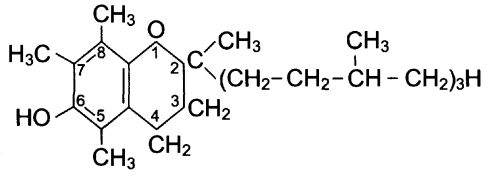
Недостаточность. При недостатке витамина D у детей развивается заболевание «рахит», характеризуемое нарушением кальцификации растущих костей. При этом наблюдают деформацию скелета с характерными изменениями костей (Х- или о-образная форма ног, «чётки» на рёбрах, деформация костей черепа, задержка прорезывания зубов).

Избыток. Поступление в организм избыточного количества витамина D_3 может вызвать гипервитаминоз D. Это состояние характеризуется избыточным отложением солей кальция в тканях лёгких, почек, сердца, стенках сосудов, а также остеопорозом с частыми переломами костей.

3. Витамины группы Е (токоферолы)

Витамин Е был выделен из масла зародышей пшеничных зёрен в 1936 г. и получил название токоферол. В настоящее время известно семейство токоферолов и токотриенолов, найденных в природных источниках. Все они — метильные производные исходного соединения токола, по строению очень близки и обозначаются буквами греческого алфавита. Наибольшую биологическую активность проявляет α-токоферол.

Токоферолы представляют собой маслянистую жидкость, хорошо растворимую в органических растворителях.



α-Токоферол (5,7,8-триметилтокол)

Источники витамина Е для человека — растительные масла, салат, капуста, семена злаков, сливочное масло, яичный желток.

Суточная потребность взрослого человека в витамине примерно 5 мг.

Биологическая роль. По механизму действия токоферол является биологическим антиоксидантом. Он ингибирует свободнорадикальные реакции в клетках и таким образом препятствует развитию цепных реакций перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот в липидах биологических мембран и других молекул, например ДНК (см. раздел 8). Токоферол повышает биологическую активность витамина А, защищая от окисления ненасыщенную боковую цепь.

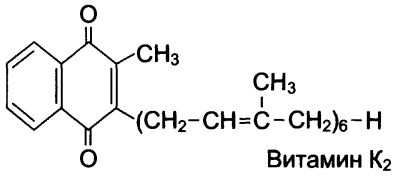
Клинические проявления недостаточности витамина Е у человека до конца не изучены. Известно положительное влияние витамина Е при лечении нарушения процесса оплодотворения, при повторяющихся непроизвольных абортах, некоторых форм мышечной слабости и дистрофии. Показано применение витамина Е для недоношенных детей и детей, находящихся на искусственном вскармливании, так как в коровьем молоке в 10 раз меньше витамина Е, чем в женском. Дефицит витамина Е проявляется развитием гемолитической анемии, возможно из-за разрушения мембран эритроцитов в результате ПОЛ.

4. Витамины К (нафтохиноны)

Витамин К существует в нескольких формах в растениях как филлохинон (K_1), в клетках кишечной флоры как менахинон (K_2).

Источники витамина К — растительные (капуста, шпинат, корнеплоды и фрукты) и животные (печень) продукты. Кроме того, он синтезируется микрофлорой кишечника. Обычно авитаминоз К развивается вслед-

Витамин K_1 (филлохинон)



Витамин K_2 (менахинон)

ствие нарушения всасывания витамина К в кишечнике, а не в результате его отсутствия в пище.

Суточная потребность в витамине взрослого человека составляет 1–2 мг.

Биологическая функция витамина К связана с его участием в процессе свёртывания крови (рис. 3-6). Он участвует в активации факторов свёртывания крови: протромбина (фактор II), проконвертина (фактор VII), фактора Кристмаса (фактор IX) и фактора Стюарта (фактор X). Эти белковые факторы синтезируются как неактивные предшественники. Один из этапов активации — их карбоксилирование по остаткам глутаминовой кислоты с образованием γ-карбоксиглутаминовой кислоты, необходимой для связывания ионов кальция (см. раздел 13). Витамин К участвует в реакциях карбоксилирования в качестве кофермента.

Для лечения и предупреждения гиповитаминоза К используют синтетические производные нафтохинона: менадион, викасол, синкавит.

Основное проявление авитаминоза К — сильное кровотечение, часто приводящее к шоку и гибели организма.

В таблице 3-3 перечислены суточные потребности и биологические функции жирорастворимых витаминов, а также характерные признаки авитаминозов.

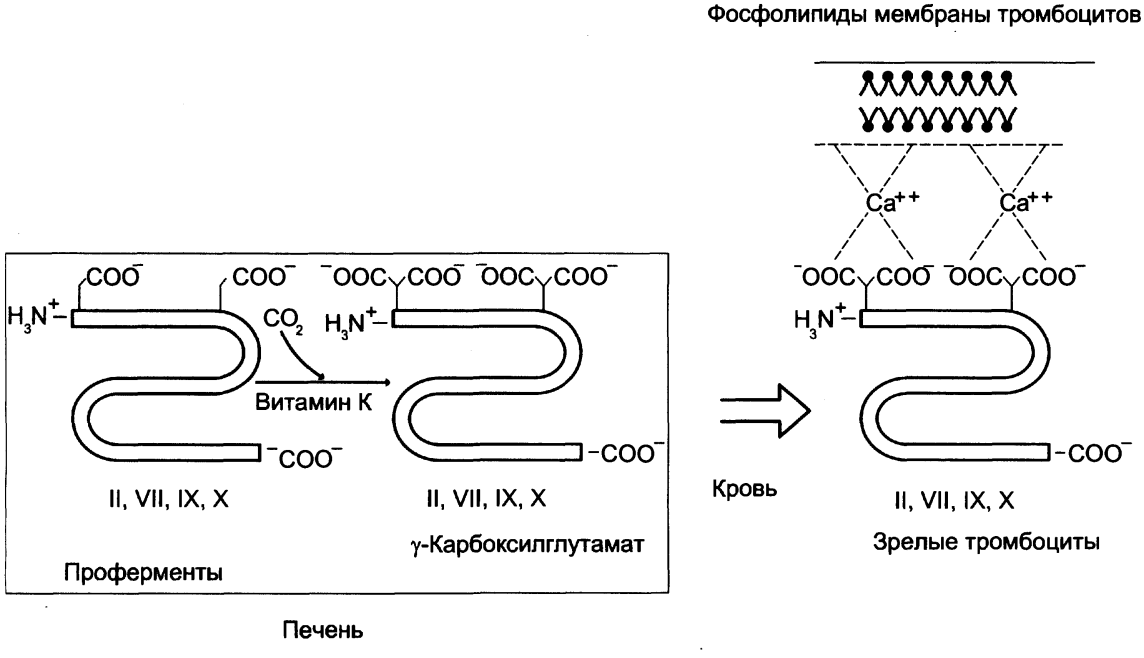


Рис. 3-6. Роль витамина К в свёртывании крови.

Таблица 3-3. Жирорастворимые витамины

Название	Суточная потребность, мг	Биологические функции	Характерные признаки авитаминозов
A (ретинол)	1–2,5	Участвует в акте зрения, регулирует рост и дифференцировку клеток	Гемералопия (куриная слепота), ксерофтальмия, кератомаляция, кератоз эпителиальных клеток
D (кальциферол)	0,012–0,025	Регуляция обмена фосфора и кальция в организме	Рахит
E (токоферол)	5	Антиоксидант; регулирует интенсивность свободнорадикальных реакций в клетке	Недостаточно изучены; известно положительное влияние на развитие беременности и при лечении бесплодия
K (нафтохинон)	1–2	Участвует в активации факторов свёртывания крови: II, VII, IX, XI	Нарушение свёртывающей системы крови

РАЗДЕЛ 4

БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ (МАТРИЧНЫЕ БИОСИНТЕЗЫ). ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

Нуклеиновые кислоты — высокомолекулярные соединения со строго определённой линейной последовательностью мономеров. Структура ДНК и РНК — способ «записи информации», обеспечивающий формирование в организме двух информационных потоков. Один из потоков осуществляет воспроизведение информации, заключённой в молекулах ДНК. Удвоение молекул ДНК называют **«репликация»**. В результате этого процесса и последующего деления дочерние клетки наследуют геном родительской клетки, в котором содержится полный набор генов, или «инструкций» о строении РНК и всех белков организма.

Второй поток информации реализуется в процессе жизнедеятельности клетки. В этом случае происходит «считывание», или **транскрипция**, генов в форме полинуклеотидных последовательностей мРНК и использование их в качестве матриц для синтеза соответствующих белков. В последнем случае осуществляется «перевод» (**трансляция**) информации, заключённой в мРНК, на «язык» аминокислот. Этот поток информации от ДНК через РНК на белок получил название **«центральная догма биологии»**. Он характерен для всех живых организмов, за исключением некоторых РНК-содержащих вирусов.

Матричная природа синтеза нуклеиновых кислот и белков обеспечивает высокую точность воспроизведения информации. Так, в ходе репликации дочерние молекулы ДНК синтезируются на нитях материнской ДНК. При образовании всех видов РНК, необходимых для синтеза белков, информация об их структуре «считывается» с определённых генов в молекулах ДНК. В синтезе новых молекул белков матрицей, содержащей информацию об их строении, являются мРНК.

Исправление ошибок, возникающих в структуре ДНК под воздействием факторов внешней и внутренней среды, осуществляет ещё один матричный синтез — **репарация**. Он является вариантом ограниченной репликации и восстанавливает первоначальную структуру ДНК, используя в качестве матрицы участок неповреждённой нити ДНК. При размножении РНК-содержащих вирусов в клетках эукариотических организмов новые молекулы ДНК могут синтезироваться с помощью процесса, в ходе которого РНК служит матрицей для синтеза комплементарной ДНК, которая может включаться в геном высших организмов (**обратная транскрипция**).

I. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В каждом живом организме присутствуют 2 типа нуклеиновых кислот: рибонуклеиновая кислота (РНК) и дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Молекулярная масса самой «маленькой» из известных нуклеиновых кислот — транспортной РНК (тРНК) составляет примерно 25 кД. ДНК — наиболее крупные полимерные молекулы; их молекулярная масса варьирует от 1 000 до 1 000 000 кД. ДНК и РНК состоят из мономерных единиц — нуклеотидов, поэтому нуклеиновые кислоты называют полинуклеотидами.

А. Строение нуклеотидов

Каждый нуклеотид содержит 3 химически различных компонента: гетероциклическое азотистое основание, моносахарид (пентозу) и остаток фосфорной кислоты. В зависимости от числа имеющихся в молекуле остатков фосфорной кислоты различают нуклеозидмонофосфаты (НМФ), нуклеозиддифосфаты (НДФ), нуклеозидтрифосфаты (НТФ) (рис. 4-1).

В состав нуклеиновых кислот входят азотистые основания двух типов: пуриновые — **аденин** (A), **гуанин** (G) и пиримидиновые — **цитозин** (C), **тимин** (T) и **урацил** (U). Нумерация атомов в основаниях записывается внутри цикла (рис. 4-2). Номенклатура нуклеотидов приведена в табл. 4-1.

Пентозы в нуклеотидах представлены либо рибозой (в составе РНК), либо дезоксирибозой (в составе ДНК). Чтобы отличить номера атомов в пентозах от нумерации атомов в основаниях, запись производят с внешней стороны цикла и к цифре добавляют штрих (′) — 1′, 2′, 3′, 4′ и 5′ (рис. 4-3).

Пентозу соединяет с основанием **N-гликозидная связь**, образованная C_1-атомом пентозы (рибозы или дезоксирибозы) и N_1-атомом пиримидина или N_9-атомом пурина (рис. 4-4).

Нуклеотиды, в которых пентоза представлена рибозой, называют рибонуклеотидами, а нуклеиновые кислоты, построенные из рибонуклеотидов, — рибонуклеиновыми кислотами, или РНК. Нуклеиновые кислоты, в мономеры которых входит дезоксирибоза, называют дезоксирибонуклеиновыми кислотами, или ДНК. Нуклеиновые кислоты по своему строению относят к

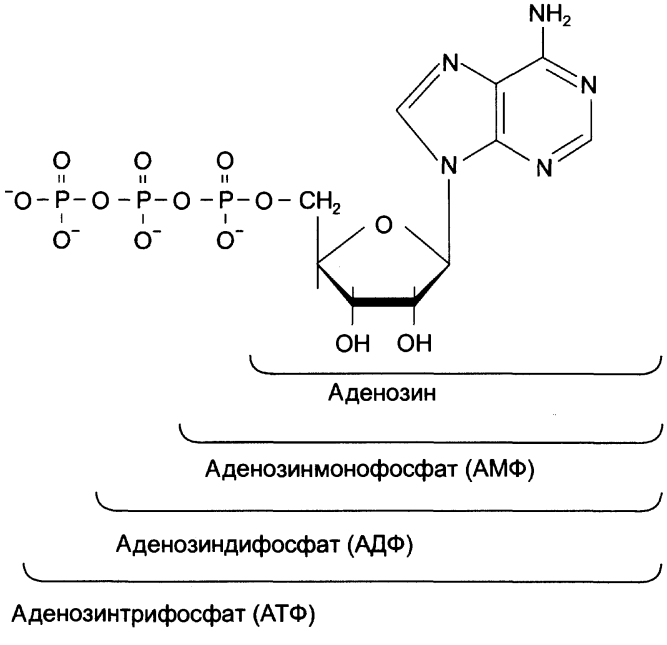


Рис. 4-1. Нуклеозидмоно-, ди- и трифосфаты аденозина. Нуклеотиды — фосфорные эфиры нуклеозидов. Остаток фосфорной кислоты присоединён к 5′-углеродному атому пентозы (5′-фосфоэфирная связь).

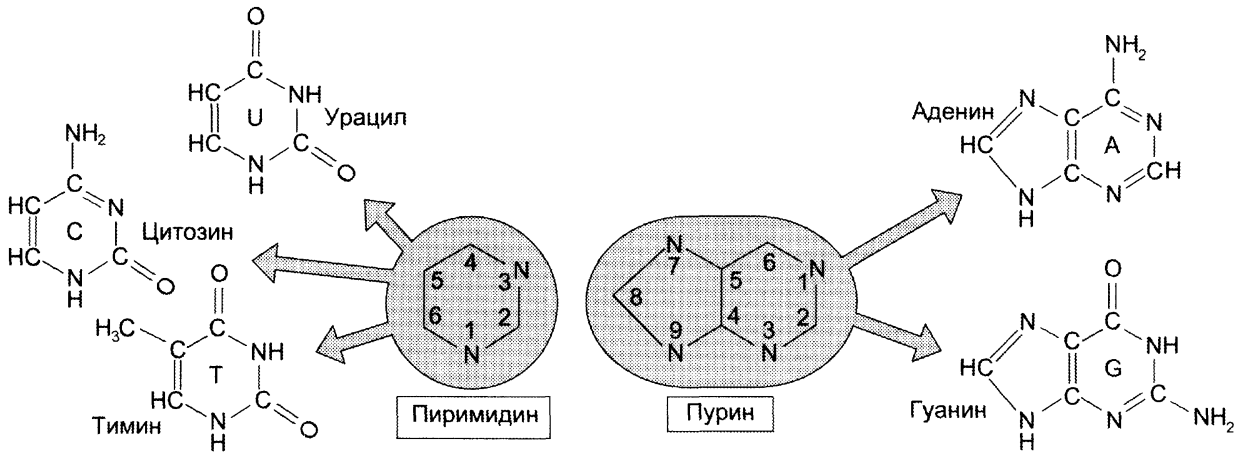


Рис. 4-2. Пуриновые и пиримидиновые основания.

Таблица 4-1. Номенклатура нуклеотидов

Азотистое основание	Нуклеозид	Нуклеотид	Трёхбуквенное обозначение	Однобуквенный код
Аденин	Аденозин	Аденозинмонофосфат	АМФ	A
Гуанин	Гуанозин	Гуанозинмонофосфат	ГМФ	G
Цитозин	Цитидин	Цитидинмонофосфат	ЦМФ	C
Урацил	Уридин	Уридинмонофосфат	УМФ	U
Тимин	Тимидин	Тимидинмонофосфат	ТМФ	T

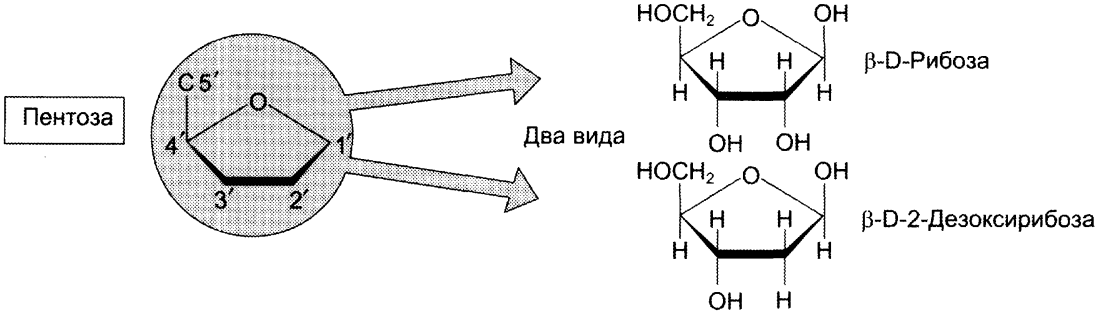


Рис. 4-3. Пентозы. Присутствуют 2 вида — β-D-рибоза в составе нуклеотидов РНК и β-D-2-дезоксирибоза в составе нуклеотидов ДНК.

классу линейных полимеров. Остов нуклеиновой кислоты имеет одинаковое строение по всей длине молекулы и состоит из чередующихся групп — пентоза-фосфат-пентоза- (рис. 4-5). Вариабельными группами в полинуклеотидных цепях служат азотистые основания — пурины и пиримидины. В молекулы РНК входят аденин (A), урацил (U), гуанин (G) и цитозин (C), в ДНК — аденин (A), тимин (T), гуанин (G) и цитозин (C). Уникальность структуры и функциональная индивидуальность молекул ДНК и РНК определяются их первичной структурой —

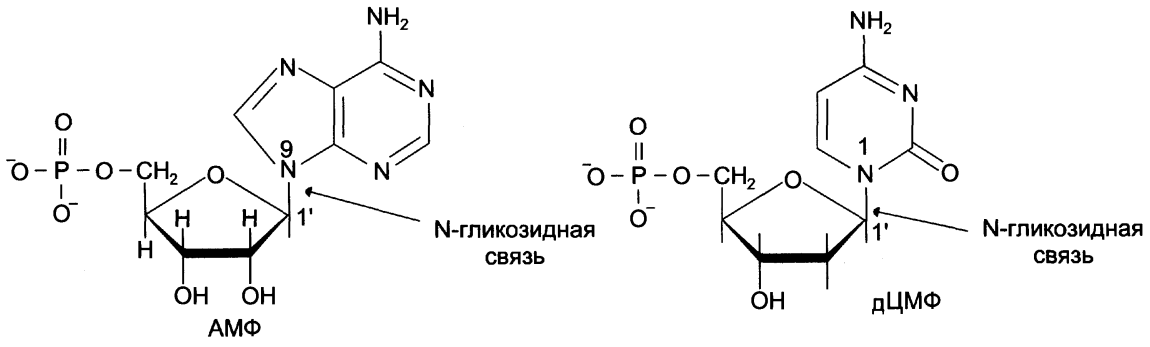


Рис. 4-4. Пуриновый и пиримидиновый нуклеотиды.

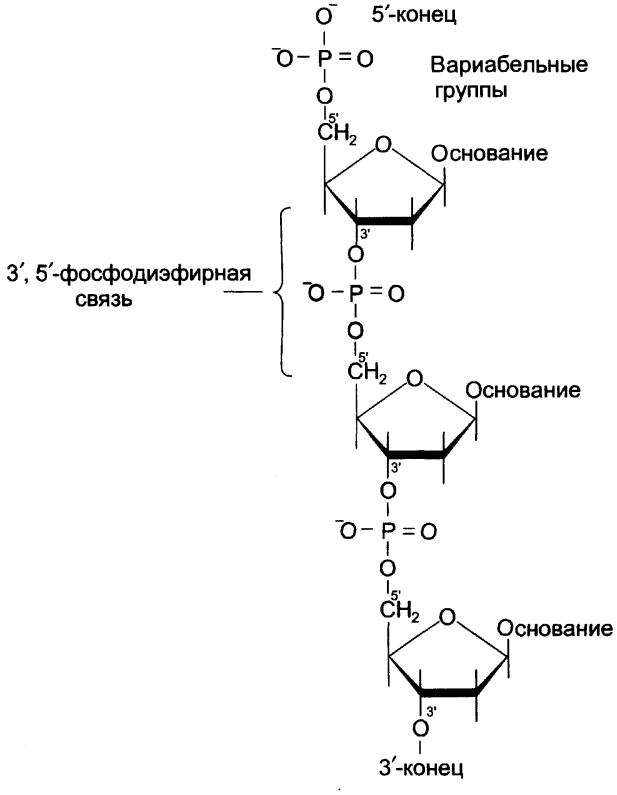


Рис. 4-5. Фрагмент цепи ДНК.

последовательностью азотистых оснований в полинуклеотидной цепи.

Б. Структура дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)

Первичная структура ДНК — порядок чередования дезоксирибонуклеозидмонофосфатов (дНМФ) в полинуклеотидной цепи.

Каждая фосфатная группа в полинуклеотидной цепи, за исключением фосфорного остатка на 5′-конце молекулы, участвует в образовании двух эфирных связей с участием 3′- и 5′-углеродных атомов двух соседних дезоксирибоз, поэтому связь между мономерами обозначают 3′, 5′-фосфодиэфирной.

Концевые нуклеотиды ДНК различают по структуре: на 5′-конце находится фосфатная группа, а на 3′-конце цепи — свободная ОН-группа. Эти концы называют 5′- и 3′-концами. Линейная последовательность дезоксирибонуклеотидов в полимерной цепи ДНК обычно сокращённо записывают с помощью однобуквенного кода, например -A-G-C-T-T-A-C-A- от 5′- к 3′-концу.

В каждом мономере нуклеиновой кислоты присутствует остаток фосфорной кислоты. При pH 7 фосфатная группа полностью ионизирована, поэтому *in vivo* нуклеиновые кислоты существуют в виде полианионов (имеют множественный отрицательный заряд). Остатки пентоз тоже проявляют гидрофильные свойства. Азотистые основания почти нерастворимы в воде, но некоторые атомы пуринового и пиримидинового циклов способны образовывать **водородные связи**.

Вторичная структура ДНК. В 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком была предложена модель пространственной структуры ДНК. Согласно этой модели, молекула ДНК имеет форму спирали, образованную двумя полинуклеотидными цепями, закрученными относительно друг друга и вокруг общей оси. Двойная спираль **правозакрученная**, полинуклеотидные цепи в ней **антипараллельны** (рис. 4-6), т.е. если одна из них ориентирована в направлении 3′→5′, то вторая — в направлении 5′→3′. Поэтому на каждом из кон-

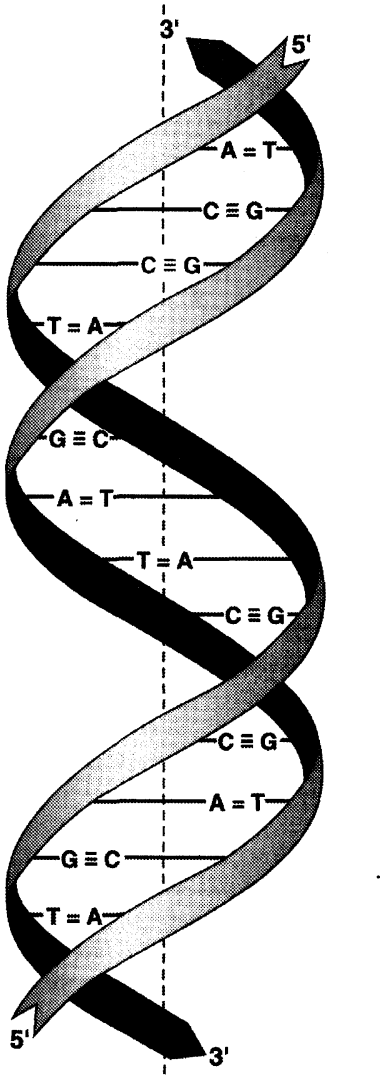


Рис. 4-6. Двойная спираль ДНК. Молекулы ДНК состоят из двух антипараллельных цепей с комплементарной последовательностью нуклеотидов. Цепи закручены относительно друг друга в правозакрученную спираль так, что на один виток приходится примерно 10 пар нуклеотидов.

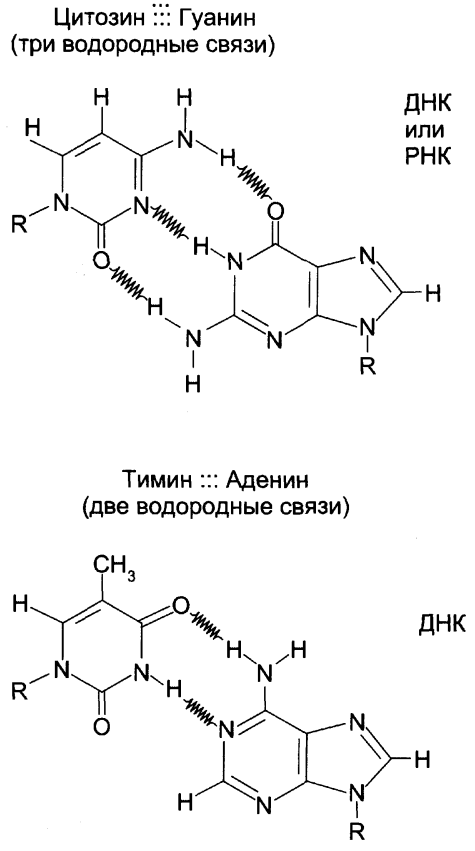


Рис. 4-7. Пурин-пиримидиновые пары оснований в ДНК.

цов молекулы ДНК расположены 5′-конец одной цепи и 3′-конец другой цепи.

Все основания цепей ДНК расположены внутри двойной спирали, а пентозофосфатный остов — снаружи. Полинуклеотидные цепи удерживаются относительно друг друга за счёт водородных связей между комплементарными пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями А и Т (две связи) и между G и С (три связи) (рис. 4-7). При таком сочетании каждая пара содержит по три кольца, поэтому общий размер этих пар оснований одинаков по всей длине молекулы. Водородные связи при других сочетаниях оснований в паре возможны, но они значительно слабее. Последовательность нуклеотидов одной цепи полностью комплементарна последовательности нуклеотидов второй цепи. Поэтому, согласно правилу Чаргаффа (Эрвин Чаргафф в 1951 г. установил закономерности в соотношении пуриновых и пиримидиновых оснований в молекуле ДНК), число пуриновых оснований (A + G) равно числу пиримидиновых оснований (T + C).

Комплементарые основания уложены в стопку в сердцевине спирали. Между основаниями двухцепочечной молекулы в стопке возникают **гидрофобные взаимодействия**, стабилизирующие двойную спираль.

Такая структура исключает контакт азотистых остатков с водой, но стопка оснований не может быть абсолютно вертикальной. Пары ос-

нований слегка смещены относительно друг друга. В образованной структуре различают две бороздки — большую, шириной 2,2 нм, и малую, шириной 1,2 нм. Азотистые основания в области большой и малой бороздок взаимодействуют со специфическими белками, участвующими в организации структуры хроматина.

Третичная структура ДНК (суперспирализация ДНК)

Каждая молекула ДНК упакована в отдельную хромосому. В диплоидных клетках человека содержится **46 хромосом**. Общая длина ДНК всех хромосом клетки составляет 1,74 м, но она упакована в ядре, диаметр которого в миллионы раз меньше. Чтобы расположить ДНК в ядре клетки, должна быть сформирована очень компактная структура. Компактизация и суперспирализация ДНК осуществляются с помощью разнообразных белков, взаимодействующих с определёнными последовательностями в структуре ДНК. Все связывающиеся с ДНК эукариотов белки можно разделить на 2 группы: **гистоновые и негистоновые белки**. Комплекс белков с ядерной ДНК клеток называют хроматином.

Гистоны — белки с молекулярной массой 11–21 кД, содержащие много остатков аргинина и лизина. Благодаря положительному заряду гистоны образуют ионные связи с отрицательно заряженными фосфатными группами, расположенными на внешней стороне двойной спирали ДНК.

Существует 5 типов гистонов. Четыре гистона H2A, H2B, H3 и H4 образуют октамерный белковый комплекс $(H2A, H2B, H3, H4)_2$, который называют «**нуклеосомный кор**» (от англ. *nucleosome core*). Молекула ДНК «накручивается» на поверхность гистонового октамера, совершая 1,75 оборота (около 146 пар нуклеотидов). Такой комплекс гистоновых белков с ДНК служит основной структурной единицей хроматина, её называют «**нуклеосома**». ДНК, связывающую нуклеосомные частицы, называют линкерной ДНК. В среднем линкерная ДНК составляет 60 пар нуклеотидных остатков. Молекулы гистона H1 связываются с ДНК в межнуклеосомных участках (линкерных последовательностях) и защищают эти участки от действия нуклеаз (рис. 4-8).

В ядре каждой клетки присутствует около 60 млн молекул каждого типа гистонов, а общая масса гистонов примерно равна содержанию ДНК. Аминокислотные остатки лизина, аргинина и концевые аминогруппы гистонов могут модифицироваться: ацетилироваться, фосфорилироваться, метилироваться или взаимодействовать с белком убиквитином (негистоновый белок). Модификации бывают обратимыми и необратимыми, они изменяют заряд и конформацию гистонов, а это влияет на взаимодействие гистонов между собой и с ДНК.

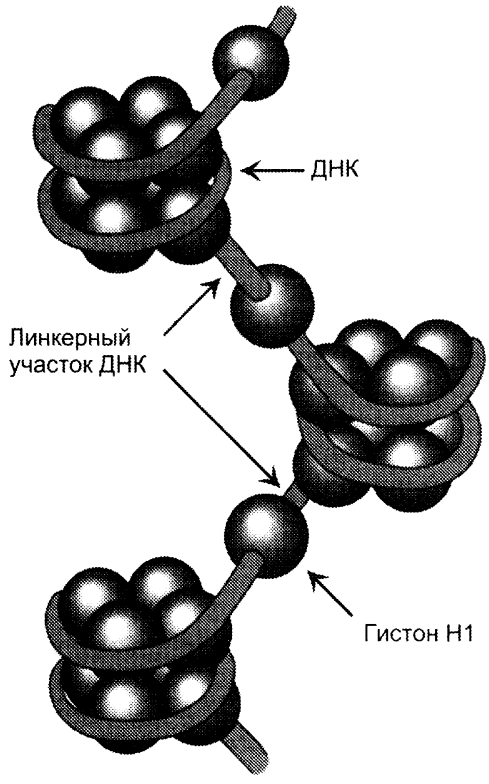


Рис. 4-8. Структура нуклеосом. Восемь молекул гистонов $(H2A, H2B, H3, H4)_2$ составляют ядро нуклеосомы, вокруг которого ДНК образует примерно 1,75 витка.

Активность ферментов, ответственных за модификации, регулируется и зависит от стадии клеточного цикла. Модификации делают возможными конформационные перестройки хроматина.

Негистоновые белки хроматина

В ядре эукариотической клетки присутствуют сотни самых разнообразных ДНК-связывающих негистоновых белков. Каждый белок комплементарен определённой последовательности нуклеотидов ДНК (**сайт ДНК**). К этой группе относят

семейство сайт-специфических белков типа «цинковые пальцы» (см. раздел 1). Каждый «цинковый палец» узнаёт определённый сайт, состоящий из 5 нуклеотидных пар. Другое семейство сайт-специфических белков — гомодимеры. Фрагмент такого белка, контактирующий с ДНК, имеет структуру «спираль-поворот-спираль» (см. раздел 1). К группе структурных и регуляторных белков, которые постоянно ассоциированы с хроматином, относят белки высокой подвижности (**HMG-белки** — от англ. *high mobility gel proteins*). Они имеют молекулярную массу менее 30 кД и характеризуются высоким содержанием заряженных аминокислот. Благодаря небольшой молекулярной массе HMG-белки обладают высокой подвижностью при электрофорезе в полиакриламидном геле. К негистоновым белкам принадлежат также ферменты репликации, транскрипции и репарации. При участии структурных, регуляторных белков и ферментов, участвующих в синтезе ДНК и РНК, нить нуклеосом преобразуется в высококонденсированный комплекс белков и ДНК. Образованная структура в 10 000 раз короче исходной молекулы ДНК.

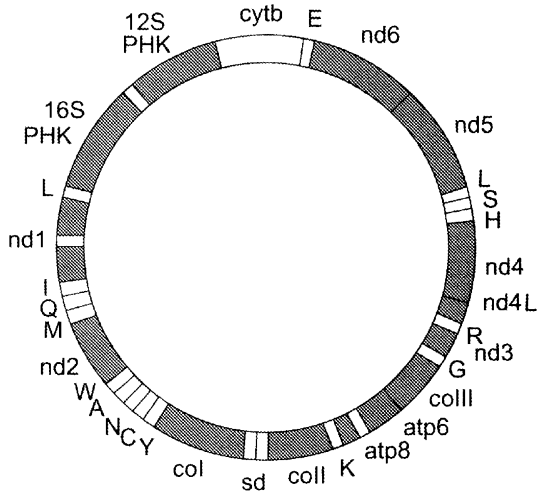


Рис. 4-9. Кольцевая молекула митохондриальной ДНК. Гены *nd1–nd6, nd4l* кодируют субъединицы NADH-дегидрогеназного комплекса; ген coi-III — субъединицы цитохромоксидазы; ген cytb — цитохром b. Гены *atp 8* и *atp 6* кодируют субъединицы АТФ-синтазы (NADH-дегидрогеназный комплекс, цитохромоксидаза, цитохром b — белки, участвующие в энергетическом обмене). Остальные гены кодируют рибосомные (12S РНК и 16S РНК) и транспортные РНК соответствующих аминокислот, обозначенные латинскими буквами.

В. Генетическая система митохондрий

Митохондрии — важнейшие органеллы клеток, осуществляющие синтез АТФ за счёт окисления субстратов. Митохондрии имеют собственный уникальный геном, наследуемый по материнской линии, так как он происходит из цитоплазмы яйцеклетки. Геном митохондрий сперматозоидов не попадает в оплодотворённую яйцеклетку.

Митохондриальный геном человека представлен одной кольцевой молекулой ДНК из 16 569 нуклеотидных пар (рис. 4-9). Он кодирует 13 белков, используемых на построение структурно-функциональных компонентов митохондрий.

В митохондриях отсутствуют ферменты, ответственные за репарацию, поэтому митохондриальный геном содержит немало ошибок. Митохондрии эукариотов имеют очень маленькие рибосомы с константой седиментации 55S, тогда как рибосомы прокариотов — 70S.

Г. Структура рибонуклеиновых кислот (РНК)

Первичная структура РНК — порядок чередования рибонуклеозидмонофосфатов (НМФ) в полинуклеотидной цепи. В РНК, как и в ДНК, нуклеотиды связаны между собой 3′,5′-фосфодиэфирными связями. Концы полинуклеотидных цепей РНК неодинаковы. На одном конце находится фосфорилированная ОН-группа 5′-углеродного атома, на другом конце — ОН-группа 3′-углеродного атома рибозы, поэтому концы называют 5′- и 3′-концами цепи РНК. Гидроксильная группа у 2′-углеродного атома рибозы делает молекулу РНК нестабильной. Так, в слабощелочной среде молекулы РНК гидролизуются даже при нормальной температуре, тогда как структура цепи ДНК не изменяется.

Вторичная структура РНК

Молекула рибонуклеиновой кислоты построена из одной полинуклеотидной цепи. Отдельные участки цепи РНК образуют спирализованные петли — «шпильки», за счёт водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями A-U и G-C. Участки цепи РНК в таких спиральных структурах антипараллельны, но не всегда полностью комплементарны, в них встречаются неспаренные нуклеотидные остатки или даже од-

ноцепочечные петли, не вписывающиеся в двойную спираль. Наличие спирализованных участков характерно для всех типов РНК.

Третичная структура РНК

Одноцепочечные РНК характеризуются компактной и упорядоченной третичной структурой, возникающей путём взаимодействия спирализованных элементов вторичной структуры. Так, возможно образование дополнительных водородных связей между нуклеотидными остатками, достаточно удалёнными друг от друга, или связей между ОН-группами остатков рибозы и основаниями. Третичная структура РНК стабилизирована ионами двухвалентных металлов, например ионами Mg^{2+}, связывающимися не только с фосфатными группами, но и с основаниями.

Основные типы РНК

В цитоплазме клеток присутствуют 3 типа рибонуклеиновых кислот — транспортные РНК (тРНК), матричные РНК (мРНК) и рибосомальные РНК (рРНК). Они различаются по первичной структуре, молекулярной массе, конформации, продолжительности жизни и, самое главное, по функциональной активности.

Транспортные РНК (тРНК)

Пространственную структуру любых тРНК, независимо от различий в последовательности нуклеотидов, описывают универсальной моделью «клеверного листа» (рис. 4-10). В каждой молекуле тРНК есть участки цепи, не участвующие в образовании водородных связей между нуклеотидными остатками. К ним, в частности, относят участок, ответственный за связывание с аминокислотой на 3′-конце молекулы и антикодон — специфический триплет нуклеотидов, взаимодействующий комплементарно с кодоном мРНК.

В состав нуклеотидов тРНК входят минорные основания (в среднем 10—12 оснований на молекулу). Они представлены метилированными основаниями, изомерами и аналогами пиримидинов (рис. 4-11).

Минорные основания выполняют 2 функции: они делают тРНК устойчивыми к действию нуклеаз цитоплазмы и поддерживают определённую третичную структуру молекулы, так как не могут участвовать в образовании комплементарных пар, и препятствуют спирализации определённых участков в полинуклеотидной последовательности тРНК.

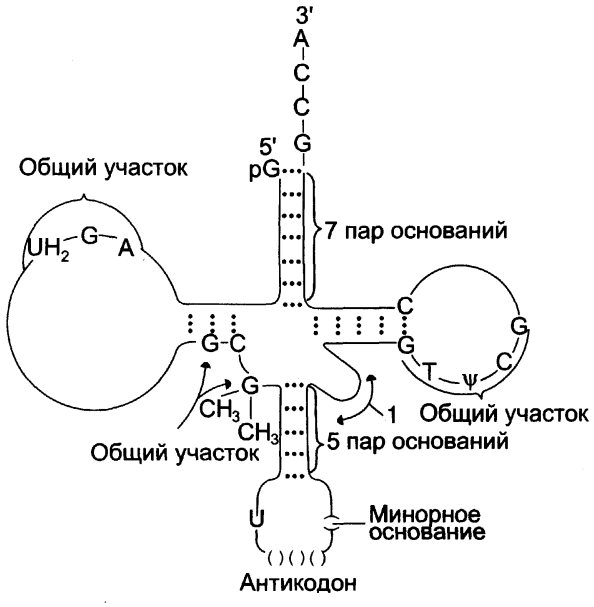


Рис. 4-10. Строение транспортных РНК. Спирализованные участки обозначены на рисунке пунктиром; «общие участки» одинаковы у всех тРНК; 1 — петля переменного размера; UH_2 (дигидроурацил), ψ (псевдоурацил) — минорные основания; антикодону всегда предшествует U (урацил), а после него всегда стоит минорное основание.

Матричные РНК (мРНК)

Первичная структура всех мРНК, независимо от уникальности их кодирующей последовательности, имеет одинаковое строение 5′- и 3′-концов. Так, на 5′- конце присутствует модифицированный нуклеотид **7-метилгуанозин-5′-трифосфат** (кэп). Несколько десятков нуклеотидов отделяют кэп от инициирующего кодона, обычно это триплет -AUG-. За кодирующим участком следует один из терминирующих кодонов — **-UGA-**, **-UUA-**, **-UAG-**. На 3′-конце большинства мРНК присутствует последовательность нуклеотидов из 100—200 аденозинмонофосфатных остатков.

Рибосомальные РНК (рРНК)

Рибосомальные РНК имеют многочисленные спирализованные участки. Различают рРНК — 5S, 5,8S, 28S и 18S (S — коэффициент седиментации). Рибосомальные РНК содержат несколь-

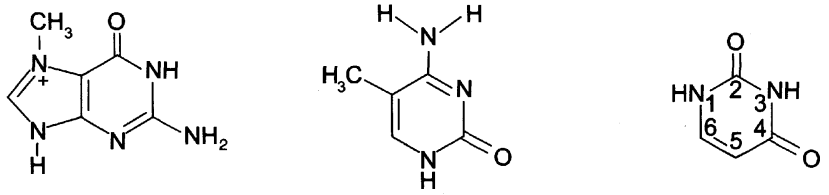


Рис. 4-11. Минорные основания тРНК.

ко модифицированных нуклеотидов, чаще всего это метилированные производные азотистых оснований или рибозы (2′-метилрибоза). рРНК образуют комплексы с белками, которые называют рибосомами. Каждая рибосома состоит из двух субъединиц — малой (40S) и большой (60S). Субъединицы рибосом различаются не только набором рРНК, но и количеством и структурой белков (рис. 4-12).

Д. Гибридизация нуклеиновых кислот

Вторичная структура нуклеиновых кислот образуется за счёт слабых взаимодействий — водородных и гидрофобных. Поэтому если водный раствор ДНК нагреть до 100 °С, то связи, удерживающие две цепи двойной спирали вместе, разрушаются. В результате разрыва водородных и гидрофобных связей цепи ДНК расходятся. Этот процесс называют «**денатурация**». Однако если раствор, содержащий денатурированную ДНК, очень медленно охлаждать, то могут получиться двухспиральные структуры, идентичные исходным. Такой процесс получил название «**ренативация**».

На явлении денатурации и ренативации основан метод, называемый «**молекулярная гибридизация**». Процесс гибридизации может осуществляться между двумя любыми цепями нуклеиновых кислот (ДНК–ДНК, ДНК–РНК) при условии, что они содержат комплементарные последовательности нуклеотидов. Такие гибридные структуры можно выделить центрифугированием в градиенте плотности сахарозы или наблюдать в электронном микроскопе (рис. 4-13).

Если раствор, содержащий образцы ДНК 1 и 2, выделенные из организмов разных видов, денатурировать, а затем провести ренативацию, то образуются двухспиральные структуры. Но наряду с исходными ДНК 1 и ДНК 2

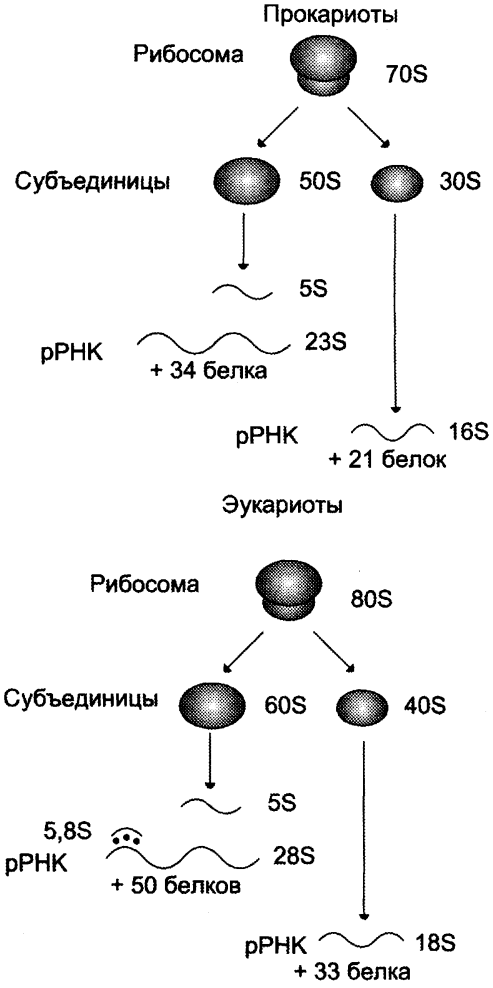


Рис. 4-12. Строение эукариотических и прокариотических рибосом. Величина S характеризует скорость оседания частиц при ультрацентрифугировании и пропорциональна их молекулярной массе. Рибосома прокариотов (70S) состоит из 50S и 30S субъединиц, эукариотов (80S) — состоит из субъединиц 60S и 40S. Рибосомы эукариотов и прокариотов различаются по молекулярной массе субъединиц, количеству молекул рРНК, массе рРНК, количеству и разнообразию белков, способных связывать специфические лиганды.

образуются гибридные двойные спирали, содержащие цепь ДНК образца 1 и цепь ДНК образца 2, где присутствуют как спирализованные, так и неспирализованные участки. В неспирализованных участках фрагменты цепей ДНК не комплементарны, т.е. в ходе гибридизации получаются несовершенные гибриды. Методом молекулярной гибридизации можно установить:

- сходство и различие первичной структуры разных образцов нуклеиновых кислот;
- различие ДНК, выделенных из организмов разных видов;
- идентичность ДНК всех органов и тканей одного организма.

При проведении гибридизации ДНК–РНК были выделены гибридные молекулы, содержащие одну цепь ДНК и одну цепь РНК. Если для эксперимента были взяты ДНК и РНК (первичный транскрипт), выделенные из одного организма, то образовывались совершенные гибриды, потому что молекула РНК комплементарна цепи ДНК. Гибридизацией ДНК–РНК было впервые установлено, что все виды РНК клетки имеют на молекуле ДНК комплементарные участки.

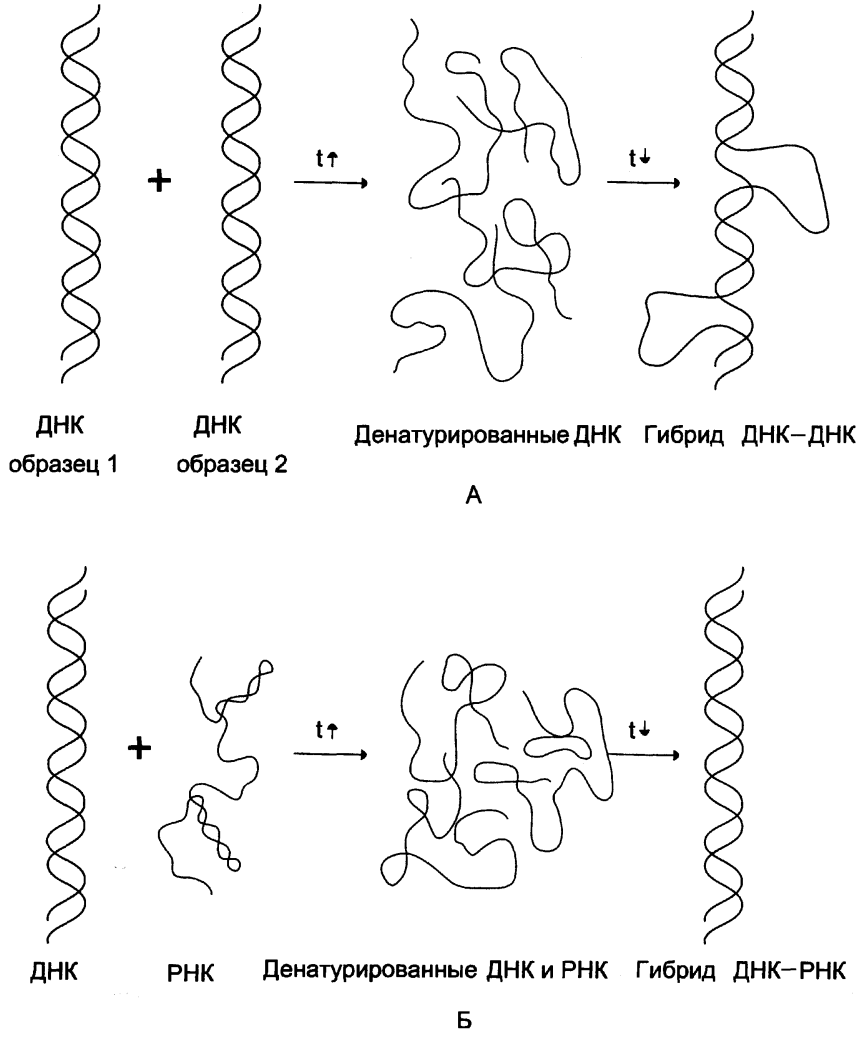


Рис. 4-13. Гибридизация нуклеиновых кислот. А – гибридизация ДНК–ДНК; Б – гибридизация ДНК–РНК.

II. РЕПЛИКАЦИЯ

Живые организмы в течение S-фазы клеточного цикла, которая предшествует делению клетки, удваивают содержание ДНК таким образом, что каждая дочерняя клетка после деления получает набор хромосом, идентичный родительской клетке. Процесс удвоения хромосом называют репликацией (редупликацией).

Хромосома содержит одну непрерывную двухцепочечную молекулу ДНК. При репликации каждая цепь родительской двухцепочечной ДНК служит матрицей для синтеза новой комплементарной цепи. Вновь образованная двойная спираль имеет одну исходную (родительскую) и одну вновь синтезированную (дочернюю) цепь. Такой механизм удвоения ДНК получил название **«полуконсервативная репликация»** (рис. 4-14). Первичная структура дочерней цепи определяется первичной структурой родительской цепи, потому что в основе её образования лежит принцип комплементарности оснований (G ≡ C и A = T).

Ферменты и белки, участвующие в репликации, должны работать быстро и точно. Эти условия выполняются с помощью особого мультиферментного комплекса.

Репликацию можно разделить на 4 этапа: образование репликативной вилки (инициация), синтез новых цепей (элонгация), исключение праймеров, завершение синтеза двух дочерних цепей ДНК (терминация).

A. Инициация репликации

Синтез ДНК у эукариотов происходит в S-фазу клеточного цикла. Инициацию репликации регулируют специфические сигнальные белковые молекулы — **факторы роста**. Факторы роста связываются рецепторами мембран клеток, которые передают сигнал, побуждающий клетку к началу репликации (см. раздел 11).

Синтез новых одноцепочечных молекул ДНК может произойти только при расхождении родительских цепей. В определённом сайте (**точка начала репликации**) происходит локальная денатурация ДНК, цепи расходятся и образуются две **репликативные вилки**, движущиеся в противоположных направлениях.

В образовании репликативной вилки принимает участие ряд белков и ферментов. Так, семейство ДНК-топоизомераз (I, II и III), обладая нуклеазной активностью, участвует в регуляции суперспирализации ДНК. Например, **ДНК-топоизомераза I** разрывает фосфоэфирную связь в одной из цепей двойной спирали и ковалентно присоединяется к 5′-концу в точке разрыва (рис. 4-15). По окончании формирования репликативной вилки фермент ликвидирует разрыв в цепи и отделяется от ДНК.

Разрыв водородных связей в двухцепочечной молекуле ДНК осуществляет **ДНК-хеликаза**. Фермент ДНК-хеликаза использует энергию АТФ для расплетения двойной спирали ДНК.

В результате происходит раскручивание участка суперспирализованной молекулы ДНК. В поддержании этого участка ДНК в раскрученном состоянии участвуют **SSB-белки** (от англ. *single strand binding proteins*, т.е. белки, связывающиеся с одноцепочечными нитями ДНК). SSB-белки, не закрывая азотистых оснований, связываются с одноцепочечной ДНК по всей длине разделившихся цепей и таким образом предотвращают их комплементарное скручивание и образование «шпилек». Они обладают большим сродством к одноцепочечным участкам ДНК, независимо от первичной структуры цепей.

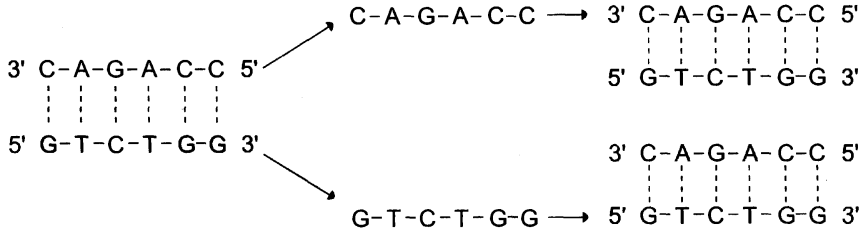


Рис. 4-14. Полуконсервативная репликация.

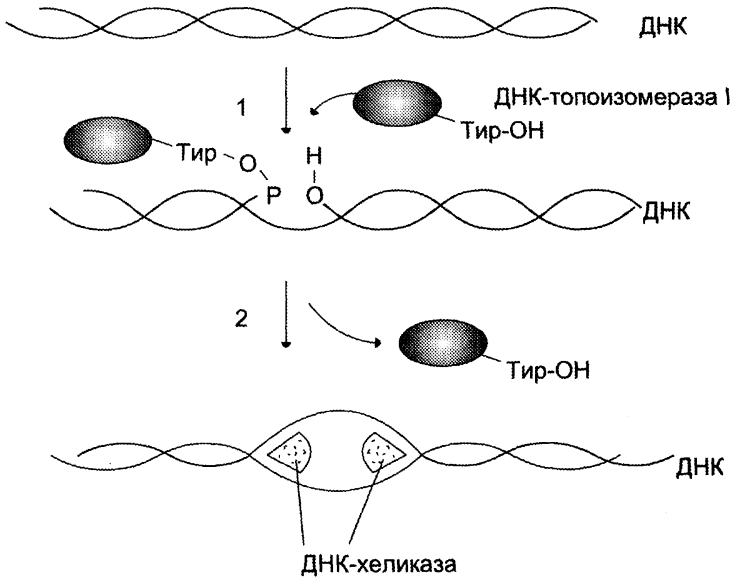


Рис. 4-15. Участие ДНК-топоизомеразы I в образовании репликативной вилки. 1 — фермент расщепляет одну цепь ДНК; между остатком тирозина молекулы фермента и фосфорным остатком цепи образуется ковалентная связь; 2 — происходит локальное раскручивание двойной спирали при участии ДНК-хеликазы; ДНК-топоизомераза I восстанавливает фосфоэфирную связь.

Б. Элонгация

Репликация ДНК осуществляется ДНК-зависимыми ДНК-полимеразами (рис. 4-16). Субстратами и источниками энергии для синтеза продукта служат 4 макроэргических соединения — дезоксирибонуклеозидтрифосфаты дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ, для активации которых необходимы ионы магния. Нейтрализуя отрицательный заряд нуклеотидов, они повышают их реакционную способность. Ферменты проявляют каталитическую активность только в присутствии предварительно раскрученной матричной двухцепочечной ДНК. Синтез цепей ДНК происходит в направлении 5′→3′ растущей цепи, т.е. очередной нуклеотид присоединяется к свободному 3′-ОН-концу предшествующего нуклеотидного остатка. Синтезируемая цепь всегда антипараллельна матричной цепи. В ходе репликации образуются 2 дочерние цепи, представляющие собой копии матричных цепей.

В синтезе эукариотических ДНК принимают участие 5 ДНК-полимераз (α, β, γ, δ, ε). **ДНК-полимеразы** различают по числу субъединиц, молекулярной массе, ассоциации с разными вспомогательными белками, ускоряющими процесс биосинтеза ДНК, и функциональному назначению. ДНК-полимеразы α (альфа), β (бета), δ (дельта), ε (эпсилон) участвуют в синтезе ДНК в ядре клеток, ДНК-полимераза γ (гамма) — в репликации митохондриальной ДНК.

ДНК-полимеразы β, δ, ε не могут инициировать образование дочерних цепей, так как не имеют сродства к одиночной нити ДНК. Инициирует репликацию ДНК-полимераза α, которая комплементарна определённому сайту одноцепочечной ДНК. Присоединяясь к нему, ДНК-полимераза α синтезирует небольшой фрагмент РНК — праймер, состоящий из 8–10 рибонуклеотидов. ДНК-полимераза α состоит из четырёх субъединиц. Каждая из субъединиц фермента выполняет определённую функцию: «узнавание» сайта репликации, синтез праймера (8–10 рибонуклеотидов), синтез фрагмента цепи ДНК, около 50 дезоксирибонуклеотидов. Таким образом, ДНК-полимераза α синтезирует олигонуклеотид, содержащий примерно 60 нуклеотидных остатков; первые 8–10 представлены рибонуклеотидами (праймер), а остальные — дезоксирибонуклеотидами.

ДНК-полимераза δ

Олигонуклеотид, синтезированный ДНК-полимеразой α и образующий небольшой двухце-

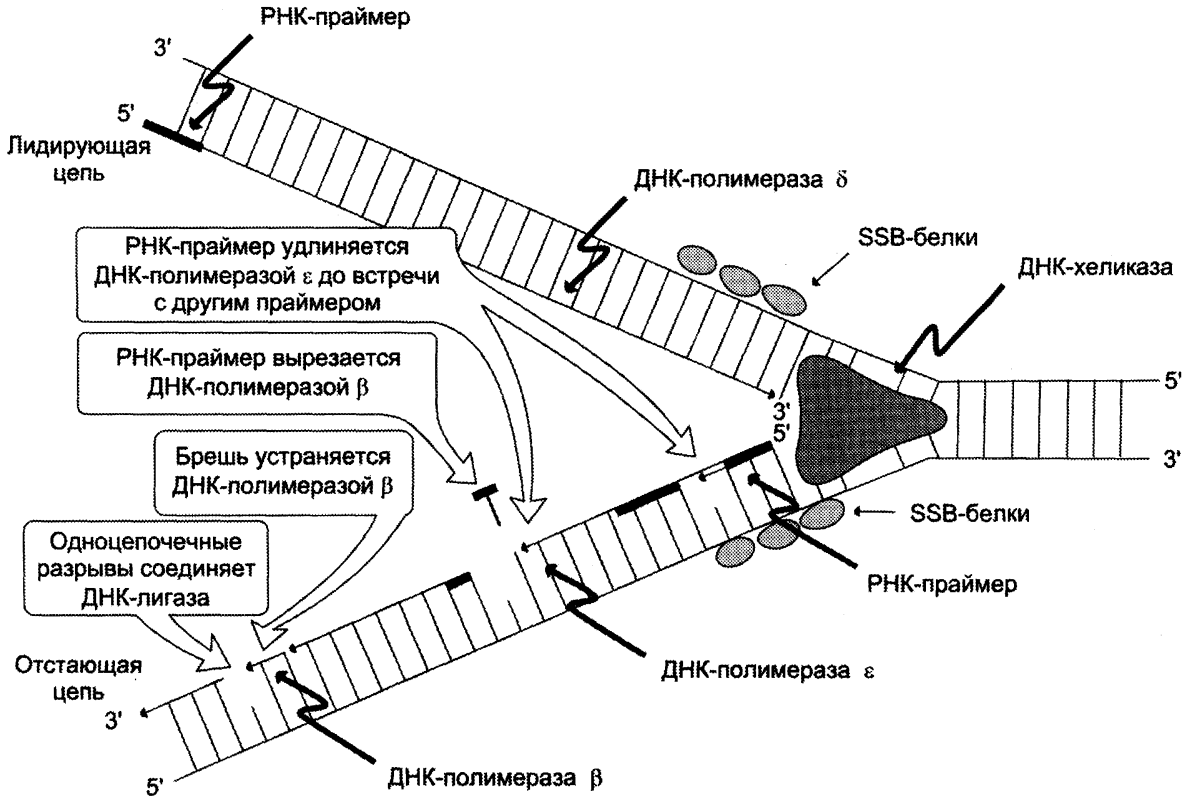


Рис. 4-16. Репликация.

почечный фрагмент с матрицей, позволяет присоединиться ДНК-полимеразе δ и продолжить синтез новой цепи в направлении от 5′- к 3′-концу по ходу раскручивания репликативной вилки.

ДНК-полимераза δ последовательно наращивает цепь, шаг за шагом присоединяя к ней соответствующие дезоксинуклеотиды. Выбор ДНК-полимеразой δ очередного нуклеотида определяется матрицей. Включение дезоксирибонуклеозидмонофосфатов в растущую цепь ДНК сопровождается гидролизом макроэргических связей соответствующих нуклеозидтрифосфатов и отщеплением пирофосфата ($H_4P_2O_7$). Энергия макроэргических связей расходуется на образование 3′,5′-фосфодиэфирной связи между последним нуклеотидом растущей цепи ДНК и присоединяемым нуклеотидом. Включение нуклеотида в синтезируемую цепь ДНК невозможно без предварительного связывания азотистого основания водородными связями с комплементарным нуклеотидом матричной цепи. ДНК-полимеразы (α, β, γ, δ, ε) могут синтезировать нуклеотидную цепь только в направлении 5′→3′, матричная цепь всегда считывается в направлении 3′→5′.

В каждой репликативной вилке идёт одновременно синтез двух новых (дочерних) цепей. Направление синтеза цепи ДНК совпадает с направлением движения репликативной вилки лишь для одной из вновь синтезируемых цепей (**лидирующая цепь**). На второй матричной цепи синтез дочерней ДНК осуществляется двумя ферментами: ДНК-полимеразой α и ДНК-полимеразой ε в направлении 5′→3′, но против движения репликативной вилки. Поэтому вторая цепь синтезируется прерывисто, короткими фрагментами, которые называют «**фрагменты Оказаки**» (по имени открывшего их исследователя). Дочерняя цепь ДНК, синтез которой происходит фрагментами, называют отстающей цепью. Каждый фрагмент Оказаки, примерно 100 нуклеотидных остатков, содержит праймер. Праймеры удаляет ДНК-полимераза β, постепенно

отщепляя с 5′-конца фрагмента по одному рибонуклеотиду. К ОН-группе на 3′-конце предыдущего фрагмента ДНК-полимераза β присоединяет дезоксирибонуклеотиды в количестве, равном вырезанному праймеру и таким образом заполняет брешь, возникающую при удалении рибонуклеотидов.

Фермент **ДНК-лигаза** катализирует образование фосфодиэфирной связи между 3′-ОН-группой дезоксирибозы одного фрагмента цепи ДНК и 5′-фосфатом следующего фрагмента. Реакция протекает с затратой энергии АТФ. Таким образом, из множества фрагментов Оказаки образуется непрерывная цепь ДНК.

В. Ориджины репликации

ДНК хромосомы человека содержит примерно 150 млн пар нуклеотидов. Репликация такой большой молекулы со скоростью 50 нуклеотидов в минуту шла бы примерно 800 ч. Поэтому инициация синтеза ДНК происходит в нескольких сайтах хромосомы, которые называют сайтами инициации репликации, или **ориджинами** (от англ. *origin* — происхождение) репликации (рис. 4-17). Термин «сайт» используют для обозначения любого участка генома. Ориджины репликации имеют определённую нуклеотидную последовательность. Последовательность ДНК, ограниченную двумя ориджинами репликации, называют единицей репликации, или **репликоном**. На ориджинах при участии ДНК-топоизомеразы I инициируется двунаправленная репликация. Образуются две репликативные вилки, перемещающиеся в противоположных направлениях до тех пор, пока не встретятся со следующим репликоном, т.е. репликация прекращается, когда встречаются две репликативные вилки.

Метилирование ДНК

После завершения репликации происходит метилирование нуклеотидных остатков вновь образованных цепей ДНК. Метильные группы присоединяются ко всем остаткам аденина в последовательности **-GATC-**, при этом образуется N_6-метиладенин, а также возможны метилирование цитозина в последовательности -GC- и образование N_5-метилцитозина. Количество метилированных оснований равно примерно 1–8%. Модификация происходит при участии ферментов, использующих в качестве источника метильных групп S-аденозилметионин (SAM) (см. раздел 9). Присоединение метильных групп к остаткам аденина и цитозина не нарушает комплементарности цепей (рис. 4-18).

Наличие метильных групп в цепях ДНК необходимо для формирования структуры хромосом, а также для регуляции транскрипции генов. В течение непродолжительного времени в молекуле ДНК последовательности -GATC- метилированы по аденину только в матричной, но не в новой цепи. Это различие используется ферментами репарации для исправления ошибок, которые могут возникать при репликации.

Г. Строение 3′- и 5′-концов цепей ДНК. Теломерная ДНК

На каждом конце хромосомы присутствует специфическая нуклеотидная последовательность. Она представлена многочисленными повторами (сотни или даже тысячи раз) олигонук-

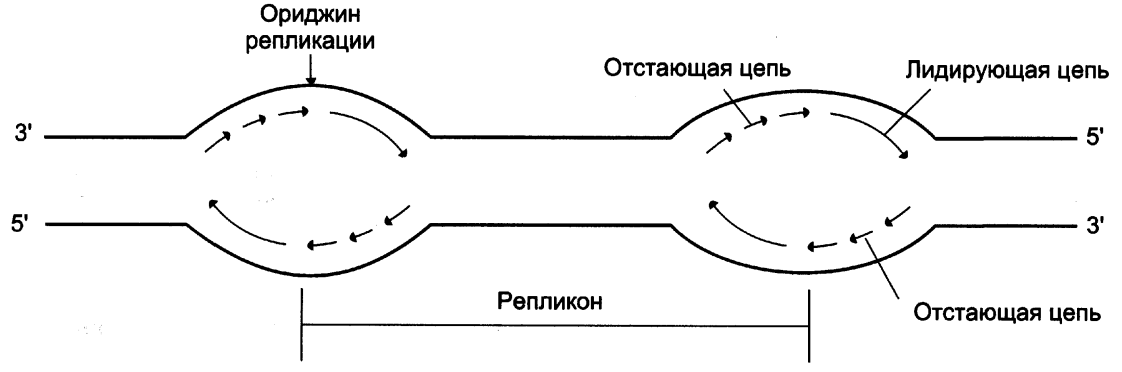


Рис. 4-17. Образование двух репликативных вилок, перемещающихся в противоположных направлениях от ориджина.

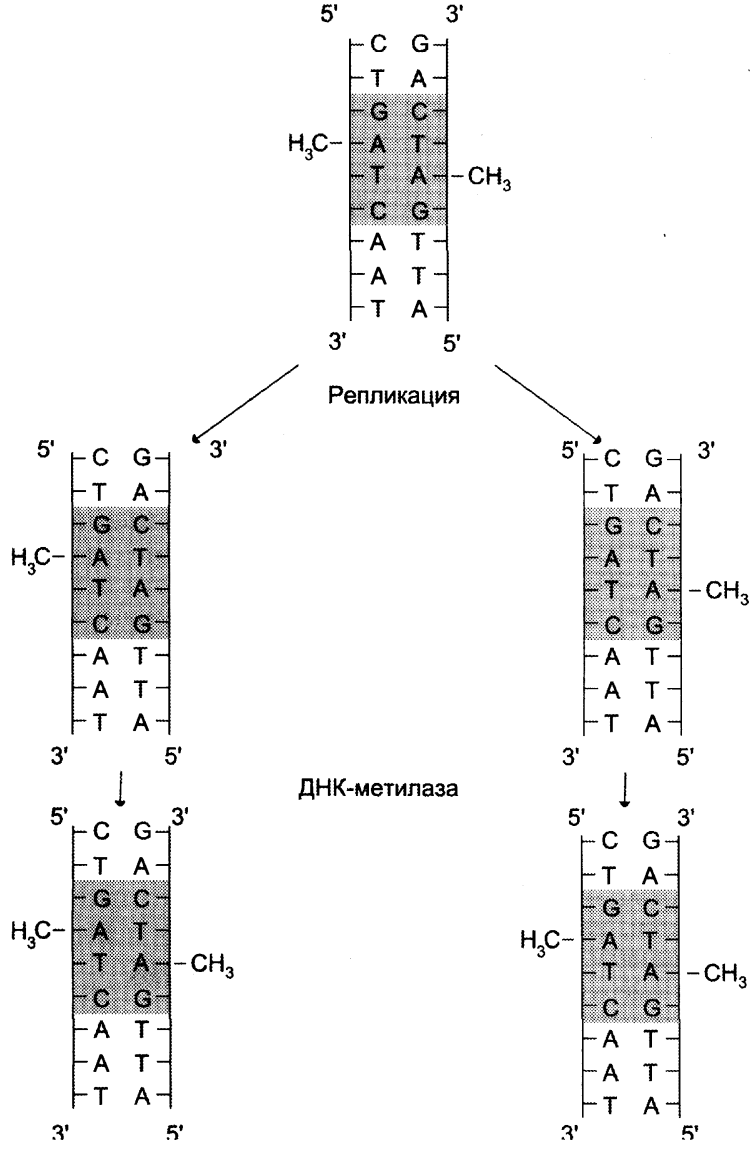


Рис. 4-18. Метилирование остатков аденина в последовательности -GATC-. В течение нескольких минут после репликации, пока не произошло метилирование, новая цепь ДНК отличается от матричной цепи.

леотидов **-GGGTTA-**, называемых теломерной последовательностью, или просто теломерной ДНК. Наличие теломер необходимо для завершения репликации концевых информативных последовательностей хромосом, т.е. для сохранения генетической информации.

После завершения репликации хромосомы 5′-концы дочерних цепей ДНК недостроены, так как после удаления праймеров эти фрагменты оказываются недореплицированными. Это происходит потому, что ДНК-полимераза β, отвечающая за заполнение бреши, образованной после удаления праймера, не может вести синтез цепи ДНК от 3′- к 5′-концу (рис. 4-19, А). Таким образом, в ходе каждого цикла репликации 5′-концы синтезированных цепей укорачиваются. Но такие потери не представляют опасности для генетической информации хромосом, потому что укорочение ДНК идёт за счёт теломер. Во время следующего цикла репликации

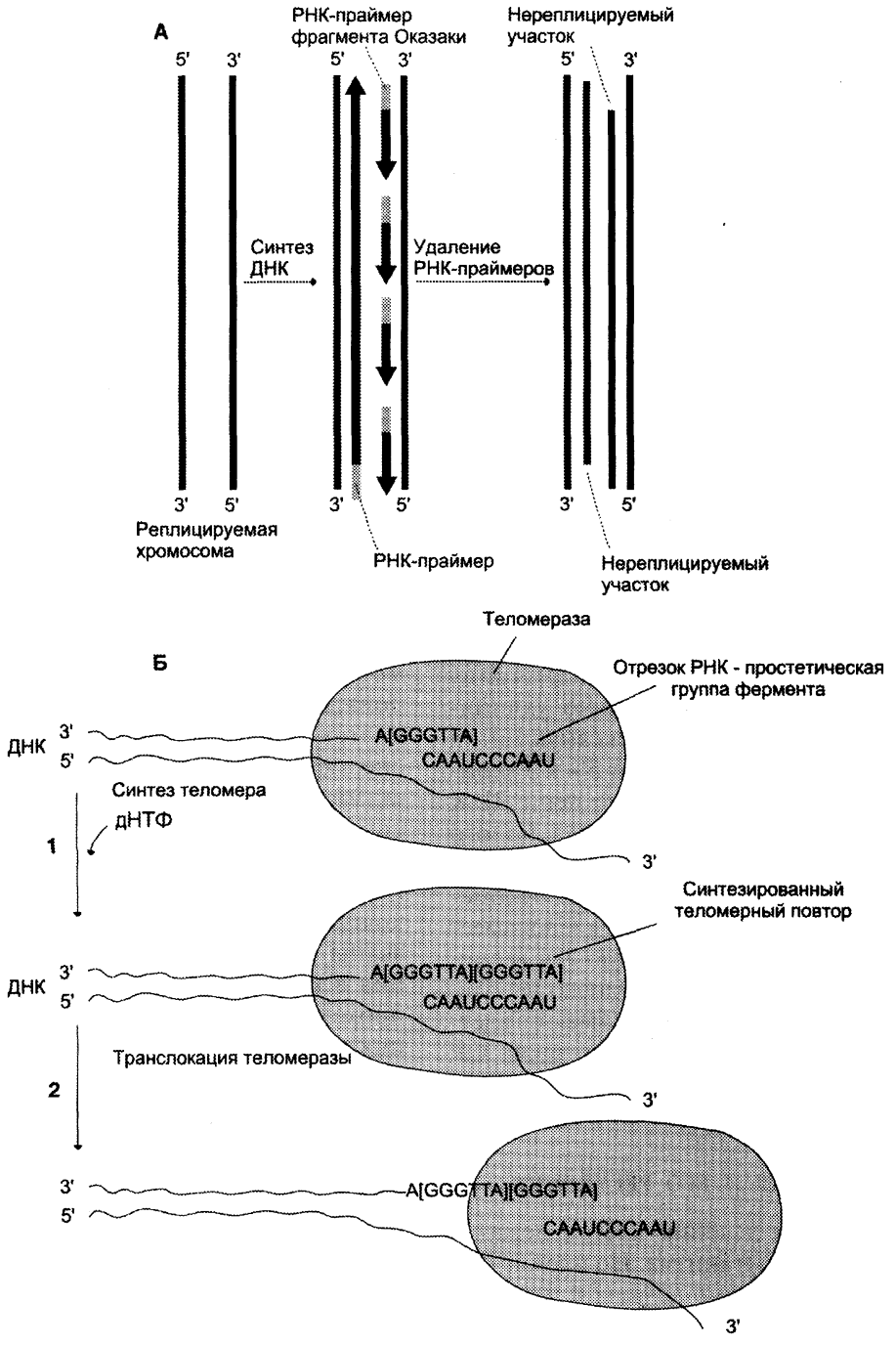


Рис. 4-19. Синтез теломерной ДНК. А – на рисунке показано укорочение вновь синтезированных цепей ДНК после удаления праймеров; **Б** – в состав теломеразы входит короткая молекула РНК, содержащая в активном центре последовательность нуклеотидов, комплементарную теломерному повтору; **1** – фермент прикрепляется за счёт взаимодействия РНК с существующей теломерой и добавляет последовательно по одному нуклеотиду фрагмент -GGGTTA-. Матрицей служит простетическая группа теломеразы — фрагмент РНК; **2** – фермент перемещается по нити ДНК таким образом, что РНК-матрица в составе теломеразы постоянно комплементарно связана с концом вновь синтезированного теломерного повтора. Заново синтезированная теломерная ДНК служит матрицей для удлинения второй цепи ДНК, но уже в ходе следующего цикла клеточного деления. Теломерный повтор на рисунке взят в квадратные скобки -[GGGTTA]-.

5′-концы цепей ДНК опять остаются недостроенными. Таким образом, с каждым клеточным делением ДНК хромосом будут последовательно укорачиваться. Укорочение теломер в большинстве клеток по мере их старения — важный фактор, определяющий продолжительность жизни организма.

Однако в эмбриональных и других быстроделящихся клетках потери концов хромосом недопустимы, потому что укорочение ДНК будет происходить очень быстро. В эукариотических клетках имеется фермент **теломераза** (нуклеотидилтрансфераза), обеспечивающий восстановление недореплицированных 5′-концов. К особенностям этого фермента относят присутствие в качестве простетической группы РНК. Фрагмент РНК в активном центре теломеразы служит матрицей при синтезе теломерных повторов хромосом.

С помощью РНК фермент комплементарно прикрепляется к 3′-концу недостроенной дочерней цепи ДНК. Теломераза по принципу комплементарности последовательно удлиняет 3′-конец цепи ДНК на один гексануклеотид -GGGTTA-. Синтез всегда идёт от 5′- к 3′-концу. Затем теломераза смещается по цепи ДНК на один теломер и начинает синтез нового фрагмента -GGGTTA- (рис. 4-19, Б).

В большинстве соматических клеток теломераза неактивна, так как соматическая клетка имеет длину теломерной ДНК, достаточную для времени жизни клетки и её потомства. Однако небольшую активность теломеразы обнаруживают в клетках с высокой скоростью обновления, таких как лимфоциты, стволовые клетки костного мозга, клетки эпителия, эпидермиса кожи и др.

Д. Клеточный цикл и его регуляция

Процессы роста и деления клеток лежат в основе жизни любого организма. Но прежде чем совершить деление, клетка должна с высокой точностью копировать свой геном, синтезировать множество высоко- и низкомолекулярных соединений. Совокупность событий, обеспечивающих деление эукариотических клеток, называют **«клеточный цикл»**. Продолжительность клеточного цикла зависит от типа делящихся клеток, у взрослого человека она может варьировать примерно от 8 ч и более, а для некоторых типов клеток до года и больше (рис. 4-20).

Все фазы клеточного цикла G_1, S, G_2, M могут различаться по длительности, но в особенности это касается фазы G_1, длительность которой может быть равна практически нулю или быть столь продолжительной, что может казаться, будто клетки вообще прекратили деление. В этом случае говорят, что клетки находятся в состоянии покоя (фаза G_0). Так, нейроны взрослого человека не делятся вообще. Клетки эпителия кишечника делятся на протяжении всей жизни человека, но даже у этих быстропролиферирующих клеток подготовка к делению занимает 24 ч. Клетки лёгких, почек, печени во взрослом организме начинают делиться только лишь в ответ на повреждение органов.

Внешние сигналы могут стимулировать или ингибировать прохождение клетки через цикл. Пролиферативные сигналы очень разнообразны, они зависят от типа клетки, стадии развития и других факторов. Такими сигналами могут быть факторы роста, интерлейкины, гормоны, способные поддерживать или индуцировать пролиферацию определённых типов клеток. Сигнальные молекулы связываются специфическими мембранными рецепторами, активируют внутриклеточные пути передачи сигналов от рецептора к ядру и таким образом индуцируют транскрипцию определённых генов. Одними из первых активируются гены, кодирующие белки **циклины**. Белки были названы циклинами, потому что их концентрация в клетке периодически меняется по мере прохождения клеткой разных фаз клеточного цикла.

Все циклины делят на 2 подсемейства: **G1-циклины** (D, E) и митотические циклины (A и B). Любой из циклинов представлен группой полиморфных белков, например циклин D представлен формами D1, D2, D3. У каждого типа циклинов есть гомологичный участок из 100 аминокислотных остатков — «циклиновый бокс», отвечающий за связывание с циклинзависимой киназой (от англ. CDK — *cyclin-dependent kinases*). В клетках эукариотов существует примерно восемь различных CDK (CDK1-8), активирующихся различными циклинами (табл. 4-2).

Циклинзависимые киназы, связывая циклин, переходят в активную форму и могут фосфорилировать специфические белки, например факторы транскрипции, белки-ингибиторы факто-

ров транскрипции, которые регулируют синтез ферментов, обеспечивающих репликацию. Синтез каждого циклина начинается при подготовке к соответствующей фазе клеточного цикла, его концентрация в клетке повышается, а после окончания фазы резко падает до нуля. Завершившие свою работу комплексы циклинов и CDK связываются специфическими белками, ингибирующими их активность, и затем подвергаются разрушению.

III. РЕПАРАЦИЯ

Процесс, позволяющий живым организмам восстанавливать повреждения, возникающие в ДНК, называют репарацией. Все репарационные механизмы основаны на том, что ДНК — двухцепочечная молекула, т.е. в клетке есть 2 копии генетической информации. Если нуклеотидная последовательность одной из двух цепей оказывается повреждённой (изменённой), информацию можно восстановить, так как вторая (комплементарная) цепь сохранена.

Процесс репарации происходит в несколько этапов. На первом этапе выявляется нарушение комплементарности цепей ДНК. В ходе второго этапа некомплементарный нуклеотид или только основание устраняется, на третьем и четвёртом этапах идёт восстановление целостности цепи по принципу комплементарности. Однако в зависимости от типа повреждения количество этапов и ферментов, участвующих в его устранении, может быть разным.

Очень редко происходят повреждения, затрагивающие обе цепи ДНК, т.е. нарушения структуры нуклеотидов комплементарной пары. Такие повреждения в половых клетках не репарируются, так как для осуществления сложной репарации с участием гомологичной рекомбинации требуется наличие диплоидного набора хромосом.

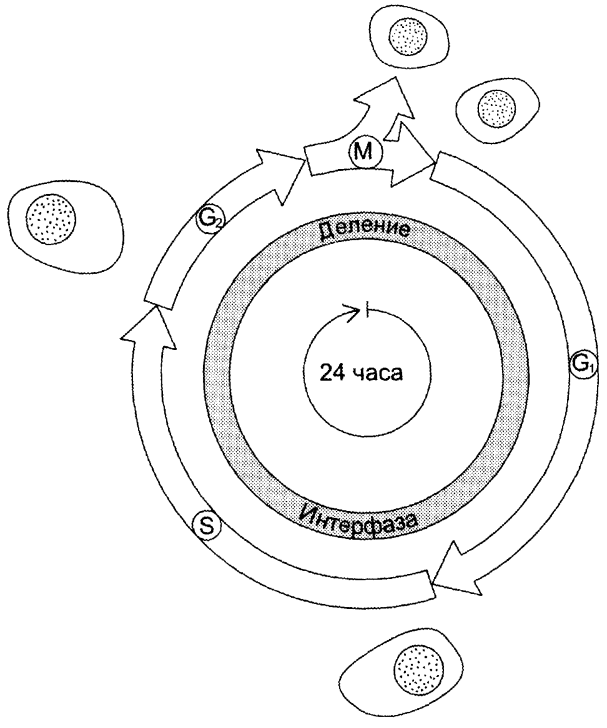


Рис. 4-20. Фазы клеточного цикла. После фазы М, в ходе которой происходит деление ядра (митоз) и цитоплазмы (цитокинез), дочерние клетки вступают в интерфазу нового цикла. Интерфаза начинается с фазы G_1, в ходе которой активно происходят биосинтетические процессы, резко замедленные во время митоза. Фаза S — период синтеза ДНК; она заканчивается, когда содержание ДНК в ядре удвоится и хромосомы полностью реплицируются. Затем наступает фаза G_2, в ходе которой происходят деление митохондрий и увеличение энергетических запасов клетки. Фаза G_2 продолжается до начала митоза, т.е. фазы М. В фазе М ядерная оболочка разрушается, формируются два новых ядра, цитоплазма делится с образованием двух дочерних клеток, имеющих по одному ядру. На рисунке представлен 24-часовой цикл.

A. Спонтанные повреждения

Нарушения комплементарности цепей ДНК могут происходить спонтанно, т.е. без участия каких-либо повреждающих факторов, например

Таблица 4-2. Циклины и циклинзависимые киназы, регулирующие прохождение клеточного цикла

Циклин	Киназа	Функция
D, E	CDK4, CDK6	Регулирует переход клетки из G_1-фазы в S-фазу
A	CDK2	Активирует синтез ДНК на начальной стадии S-фазы
B	CDK1	Регулирует переход клетки из G_2-фазы в М-фазу

в результате ошибок репликации, дезаминирования нуклеотидов, депуринизации.

Ошибки репликации

Точность репликации ДНК очень велика, но примерно один раз на 10^5—10^6 нуклеотидных остатков происходят ошибки спаривания, и тогда вместо пары нуклеотидов A—T, G—C в дочернюю цепь ДНК оказываются включёнными нуклеотиды, некомплементарные нуклеотидам матричной цепи. Однако ДНК-полимеразы δ, ε способны после присоединения очередного нуклеотида в растущую цепь ДНК делать шаг назад (в направлении от 3′- к 5′- концу) и вырезать последний нуклеотид, если он некомплементарен нуклеотиду в матричной цепи ДНК. Этот процесс исправления ошибок спаривания (или коррекция) иногда не срабатывает, и тогда в ДНК по окончании репликации остаются некомплементарные пары, тем более, что ДНК-полимераза α лишена корректирующего механизма и «ошибается» чаще, чем другие полимеразы.

При неправильном спаривании в первичной структуре дочерней цепи ДНК необычные основания не появляются, нарушена только комплементарность. Система репарации некомплементарных пар должна происходить только на дочерней цепи и производить замену некомплементарных оснований только в ней. Ферменты, участвующие в удалении неправильной пары нуклеотидов, распознают матричную цепь по наличию метилированных остатков аденина в последовательностях **-GATC-**. Пока основания нуклеотидных остатков в дочерней цепи неметилированы, ферменты должны успеть выявить ошибку репликации и устранить её.

Распознавание и удаление (первый этап) некомплементарного нуклеотида происходят при участии специальных белков **mut S, mut L, mut H**. Каждый из белков выполняет свою специфическую функцию. Mut S находит неправильную пару и связывается с этим фрагментом. Mut H присоединяется к метилированному (по аденину) участку -GATC-, расположенному вблизи некомплементарной пары. Связующим между mut S и mut H служит белок mut L, его присоединение завершает образование активного фермента. Формирование комплекса mut S, mut L, mut H на участке, содержащем ошибку, способствует проявлению у белка mut H эндонуклеазной активности. Ферментативный комплекс гидролизует фосфоэфирную связь в неметилированной цепи (рис. 4-21).

К свободным концам цепи присоединяется экзонуклеаза (второй этап). Отщепляя по одному нуклеотиду в направлении от 3′- к 5′- концу дочерней цепи, она устраняет участок, содержащий некомплементарную пару. Брешь застраивает ДНК-полимераза β (третий этап), соединение основного и вновь синтезированного участков цепи катализирует фермент ДНК-лигаза (четвёртый этап). Для успешного функционирования экзонуклеазы, ДНК-полимеразы β и ДНК-лигазы необходимо участие в репарации хеликазы и SSB-белков.

Депуринизация (апуринизация)

ДНК каждой клетки человека теряет за сутки около 5000 пуриновых остатков вследствие разрыва N-гликозидной связи между пурином и дезоксирибозой (рис. 4-22).

Тогда в молекуле ДНК на месте этих оснований образуется участок, лишённый азотистых оснований, названный АП-сайтом (AP-site, или апуриновый сайт). Термин «АП-сайт» используют также в тех случаях, когда из ДНК выпадают пиримидиновые основания и образуются апиримидиновые сайты (от англ. *apurinic-apyrimidinic site*).

Этот тип повреждений устраняет фермент **ДНК-инсертаза** (от англ. *insert* — вставлять), который может присоединять к дезоксирибозе основание в соответствии с правилом комплементарности. В этом случае нет необходимости разрезать цепь ДНК, вырезать неправильный нуклеотид и репарировать разрыв.

Дезаминирование

Реакции дезаминирования цитозина и превращение его в урацил (рис. 4-23), аденина в гипоксантин, гуанина в ксантин происходят значительно реже, чем депуринизация, и составляют 10 реакций на один геном в сутки.

Исправление этого вида спонтанного повреждения происходит в 5 этапов (рис. 4-24). В репарации принимает участие **ДНК-N-гликозилаза**, гидролизующая связи между аномальным основанием и дезоксирибозой (первый этап), в результате образуется АП-сайт, который распознаёт фермент **АП-эндонуклеаза** (второй этап). Как только в цепи ДНК возникает разрыв, в работу вступает ещё один

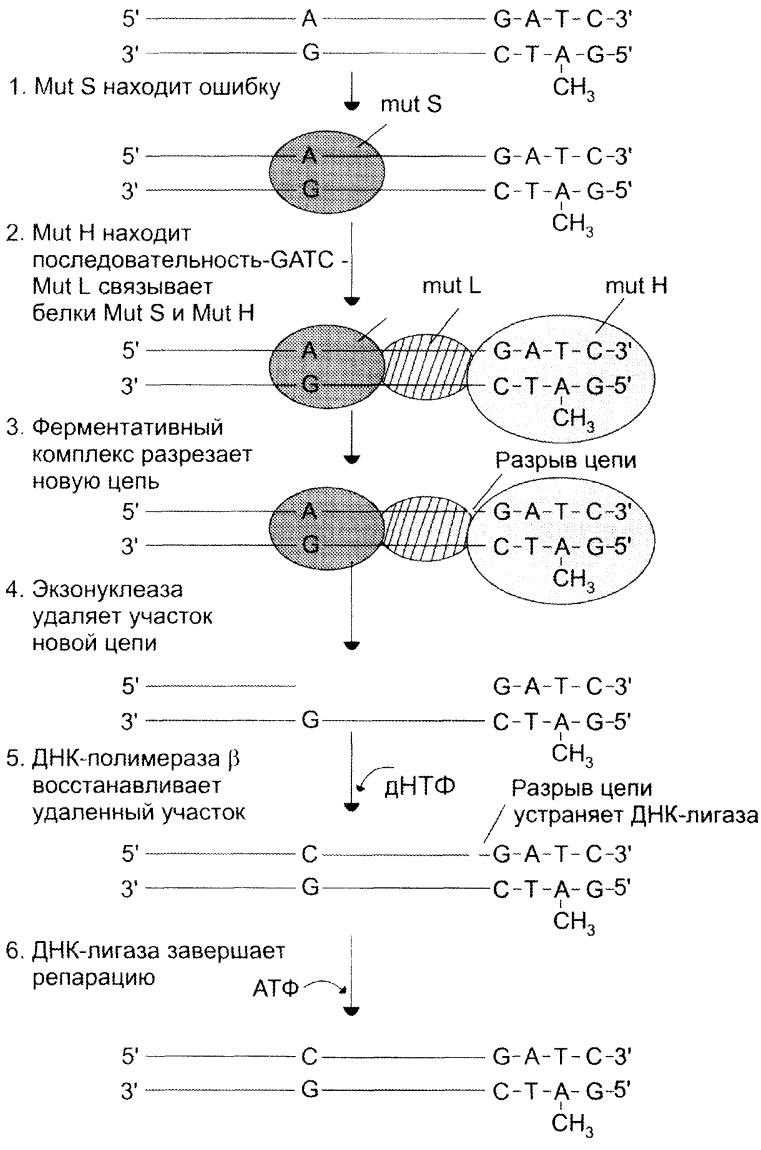


Рис. 4-21. Система репарации ошибок репликации. 1 — белок mut S «узнаёт» некомплементарную пару и присоединяется в этом участке ДНК; 2 — белки mut H взаимодействуют с метилированной по аденину последовательностью материнской цепи -GATC- ; завершается формирование ферментативного комплекса после присоединения mut L; 3 — комплекс определяет вновь синтезированную цепь по отсутствию метилированного остатка аденина в последовательности -GATC- и разрывает её; 4 — экзонуклеаза удаляет фрагмент дочерней цепи ДНК, содержащий ошибку; 5 — ДНК-полимераза β по принципу комплементарности застраивает брешь; 6 — ДНК-лигаза 3'-конец вновь синтезированного фрагмента соединяет с основной цепью и завершает репарацию ошибки.

фермент — **АП-экзонуклеаза**, который отщепляет от цепи дезоксирибозу, лишённую основания (третий этап). В цепи ДНК появляется брешь размером в один нуклеотид. Следующий фермент **ДНК-полимераза** β к 3′-концу разорванной цепи присоединяет нуклеотид по принципу комплементарности (четвёртый этап). Чтобы соединить два свободных конца (3′-конец встроенного нуклеотида и 5′-конец основной цепи), требуется ещё один фермент — **ДНК-лигаза** (пятый этап).

Нерепарируемо и поэтому опасно дезаминирование метилированного цитозина. Продукт его спонтанного дезаминирования — тимин,

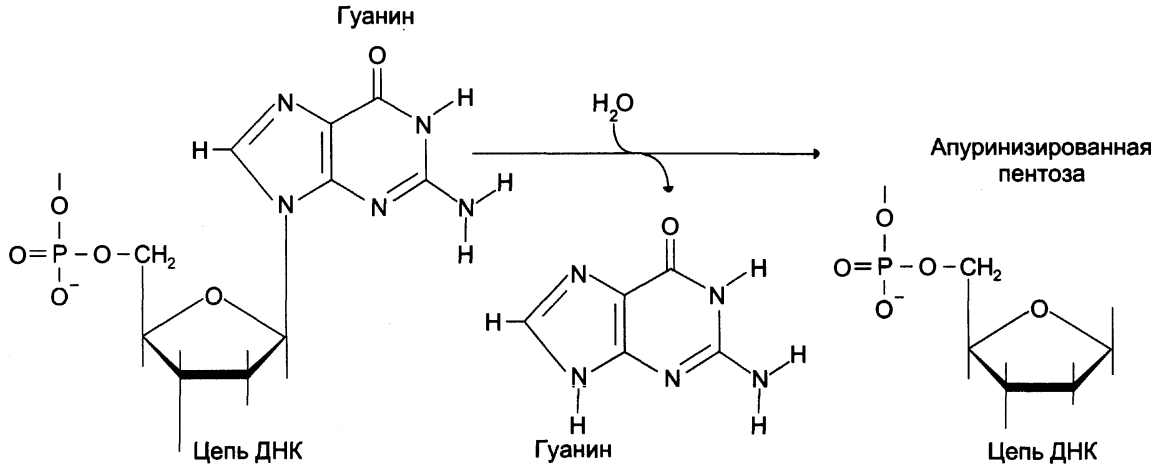


Рис. 4-22. Депуринизация — спонтанное удаление аденина или гуанина.

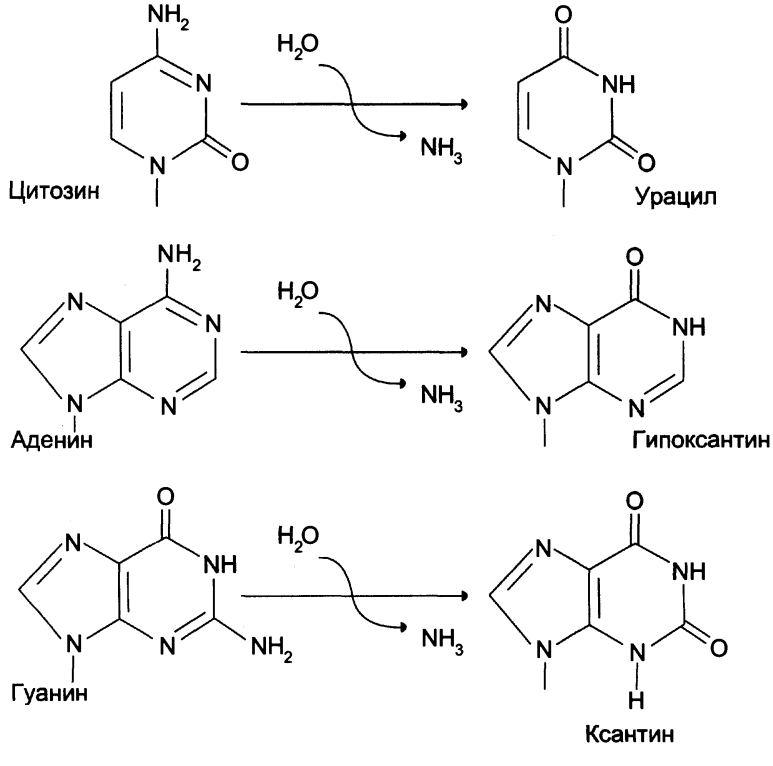


Рис. 4-23. Продукты спонтанного дезаминирования различных оснований ДНК. Все продукты дезаминирования (урацил, гипоксантин, ксантин) нехарактерны для состава ДНК и поэтому довольно легко распознаются ферментами репарации.

нормальное для ДНК основание, которое не распознаётся ДНК-N-гликозилазой.

Б. Индуцируемые повреждения

Индуцируемые повреждения возникают в ДНК в результате воздействия разнообразных мутагенных факторов как радиационной, так и химической природы.

Образование димеров пиримидиновых оснований

Под действием УФО двойная связь между C_5 и C_6 атомами углерода в составе пиримидиновых оснований (тимине и цитозине) может разрываться. Атомы углерода остаются связанными одной связью. Расстояние между параллельными плоскостями оснований полинуклеотидной цепи, в которых произошёл разрыв, равно примерно 3,4 Å. Это расстояние позволяет освободившимся валентностям между С-С атомами пиримидиновых оснований, расположенных последовательно в цепи ДНК, сформировать циклобутановое кольцо (рис. 4-25). В зависимости от того, какие основания соединены в димер, их называют димерами тимина, цитозина или тимин-цитозиновыми димерами.

Удаление пиримидиновых димеров происходит под действием **фотолиазы**. Фермент расщепляет вновь образовавшиеся связи между соседними пиримидиновыми основаниями и восстанавливает нативную структуру. В фотолиазе есть участок, либо сам поглощающий фотоны (в синей части спектра), либо связывающийся с кофакторами, адсорбирующими свет. Таким образом, свет активирует фотолиазу, которая распознаёт димеры в облучённой ДНК, присоединяется к ним и разрывает возникшие между пиримидиновыми кольцами связи. После этого фермент отделяется от ДНК.

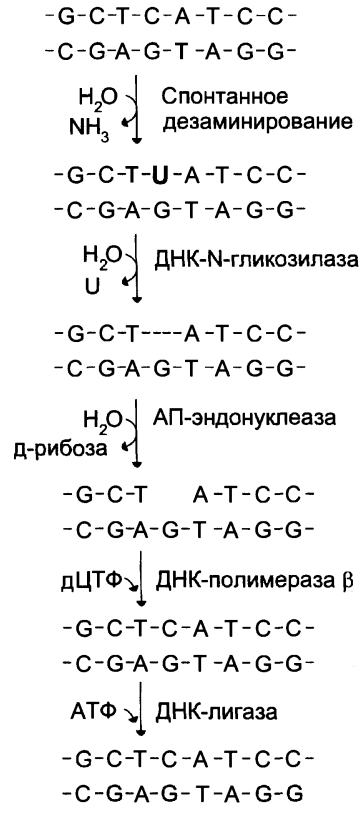


Рис. 4-24. Репарация АП-сайтов с участием ДНК-N-гликозилазы и АП-экзонуклеазы.

Повреждения оснований ДНК химическими мутагенами

Азотистые основания в ДНК могут подвергаться разнообразным повреждениям: алкилированию,

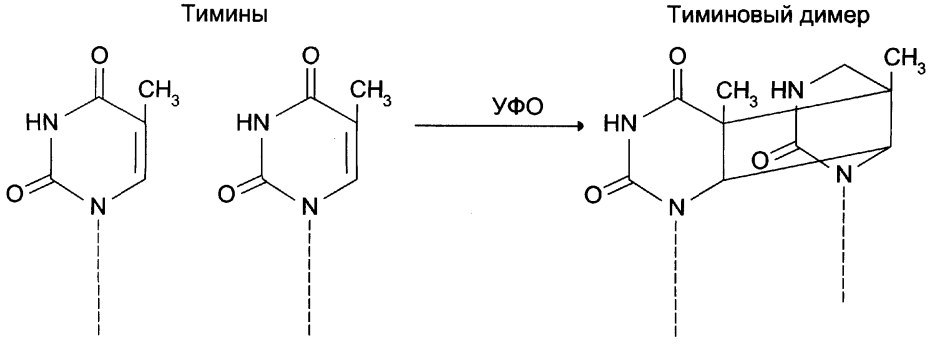


Рис. 4-25. Димер тимина (циклобутановое кольцо).

окислению, восстановлению или связыванию основания с формамидными группировками. Репарация начинается с присоединения ДНК-N-гликозилазы к повреждённому основанию. Существует множество ДНК-N-гликозилаз, специфичных к разным модифицированным основаниям. Ферменты гидролитически расщепляют N-гликозидную связь между изменённым основанием и дезоксирибозой, это приводит к образованию АП-сайта в цепи ДНК (первый этап). Репарация АП-сайта может происходить или только при участии ДНК-инсертазы, которая присоединяет к дезоксирибозе основание в соответствии с правилом комплементарности, или при участии всего комплекса ферментов, участвующих в репарации: АП-эндонуклеазы, АП-экзонуклеазы, ДНК-полимеразы β и ДНК-лигазы.

В. Дефекты репарационных систем и наследственные болезни

Репарация необходима для сохранения нативной структуры генетического материала на протяжении всей жизни организма. Снижение активности ферментов репарационных систем приводит к накоплению повреждений (мутаций) в ДНК.

Причиной многих наследственных болезней человека выступает нарушение отдельных этапов процесса репарации.

Пигментная ксеродерма

У больных в системе репарации снижена активность ферментов, ответственных за удаление неправильных оснований, «застройку» бреши и другие функции. Дефект репарационной системы проявляется в сверхчувствительности к УФ-свету, что приводит к появлению красных пятен на коже, переходящих в незаживающие коросты и нередко в рак кожи.

Трихотиодистрофия

Заболевание связано с повышенной фоточувствительностью ДНК, вызванной снижением активности фермента, участвующего в удалении димеров тимина. Симптомы заболевания: ломкость волос вследствие нехватки серы в белках волос и их луковиц; часто умственная и физическая отсталость; аномалии кожи и зубов.

IV. ТРАНСКРИПЦИЯ

Транскрипция — первая стадия реализации генетической информации в клетке. В ходе процесса образуются молекулы мРНК, служащие матрицей для синтеза белков, а также транспортные, рибосомальные и другие виды молекул РНК, выполняющие структурные, адапторные и каталитические функции (рис. 4-26).

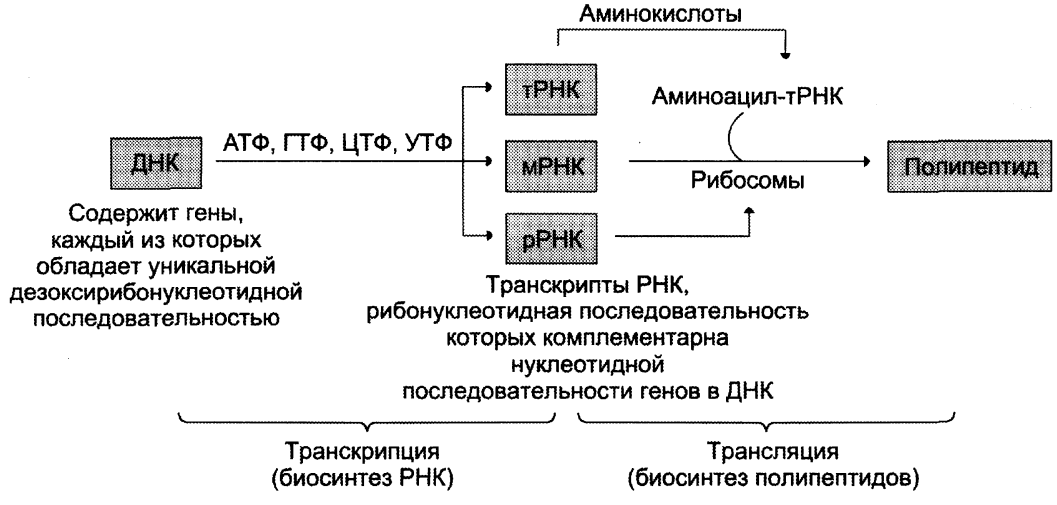


Рис. 4-26. Схема реализации генетической информации в фенотипические признаки. Реализацию потока информации в клетке можно представить схемой ДНК→РНК→белок. ДНК→РНК обозначает биосинтез молекул РНК (транскрипцию); РНК→белок означает биосинтез полипептидных цепей (трансляцию).

Транскрипция у эукариотов происходит в ядре. В основе механизма транскрипции лежит тот же структурный принцип комплементарного спаривания оснований в молекуле РНК (G≡C, A=U и T=A). ДНК служит только матрицей и в ходе транскрипции не изменяется. Рибонуклеозидтрифосфаты (ЦТФ, ГТФ, АТФ, УТФ) — субстраты и источники энергии, необходимые для протекания полимеразной реакции, образования 3′,5′-фосфодиэфирной связи между рибонуклеозидмонофосфатами.

Синтез молекул РНК начинается в определённых последовательностях (сайтах) ДНК, которые называют **промоторы**, и завершается в терминирующих участках (**сайты терминации**). Участок ДНК, ограниченный промотором и сайтом терминации, представляет собой единицу транскрипции — **транскриптон**. У эукариотов в состав транскриптона, как правило, входит один ген (рис. 4-27), у прокариотов несколько. В каждом транскриптоне присутствует неинформативная зона; она содержит специфические последовательности нуклеотидов, с которыми взаимодействуют регуляторные транскрипционные факторы.

Транскрипционые факторы — белки, взаимодействующие с определёнными регуляторными сайтами и ускоряющие или замедляющие процесс транскрипции. Соотношение информативной и неинформативной частей в транскриптонах эукариотов составляет в среднем 1:9 (у прокариотов 9:1).

Соседние транскриптоны могут быть отделены друг от друга нетранскрибируемыми участками ДНК. Разделение ДНК на множество транскриптонов позволяет осуществлять с разной активностью индивидуальное считывание (транскрипцию) разных генов.

В каждом транскриптоне транскрибируется только одна из двух цепей ДНК, которая называется **матричной**, вторая, комплементарная ей цепь, называется **кодирующей**. Синтез цепи РНК идёт от 5′- к 3′-концу, при этом матричная цепь ДНК всегда антипараллельна синтезируемой нуклеиновой кислоте (рис. 4-28).

Транскрипция не связана с фазами клеточного цикла; она может ускоряться и замедляться в зависимости от потребности клетки или организма в определённом белке.

РНК-полимеразы

Биосинтез РНК осуществляется ДНК-зависимыми РНК-полимеразами. В ядрах эукариотов обнаружены 3 специализированные РНК-полимеразы: **РНК-полимераза I**, синтезирующая пре-рРНК; **РНК-полимераза II**, ответственная за синтез пре-мРНК; **РНК-полимераза III**, синтезирующая пре-тРНК. РНК-полимеразы — олигомерные ферменты, состоящие из нескольких субъединиц — 2α, β, β′, σ. Субъединица σ (сигма) выполняет регуляторную функцию, это один из факторов инициации транскрипции. РНК-полимеразы I, II, III, узнающие разные промоторы, содержат разные по строению субъединицы σ.

А. Стадии транскрипции

В процессе транскрипции различают 3 стадии: инициацию, элонгацию и терминацию.

Инициация

Активация промотора происходит с помощью большого белка — **ТАТА-фактора**, называемого так потому, что он взаимодействует со специфической последовательностью нуклеотидов промотора — **ТАТААА- (ТАТА-бокс)** (рис. 4-29).

Присоединение ТАТА-фактора облегчает взаимодействие промотора с РНК-полимеразой. Факторы инициации вызывают изменение конформации РНК-полимеразы и обеспечивают раскручивание примерно одного витка спирали ДНК, т.е. образуется **транскрипционная вил-**

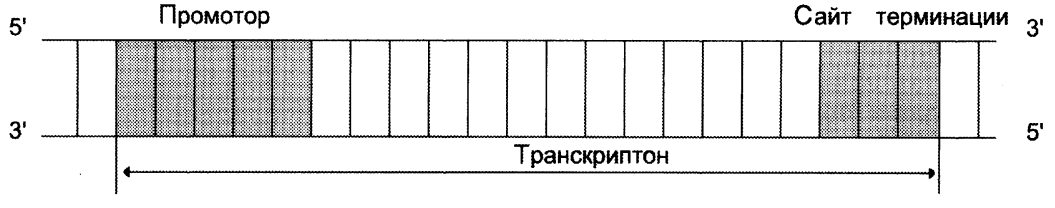


Рис. 4-27. Строение транскриптона.

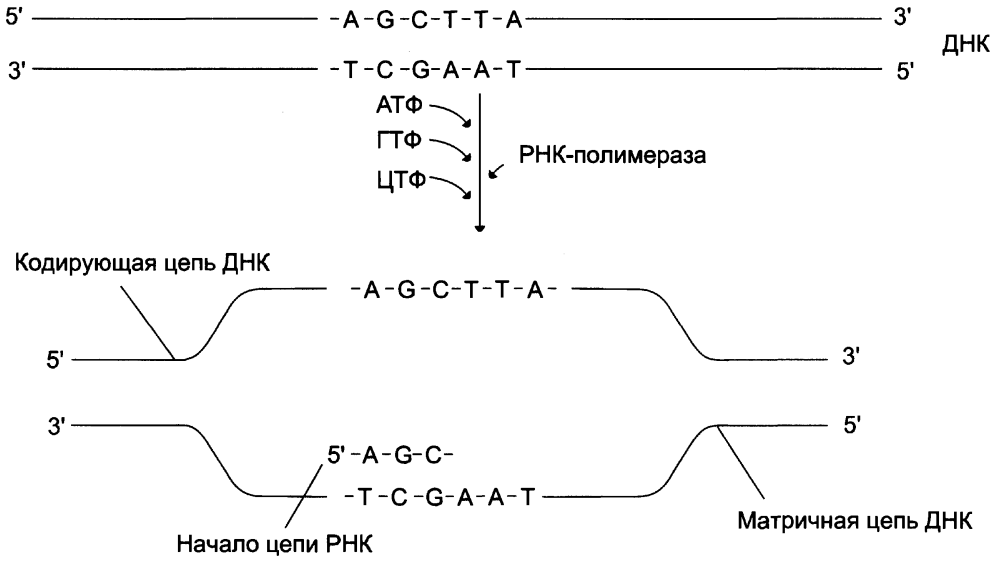


Рис. 4-28. Транскрипция РНК на матричной цепи ДНК. Синтез РНК всегда происходит в направлении 5′→3′.

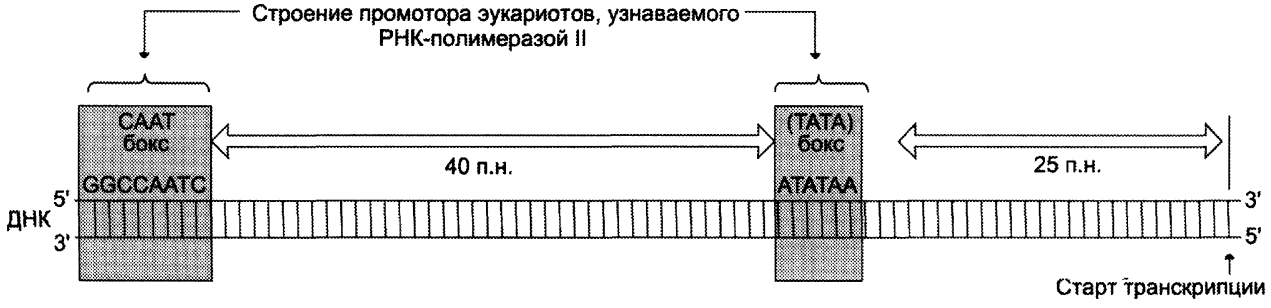


Рис. 4-29. Строение промотора эукариотов. Промоторные элементы — специфические последовательности нуклеотидов, характерные для любого промотора, связывающего РНК-полимеразу. Первый промоторный элемент — последовательность ATATAA- (TATA-бокс) отделён от сайта начала транскрипции приблизительно на 25 пар нуклеотидов (п.н.). На расстоянии примерно 40 (иногда до 120) п.н. от него располагается последовательность GGCCAATC- (CAAT-бокс).

ка, в которой матрица доступна для инициации синтеза цепи РНК (рис. 4-30).

После того как синтезирован олигонуклеотид из 8—10 нуклеотидных остатков, σ-субъединица отделяется от РНК-полимеразы, а вместо неё к молекуле фермента присоединяются несколько факторов элонгации.

Элонгация

Факторы элонгации повышают активность РНК-полимеразы и облегчают расхождение цепей ДНК. Синтез молекулы РНК идёт от 5′- к 3′-концу комплементарно матричной цепи ДНК. На стадии элонгации, в области транскрипционной вилки, одновременно разделены примерно 18 нуклеотидных пар ДНК. Растущий конец цепи РНК образует временную гибридную спираль, около 12 пар нуклеотидных остатков, с матричной цепью ДНК. По мере продвижения РНК-полимеразы по матрице в направлении от 3′- к 5′-концу впереди неё происходит расхождение, а позади — восстановление двойной спирали ДНК.

Терминация

Раскручивание двойной спирали ДНК в области сайта терминации делает его доступным для фактора терминации. Завершается синтез РНК в

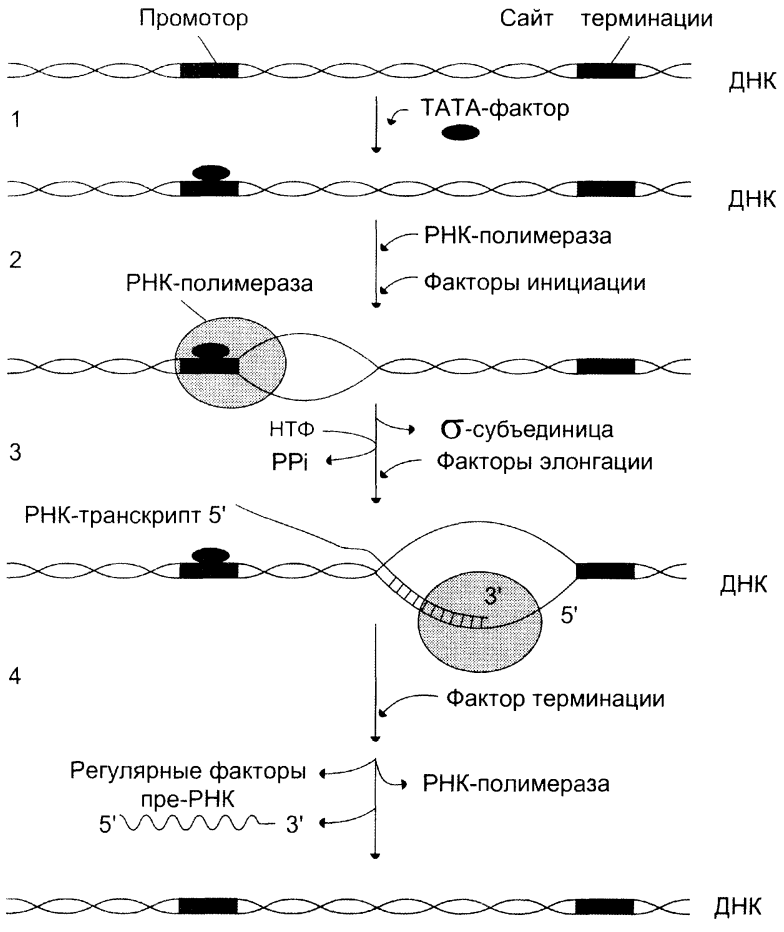


Рис. 4-30. Стадии транскрипции. 1 — присоединение ТАТА-фактора к промотору. Чтобы промотор был узнан РНК-полимеразой, необходимо образование транскрипционного комплекса ТАТА-фактор/ТАТА-бокс (промотор). ТАТА-фактор остаётся связанным с ТАТА-боксом во время транскрипции, это облегчает использование промотора многими молекулами РНК-полимеразы; 2 — образование транскрипционной вилки; 3 — элонгация; 4 — терминация.

строго определённых участках матрицы — терминаторах (**сайты терминации**). Фактор терминации облегчает отделение первичного транскрипта (**пре-мРНК**), комплементарного матрице, и РНК-полимеразы от матрицы. РНК-полимераза может вступить в следующий цикл транскрипции после присоединения субъединицы σ.

Б. Ковалентная модификация (процессинг) матричной РНК

Первичные транскрипты мРНК, прежде чем будут использованы в ходе синтеза белка, подвергаются ряду ковалентных модификаций. Эти модификации необходимы для функционирования мРНК в качестве матрицы.

Модификация 5′-конца

Модификации пре-мРНК начинаются на стадии элонгации. Когда длина первичного транскрипта достигает примерно 30 нуклеотидных остатков, происходит **кэпирование** его 5′-конца. Осуществляет кэпирование гуанилилтрансфераза. Фермент гидролизует макроэргическую связь в молекуле ГТФ и присоединяет нуклеотиддифосфатный остаток 5′-фосфатной группой к 5′-концу синтезированного фрагмента РНК с образованием 5′,5′-фосфодиэфирной связи. Последующее метилирование остатка гуанина в составе ГТФ с образованием N_7-метилгуанозина завершает формирование кэпа (рис. 4-31).

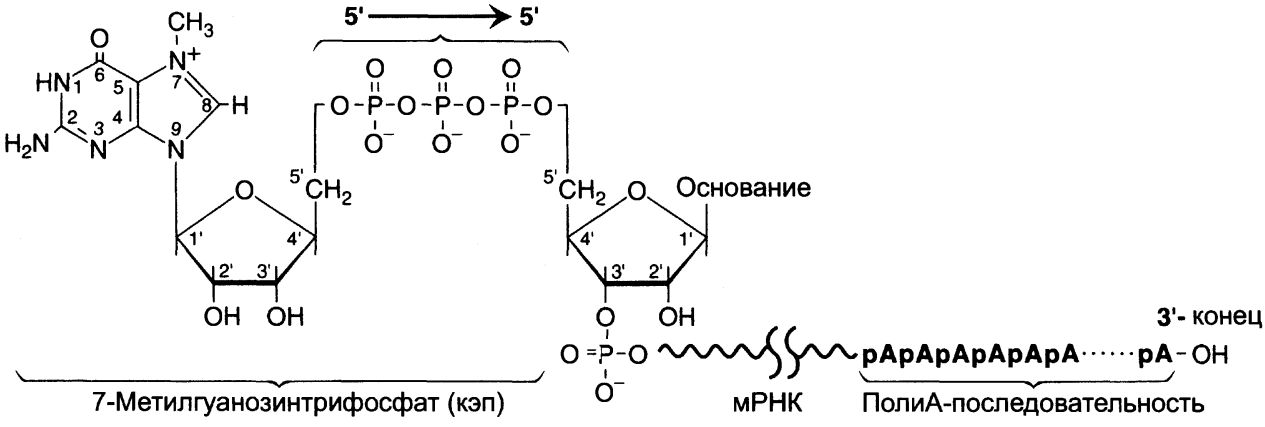


Рис. 4-31. Ковалентная модификация концевых нуклеотидных остатков первичного транскрипта мРНК.

Модифицированный 5′-конец обеспечивает инициацию трансляции, удлиняет время жизни мРНК, защищая её от действия 5′-экзонуклеаз в цитоплазме. Кэпирование необходимо для инициации синтеза белка, так как инициирующие триплеты AUG, GUG распознаются рибосомой только если присутствует кэп. Наличие кэпа также необходимо для работы сложной ферментной системы, обеспечивающей удаление интронов.

Модификация 3′-конца

3′-Конец большинства транскриптов, синтезированных РНК-полимеразой II, также подвергается модификации, при которой специальным ферментом полиА-полимеразой формируется полиА-последовательность (полиА-«хвост»), состоящая из 100—200 остатков адениловой кислоты.

Сигналом к началу полиаденилирования является последовательность -**AAUAAA**- на растущей цепи РНК. Фермент полиА-полимераза, проявляя экзонуклеазную активность, разрывает 3′-фосфоэфирную связь после появления в цепи РНК специфической последовательности -AAUAAA-. К 3′-концу в точке разрыва полиА-полимераза наращивает полиА-«хвост». Наличие полиА-последовательности на 3′-конце облегчает выход мРНК из ядра и замедляет её гидролиз в цитоплазме.

Ферменты, осуществляющие кэпирование и полиаденилирование, избирательно связываются с РНК-полимеразой II, и в отсутствие полимеразы неактивны.

Сплайсинг первичных транскриптов мРНК

С появлением методов, позволяющих изучать первичную структуру молекул мРНК в цитоплазме и последовательность нуклеотидов кодирующей её геномной ДНК, было установлено, что они не комплементарны, а длина гена в несколько раз больше «зрелой» мРНК. Последовательности нуклеотидов, присутствующие в ДНК, но не входящие в состав зрелой мРНК, были названы некодирующими, или **интроны**, а последовательности, присутствующие в мРНК, — кодирующими, или **экзоны**. Таким образом, первичный транскрипт — строго комплементарная матрице нуклеиновая кислота (пре-мРНК), содержащая как экзоны, так и интроны. Длина интронов варьирует от 80 до 1000 нуклеотидов. Последовательности интронов «вырезаются» из первичного транскрипта, концы экзонов соединяются друг с другом. Такую модификацию РНК называют «**сплайсинг**» (от англ. *to splice* — сращивать). Сплайсинг происходит в ядре, в цитоплазму поступает уже «зрелая» мРНК.

Гены эукариотов содержат больше интронов, чем экзонов, поэтому очень длинные молекулы пре-мРНК (около 5000 нуклеотидов) после сплайсинга превращаются в более короткие молекулы цитоплазматической мРНК (от 500 до 3000 нуклеотидов).

Процесс «вырезания» интронов протекает при участии малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП). В состав мяРНП входит малая ядерная РНК (мяРНК), нуклеотидная цепь которой связана с белковым остовом, состоящим из нескольких протомеров. В сплайсинге принимают участие различные мяРНП (рис. 4-32).

Нуклеотидные последовательности интронов функционально неактивны. Но на 5′- и 3′-концах они имеют высокоспецифические последовательности — AGGU- и GAGG- соответственно (сайты сплайсинга), которые обеспечивают их удаление из молекулы пре-мРНК. Изменение структуры этих последовательностей влияет на процесс сплайсинга.

На первой стадии процесса мяРНП связываются со специфическими последовательностями первичного транскрипта (сайты сплайсинга), далее к ним присоединяются другие мяРНП. При формировании структуры сплайсосомы 3′-конец одного экзона сближается с 5′-концом следующего экзона. Сплайсосома катализирует реакцию расщепления 3′,5′-фосфодиэфирной связи на границе экзона с интроном. Последовательность интрона удаляется, а два экзона соединяются. Образование 3′,5′-фосфодиэфирной связи между двумя экзонами катализируют мяРНК (малые ядерные РНК), входящие в структуру сплайсосомы. В результате сплайсинга из первичных транскриптов мРНК образуются молекулы «зрелой» мРНК.

Альтернативный сплайсинг первичных транскриптов мРНК

Для некоторых генов описаны альтернативные пути сплайсинга и полиаденилирования одного и того же транскрипта. Экзон одного варианта сплайсинга может оказаться интроном в альтернативном пути, поэтому молекулы мРНК, образованные в результате альтернативного сплайсинга, различаются набором экзонов. Это приводит к образованию разных мРНК и, соответственно, разных белков с одного первичного транскрипта. Так, в парафолликулярных клетках щитовидной железы (рис. 4-33) в ходе транскрипции гена гормона кальцитонина (см. раздел 11) образуется первичный транскрипт мРНК, который состоит из шести экзонов. Матричная РНК кальцитонина образуется путём сплайсинга первых четырёх экзонов (1–4). Последний (четвёртый) экзон содержит сигнал полиаденилирования (последовательность -AAUAAA-), узнаваемый полиА-полимеразой в парафолликулярных клетках щитовидной железы. Этот же первичный транскрипт в клетках головного мозга в ходе другого (альтер-

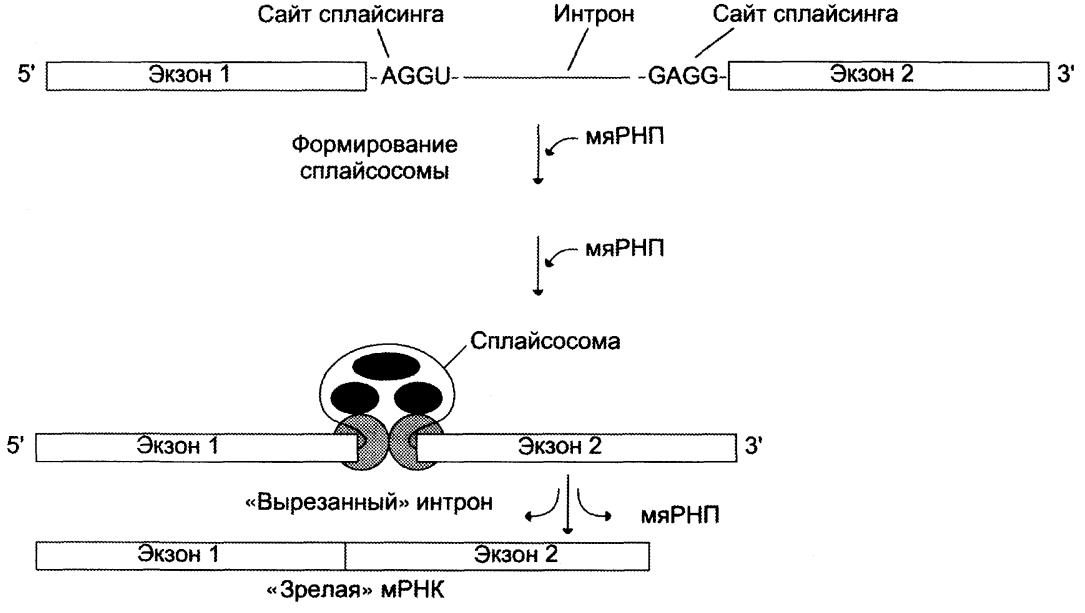


Рис. 4-32. Сплайсинг РНК. В процессе сплайсинга принимают участие различные мяРНП, которые формируют сплайсосому. мяРНП, взаимодействуя с РНК и друг с другом, фиксируют и ориентируют реакционные группы первичного транскрипта. Каталитическая функция сплайсосом обусловлена РНК-составляющими; такие РНК называют рибозимами.

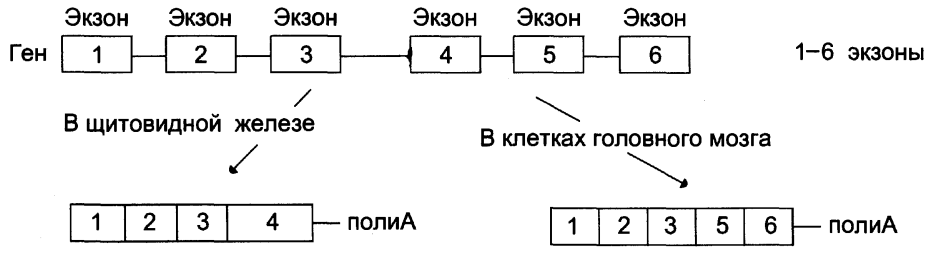


Рис. 4-33. Альтернативный сплайсинг гена кальцитонина. В клетках щитовидной железы сплайсинг первичного транскрипта приводит к образованию кальцитониновой мРНК, включающей 4 экзона и полиА-последовательность, которая образуется после расщепления транскрипта в первом участке сигнала полиаденилирования. В клетках мозга образуется мРНК, содержащая: экзоны 1, 2, 3, 5, 6 и полиА-последовательность, образованную после второго сигнала полиаденилирования.

нативного) пути сплайсинга превращается в мРНК кальцитонинподобного белка, отвечающего за вкусовое восприятие. Матричная РНК этого белка состоит из первых трёх экзонов, общих с кальцитониновой мРНК, но включает дополнительно пятый и шестой экзоны, не свойственные мРНК кальцитонина. Шестой экзон тоже имеет сигнал полиаденилирования -AAUAAA-, узнаваемый ферментом полиА-полимеразой в клетках нервной ткани. Выбор одного из путей (альтернативный сплайсинг) и одного из возможных сайтов полиаденилирования играет важную роль в тканеспецифической экспрессии генов.

Разные варианты сплайсинга могут приводить к образованию разных изоформ одного и того же белка. Например, ген тропонина состоит из 18 экзонов и кодирует многочисленные изоформы этого мышечного белка. Разные изоформы тропонина образуются в разных тканях на определённых стадиях их развития.

В. Процессинг первичных транскриптов рибосомальной РНК и транспортной РНК

Гены, кодирующие большую часть структурных РНК, транскрибируются РНК-полимеразами I и III. Нуклеиновые кислоты — предшественники рРНК и тРНК – подвергаются в ядре расщеплению и химической модификации (процессингу).

Посттранскрипционные модификации первичного транскрипта тРНК (процессинг тРНК)

Первичный транскрипт тРНК содержит около 100 нуклеотидов, а после процессинга — 70–90 нуклеотидных остатков. Посттранскрипционные модификации первичных транскриптов тРНК происходят при участии РНК-аз (**рибонуклеаз**). Так, формирование 3′-конца тРНК катализирует РНК-аза, представляющая собой 3′-экзонуклеазу, «отрезающую» по одному нуклеотиду, пока не достигнет последовательности **-ССА**, одинаковой для всех тРНК. Для некоторых тРНК формирование последовательности -ССА на 3′-конце (акцепторный конец) происходит в результате последовательного присоединения этих трёх нуклеотидов. Пре-тРНК содержит всего один интрон, состоящий из 14–16 нуклеотидов. Удаление интрона и сплайсинг приводят к формированию структуры, называемой **«антикодон»**, — триплета нуклеотидов, обеспечивающего взаимодействие тРНК с комплементарным кодоном мРНК в ходе синтеза белков (рис. 4-34).

Посттранскрипционные модификации (процессинг) первичного транскрипта рРНК. Формирование рибосом

В клетках человека содержится около сотни копий гена рРНК, локализованных группами на пяти хромосомах. Гены рРНК транскрибируются РНК-полимеразой I с образованием идентичных транскриптов. Первичные транскрипты имеют длину около 13 000 нуклеотидных остатков (45S рРНК). Прежде чем покинуть ядро в составе рибосомной частицы, молекула 45S рРНК подвергается процессингу, в результате образуется 28S рРНК (около 5000 нуклеотидов), 18S рРНК (около 2000 нуклеотидов) и 5,8S рРНК (около 160 нуклеотидов), которые являются компонентами рибосом (рис. 4-35). Остальная часть транскрипта разрушается в ядре.

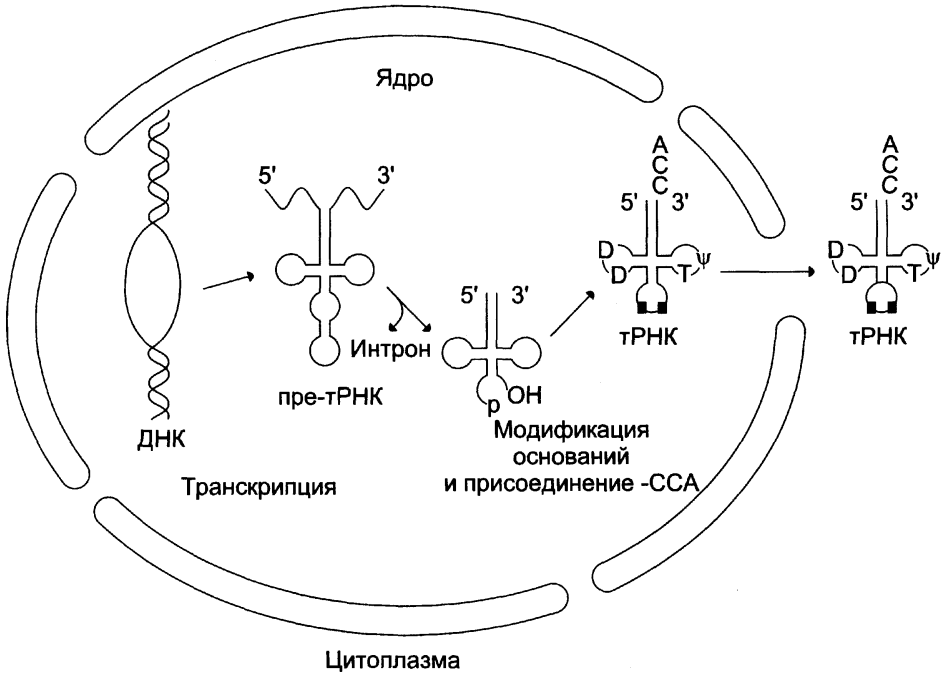


Рис. 4-34. Процессинг пре-тРНК. Определённые азотистые основания нуклеотидов тРНК в ходе процессинга метилируются под действием РНК-метилазы и превращаются, например, в 7-метилгуанозин и 2-метилгуанозин (минорные основания). В молекуле тРНК содержатся и другие необычные основания — псевдоуридин, дигидроуридин, которые также модифицируются во время процессинга.

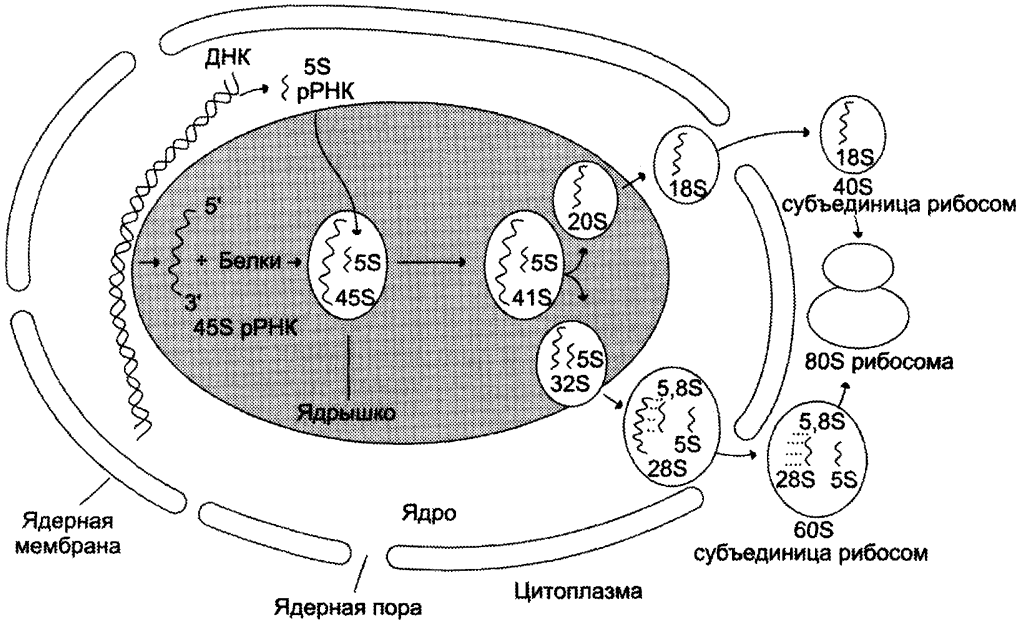


Рис. 4-35. Образование и выход из ядра субъединиц рибосом. В результате процессинга из молекулы предшественника 45S рРНК образуются три типа рРНК: 18S, входящая в состав малой субъединицы рибосом, а также 28S и 5,8S, локализующиеся в большой субъединице. Все три рРНК образуются в равных количествах, так как они происходят из одного и того же первичного транскрипта. 5S рРНК большой субъединицы рибосом транскрибируется отдельно от первичного транскрипта 45S рРНК. Рибосомальные РНК, образованные в ходе посттранскрипционных модификаций, связываются со специфическими белками, и образуется рибосома.

Рибосома — органелла клетки, участвующая в биосинтезе белка. Рибосома эукариотов (80S) состоит из двух, большой и малой, субъединиц: 60S и 40S. Белки рибосом выполняют структурную, регуляторную и каталитическую функции.

V. БИОСИНТЕЗ БЕЛКОВ (ТРАНСЛЯЦИЯ)

Перевод информации, заключённой в полинуклеотидной последовательности мРНК, в аминокислотную последовательность белка требует определённого способа кодирования или шифрования, т.е. существования определённого закона, по которому чередование четырёх нуклеотидов в мРНК задаёт специфическую последовательность аминокислот в белке.

А. Генетический код и его свойства

Необходимость кодирования структуры белков в линейной последовательности нуклеотидов мРНК и ДНК продиктована тем, что в ходе трансляции:

- нет соответствия между числом мономеров в матрице мРНК и продукте — синтезируемом белке;
- отсутствует структурное сходство между мономерами РНК и белка.

Это исключает комплементарное взаимодействие между матрицей и продуктом — принцип, по которому осуществляется построение новых молекул ДНК и РНК в ходе репликации и транскрипции.

Отсюда становится ясным, что должен существовать «словарь», позволяющий выяснить, какая последовательность нуклеотидов мРНК обеспечивает включение в белок аминокислот в заданной последовательности. Этот «словарь» получил название генетического, биологического, нуклеотидного, или аминокислотного кода. Он позволяет шифровать аминокислоты, входящие в состав белков, с помощью определённой последовательности нуклеотидов в ДНК и мРНК. Для него характерны определённые свойства.

Триплетность. Одним из основных вопросов при выяснении свойств кода был вопрос о числе нуклеотидов, которое должно определять включение в белок одной аминокислоты. Сразу было понятно, что это число не может быть равным 1 или 2, так как в этом случае количество кодирующих элементов будет недостаточным для шифрования 20 аминокислот в белках. Число кодирующих последовательностей из четырёх нуклеотидов по три равно $4^3=64$, что более чем в 3 раза превышает минимальное количество, которое необходимо для кодирования 20 аминокислот. В дальнейшем было установлено, что кодирующими элементами в шифровании аминокислотной последовательности действительно являются тройки нуклеотидов, или **триплеты**, которые получили название «**кодоны**».

Смысл кодонов

Смысл кодонов стал понятен в 60-х г. XX столетия, когда, используя бесклеточную систему синтеза белков (табл. 4-3) и синтетические полирибонуклеотиды с заданной последовательностью нуклеотидов в качестве матрицы, М. Ниренберг и Г. Маттеи синтезировали полипептиды определённого строения. Так, на матрице поли-У, состоящей только из остатков УМФ, был получен полифенилаланин, а на матрице поли-Ц — полипролин. Из этого следовало, что триплет -UUU кодирует Фен, а триплет -CCC — Про.

В последующих экспериментах использовали смешанные синтетические полирибонуклеотиды с известным составом. В результате этой работы удалось установить, что из 64 кодонов включение аминокислот в синтезирующуюся полипептидную цепь шифрует 61 триплет, а 3 остальных — UAA, UAG, UGA не кодируют включение в белок аминокислот и первоначально были названы бессмысленными, или нонсенс-кодонами. Однако в дальнейшем было показано, что эти триплеты сигнализируют о завершении трансляции, и поэтому их стали называть терминирующими, или стоп-кодонами.

Кодоны мРНК и триплеты нуклеотидов в кодирующей нити ДНК с направлением от 5′ к 3′-концу имеют одинаковую последовательность азотистых оснований, за исключением того, что в ДНК вместо урацила (U), характерного для мРНК, стоит тимин (T).

Специфичность

Каждому кодону соответствует только одна определённая аминокислота. В этом смысле генетический код строго однозначен.

Таблица 4-3. Основные компоненты белоксинтезирующей системы

Необходимые компоненты	Функции
1. Аминокислоты	Субстраты для синтеза белков
2. тРНК	тРНК выполняют функцию адапторов. Они акцепторным концом взаимодействуют с аминокислотами, а антикодоном — с кодоном мРНК.
3. Аминоацил-тРНК синтетазы	Каждая аа-тРНК-синтетаза катализирует реакцию специфического связывания одной из 20 аминокислот с соответствующей тРНК
4. мРНК	Матрица содержит линейную последовательность кодонов, определяющих первичную структуру белков
5. Рибосомы	Рибонуклеопротеиновые субклеточные структуры, являющиеся местом синтеза белков
6. АТФ, ГТФ	Источники энергии
7. Белковые факторы инициации, элонгации, терминации	Специфические внерибосомные белки, необходимые для процесса трансляции (12 факторов инициации: eIF; 2 фактора элонгации: eEF1, eEF2, и факторы терминации: eRF)
8. Ионы магния	Кофактор, стабилизирующий структуру рибосом

Примечания: eIF (*eukaryotic initiation factors*) — факторы инициации; eEF (*eukaryotic elongation factors*) — факторы элонгации; eRF (*eukaryotic releasing factors*) — факторы терминации.

Вырожденность

В мРНК и ДНК имеет смысл 61 триплет, каждый из которых кодирует включение в белок одной из 20 аминокислот. Из этого следует, что в информационных молекулах включение в белок одной и той же аминокислоты определяют несколько кодонов. Это свойство биологического кода получило название вырожденности.

У человека одним кодоном зашифрованы только 2 аминокислоты — Мет и Три, тогда как Лей, Сер и Арг — шестью кодонами, а Ала, Вал, Гли, Про, Тре — четырьмя кодонами (табл. 4-4).

Избыточность кодирующих последовательностей — ценнейшее свойство кода, так как она повышает устойчивость информационного потока к неблагоприятным воздействиям внешней и внутренней среды. При определении природы аминокислоты, которая должна быть включена в белок, третий нуклеотид в кодоне не имеет столь важного значения, как первые два. Как видно из табл. 4-4, для многих аминокислот замена нуклеотида в третьей позиции кодона не сказывается на его смысле.

Линейность записи информации

В ходе трансляции кодоны мРНК «читаются» с фиксированной стартовой точки последовательно и не перекрываются. В записи информации отсутствуют сигналы, указывающие на конец одного кодона и начало следующего.

Кодон AUG является инициирующим и прочитывается как в начале, так и в других участках мРНК как Мет. Следующие за ним триплеты читаются последовательно без каких-либо пропусков вплоть до стоп-кодона, на котором синтез полипептидной цепи завершается.

Универсальность

До недавнего времени считалось, что код абсолютно универсален, т.е. смысл кодовых слов одинаков для всех изученных организмов: вирусов, бактерий, растений, земноводных, млекопитающих, включая человека. Однако позднее стало известно одно исключение, оказалось, что митохондриальная мРНК содержит 4 триплета, имеющих другое значение, чем в мРНК ядерного происхождения. Так, в мРНК митохондрий триплет UGA кодирует Три, AUA — Мет, а AGA и AGG прочитываются как дополнительные стоп-кодоны.

Колинеарность гена и продукта

У прокариотов обнаружено линейное соответствие последовательности кодонов гена и последовательности аминокислот в белковом продукте, или, как говорят, существует колинеарность гена и продукта.

Таблица 4-4. Генетический код

Первое основание	Второе основание			
	U	C	A	G
U	UUU Фен	UCU Сер	UAU Тир	UGU Цис
	UUC Фен	UCC Сер	UAC Тир	UGC Цис
	UUA Лей	UCA Сер	UAA*	UGA*
	UUG Лей	UCG Сер	UAG*	UGG Три
C	CUU Лей	CCU Про	CAU Гис	CGU Арг
	CUC Лей	CCC Про	CAC Гис	CGC Арг
	CUA Лей	CCA Про	CAA Глн	CGA Арг
	CUG Лей	CCG Про	CAG Глн	CGG Арг
A	AUU Иле	ACU Тре	AAU Асн	AGU Сер
	AUC Иле	ACC Тре	AAC Асн	AGC Сер
	AUA Мет	ACA Тре	AAA Лиз	AGA Арг
	AUG Мет	ACG Тре	AAG Лиз	AGG Арг
G	GUU Вал	GCU Ала	GAU Асп	GGU Гли
	GUC Вал	GCC Ала	GAC Асп	GGC Гли
	GUA Вал	GCA Ала	GAA Глу	GGA Гли
	GUG Вал	GCG Ала	GAG Глу	GGG Гли

Примечания: U — урацил; C — цитозин; A — аденин; G — гуанин; * — терминирующий кодон.

У эукариотов последовательности оснований в гене, колинеарные аминокислотной последовательности в белке, прерываются интронами. Поэтому в эукариотических клетках аминокислотная последовательность белка колинеарна последовательности экзонов в гене или зрелой мРНК после посттранскрипционного удаления интронов.

Б. Основные компоненты белоксинтезирующей системы

Как видно из табл. 4-3, для синтеза полипептидной цепи необходимо большое количество компонентов, совместное и согласованное взаимодействие которых приводит к образованию белка.

Аминокислоты

Все 20 аминокислот, входящих в структуру белков организма человека, должны присутствовать в достаточном количестве. Это требование прежде всего относится к незаменимым (т.е. не синтезирующимся в организме) аминокислотам, так как недостаточное снабжение клетки хотя бы одной незаменимой аминокислотой приводит к снижению, а иногда и полной остановке синтеза белка на кодоне, требующем включения этой аминокислоты в белок.

мРНК. Содержит информацию о структуре синтезируемого белка и используется в качестве матрицы.

тРНК. У человека около 50 различных тРНК обеспечивают включение аминокислот в белок. тРНК называют «**адапторные молекулы**», так как к акцепторному концу этих молекул может быть присоединена определённая аминокислота, а с помощью антикодона они узнают специфический кодон на мРНК. В процессе синтеза белка на рибосоме связывание антикодонов тРНК с кодонами мРНК происходит по принципу комплементарности и антипараллельности.

Антикодон $тРНК^{Арг}$	(3`)-G-C-C-(5`)
Кодоны Арг:	(5`)-C-G-G-(3`)

Однако оказалось, что число тРНК для каждой аминокислоты не совпадает с числом кодирующих её кодонов в мРНК, и, следовательно, некоторые тРНК способны связываться больше чем с одним кодоном.

Исследование этого вопроса позволило установить следующее:

- первые два основания кодона и последние два основания антикодона образуют обычные прочные пары (гуанин-цитозин и аденин-урацил) и вносят наибольший вклад в специфичность декодирования;
- связывание третьего основания кодона с первым основанием антикодона происходит слабее, чем с первыми двумя, и это позволяет некоторым тРНК прочитывать больше чем один кодон.

Гипотеза, объясняющая характер кодон-антикодонового взаимодействия, получила название «**гипотезы качания**» (т.е. третье основание большинства кодонов имеет определённую степень свободы при образовании пары с соответствующим антикодоном и как бы «качается»).

Так, например, одна из аргининовых тРНК имеет антикодон 5′-I-C-G-3′, который может узнавать 3 разных аргининовых кодона:

Антикодон:	(3`)-G-C-I-(5`)	(3`)-G-C-I-	(3`)-G-C-I-
Кодоны:	(5`)-C-G-A-(3`)	(5`)-C-G-U-	(5`)-C-G-C-

Аминоацил-тРНК синтетазы (аминоацил-тРНК лигазы)

В цитозоле клеток 20 различных аминокислот присоединяются α-карбоксильной группой к 3′-гидроксильному акцепторному концу соответствующих тРНК с образованием сложноэфирной связи. Эти реакции катализирует семейство ферментов, носящее название аминоацил-тРНК синтетаз (аа-тРНК-синтетаз). Каждый член этого семейства узнаёт только одну определённую аминокислоту и те тРНК, которые способны связываться с этой аминокислотой. Из этого следует, что в группу тРНК синтетаз входит 20 различных ферментов. Они осуществляют активацию аминокислот в 2 стадии: на первой стадии аминокислота присоединяется к ферменту и реагирует с АТФ с образованием богатого энергией промежуточного соединения — аминоацил-АМФ. На второй стадии аминоацильный остаток аминоациладенилата, оставаясь связанным с ферментом, взаимодействует с молекулой соответствующей тРНК с образованием аминоацил-тРНК (рис. 4-36).

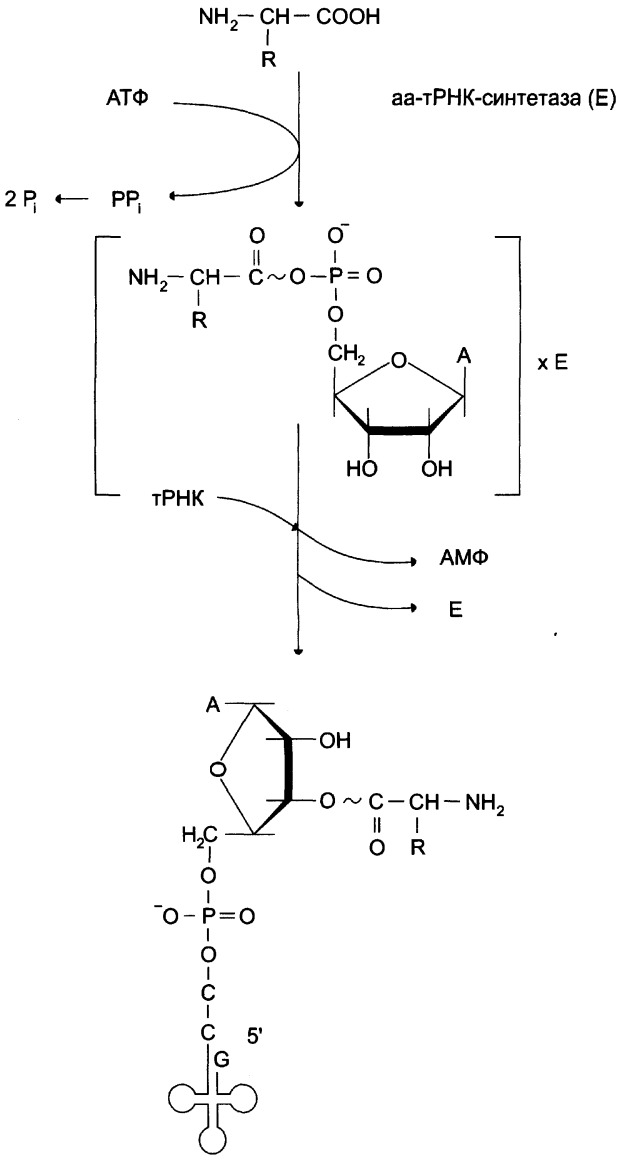


Рис. 4-36. Образование аминоацил-тРНК. Аминокислота взаимодействует с АТФ и активируется, образуя аминоацил-аденилат, который, не освобождаясь из связи с ферментом (E), отдаёт активированную аминокислоту тРНК с образованием аминоацил-тРНК (аа-тРНК).

Суммарную реакцию, катализируемую аминоацил-тРНК синтетазами в присутствии ионов Mg^{2+}, можно представить следующим образом:

Аминокислота +тРНК + АТФ → аминоацил-тРНК + АМФ + PP_i.

Для каждой аминокислоты существует свой фермент — своя аминоацил тРНК синтетаза: для глутамата — глутамил-тРНК синтетаза, гистидина — гистидил-тРНК синтетаза и т.д.

Аминокислоты присоединяются к 3′- или 2′-ОН группам рибозы на 3′-конце тРНК, где все тРНК имеют общую нуклеотидную последовательность -ССА.

Энергия, заключённая в макроэргической сложноэфирной связи аминоацил~тРНК, впоследствии используется на образование пептидной связи в ходе синтеза белка.

Пирофосфат, выделяющийся в ходе этой реакции, гидролитически расщепляется с образованием двух молекул ортофосфата и выделением энергии, что делает реакцию активации аминокислот необратимой.

Чрезвычайно высокая специфичность аа-тРНК синтетаз в связывании аминокислоты с соответствующими тРНК лежит в основе точности трансляции генетической информации. В активном центре этих ферментов есть 4 специфических участка для узнавания: аминокислоты, тРНК, АТФ и четвёртый — для присоединения молекулы H_2O, которая участвует в гидролизе неправильных аминоациладенилатов. За счёт существования в активном центре этих ферментов корректирующего механизма, обеспечивающего немедленное удаление ошибочно присоединённого аминокислотного остатка, достигается поразительно высокая точность работы: на 1300 связанных с тРНК аминокислот встречается только одна ошибка.

Аминокислота, присоединяясь к тРНК, в дальнейшем не определяет специфических свойств аа-тРНК, так как её структуру не узнаёт ни рибосома, ни мРНК. Участие в синтезе белка зависит только от структуры тРНК, а точнее, от комплементарного взаимодействия антикодона аминоацил-тРНК с кодоном мРНК.

Антикодон расположен в центральной (антикодоновой) петле тРНК. Узнавание тРНК аа-тРНК синтетазами не всегда происходит по антикодоновой петле. Активный центр некоторых ферментов обнаруживает комплементарное соответствие другим участкам пространственной структуры тРНК.

Рибосомы

Рибосомы представляют собой рибонуклеопротеиновые образования — своеобразные «фабрики», на которых идёт сборка аминокислот в белки. Эукариотические рибосомы имеют константу седиментации 80S и состоят из 40S (малой) и 60S (большой) субъединиц. Каждая субъединица включает рРНК и белки. В 40S субъединицу входит рРНК с константой седиментации 18S и около 30—40 белков. В 60S субъединице обнаружено 3 вида рРНК: 5S, 5,8S и 28S и около 50 различных белков.

Белки входят в состав субъединиц рибосомы в количестве одной копии и выполняют структурную функцию, обеспечивая взаимодействие между мРНК и тРНК, связанными с аминокислотой или пептидом.

В присутствии мРНК 40S и 60S субъединицы объединяются с образованием полной рибосомы, масса которой примерно в 650 раз больше массы молекулы гемоглобина.

В рибосоме есть 2 центра для присоединения молекул тРНК: аминоацильный (А) и пептидильный (Р) центры, в образовании которых участвуют обе субъединицы. Вместе центры А и Р включают участок мРНК, равный 2 кодонам. В ходе трансляции центр А связывает аа-тРНК, строение которой определяет кодон, находящийся в области этого центра. В структуре этого кодона зашифрована природа аминокислоты, которая будет включена в растущую полипептидную цепь. Центр Р занимает пептидил-тРНК, т.е. тРНК, связанная с пептидной цепочкой, которая уже синтезирована.

У эукариотов различают рибосомы 2 типов: «свободные», обнаруживаемые в цитоплазме клеток, и связанные с эндоплазматическим ретикулумом (ЭР). Рибосомы, ассоциированные с ЭР, ответственны за синтез белков «на экспорт», которые выходят в плазму крови и участвуют в обновлении белков ЭР, мембраны аппарата Гольджи, митохондрий или лизосом.

Митохондрии содержат свой набор рибосом. Митохондриальные рибосомы мельче, чем рибосомы эукариотов, прокариотов и имеют константу седиментации 55S. Они также состоят из двух субъединиц, но отличаются от эукариотических рибосом количеством и составом рРНК и белков.

Белковые факторы

В каждой стадии белкового синтеза на рибосоме: инициации, элонгации и терминации участвует разный набор внерибосомных белковых

факторов. Эти белки связываются с рибосомой или её субъединицами на определённых стадиях процесса и стабилизируют или облегчают функционирование белоксинтезирующей машины.

АТФ и ГТФ как источники энергии

На включение одной аминокислоты в растущую полипептидную цепь клетка затрачивает 4 макроэргические связи: 2 из АТФ в ходе реакции, катализируемой аа-тРНК синтетазой (в процессе активации аминокислот АТФ расщепляется на АМФ и пирофосфат), и 2 молекулы ГТФ: одна используется на связывание аа-тРНК в А-центре рибосомы, а вторая затрачивается на стадию транслокации. К этому следует добавить использование ещё двух макроэргических связей молекул: АТФ и ГТФ на инициацию и терминацию синтеза полипептидной цепи.

В. Синтез полипептидной цепи на рибосоме

В ходе синтеза белка прочтение информации мРНК идёт в направлении от 5′- к 3′-концу, обеспечивая синтез пептида от N- к С-концу.

Каждая эукариотическая мРНК кодирует строение только одной полипептидной цепи (т.е. она моноцистронна), в отличие от прокариотических мРНК, которые часто содержат информацию о нескольких пептидах (т.е. они полицистронны). Эти различия вызваны тем, что у прокариотов ДНК лишена интронов, и РНК-полимераза транскрибирует участки, прочтение информации с которых подчиняется общему регуляторному механизму. Кроме того, на полицистронных мРНК синтез белка начинается до того, как заканчивается их собственный синтез, так как процессы транскрипции и трансляции не разделены. У эукариотов трансляция протекает в цитоплазме, куда из ядра поступают уже «зрелые» мРНК.

События на рибосоме включают этапы: инициации, элонгации и терминации.

1. Инициация

Инициация трансляции представляет собой событие, в ходе которого происходит образование комплекса, включающего Мет-тРНК$_i^{Мет}$, мРНК и рибосому, где тРНК$_i^{Мет}$ — инициирующая метиониновая тРНК (рис. 4-37). В этом процессе участвуют не менее 10 факторов инициации, которые обозначают как eIF (от англ. *eukaryotic initiation factors*) с указанием номера и буквы. Первоначально 40S субъединица рибосомы соединяется с фактором инициации, который препятствует её связыванию с 60S субъединицей, но стимулирует объединение с тройным комплексом, включающим Мет-тРНК$_i^{Мет}$, eIF-2 и ГТФ. Затем этот теперь уже более сложный комплекс связывается с 5′-концом мРНК при участии нескольких eIF. Один из факторов инициации (eIF-4F) узнаёт и присоединяется к участку «кэп» на молекуле мРНК, поэтому он получил название кэпсвязывающего белка. Прикрепившись к мРНК, 40S субъединица начинает скользить по некодирующей части мРНК до тех пор, пока не достигнет инициирующего кодона AUG кодирующей нуклеотидной последовательности. Скольжение 40S субъединицы по мРНК сопровождается гидролизом АТФ, энергия которого затрачивается на преодоление участков спирализации в нетранслируемой части мРНК. В эукариотических клетках некодирующие участки мРНК имеют разную длину, но обычно от 40 до 80 нуклеотидов, хотя встречаются области с протяжённостью более 700 нуклеотидов.

Достигнув начала кодирующей последовательности мРНК, 40S субъединица останавливается и связывается с другими факторами инициации, ускоряющими присоединение 60S субъединицы и образование 80S рибосомы за счёт гидролиза ГТФ до ГДФ и неорганического фосфата. При этом формируются А- и Р-центры рибосомы, причём в Р-центре оказывается AUG-кодон мРНК с присоединённой к нему Мет-тРНК$_i^{Мет}$.

В клетках есть 2 различающиеся по структуре тРНК, узнающие кодон AUG. Инициирующий кодон узнаёт тРНК$_i^{Мет}$, а триплеты мРНК, кодирующие включение метионина во внутренние участки белка, прочитываются другой тРНК^{Мет}.

2. Элонгация

По завершении инициации рибосома располагается на мРНК таким образом, что в Р-центре находится инициирующий кодон AUG с присоединённой к нему Мет-тРНК$_i^{Мет}$, а в А-

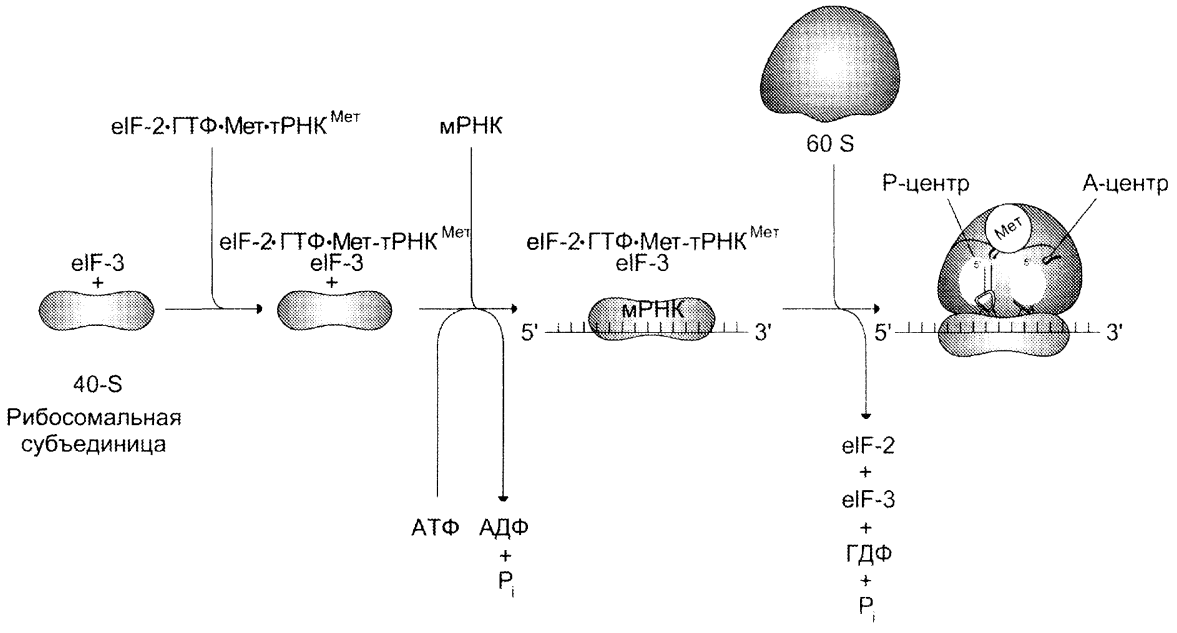


Рис. 4-37. Образование инициирующего комплекса в ходе синтеза белка у эукариотов. Мет-тРНК$_i^{Мет}$ объединяется с малой субъединицей рибосомы в форме тройного комплекса: Мет-тРНК^{Мет}, eIF-2 и ГТФ. Образовавшийся более сложный четырёхкомпонентный комплекс присоединяется к 5′-концу мРНК с помощью нескольких дополнительных факторов, и малая субъединица начинает скользить по мРНК до тех пор, пока антикодон Мет-тРНК^{Мет} не свяжется с инициирующим кодоном AUG. При этом в комплексе происходит изменение состава инициирующих факторов, и ускоряется присоединение 60S субъединицы рибосомы, сопровождающееся гидролизом ГТФ. Мет-тРНК$_i^{Мет}$ занимает на рибосоме Р-центр.

центре — триплет, кодирующий включение первой аминокислоты синтезируемого белка. Далее начинается самый продолжительный этап белкового синтеза — элонгация, в ходе которого рибосома с помощью аа-тРНК последовательно «читает» мРНК в виде триплетов нуклеотидов, следующих за инициирующим кодоном в направлении от 5′ к 3′-концу, наращивая полипептидную цепочку за счёт последовательного присоединения аминокислот.

Включение каждой аминокислоты в белок происходит в 3 стадии, в ходе которых:

- аа-тРНК каждой входящей в белок аминокислоты связывается с А-центром рибосомы;
- пептид от пептидил-тРНК, находящейся в Р-центре, присоединяется к α-NH_2-группе аминоацильного остатка аа-тРНК А-центра с образованием новой пептидной связи;
- удлинённая на один аминокислотный остаток пептидил-тРНК перемещается из А-центра в Р-центр в результате транслокации рибосомы.

Связывание аминоацил-тРНК в А-центре. Кодон мРНК, располагающийся в А-центре рядом с инициирующим кодоном, определяет природу аа$_1$-тРНК^{аа_1}, которая будет включена в А-центр. аа$_1$-тРНК^{аа_1} взаимодействует с рибосомой в виде тройного комплекса, состоящего из фактора элонгации EF-1, аа$_1$-тРНК^{аа_1} и ГТФ. Комплекс эффективно взаимодействует с рибосомой лишь в том случае, если антикодон аа-тРНК^{аа_1} комплементарен и антипараллелен кодону мРНК в А-центре. Включение аа-тРНК^{аа_1} в рибосому происходит за счёт энергии гидролиза ГТФ до ГДФ и неорганического фосфата (рис. 4-38).

Образование пептидной связи происходит сразу же после отщепления комплекса EF-1 и ГДФ от рибосомы. Эта стадия процесса получила название **реакции транспептидации** (рис. 4-39).

В ходе этой реакции остаток метионина Мет-тРНК$_i^{Мет}$ связывается с α-аминогруппой первой аминокислоты, присоединённой к тРНК^{аа_1} и расположенной в А-центре, образуется первая пептидная связь. Установлено, что пептидилтрансферазная активность большой субъединицы рибосомы принадлежит 28S рРНК. К настоящему времени обнаружена целая группа РНК, об-

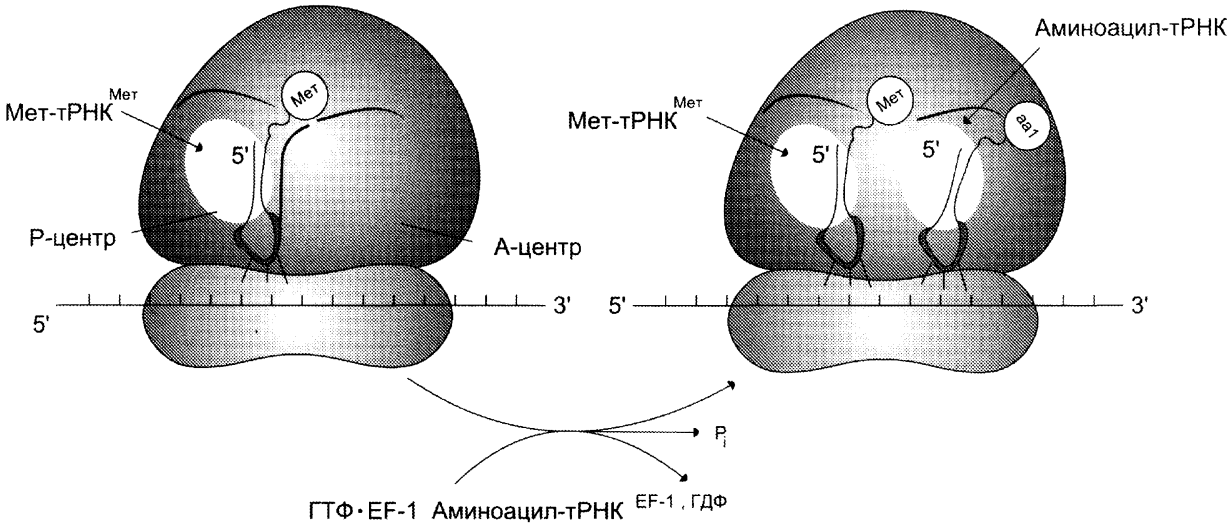


Рис. 4-38. Включение $аа_1$-тРНК^{аа_1} в рибосому. $аа_1$-тРНК^{аа_1} взаимодействует с рибосомой в виде тройного комплекса, состоящего из фактора элонгации EF-1, $аа_1$-тРНК^{аа_1} и ГТФ. Антикодон аа-тРНК^{аа_1} комплементарен и антипараллелен кодону мРНК в А-центре. Связывание $аа_1$-тРНК^{аа_1} происходит за счёт энергии гидролиза ГТФ до ГДФ и P_i.

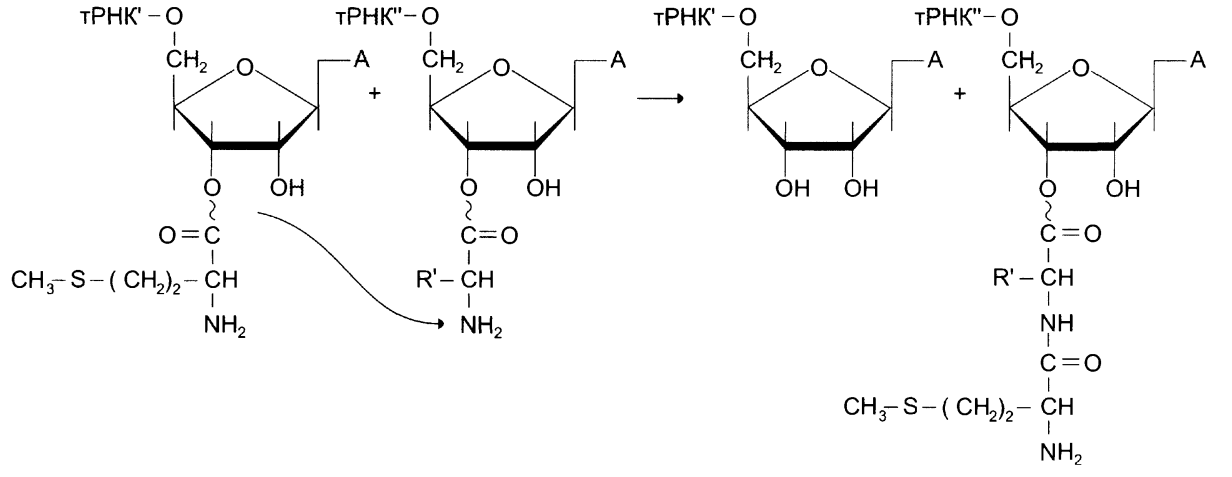


Рис. 4-39. Реакция транспептидации. Метионин от Мет-тРНК$_i^{Мет}$, находящегося в Р-центре, присоединяется к α-NH_2-группе аминоацильного остатка $аа_1$-тРНК^{аа_1} А-центра с образованием новой пептидной связи.

ладающая свойствами ферментов. Эти каталитически активные РНК получили название рибозимов (см. раздел 2). Полагают, что рибозимы можно считать «реликтами» раннего периода эволюции, когда белки ещё не приобрели такого значения, как в последующие периоды.

Транслокация — третья стадия элонгации. К рибосоме присоединяется фактор элонгации EF-2 и за счёт энергии ГТФ продвигает рибосому по мРНК на один кодон к 3′-концу. В результате дипептидил-тРНК, которая не меняет своего положения относительно мРНК, из А-центра перемещается в Р-центр. Свободная от метионина тРНК$_i^{Мет}$ покидает рибосому, а в область А-центра попадает следующий кодон (рис. 4-40).

По завершении третьей стадии элонгации рибосома в Р-центре имеет дипептидил-тРНК, а в А-центр попадает триплет, кодирующий вклю-

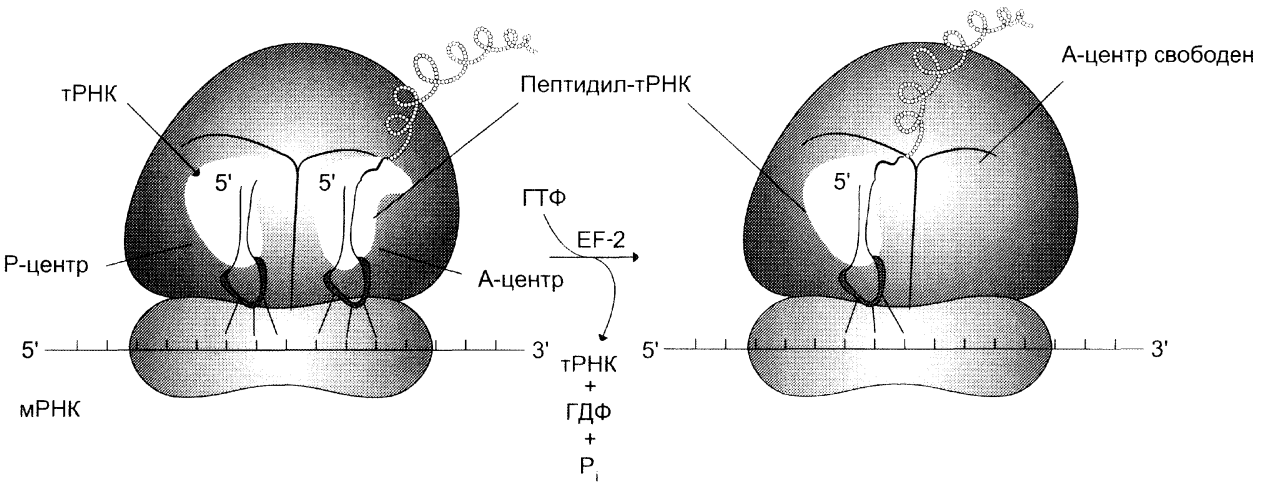


Рис. 4-40. Стадия транслокации. К рибосоме присоединяется фактор элонгации EF-2, и за счёт энергии ГТФ продвигает рибосому по мРНК на один кодон к 3′-концу. Пептидил-тРНК, не меняя своего положения относительно мРНК, из А-центра перемещается в Р-центр.

чение в полипептидную цепь второй аминокислоты. Начинается следующий цикл стадии элонгации, в ходе которого на рибосоме снова проходят вышеописанные события. Повторение таких циклов по числу смысловых кодонов мРНК завершает весь этап элонгации.

3. Терминация

Терминация трансляции наступает в том случае, когда в А-центр рибосомы попадает один из стоп-кодонов: UAG, UAA или UGA. Для стоп-кодонов нет соответствующих тРНК. Вместо этого к рибосоме присоединяются 2 белковых высвобождающих фактора RF (от англ. *releasing factor*) или **фактора терминации**. Один из них с помощью пептидилтрансферазного центра катализирует гидролитическое отщепление синтезированного пептида от тРНК. Другой за счёт энергии гидролиза ГТФ вызывает диссоциацию рибосомы на субъединицы (рис. 4-41).

Интересно отметить, что факторы трансляции, реализующие эффекты за счёт гидролиза ГТФ, являются членами суперсемейства G-белков, в которое входят G-белки, участвующие в трансдукции сигналов гормонов и других биологически активных веществ, и Ras-белки, функционирующие как факторы роста (см. разделы 11, 15). Все G-белки связывают и гидролизуют ГТФ. Когда они связаны с ГТФ, то активны и участвуют в соответствующих метаболических процессах, а когда в активном центре в результате гидролиза ГТФ превращается в ГДФ, эти белки приобретают неактивную конформацию.

Таким образом, матричная природа процесса трансляции проявляется в том, что последовательность поступления аминоацил-тРНК в рибосому для синтеза белка строго детерминирована мРНК, т.е. порядок расположения кодонов вдоль цепи мРНК однозначно задаёт структуру синтезируемого белка. Рибосома сканирует цепь мРНК в виде триплетов и последовательно отбирает из окружающей среды «нужные» аа-тРНК, освобождая в ходе элонгации деацилированные тРНК.

Малая и большая субъединицы рибосомы в процессе трансляции выполняют разные функции: малая субъединица присоединяет мРНК и декодирует информацию с помощью тРНК и механизма транслокации, а большая субъединица ответственна за образование пептидных связей.

Г. Полирибосомы

В процессе синтеза белка рибосома присоединяется к 5′-концу мРНК и перемещается в направлении 3′-конца. При этом 5′-конец мРНК освобождается, и к нему может присоединиться новая рибосома, на которой начинается рост ещё одной полипептидной цепи. Как правило,

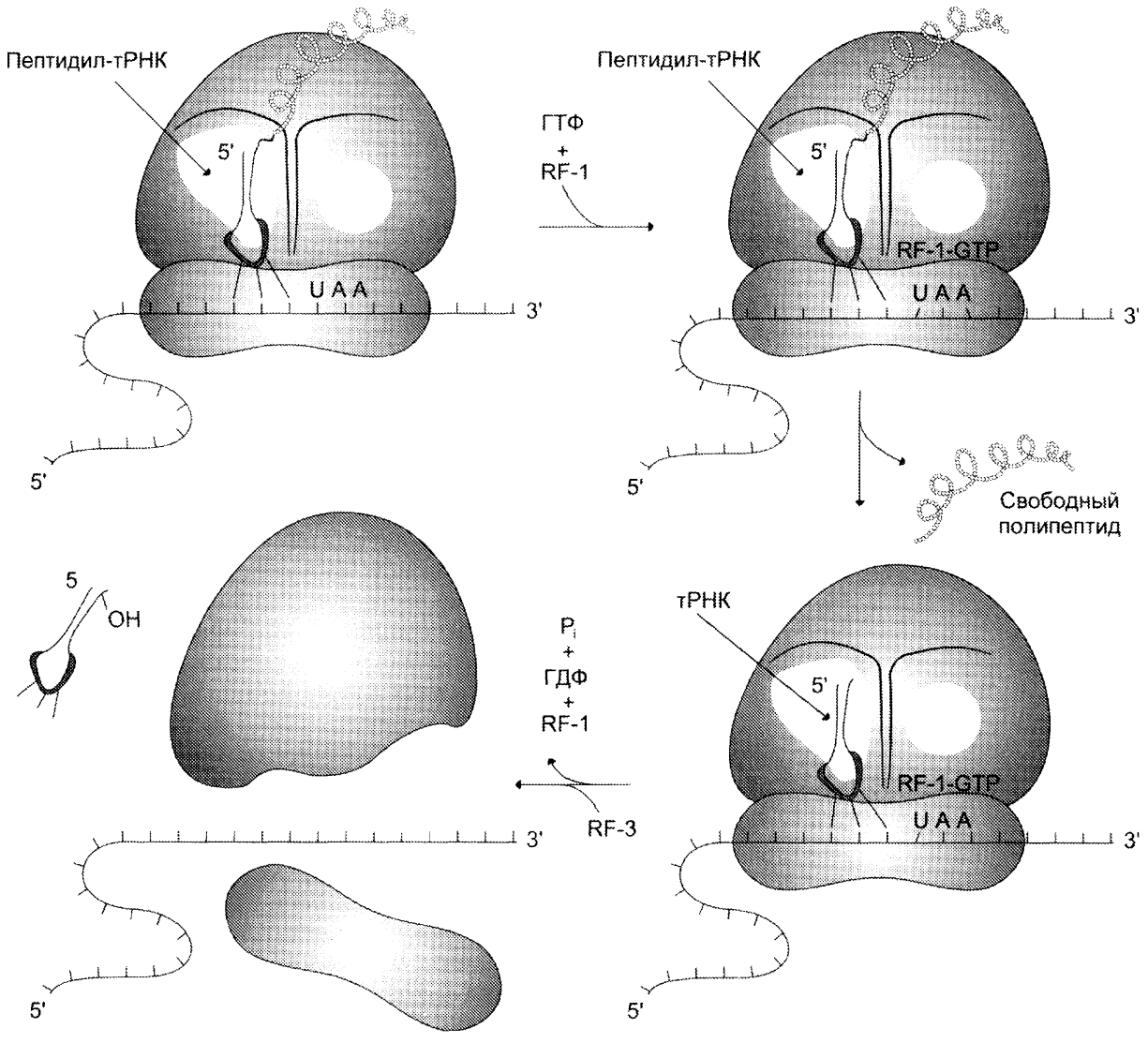


Рис. 4-41. Терминация синтеза белка.

много рибосом одновременно участвует в синтезе белка на одной и той же мРНК, образуя комплекс, который называют полирибосомой, или полисомой (рис. 4-42).

Каждая рибосома занимает на мРНК участок длиной около 80 нуклеотидов, поэтому рибосомы располагаются на мРНК с интервалом примерно в 100 нуклеотидов. Чем длиннее полипептидная цепочка синтезируемого белка, тем больше рибосом может одновременно осуществлять синтез этого белка, значительно увеличивая таким образом эффективность использования матрицы.

Каждая рибосома способна катализировать образование около 100 пептидных связей в минуту. Полирибосомы могут существовать в виде частиц, плавающих в цитоплазме клеток, или могут быть связаны с ЭР. Свободные цитоплазматические полирибосомные частицы ответственны за синтез белков, выполняющих внутриклеточные функции. Полирибосомы, ассоциированные с ЭР, под электронным микроскопом имеют вид «шероховатой» поверхности. Белки, синтезируемые «шероховатым» ЭР, должны транспортироваться через мембрану для того, чтобы они достигли места окончательной локализации. Для

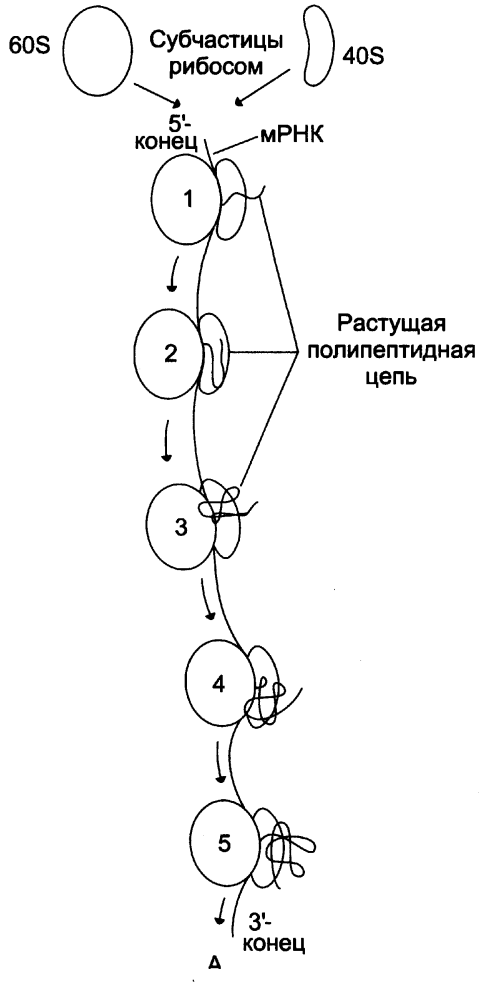


Рис. 4-42. Синтез белков на полирибосомном комплексе. Пять рибосом считывают информацию, содержащуюся в мРНК.

них характерно присутствие на N-конце лидерной, или сигнальной, последовательности длиной от 15 до 30 аминокислотных остатков, которая содержит много аминокислот с гидрофобными радикалами и обеспечивает прохождение белка через липидный бислой мембран. Некоторые из этих белков для дальнейшего транспорта упаковываются аппаратом Гольджи в секреторные гранулы.

Д. Посттрансляционные модификации полипептидной цепи

Полипептидные цепи могут подвергаться структурным модификациям, либо будучи ещё связанными с рибосомами, либо после завершения синтеза. Эти конформационные и структурные изменения полипептидных цепей получили название посттрансляционных изменений. Они включают удаление части полипептидной цепи, ковалентное присоединение одного или нескольких низкомолекулярных лигандов, приобретение белком нативной конформации.

Многие модификации осуществляются в ЭР. Здесь происходят **фолдинг полипептидных цепей** и формирование уникальной третичной или четвертичной структуры белков. Причём для поддержания нативной конформации молекул огромное значение имеет правильное **формирование дисульфидных связей**.

Частичный протеолиз

Многие белки, секретируемые из клеток, первоначально синтезируются в виде молекул-предшественников, функционально неактивных. Удаление части полипептидной цепи специфическими эндопротеазами приводит к образованию активных молекул. Некоторые белки-предшественники расщепляются в ЭР или аппарате Гольджи, другие — после секреции. Так, неактивные предшественники секретируемых ферментов — зимогены — образуют активный фермент после расщепления по определённым участкам молекулы: зимоген панкреатической железы трипсиноген превращается в активный трипсин после секреции в тонкий кишечник.

Наглядным примером последовательного двухстадийного протеолиза служит образование активных форм пептидных гормонов (например, инсулина или глюкагона) из препрогормонов. Первоначально N-концевой сигнальный пептид молекулы-предшественника удаляется в ЭР в процессе синтеза белка и образуется неактивный прогормон. Затем прогормон в секреторных гранулах, формирующихся в аппарате Гольджи, подвергается действию эндо- и/или экзопротеаз и превращается в активный гормон.

Ковалентные модификации

Структурные белки и ферменты могут активироваться или инактивироваться в результате присоединения различных химических групп: фосфатных, ацильных, метильных, олигосахаридных и некоторых других.

Фосфорилирование белков осуществляется по гидроксильным группам серина, треонина

и, реже, тирозина ферментами из группы протеинкиназ, тогда как дефосфорилирование катализируют гидролитические ферменты фосфопротеинфосфатазы (см. раздел 2).

Гликозилирование. Белки, входящие в состав плазматических мембран или секретирующиеся из клеток, подвергаются гликозилированию. Углеводные цепи присоединяются по гидроксильным группам серина или треонина (O-гликозилирование) либо аспарагина (N-гликозилирование). Последовательное наращивание углеводного фрагмента происходит в ЭР и аппарате Гольджи.

Многочисленным модификациям подвергаются боковые радикалы некоторых аминокислот: в тиреоглобулине йодируются остатки тирозина; в факторах свёртывания крови карбоксилируются остатки глутамата; в ЭР фибробластов гидроксилируются остатки пролина и лизина в цепях тропоколлагена.

VI. ИНГИБИТОРЫ МАТРИЧНЫХ БИОСИНТЕЗОВ

Существует большая группа веществ, ингибирующая синтез ДНК, РНК или белков. Некоторые из них нашли применение в медицине для лечения инфекционных болезней и опухолевых новообразований, а другие для человека оказались токсинами.

Действие ингибиторов матричных биосинтезов как лекарственных препаратов основано на модификации матриц: ДНК, РНК, белоксинтезирующего аппарата (прежде всего, рибосом) или на инактивации ферментов. Центральное место среди них принадлежит антибиотикам — разнообразным по химическому строению органическим соединениям, синтезируемым микроорганизмами, главным образом, микроскопическими грибами, и способным в малых количествах оказывать избирательное токсическое действие на другие микроорганизмы (табл. 4-5).

А. Ингибиторы репликации — противоопухолевые препараты

Антибиотики, взаимодействующие с ДНК, нарушают её матричную функцию и вызывают подавление процессов репликации и транскрипции. Их используют для лечения злокачественных новообразований и называют противоопухолевыми препаратами (см. раздел 15). Дауномицин, доксорубицин и некоторые другие взаимодействуют с молекулой ДНК таким образом, что циклическая структура этих антибиотиков встраивается («**интеркалирует**») между парами оснований G≡C, а углеводный компонент занимает малую бороздку ДНК (рис. 4-43). Это ведёт к локальному изменению структуры ДНК и ингибированию репликации и транскрипции.

К «интеркаляторам» относят также антибиотик актиномицин D, блокирующий синтез ДНК и РНК у про- и эукариотов. Это соединение слишком токсично, чтобы использовать его в клинических целях, но его широко используют в научно-исследовательской работе для изучения процессинга первичных транскриптов РНК.

Избирательность действия противоопухолевых антибиотиков невелика и обеспечивается более высокой по сравнению с нормальными клетками скоростью синтеза ДНК и РНК, а также повышенной проницаемостью клеточных мембран опухолевых клеток. В то же время эти соединения токсичны для быстроделящихся нормальных клеток организма, таких как стволовые клетки кроветворной системы, клетки слизистой оболочки желудка и кишечника, фолликулов волос. В последние годы проводятся исследования по созданию препаратов, обеспечивающих доставку ингибитора только в опухолевые клетки. Это достигается связыванием цитотоксических антибиотиков с белками, рецепторы к которым имеются главным образом на опухолевых клетках (см. раздел 15).

К препаратам, останавливающим репликацию, относят **алкилирующие агенты** и **ингибиторы ДНК-топоизомеразы II** (одной из изоформ топоизомераз). Последние называют ингибиторами гираз, поскольку ДНК-гиразы — ферменты прокариотических клеток, ответственные за суперспирализацию ДНК; у эукариотов аналогичную функцию выполняют ДНК-топоизомеразы. Известно, что транскрипция некоторых генов возможна лишь при определённом уровне суперспирализации матрицы. Соединения, вмешивающиеся в работу ДНК-гираз, могут ингибировать или активировать синтез РНК. К ингибиторам гираз принадлежат налидиксовая кислота, новобиоцин и номермицин.

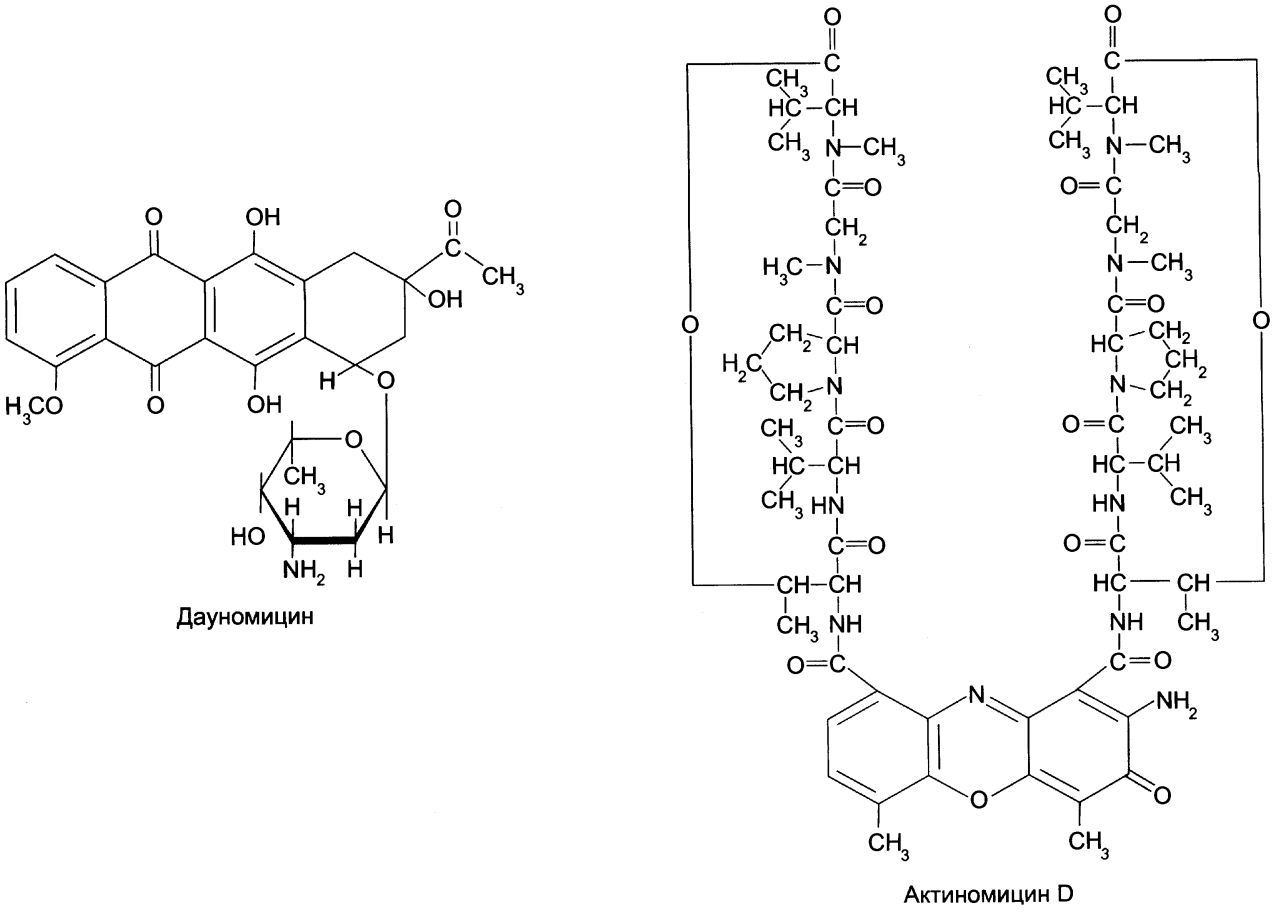


Рис. 4-43. Строение «интеркаляторов» — дауномицина и актиномицина D.

Б. Ингибиторы транскрипции и трансляции — антибактериальные препараты

К ингибиторам матричных синтезов, оказывающим противобактериальное действие, относят вещества, блокирующие синтез РНК или белка. В эту группу входит широко применяемый в клинике рифампицин, получаемый на основе природного антибиотика рифамицина. Антибиотики из семейства рифамицинов ингибируют только бактериальную **ДНК-зависимую РНК-полимеразу**, связываясь с β-субъединицей фермента и препятствуя инициации транскрипции (рис. 4-44). Их применяют для лечения туберкулёза, так как эти препараты не влияют на работу ядерных РНК-полимераз эукариотических клеток. Однако они могут ингибировать синтез митохондриальных РНК, хотя дозы препарата, при которых блокируется образование митохондриальных РНК, выше тех, что используют в лечении инфекционного заболевания.

Большая группа антибиотиков является ингибиторами трансляции (рис. 4-45): тетрациклины, эритромицин, пуромицин, хлорамфеникол и аминогликозиды. Так, один из наиболее известных аминогликозидов **стрептомицин** ингибирует инициацию синтеза белка у прокариотов и вызывает ошибки в прочтении информации, закодированной в мРНК. Его часто назначают при лечении инфекционных заболеваний сердца. К антибиотикам широкого спектра действия относят **тетрациклины**. Они связываются с 30S субъединицей рибосомы и блокируют присоединение аминоацил-тРНК в А-центр рибосомы, тем самым нарушая элонгацию полипептидной цепи. Тетрациклины эф-

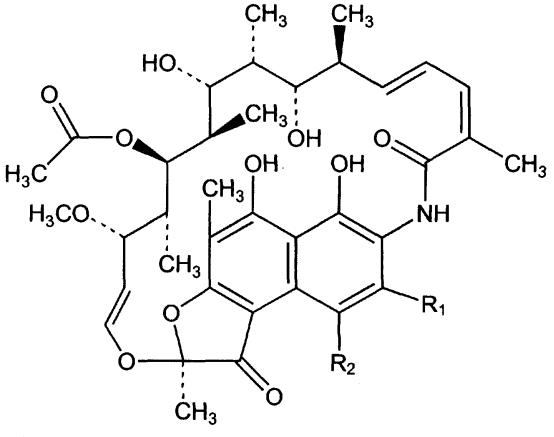
Таблица 4-5. Антибиотики — ингибиторы матричных биосинтезов как лекарственные препараты

Антибиотики	Механизм действия
Ингибиторы репликации	
Дауномицин Доксорубицин Актиномицин D	Внедряются («интеркалируют») между парами оснований ДНК и нарушают репликацию и транскрипцию
Мелфалан	Алкилирует ДНК и нарушает репликацию
Номермицин Новобиоцин	Ингибируют ДНК-топоизомеразу II, ответственную за суперспирализацию ДНК, нарушают репликацию и транскрипцию
Ингибиторы транскрипции	
Рифамицины	Связываются с бактериальной РНК-полимеразой и препятствуют началу транскрипции
Ингибиторы трансляции	
Тетрациклины	Ингибируют элонгацию: связываются с 30S субъединицей рибосомы и блокируют присоединение аа-тРНК в А-центр
Левомицетин	Присоединяется к 50S субъединице рибосомы и ингибирует пептидилтрансферазную активность
Эритромицин	Присоединяется к 50S субъединице рибосомы и ингибирует транслокацию
Стрептомицин	Ингибирует инициацию трансляции. Связывается с 30S субъединицей рибосомы, вызывает ошибки в прочтении информации, закодированной в мРНК

фективны в отношении возбудителей многих болезней. **Левомицетин** (хлорамфеникол) также относят к антибиотикам широкого спектра действия. Он ингибирует синтез белка за счёт присоединения к 50S субъединице рибосомы, подавляя пептидилтрансферазную активность.

Пенициллины и цефалоспорины относят к группе β-лактамных антибиотиков, продуцируемых плесенью штамма *Penicillum*. В структуре этих молекул присутствует реакционно-способное β-лактамное кольцо, вызывающее ингибирование синтеза клеточных стенок у грамотрицательных микроорганизмов. Действие этих антибиотиков направлено на фермент, обеспечивающий образование поперечных связей в структуре белков клеточной стенки бактерий. Необратимое ингибирование активности этого фермента ведёт к образованию изменённых клеточных стенок и гибели бактерий в процессе размножения.

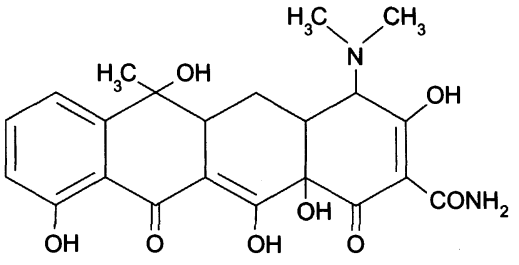
Надо сказать, что препараты антибактериальной группы отличаются высокой избирательно-



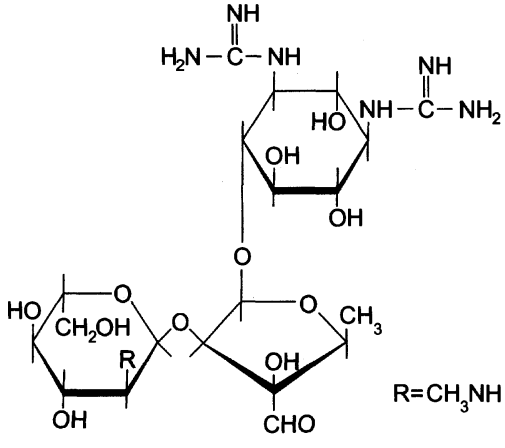
Рифамицин B(R_1 = H; R_2 = O–CH_2–COOH)

Рифампицин (R_1 = CH = N–N–CH_3; R_2 = OH)

Рис. 4-44. Антибиотики из семейства рифамицинов.



Тетрациклин



Стрептомицин

Рис. 4-45. Некоторые антибиотики–ингибиторы синтеза белков у прокариотов.

стью и сравнительно мало токсичны для человека. Это объясняется различиями в структуре РНК-полимераз, РНК и белков рибосом в эукариотических и прокариотических клетках.

В. Вирусы и токсины — ингибиторы матричных синтезов в эукариотических клетках

Вирусы

Генетический материал вирусов представлен молекулой ДНК или РНК. Он, как правило, невелик и содержит информацию лишь о некоторых специфических белках и ферментах, необходимых для репродукции вируса (например, вирусов оспы, гриппа, полиомиелита, гепатита). Вскоре после заражения с высокой скоростью начинается синтез вирусных ДНК, РНК и белков с использованием ферментов и белков, субстратов и источников энергии клетки хозяина. При этом в инфицированных клетках прекращается синтез нуклеиновых кислот и белков, свойственных организму хозяина. Репродукция вирусных частиц идёт вплоть до гибели заражённой клетки.

Токсины

Причиной гибели людей при отравлении бледной поганкой *Amanita phalloides* является токсин — **α-аманитин**, который содержится в теле гриба и вызывает необратимую дисфункцию печени и почек. Высокая токсичность этого соединения для человека связана с тем, что оно ингибирует эукариотические РНК-полимеразы. Наибольшую чувствительность к яду обнаруживает РНК-полимераза II, катализирующая синтез мРНК. Для α-аманитина LD_{50} (доза *per os*, при которой погибает 50% лиц, получивших токсин) составляет 0,1 мг/кг массы тела.

Чрезвычайно токсичен белок **рицин**, выделенный из клещевины обыкновенной. Он представляет собой N-гликозилазу, которая удаляет один остаток аденина из 28S рРНК большой субъединицы рибосомы и ингибирует синтез белка у эукариотов. Рицин — белковый компонент касторового масла, иногда используемого в качестве слабительного средства. Из-за высокой токсичности рицина лечение касторовым маслом проводят короткими курсами, так как длительное употребление может вызвать непрекращающийся понос, нарушение работы кишечника и даже гибель больного.

У человека развитие некоторых бактериальных инфекций сопровождается ингибированием матричных синтезов. Наиболее изученный пример — ингибирование синтеза белков в клетках слизистой оболочки зева и гортани энтеротоксином возбудителя дифтерии *Corynebacterium diphteriae*. Некоторые штаммы этого патогенного микроорганизма получают ген токсина от бактериального вируса, называемого β-фагом, который инфицирует бактерию и индуцирует синтез токсина — одноцепочечного белка с молекулярной массой 60 кД. В цитоплазме клеток хозяина под влиянием протеолитических ферментов токсин расщепляется на 2 фрагмента, один из которых является ферментом АДФ-рибозилтрансферазой. Этот фермент катализирует АДФ-рибозилирование и

инактивацию фактора элонгации EF-2 по реакции:

$$EF\text{-}2 + NAD^+ \rightarrow АДФ\text{-рибозил}{-}EF\text{-}2 + никотинамид + H^+.$$

В условиях *in vitro* эта реакция обратима, но при pH и концентрации никотинамида, которые существуют в клетках, она становится необратимой. Модификация фактора EF-2 нарушает транслокацию рибосом, ведёт к прекращению биосинтеза белков в инфицированных клетках и к их гибели. С действием токсина связаны основные симптомы дифтерии.

Описаны и другие токсины бактериального и растительного происхождения, ингибирующие синтез и функциональную активность белков путём АДФ-рибозилирования или модификации рРНК.

Г. Интерфероны

Интерфероны — небольшие белки (гликопротеины), состоящие примерно из 160 аминокислотных остатков. Они секретируются некоторыми клетками позвоночных в ответ на заражение вирусами и препятствуют распространению вирусной инфекции. Этот класс белков синтезируется в исключительно малых количествах: от нанограммов (10^{-9} г) до пикограммов (10^{-12} г), но является очень активным неспецифическим противовирусным агентом (10^6–10^9 единиц антивирусной активности на 1 мг белка). Это соответствует способности одной молекулы интерферона защищать от инфекции одну клетку.

Некоторые компоненты вирусных частиц (например, двухцепочечная РНК) индуцируют синтез по крайней мере 3 типов интерферонов. У человека имеются 14 генов, кодирующих α-интерфероны, которые продуцируются В-лимфоцитами и макрофагами, 5 генов β-интерферонов, обеспечивающих образование соответствующих белков фибробластами, и 1 ген γ-интерферона, экспрессия которого идёт в Т-лимфоцитах.

Связываясь с рецепторами на плазматической мембране заражённых клеток, эти белки, подобно белковым гормонам, стимулируют синтез ферментов, способных разрушать мРНК вирусов и прекращать синтез белков на рибосомах, препятствуя тем самым экспрессии вирусных генов в клетках эукариотов.

Исследование механизма действия интерферонов показало, что они:

- ингибируют синтез белков, необходимых для репликации вирусов;
- стимулируют синтез фермента **олигонуклеотидполимеразы**, катализирующего образование небольших количеств коротких олигоаденилатов: 2′,5′-олиго (А). Эти олигонуклеотиды являются активаторами рибонуклеазы — фермента, расщепляющего матричные и рибосомные РНК;
- стимулируют синтез протеинкиназы, которая фосфорилирует и, тем самым, инактивирует фактор инициации eIF2:

$$eIF2 + АТФ \rightarrow eIF2{-}OPO_3H_2 + АДФ.$$

В результате синтез всех белков в инфицированных клетках прекращается. Клетки погибают, но вместе с ними останавливается размножение вирусов, и начинается выздоровление. Таким образом, жертвуя небольшим количеством клеток, организм защищает себя от болезни.

В настоящее время интерфероны, полученные промышленным путём с использованием техники клонирования генов, широко используют при лечении обычной простуды, гриппа, полиомиелита, ветряной оспы, герпеса, вируса гепатита и других инфекций. Хорошие результаты показывает использование интерферонов в терапии некоторых видов злокачественных опухолей, главным образом, гемобластозов (см. раздел 15), хотя их роль в химиотерапии опухолей до настоящего времени остаётся малопонятной.

VII. РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У ПРО- И ЭУКАРИОТОВ

Организмы адаптируются к меняющимся условиям окружающей среды путём изменения экспрессии (скорости транскрипции) генов. Этот процесс, в деталях изученный на бактериях и вирусах, включает взаимодействие специфических белков с участками ДНК в непосредственной близости от стартового участка транскрипции. При этом может происходить включение или выключение транскрипции. Эукариотические клетки используют тот же самый принцип, хотя в регуляции реализуются и некоторые другие более сложные механизмы.

А. Регуляция активности генов у прокариотов. Теория оперона

Исследования на клетках *E. coli* позволили установить, что у бактерий существуют ферменты 3 типов:

конститутивные, присутствующие в клетках в постоянных количествах независимо от метаболического состояния организма (например, ферменты гликолиза);

индуцируемые, их концентрация в обычных условиях мала, но может возрастать в 1000 раз и более, если, например, в среду культивирования клеток добавить субстрат такого фермента;

репрессируемые, т.е. ферменты метаболических путей, синтез которых прекращается при добавлении в среду выращивания конечного продукта этих путей.

1. Теория оперона

На основании генетических исследований индукции β-галактозидазы, участвующей в клетках *E. coli*, в гидролитическом расщеплении лактозы (рис. 4-46), Франсуа Жакоб и Жак Моно в 1961 г. сформулировали гипотезу оперона, которая объясняла механизм контроля синтеза белков у прокариотов.

В экспериментах гипотеза оперона получила полное подтверждение, а предложенный в ней тип регуляции стали называть контролем синтеза белка на уровне транскрипции, так как в этом случае изменение скорости синтеза белков осуществляется за счёт изменения скорости транскрипции генов, т.е. на стадии образования мРНК.

У *E. coli*, как и у других прокариотов, ДНК не отделена от цитоплазмы ядерной оболочкой. В процессе транскрипции образуются первичные транскрипты, не содержащие интронов, а мРНК лишены «кэпа» и поли-А-конца. Синтез белка начинается до того, как заканчивается синтез его матрицы, т.е. транскрипция и трансляция протекают почти одновременно. Исходя из размера генома (4×10^6 пар нуклеотидов), каждая клетка *E. coli* содержит информацию о нескольких тысячах белков. Но при нормальных условиях роста она синтезирует около 600–800 различных белков, а это означает, что многие гены не транскрибируются, т.е. неактивны. Гены белков, функции которых в метаболических процессах тесно связаны, часто в геноме группируются вместе в структурные единицы (**опероны**). Согласно теории Жакоба и Моно, оперонами называют участки молекулы ДНК, которые содержат информацию о группе функционально взаимосвязанных структурных белков, и регуляторную зону, контролирующую транскрипцию этих генов. Структурные гены оперона экспрессируются согласованно, либо все они транскрибируются, и тогда оперон активен, либо ни один из генов не «прочитывается», и тогда оперон неактивен. Когда оперон активен и все его гены транскрибируются, то синтезируется полицистронная мРНК, служащая матрицей для синтеза всех белков этого оперона. Транскрипция структурных генов зависит от способности РНК-полимеразы присоединяться к промотору, расположенному на 5′-конце оперона перед структурными генами.

Связывание РНК-полимеразы с промотором зависит от присутствия белка-репрессора на смежном с промотором участке, который называют **«оператор»**. Белок-репрессор синтезируется в клетке с постоянной скоростью и имеет сродство к операторному участку. Структурно участки промотора и оператора частично перекрываются, поэтому присоединение белка-репрессора к оператору создаёт стерическое препятствие для присоединения РНК-полимеразы.

Большинство механизмов регуляции синтеза белков направлено на изменение скорости связывания РНК-полимеразы с промотором, влияя таким образом на этап инициации транскрипции. Гены, осуществляющие синтез регуляторных белков, могут быть удалены от оперона, транскрипцию которого они контролируют.

2. Индукция синтеза белков. Lac-оперон

Теория оперона была предложена на основании данных, полученных при изучении свойств лактозного оперона (*lac*-оперона) *E. coli*, т.е. оперона, в котором закодированы белки, участвующие в усвоении лактозы.

Клетки *E. coli* обычно растут на среде, используя в качестве источника углерода глюкозу. Если в среде культивирования глюкозу заменить на дисахарид лактозу, то по прошествии нескольких минут клетки адаптируются к изменившимся условиям. Они начинают продуцировать 3 белка, обеспечивающих утилизацию лактозы. Один из этих белков — фермент β-галактозидаза, катализирующий гидролити-

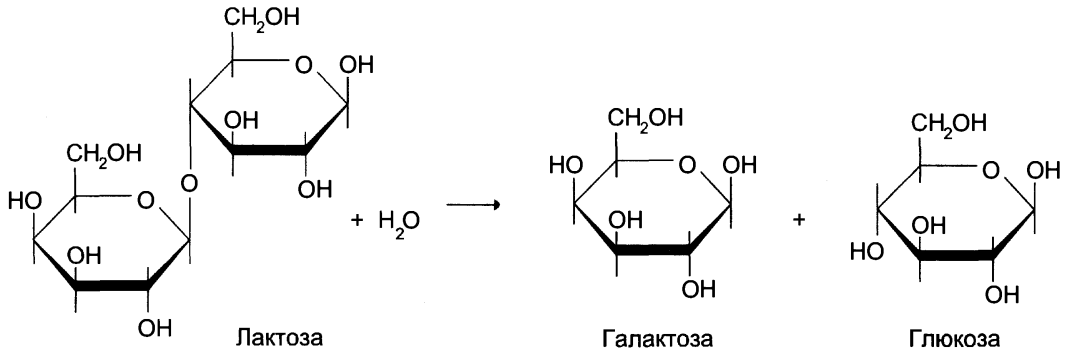


Рис. 4-46. Гидролиз лактозы β-галактозидазой.

ческое расщепление лактозы до глюкозы и галактозы.

В присутствии глюкозы клетки *E. coli* содержат менее 10 молекул этих ферментов на клетку. Перенос клеток на среду, содержащую лактозу, вызывает индукцию — увеличение количества молекул каждого из ферментов до 5000 (рис. 4-47).

Теория оперона объясняет это явление следующим образом. В отсутствие индуктора (лактозы) белок-репрессор связан с оператором. А поскольку участки оператора и промотора перекрываются, то присоединение репрессора к оператору препятствует связыванию РНК-полимеразы с промотором, и транскрипция структурных генов оперона не идёт. Когда в среде появляется индуктор, т.е. лактоза, то он присоединяется к белку-репрессору, изменяет его конформацию и снижает сродство к оператору. РНК-полимераза связывается с промотором и транскрибирует структурные гены.

3. Репрессия синтеза белков. Триптофановый и гистидиновый опероны

Снижение концентрации фермента в бактериальной клетке может осуществляться путём репрессии синтеза ферментов. Сущность этого механизма регуляции заключается в следующем: когда клетки *E. coli* растут на среде, содержащей в качестве единственного источника азота соль аммония, то им приходится синтезировать все азотсодержащие вещества. Такие клетки, в частности, должны содержать все ферменты, необходимые для синтеза 20 различных аминокислот. Однако если добавить в среду культивирования одну из аминокислот, например триптофан или гистидин, то клетка перестанет вырабатывать весь набор ферментов, необходимых для синтеза этих аминокислот из аммиака и источника углерода. Репрессия синтеза ферментов, катализирующих последовательность реакций метаболического пути конечным продуктом, как это имеет место в случае ферментов синтеза гистидина или триптофана, называется репрессией конечным продуктом.

Это явление теория оперона объясняет следующим образом: при отсутствии в среде Гис или Три регуляторный белок-репрессор не имеет сродства к оператору и происходит синтез ферментов, осуществляющих образование этих аминокислот. Когда в среду добавляют, например, Гис, то эта небольшая молекула, получившая название «**корепрессор**», присоединяется к белку-репрессору. В результате конформационных изменений в молекуле репрессора комплекс белка-репрессора и корепрессора (Гис) приобретает сродство к оператору, присоединяется к нему, и транскрипция оперона прекращается, т.е. прекращается считывание информации о строении 10 ферментов, участвующих в синтезе этой аминокислоты (рис. 4-48).

Следует иметь в виду, что репрессия и индукция синтеза белков у прокариотов реализуют принципы адаптации к меняющимся условиям существования и клеточной экономии: ферменты появляются в клетках, когда в них существует потребность, и перестают вырабатываться, если потребность исчезает.

Б. Механизмы регуляции экспрессии генов у эукариотов

Эукариотические организмы (и особенно млекопитающие) устроены значительно сложнее прокариотов и нуждаются в более слож-

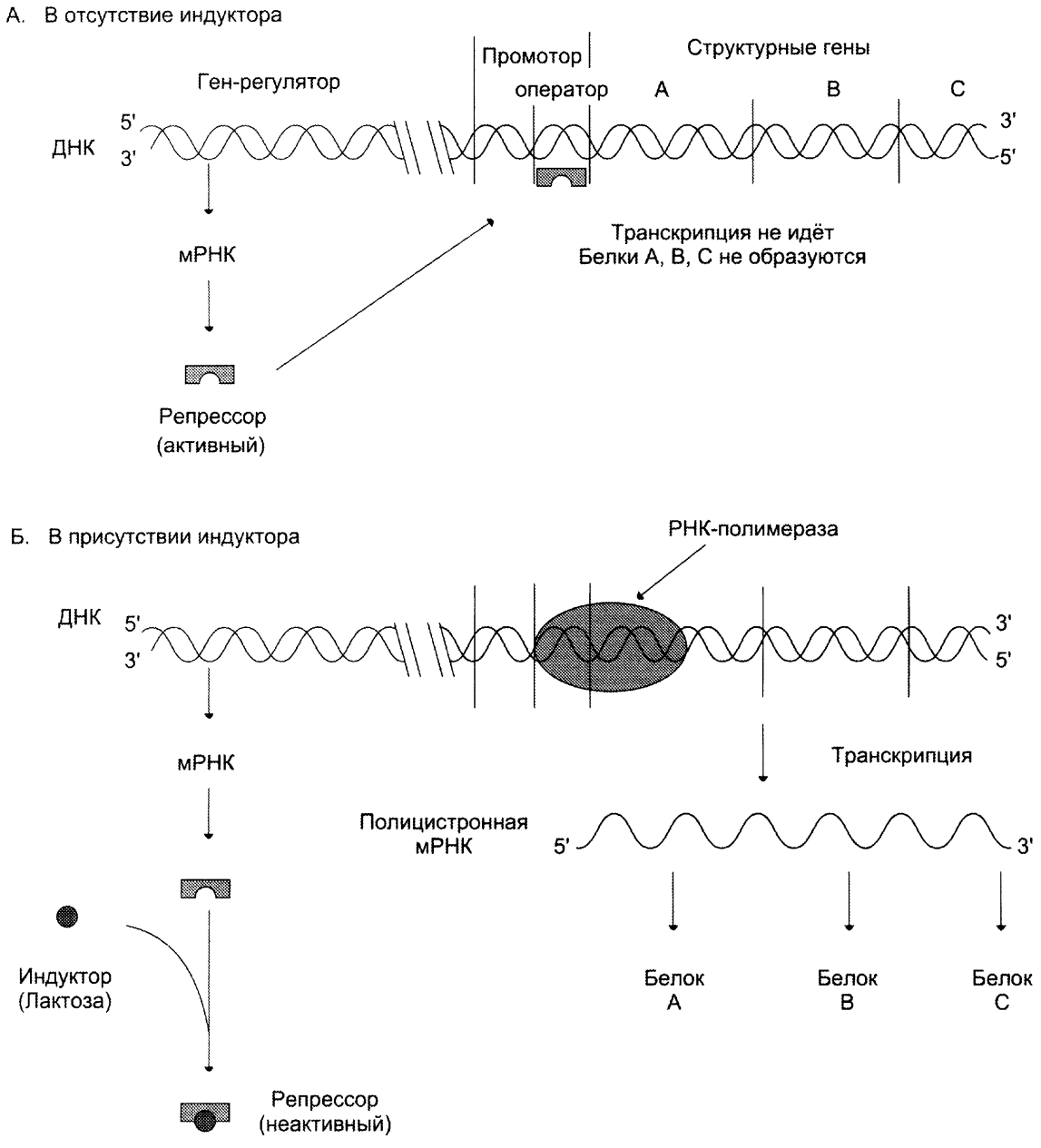


Рис. 4-47. Механизм индукции лактозного оперона. А – в отсутствие индуктора (лактозы) белок-репрессор связан с оператором. РНК-полимераза не может присоединиться к промотору, транскрипция структурных генов оперона не идёт; Б – в присутствии лактозы белок-репрессор присоединяет её, изменяет свою конформацию и теряет сродство к оператору. РНК-полимераза связывается с промотором и транскрибирует структурные гены: β-галактозидазы (А), катализирующей гидролиз лактозы до глюкозы и галактозы; галактозидпермеазы (В), осуществляющей транспорт лактозы и других галактозидов в клетки; тиогалактозидтрансацетилазы (С) — фермента, способного переносить ацетильную группу ацетил-КоА на тиогалактозу. Функция его в процессе утилизации лактозы пока неясна.

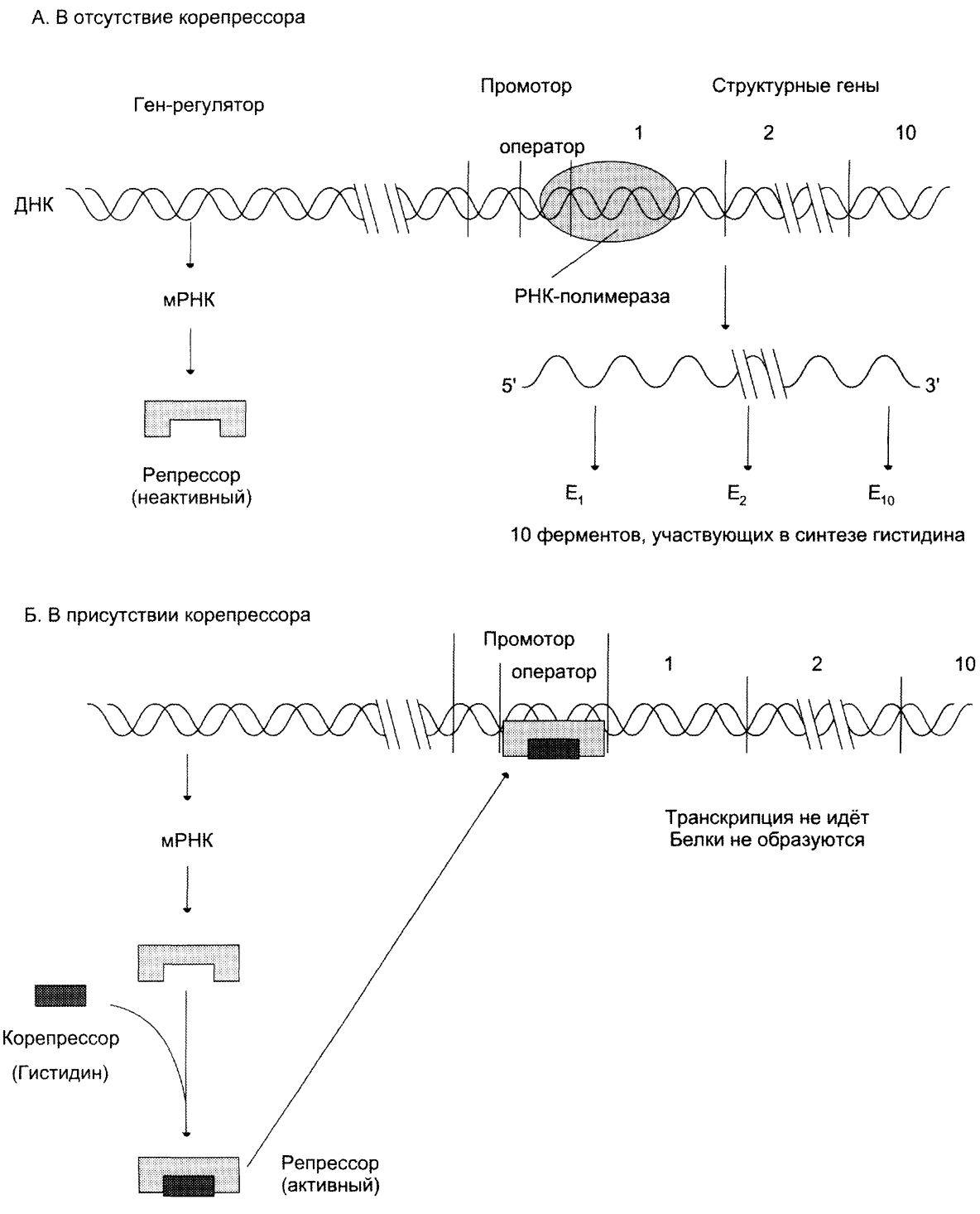


Рис. 4-48. Механизм репрессии синтеза ферментов, участвующих в образовании гистидина. А – в отсутствие корепрессора (гистидина) белок-репрессор не имеет сродства к оператору, РНК-полимераза присоединяется к промотору, и происходит транскрипция 10 структурных генов, кодирующих строение ферментов, участвующих в синтезе гистидина; Б – в присутствии гистидина в среде комплекс белка-репрессора с корепрессором, т.е. Гис, связывается с оператором, препятствует присоединению РНК-полимеразы к промотору и останавливает транскрипцию.

ном аппарате регуляции. Так, в организме человека имеется более 200 различных типов клеток, существенно различающихся по структуре и функциям. В то же время различными методами исследования ДНК (прежде всего, методом молекулярной гибридизации) доказано, что количество и структура ДНК практически всех клеток организма одинаковы (за исключением лимфоцитов), т.е. все клетки организма содержат один и тот же геном. У высших организмов по сравнению с прокариотическими существенно возрастает содержание ДНК на гаплоидную клетку: с $4{,}2\times10^6$ пар нуклеотидов у *E. coli* до $3{,}3\times10^9$ пар нуклеотидов в клетках человека.

1. Организация хроматина в дифференцированных клетках многоклеточного организма

В клетках млекопитающих наряду с адаптивной регуляцией, обеспечивающей приспособление организма к меняющимся условиям внутренней и внешней среды, существуют механизмы, которые сохраняют стабильную (существующую на протяжении всей жизни клетки и даже многих её генераций) репрессию одних генов и депрессию других.

В ядрах дифференцированных клеток хроматин имеет такую укладку, что только небольшое число генов (часто менее 1%) доступно для транскрипции. Различают участки гетерохроматина, в которых ДНК упакована очень компактно и недоступна для транскрипции, и участки эухроматина, имеющие более рыхлую укладку и способные связывать РНК-полимеразу. В разных типах клеток в область эухроматина попадают разные гены, а это означает, что в разных тканях транскрибируются разные участки хроматина.

Стойкая репрессия генов гетерохроматина обеспечивается:

- пространственной укладкой ДНК, при которой гетерохроматин находится в высококонденсированном состоянии;
- метилированием дезоксицитидина ДНК-метилазами в 5′-CG-3′ последовательностях ДНК. Эта модификация сильно меняет конформацию хроматина и препятствует активной транскрипции;
- связыванием с гистонами и образованием нуклеосом, которые также снижают транскрипционную активность ДНК.

Исследования показали, что **области эухроматина**, в которых расположены активно транскрибируемые гены, обладают некоторыми структурными особенностями:

- они более чувствительны к действию ДНК-аз, чем остальные участки ДНК;
- молекулы гистонов, связанные с ДНК в этих участках, модифицированы: ε-аминогруппа лизина метилирована или ацетилирована; метилированы некоторые остатки аргинина и гистидина в гистонах H2A и H2B, являющихся ко́ровыми белками нуклеосом. Некоторые молекулы H2A образуют прочный комплекс с белком убиквитином. В гистоне H1 фосфорилируются остатки серина. Результат этой серии ковалентных модификаций — снижение суммарного, положительного заряда гистонов и ослабление сродства нуклеосом к ДНК.
- к областям «активного» хроматина присоединяется группа негистоновых HMG-белков, или белков с высокой подвижностью при гель-электрофорезе. Эти белки содержат много положительно заряженных аминокислотных остатков, связывание с которыми ослабляет взаимодействие ДНК и гистонов и вызывает дополнительное повышение транскрипционной активности генов.

Разнообразие клеток и возросшая сложность клеточных процессов нуждаются в большом разнообразии механизмов регуляции. Показано, что разный набор и количество белков в эукариотических клетках может регулироваться:

- изменением количества структурных генов;
- перестройкой генов в хромосомах;
- эффективностью транскрипции разных участков генома;
- характером посттранскрипционных модификаций первичных транскриптов;
- на уровне трансляции;
- с помощью посттрансляционных превращений вновь синтезированных полипептидных цепей.

2. Изменение количества генов

Геном эукариотов обнаруживает высокую пластичность, играющую важную роль в регуляции активности некоторых генов и увеличивающую разнообразие клеточных ответов. У млекопитающих реализуются следующие варианты изменений в структуре генов:

Амплификация (или увеличение числа) генов используется организмом в том случае, когда возникает необходимость увеличить синтез определённого генного продукта. Многие гены, кодирующие белки или РНК, необходимые организму в больших количествах (например, гистоны, рРНК, тРНК), постоянно присутствуют в амплифицированном состоянии. Так, у человека 20% общего генома состоит из участков, кодирующих рибосомные, транспортные и ядрышковые РНК, последние из которых обеспечивают посттранскрипционные модификации РНК. Амплифицированные участки могут располагаться друг за другом (тандемно) в хромосоме или образовывать внехромосомные фрагменты ДНК, называемые двойными мини-хромосомами, их размер колеблется от 100 до 1000 килобаз (1 килобаза = 1000 пар нуклеотидов). Описано более 20 генов, способных амплифицироваться при определённых условиях.

К числу генов, для которых обнаружена амплификация, относят ген металлотионеина. Продукт экспрессии этого гена — низкомолекулярный белок металлотионеин, обладающий способностью связывать тяжёлые металлы (медь, цинк, кадмий, ртуть) и защищать клетки от отравления этими соединениями. Установлено, что в ответ на повышение концентрации тяжёлых металлов в крови в клетках происходит амплификация гена металлотионеина.

Другими примерами генов, количество которых увеличивается под влиянием лекарственных препаратов, являются ген дигидрофолатредуктазы (см. разделы 9, 10) и ген Р-гликопротеина, ответственный за синтез белка, обеспечивающего множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток (см. раздел 16).

Утрата генетического материала — довольно редкий способ регуляции. Наиболее яркий пример потери всех генов за счёт разрушения ядра — процесс созревания эритроцитов. Нестабильны амплифицированные гены, двойные хромосомы. Они, как правило, исчезают в последующих генерациях. Утрата генетического материала происходит в процессе созревания лимфоцитов и образования плазматических клеток разных клонов, синтезирующих секретируемые формы иммуноглобулинов.

3. Перестройка генов

У высших организмов, так же как и у прокариотов, отмечают процесс обмена, перемещения генов между хромосомами или внутри хромосомы, объединение генов с образованием изменённой хромосомы, которая после таких структурных изменений способна к репликации и транскрипции. Этот процесс получил название «**генетическая рекомбинация**».

У эукариотов рекомбинации наблюдают:

- при половом слиянии яйцеклетки и сперматозоида;
- при перемещении подвижных генетических элементов — транспозонов, в состав которых входят отдельные гены или группа генов, с исходной позиции в какое-либо другое место той же или другой хромосомы;
- при формировании в лимфоцитах «библиотеки» генов, кодирующих антитела или иммуноглобулины.

Рассмотрим более подробно механизмы, обеспечивающие образование в организме каждого человека около 10 млн (10^7) различных антител, т.е. количества значительно большего, чем число всех других белков, существующих у каждого индивидуума. **Антитела** с одинаковыми антигенсвязывающими свойствами синтезируются В-лимфоцитами, принадлежащими к одному определённому клону (т.е. группе клеток, возникшей из одной родоначальной клетки). При попадании в организм любого антигена среди имеющегося набора В-лимфоцитов всегда найдётся такой клон клеток, антитела которого имеют комплементарный ему активный центр. Антитела встроены в плазматическую мембрану В-лимфоцитов, и их антигенсвязывающие участки локализованы на поверхности клеток. Антиген, присоединяясь к активному центру антитела, вызывает пролиферацию клеток и превращение В-лимфоцитов в плазматические клетки, в которых идут активный синтез и секреция не связанных с мембраной антител.

Изучение вопроса о происхождении антител позволило сделать вывод о том, что огромное многообразие белков иммунной системы кодируется ограниченным количеством генетического материала, изменения в котором обеспечиваются рекомбинациями и соматическими мутациями (или изменениями в структуре ДНК,

которые сохраняются при последующих делениях клеток).

Вспомним, что мономерные антитела — доменные белки, состоящие из двух идентичных тяжёлых (H) цепей и двух идентичных лёгких (L) цепей. Лёгкие цепи имеют двухдоменную структуру и включают вариабельный (V_L) и константный (C_L) домены. Тяжёлая цепь состоит из 4–5 доменов: одного вариабельного (V_H) и, как правило, трёх константных (C_H). Иммуноглобулины — гликопротеины; их углеводная часть присоединяется к константной области H-цепей. В связывании антигенов участвуют 2 активных центра антитела, образованные вариабельными областями H-цепей (V_H) и L-цепей (V_L). L-цепи бывают двух типов: λ (лямбда) и κ (каппа), значительно различающиеся по первичной структуре C-областей.

Наличие в антителах C- и V-областей позволило предположить, что гены, обеспечивающие синтез L- и H-цепей, образуются в результате соединения двух участков гена, один из которых кодирует вариабельную область, а второй — константную. И действительно вскоре было установлено, что в зародышевых клетках и соматических клетках, не синтезирующих иммуноглобулины, участки гена, кодирующие V- и C-области L-цепей λ-типа, разделены протяжёнными нуклеотидными последовательностями, но сближены в зрелых B-лимфоцитах, синтезирующих L_λ. Из этого следовал вывод о том, что в процессе дифференцировки B-лимфоцита из зародышевой клетки происходит «вырезание» протяжённого участка генетического материала, обеспечивающее сближение V_L- и C_L-областей с образованием полного гена L-цепи иммуноглобулина. Этот процесс перестройки в геноме получил название соматической рекомбинации, так как он связан с созреванием лимфоцитов и не передаётся по наследству.

Описано 3 разных семейства генных фрагментов, или сегментов, кодирующих строение L- и H-цепей Ig. Два семейства ответственны за синтез лёгких цепей: сегменты, кодирующие строение L-цепей типа λ, расположены в хромосоме 22, генетический материал L-цепей типа κ (каппа) – в хромосоме 2, а информация о всём разнообразии H-цепей локализована в хромосоме 14.

Полные гены L-цепей λ и κ типов в ходе дифференцировки собираются из 3 сегментов: вариабельного (V_L), соединительного (J_L) и константного (C_L). Так, для L-цепей κ типа обнаружено около 300 сегментов, кодирующих N-концевой вариабельный (Vκ) участок полипептидной цепи длиной в 95 аминокислотных остатков, 5 сегментов, в которых содержится информация об остальных 13 аминокислотах Vκ области, и 1 сегмент константной области. В зародышевых клетках 300 сегментов Vκ расположены в хромосоме последовательно на расстоянии 7 килобаз друг от друга. Каждый V-сегмент состоит из 2 экзонов, разделённых коротким интроном: лидирующий экзон (L) кодирует сигнальный пептид (20–25 аминокислотных остатков), а экзон Vκ — основную часть вариабельного домена. Семейство Vκ-сегментов отделено от группы соединительных сегментов (Jκ) участком ДНК размером в 20 килобаз. Между последним из Jκ-сегментов и Cκ-экзоном, кодирующим домен константной области, расположен интрон размером в 2,4 килобазы (рис. 4-49).

В ходе дифференцировки B-клеток один из вариабельных V_L-сегментов путём соматической рекомбинации переносится из отдалённого участка в участок той же хромосомы, рядом с одним из сегментов J_L. Например, сегмент V_2 объединяется с соединительным мини-сегментом J_4, и формируется полный ген L-цепи. Он состоит из 3 экзонов и 2 интронов, расположенных в гене в следующем порядке: 5′L-I_1-V_2-J_4-J_5-I_2-C-3′, где L — лидерная последовательность, кодирующая сигнальный пептид, I_1 — интрон V_2-сегмента, а I_2 — интрон между семейством J_L-сегментов и Cκ-экзоном. После транскрипции гена в ходе сплайсинга из первичного транскрипта удаляются интроны I_1, I_2 и лишний сегмент J_5, а все кодирующие последовательности соединяются в единую информационную молекулу зрелой мРНК. В процессе синтеза L-цепи на рибосоме лидерный участок, состоящий в основном из гидрофобных аминокислот, обеспечивает прохождение белка через мембрану ЭР и затем отщепляется. Образуется L-цепь, имеющая аминокислотный состав, характерный для L-цепи κ-типа в молекуле Ig.

Расчёты показывают, что из имеющихся сегментов κ-гена в организме можно синтезировать 4500 полных генов, кодирующих L-цепи κ-типа.

Формирование полных генов L-цепей λ-типа происходит так же, как L-цепей κ-типа.

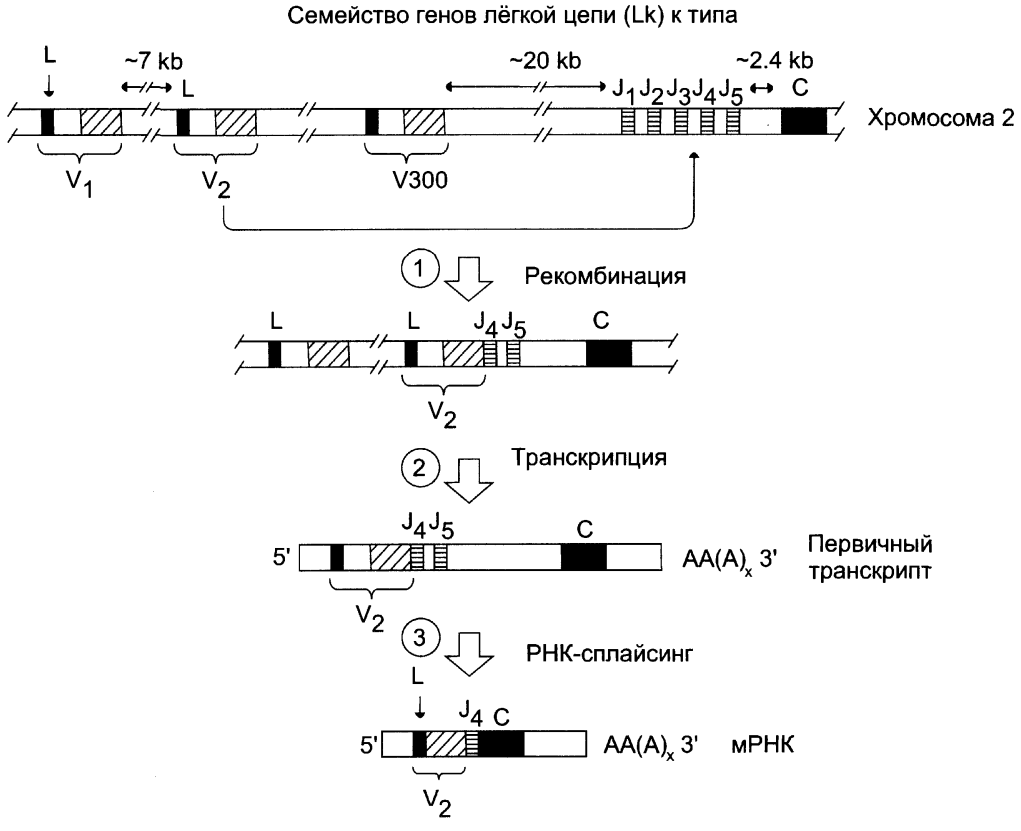


Рис. 4-49. Образование гена лёгкой цепи κ (каппа) типа и его транскрипция. 1 — V-сегменты L-цепей состоят из двух экзонов и разделяющего их интрона. Экзоны кодируют сигнальный пептид (L) и почти весь вариабельный домен V. В ходе соматической рекомбинации сегмент гена вариабельной части L-цепи (V_2) объединяется с одним из соединительных сегментов (J_4); 2 — транскрибируется полный ген L-цепи, состоящий из трёх экзонов и двух интронов, расположенных в следующем порядке: 5'L -I_1-, V_2J_4-J_5-I_2-C-3'; 3 — в ходе сплайсинга первичного транскрипта гена интрон I_1 сегмента V_2, J_5 сегмент и интрон I_2, отделяющий V_2J_4 от С-области, удаляются.

Ещё большее разнообразие вариантов возникает при сборке полных генов тяжёлых (Н) цепей Ig. Н-цепи кодируются четырьмя сегментами: V_H, D_H (от англ. *diversity*) сегментами разнообразия, J_H и C_H. У человека обнаружено около 500 V_H, 15 D_H и 4 J_H сегментов.

Каждый V_H сегмент содержит информацию об аминокислотной последовательности сигнального пептида и около 100 аминокислот V_H домена. В сегменте D_H закодирован участок полипептидной цепи, содержащий от 2 до 13 аминокислот, а в сегменте J_H — 4–6 аминокислот. Полный ген вариабельного домена образуется путём соединения V_H, D_H и J_H сегментов.

При формировании полного гена вариабельной части Н-цепи Ig, состоящей из V_H, D и J_H сегментов, происходит 2 рекомбинационные состыковки: на первом этапе удаляется участок между выбранными D_x и J_y кодирующими последовательностями, а на втором — между V_i и D_xJ_y сегментами. Экзонов, кодирующих константную область Н-цепей, описано 10: Cμ, Cσ, $C\gamma_3$, $C\gamma_1$, $C\alpha_1$, $C\gamma_2\alpha$, $C\gamma_2\beta$, $C\gamma_4$, Cε и $C\alpha_2$, они определяют классы и подклассы иммуноглобулинов — IgM, IgG, IgA и т.д.

Первыми в иммунном ответе появляются IgM, поскольку к полному гену вариабельного домена ближе всех остальных С-экзонов находится Cμ сегмент Н-цепи. Активированные В-клетки могут синтезировать мембранно-связанную и секретируемую формы IgM. Кроме того, они могут переключаться с синтеза IgM на образование антител других классов. Перед каждым C_H экзоном имеется участок ДНК, называемый **«участок переключения»**, или **«свич-сайт»** (от англ. *swich site*), построенный из повторя-

ющихся нуклеотидных последовательностей. Эти участки облегчают протекание дополнительной рекомбинации, в ходе которой удаляются С-сегменты между полным геном вариабельной области и С-сегментом того класса, который должен быть включён.

Исследование нуклеотидных последовательностей генов некоторых подклассов L-цепей κ-типа и Н-цепей показало, что разнообразие структуры сегментов, закодированных в зародышевой клетке, увеличивают **соматические мутации**. Мутации происходят в дифференцированных клетках на участках V_L-J_L и $V_HD_HJ_H$ сегментов в процессе или после рекомбинаций, делая, таким образом, количество антител практически неограниченным. Очень важно, что мутации происходят в областях, ответственных за узнавание антигенов, обеспечивая более полное соответствие активного центра антитела антигену.

Таким образом, перестройки генетического материала в процессе формирования полных генов Ig происходят в несколько этапов, каждый из которых приурочен к строго определённой стадии дифференцировки В-лимфоцитов. Из сегментов, которые кодируют различные участки полипептидной цепи, входящей в вариабельные домены, и одного из экзонов константного домена собираются полные гены тяжёлых и лёгких нитей Ig. Сборка L-цепей включает одну соматическую рекомбинацию, а сборка Н-цепей происходит с помощью двух соматических рекомбинаций. Когда В-лимфоциты синтезируют Ig не класса М, то это сопровождается ещё одним дополнительным рекомбинационным событием. Соматические мутации, происходящие в зрелых В-лимфоцитах, делают многообразие антител неисчерпаемым.

Аналогичные процессы наблюдают и в ходе дифференцировки Т-лимфоцитов.

4. Регуляция транскрипции

Регуляция транскрипции генов высших организмов сходна с регуляцией экспрессии генов прокариотов. Основное различие состоит в значительно большем количестве участков ДНК и регуляторных факторов, контролирующих этот процесс.

У животных и человека различные гены экспрессируются в разные моменты времени и с разной интенсивностью. Здесь, так же, как у прокариотов, есть гены «домашнего хозяйства», транскрибирующиеся конститутивно, т.е. постоянно и во всех тканях. Это гены гликолиза, синтеза РНК и некоторых белков (например, альбумина). Существуют гены, транскрибирующиеся только в специализированных клетках, т.е. имеет место тканеспецифическая экспрессия. Например, экспрессия генов α- и β-цепей глобина происходит только в клетках-предшественниках эритроцитов. Многие гены подвергаются адаптивной регуляции и являются объектами индуцибельных воздействий или негативного контроля.

Ранее уже говорилось о том, что минимальный синтез любого белка поддерживается в том случае, если к ТАТА-участку промотора присоединяется ТАТА-связывающий белок, факторы транскрипции и РНК-полимераза, образующие инициирующий комплекс, осуществляющий синтез небольшого количества мРНК. Формирование комплекса — многоступенчатый процесс, от образования которого зависит скорость инициации транскрипции. Идентифицировано более 100 различных белков, способных взаимодействовать со специфическими регуляторными последовательностями ДНК, влияя главным образом на процесс сборки транскрипционного комплекса и скорость транскрипции (рис. 4-50).

Эти белки имеют один или несколько доменов, обеспечивающих выполнение регуляторных функций.

ДНК-связывающие домены, ответственные за узнавание и связывание регуляторных факторов со специфическими участками на молекуле ДНК;

Домены, активирующие транскрипцию за счёт связывания с белками основного инициаторного комплекса: транскрипционными факторами, коактиваторами и РНК-полимеразой;

Антирепрессорные домены, благодаря которым белки способны взаимодействовать с гистонами нуклеосом и освобождать транскрибируемые участки ДНК от связи с этими ингибиторными структурами;

Домены, связывающие лиганды, присоединение которых к белку изменяет его конформацию и обеспечивает связывание с молекулой ДНК. Лиганды-индукторы транскрипции — стероидные гормоны, ретиноевая кислота, кальцитриол (производное витамина D_3) и гор-

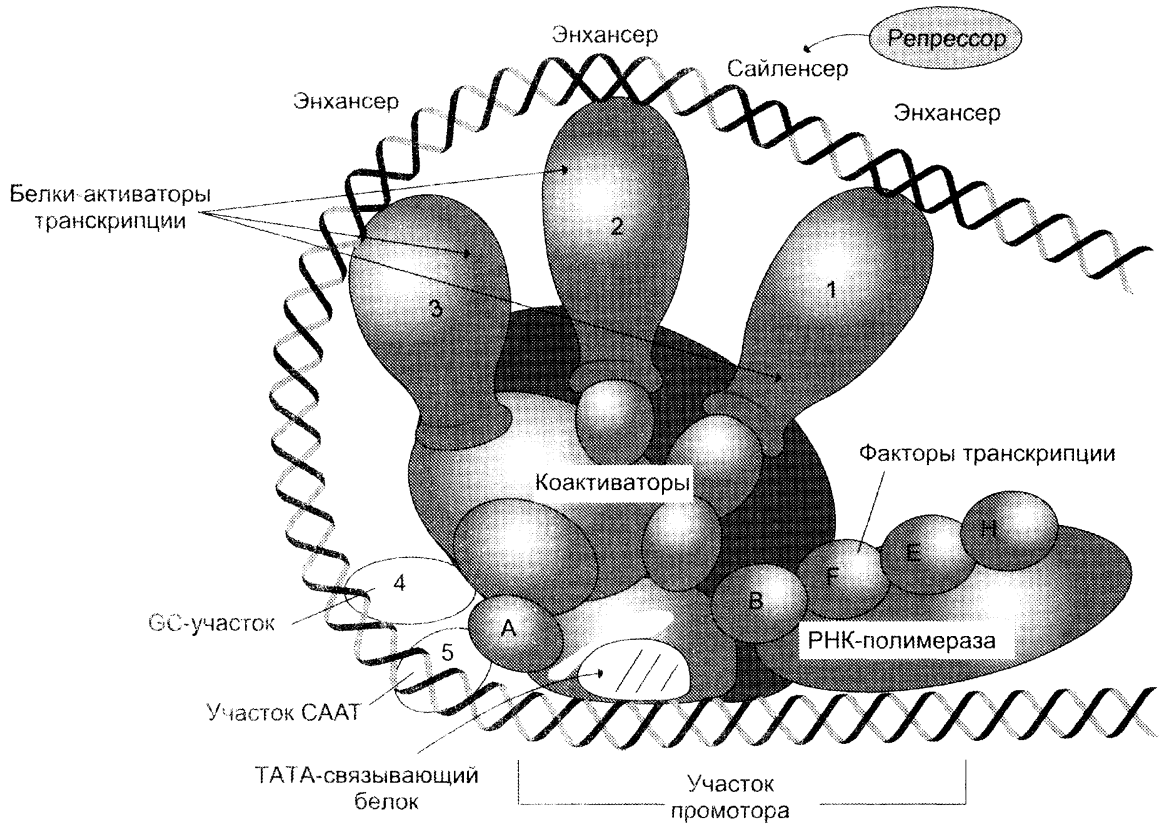


Рис. 4-50. Адаптивная регуляция транскрипции у эукариотов. Промоторы эукариотических генов находятся под контролем большого числа регуляторных участков на молекуле ДНК: ТАТА-, СААТ-, GC-последовательностей, энхансеров, сайленсеров–последовательностей, к которым присоединяются комплексы белков с различными лигандами (цАМФ, стероидными гормонами, метаболитами, ионами металлов и т.д.).

моны щитовидной железы. Лигандами-репрессорами могут быть конечные продукты метаболических путей, некоторые гормоны. Будучи липофильными молекулами, они проходят плазматическую, а иногда и ядерную мембраны, взаимодействуют с внутриклеточными рецепторами, присоединяясь к лиганд-связывающему участку (рис. 4-51).

Присоединение лиганда к рецептору образует ДНК-связывающий участок, узнающий специфическую последовательность в регуляторной зоне ДНК и индуцирующий транскрипцию определённых генов.

На молекуле ДНК на расстоянии 100—200 пар оснований от стартовой точки транскрипции имеются короткие специфические последовательности ДНК: СААТ — элемент (или бокс), CG-бокс и октамерный бокс (включающий 8 пар оснований), узнающие транскрипционные факторы. Эти элементы есть во всех клетках, и конститутивно экспрессируемые гены нуждаются только в них. В то же время для генов, подвергающихся адаптивной регуляции, обнаружены участки молекулы ДНК, которые удалены (до 1000 и более пар оснований) от промотора, но тоже участвующие в регуляции транскрипции. Эти нуклеотидные последовательности бывают 2 типов.

Энхансеры — участки ДНК размером 10—20 пар оснований, присоединение к которым регуляторных белков увеличивает скорость транскрипции. Если участки ДНК, связываясь с белками, обеспечивают замедление транскрипции, то их называют сайленсерами.

Эти структурные элементы молекулы ДНК контролируют транскрипцию, даже если они:

- ориентированы на молекуле ДНК в любом направлении (от 5′- к 3′-концу или наоборот);

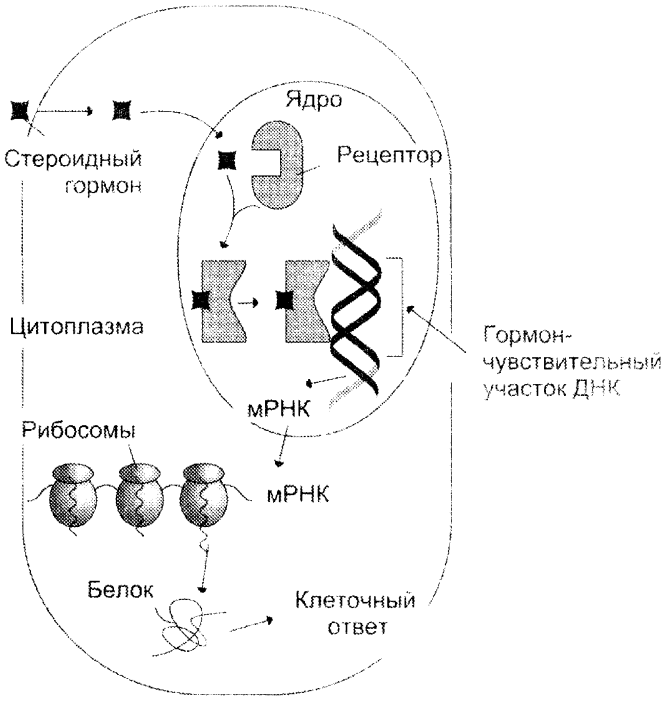


Рис. 4-51. Действие лиганда-индуктора транскрипции на клетку млекопитающих. Лиганд-индуктор, например стероидный гормон, связывается с внутриклеточным рецептором, находящимся в ядре или цитоплазме, и поступает в ядро. Комплекс гормон-рецептор присоединяется к определённому участку на молекуле ДНК и активирует транскрипцию гена. Образуется мРНК — матрица для синтеза белка, обеспечивающего определённый клеточный ответ.

- связываются с одним или несколькими регуляторными белками;
- располагаются перед или после гена, экспрессию которого они регулируют.

Элементы ответа, или cis-элементы — регуляторные последовательности ДНК, общие для группы генов. Они обеспечивают координированную регуляцию транскрипции генов и, как правило, располагаются на расстоянии примерно в 250 пар оснований выше промотора каждого гена. В остальном эти нуклеотидные последовательности имеют много общего с энхансерами. В данном варианте регуляции один и тот же индуктор, связываясь с соответствующим регуляторным белком, может активировать много разных генов, так как каждый из них в регуляторной области содержит один и тот же cis-элемент. Один из белков-продуктов этой группы генов может оказаться индуктором другой группы генов. Конечный результат регуляции — серия ответных реакций за счёт активации различных генов одним индуктором (рис. 4-52).

К генам, регулируемым cis-элементами, относят гены, чувствительные к стероидным гормонам, гены белков теплового шока и многие другие. Например, при повышении температуры или после какого-либо другого клеточного стресса активируется синтез транскрипционного фактора, который индуцирует транскрипцию генов, кодирующих строение шаперонов.

Очевидно, что эффективность регуляции во многом зависит от структуры транскрипционных факторов и внутриклеточных рецепторов, непосредственно взаимодействующих с молекулой ДНК. Установлено, что большинство ДНК-связывающих белков принадлежит к трём семействам в зависимости от структуры домена, непосредственно взаимодействующего с двойной спиралью ДНК. Эти белки включают структуры типа «спираль-поворот-спираль», «цинковые пальцы» и «лейциновой молнии» (см. раздел 1). Как правило, эти структуры — небольшие фрагменты молекул белков, а сайт-специфическое связывание происходит за счёт взаимодействия между радикалами аминокис-

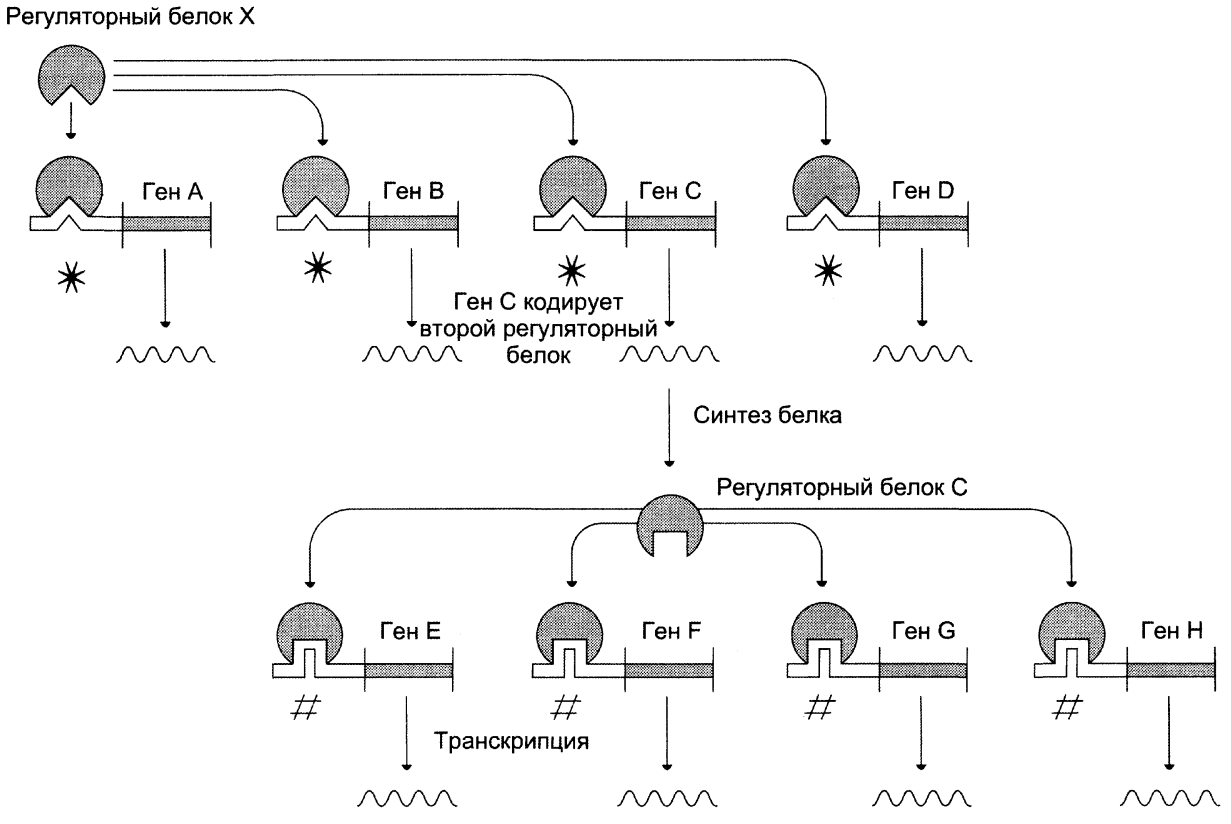


Рис. 4-52. Активация группы генов с помощью одного индуктора. Группа генов имеет общий регуляторный *cis*-элемент и активируется одним и тем же регуляторным белком. Один из белковых продуктов первой серии ответных реакций активирует вторую серию генов (⋆ — cis-элементы к белку X; # — cis-элементы к белку C).

лот этих участков и азотистыми основаниями молекулы ДНК.

5. Посттранскрипционная регуляция

В организме животных существенное значение в обеспечении разнообразия белков играет посттранскрипционный процессинг РНК. Основные способы такой регуляции — альтернативный сплайсинг и изменение стабильности РНК.

Альтернативный сплайсинг. Установлено, что многие эукариотические гены, будучи транскрибированы, образуют несколько вариантов зрелой мРНК в ходе процессинга (или созревания) первичного транскрипта, имеющего полиэкзонное строение.

Возможные варианты сплайсинга РНК представлены на рис. 4-53.

Наиболее часто промотор сохраняется на одном из концов транскрипта, а в ходе сплайсинга происходит «вырезание» одного или нескольких экзонов. В других случаях в зрелой мРНК сохраняется часть интрона и включается в состав экзона с 5′ или 3′-конца. Сплайсинг может влиять на выбор промотора или участка полиаденилирования.

С помощью альтернативного сплайсинга в процессе синтеза антител образуются мембраносвязанные и секреторные формы антител (рис. 4-54). Так, первоначально В-лимфоциты продуцируют транскрипты, полиаденилированные после второго стоп-кодона, а интрон, в котором имеется первый стоп-кодон, удаляется. В результате синтезируются IgM, связанные с клеточной мембраной, так как мРНК таких клеток содержит на 3′-конце экзон, кодирующий участок полипептидной цепи, состоящий из гидрофобных аминокислот. С помощью этого участка происходит «заякоривание» IgM в мембране. Когда В-лимфоциты превращаются в плазматические клетки, то в

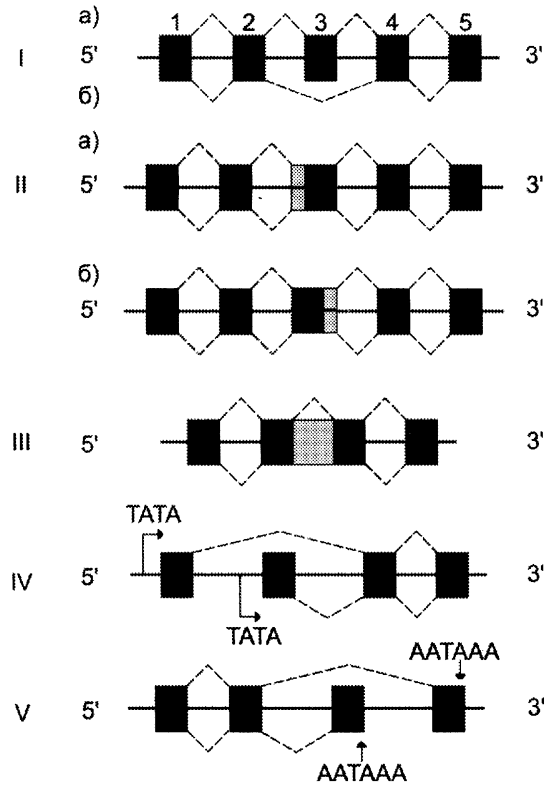


Рис. 4-53. Часто встречающиеся варианты сплайсинга первичных транскриптов РНК. I. Вырезание одного из экзонов: а) синтез белка, содержащего полный набор экзонов (1–5); б) синтез белка, лишённого одного экзона (1, 2, 4, 5); II. Сохранение участка интрона: а) с 5'-конца; б) с 3'-конца. III. Сохранение целого интрона. IV. Использование альтернативных промоторов (либо перед экзоном 1, либо перед экзоном 2). V. Использование альтернативных участков полиаденилирования (например, при последовательном сшивании экзонов после экзона 3, а если экзон 3 не прочитывается, то после экзона 4).

результате альтернативного сплайсинга образуется мРНК, в которой сохраняется интрон, содержащий первый стоп-кодон. Поэтому происходит более раннее полиаденилирование и исчезает экзон, кодирующий гидрофобный участок молекулы. Синтезируются укороченные молекулы антител, секретируемые в кровь.

«Редактирование» РНК. Описан ряд случаев, когда первичная структура мРНК изменяется («редактируется») после транскрипции. Последовательность нуклеотидов в таких генах одинакова, а транскрибируемая в разных тканях мРНК различается в результате появления в молекуле замен, вставок или выпадений нуклеотидов. Пример «редактирования» РНК — образование апопротеина В (апо-В) в клетках печени и тонкого кишечника (рис. 4-55). Апо-В — основной компонент липопротеинов, участвующих в транспорте триацилглицеринов из этих тканей в кровь. Хотя апопротеин В кодируется одним и тем же геном, вариант белка, образующийся в печени, называют апо-В-100, и он содержит 4563 аминокислотных остатка, тогда как белок, синтезированный в клетках кишечника, состоит из 2152 аминокислот. В гене, кодирующем этот белок, последовательность нуклеотидов в триплете 2153 — CAA и шифрует включение в полипептидную цепь остатка глутамина. В клетках кишечника в первичном транскрипте гена азотистое основание — цитозин (C) кодона 2153 дезаминируется и превращается в урацил (U). Возникает стоп-кодон — UAA, прекращающий трансляцию мРНК в середине молекулы и приводящий к синтезу укороченного белка. В результате образуется белок (В-48), длина которого составляет 48% от длины белка синтезируемого печенью.

Изменение стабильности мРНК. Для того, чтобы участвовать в синтезе белка, мРНК должна выйти из ядра в цитоплазму через ядерные поры. Установлено, что в ядре клеток обычно синтезируется больший набор гетерогенных РНК, чем тот, что выходит в цитоплазму. Многие продукты транскрипции подвергаются расщеплению нуклеазами, а те мРНК, что, транспортируются из ядра в цитоплазму, защищаются от гидролитического разрушения, образуя комплексы с белками.

Время жизни эукариотических мРНК значительно больше ($t_{1/2}$ составляет от нескольких часов до нескольких дней), чем $t_{1/2}$ мРНК прокариотов, равное нескольким минутам. Очевидно, что стабильность молекул мРНК — фактор, изменение которого влияет на уровень трансляции. Стабилизация мРНК при фиксированной скорости транскрипции приводит к накоплению и увеличению количества образующегося белкового продукта.

Продолжительность жизни разных мРНК варьирует в достаточно широких пределах. Некоторые гены кодируют продукт с большой продолжительностью жизни. Так, в ходе транскрипции гена β-глобина образуется мРНК с $t_{1/2}$, равной примерно 10 ч. Другие гены образуют мРНК с короткой продолжительностью жизни: мРНК, на которых синтезируются факторы ро-

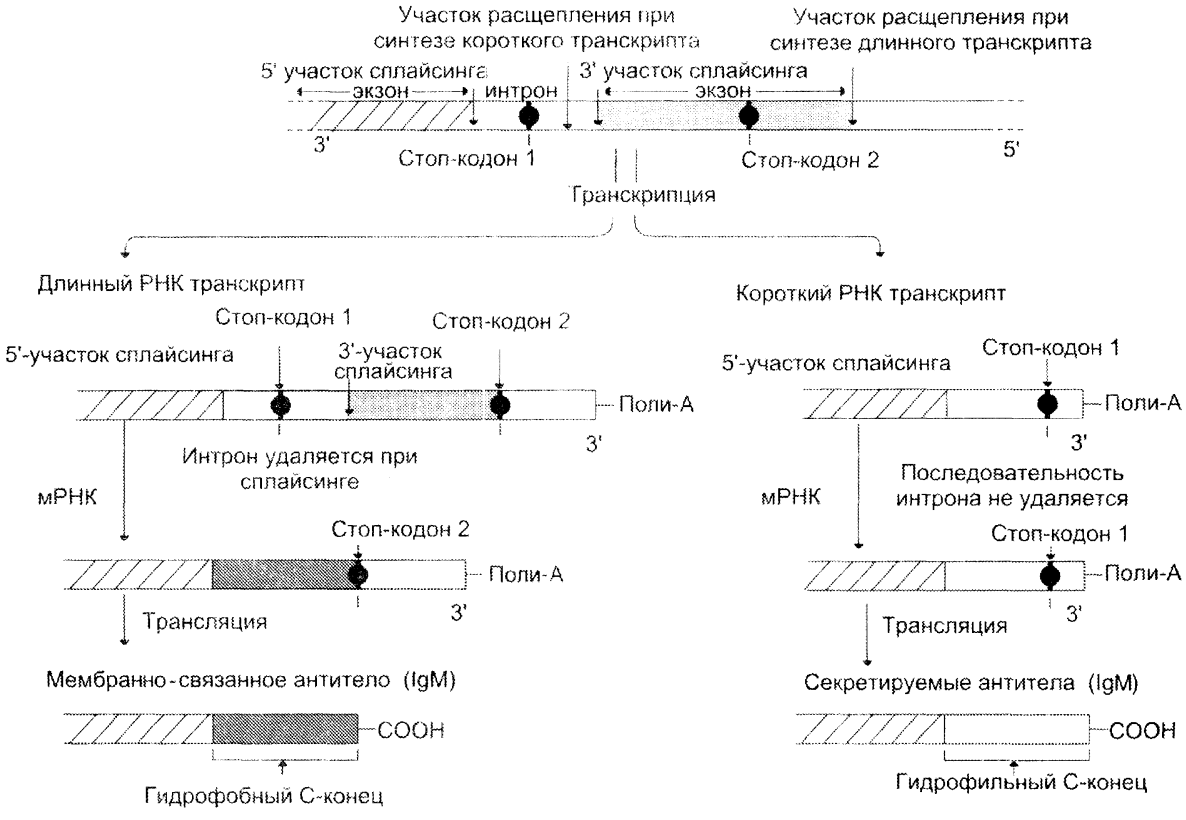


Рис. 4-54. Использование механизмов альтернативного сплайсинга и полиаденилирования в ходе синтеза мембранно-связанных и секреторных Ig. Если транскрипт подвергается полиаденилированию после второго стоп-кодона, присутствующего в экзоне гена IgM, то синтезируются белки, у которых на С-конце присутствует гидрофобный домен, обеспечивающий связывание с плазматической мембраной. При стимуляции В-лимфоцитов в клетках осуществляется альтернативный сплайсинг первичного транскрипта, при котором интрон, содержащий первый стоп-кодон, сохраняется. Образуются более короткие мРНК, полиаденилирование которых происходит после первого стоп-кодона.

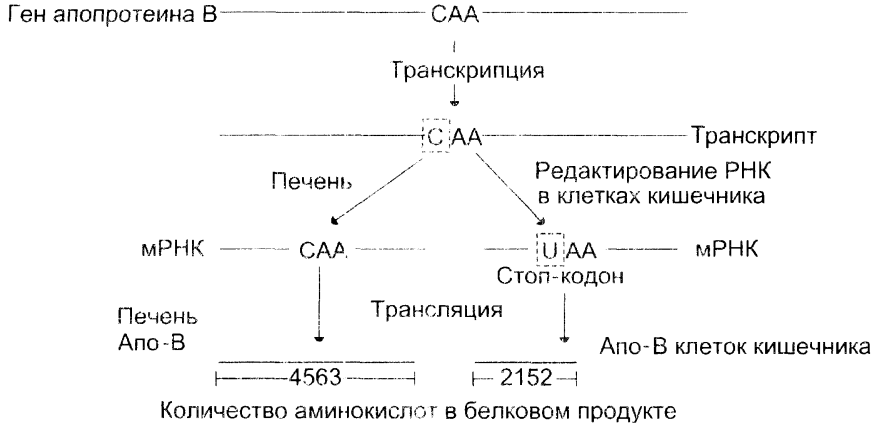


Рис. 4-55. «Редактирование» мРНК апопротеина В. В ходе транскрипции гена апопротеина В в печени образуется мРНК, служащая матрицей для синтеза белка, состоящего из 4563 аминокислотных остатков. В клетках тонкого кишечника экспрессия того же гена вызывает образование белка, состоящего из 2152 аминокислот. В РНК транскрипте цитозин кодона 2153 — CAA превращается в урацил (U), и возникает стоп-кодон в середине молекулы мРНК. Это приводит к синтезу укороченного белка.

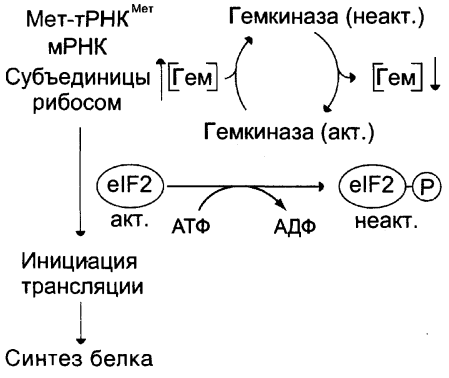


Рисунок 4-56. Зависимость скорости синтеза глобина от концентрации гема. Когда внутриклеточный уровень гема высок, фактор инициации eIF2 не фосфорилирован и активен, происходит синтез глобина. Если содержание гема в клетке снижается, фактор инициации фосфорилируется, инактивируется и синтез белка прекращается.

ста, имеют $t_{1/2}$ менее 1 ч. Показано, что поли(А)-фрагмент на 3′-конце мРНК увеличивает продолжительность жизни молекул. Чем длиннее поли(А)-фрагмент, тем больше время жизни мРНК.

Описано много примеров регуляции количества синтезирующихся белков за счёт изменения продолжительности функционирования мРНК. Так, стабильность мРНК-матриц для синтеза молекул гистонов сильно зависит от фазы клеточного цикла. В S-фазе гистоны постоянно синтезируются и используются для укладки вновь образованной ДНК в нуклеосомы. Гистоновая мРНК в этот период стабильна в течение нескольких часов. После S-периода, когда ДНК уже не синтезируется, в клетках образуется небольшое количество гистонов, так как они не требуются для формирования нуклеосом. В этот период $t_{1/2}$ для гистоновой мРНК составляет 10—15 мин.

6. Регуляция трансляции и посттрансляционных модификаций

Изменение скорости трансляции

Хотя изменение скорости образования белков на уровне трансляции не относят к числу основных способов регуляции количества и разнообразия белков, некоторые случаи такой регуляции известны. Наиболее изученный пример — синтез белков в ретикулоцитах. Известно, что на этом уровне дифференцировки кроветворные клетки лишены ядра, а следовательно, и ДНК. Регуляция синтеза белка-глобина осуществляется только на уровне трансляции и зависит от содержания гема в клетке (рис. 4-56). Если внутриклеточная концентрация гема высока, то глобин синтезируется; когда содержание гема снижается, то ингибируется и образование глобина. Остановка синтеза белка осуществляется за счёт фосфорилирования фактора инициации eIF2, который в фосфорилированной форме неактивен. Гем предотвращает фосфорилирование eIF2, связываясь со специфической протеинкиназой, которая получила название гемкиназы.

Некоторые мРНК содержат элементы вторичной структуры на 5′- или 3′-концах нетранслируемого участка мРНК, к которым могут присоединяться белки и ингибировать трансляцию. Например, синтез ферритина — белка, обеспечивающего хранение ионов железа в клетке, усиливается при повышении внутриклеточной концентрации железа (см. раздел 14). Обнаружено, что мРНК ферритина на 5′-конце имеет петли, к которым при низкой концентрации железа присоединяется регуляторный белок. Когда этот белок связан с мРНК, то трансляция не идёт. Если концентрация ионов железа в клетке повышается, то Fe^{3+} взаимодействует с белком, изменяет его конформацию и сродство к мРНК. мРНК освобождается от регуляторного белка, и на ней начинается синтез ферритина.

Различия в продолжительности жизни молекул белка

После того как белки синтезированы, время их жизни регулируется протеазами. Разные белки имеют разные $t_{1/2}$: от нескольких часов до нескольких месяцев, а иногда и лет (табл. 4-6). В каждой клетке скорость расщепления белков варьирует в широких пределах. Ферменты, катализирующие регуляторные реакции метаболических путей, как правило, подвергаются быстрому расщеплению, поэтому скорость обновления этих молекул достаточно высока. Физиологическое состояние организма также влияет на продолжительность жизни белков. Кроме того, существует мощная система защиты, обеспечивающая быстрое расщепление дефектных белков.

Некоторые белки расщепляются лизосомными ферментами. В процессе аутофагии содержимое клетки, включая органеллы, окружается мембраной, сливается с лизосомой другой клетки и подвергается действию лизосомных фер-

ментов. В результате гидролиза образующиеся мономеры поступают в цитоплазму для повторного использования.

Таблица 4-6. Период полураспада некоторых белков в клетках млекопитающих

Фермент	$T_{1/2}$, ч
Орнитиндекарбоксилаза	0,5
Тирозинаминотрансфераза	2,0
Карбоксикиназа фосфоенолпирувата	5,0
Аргиназа	96
Альдолаза	118
Лактатдегидрогеназа	144
Цитохром С	150

Для других белков показано расщепление в цитоплазме протеазами. Так, подлежащие разрушению белки первоначально отмечаются клеткой путём присоединения белка под названием **убиквитин**. Этот небольшой белок, состоящий из 76 аминокислотных остатков, обнаружен у многих организмов.

VIII. МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ. ПОЛИМОРФИЗМ БЕЛКОВ. НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ

Точная работа всех матричных биосинтезов — репликации, транскрипции и трансляции — обеспечивает копирование генома и воспроизведение фенотипических характеристик организма в поколениях, т.е. наследственности. Однако биологическая эволюция и естественный отбор возможны только при наличии генетической изменчивости. Установлено, что геном постоянно претерпевает разнообразные изменения. Несмотря на эффективность механизмов коррекции и репарации ДНК, часть повреждений или ошибок в ДНК остаётся. Изменения в последовательности пуриновых или пиримидиновых оснований в гене, не исправленные ферментами репарации, получили название «**мутации**». Одни из них остаются в соматических клетках, в которых они возникли, а другие обнаруживаются в половых клетках, передаются по наследству и могут проявляться в фенотипе потомства как наследственная болезнь.

Существенный вклад в генетическую изменчивость вносят перестройки хромосом в процессе мейоза. Как уже указывалось ранее, слияние яйцеклетки со сперматозоидом у эукариотов сопровождается генетическими рекомбинациями, в ходе которых происходит обмен участками ДНК между гомологичными хромосомами. Это приводит к появлению потомства с новой комбинацией генов.

Ген или части генов могут перемещаться из одного места хромосомы в другие. Эти подвижные элементы или фрагменты ДНК получили название транспозонов и ретротранспозонов.

Транспозоны — участки ДНК, удаляемые из одного локуса хромосомы и встраиваемые в другой локус той же или другой хромосомы. **Ретротранспозоны** не покидают исходного положения в молекуле ДНК, но могут копироваться, и копии встраиваются, подобно транспозонам, в новый участок. Включаясь в гены или участки около генов, они могут вызывать мутации и изменять их экспрессию.

Геном эукариотов подвергается изменениям и при заражении ДНК- или РНК-содержащими вирусами, которые внедряют свой генетический материал в ДНК клеток хозяина.

А. Мутагенез

Изменения в геноме могут быть разнообразны и затрагивать различные по протяжённости участки ДНК от хромосом и генов до отдельных нуклеотидов (табл. 4-7).

Наиболее драматичны геномные и хромосомные мутации, часто наблюдаемые на уровне соматических клеток. Если они имеют место в половых клетках, то для организма это имеет чаще всего летальные последствия. Частота мутаций в половых клетках высока. Существуют данные, указывающие на то, что в 20% случаев при беременности у эмбрионов наблюдают нарушения структуры хромосом. В 90% случаев это приводит к ненормальному развитию плода и элиминированию зародышей в результате спонтанных абортов. Выкидыши, происходящие в течение первых нескольких недель беременности, связаны с серьёзными нарушениями хромосом. В 50% случаев отмечается трисомия по аутосомам, т.е. вместо

Таблица 4-7. Классификация мутаций

Тип мутаций	Характер мутационных изменений	Примеры последствий
Геномный	Изменение числа хромосом	Болезнь Дауна (появление дополнительной хромосомы 21)
Хромосомные	Общее число хромосом не меняется. Наблюдают перестройки хромосом, обычно видимые при микроскопическом исследовании.	Мышечная дистрофия Дюшенна (делеции Х-хромосомы)
Генные	Изменения затрагивают один кодон или небольшой отрезок гена и не обнаруживаются цитогенетически	Серповидно-клеточная анемия, вызванная заменой одного нуклеотида в гене β-цепи глобина

пары хромосом наблюдаются три. Пример такой патологии — болезнь Дауна, при которой хромосома 21 присутствует в 3 экземплярах.

Некоторые генные мутации закрепляются в популяции, становятся наследственными и определяют эволюционные процессы. С мутациями такого типа связано появление различных наследственных патологий, сопровождающихся прекращением синтеза белка, кодируемого повреждённым геном, либо синтезом изменённого белка.

Генные, или точечные, мутации бывают в основном 3 видов:

замены, при которых одно азотистое основание в ДНК замещается на другое;

вставки, обеспечивающие внедрение в молекулу ДНК одного или нескольких дополнительных нуклеотидов;

делеции (или выпадения) одного или нескольких нуклеотидов, при которых происходит укорочение молекулы ДНК.

1. Мутации по типу замены возникают в результате замены одного азотистого основания на другое, что вызывает изменение в одном из кодонов мутантного гена. Если кодирующий триплет, в котором находится изменённый нуклеотид, из-за вырожденности кода вызывает включение в белок той же аминокислоты, что исходный кодон (или кодон «дикого» типа), то такую мутацию называют «молчащей», и белковый продукт остаётся тем же.

	Триплет «дикого» типа	Изменённый триплет
Матрица ДНК	3′-GGT-5′	3′-GGA-5′
Кодон мРНК	5′-CCA-3′	5′-CCU-3′
Аминокислота	-Про-	-Про-

Когда замена одного основания приводит к замене аминокислоты в мутантном белке, то такую мутацию называют «**миссенс-мутация**». В ряде случаев, несмотря на произошедшую замену, белок сохраняет биологическую активность. Это, как правило, связано с тем, что изменённая аминокислота находится в участке белка, не имеющем функционального значения, и к тому же она по структуре и свойствам напоминает исходную аминокислоту. Такая мутация тоже будет «молчащей», а замена — эквивалентной.

	Триплет «дикого» типа	Изменённый триплет
Матрица ДНК	3′-TAA-5′	3′-GAA-5′
Кодон мРНК	5′-AUU-3′	5′-CUU-3′
Аминокислота	-Иле-	-Лей-

Иногда аминокислота, оказавшаяся заменённой, располагается в области, важной для проявления функциональной активности белка, и её замещение приводит к образованию функционально неактивного продукта. Так, точечная мутация в кодоне серина (Сер — важнейший структурный компонент активного центра сериновых протеаз: трипсина, химотрипсина и некоторых других ферментов) приводит к полной потере активности. Если подобный фермент участвует в реакциях главных метаболических путей, то такая «неэквивалентная» замена может стать летальной.

	Триплет «дикого» типа	Изменённый триплет
Матрица ДНК	3′-AGA-5′	3′-AAA-5′
Кодон мРНК	5′-UCU-3′	5′-UUU-3′
Аминокислота	-Сер-	-Фен-

В ряде случаев мутантный белок, несмотря на входящую в него изменённую аминокислоту, сохраняет способность выполнять свою функцию, но может быть не столь эффективным, как белок «дикого» типа. В результате мутации у фермента может оказаться более высоким значение K_m или более низким значение V_{max}, а иногда то и другое одновременно. Такие частично функционирующие белки называют мутантными белками с неполностью подавленной функцией.

Изредка в результате мутации белковый продукт гена оказывается лучше приспособленным к выполнению своей функции. Такие мутации дают потомству преимущества в борьбе за существование, а серия соответствующих мутаций может привести к появлению нового вида.

Наибольшим повреждающим действием обладают мутации, приводящие к образованию одного из терминирующих кодонов (**нонсенс-мутация**). В процессе синтеза белка работа рибосомы будет остановлена на мутантном триплете мРНК: UAA, UAG или UGA. Проявление нонсенс-мутаций зависит от их внутригенной локализации. Чем ближе мутация к 5′-концу гена, т.е. к началу транскрипции, тем короче её белковый продукт, а следовательно, тем меньше он способен к осуществлению биологической функции.

	Триплет «дикого» типа	**Изменённый триплет**
Матрица ДНК	3′-GTC-5′	3′-ATC-5′
Кодон мРНК	5′-CAG-3′	5′-UAG-3′
Аминокислота	-Глн-	Стоп-кодон

2. Мутации по типу вставки или делеции нуклеотидов

Более многочисленны и опасны для клеток мутации по типу вставки или делеции (утраты) нуклеотидов.

Если мутация приводит к вставке или делеции в ген одной нуклеотидной пары или участка двухцепочечной молекулы ДНК с числом мономеров, не кратным 3 , то это вызывает изменение считывания всех последующих кодонов, так как происходит сдвиг «рамки считывания» ДНК и нарушение соответствия между кодонами в ДНК и аминокислотами в конечном продукте — белке (рис. 4-57).

Как видно из рис. 4-57, нарушения в прочтении информации начинаются с участка, в котором произошла мутация, так как именно в этом месте происходит сдвиг «рамки считывания» информации. Белковый продукт за точкой мутации будет иметь случайную последовательность аминокислот. Мутации со сдвигом рамки считывания часто приводят к появлению внутреннего терминирующего кодона, вызывающего преждевременное прекращение синтеза полипептидной цепи и образование укороченного продукта, лишённого биологической активности.

Мутации со сдвигом «рамки считывания» индуцируют ингибиторы матричных синтезов — «интеркаляторы». Их большие плоские молекулы, похожие на обычные азотистые основания или пары оснований, встраиваются между двумя соседними парами оснований, в результате в ДНК «как бы» появляется лишнее основание. В ходе репликации такой изменённой цепи ДНК в дочернюю нить в результате ошибочного спаривания с «интеркалированной» молекулой может встроиться дополнительный нуклеотид.

Иногда, хотя и крайне редко, теряется или включается в ДНК олигодезоксинуклеотид, состоящий из 3 или кратного 3 числа нуклеотидов. Такие мутации называют делециями или вставками без сдвига «рамки считывания» ДНК. В образующемся белковом продукте в этом участке окажется пропущенной или, наоборот, включённой дополнительно одна или несколько аминокислот, тогда как вся остальная аминокислотная последовательность будет соответствовать исходной молекуле. Такие мутации, как правило, не приносят большого вреда.

Информация о разных типах мутаций и изменениях в структуре мутантных белков обобщены в табл. 4-8.

3. Частота мутаций

Считается, что средняя частота возникновения мутаций в структурных локусах (областях локализации гена в хромосоме или в молекуле ДНК) человека колеблется в пределах от 10^{-5} до 10^{-6} на одну гамету за каждое поколение. Однако эта величина может значительно варьировать для разных генов (от 10^{-4} для генов с высокой скоростью мутаций до 10^{-11} для наиболее устойчивых участков генома). Столь существенные колебания в частоте возникновения мутаций обуслов-

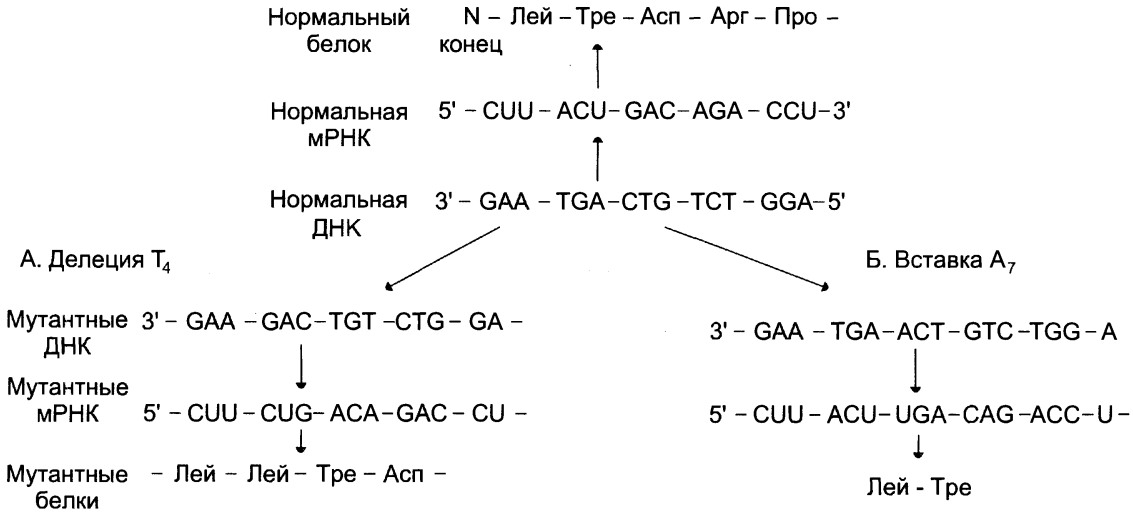


Рис. 4-57. Делеции (А) или вставки (Б) нуклеотидов вызывают мутации со сдвигом «рамки считывания».

Таблица 4-8. Основные виды генных мутаций

Виды мутаций	Изменения в структуре ДНК	Изменения в структуре белка
ЗАМЕНА		
Без изменения смысла кодона	Замена одного нуклеотида в кодоне	Белок не изменён
С изменением смысла кодона (миссенс-мутация)		Происходит замена одной аминокислоты на другую
С образованием терминирующего кодона (нонсенс-мутация)		Синтез пептидной цепи прерывается, и образуется укороченный продукт
ВСТАВКА		
Без сдвига «рамки считывания»	Вставка фрагмента ДНК из 3 нуклеотидов или с числом нуклеотидов, кратным 3	Происходит удлинение полипептидной цепи на одну или несколько аминокислот
Со сдвигом «рамки считывания»	Вставка одного или нескольких нуклеотидов, не кратных 3	Синтезируется пептид со «случайной» последовательностью аминокислот, так как изменяется смысл всех кодонов, следующих за местом мутации
ДЕЛЕЦИЯ		
Без сдвига «рамки считывания»	Выпадение фрагмента ДНК из 3 нуклеотидов или с числом нуклеотидов, кратным 3	Происходит укорочение белка на одну или несколько аминокислот
Со сдвигом «рамки считывания»	Выпадение одного или нескольких нуклеотидов, не кратных 3	Синтезируется пептид со «случайной» последовательностью аминокислот, так как изменяется смысл всех кодонов, следующих за местом мутации

лены характером мутационного повреждения, механизмом возникновения мутации, протяжённостью кодирующей области мутантного гена, функциями белка, закодированного в этом гене. Так, для гена гемоглобина скорость замещения одного основания другим лежит в интервале $\mu = 2{,}5\times10^{-9}$–5×10^{-9} замен в гамете за одно поколение. Чтобы представить себе, что означают эти цифры, распространим эту скорость мутаций на весь геном человека — 3×10^{9} пар оснований. Умножив размер генома на скорость μ, мы получим, что геном за одно поколение может получить от 7 до 15 мутаций, т.е. это значит, что каждая гамета содержит такое количество изменений в ДНК по сравнению с родительской ДНК. А поскольку у каждого индивидуума клетки диплоидны и получаются при слиянии 2 гамет, то мутаций тоже в 2 раза больше.

Спрашивается, каким же образом человечество справляется с такой мутационной нагрузкой? Отвечая на этот вопрос, следует помнить, что кодирующие части генов, изменения в которых наиболее опасны, занимают не более 10% генома. Ситуация облегчается ещё и тем, что далеко не каждая мутация в кодирующей области имеет фенотипическое проявление. Многие попадают в 3′-положение кодонов и, таким образом, являются «молчащими», так как благодаря вырожденности генетического кода они не приводят к аминокислотным заменам, другие оказываются в доменах, несущественных для функционирования белков. Потомству передаются мутации, происходящие в гаметах, а их процент совсем невелик.

Б. Организация генома человека

Геном эукариотических клеток (клеток человека в частности) содержит значительно больше ДНК, чем геном прокариотов. У кишечной палочки *E. coli* ДНК содержит $3{,}8\times10^{6}$ пар нуклеотидов или около 3000 генов. При этом вся ДНК выполняет определённые функции: кодирует белки, рРНК, тРНК или участвует в регуляции образования генных продуктов. Общая длина ДНК гаплоидного набора из 23 хромосом человека составляет $3{,}5\times10^{9}$ пар нуклеотидов, что в 1000 раз превосходит размер генома прокариотов. Этого количества ДНК достаточно для создания нескольких миллионов генов. Однако, согласно многим независимым подсчётам, истинное число структурных генов находится в области 100 000, а по данным Международного консорциума и фирмы «Целера Геномикс», полученным при секвенировании генома человека и опубликованным в 2001 г., число белок-кодирующих генов, по оценкам первой организации, составляет 31780, а по оценкам второй — 39 114 генов. Последовательность нуклеотидов в ДНК человека имеет области, кодирующие белки (не более 2% общего генома), области, кодирующие РНК (около 20% генома), и повторяющиеся последовательности (более 50% общего генома).

Функции «избыточной» ДНК до конца не ясны, полагают, что она участвует в регуляции экспрессии генов, процессинга РНК, выполняет структурные функции, повышает точность гомологичного спаривания и рекомбинации хромосом в процессе мейоза, способствует успешной репликации. Большая часть этой ДНК возникла в результате обратной транскрипции РНК и благодаря наличию подвижных элементов.

Часто повторяющиеся последовательности ДНК

Во фракции «избыточной» ДНК выделяют относительно короткие последовательности длиной от 2 до 10 пар нуклеотидов, повторяющиеся миллионы раз. Эти часто повторяющиеся последовательности получили название «сателлитной ДНК». Они составляют около 10% всего генома человека, рассеяны по всему генетическому материалу клетки, но преимущественно локализуются в центромерных и теломерных областях большинства хромосом.

Умеренно повторяющиеся последовательности ДНК

Выделяют также группу умеренно повторяющихся последовательностей ДНК, очень гетерогенную по длине и числу копий, составляющую более 30% генома человека. Эта фракция включает ДНК, кодирующую структуру рРНК, тРНК и некоторых мРНК. Гены гистонов присутствуют в геноме в количестве нескольких сотен копий и также принадлежат к этому классу. Умеренно повторяющиеся последовательности ДНК включают участки, которые не транскрибируются, но важны в регуляции экспрессии генов: промоторы и энхансеры. В этой группе

были обнаружены последовательности ДНК длиной примерно в 300 пар нуклеотидов, которые повторяются около миллиона раз (в среднем через каждые 5000 пар нуклеотидов) и рассеяны по всему геному человека.

Частые представители умеренно повторяющихся последовательностей — line-семейство (от англ. *long interspersed elements*), или семейство длинных рассеянных элементов, в которое входят ДНК последовательности длиной от 5000–8000 пар нуклеотидов, встречаются в геноме в количестве 850 000 копий.

Уникальные последовательности ДНК

Они представлены ДНК-последовательностями, которые присутствуют в геноме в количестве одной или нескольких копий, и транскрибируются, образуя мРНК, содержащие информацию о различных белках (рис. 4-58).

Типичный ген человека состоит примерно из 28 000 нуклеотидов и содержит в среднем 8 экзонов, его кодирующая последовательность составляет около 1340 пар нуклеотидов и шифрует белок, включающий 447 аминокислотных остатков. Самый крупный ген — ген мышечного белка дистрофина, состоящий из $2{,}4\times10^6$ пар нуклеотидов, а наибольшее количество экзонов (234) присутствует в гене фибриллярного белка титина, ответственного за пассивную эластичность скелетных мышц.

Нередко уникальные последовательности образуют **мультигенные семейства**, располагающиеся в виде кластеров в определённых областях одной или нескольких хромосом. Примерами мультигенных семейств могут служить гены рибосомальных, транспортных и малых ядерных РНК, гены α- и β-глобинов, тубулинов, миоглобина, актина, трансферина и многих других.

В мультигенных семействах наряду с функционально активными генами содержатся **псевдогены** — мутационно изменённые последовательности, не способные транскрибироваться или продуцирующие функционально неактивные генные продукты.

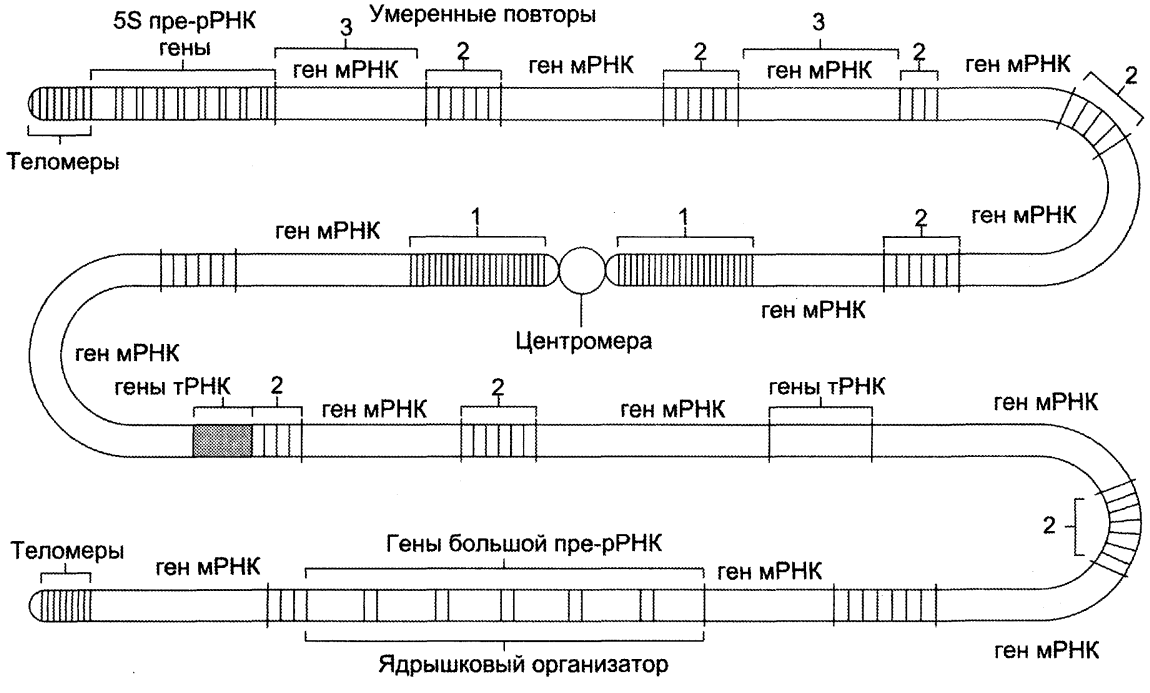


Рис. 4-58. Распределение уникальных, умеренно и часто повторяющихся последовательностей ДНК в гипотетической хромосоме человека. Уникальные последовательности (3) транскрибируются в виде мРНК. Эти гены встречаются в одной или нескольких копиях. Гены рРНК и тРНК представлены множеством копий, образующих кластеры в геноме. Гены большой пре-рРНК образуют ядрышковый организатор. Умеренно повторяющиеся последовательности (2) распределены по всему геному, а часто повторяющиеся последовательности (1) образуют кластеры в областях центромеры и концов хромосомы — теломеров.

Псевдогены — одна из важных структурных особенностей генома человека. Эти уникальные последовательности очень сходны по структуре с определёнными генами. В связи с тем, что в генных семействах наряду с псевдогенами сохраняются неизменённые гены, жизнеспособность организма не нарушается. Для многих генов обнаружены псевдогены. Их количество варьирует от одной до нескольких десятков копий на геном, и, как правило, они расположены тандемно. Иногда псевдогены и соответствующие им нормальные гены локализованы в разных хромосомах.

В. Полиморфизм белков

Поскольку большинство нормальных клеток человека диплоидны, то они содержат две копии каждой хромосомы, одна из которых получена от отца, а вторая от матери. Эти две копии одной и той же хромосомы называют гомологичными (рис. 4-59). В ДНК каждой хромосомы содержится более тысячи генов. Соответствующие друг другу гены в гомологичных хромосомах называют аллелями. Аллели могут быть идентичными и содержат одинаковую последовательность нуклеотидов. В этом случае индивидуум, имеющий такие аллели, будет **гомозиготен** по данному признаку. Если аллели различаются по последовательности нуклеотидов в ДНК, то говорят о гетерозиготном наследовании гена. В этом случае индивидуум будет иметь 2 белковых продукта гена, различающихся по аминокислотной последовательности.

У каждого человека существует только 2 разных аллеля одного гена, тогда как в популяции людей вариантов аллелей может быть огромное множество. Как уже говорилось ранее, изменчивость структуры ДНК, а следовательно разнообразие аллелей, обусловлено мутационным процессом и рекомбинациями в гомологичных хромосомах половых клеток. Если в ходе мейоза рекомбинации сопровождаются обменом участками ДНК, меньшими по размеру, чем ген, то такой процесс может приводить к появлению новых, прежде не существовавших аллелей. А поскольку рекомбинации — более частые события, чем мутации в кодирующих участках гена, то разнообразие вариантов аллелей обусловлено главным образом ими.

Существование в популяции 2 и большего числа аллелей одного гена называют «**аллеломорфизм**», или «**полиморфизм**», а белковые продукты, образующиеся в ходе экспрессии этих вариантов гена — «**полиморфы**». Разные аллели встречаются в популяции с разной частотой. К полиморфам относят только те варианты, распространённость которых в популяции не меньше 1%.

В процессе эволюции отдельные гены амплифицируют с образованием копий, а их структура и положение могут изменяться в результате мутаций и перемещений не только внутри хромосомы, но и между хромосомами. Со временем это приводит к появлению новых генов, кодирующих белки, родственные исходному, но отличающиеся от него определёнными свойствами и занимающие в хромосомах разные генные локусы (или места).

К родственным белкам относят **изобелки**, представляющие собой варианты белков, выполняющие одну и ту же функцию и обнаруживаемые в пределах одного вида организмов. Так, в группе из 2000 генов человека, кодирующих факторы транскрипции и транскрипционные активаторы, идентифицировано 900, относящихся к семейству белков, имеющих «цинковые пальцы». Существует 46 генов фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, осуществляющего единственную окислительную реакцию в метаболическом пути катаболизма глюкозы до пирувата.

Выявлены семейства родственных белков, возникшие в ходе эволюции из одного «предкового» гена, или гена-предшественника. Такие семейства составляют:

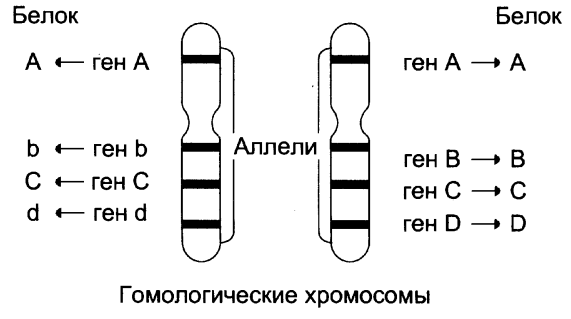


Рис. 4-59. Гомологичные хромосомы и соответствующие аллелям белковые продукты. На рисунке показано расположение 4 аллелей (AA, Bb, CC, dD) на гомологичных хромосомах. Аллели могут быть идентичны, как в случае генов AA и CC, или различаться (Bb, Dd). Белковые продукты будут идентичны для аллелей AA и CC, но будут различаться по аминокислотной последовательности в случае аллелей Bb и Dd.

- гены миоглобина и протомеров гемоглобинов;
- группа протеолитических ферментов: трипсин, химотрипсин, эластаза, плазмин, тромбин и некоторые другие белки и ферменты.

1. Гемоглобины человека

В ходе эволюции из единичных генов-предшественников возникли семейства генов α- и β-глобинов (рис. 4-60), на хромосомах 16 и 11 соответственно.

В процессе онтогенеза у людей образуются разные виды гемоглобинов, обеспечивающие наилучшую адаптацию к меняющимся условиям существования. HbE — эмбриональный, синтезируется у зародыша в первые месяцы развития, HbF — фетальный, обеспечивает дальнейшее внутриутробное развитие плода, а HbA и HbA_2 осуществляют транспорт кислорода в организме взрослого человека. Эти белки представляют собой тетрамеры, состоящие из полипептидных цепей двух видов: α и β в HbA ($2\alpha2\beta$), α и ε в HbE ($2\alpha2\varepsilon$), а у остальных гемоглобинов β-цепи заменены на γ-полипептиды в HbF ($2\alpha2\gamma$) или на δ-цепи в HbA_2 ($2\alpha2\delta$).

Полиморфизм гемоглобинов в популяции людей очень велик. Наряду с генами, кодирующими изобелки и занимающими разные локусы на хромосоме, обнаружено большое число вариантов гемоглобина А, являющихся продуктами аллельных генов. Некоторые варианты HbA представлены в таблице 4-9.

Один из наиболее известных аллельных вариантов HbA — HbS, образующийся в результате замены остатка глутамата в положении 6 β-цепи HbA на валин (β_6 Глу→Вал). По аллелям HbA и HbS всех людей можно разделить на 3 генотипически различающиеся группы: AA, AS и SS. Распространённость аллеля S по земному шару неравномерна. Часто людей с этим аллелем можно встретить в малярийных районах Африки и Азии (до 35%). К настоящему времени описано свыше 300 вариантов HbA, на основании этого признака всех людей можно разделить на 600 генотипических групп по наиболее часто встречающимся аллелям.

2. Группы крови

Другой важный пример полиморфизма белков, связанный с проблемой переливания крови, — существование в популяции людей 3 аллельных вариантов гена фермента гликозилтрансферазы (А, В и 0). Этот фермент принимает участие в синтезе олигосахарида, локализованного на наружной поверхности плазматической мембраны и определяющего антигенные свойства эритроцитов. Варианты фермента А и В имеют разную субстратную специфичность: вариант А катализирует присоединение к олигосахариду N-ацетилгалактозамина, а вариант В — галактозы. Вариант 0 кодирует белок, лишённый ферментативной активности. В результате структура олигосахари-

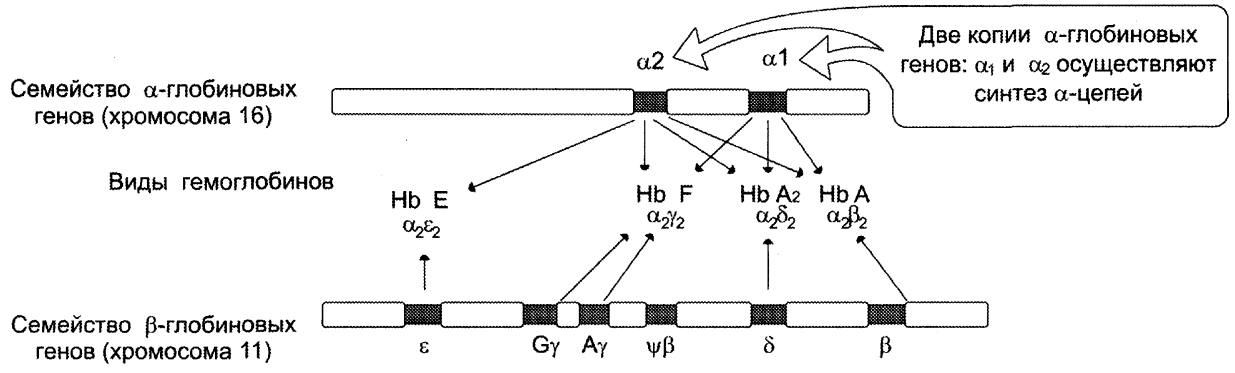


Рисунок 4-60. Схематическое расположение кластеров α- и β-глобиновых генов. Обнаружены две копии α-глобинового гена: α_1 и α_2, каждая из которых обеспечивает синтез α-глобиновой цепи. В семействе генов β-глобинов локус ε экспрессируется в период раннего эмбрионального развития плода на начальных месяцах беременности ($\alpha_2\varepsilon_2$). Гены γ экспрессируются в процессе внутриутробного развития плода (HbF, $\alpha_2\gamma_2$). Гемоглобины взрослого человека — HbA ($\alpha_2\beta_2$), составляющий 96%, и HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$), составляющий 2–2,5%, образуются в результате экспрессии генов β и δ. ψβ — псевдоген, имеющий последовательность нуклеотидов, гомологичную β-гену, но содержащий мутации, нарушающие его экспрессию.

Таблица 4-9. Некоторые варианты гемоглобина А человека

Название	Мутация	Аномальное свойство
	Замены аминокислот	
HbI	α16Лиз→Глу	Нет
Torino	α43Фен→Вал	Нарушен контакт с гемом; нестабилен
Nasharon	α47Асп→Гис	Нестабилен
Buda	α61Лиз→Асн	Снижено сродство к O_2
Iwate	α87Гис→Тир	Снижено сродство к O_2; легко окисляется в MetHb
Denmark Hill	α95Про→Ала	Нарушен $\alpha_1\beta_2$-контакт; сродство к O_2 повышено
HbC	β6Глу→Лиз	Нет
H_bS	β6Глу→Вал	Снижены растворимость и сродство к O_2
Baltimore	β16Глу→Асн	Нет
Genova	β28Лей→Про	Повышено сродство к O_2
Zurich	β63Гис→Арг	Повышено сродство к O_2; нестабилен
Koln	β98Вал→Мет	То же
Kansas	β102Асн→Тре	Нарушен $\alpha_1\beta_2$-контакт; сродство к O_2 повышено
San Diego	β109Вал→Мет	Нарушен $\alpha_1\beta_1$-контакт; сродство к O_2 снижено
Hiroshima	β146Гис→Асп	Сильно повышено сродство к O_2
	Делеции аминокислот	
Leiden	β6 или β7→0	Нестабилен
Tochigi	β(56–59)→0	Нестабилен
Green Hill	β(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

Примечание. Цитировано по учебнику А.Я. Николаева «Биологическая химия» (М.: Высшая школа, 1989).

дов, расположенных на поверхности эритроцитов, будет разной (рис. 4-61).

Антитела к антигенам А и В обычно имеются в сыворотке крови людей, на поверхности эритроцитов которых отсутствует соответствующий антиген, т.е. индивидуумы с антигенами А на поверхности эритроцитов продуцируют в сыворотку крови антитела к В-антигенам (анти-В), а люди с В-антигенами — антитела к антигенам А (анти-А). В сыворотке крови анти-А и анти-В обычно присутствуют в высоких титрах и при появлении соответствующих антигенов способны активировать ферменты системы комплемента.

·При переливании крови руководствуются правилом, согласно которому кровь донора и реципиента не должна содержать антигены и антитела, реагирующие между собой: например, реципиенту, имеющему в сыворотке крови анти-А, нельзя переливать кровь от донора, содержащего на эритроцитах антигены А.

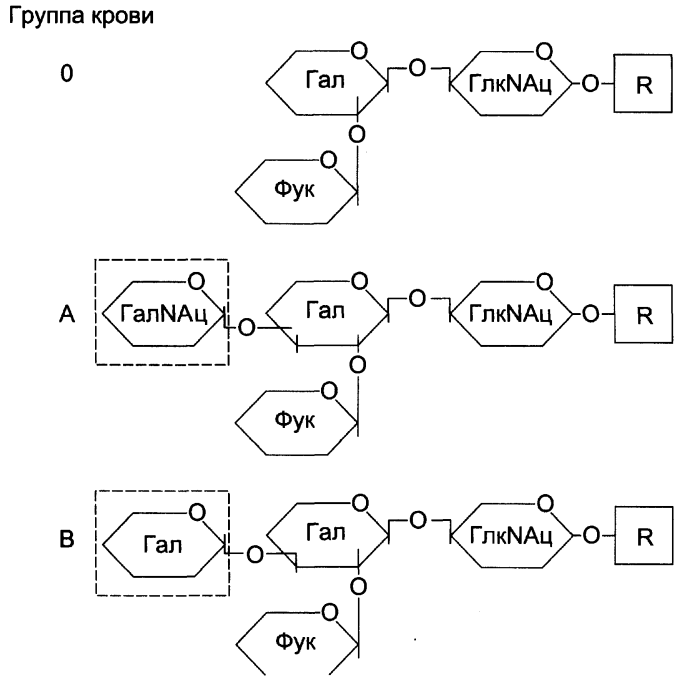


Рис. 4-61. Структура олигосахаридов, определяющих группу крови. Олигосахариды различаются концевыми мономерами. Олигосахарид А имеет на нередуцирующем конце N-ацетилгалактозамин (ГалNAц), олигосахарид В — галактозу (Гал), а олигосахарид 0 укорочен на один моносахаридный остаток. R представляет собой белок либо липид — церамид.

При нарушении этого правила происходит реакция антиген-антитело. Это вызывает агглютинацию (склеивание) эритроцитов и их разрушение ферментами комплемента и фагоцитами.

Как видно из табл. 4-10, у индивидуумов-гетерозигот, имеющих группу крови АВ (IV), на эритроцитах присутствуют А- и В-антигены, функционируют 2 варианта гликозилтрансферазы (А и В), а следовательно антитела не образуются. Этих людей можно рассматривать как «универсальных» реципиентов, которым безопасно вводить эритроциты от доноров, имеющих любые группы крови. Однако люди с группой крови IV не могут безопасно получать сыворотку крови от этих доноров, так как она содержит антитела к А- и/или В-антигенам. В то же время индивидуумы, имеющие 0 (I) группу крови, — гомозиготы по неактивному варианту гликозилтрансферазы 0, и поверхность их эритроцитов лишена антигенов. Такие люди являются «универсальными» донорами эритроцитарной массы, так как их эритроциты можно вводить людям с группами крови А, В, 0 или АВ. В то же время сыворотка крови этих доноров содержит антитела к А- и В-антигенам и может использоваться только для пациентов 0 (I) группы крови.

3. Белки главного комплекса гистосовместимости и трансплантационная несовместимость

При формировании клеточного иммунного ответа узнавание Т-лимфоцитами чужеродного антигена происходит только если он расположен рядом с гликопротеинами, присутствующими на собственной клеточной мембране. Эти гликопротеины называют белками главного комплекса гистосовместимости, или MHC-белками (см. раздел 1). Существуют 2 класса этих белков: молекулы класса I и II. MHC-белки класса I обнаружены практически во всех содержащих ядро клетках, включая Т-киллеры, тогда как MHC-белки класса II найдены главным образом в клетках, участвующих в иммунном ответе, в антиген-представляющих В-клетках и Т-хелперах, но не в Т-киллерах и макрофагах.

Строение MHC-белков кодирует семейство генов, расположенных на коротком плече хро-

Таблица 4-10. Характеристика групп крови

Антигены эритроцитов	Нет	A	B	AB
Генотипы	00	AA или A0	BB или B0	AB
Антитела в сыворотке крови	Анти-A и анти-B	Анти-B	Анти-A	Нет
Группы крови	0 (I)	A (II)	B (III)	AB (IV)
Частота (%)	45	40	10	5

мосомы 6 и занимающих участок ДНК длиной более 6000 пар нуклеотидов. Это семейство состоит из серии тесно сцепленных генов, ответственных за синтез MHC-белков и некоторых компонентов системы комплемента. Гены комплекса отличаются чрезвычайно высоким полиморфизмом. Число разных аллелей достигает нескольких миллионов. Белки MHC-системы считают самой полиморфной системой человека. Вариабельность MHC-белков обеспечивает трансплантационную несовместимость. Клетки трансплантата имеют набор этих белков, отличный от MHC-белков реципиента (во всех случаях, кроме генетически идентичных близнецов), и это приводит к развитию реакции клеточного иммунитета, в результате которой трансплантированная ткань отторгается.

Исследования показали, что полиморфизм различных белков настолько велик, что можно говорить о биохимической индивидуальности и уникальности каждого человека.

Г. Наследственные болезни

Каждый генетический локус характеризуется определённым уровнем изменчивости, т.е. присутствием различных аллелей у разных индивидуумов. Аллели генов делят на 2 группы — нормальные, или аллели «дикого» типа, для которых функция гена не нарушена, и мутантные, приводящие к нарушению работы гена. «Плохой» аллель кодирует синтез белка, функция которого сильно нарушена и при гомозиготном наследовании фенотипически проявляется как наследственная болезнь. Наследственные болезни — следствие мутаций, произошедших в гаметах или зиготе. Такие мутации могут быть первичными, если возникли в гаметах или в процессе формирования зиготы, или вторичными, если мутантный ген возник раньше и был передан последующему поколению по наследству.

Первичные мутации, как правило, не сопровождаются возникновением болезни, так как происходят обычно в одной из хромосом, и индивидуум, получивший такую мутацию, становится гетерозиготным носителем повреждения в гене. Мутантный ген в гетерозиготном состоянии часто не проявляется как болезнь и существенно не снижает жизнеспособность организма. Это способствует его распространению в популяции.

При вторичных мутациях, если каждый из родителей является носителем мутантного гена, будучи гетерозиготой, возможно рождение детей-гомозигот по дефектному аллелю. В таком случае развивается наследственная болезнь, часто сопровождаемая очень тяжёлым течением.

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, около 2,4% всех новорождённых на земном шаре страдают теми или иными наследственными нарушениями. Около 40% ранней младенческой смертности и инвалидности с детства обусловлены наследственной патологией.

К настоящему времени на хромосомах человека выявлено около 800 генов, мутации в которых приводят к развитию различных наследственных болезней. Количество моногенных заболеваний (т.е. вызванных мутациями в определённом гене) ещё больше и равно примерно 950 в результате существования так называемых «аллельных серий», т.е. групп болезней, клинически сильно отличающихся друг от друга, но обусловленных мутациями в одном и том же гене. Например, мутации в гене рецептора с тирозинкиназной активностью *ret* могут вызывать 4 различных наследственных заболевания.

Более половины генов, в которых найдены мутации, вызывающие наследственные заболе-

вания, охарактеризованы методами молекулярного анализа. Наибольшую по размеру группу составляют ферменты (31% от общего числа). За этой группой следуют белки, модулирующие функции белков и участвующие в правильном сворачивании полипептидных цепей (14%).

На каждой хромосоме в среднем идентифицировано около 30 структурных генов, мутации в которых вызывают наследственные болезни. Однако распределены эти гены по хромосомам неравномерно. Так, например, на хромосоме 2 их в 3 раза меньше, чем на хромосоме 1. Наибольшее число мутантных генов (более 100) установлено на Х-хромосоме.

Хорошо изученными наследственными заболеваниями, связанными с нарушением синтеза α- или β-цепей Hb, являются талассемии. Синтез α- и β-цепей в норме регулируется таким образом, что все молекулы протомеров используются на синтез тетрамера $\alpha_2\beta_2$. Талассемии возникают как результат мутаций, включающих замены или делеции одного или нескольких нуклеотидов, а иногда и целого гена, кодирующего структуру одного из протомеров. Эти болезни классифицируют по 4 типам: так, в случае, если одна из цепей не синтезируется, то их обозначают как α^0- или β^0-талассемии, а если синтез какой-либо из цепей снижен, то α^+- или β^+-талассемии.

α-Талассемии возникают при нарушении синтеза α-цепей. В геноме каждого индивидуума существует 4 копии гена α-глобина (по 2 копии на каждой хромосоме), поэтому встречаются несколько видов недостаточности α-цепей. Если дефектна одна из 4 копий, то фенотипически это не проявляется, и такого человека рассматривают как «молчащего носителя» талассемии. При дефекте в 2 копиях гена у носителя мутации обнаруживают слабовыраженные признаки болезни, а при дефекте в 3 копиях развивается гемолитическая анемия. При полном отсутствии синтеза α-цепей (т.е. дефектны все 4 копии гена) наступает внутриутробная гибель плода, так как не образуются фетальные формы Hb, а тетрамеры γ_4 обладают высоким сродством к кислороду и не способны функционировать как транспортные белки.

β-Талассемии развиваются в результате снижения синтеза β-цепей Hb, для которых на каждой хромосоме имеется по одному гену. Синтез HbA начинается после рождения ребёнка. При дефекте в одной из копий гена недостаточность Hb проявляется в слабой степени и не требует специального лечения. Однако при полном выключении синтеза β-цепей развивается тяжёлая форма анемии, и таким пациентам проводят либо периодическую трансфузию крови, либо пересадку костного мозга.

Со многими моногенными наследственными заболеваниями читатель познакомится практически во всех последующих разделах учебника. Здесь же хотелось бы только отметить, что наряду с болезнями, наследственная природа которых ярко выражена, существует множество болезней, характеризующихся семейной предрасположенностью. Это такие широко распространённые заболевания, как сахарный диабет, подагра, атеросклероз, шизофрения и ряд других. В отличие от моногенных болезней, эти заболевания относят к мультифакторным. Поэтому исследования, направленные на выявление белков, аллельные формы которых ответственны за предрасположенность к заболеванию, являются задачами настоящего и будущего времени.

IX. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-ТЕХНОЛОГИЙ В МЕДИЦИНЕ

В настоящее время стало очевидным, что достижения в области молекулярной биологии способны сильно изменить практическую медицину. Они не только углубили наши знания об экспрессии генов и причинах многих болезней, но способствовали разработке новых подходов к их диагностике и лечению.

Было установлено, что полиморфизм генов широко распространён в популяции людей, показана взаимосвязь между изменениями в структуре ДНК и многими болезнями. Идентификация генов, нарушение работы которых приводит к развитию наследственных заболеваний, создала предпосылки для подробного анализа генетических и биохимических основ патогенеза этих заболеваний и разработки наиболее эффективных методов лечения.

Методами молекулярной медицины были созданы вакцины для предотвращения гепатитов, инсулин человека — для лечения сахарного диабета, фактор VIII — для восстановления нормального свёртывания крови и лечения гемофилии и многие другие препараты.

С помощью генной терапии оказалось возможным вводить в организм больного полноценно работающие гены и таким образом восстанавливать метаболические нарушения, вызванные мутантными генами. Таким путём осуществляется лечение детей с иммунодефицитом, вызванным дефектом аденозиндезаминазы, в стадии клинических испытаний находятся методы генокоррекции таких наследственных болезней, как семейная гиперхолестеринемия, гемофилия В, муковисцидоз и некоторые другие.

Для выявления дефектов в структуре ДНК она должна быть выделена из соответствующего источника (биологической жидкости, биоптата, культуры клеток и т.д.) и «наработана» в количествах, достаточных для исследования. Для генно-терапевтических работ необходимы выделение нормальных генов и введение их в дефектные клетки таким образом, чтобы они экспрессировались, позволяя восстановить здоровье пациента.

В настоящем разделе будут даны основные представления о методах, используемых в решении проблем ДНК-диагностики наследственных болезней и генной терапии.

А. Методы выделения ДНК

ДНК может быть выделена из любого типа тканей и клеток, содержащих ядра. Этапы выделения ДНК включают быстрый лизис клеток, удаление фрагментов клеточных органелл и мембран с помощью центрифугирования, ферментативное разрушение белков протеиназами и экстрагирование ДНК из раствора с помощью фенола и хлороформа. Затем ДНК осаждают, как правило, этанолом и после удаления надосадочной жидкости растворяют в буферном растворе.

- Оценку качества экстрагированной ДНК проводят на основании измерения оптической плотности раствора ДНК в области белкового и нуклеинового спектров поглощения, т.е. при 280 и 260 нм, соответственно. Для чистых образцов ДНК соотношение оптических плотностей, полученных при 260/280 нм, должно быть больше 1,8.
- Молекула ДНК одной хромосомы среднего размера содержит 150×10^6 пар нуклеотидов и имеет длину около 4 см. Молекулы такого размера чувствительны к механическим воздействиям, возникающим в растворе в процессе выделения, и часто фрагментируются. В ходе выделения получают молекулы ДНК значительно меньше исходных, но всё равно очень большие — тысячи или десятки тысяч пар нуклеотидов. Такие молекулы неудобны для исследований, и их приходится дополнительно фрагментировать.

Расщепление ДНК с помощью рестриктаз

Для фрагментирования используют рестриктазы (ферменты, расщепляющие ДНК) или рестрикционные эндонуклеазы (от англ. *restriction endonucleases*), выделенные из бактериальных клеток. Эти ферменты *in vivo* участвуют в узнавании и разрушении чужеродных для бактерий ДНК, расщепляя внутренние участки молекулы на сравнительно небольшие фрагменты. Рестриктазы узнают специфические последовательности из 4–6, реже 8–12 нуклеотидов в двухцепочечной молекуле ДНК (сайты рестрикции) и «разрезают» её в местах локализации этих последовательностей. Количество образующихся рестрикционных фрагментов ДНК при использовании одной рестриктазы зависит от количества сайтов рестрикции, а размер фрагментов определяется положением этих сайтов по всей длине исходной молекулы ДНК.

Известно более 500 различных типов рестриктаз бактериального происхождения, причём каждый из этих ферментов узнаёт свою специфическую последовательность (рис. 4-62). С помощью набора рестриктаз можно разрезать молекулу ДНК на фрагменты желаемой длины. Например, для изучения первичной структуры (метод секвенирования) удобны фрагменты размером около 300 пар нуклеотидов. Следовательно, ДНК одной хромосомы в 150×10^6 пар нуклеотидов нужно разрезать на 500 000 фрагментов и каждый из фрагментов изучать отдельно.

Образующиеся в результате рестрикции фрагменты ДНК могут быть исследованы методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле. Выявление ДНК в геле возможно в присутствии бромида этидия, связывающегося с фрагментами молекулы и дающего специфическое розовое окрашивание в ультрафиолетовой области спектра.

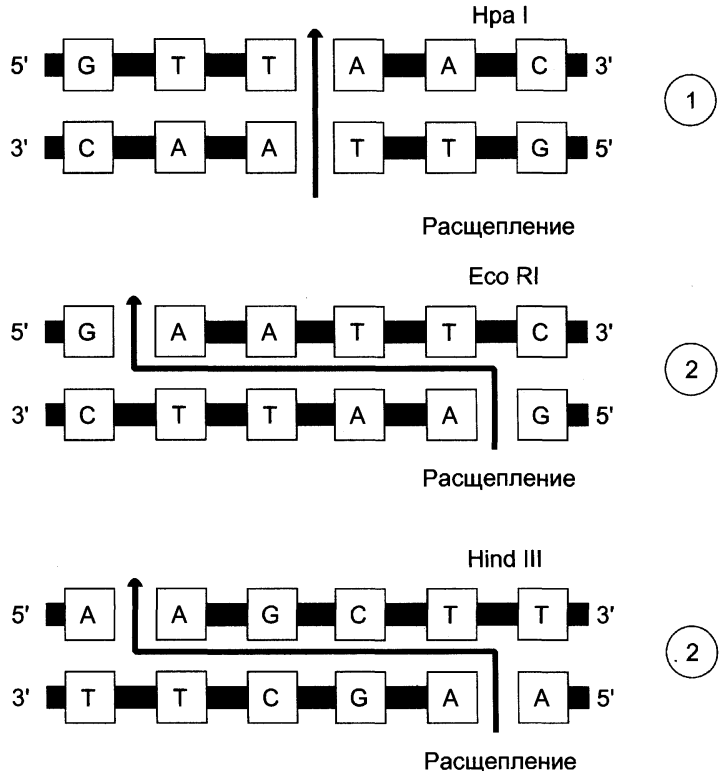


Рис. 4-62. Последовательность нуклеотидов в ДНК, узнаваемая тремя наиболее часто используемыми рестриктазами. Рестрикцирующие нуклеазы получают из различных бактерий: HPA I — *Haemophilus parainfluenzae;* Eco RI — из *Escherichia coli*; Hind III — из *Haemophilus influenzae*. Рестриктазы типа 1 расщепляют ДНК с образованием «слепых» концов, а другие (типа 2) с образованием по месту разрыва одноцепочечных «липких» концов.

Б. Идентификация специфических последовательностей

При обработке геномной эукариотической ДНК, в частности, ДНК человека, рестриктазами образуется так много фрагментов различной длины, что их не удаётся удовлетворительно разделить с помощью электрофореза в полиакриламидном или агарозном геле. После электрофореза рестрикцированной геномной ДНК и проявления с помощью бромида этидия получается равномерное окрашивание по всей длине геля. Идентификация нужных фрагментов ДНК в таком геле возможна только путём гибридизации с мечеными ДНК-зондами. Синтез ДНК-зондов осуществляется в автоматизированных машинах, позволяющих синтезировать фрагменты однонитевой ДНК длиной свыше 100 нуклеотидных звеньев со строго определённой первичной структурой. Такие молекулы можно использовать для специфического связывания с исследуемыми участками гена.

Блот-гибридизация по Саузерну

Классическим методом идентификации интересующих участков ДНК стал метод блот-гибридизации по Саузерну, предложенный в 1975 г. Суть метода заключается в том, что сплошная «лестница» фрагментов ДНК, получившаяся в результате их деления по молекулярной массе в гелях, подвергается денатурации и переносится с геля на плотный носитель (нитроцеллюлозный фильтр или нейлоновую мембрану). Перенос, или блоттинг, осуществляется за счёт капиллярных сил, электрического поля или вакуума (рис. 4-63). Фиксированную на фильтре ДНК гибридизуют с ДНК- или РНК-зондом, содержащим метку. Методом радиоавтографии определяют положение искомого фрагмента геномной ДНК на электрофореграмме. Блот-гиб-

ридизация — высокочувствительный метод идентификации специфических последовательностей.

К настоящему времени разработано много модификаций этого метода. Так, ДНК-зонд не всегда метят радиоактивными изотопами, нередко используют соединения, ковалентно связывающиеся с ДНК; их можно обнаружить по образованию окрашенного продукта или флюоресценции. Длина олигонуклеотидов в ДНК-зондах также может сильно варьировать, будучи иногда очень короткой — в 15—20 пар нуклеотидов. Описаны методы дот- (пятно) или слот- (полоска) гибридизации, когда на твёрдый носитель наносят препараты ДНК или РНК без предварительной рестрикции или электрофореза и гибридизуют их с мечеными ДНК-зондами.

В. Установление первичной структуры ДНК-фрагментов (секвенирование ДНК)

Наиболее часто для установления первичной структуры ДНК используют дидезоксисеквенирование. В реакционных пробах, содержащих денатурированную однонитевую ДНК, ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ) — дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ, один из которых является радиоактивным, и праймер инициируют синтез ДНК в присутствии специфических дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ддНТФ), или терминаторов, — ддАТФ, ддЦТФ, ддГТФ или ддТТФ. Синтез одновременно ведут в четырёх параллельных пробах, в каждую из которых наряду с компонентами реакционной смеси прибавляют один из 4 ддНТФ. ддНТФ будут конкурировать с нормальными дНТФ за включение в растущую полинуклеотидную цепь. При встраивании ддНТФ вместо соответствующего нуклеотида синтез ДНК прекращается. В результате в каждой из пробирок получается набор различающихся по длине меченых фрагментов ДНК с одним из специфических дидезоксинуклеотидов на конце. После одновременного разделения этих фрагментов в электрическом поле на 4 соседних дорожках и радиоавтографии размер синтезированных молекул может быть установлен, а это значит, что может быть определена локализация терминирующих дидезоксинуклеотидов. На основании этих данных устанавливают последовательность нуклеотидов во вновь синтезированных фрагментах, комплементарных ДНК-матрице (рис. 4-64).

В настоящее время создают приборы для автоматического одновременного секвенирования большого числа проб с использованием меченных разными флюорохромами дидезоксинуклеотидов.

В то же время разрабатывают новые, более эффективные и экономичные методы секвенирования. Сущность одного из них заключается в следующем: из 4 нуклеозидтрифосфатов (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ) создаётся набор олигонуклеотидов (например, октануклеотидов), включающий все возможные варианты последовательностей. Эти октануклеотиды иммобилизуют (пришивают) в ячейках, в результате чего создаётся так называемая олигонуклеотидная

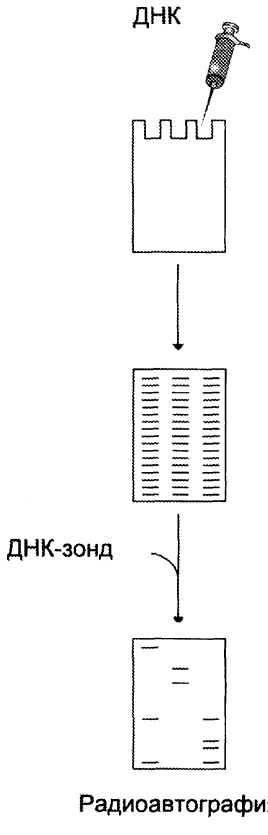


Рис. 4-63. Блот-гибридизация по Саузерну. Фрагменты ДНК разделяют с помощью электрофореза, денатурируют, переносят на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизуют с ДНК-зондом.

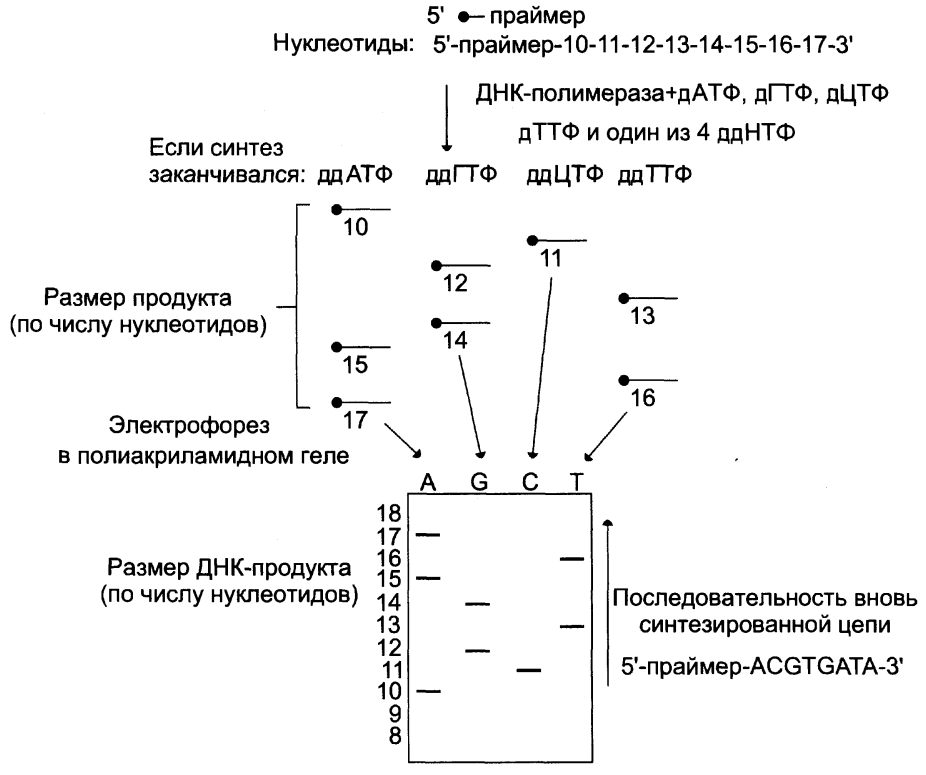


Рис. 4-64. Дидезоксисеквенирование последовательности ДНК. Используют 4 пробы, каждая из которых содержит ДНК-матрицу, праймер, ДНК-полимеразу, 4 дНТФ (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ). Праймер либо один из нуклеотидов содержит радиоактивную метку, благодаря чему полосы могут быть обнаружены в геле с помощью радиоавтографии. Один из 4 дидезоксирибонуклеотидов (ддНТФ) добавляют в каждую пробирку. Остановка синтеза происходит в том случае, когда ддНТФ включается в растущую олигонуклеотидную цепь.

матрица. Секвенируемый фрагмент ДНК метят по фосфатному остатку и добавляют в ячейки матрицы. Фрагмент ДНК гибридизуется только с теми октануклеотидами, последовательности которых комплементарны его участкам. Таким образом, определяется набор всех возможных октануклеотидов, присутствующих в исследуемом фрагменте ДНК. Далее при помощи специальной компьютерной обработки упорядочивается расположение октамеров в исследуемом фрагменте ДНК.

Г. Получение рекомбинантных ДНК и их амплификация

Для работы с нуклеотидными последовательностями в генах и других участках ДНК необходимо иметь достаточное количество материала для исследования. Это непростая задача, особенно если источником ДНК служат ткани человека. Поэтому исследуемые фрагменты ДНК обычно предварительно амплифицируют (увеличивают количественно в миллионы раз), для того чтобы получать их в любое время и в неограниченном количестве. Исключительно ценным инструментом в решении этой проблемы оказалось использование рекомбинантных ДНК (т.е. ДНК, построенных из участков разного происхождения).

1. Получение рекомбинантных ДНК

Для получения таких молекул первоначально выделяют ДНК из 2 разных источников (рис. 4-65).

Каждую из них в отдельности фрагментируют, используя одну и ту же рестриктазу, расщепляющую ДНК с образованием «липких» концов. После процедуры нагревания и медленного охлаждения (отжига) наряду с исходными

молекулами $ДНК_X$ и $ДНК_Y$ могут образовываться рекомбинантные молекулы, состоящие из фрагментов $ДНК_X$ и $ДНК_Y$, связанных между собой «липкими» концами. Ковалентное сшивание фрагментов осуществляют с помощью ДНК-лигазы в присутствии АТФ как источника энергии.

В технологии рекомбинантных ДНК, кроме фрагментов ДНК, выделенных из клеток, содержащих ядра, используют ДНК, полученную с помощью обратной транскриптазы. При добавлении в реакционную среду 4 разных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов фермент на матрице мРНК по принципу комплементарности синтезирует ДНК-копию, или кДНК. Так как источником информации при образовании кДНК служит зрелая цитоплазматическая мРНК, то такая ДНК, в отличие от ДНК фрагментов, полученных при расщеплении геномной ДНК эукариотов, не содержит интронов.

2. Клонирование ДНК

Для получения значительных количеств интересующего нас материала проводят клонирование ДНК, предполагающее встраивание нужного нам фрагмента ДНК в векторную молекулу ДНК (или вектор). Вектор обеспечивает проникновение этой рекомбинантной, или химерной, ДНК в бактериальные клетки. В качестве векторов используют плазмиды, фаги, ретро- и аденовирусы. Особенно часто в качестве вектора служит плазмидная ДНК.

Плазмиды — небольшие кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, присутствующие в бактериальных клетках в различном количестве копий. Они имеют автономную систему контроля репликации, которая поддерживает их количество в клетках на определённом уровне — от нескольких единиц до нескольких сотен копий геномов на клетку.

Используемую для клонирования плазмидную ДНК и интересующую нас ДНК расщепляют по определённому участку рестриктазой, получают рекомбинантную ДНК, возвращают гибридную плазмиду в кольцевую форму и вводят в бактериальные клетки, т.е. осуществляют трансформацию бактерий. При размножении трансформированных бактерий происходит увеличение числа копий введённого в плазмиду фрагмента ДНК, т.е. таким способом чужеродный для бактерий генетический материал может быть получен в значительных количествах (рис. 4-66).

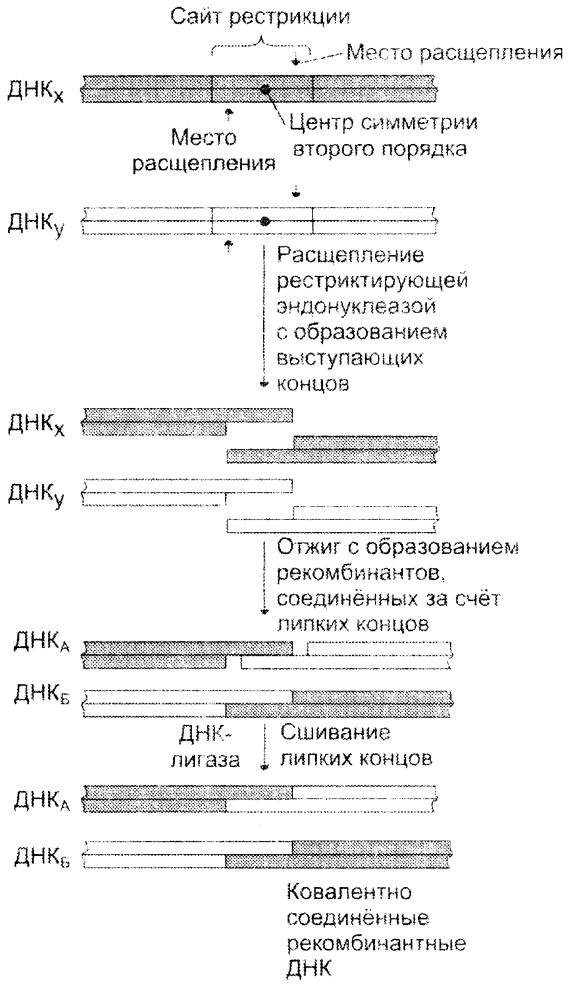


Рис. 4-65. Получение рекомбинантных ДНК. Два образца ДНК: $ДНК_X$ и $ДНК_Y$ расщепляют одной и той же рестриктазой и получают фрагменты с «липкими» концами. При денатурации и последующем «отжиге» образуются рекомбинантные молекулы $ДНК_А$ и $ДНК_Б$, первоначально соединённые друг с другом за счёт «липких» концов, затем сшиваемых ДНК-лигазой.

В качестве клонирующих векторов часто используют фаги. Если экзогенную ДНК вводят в эукариотические клетки, то эту процедуру называют трансдукцией.

3. Полимеразная цепная реакция

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), предложенный в 1983 г. Карри Муллисом (Нобелевская премия, 1993 г.), явился эпохальным

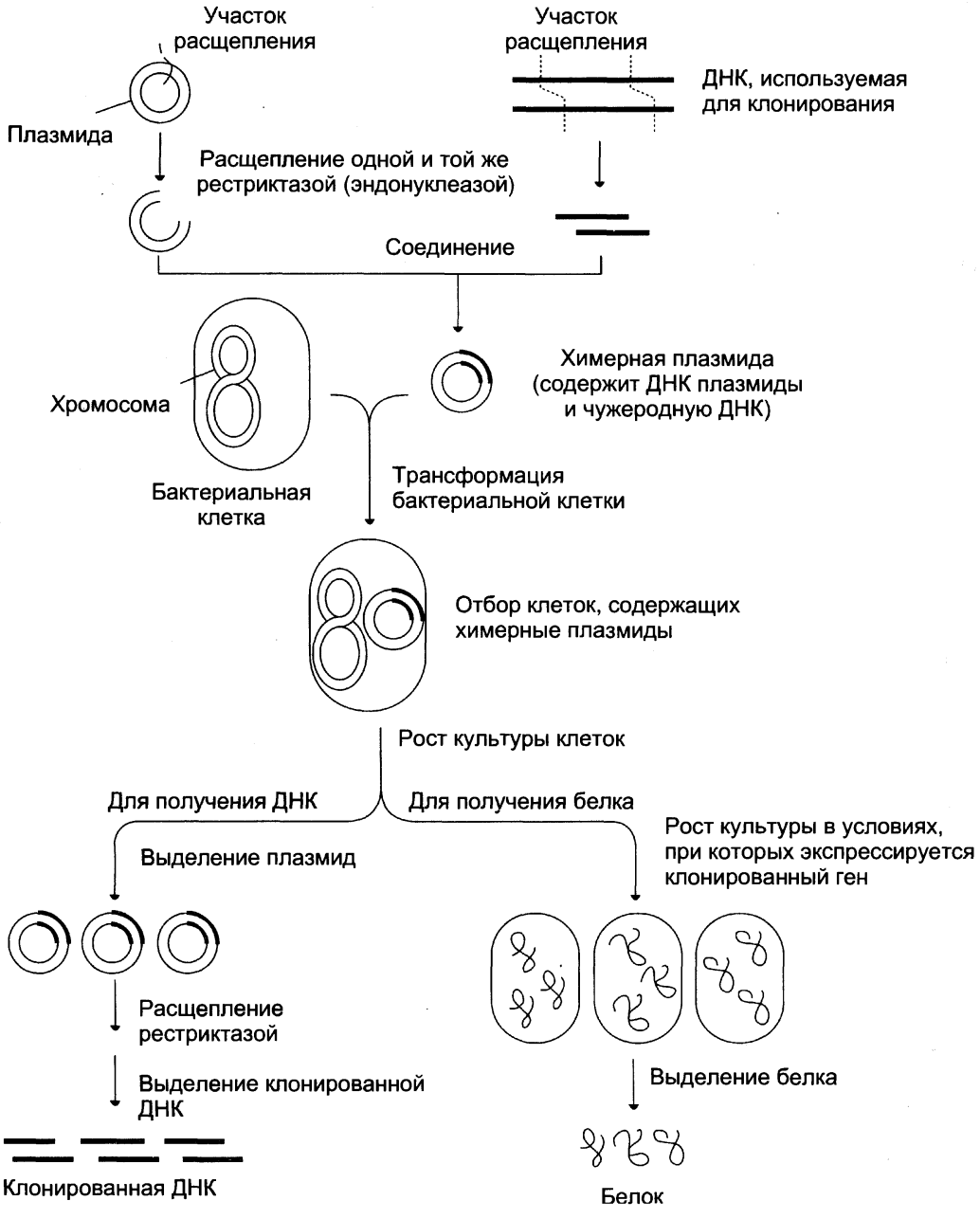


Рис. 4-66. Схема клонирования ДНК в бактериальных клетках.

открытием XX века в области молекулярной биологии. Он позволяет подвергать специфичной амплификации в условиях *in vitro* (в пробирке) участки ДНК длиной от нескольких десятков до нескольких сотен пар нуклеотидов, используя в качестве матрицы любые образцы ДНК. Необходимое условие для проведения ПЦР — знание нуклеотидной последовательности амплифицируемой области. Участок исследуемой ДНК гибридизуют с двумя искусственно синтезированными праймерами — олигодезоксирибонуклеотидными последовательностями длиной от 15 до 30 пар нуклеотидов, которые комплементарны 3′-концам амплифицируемого участка на ко-

дирующей и некодирующей нитях ДНК. Расстояние между праймерами определяет длину синтезируемых молекул. В качестве матрицы для синтеза продуктов ПЦР используют любой тип ДНК: геномную ДНК человека, различных видов про- и эукариотов, ДНК, выделенную из культур клеток, «библиотек» генов и других источников. Метод не требует больших количеств исследуемой ДНК, в принципе, достаточно даже одной молекулы, содержащейся в одном волосе на голове, одной капле крови или спермы.

Успех в разработке метода в значительной степени обусловлен использованием в качестве фермента термофильной ДНК-полимеразы, выделенной из бактерий, живущих в горячих источниках, и потому устойчивой к действию высоких температур.

Реакционная смесь для получения интересующей нас ДНК содержит исследуемую ДНК, субстраты реакции — 4 дНТФ, 2 праймера, термостабильную, или Taq-полимеразу и буфер, содержащий ионы Mg^{2+}.

Один цикл полимеризации включает 3 этапа (рис. 4-67):

плавление: на этой стадии реакционную смесь нагревают до температуры 90—97 °С. Исследуемая двуцепочечная ДНК денатурирует и переходит в однонитевую форму;

гибридизация или отжиг ДНК с праймерами. В результате снижения температуры до 50—60 °С происходит комплементарное связывание праймеров с цепями матричной ДНК и образование двухцепочечного участка на каждой из нитей ДНК;

элонгация, удлинение нитей ДНК, комплементарных матричной ДНК, катализирует Taq-полимераза в направлении от 5′- к 3′-концу.

Затем снова наступает этап плавления, когда за счёт повышения температуры синтез ДНК прекращается, и двунитевой участок между матричными и вновь синтезированными молекулами ДНК денатурирует. Во втором и последующих циклах праймеры гибридизируются с исходной матричной ДНК и с вновь синтезированными молекулами ДНК, количество которых нарастает в геометрической прогрессии. В последнем случае синтез ДНК заканчивается не из-за изменения температурного режима, а по достижении ДНК-полимеразой границы амплифицированного участка, что определяет строго определённый размер продукта с точностью до одного нуклеотида.

Каждый из этапов цикла имеет продолжительность от десятков секунд до 1—3 мин, в результате полный цикл длится от одной до нескольких минут.

Описанную процедуру амплификации ДНК проводят в автоматическом режиме в приборе — циклизаторе, или термоциклере, амплификаторе ДНК. Такой прибор позволяет задавать нужное количество циклов и выбирать оптимальные временные и температурные параметры. За 25—30 циклов число синтезированных копий ДНК достигает нескольких миллионов.

С помощью ПЦР можно получить достаточное количество копий участков ДНК, в которых предполагаются присутствие мутаций, полиморфизм сайтов, можно проводить ДНК-диагностику инфицированности пациентов вирусными, бактериальными и грибковыми возбудителями болезней.

Д. ДНК-диагностика заболеваний

Используя технику рекомбинантных ДНК, удаётся исследовать варианты генов, ответственных за развитие многих заболеваний. Этим способом идентифицированы точечные мутации, вызванные заменой одного азотистого основания, делециями или вставками, приводящими к появлению аллелей, кодирующих функционально неактивные белки. Дефектные «полиморфы» возникают как за счёт изменений в кодирующих участках гена, так и в результате мутаций в некодирующих областях, тесно примыкающих к генам и вызывающих нарушение их работы.

Разработанные технологии позволяют вести целенаправленное картирование генов человека в рамках международного проекта «Геном человека». Официально эта научная программа с участием ведущих молекулярно-генетических лабораторий США, стран Западной Европы, а также России и Японии оформилась в 1990 г. В ходе работы над проектом картированы 923 гена, вызывающих развитие моногенных заболеваний, более 100 из них полностью секвенированы. К концу 2001 г. работами лабораторий США, Великобритании, Японии и ряда европейских стран с точностью до 90% завершена расшифровка генома. Ожидается, что в течение ближайших 2—3 лет будут изучены все гены, ответственные за развитие патологичес-

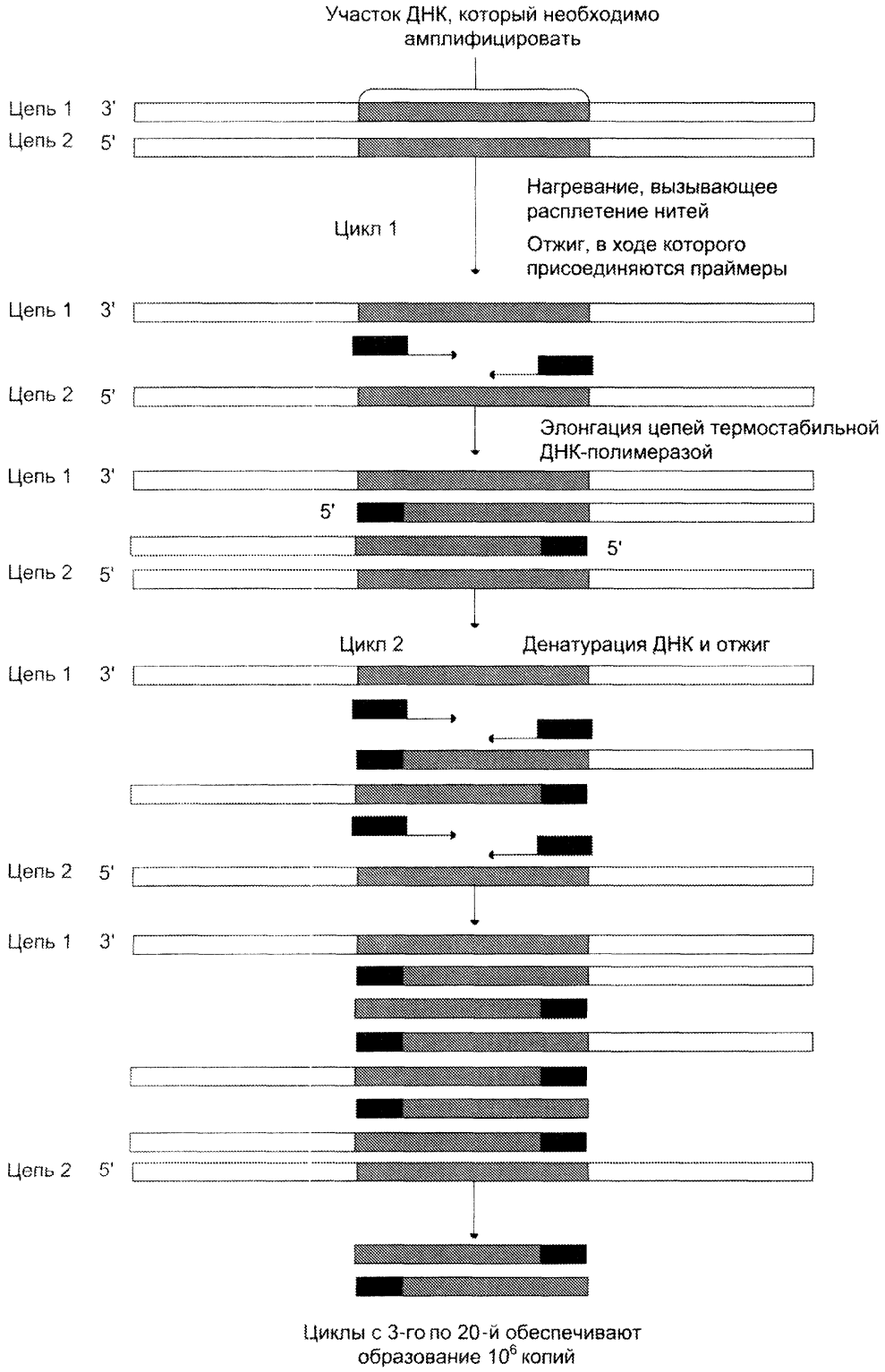


Рис. 4-67. Полимеразная цепная реакция.

ких процессов у человека. Это позволит вывести диагностику и лечение многих болезней на новый уровень.

Остановимся на некоторых методах, широко используемых для идентификации моногенных болезней.

1. Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ)

Мутации, возникающие в участках узнавания определённых рестриктаз, делают эти участки ДНК нечувствительными к действию ферментов. Это может быть легко обнаружено по изменению длины рестрикционных фрагментов ДНК. ПДРФ-анализ включает следующие этапы: выделение геномной ДНК, её рестрикцию специфической эндонуклеазой, электрофоретическое разделение образующихся фрагментов ДНК и идентификацию этих фрагментов путём блот-гибридизации по Саузерну. На электрофореграммах при отсутствии рестрикции в исследуемой ДНК выявляют один крупный фрагмент, соответствующий по длине последовательности ДНК между двумя соседними участками рестрикции для той же эндонуклеазы. При наличии рестрикции в полиморфном участке на электрофореграмме будет присутствовать меньший по размерам фрагмент, равный расстоянию между полиморфным участком рестрикции и одним из ближайших постоянных участков рестрикции (рис. 4-68).

ПДРФ-анализ может быть значительно упрощён в том случае, если возможна специфическая амплификация участка ДНК, содержащего полиморфный сайт рестрикции. Тестирование состояния этого локуса возможно путём проведения ПЦР и рестрикции амплифицированного фрагмента. При отсутствии сайта узнавания в исследуемой области ДНК размеры амплифицированного фрагмента не изменятся после его обработки рестриктазой. Если участок узнавания не изменён, обработка ферментом приведёт к образованию 2 маленьких фрагментов с той же суммарной длиной, что и исходный фрагмент.

При обследовании пациентов и членов их семей на носительство патологических генов широко используют этот метод, с помощью которого:

- идентифицируют делеции в гене дистрофина, на долю которых приходится около 60% всех мутаций, вызывающих миодистрофию Дюшенна;
- диагностируют гемофилию А, некоторые талассемии, ретинобластому и гранулематоз;
- контролируют здоровье детей в семьях, в которых родители являются гетерозиготами по гену серповидно-клеточной анемии и другим дефектным генам.

2. Определение мутаций с помощью аллель-специфических проб

Многие мутации, вызывающие возникновение генных болезней, не попадают в участки, ответственные за узнавание ферментов рестрикции. В этом случае, если последовательность оснований в области мутации известна, то её обнаруживают с помощью аллель-специфических олигонуклеотидов. Для этого синтезируют короткие олигонуклеотидные зонды, содержащие обычно около 19 нуклеотидов, комплементарные участку нормального и мутантного аллеля в ДНК. Область генома, содержащую исследуемый ген, амплифицируют с помощью ПЦР, и образцы полученной ДНК переносят на нитроцеллюлозные фильтры (дот- или слот-блоттинг). Пробы выдерживают с ^{32}P-зондами для выявления нормальной или мутантной последовательности. У гомозигот по исследуемой мутации ДНК будет гибридизоваться только с зондом, комплементарным мутантной последовательности. ДНК нормального гомозиготного индивидуума свяжется с зондом, соответствующим неизменённой нуклеотидной последовательности, тогда как с ДНК гетерозигот будут гибридизоваться оба зонда. На рисунке 4-69 представлены результаты генного зондирования 7 пациентов на носительство наиболее часто встречающейся делеции 3 нуклеотидов (ΔF508) в гене, ответственном за развитие муковисцидоза.

Олигонуклеотиды, аллель-специфичные по определённым мутациям, можно использовать в качестве праймеров в ПЦР при клиническом тестировании населения на наличие патологического гена. Если ДНК, полученная от пациента, амплифицирует с мутантным олигонуклеотидом, то следовательно пациент является носителем мутации. Если нуклеотидная последовательность в исследуемом гене не изменена, то олигонуклеотид, содержащий мутацию, не свяжется с ДНК-матрицей, и ПЦР не пойдёт.

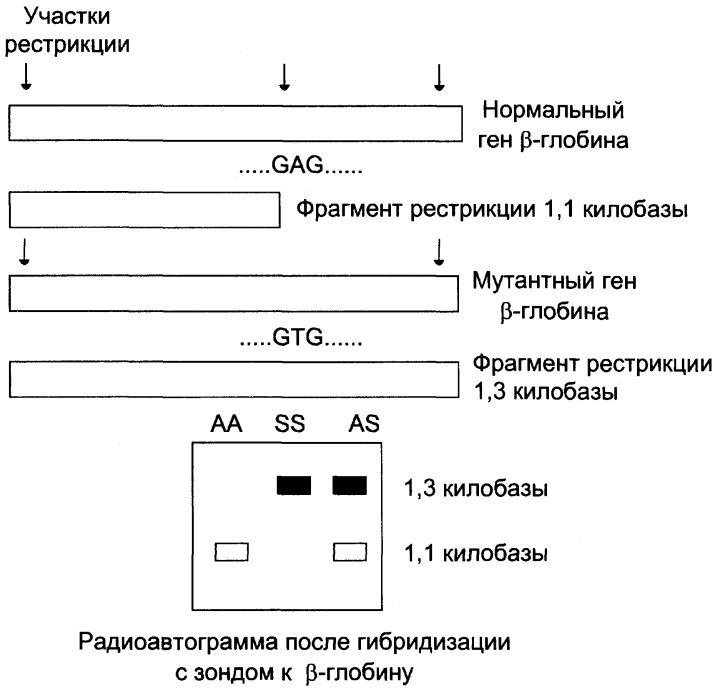


Рис. 4-68. Рестрикционный анализ ДНК гемоглобина человека, больного серповидно-клеточной анемией (HbS). Миссенс-мутация, ответственная за возникновение серповидно-клеточной анемии, связана с заменой в гене β-цепи глобина триплета GAG на GTG. При этом утрачивается участок рестрикции фермента MstII, узнающего последовательность CCTNAGG, где N может быть любым основанием. При наличии мутации генный зонд гибридизуется с более крупным фрагментом ДНК размером 1,3 килобазы, имеющим при электрофорезе меньшую подвижность, чем продукт рестрикции нормального гена, длина которого равна 1,1 килобазы.

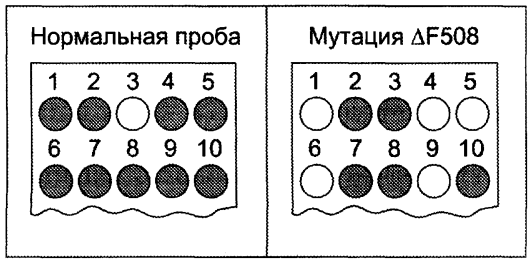


Рис. 4-69. Генное зондирование на носительство муковисцидоза. С помощью ПЦР амплифицируют геномную ДНК, и продукт переносят на 2 нейлоновых фильтра, один из которых гибридизуют с ^{32}P-зондом на нормальный аллель, а второй с ^{32}P-зондом на мутантный аллель ΔF508. Образование гибридов обнаруживают радиоавтографически. Пробы 1–3 служили контролями: первая содержала продукты ПЦР ДНК от гомозигот по нормальному гену; вторая — от гетерозиготного носителя мутации ΔF508; третья — от больного муковисцидозом, гомозиготного по мутации ΔF508. Пробы 4–10 получены при обследовании 7 пациентов на носительство ΔF508: 4, 5, 6 и 9 оказались гомозиготами по нормальному гену, а 7, 8 и 10 — гетерозиготными носителями мутантного гена.

E. Использование ДНК-технологий для получения лекарственных препаратов и лечения различных болезней

Вакцины — очищенные белки, антигенные детерминанты ряда возбудителей вирусных и бактериальных инфекций. В последнее время их получают, пользуясь техникой рекомбинантных ДНК. Первой вакциной, синтезированной этим способом, была вакцина против вируса гепатита В.

Белки, имеющие терапевтическое значение, получают с использованием этой технологии во многих странах мира. Так, одним из первых синтезирован инсулин человека (рис. 4-70). В клетках *E. coli*, трансформированных плазмидами, содержащими ДНК, которая кодировала А- и В-цепи инсулина, нарабатывают белковые продукты А- и В-цепей. После очистки их подвергают фолдингу и окислению, которое обеспечивает образование соответствующих дисульфидных мостиков.

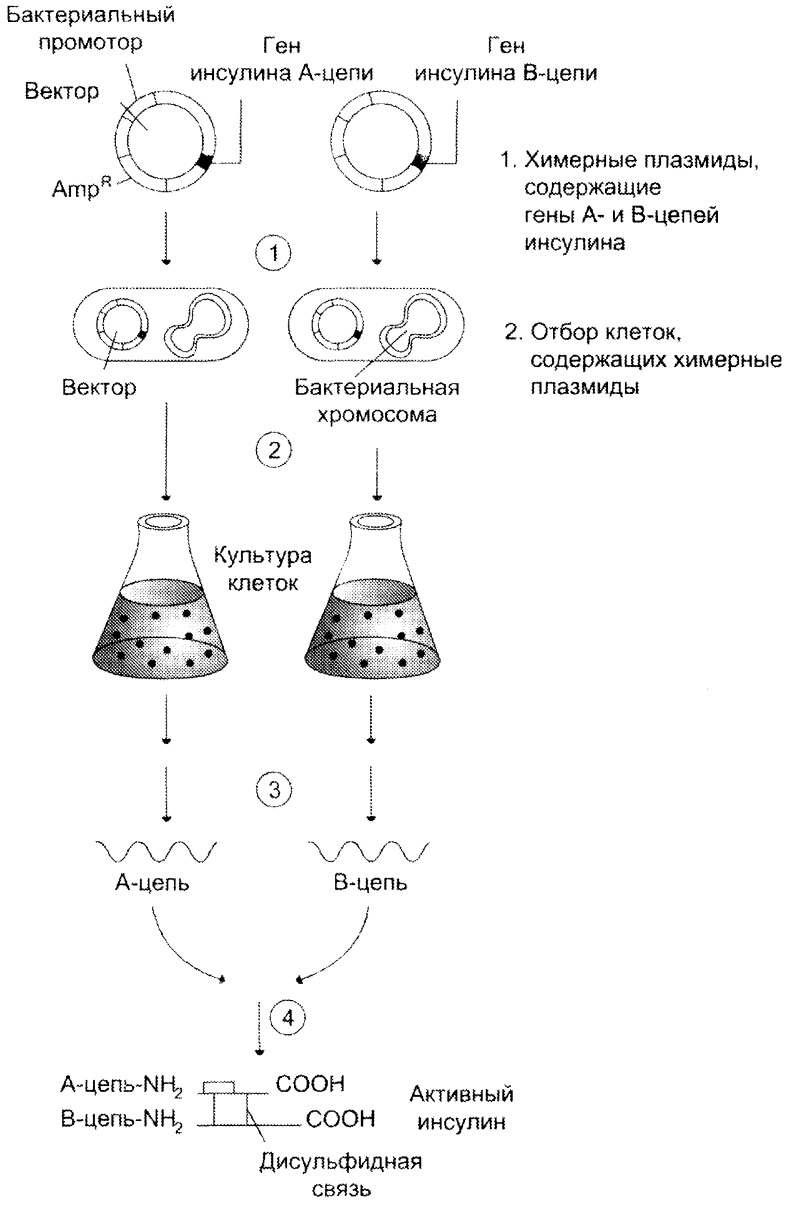


Рис. 4-70. Получение инсулина человека в клетках *E. coli*. 1 — трансформация клеток *E. coli* плазмидами, которые содержат гены, кодирующие структуру А- и В-цепей инсулина; 2 — синтез А- и В-цепей инсулина в процессе выращивания культуры трансформированных клеток *E. coli*; 3 — выделение и очистка А- и В-цепей инсулина; 4 — пространственная укладка А- и В-цепей инсулина и окисление остатков цистеина.

Аналогичным способом получен гормон роста, используемый для лечения детей с недостаточностью этого гормона. Более сложные белки получены в культуре клеток млекопитающих. Так, дефекты в гене фактора VIII, кодирующего один из белков — участников свёртывающей системы крови, ответственны за возникновение гемофилии. До того как фактор VIII был получен методами генной инженерии, большое количество больных погибало от СПИДа или гепатита, которыми они заражались в результате введения выделенного из крови фак-

тора VIII или переливания крови от доноров, являвшихся носителями этих болезней.

Тканевый активатор плазминогена (ТАП) — протеаза, участвующая в процессе фибринолиза и предотвращающая образование тромбов в кровеносном русле; получена с помощью рекомбинантных ДНК. ТАП назначают больным с ишемической болезнью сердца для ускорения растворения тромбов, которые могут вызвать закупорку коронарных артерий и нарушить поступление кислорода в миокард.

Осуществлено получение рекомбинантных факторов роста, обеспечивающих восстановление гемостаза: эритропоэтина, интерлейкинов, колоний-стимулирующих факторов. Эти препараты используют в лечении больных анемией, после трансплантации костного мозга или химиотерапии, чтобы стимулировать образование клеток крови и снизить риск иммунодефицита. Разработаны методы получения белков человека с использованием трансгенных животных; эти белки получают в результате искусственного введения чужеродного гена в оплодотворённую яйцеклетку или в ранние зародыши млекопитающих (рис. 4-71). Генноинженерные мероприятия можно провести таким образом, чтобы интересующий нас белок человека секретировался с белками молока.

Генная терапия — лечение наследственных, многофакторных и инфекционных заболеваний путём введения в соматические клетки пациентов генов, которые обеспечивают исправление генных дефектов или придают клеткам новые функции.

Первый клинический опыт применения генной терапии был осуществлён в 1990 г. в Бетесде (США) на четырёхлетней девочке, страдавшей наследственным иммунодефицитом, вызванным мутацией в гене аденозиндезаминазы (*ADA*). Ребёнку были введены её собственные лимфоциты, предварительно трансформированные вне организма генной конструкцией, включающей ген *ADA* + ген *neo* + ретровирусный вектор. Лечебный эффект наблюдался в течение нескольких месяцев, после чего процедуру введения гена повторяли многократно без видимых неблагоприятных эффектов.

Для успешной генотерапии необходимо:

- обеспечить эффективную доставку чужеродного гена в клетки-мишени;
- создать условия для длительной экспрессии гена в этих клетках.

К настоящему времени разработаны химические, физические и биологические методы доставки чужеродного гена в клетки-мишени. Однако пока только вирусные векторы или генетические конструкции, включающие вирусные последовательности, способны к эффективной доставке необходимого гена и его последующей длительной экспрессии. В результате из более чем 175 уже одобренных протоколов клинических испытаний по генотерапии более 120 основаны на применении ретровирусных векторов.

В геном пациента чужеродная ДНК может вводиться либо в культуре клеток (*ex vivo*), либо непосредственно в организм больного (*in vivo*). При осуществлении первого способа выделяют и культивируют специфический тип клеток пациента, вводят в него чужеродный ген, отбирают трансформированные клетки и реинфузируют их тому же больному (рис. 4-72).

Генная терапия *in vivo* основана на прямом введении в специализированные ткани больного клонированных и определённым образом упакованных последовательностей ДНК, поступающих с помощью рецепторов в определённые типы клеток. В этом способе гены вводят, как правило, в виде аэрозольных и инъецируемых форм. Наиболее часто аэрозольную генотерапию используют при лечении болезней лёгких (например, раке лёгких) и муковисцидоза.

Наряду с развитием исследований, касающихся лечения наследственных дефектов, генотерапию всё чаще используют для лечения ненаследственных, главным образом, инфекционных и онкологических болезней (см. раздел 16).

Единственное и непременное ограничение таких работ состоит в том, чтобы все генотерапевтические мероприятия были направлены на конкретного больного и затрагивали только его соматические клетки.

Современный уровень знаний не позволяет проводить коррекцию генных дефектов на уровне половых клеток и клеток ранних доимплантационных зародышей человека в связи с реальной опасностью засорения генофонда нежелательными генными конструкциями и внесения мутаций с непредсказуемыми результатами.

Рис. 4-71. Использование трансгенных животных для получения белков человека. Ген человека встраивают в вектор таким образом, чтобы он был под контролем β-лактоглобинового промотора, который активен только в клетках молочной железы. Присутствие у трансгенного потомства гена человека контролировали с помощью метода ПЦР, в которой использовали праймеры к гену человека. При фракционировании белков молока получают белковый продукт экспрессии гена человека.

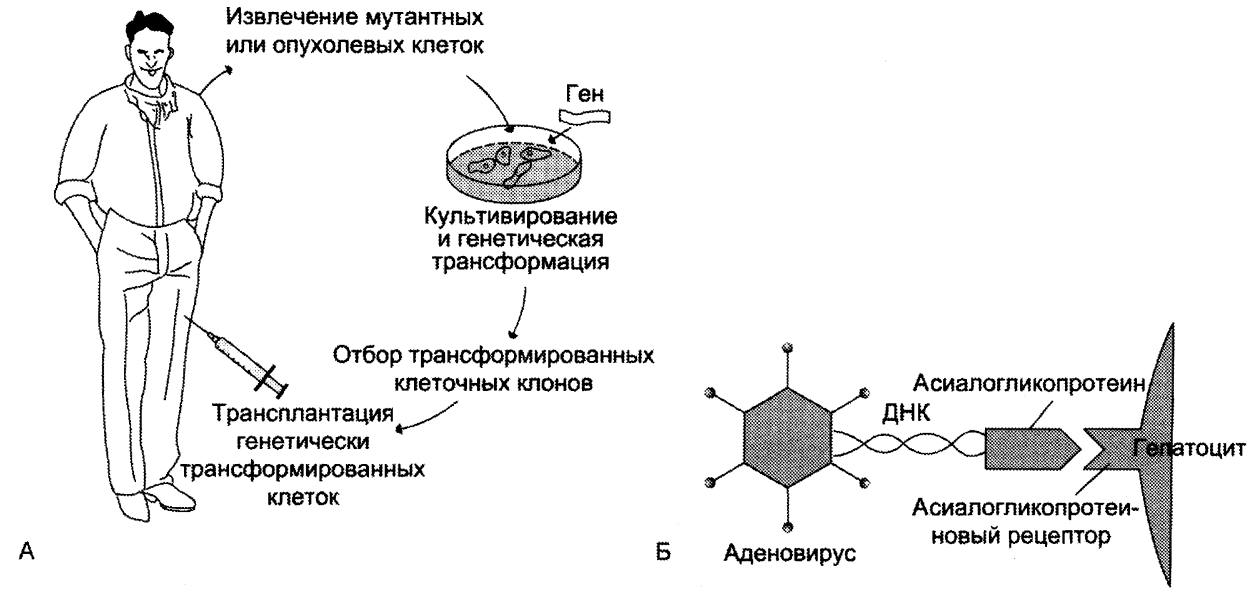


Рис. 4-72. Введение чужеродного гена *ex vivo* (А) и *in vivo* (Б). А. Введение чужеродного «лечебного» гена в организм больного в составе клеток, содержащих этот ген. Б. Введение «лечебного» гена в составе конструкции, содержащей: ДНК, включающую этот ген; белок (например асиалогликопротеин), взаимодействующий с соответствующим рецептором на мембране клеток; вирусный вектор (аденовирус), обеспечивающий длительную экспрессию «лечебного» гена.

В целях предотвращения распространения дефектных генов в популяции людей и рождения детей с наследственными патологиями во многих странах мира работают генетические консультанты, а также проводят пренатальную диагностику, позволяющую оценить здоровье плода с использованием анализа ДНК на самых ранних стадиях развития.

РАЗДЕЛ 5

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Все клетки имеют мембраны. Кроме того, почти во всех эукариотических клетках существуют органеллы, каждая из которых имеет свою мембрану. Мембраны ответственны за выполнение многих важнейших функций клетки. Согласованное функционирование мембранных систем — рецепторов, ферментов, транспортных механизмов помогает поддерживать гомеостаз клетки и в то же время быстро реагировать на изменения внешней среды.

К основным функциям мембран можно отнести:

- отделение клетки от окружающей среды и формирование внутриклеточных компартментов (отсеков);
- контроль и регулирование транспорта огромного разнообразия веществ через мембраны;
- участие в обеспечении межклеточных взаимодействий, передаче внутрь клетки сигналов;
- преобразование энергии пищевых органических веществ в энергию химических связей молекул АТФ.

I. РОЛЬ МЕМБРАН В МЕТАБОЛИЗМЕ И ИХ РАЗНООБРАЗИЕ

Основные принципы структурной организации всех мембран одинаковы, однако одна из самых характерных особенностей — огромное их разнообразие. Мембраны органелл эукариотических клеток уникальны по своему составу и по характеру выполняемых функций.

Плазматическая мембрана

Плазматическая мембрана, окружающая каждую клетку, определяет её величину, обеспечивает транспорт малых и больших молекул из клетки и в клетку, поддерживает разницу концентраций ионов по обе стороны мембраны. Мембрана участвует в межклеточных контактах, воспринимает, усиливает и передаёт внутрь клетки сигналы внешней среды. С мембраной связаны многие ферменты, катализирующие биохимические реакции.

Ядерная мембрана

Ядерная оболочка состоит из внешней и внутренней ядерных мембран. Ядерная оболочка имеет поры, через которые РНК проникают из ядра в цитоплазму, а регуляторные белки из цитоплазмы в ядро.

Внутренняя ядерная мембрана содержит специфические белки, имеющие участки связывания основных полипептидов ядерного матрикса — ламина А, ламина В и ламина С. Важная функция этих белков — дезинтеграция ядерной оболочки в процессе митоза.

Мембрана эндоплазматического ретикулума (ЭР)

Мембрана ЭР имеет многочисленные складки и изгибы. Она образует непрерывную поверхность, ограничивающую внутреннее пространство, называемое полостью ЭР. Шероховатый ЭР связан с рибосомами, на которых происходит синтез белков плазматической мембраны, ЭР, аппарата Гольджи, лизосом, а также секретируемых белков. Области ЭР, не содержащие рибосом, называют гладким ЭР. Здесь происходит завершающий этап биосинтеза холестерина, фосфолипидов, реакции окисления собственных метаболитов и чужеродных веществ с участием мембранных ферментов — цитохрома P_{450}, цитохром P_{450} редуктазы, цитохром b_5 редуктазы и цитохрома b_5 (см. раздел 12).

Аппарат Гольджи

Аппарат Гольджи — важная мембранная органелла, отвечающая за модификацию, накопление, сортировку и направление различных веществ в соответствующие внутриклеточные компартменты, а также за пределы клетки. Специфические ферменты мембраны комплекса Гольджи, гликозилтрансферазы, гликозилируя белки по остаткам серина, треонина или амидной группе аспарагина, завершают образование сложных белков — гликопротеинов.

Митохондриальные мембраны

Митохондрии — органеллы, окружённые двойной мембраной, специализирующиеся на синтезе АТФ путём окислительного фосфорилирования. Отличительная особенность внешней митохондриальной мембраны — содержание большого количества белка порина, образующего поры в мембране. Благодаря порину внешняя мембрана свободно проницаема для неорганических ионов, метаболитов и даже небольших молекул белков (меньше 10 кД). Для больших белков внешняя мембрана непроницаема, это позволяет митохондриям удерживать белки межмембранного пространства от утечки в цитозоль.

Для внутренней мембраны митохондрий характерно высокое содержание белков, около 70%, которые выполняют в основном каталитическую и транспортную функции. Транслоказы мембраны обеспечивают избирательный перенос веществ из межмембранного пространства в матрикс и в обратном направлении, ферменты участвуют в транспорте электронов (цепи переноса электронов) и синтезе АТФ. Подробно строение и функционирование ферментов цепи переноса электронов рассмотрено в разделе 6.

Мембрана лизосом

Мембрана лизосом играет роль «щита» между активными ферментами (более 50), обеспечивающими реакции распада белков, углеводов, жиров, нуклеиновых кислот, и остальным клеточным содержимым. Мембрана содержит уникальные белки, например АТФ-зависимую протонную помпу (насос), которая поддерживает кислую среду (pH 5), необходимую для действия гидролитических ферментов (протеаз, липаз), а также транспортные белки, позволяющие продуктам расщепления макромолекул покидать лизосому. Большинство белков лизосомальной мембраны сильно гликозилированы, углеводные составляющие, находящиеся на внутренней поверхности мембраны, защищают их от действия протеаз.

А. Строение и состав мембран

Биологические мембраны представляют собой «ансамбли» липидных и белковых молекул, удерживаемых вместе с помощью нековалентных взаимодействий.

Основу мембраны составляет **двойной липидный слой**, в формировании которого участвуют фосфолипиды и гликолипиды. Липидный бислой образован двумя рядами липидов, гидрофобные радикалы которых спрятаны внутрь, а гидрофильные группы обращены наружу и контактируют с водной средой. Белковые молекулы как бы «растворены» в липидном бислое (рис. 5-1).

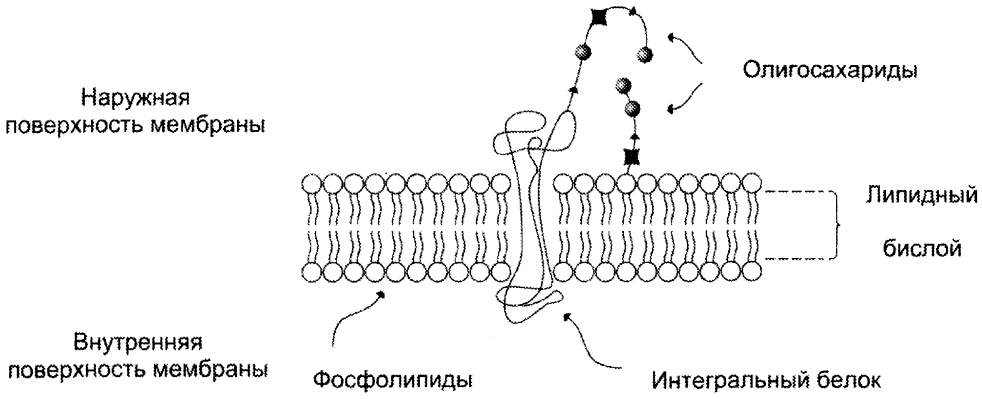


Рис. 5-1. Поперечный разрез плазматической мембраны.

1. Структура и свойства липидов мембран

Мембранные липиды — **амфифильные** (амфипатические) **молекулы**, т.е. в молекуле есть как гидрофильные группы (полярные «головки»), так и алифатические радикалы (гидрофобные «хвосты»), самопроизвольно формирующие бислой. В большинстве эукариотических клеток они составляют около 30—70% массы мембраны (рис. 5-2). В мембранах присутствуют липиды трёх главных типов — фосфолипиды, гликолипиды и холестерол (холестерин).

Липидный состав мембран различен, содержание того или другого липида, по-видимому, определяется разнообразием функций, выполняемых этими липидами в мембранах.

Фосфолипиды. Все фосфолипиды можно разделить на 2 группы — глицерофосфолипиды и сфингофосфолипиды. Глицерофосфолипиды относят к производным фосфатидной кислоты. Наиболее распространённые глицерофосфолипиды мембран — фосфатидилхолины и фосфатидилэтаноламины (рис. 5-3). В мембранах эукариотических клеток обнаружено огромное количество разных фосфолипидов, причём они распределены неравномерно по разным клеточным мембранам. Эта неравномерность относится к распределению как полярных «головок» (табл. 5-1), так и ацильных остатков (табл. 5-2).

Каждый глицерофосфолипид, например фосфатидилхолин, представлен несколькими десятками фосфатидилхолинов, отличающихся друг от друга строением жирно-кислотных остатков.

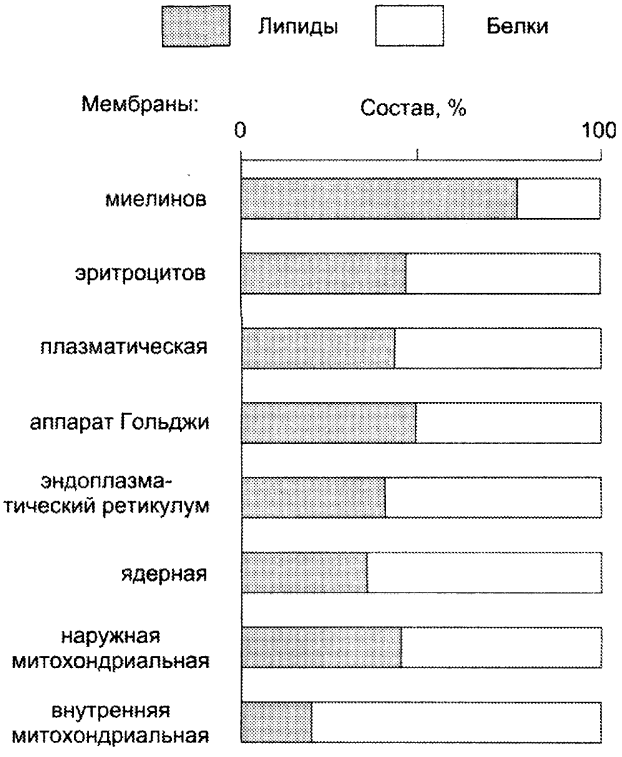


Рис. 5-2. Содержание липидов и белков в различных клеточных мембранах (%).

На долю глицерофосфолипидов (полярная группа — инозитол) приходится лишь 2—8% всех фосфолипидов, содержащихся в клеточной мембране эукариотов. Инозитол в составе фосфатидилинозитолов может быть фосфорилирован по C_4 (фосфатидилинозитол-4-монофосфат) или C_4 и C_5 (фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат).

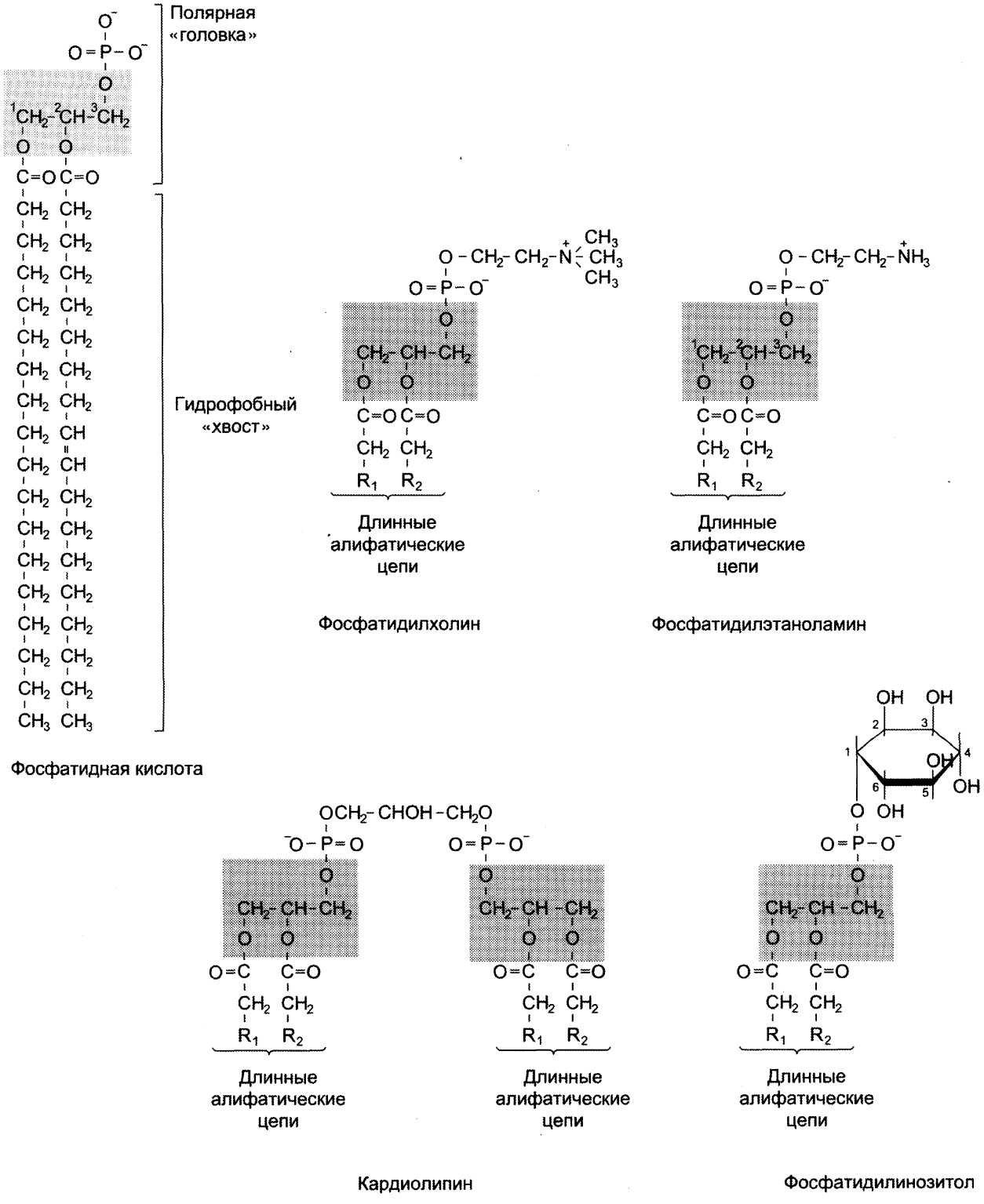


Рис. 5-3. Глицерофосфолипиды мембран.

Таблица 5-1. Фосфолипидный состав клеточных органелл и плазматической мембраны гепатоцитов

Фосфолипиды с разным строением полярных «головок»	Доля от суммарного количества фосфолипидов, %				
	мито-хондрии	лизосомы	ядерная мембрана	мембраны аппарата Гольджи	плазматическая мембрана
Кардиолипин	18	1	4	1	1
Фосфатидилэтаноламин	35	14	13	20	23
Фосфатидилхолин	40	40	55	50	39
Фосфатидилинозитол	5	5	10	12	8
Фосфатидилсерин	1	2	3	6	9
Фосфатидная кислота	–	1	2	1	1
Сфингомиелин	1	20	3	8	16

Таблица 5-2. Жирно-кислотный состав некоторых мембран печени

Жирные кислоты, % (по массе)	Мембранная фракция				
	Мембраны митохондрий		ЭР	Аппарат Гольджи	Плазматическая мембрана
	наружная	внутренняя			
Миристиновая 14:0	0,4	0,3	0,4	0,9	0,9
Пальмитиновая 16:0	4,0	3,6	3,1	–	–
Пальмито-олеиновая 16:1	21,0	18,0	26,5	22,5	31,2
Стеариновая 18:0	13,5	15,8	14,9	18,5	12,9
Арахидоновая 20:4	15,7	18,5	14,0	14,5	11,1
Цервоновая 22:6	3,5	3,8	0,7	–	–

В состав фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатов входят в основном ацильные остатки стеариновой или пальмитиновой (по первому положению глицерола) и арахидоновой (по второму положению) жирных кислот.

Специфические фосфолипиды внутренней мембраны митохондрий — кардиолипины (дифосфатидилглицеролы), построенные на основе глицерола и двух остатков фосфатидной кислоты. Они синтезируются ферментами внутренней мембраны митохондрий и составляют около 22% от всех фосфолипидов мембраны.

В плазматических мембранах клеток в значительных количествах содержатся сфингомиелины (рис. 5-4). Сфингомиелины построены на основе церамида — ацилированного аминоспирта сфингозина. Полярная группа состоит из остатка фосфорной кислоты и холина, этаноламина или серина. Сфингомиелины — главные липиды миелиновой оболочки нервных волокон.

Гликолипиды. В гликолипидах гидрофобная часть представлена церамидом. Гидрофильная группа — углеводный остаток, присоединённый гликозидной связью к гидроксильной группе у

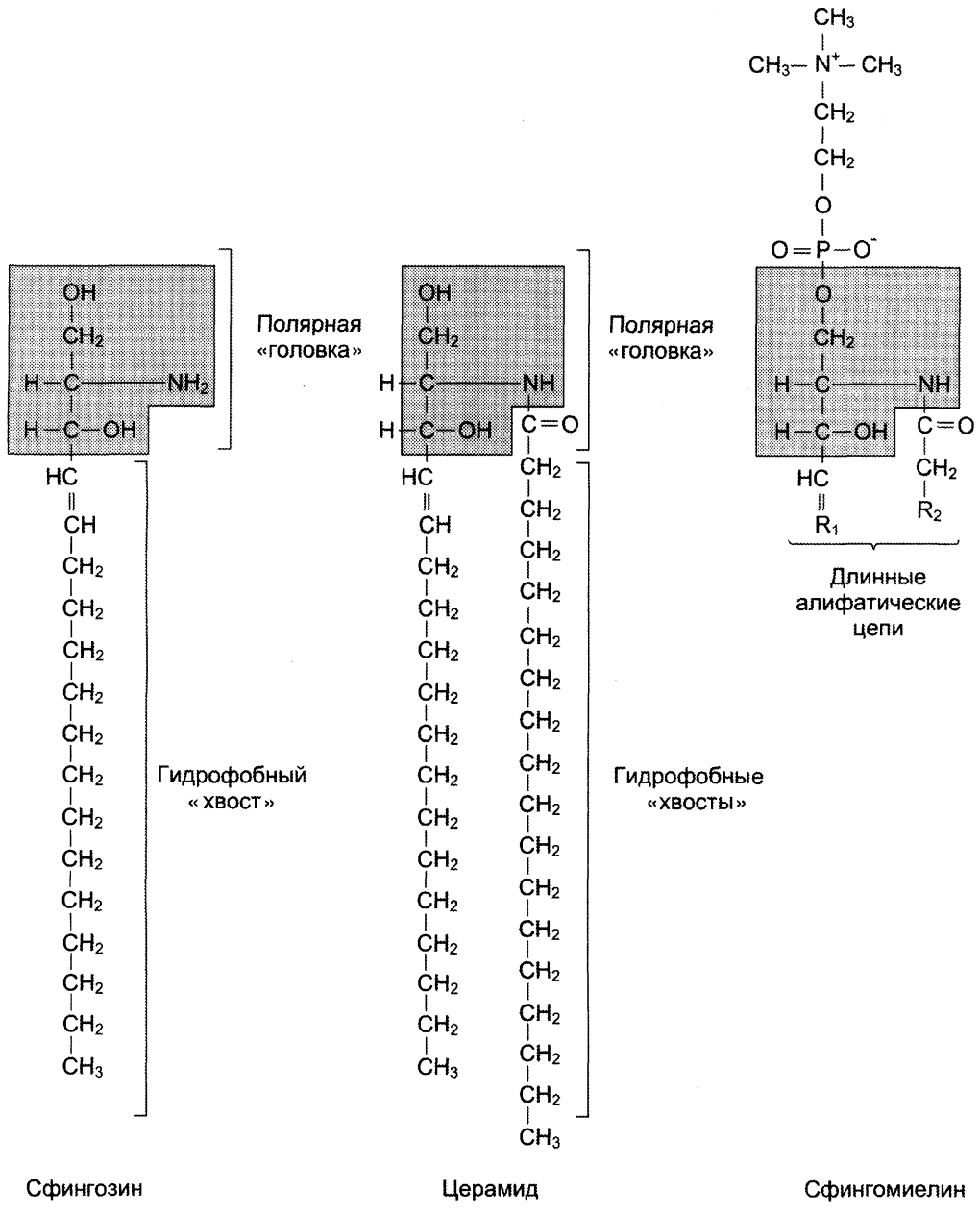


Рис. 5-4. Сфингофосфолипиды — производные церамида.

первого углеродного атома церамида (рис. 5-5). В зависимости от длины и строения углеводной части различают **цереброзиды**, содержащие моно- или олигосахаридный остаток, и **ганглиозиды**, к ОН-группе которых присоединён сложный, разветвлённый олигосахарид, содержащий N-ацетилнейраминовую кислоту (NANA) (см. раздел 7).

Полярные «головки» гликосфинголипидов находятся на наружной поверхности плазматических мембран. В значительных количествах гликолипиды содержатся в мембранах клеток мозга, эритроцитов, эпителиальных клеток. Ганглиозиды эритроцитов разных индивидуумов различаются строением олигосахаридных цепей, проявляющих антигенные свойства.

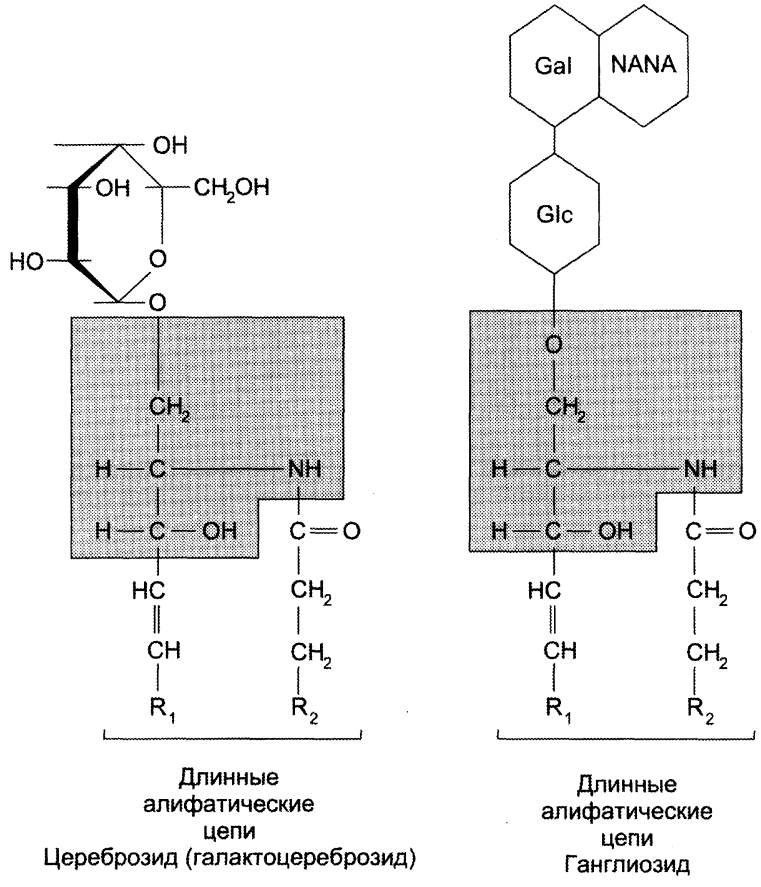


Рис. 5-5. Гликолипиды. Gal — галактоза; Glc — глюкоза; NANA (NeuAc) — N-ацетилнейраминовая или сиаловая кислота.

Холестерол. Холестерол присутствует во всех мембранах животных клеток. Его молекула состоит из жёсткого гидрофобного ядра и гибкой углеводородной цепи, единственная гидроксильная группа является «полярной головкой» (рис. 5-6).

Для животной клетки среднее молярное отношение холестерол/фосфолипиды равно 0,3—0,4, но в плазматической мембране это соотношение гораздо выше (0,8—0,9). Наличие холестерола в мембранах уменьшает подвижность жирных кислот, снижает латеральную диффузию липидов и белков, и поэтому может влиять на функции мембранных белков.

В составе мембран растений холестерола нет, а присутствуют растительные стероиды — ситостерол и стигмастерол.

2. Трансмембранная асимметрия липидов

Каждая мембрана клетки замкнута, т.е. имеет внутреннюю и внешнюю поверхности, различающиеся по липидному и белковому составам — эту особенность мембран называют **трансмембранной** (поперечной) **асимметрией**.

Липидная асимметрия возникает прежде всего потому, что липиды с более объёмными полярными «головками» стремятся находиться в наружном монослое, так как там площадь поверхности, приходящаяся на полярную «головку», больше. Фосфатидилхолины и сфингомиелины локализованы преимущественно в наружном монослое, а фосфатидилэтаноламины и фосфатидилсерины в основном во внутреннем.

Липиды в некоторых биологических мембранах с довольно большой частотой мигрируют с одной стороны мембраны на другую, т.е. совершают «флип-флоп» (от англ. *flip—flop*) перескоки (рис. 5—7). Перемещение липидных молекул затрудняют полярные «головки», поэтому липиды, находящиеся на внутренней стороне мембраны, имеют относительно высокую ско-

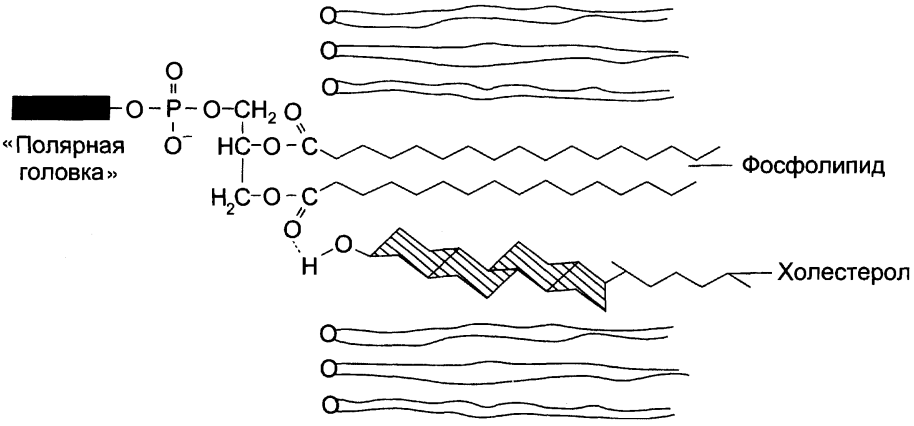


Рис. 5-6. Положение молекулы холестерола в мембране. Молекула холестерола располагается в липидном слое мембраны параллельно алифатическим цепям молекул фосфо- и гликолипидов. Гидроксильная группа холестерола контактирует с гидрофильными «головками» этих липидов.

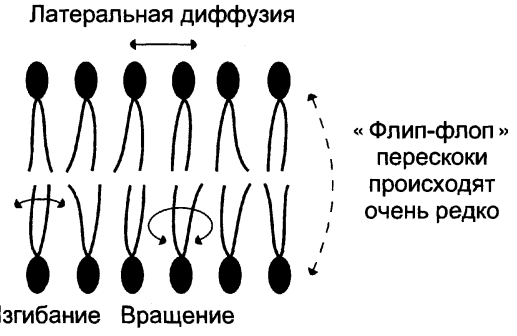


Рис. 5-7. Типы движений липидных молекул в бислое мембран.

рость трансмембранной миграции по сравнению с липидами наружной стороны мембраны, мигрирующих медленнее или вообще не совершающими «флип-флоп» перескоки.

3. Жидкостность мембран

Для мембран характерна жидкостность (текучесть), способность липидов и белков к латеральной диффузии. Скорость перемещения молекул зависит от микровязкости мембран, которая, в свою очередь, определяется относительным содержанием насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в составе липидов. Микровязкость меньше, если в составе липидов преобладают ненасыщенные жирные кислоты, и больше при высоком содержании насыщенных жирных кислот.

Ацильные (алифатические) остатки ненасыщенных жирных кислот имеют так называемые «изломы» (см. раздел 8). Эти «изломы» препятствуют слишком плотной упаковке молекул в мембране и делают её более рыхлой, а следовательно и более «текучей». На текучесть мембран также влияют размеры углеводородных «хвостов» липидов, с увеличением длины которых мембрана становится более «текучей».

4. Функции мембранных липидов

Фосфо- и гликолипиды мембран, помимо участия в формировании липидного бислоя, выполняют ряд других важных функций.

Липиды формируют среду для функционирования мембранных белков, принимающих в ней нативную конформацию. Выделенные из мембран ферменты, лишённые липидного окружения, как правило, не проявляют каталитической активности.

Некоторые мембранные липиды — предшественники вторичных посредников при передаче гормонального сигнала. Так, фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат ($ФИФ_2$) под действием фермента фосфолипазы С гидролизуется до диацилглицерола (ДАГ), активатора протеинкиназы С и инозитол-1,4,5-трифосфата ($ИФ_3$) — регулятора кальциевого обмена в клетке (рис. 5-8). ДАГ, $ИФ_3$, протеинкиназа С и Ca^{2+} — участники инозитолфосфатной системы передачи сигнала.

Кроме того, некоторые липиды выполняют «якорную» функцию, например к фосфатидилинозитолам через олигосахарид могут присоединяться специфические белки наружной поверх-

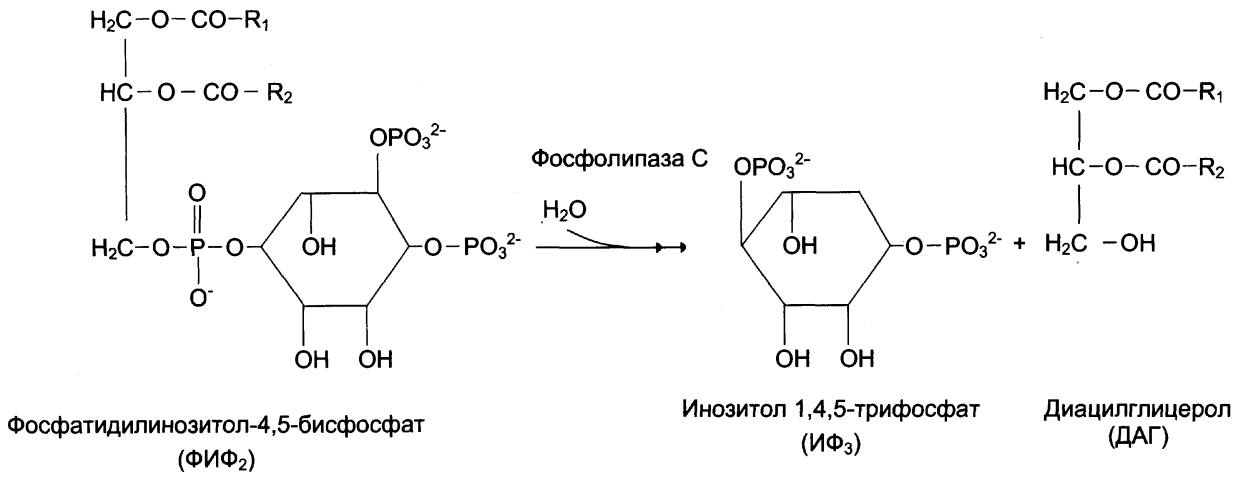


Рис. 5-8. Гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата.

ности клетки (рис. 5-9). Фосфатидилинозитол с присоединённым к нему олигосахаридом (гликаном) называют фосфатидилинозитолгликаном.

Связь белков с этой молекулой (гликаном) осуществляется через фосфоэтаноламин. Пример такого «заякоренного» белка — ацетилхолинэстераза, катализирующая гидролиз ацетилхолина в синаптической щели. Этот фермент фиксируется на постсинаптической мембране, ковалентно присоединяясь к фосфатидилинозитолгликану. Под действием фосфолипазы С может происходить отделение белков от внешней поверхности клетки.

Липиды могут быть аллостерическими активаторами мембранных ферментов. Например, β-гидроксибутиратдегидрогеназа, участвующая в окислении кетоновых тел (см. раздел 8), локализована на внутренней мембране митохондрий. Каталитическая активность фермента проявляется только в присутствии фосфатидилхолина.

Фермент **протеинкиназа С** катализирует реакции фосфорилирования белков по аминокис-

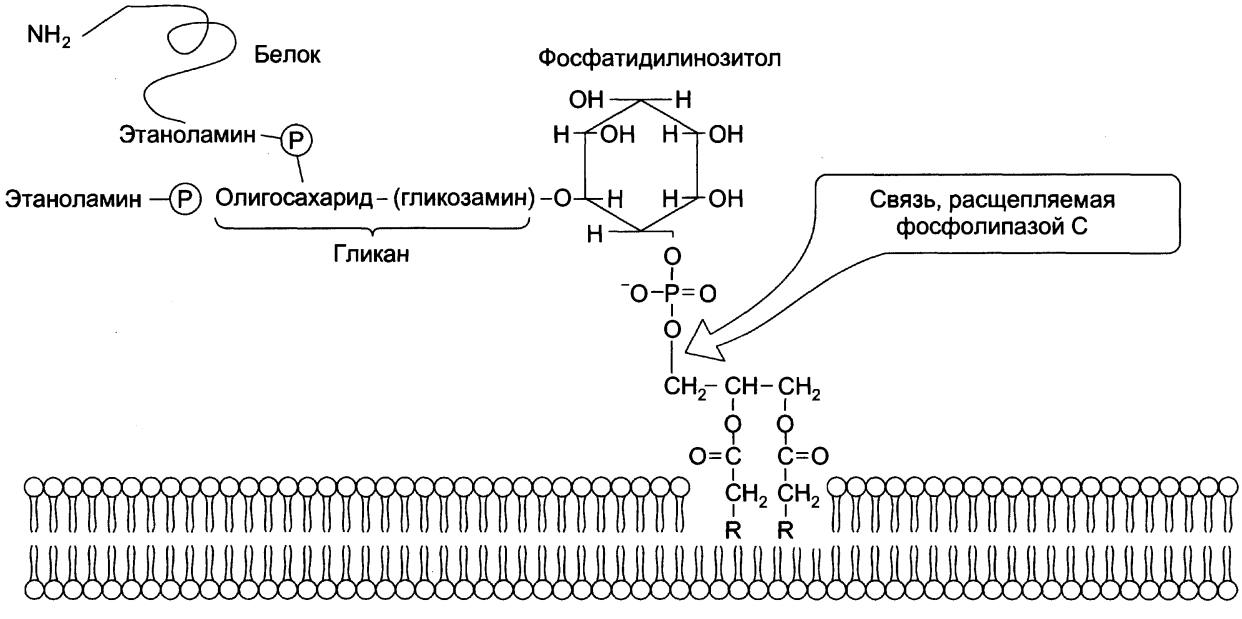


Рис. 5-9. «Якорная» функция фосфатидилинозитолгликанов.

лотным остаткам серина и треонина. В неактивной форме протеинкиназа С находится в цитозоле. Однако после стимуляции клетки (повышение в клетке концентрации кальция) фермент быстро активируется ионами кальция и оказывается связанным с мембраной. Функционально активная протеинкиназа С — комплекс, содержащий мономер фермента, молекулу диацилглицерола, один или более ионов Ca^{2+} и четыре молекулы фосфатидилсерина.

Креатинкиназа, фермент катализирующий образование макроэргического соединения креатинфосфата (см. раздел 9). Для проявления его активности требуется специфическое взаимодействие с кардиолипином внутренней мембраны митохондрий.

II. БЕЛКИ МЕМБРАН

Если основная роль липидов в составе мембран заключается в стабилизации бислоя, то белки отвечают за функциональную активность мембран. Одни из них обеспечивают транспорт определённых молекул и ионов, другие являются ферментами, третьи участвуют в связывании цитоскелета с внеклеточным матриксом или служат рецепторами для гормонов, медиаторов, эйкозаноидов, липопротеинов, оксида азота (NO). На долю белков приходится от 30 до 70% массы мембран. Белки определяют особенности функционирования каждой мембраны.

Особенности строения и локализации белков в мембранах

Мембранные белки, контактирующие с гидрофобной частью липидного бислоя, должны быть амфифильными. Те участки белка, которые взаимодействуют с углеводородными цепями жирных кислот, содержат преимущественно неполярные аминокислоты. Участки белка, находящиеся в области полярных «головок», обогащены гидрофильными аминокислотными остатками.

Белки мембран различаются по своему положению в мембране (рис. 5-10). Они могут глубоко проникать в липидный бислой или даже пронизывать его — **интегральные белки**, либо разными способами прикрепляться к мембране — **поверхностные белки**.

Поверхностные белки

Поверхностные белки часто прикрепляются к мембране, взаимодействуя с интегральными

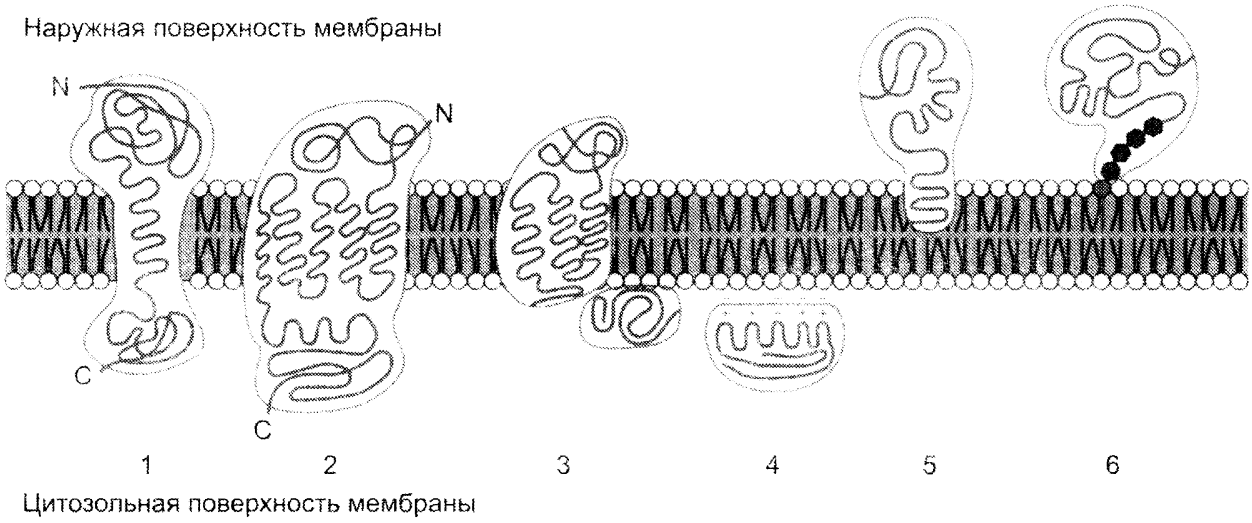


Рис. 5-10. Расположение (локализация) белков в мембранах. Трансмембранные белки, например: 1 — гликофорин А; 2 — рецептор адреналина. Поверхностные белки: 3 — белки, связанные с интегральными белками, например, фермент сукцинатдегидрогеназа; 4 — белки, присоединённые к полярным «головкам» липидного слоя, например, протеинкиназа С; 5 — белки, «заякоренные» в мембране с помощью короткого гидрофобного концевого домена, например, цитохром b_5; 6 — «заякоренные» белки, ковалентно соединённые с липидом мембраны (например, фермент щелочная фосфатаза).

белками или поверхностными участками липидного слоя.

Белки, образующие комплексы с интегральными белками мембраны

Ряд пищеварительных ферментов, участвующих в гидролизе крахмала и белков, прикрепляется к интегральным белкам мембран микроворсинок кишечника.

Примерами таких комплексов могут быть сахараза-изомальтаза и мальтаза-гликоамилаза (см. раздел 7). Возможно, связь этих пищеварительных ферментов с мембраной позволяет с высокой скоростью гидролизовать субстраты и усваивать продукты гидролиза клеткой.

Белки, связанные с полярными «головками» липидов мембран

Полярные или заряженные домены белковой молекулы могут взаимодействовать с полярными «головками» липидов, образуя ионные и водородные связи. Кроме того, множество растворимых в цитозоле белков при определённых условиях могут связываться с поверхностью мембраны на непродолжительное время. Иногда связывание белка — необходимое условие проявления ферментативной активности. К таким белкам, например, относят протеинкиназу С, факторы свёртывания крови.

Закрепление с помощью мембранного «якоря»

«Якорем» может быть неполярный домен белка, построенный из аминокислот с гидрофобными радикалами. Примером такого белка может служить цитохром b_5 мембраны ЭР. Этот белок участвует в окислительно-восстановительных реакциях, как переносчик электронов (см. раздел 12).

Роль мембранного «якоря» может выполнять также ковалентно связанный с белком остаток жирной кислоты (миристиновой — C_{14} или пальмитиновой — C_{16}). Белки, связанные с жирными кислотами, локализованы в основном на внутренней поверхности плазматической мембраны. Миристиновая кислота присоединяется к N-концевому глицину с образованием амидной связи. Пальмитиновая кислота образует тиоэфирную связь с цистеином или сложноэфирную с остатками серина и треонина.

Небольшая группа белков может взаимодействовать с наружной поверхностью клетки с помощью ковалентно присоединённого к С-концу белка фосфатидилинозитолгликана. Этот «якорь» — часто единственное связующее звено между белком и мембраной, поэтому при действии фосфолипазы С этот белок отделяется от мембраны.

Трансмембранные (интегральные) белки

Некоторые из трансмембранных белков пронизывают мембрану один раз (гликофорин), другие имеют несколько участков (доменов), последовательно пересекающих бислой (рис. 5-11).

Трансмембранные домены, пронизывающие бислой, имеют конформацию α-спирали. Полярные остатки аминокислот обращены внутрь гло-

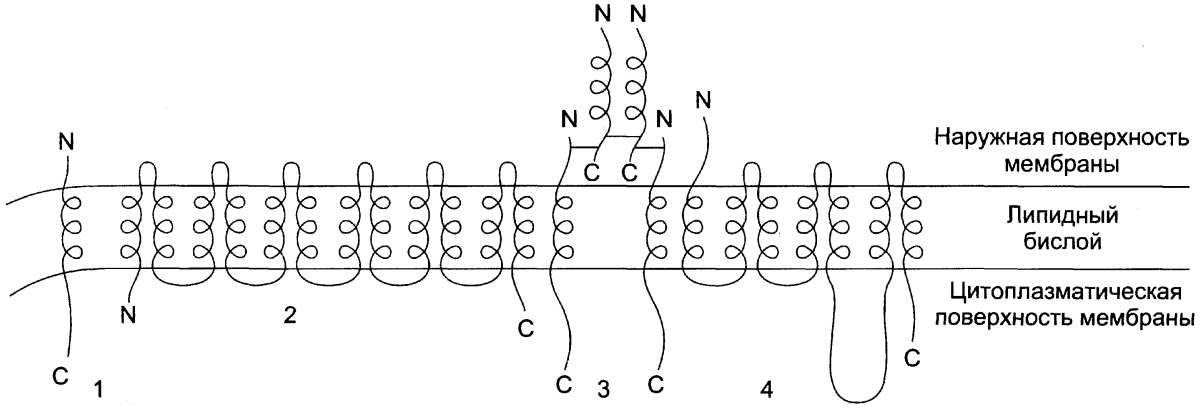


Рис. 5-11. Интегральные белки мембран, содержащие от 1 до 12 трансмембранных доменов. 1 – рецептор ЛПНП; 2 – ГЛЮТ-1 — транспортёр глюкозы; 3 – рецептор инсулина; 4 – адренорецептор.

булы, а неполярные контактируют с мембранными липидами. Такие белки называют «вывернутыми» по сравнению с растворимыми в воде белками, в которых большинство гидрофобных остатков аминокислот спрятано внутрь, а гидрофильные располагаются на поверхности (рис. 5-12).

Радикалы заряженных аминокислот в составе этих доменов лишены заряда и протонированы (-COOH) или депротонированы ($-NH_2$).

Гликозилированные белки

Поверхностные белки или домены интегральных белков, расположенные на наружной поверхности всех мембран, почти всегда гликозилированы. Олигосахаридные остатки могут быть присоединены через амидную группу аспарагина или гидроксильные группы серина и треонина (рис. 5-13).

Олигосахаридные остатки защищают белок от протеолиза, участвуют в узнавании лигандов или адгезии.

Латеральная диффузия белков

Некоторые мембранные белки перемещаются вдоль бислоя (**латеральная диффузия**) или поворачиваются вокруг оси, перпендикулярно его поверхности.

Например, фермент фосфолипаза A_2, связываясь с цитоплазматической поверхностью мембраны, может латерально перемещаться по поверхности бислоя и гидролизовать несколько тысяч фосфолипидов в минуту до тех пор, пока не отделится от мембраны.

Латеральная диффузия интегральных белков в мембране ограничена, это связано с их большими размерами, взаимодействием с другими мембранными белками, элементами цитоскелета или внеклеточного матрикса.

Белки мембран не совершают перемещений с одной стороны мембраны на другую («флип-флоп» перескоки), подобно фосфолипидам.

III. ПЕРЕНОС ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ

Любая молекула может пройти через липидный бислой, однако скорость **пассивной диффузии** веществ, т.е. перехода вещества из области с большей концентрацией в область с меньшей, может сильно отличаться. Для некоторых молекул это занимает столь длительное время, что

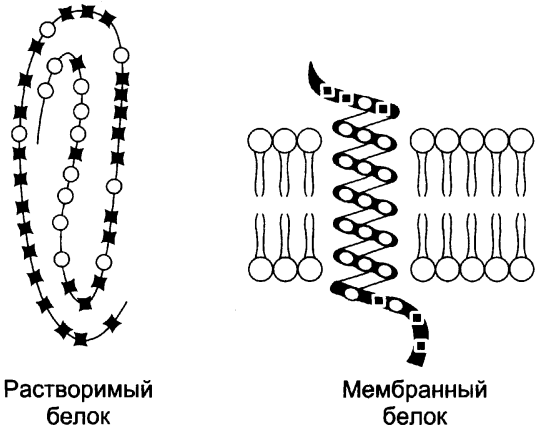


Рис. 5-12. Локализация неполярных (незакрашенные кружки) и полярных (закрашенные квадраты) аминокислот в растворимых и мембранных белках.

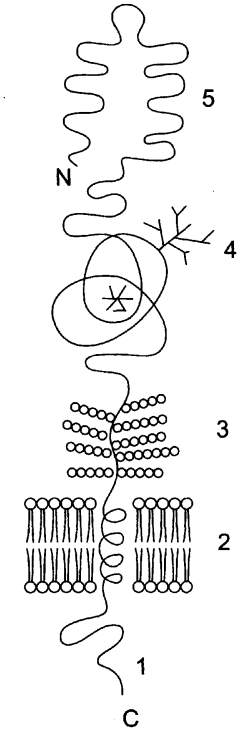


Рис. 5-13.Строение рецептора липопротеина низкой плотности (ЛПНП). 1 — внутриклеточный домен; 2 — трансмембранный домен; 3 — олигосахаридные остатки, присоединённые к ОН-группам серина или треонина; 4 — олигосахаридные остатки, присоединённые через амидную группу аспарагина; 5 — ЛПНП-связывающий домен.

можно говорить об их практической непроницаемости для липидного бислоя мембраны. Скорость диффузии веществ через мембрану зависит главным образом от размера молекул и их относительной растворимости в жирах.

Легче всего проходят **простой диффузией** через липидную мембрану малые неполярные молекулы, такие как O_2, стероиды, тиреоидные гормоны, а также жирные кислоты. Малые полярные незаряженные молекулы — CO_2, NH_3, H_2O, этанол, мочевина — также диффундируют с достаточно большой скоростью. Диффузия глицерола идёт значительно медленнее, а глюкоза практически не способна самостоятельно пройти через мембрану. Для всех заряженных молекул, независимо от размера, липидная мембрана непроницаема.

Транспорт таких молекул возможен благодаря наличию в мембранах либо белков, формирующих в липидном слое каналы (поры), заполненные водой, через которые могут проходить вещества определённого размера простой диффузией, либо специфических белков-переносчиков, которые избирательно взаимодействуя с определёнными лигандами, облегчают их перенос через мембрану (**облегчённая диффузия**).

Кроме пассивного транспорта веществ, в клетках есть белки, активно перекачивающие определённые растворённые в воде вещества против их градиента, т.е. из меньшей концентрации в область большей. Этот процесс, называемый **активным транспортом**, осуществляется всегда с помощью белков-переносчиков и происходит с затратой энергии.

А. Строение и функционирование белковых каналов

Каналы в мембране формируются интегральными белками, которые «прерывают» липидный бислой, образуя пору, заполненную водой. Стенки канала «выстилаются» радикалами аминокислот этих белков.

Если каналы различают вещества только по размеру и пропускают все молекулы меньше определённой величины, по градиенту концентрации, т.е. служат фильтрами, то их называют «**неселективные каналы**», или «**поры**». Такие поры есть в наружной мембране митохондрий, где молекулы белка-порина образуют широкие гидрофильные каналы. Через них могут проходить все молекулы с молекулярной массой 10 кД и меньше, в том числе и небольшие белки.

Селективные каналы, как правило, участвуют в переносе определённых ионов. Ионная селективность (избирательность) каналов определяется их диаметром и строением внутренней поверхности канала. Например, катионселективные каналы пропускают только катионы, так как содержат много отрицательно заряженных аминокислотных остатков.

Открытие или закрытие селективных каналов регулируется либо изменением концентрации специфических регуляторов, таких как медиаторы, гормоны, циклические нуклеотиды, NO, G-белки, либо изменением трансмембранного электрохимического потенциала (рис. 5-14). Воздействие регуляторного фактора вызывает конформационные изменения каналообразующих белков, канал открывается и ионы проходят по градиенту концентрации. Транспорт веществ через каналы не приводит к конформационным изменениям белков и зависит только от разности концентраций веществ по обе стороны мембраны. Поэтому скорость транспорта веществ через такие каналы может достигать 10^6-10^8 ионов в секунду.

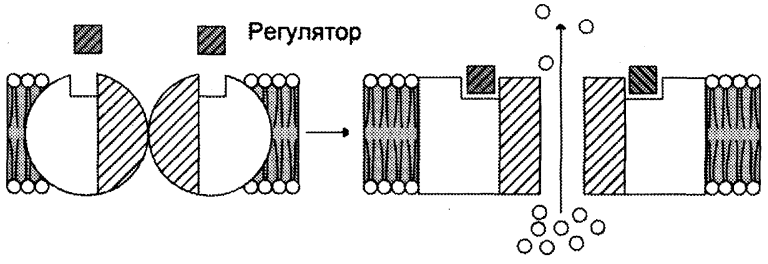


Рис. 5-14. Регулируемый канал. Заштрихованные квадраты — регуляторы, светлые кружки — переносимые ионы.

Б. Облегчённая диффузия веществ

В мембранах клеток существуют **белки-транслоказы**. Взаимодействуя со специфическим лигандом, они обеспечивают его диффузию (транспорт из области большей концентрации в область меньшей) через мембрану. В отличие от белковых каналов, транслоказы в процессе взаимодействия с лигандом и переноса его через мембрану претерпевают конформационные изменения. Кинетически перенос веществ облегчённой диффузией напоминает ферментативную реакцию. Для транслоказ существует насыщающая концентрация лиганда, при которой все центры связывания белка с лигандом заняты, и белки работают с максимальной скоростью V_{max}. Поэтому скорость транспорта веществ облегчённой диффузией зависит не только от градиента концентраций переносимого лиганда, но и от количества белков-переносчиков в мембране.

Существуют транслоказы, переносящие только одно растворимое в воде вещество с одной стороны мембраны на другую. Такой простой транспорт называют «**пассивный унипорт**». Примером унипорта может служить функционирование ГЛЮТ-1 — транслоказы, переносящей глюкозу через мембрану эритроцита (рис. 5-15):

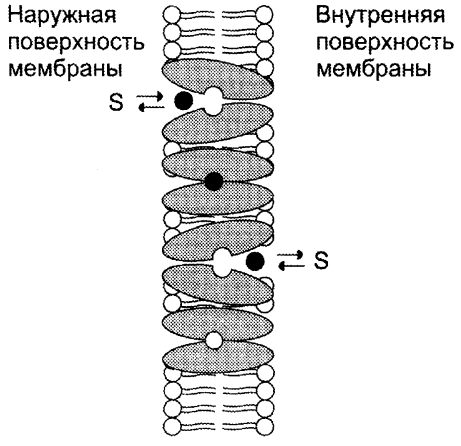


Рис. 5-15. Облегчённая диффузия (унипорт) глюкозы в эритроциты с помощью ГЛЮТ-1 (S — молекула глюкозы). Молекула глюкозы связывается переносчиком на наружной поверхности плазматической мембраны. Происходит конформационное изменение, и центр переносчика, занятый глюкозой, оказывается открытым внутрь клетки. Вследствие конформационных изменений переносчик теряет сродство к глюкозе, и молекула высвобождается в цитозоль клетки. Отделение глюкозы от переносчика вызывает конформационные изменения белка, и он возвращается к исходной конформации.

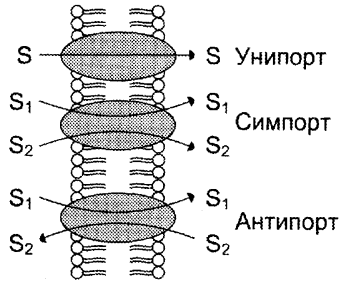


Рис. 5-16. Типы (виды) облегчённой диффузии с участием переносчиков (транслоказ). S_1, S_2 — разные молекулы.

Некоторые транслоказы могут переносить два разных вещества по градиенту концентраций в одном направлении — **пассивный симпорт**, или в противоположных направлениях — **пассивный антипорт** (рис. 5-16).

Примером транслоказы, работающей по механизму пассивного антипорта, может служить анионный переносчик мембраны эритроцитов (рис. 5-17).

Внутренняя митохондриальная мембрана содержит много транслоказ, осуществляющих пассивный антипорт (рис. 5-18). В процессе такого переноса происходит эквивалентный обмен ионами, но не всегда эквивалентный обмен по заряду.

В. Строение и функционирование белков-переносчиков, осуществляющих активный транспорт

Перенос некоторых лигандов (ионов, глюкозы, аминокислот) через мембраны происходит против градиента концентрации и сопряжён с затратой энергии (**активный транспорт**). Перенос лигандов через мембрану, связанный с затратой энергии АТФ, называют «**первично-активный транспорт**».

1. Первично-активный транспорт

Перенос некоторых неорганических ионов идёт против градиента концентрации при участии транспортных АТФ-аз (ионных насосов). Все ионные насосы одновременно служат ферментами, способными к аутофосфорилированию и аутодефосфорилированию. АТФ-азы различаются по ионной специфичности, количеству переносимых ионов, направлению транспорта. В результате функционирования АТФ-азы пе-

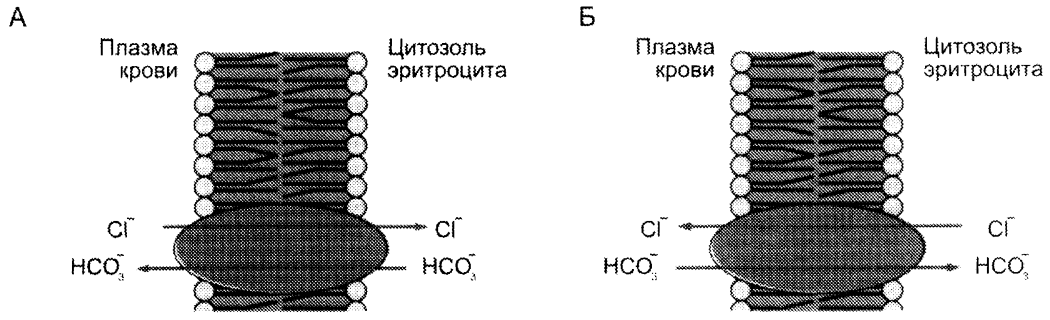


Рис. 5-17. Пассивный антипорт анионов HCO_3^- и Cl^- через мембрану эритроцитов. А – когда эритроцит находится в венозных капиллярах, анион HCO_3^-, образованный при диссоциации угольной кислоты, по градиенту концентрации выходит в кровь. В обмен на каждый транспортируемый из клетки ион HCO_3^- транслоказа переносит в эритроцит ион Cl^-; Б – когда кровь достигает лёгких транслоказа производит обмен ионами в противоположных направлениях. Такая «челночная» система работает очень быстро и обеспечивает удаление CO_2 из организма и в то же время сохранение оптимального значения pH в клетке.

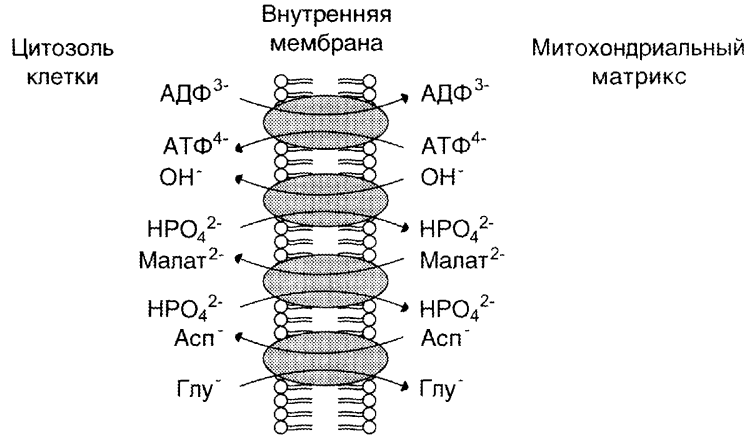


Рис. 5-18. Некоторые митохондриальные переносчики.

реносимые ионы накапливаются с одной стороны мембраны. Наиболее распространены в плазматической мембране клеток человека Na^+,K^+-АТФ-аза, Ca^{2+}-АТФ-аза и H^+,K^+,-АТФ-аза слизистой оболочки желудка.

Na^+, K^+-АТФ-аза

Этот фермент-переносчик катализирует АТФ-зависимый транспорт ионов Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану. Na^+,K^+-АТФ-аза состоит из субъединиц α и β; α — каталитическая большая субъединица, а β — малая субъединица (гликопротеин). Активная форма транслоказы — тетрамер $(\alpha\beta)_2$ (рис. 5-19).

Na^+,K^+-АТФ-аза отвечает за поддержание высокой концентрации K^+ в клетке и низкой концентрации Na^+. Так как Na^+,K^+-АТФ-аза выкачивает три положительно заряженных иона, а закачивает два, то на мембране возникает электрический потенциал с отрицательным значением на внутренней части клетки по отношению к её наружной поверхности.

Ca^{2+}-АТФ-аза

В цитозоле «покоящихся» клеток концентрация Ca^{2+} составляет ~10^{-7} моль/л, тогда как вне клетки она равна ~$2 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Поддерживает такую разницу в концентрации система

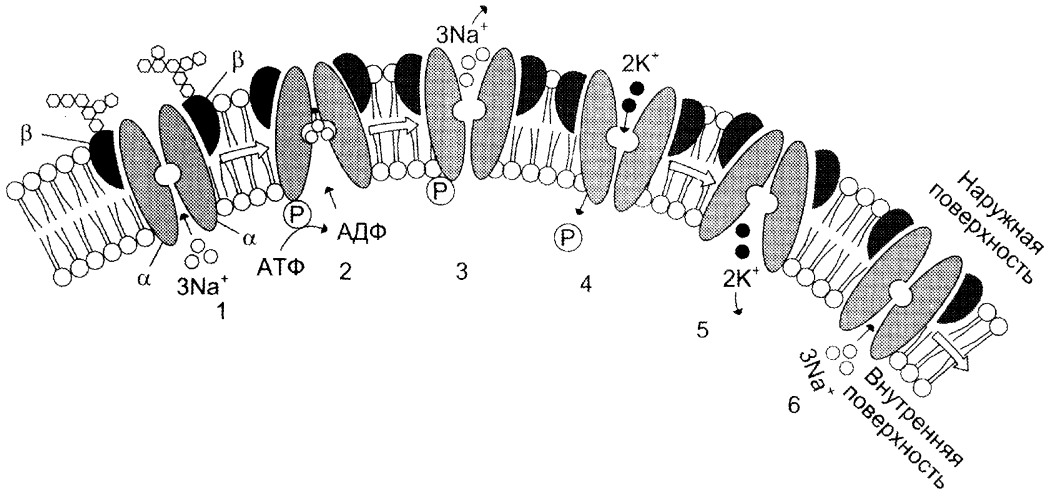


Рис. 5-19. Строение и функционирование Na^+,K^+-АТФ-азы плазматической мембраны. 1 – три иона натрия связываются специфическим центром транслоказы; 2 – изменение конформации транслоказы, вызванное присоединением $3Na^+$, приводит к активации каталитической субъединицы и увеличению сродства активного центра к субстрату (АТФ). Протекает реакция аутофосфорилирования по карбоксильной группе аспарагиновой кислоты; 3 – аутофосфорилирование изменяет заряд и конформацию транслоказы, она закрывается с внутренней стороны мембраны и открывается с наружной, уменьшается сродство к ионам натрия и они диссоциируют от переносчика; 4 – Na^+, K^+-АТФ-аза открытая с наружной стороны мембраны имеет специфический центр связывания для $2K^+$; Присоединение двух ионов калия к фосфорилированной транслоказе вызывает изменение конформации и появление аутофосфатазной активности. Протекает реакция аутодефосфорилирования; 5 – дефосфорилирование изменяет заряд и конформацию транслоказы, она закрывается с наружной стороны мембраны и открывается с внутренней, уменьшается сродство к ионам калия и они диссоциируют от Na^+, K^+-АТФ-азы; 6 – АТФ-аза возвращается в первоначальное состояние.

активного транспорта ионов кальция; её основные компоненты — кальциевые насосы — Ca^{2+}-АТФ-азы и Na^+,Ca^{2+} -обменники.

Ca^{2+}-АТФ-аза локализована не только в плазматической мембране, но и в мембране ЭР. Фермент состоит из десяти трансмембранных доменов, пронизывающих клеточную мембрану. Между вторым и третьим доменами находятся несколько остатков аспарагиновой кислоты, участвующих в связывании кальция. Область между четвёртым и пятым доменами имеет центр для присоединения АТФ и аутофосфорилирования по остатку аспарагиновой кислоты. Ca^{2+}-АТФ-азы плазматических мембран некоторых клеток регулируются белком кальмодулином. Каждая из Ca^{2+}-АТФ-аз плазматической мембраны и ЭР представлена несколькими изоформами.

Работа Ca^{2+}-АТФ-азы цитоплазматической мембраны по стадиям представлена на рис. 5-20.

Нарушение активности Ca^{2+}-АТФ-азы при патологии. Одна из причин нарушения работы Ca^{2+}-АТФ-азы — активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран. Окислению подвергаются как ацильные остатки жирных кислот в составе фосфолипидов, так и SH-группы в активном центре фермента. Нарушение структуры липидного окружения и структуры активного центра приводит к изменению конформации АТФ-азы, потере сродства к ионам кальция и способности к аутофосфорилированию. АТФ-аза перестаёт выкачивать ионы кальция из цитозоля клетки, повышается концентрация внутриклеточного кальция, Ca^{2+} усиливает мышечное сокращение, возрастает тонус мышечной стенки, что приводит к повышению АД. Не последнюю роль нарушение функционирования Ca^{2+}-АТФ-азы играет в развитии атеросклероза, рака, иммунных патологий.

2. Вторично-активный транспорт

Перенос некоторых растворимых веществ против градиента концентрации зависит от одновременного или последовательного переноса

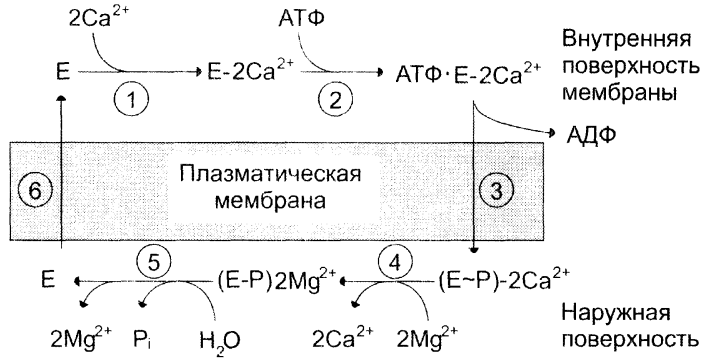


Рис. 5-20. Последовательность событий в процессе работы Ca^{2+}-АТФ-азы. 1 – связывание двух ионов кальция участком АТФ-азы, обращённой в цитозоль; 2 – изменение заряда и конформации фермента (АТФ-азы), вызванное присоединением двух ионов Ca^{2+}, приводит к повышению сродства к АТФ и активации аутофосфорилирования; 3 – аутофосфорилирование сопровождается конформационными изменениями, АТФ-аза закрывается с внутренней стороны мембраны и открывается с наружной; 4 – происходит снижение сродства центров связывания к ионам кальция и они отделяются от АТФ-азы; 5 – аутодефосфорилирование активируется ионами магния, в результате Ca^{2+}-АТФ-аза теряет фосфорный остаток и два иона Mg^{2+}; 6 – АТФ-аза возвращается в исходное состояние.

другого вещества по градиенту концентрации в том же направлении (**активный симпорт**) или в противоположном (**активный антипорт**). В клетках человека ионом, перенос которого происходит по градиенту концентрации, чаще всего служит Na^+.

Примером такого типа транспорта может служить Na^+,Ca^{2+}-обменник плазматической мембраны (активный антипорт), ионы натрия по градиенту концентрации переносятся в клетку, а ионы Ca^{2+} против градиента концентрации выходят из клетки (рис. 5-21).

По механизму активного симпорта происходят всасывание глюкозы клетками кишечника и реабсорбция из первичной мочи глюкозы, аминокислот клетками почек (рис. 5-22).

Г. Перенос через мембрану макромолекул и частиц: эндоцитоз и экзоцитоз

Траспортные белки обеспечивают перемещение через клеточную мембрану полярных молекул небольшого размера, но они не могут транспортировать макромолекулы, например белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды или ещё более крупные частицы. Механизмы, с помощью которых клетки могут усваивать такие вещества или удалять их из клетки, отличаются от механизмов транспорта ионов и полярных соединений.

Эндоцитоз

Перенос вещества из среды в клетку вместе с частью плазматической мембраны называют «**эндоцитоз**». Путём эндоцитоза (фагоцитоза) клетки могут поглощать большие частицы, такие как вирусы, бактерии или обломки клеток. Захват больших частиц осуществляется в основном специализированными клетками — фагоцитами.

Поглощение жидкости и растворённых в ней веществ с помощью небольших пузырьков называют «**пиноцитоз**». Усвоение веществ механизмом эндоцитоза (пиноцитоза) характерно для всех клеток.

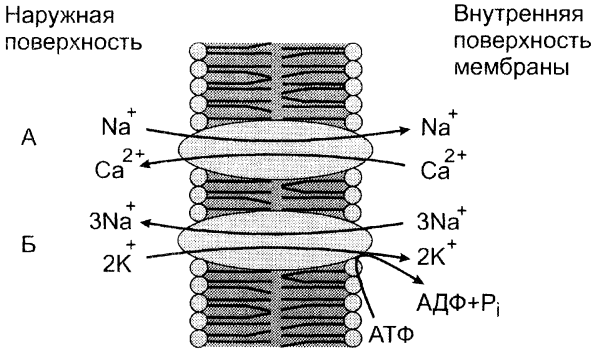


Рис. 5-21. Натрий-зависимый транспорт ионов кальция. А – Na^+-зависимый переносчик ионов кальция; Б – Na^+, K^+-АТФ-аза.

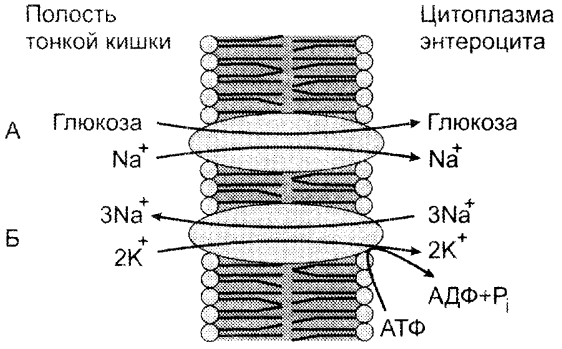


Рис. 5-22 Механизм активного симпорта. А – Na^+ и глюкоза связываются в разных центрах транслоказы. Ионы стремятся войти в клетку по градиенту концентрации и «тащат» глюкозу за собой, если концентрация Na^+ вне клетки уменьшается, транспорт глюкозы в клетки снижается; Б – ионы натрия, проникающие в клетку вместе с глюкозой, «выкачиваются» обратно Na^+,K^+-АТФ-азой, поддерживающей градиент концентрации Na^+ и контролирующей транспорт глюкозы.

Цикл эндоцитоза начинается в определённых участках плазматической мембраны, называемых **«окаймлённые ямки»** (рис. 5-23). На долю окаймлённых ямок приходится всего 1–2% общей площади мембраны. Белок **клатрин** образует решётчатые структуры, связанные с углублениями на поверхности плазматической мембраны.

Окаймлённые ямки втягиваются в клетку, сужаются у основания, отделяются от мембраны, образуя окаймлённые пузырьки (пиноцитозные пузырьки). Время жизни окаймлённых ямок невелико, они формируются в течение минуты, затем совершают цикл эндоцитоза.

Вещества в составе пиноцитозных пузырьков не смешиваются с другими макромолекулами клетки. Они заканчивают свой путь в лизосомах, а мембранные компоненты пузырьков, содержащие клатрин, возвращаются в плазматическую мембрану.

Эндоцитоз, происходящий с участием рецепторов, встроенных в окаймлённые ямки, позволяет клеткам поглощать специфические вещества. Макромолекулы или частицы связываются рецепторами и накапливаются в окаймлённой ямке. Затем следует погружение в клетку и отделение эндоцитозного пузырька, в составе которого находится поглощённое вещество, мембранные компоненты окаймлённой ямки и рецептор. В разные окаймлённые ямки могут быть встроены разные рецепторы.

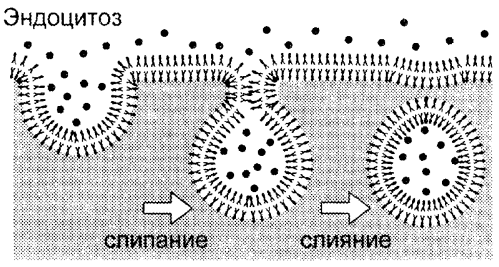


Рис. 5-23. Последовательность событий при образовании окаймлённого пузырька из окаймлённой ямки.

Примером рецептор-зависимого эндоцитоза может служить поступление в клетку холестерола в составе липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) (рис. 5-24).

Количество рецепторов в окаймлённой ямке плазматической мембраны варьирует в зависимости от потребности клетки в холестероле. Нарушение структуры рецепторов ЛПНП (мутации в гене) не позволяет им встраиваться в плазматическую мембрану в область окаймлённой ямки. Положение рецептора вне окаймлённой ямки не снижает его комплементарность к ЛПНП, но эндоцитоз комплекса рецептор-ЛПНП не происходит.

Экзоцитоз

Макромолекулы, например белки плазмы крови, пептидные гормоны, пищеварительные ферменты, белки внеклеточного матрикса, липопротеиновые комплексы, синтезируются в клетках и затем секретируются в межклеточное пространство или кровь. Но мембрана непроницаема для таких макромолекул или комплексов, их секреция происходит путём экзоцитоза. Особенность экзоцитоза в том, что секретируемые вещества локализуются в пузырьках и не смешиваются с другими макромолекулами или органеллами клетки. В ходе экзоцитоза содержимое секреторных пузырьков выделяется во внеклеточное пространство, когда они сливаются с плазматической мембраной.

В организме имеются как регулируемый, так и нерегулируемый пути экзоцитоза. **Нерегулируемая секреция** характеризуется непрерывным синтезом секретируемых белков, упаковкой их в транспортные пузырьки в аппарате Гольджи и переносом к плазматической мембране для

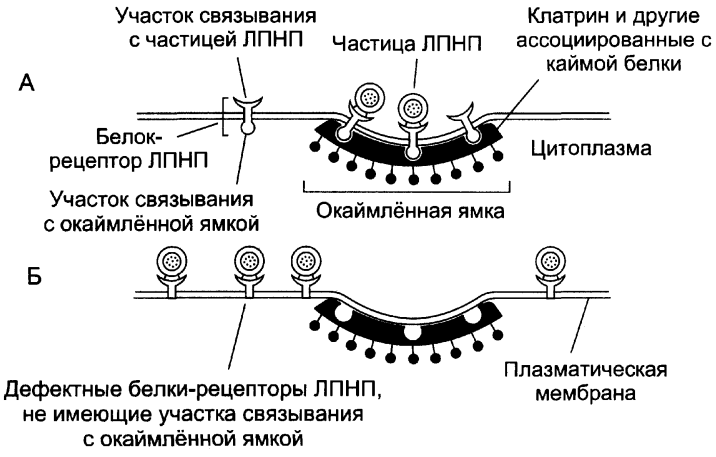


Рис. 5-24. Положение рецепторов ЛПНП в цитоплазматической мембране. А – положение рецепторов ЛПНП в окаймлённой ямке; Б – положение дефектных рецепторов ЛПНП вне окаймлённой ямки.

секреции. Примером может служить синтез и секреция коллагена фибробластами для формирования межклеточного матрикса.

Для регулируемой секреции характерны хранение приготовленных на экспорт молекул в транспортных пузырьках и их слияние с плазматической мембраной только при воздействии на клетку специфического стимула. С помощью регулируемой секреции происходят выделение пищеварительных ферментов в период переваривания пищи, а также секреция гормонов, нейромедиаторов и других биологически активных веществ. Пример такого типа секреции — выброс пептидного гормона инсулина в кровь после еды. Стимулом к секреции инсулина, хранящегося в секреторных гранулах β-клеток островков Лангерханса поджелудочной железы, является повышение концентрации глюкозы в крови и β-клетках (рис.5-25).

IV. УЧАСТИЕ МЕМБРАН В МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ

В плазматической мембране эукариотических клеток содержится множество специализированных рецепторов, которые, взаимодействуя с лигандами, вызывают специфические клеточные ответы. Одни рецепторы связывают сигнальные молекулы — гормоны, нейромедиаторы, другие — питательные вещества и метаболиты, третьи — участвуют в клеточной адгезии. Этот класс включает рецепторы, необходимые для узнавания клетками друг друга и для их адгезии, а также рецепторы, ответственные за связывание клеток с белками внеклеточного матрикса, такими как фибронектин или коллаген.

Способность клеток к специфическому взаимному узнаванию и адгезии важна для эмбрионального развития. У взрослого человека адгезивные взаимодействия «клетка–клетка» и «клетка–матрикс» продолжают оставаться существенными для поддержания стабильности тканей. В многочисленном семействе рецепторов клеточной адгезии наиболее изучены интегрины, селектины и кадгерины.

Интегрины — обширное суперсемейство гомологичных рецепторов клеточной поверхности для молекул межклеточного матрикса, таких как коллаген, фибронектин, ламинин и др. Являясь трансмембранными белками, они взаимодействуют как с внеклеточными молекулами, так и с внутриклеточными белками цитоскелета. Благодаря этому интегрины участвуют в передаче информации из внеклеточной среды в клетку, определяя таким образом направление её дифференцировки, форму, митотическую активность, способность к миграции. Передача информации может идти и в обратном направлении — от внутриклеточных белков через рецептор во внеклеточный матрикс.

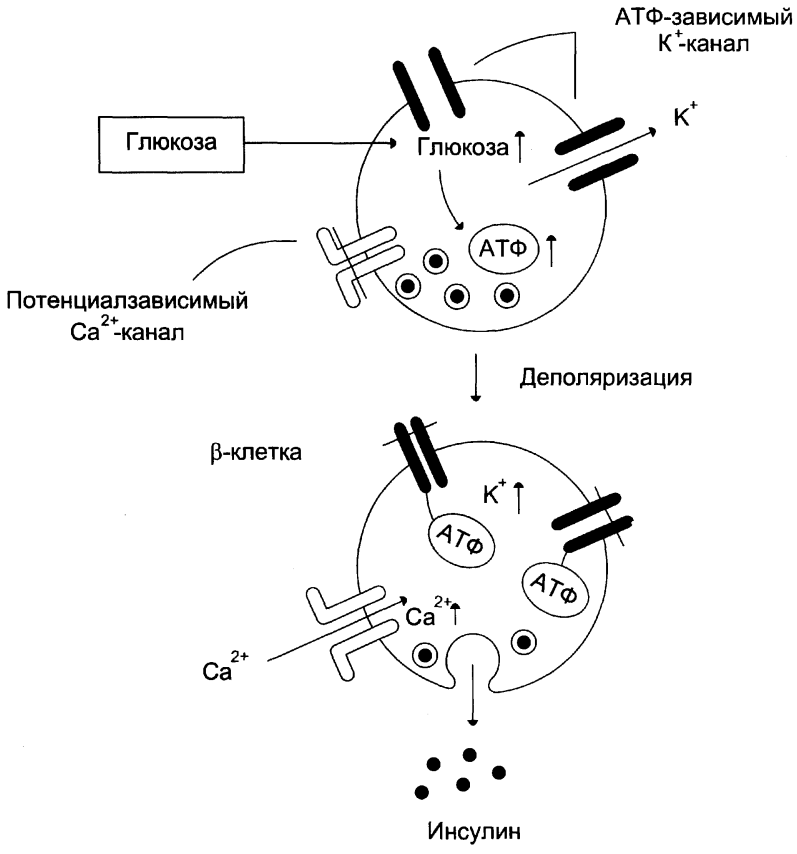


Рис. 5-25. Регуляция секреции инсулина. Повышение концентрации глюкозы приводит к увеличению соотношения АТФ/АДФ в β-клетке, закрытию АТФ-зависимых калиевых каналов, деполяризации, раскрытию потенциалзависимых кальциевых каналов. Повышение концентрации ионов калия и кальция в β-клетке инициирует слияние секреторных пузырьков (инсулинсодержащих гранул) с мембраной и выделение содержимого пузырьков (инсулина) из клетки.

Идентифицировано примерно 20 разных членов семейства рецепторов в разных типах клеток. Примеры некоторых интегринов:

- рецепторы для белков внеклеточного матрикса. Они связываются с гликопротеиновыми компонентами внеклеточного матрикса, в частности с фибронектином, ламинином и витронектином (см. раздел 15);
- интегрины тромбоцитов (IIb и IIIa) участвуют в агрегации тромбоцитов, происходящей при свёртывании крови;
- лейкоцитарные белки адгезии. Для того чтобы мигрировать к месту инфекции и воспаления, лейкоциты должны вступить во взаимодействие с эндотелиальными клетками сосудов. Это взаимодействие может опосредовать связывание Т-лимфоцитов с фибробластами при воспалении.

Интегрины — гетеродимеры, а каждая субъединица (α, β) содержит один трансмембранный домен (рис. 5-26).

Индивидуальные интегрины строго специфичны. Центр связывания интегринов образован внеклеточными доменами α- и β-субъединиц. Интегрины узнают и связываются с белками, содержащими определённую аминокислотную последовательность -Арг-Гли-Асп-, присутствующую в ряде матриксных белков (фибронектин, фибриноген, ламинин, коллаген I типа и другие). Эффект связывания усиливается в присутствии ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}.

Кадгерины и селектины — семейства трансмембранных Ca^{2+}-зависимых гликопротеинов, участвующих в межклеточной адгезии. Три возможных способа участия рецепторов этого типа в межклеточной адгезии представлены на рис. 5-27.

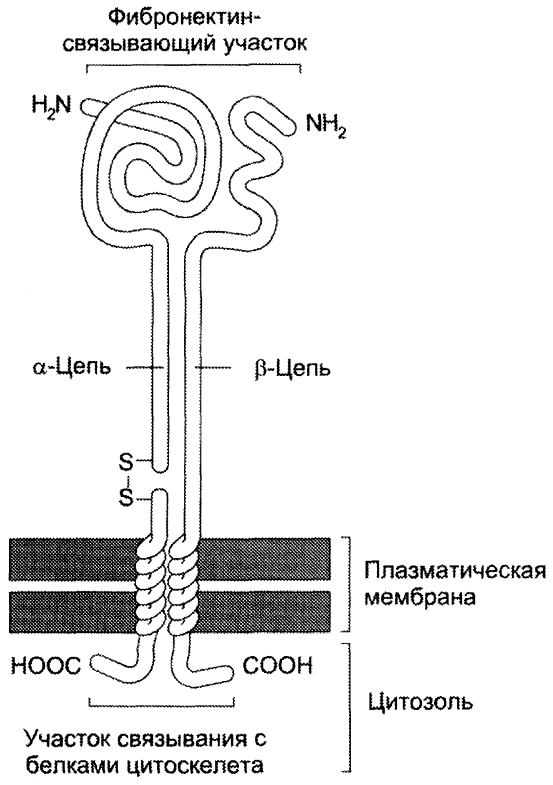


Рис. 5-26. Рецептор фибронектина. Рецептор фибронектина принадлежит к семейству интегринов. Каждая субъединица имеет единственный трансмембранный домен, короткий цитоплазматический и протяжённый N-внеклеточный домены. Обе субъединицы (α, β) интегрина гликозилированы и удерживаются вместе нековалентными связями. α-Субъединица синтезируется в виде одной полипептидной цепи, затем расщепляемой на малую трансмембранную цепь и большую внеклеточную цепь, соединённые дисульфидными мостиками. β-Субъединица содержит 4 повтора из 40 аминокислотных остатков каждый. α-Субъединицы богаты цистеином и содержат множество внутрицепочечных дисульфидных связей (на рисунке не показаны). Связываясь с фибронектином снаружи и с цитоскелетом внутри клетки, интегрин действует как трансмембранный линкер.

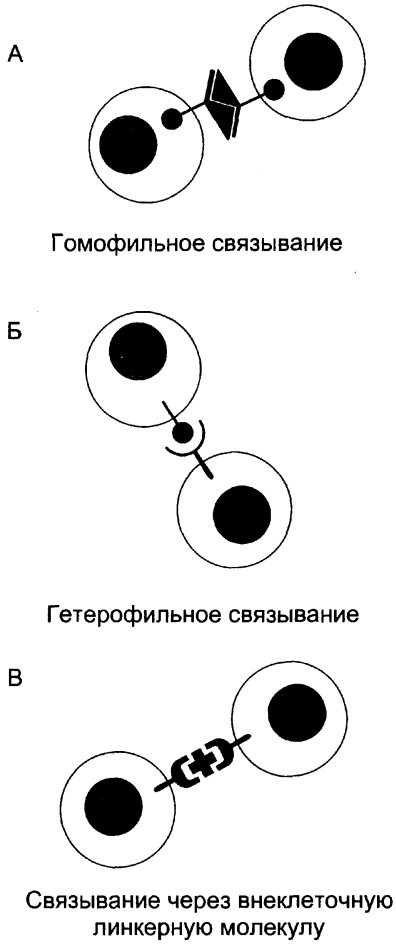


Рис. 5-27. Способы взаимодействия между молекулами клеточной поверхности в процессе межклеточной адгезии. А — рецепторы одной клетки могут связываться с такими же рецепторами соседних клеток (гомофильное связывание); Б — рецепторы одной клетки могут связываться с рецепторами другого типа соседних клеток (гетерофильное связывание); В — рецепторы клеточной поверхности соседних клеток могут связываться друг с другом с помощью поливалентных линкерных молекул.

Кадгерины разных тканей очень схожи, гомологичные аминокислотные последовательности составляют 50–60%. Каждый рецептор имеет один трансмембранный домен. В отсутствие Ca^{2+} конформация кадгеринов меняется, и они становятся доступными для протеолитических ферментов, которые их расщепляют. Наиболее полно охарактеризованы 3 группы кадгериновых рецепторов:

- E-кадгерин находится на поверхности многих клеток эпителиальных и эмбриональных тканей;
- N-кадгерин локализован на поверхности нервных клеток, клеток сердца и хрусталика;
- P-кадгерин расположен на клетках плаценты и эпидермиса.

Кадгерины играют важную роль при начальной межклеточной адгезии, на стадиях морфо- и органогенеза. Они обеспечивают структурную целостность и полярность тканей, особенно эпителиального монослоя.

В семействе селектиновых рецепторов наиболее хорошо изучены три белка: L-селектин,

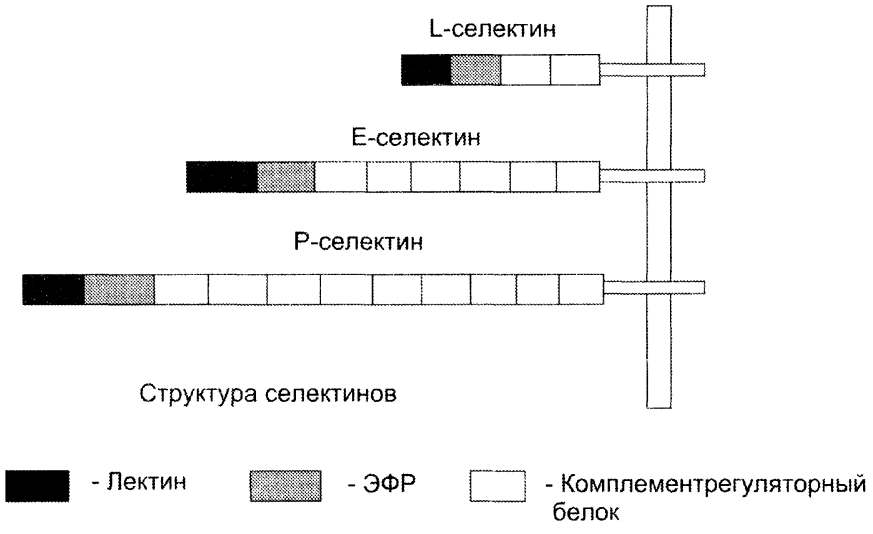


Рис. 5-28. Структура селектинов.

P-селектин и E-селектин. Внеклеточная часть селектинов состоит из 3 доменов: первый домен представлен 2–9 блоками повторяющихся аминокислотных остатков (комплементрегуляторный белок), второй — домен эпидермального фактора роста (ЭФР), третий — N-концевой лектиновый домен (рис. 5-28). Селектины L, P, E различаются количеством блоков в комплементрегуляторном белке. Лектины — семейство белков, специфически взаимодействующих с определёнными последовательностями углеводных остатков в составе гликопротеинов, протеогликанов и гликолипидов внеклеточного матрикса.

Углеводные структуры — поливалентные линкерные молекулы, которые могут быть сульфатированы, фукозилированы и сиализированы, т.е. могут содержать остатки серной кислоты, фукозы и сиаловой кислоты. Связывание лигандов с рецепторами происходит в области N-концевого лектинового домена.

V. ТРАНСМЕМБРАННАЯ ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА

Важное свойство мембран — способность воспринимать и передавать внутрь клетки сигналы из внешней среды. «Узнавание» сигнальных молекул осуществляется с помощью белков-рецепторов, встроенных в клеточную мембрану клеток-мишеней или находящихся в клетке. Клетку-мишень определяют по способности избирательно связывать данную сигнальную молекулу с помощью рецептора.

Если сигнал воспринимается мембранными рецепторами, то схему передачи информации можно представить так:

- взаимодействие рецептора с сигнальной молекулой (первичным посредником);
- активация мембранного фермента, ответственного за образование вторичного посредника;
- образование вторичного посредника цАМФ, цГМФ, $ИФ_3$, ДАГ или Ca^{2+};
- активация посредниками специфических белков, в основном протеинкиназ, которые, в свою очередь, фосфорилируя ферменты, оказывают влияние на активность внутриклеточных процессов.

Несмотря на огромное разнообразие сигнальных молекул, рецепторов и процессов, которые они регулируют, существует всего несколько механизмов трансмембранной передачи информации: с использованием аденилатциклазной системы, инозитолфосфатной системы, каталитических рецепторов, цитоплазматических или ядерных рецепторов.

А. Сигнальные молекулы — гормоны, медиаторы, эйкозаноиды, факторы роста, оксид азота (NO)

Сигнальными молекулами могут быть неполярные и полярные вещества. Неполярные вещества, например стероидные гормоны, проникают в клетку, проходя через липидный бислой. Полярные сигнальные молекулы в клетку не проникают, но связываются специфическими рецепторами клеточных мембран. Такое взаимодействие вызывает цепь последовательных событий в самой мембране и внутри клетки. К полярным сигнальным молекулам относят белковые гормоны (например, глюкагон, инсулин, паратгормон), нейромедиаторы (например, ацетилхолин, глицин, γ-аминомасляная кислота), факторы роста, цитокины, эйкозаноиды.

Б. Рецепторы

По локализации различают мембранные, цитоплазматические и ядерные рецепторы. По другой классификации все рецепторы можно разделить на быстроотвечающие (в пределах миллисекунд) и медленноотвечающие, в пределах нескольких минут или даже часов, что характерно для гормонов, передающих сигнал на внутриклеточные рецепторы. Рецепторы первого типа — интегральные олигомерные белки, содержащие субъединицу, имеющую центр для связывания сигнальной молекулы и центральный ионный канал (рис. 5-29).

Рецепторы второго типа, локализованные в мембранах и не связанные с каналами, подразделяют на 2 большие группы: **каталитические рецепторы**, обладающие собственной тирозинкиназной или гуанилатциклазной активностью, и **рецепторы**, взаимодействующие через **G-белок** с мембранным ферментом. Связывание лиганда (например, гормона) с рецептором на наружной стороне клеточной мембраны приводит к изменению активности цитоплазматического фермента, который, в свою очередь, инициирует клеточный ответ, т.е. через мембрану переносится информация, а не заряды или какие-либо растворённые молекулы.

В случае цитоплазматических рецепторов через мембрану проходит гормон, а информация о присутствии гормона в клетке с помощью рецептора передаётся в ядро.

Различные клетки организма в зависимости от выполняемых ими функций имеют определённый набор рецепторов. В мембране одной клетки может быть более десятка разных типов рецепторов. Взаимодействуя с рецептором, внеклеточные химические посредники оказывают влияние на метаболизм и функциональное состояние (пролиферация, секреция и т.д.) клеток-мишеней.

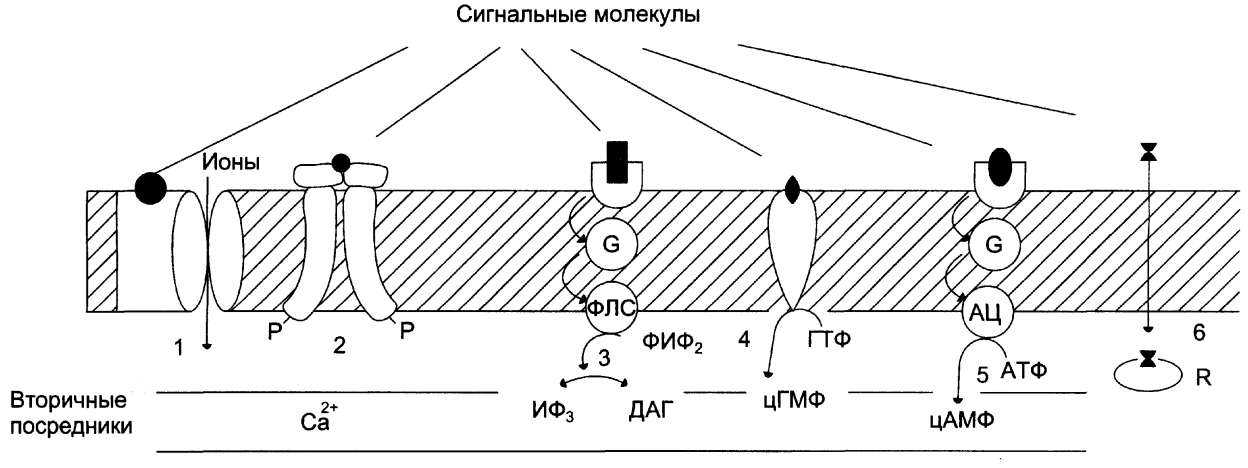


Рис. 5-29. Участие рецепторов в трансмембранной передаче сигнала. Рецепторы: 1 — связанные с ионными каналами, например рецептор ГАМК; 2 — с каталитической активностью (рецептор инсулина); 3 — передающие сигнал на фосфолипазу С, например α_1-адренорецептор; 4 — с каталитической активностью (гуанилатциклаза, рецептор ПНФ); 5 — передающие сигнал на аденилатциклазу, например β-адренорецепторы; 6 — связывающие гормон в цитозоле или ядре, например рецептор кортизола.

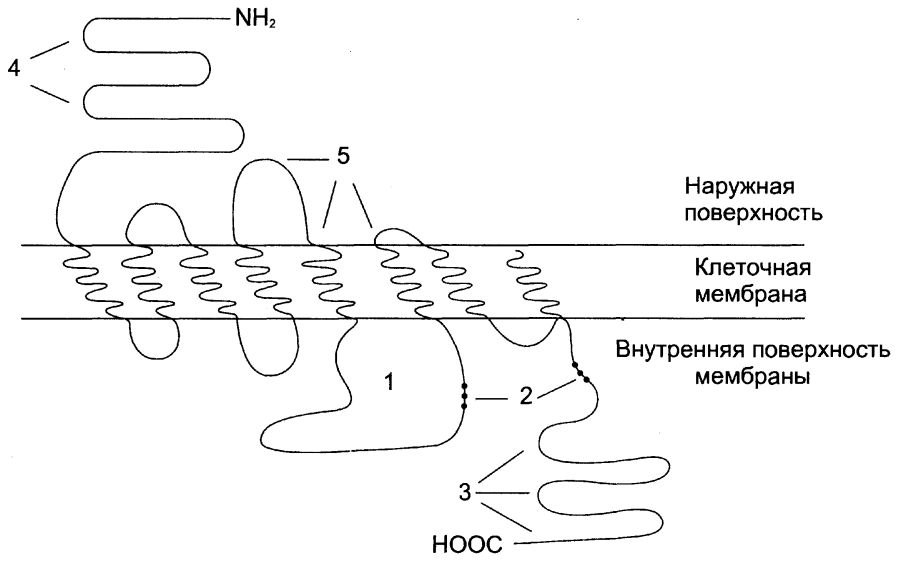


Рис. 5-30. Мембранная организация β_2-адренорецептора. 1 — фрагмент рецептора, участвующий в связывании G_s-белка; 2, 3 — участки возможного фосфорилирования протеинкиназой А (2) и киназой β-адренорецептора (3); 4 — участок гликозилирования; 5 — участок связывания адреналина.

1. Рецепторы адреналина — адренорецепторы

Адренорецепторы различают по распределению в организме — центральные и периферические. Центральные адренорецепторы, локализованные в различных областях мозга, участвуют в регуляции функций ЦНС, периферические — контролируют работу внутренних органов.

Все адренорецепторы классифицируют на два типа — α- и β-, но каждый тип имеет несколько подтипов, наиболее распространённые из них — α_1-, α_2-, β_1- и β_2-рецепторы. В зависимости от своего анатомического расположения клетки одного типа, например гладкомышечные клетки сосудов или адипоциты, содержат разные типы рецепторов.

Несмотря на значительное подобие между α- и β-рецепторами и их подтипами, они кодируются разными генами. Адренорецепторы принадлежат к семейству белков, имеющих 7 трансмембранных α-спиралей (которые принято называть доменами). Длина N- и С-концов, а также длина 1–4 доменов различается у разных типов и подтипов рецепторов (рис. 5-30).

Адренорецепторы — гликопротеины, включающие в свой состав различные углеводные фрагменты. Гликозилированию подвергаются расположенные в области N-конца остатки аспарагиновой кислоты.

β-Адренорецепторы встречаются практически во всех тканях организма. Количество β-адренорецепторов, приходящееся на клетку, варьирует от 300 до 4000.

Центр связывания адреналина образован аминокислотными остатками третьего, пятого и шестого доменов. Другой функционально важный центр — область взаимодействия с G-белками, участвующими в формировании клеточного ответа. Остатки серина и треонина в области третьего внутреннего домена и С-конца адренорецептора могут фосфорилироваться под действием протеинкиназы А или специфической киназой β-адренорецептора. Фосфорилирование приводит к изменению конформации рецептора и снижению сродства к G-белку или препятствует связыванию с G-белком.

α-Адренорецепторы различают по локализации (например, гепатоциты имеют α_1-рецепторы, адипоциты — α_2-адренорецепторы) и механизму трансформации биологического сигнала. Эффекторные системы, связанные с α_1- и α_2-адренорецепторами, включают G-белки разного типа — Gplc-белки (G-белок стимулирующий) и G_i-белки (G-белок ингибирующий) и соответственно ферменты — фосфолипазу С или аденилатциклазу.

2. Рецепторы с тирозинкиназной активностью

Тирозиновые протеинкиназы — ферменты, фосфорилирующие специфические белки по тирозину, подразделяют на 2 типа — мембранные (рецепторные) и цитоплазматические. Внутриклеточные тирозиновые протеинкиназы принимают участие в процессах передачи сигнала в ядро. Рецепторные тирозиновые протеинкиназы участвуют в трансмембранной передаче сигналов.

Примером рецепторной тирозиновой протеинкиназы может служить рецептор инсулина (рис. 5-31). Рецептор инсулина — тирозиновая протеинкиназа, фосфорилирующая белки по ОН-группам тирозина.

Рецептор состоит из двух α- и двух β-субъединиц, связанных дисульфидными связями и нековалентными взаимодействиями. α- и β-Субъединицы — гликопротеины с углеводной частью на наружной стороне мембраны. Вне мембраны на её поверхности находятся α-субъединицы. Центр связывания инсулина образован N-концевыми доменами α-субъединиц. β-Субъединицы пронизывают мембранный бислой и не участвуют в связывании инсулина.

Каталитический центр тирозиновой протеинкиназы находится на внутриклеточных доменах β-субъединиц. В отсутствие гормона инсулиновые рецепторы не проявляют тирозинкиназной активности. Присоединение инсулина к центру связывания на α-субъединицах активирует фермент, причём субстратом служит сама тирозиновая протеинкиназа (β-субъединицы), т.е. происходит фосфорилирование β-субъединицы по нескольким тирозиновым остаткам. Фосфорилирование β-субъединиц происходит по механизму межмолекулярного трансфосфорилирования, т.е. одна β-цепь фосфорилирует другую β-цепь той же молекулы рецептора. Это, в свою очередь, приводит к изменению субстратной специфичности тирозиновой протеинкиназы; теперь она способна фосфорилировать другие внутриклеточные белки. Активация и изменение специфичности обусловлены конформационными изменениями рецептора инсулина после связывания гормона и аутофосфорилирования.

Ключевой белок, фосфорилируемый тирозиновой протеинкиназой, — субстрат инсулинового рецептора-1 (от англ. *insulin receptor substrate*, IRS-I). Фосфорилированный IRS-I активирует ферменты, например тирозиновую фосфопротеинфосфатазу, и белки, участвующие в регуляции клеточных процессов.

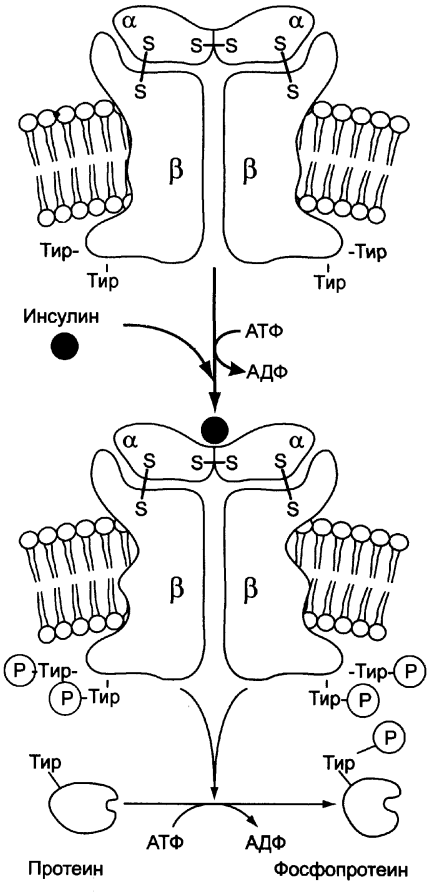


Рис. 5-31. Активация рецептора инсулина — тирозиновой протеинкиназы.

Дефосфорилирование рецептора под действием тирозиновой фосфопротеинфосфатазы возвращает его в неактивное состояние. Сродство рецептора к инсулину снижается при его фосфорилировании протеинкиназой А по аминокислотным остаткам серина и треонина.

3. Рецепторы с гуанилатциклазной активностью

Гуанилатциклаза катализирует образование цГМФ из ГТФ, одного из важных посредников внутриклеточной передачи сигнала (рис. 5-32, 5-33). Гуанилатциклаза находится в клетке, как в мембранносвязанном состоянии, так и в цитозольном.

Соотношения этих двух форм фермента в различных тканях разное. Например, в клетках тон-

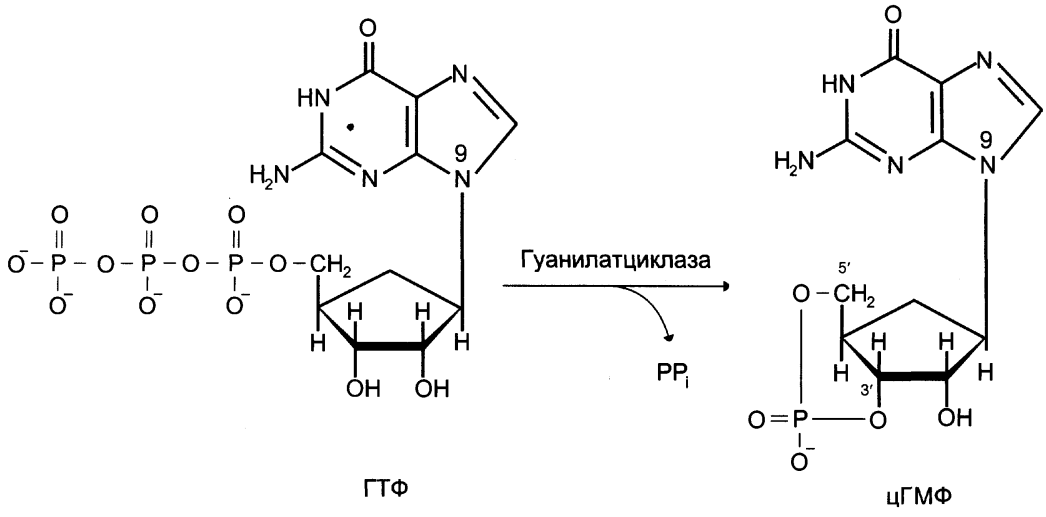


Рис. 5-32. Образование 3′,5′-циклического ГМФ (цГМФ).

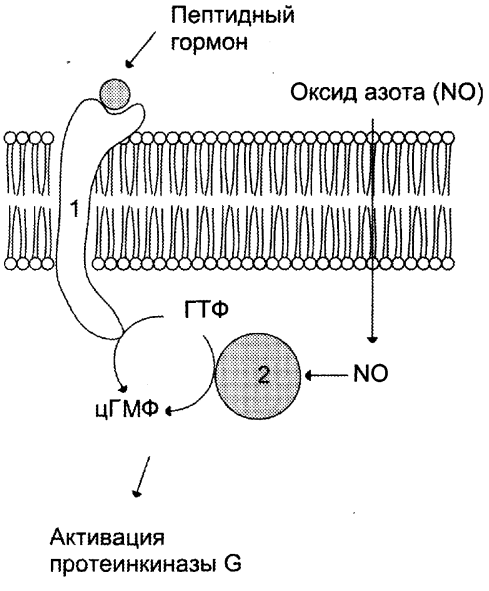


Рис. 5-33. Регуляция активности мембранной (1) и цитозольной (2) гуанилатциклазы.

кого кишечника 90% гуанилатциклазы находится в мембранах, а в лёгких и печени — лишь 20%. Цитозольная и мембранносвязанная гуанилатциклазы различаются не только по локализации, но и по молекулярной массе, активности, способу регуляции.

Цитозольная форма гуанилатциклазы состоит из двух субъединиц (α и β) и содержит в своём составе простетическую группу — гем. В области гема связывается активатор этой формы гуанилатциклазы — оксид азота (NO), образующийся из аргинина под действием фермента синтазы оксида азота (см. раздел 9).

Мембранносвязанная гуанилатциклаза — трансмембранный гликопротеин. Внутриклеточный домен гуанилатциклазы проявляет каталитическую активность, внеклеточный домен служит рецептором. Присоединение активатора к рецептору вызывает изменение конформации в мембранном и цитозольном доменах и, как следствие, активацию гуанилатциклазы. В тканях человека присутствуют 3 типа мембранносвязанных гуанилатциклаз, в активации которых принимают участие специфические регуляторы — предсердный натрийуретический фактор (ПНФ), натрийуретический пептид из мозга и кишечный пептид гуанилин.

В клетках тканей выявлены 3 основных типа внутриклеточных рецепторных белков, с которыми взаимодействует цГМФ: цГМФ-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа G), цГМФ-регулируемые ионные каналы и цГМФ-регулируемая фосфодиэстераза, специфичная к цАМФ (катализирует превращение цАМФ в АМФ).

цГМФ играет важную роль в регуляции Ca^{2+}-гомеостаза в различных типах клеток. Повышение концентрации цГМФ приводит к понижению концентрации Ca^{2+} как в результате активации Ca^{2+}-АТФ-аз, так и за счёт подавления

рецепторзависимого поступления этого иона в цитоплазму клетки. Эти эффекты опосредованы действием протеинкиназы G на мембранные белки, участвующие в обмене Ca^{2+}.

В. Структурно-функциональная организация G-белков

G-белки (ГТФ-связывающие белки) — универсальные посредники при передаче сигналов от рецепторов к ферментам клеточной мембраны, катализирующим образование вторичных посредников гормонального сигнала. G-белки — олигомеры, состоящие из α, β и γ-субъединиц. Состав димеров βγ незначительно различаются в разных тканях, но в пределах одной клетки все G-белки, как правило, имеют одинаковый комплект βγ-субъединиц. Поэтому G-белки принято различать по их α-субъединицам. Выявлено 16 генов, кодирующих различные α-субъединицы G-белков. Некоторые из генов имеют более одного белка, вследствие альтернативного сплайсинга РНК.

Каждая α-субъединица в составе G-белка имеет специфические центры:

- связывания ГТФ или ГДФ;
- взаимодействия с рецептором;
- связывания с βγ-субъединицами;
- фосфорилирования под действием протеинкиназы С;
- взаимодействия с ферментом аденилатциклазой или фосфолипазой С.

В структуре G-белков отсутствуют α-спиральные, пронизывающие мембрану домены. G-белки относят к группе «заякоренных» белков (рис. 5-34).

Регуляция активности G-белков

Различают неактивную форму G-белка — комплекс αβγ-ГДФ и активированную форму αβγ-ГТФ. Активация G-белка происходит при взаимодействии с комплексом активатор-рецептор, изменение конформации G-белка снижает сродство α-субъединицы к молекуле ГДФ и увеличивает к ГТФ. Замена ГДФ на ГТФ в активном центре G-белка нарушает комплементарность между α-ГТФ и βγ-субъединицами. Рецептор, связанный с сигнальной молекулой, может активировать большое количество молекул G-белка, таким образом обеспечивая усиление внеклеточного сигнала на этом этапе (рис. 5-35).

Активированная α-субъединица G-белка (α-ГТФ) взаимодействует со специфическим

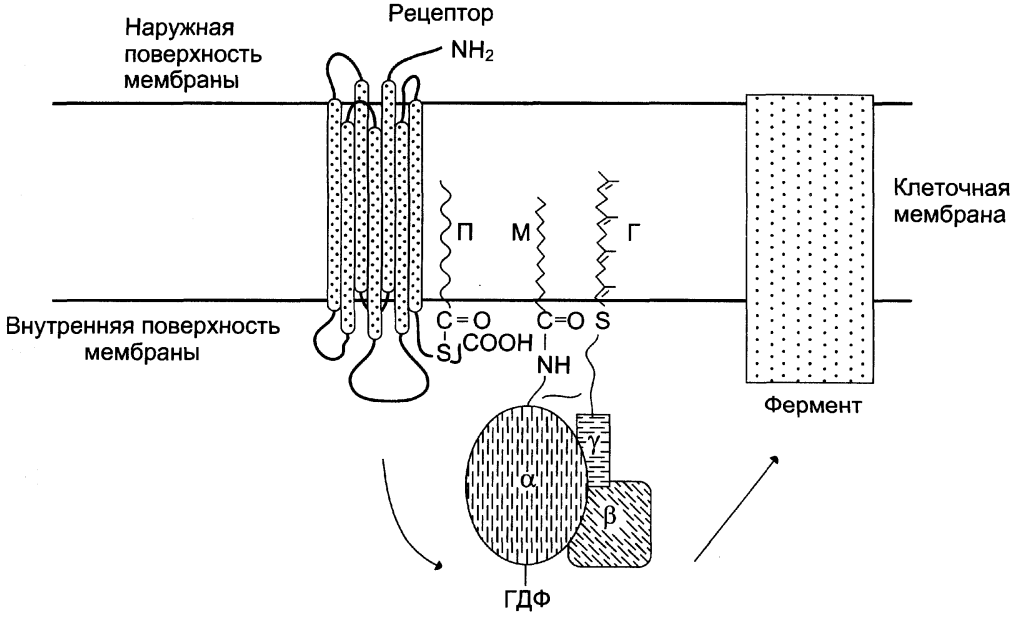


Рис. 5-34. Положение G-белков в мембране. Для ассоциации G-белков важно ацилирование α-протомеров алифатическими радикалами жирных кислот, миристиновой кислоты (М) или изопреновой. γ-Субъединица G-белка имеет геранил-геранильную группу (Г), связанную тиоэфирной связью с остатком цистеина С-конца.

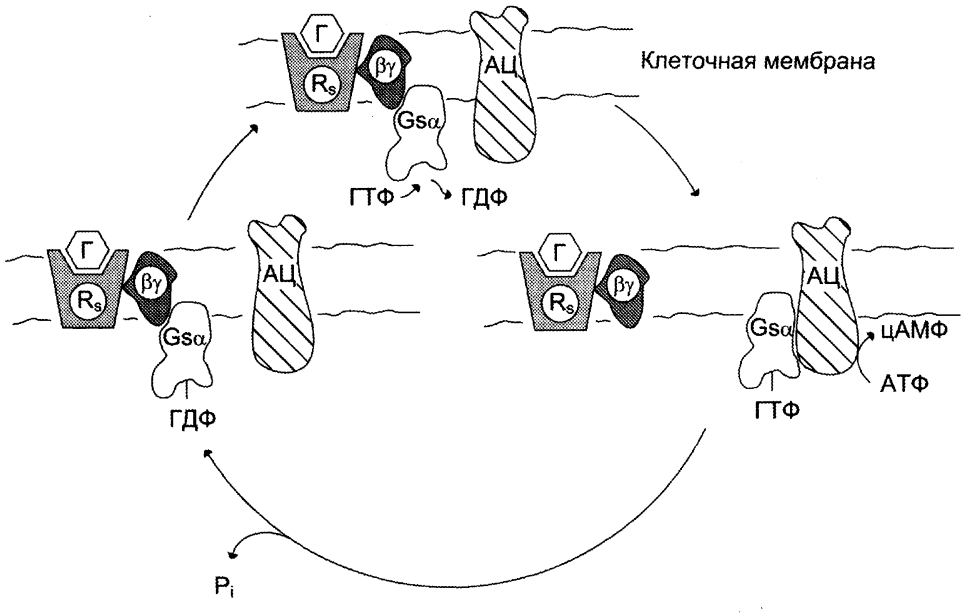


Рис. 5-35. Цикл функционирования G-белка. R_s — рецептор; Г — гормон; АЦ — аденилатциклаза.

белком клеточной мембраны и изменяет его активность. Такими белками могут быть ферменты аденилатциклаза, фосфолипаза С, фосфодиэстераза цГМФ, Na^+-каналы, K^+-каналы.

Следующий этап цикла функционирования G-белка — дефосфорилирование ГТФ, связанного с α-субъединицей, причём фермент, катализирующий эту реакцию, — сама α-субъединица.

Дефосфорилирование приводит к образованию комплекса α-ГДФ, который не комплементарен специфическому белку мембраны (например, аденилатциклазе), но имеет высокое сродство к βγ-протомерам. G-белок возвращается к неактивной форме — αβγ-ГДФ. При последующей активации рецептора и замене молекулы ГДФ на ГТФ цикл повторяется снова. Таким образом, α-субъединицы G-белков совершают челночное движение, перенося стимулирующий или ингибирующий сигнал от рецептора, который активирован первичным посредником (например, гормоном), на фермент, катализирующий образование вторичного посредника.

Некоторые формы протеинкиназ могут фосфорилировать α-субъединицы G-белков. Фосфорилированная α-субъединица не комплементарна специфическому белку мембраны, например аденилатциклазе или фосфолипазе С, поэтому не может участвовать в передаче сигнала.

Г. Аденилатциклаза

Фермент аденилатциклаза, катализирующий превращение АТФ в цАМФ (рис. 5-36), — ключевой фермент аденилатциклазной системы передачи сигнала. Аденилатциклаза обнаружена во всех типах клеток.

Фермент относят к группе интегральных белков клеточной мембраны, он имеет 12 трансмембранных доменов. Внеклеточные фрагменты аденилатциклазы гликозилированы. Цитоплазматические домены аденилатциклазы имеют два каталитических центра, ответственных за образование цАМФ — вторичного посредника, участвующего в регуляции активности фермента протеинкиназы А.

На активность аденилатциклазы оказывают влияние как внеклеточные, так и внутриклеточные регуляторы. Внеклеточные регуляторы (гормоны, эйкозаноиды, биогенные амины) осуществляют регуляцию через специфические рецепторы, которые с помощью α-субъединиц G-белков передают сигналы на аденилатциклазу. α_s-Субъединица (стимулирующая) при взаимодействии с аденилатциклазой активирует фермент, α_i-субъединица (ингибирующая) ингибирует фермент. В свою очередь, аденилатциклаза стимулирует проявление ГТФ-фосфа-

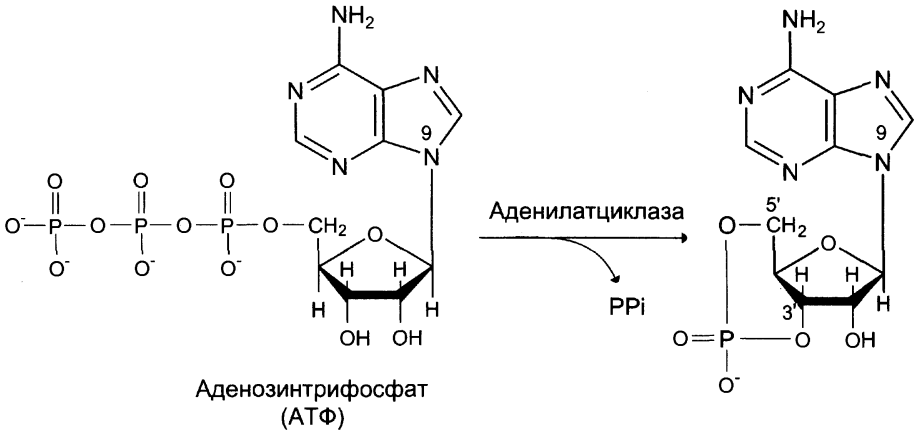


Рис. 5-36. Образование циклического аденозинмонофосфата (цАМФ).

тазной активности α-субъединиц. В результате дефосфорилирования ГТФ образуются субъединицы α_s-ГДФ и α_i-ГДФ, не комплементарные аденилатциклазе.

Из 8 изученных изоформ аденилатциклазы 4 — Ca^{2+}-зависимые (активируются Ca^{2+}). Регуляция аденилатциклазы внутриклеточным кальцием позволяет клетке интегрировать активность двух основных вторичных посредников цАМФ и Ca^{2+}.

Д. Фосфолипазы

Фосфолипазы — ферменты класса гидролаз, катализирующие катаболизм глицерофосфолипидов. Различают фосфолипазы секреторные, входящие в состав панкреатического сока, и клеточные фосфолипазы. Клеточные фосфолипазы A_1, A_2, D, C различаются по специфичности к отщепляемой группе. Все фосфолипазы — кальцийзависимые ферменты (рис. 5-37).

Фосфолипаза С — фермент, гидролизующий фосфоэфирную связь в глицерофосфолипидах. В клетках человека идентифицировано 10 изоформ фосфолипазы С, различающихся по молекулярной массе, локализации, способу регуляции, субстратной специфичности. В структуре всех изоформ фосфолипазы С отсутствуют гидрофобные домены, которые могли бы обеспечить их взаимодействие с мембраной. Однако некоторые формы фосфолипазы С связаны с мембраной с помощью гидрофобного «якоря» —

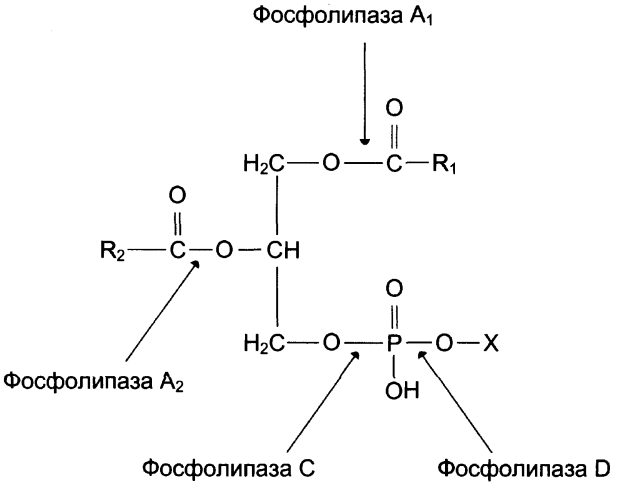


Рис. 5-37. Действие фосфолипаз.

ацильного остатка миристиновой кислоты или за счёт взаимодействия с поверхностью бислоя. Каталитическая активность всех изоформ фосфолипазы С зависит от ионов кальция.

Большинство фосфолипаз С специфично в отношении фосфатидилинозитолов и практически не гидролизует другие типы фосфолипидов. Активный фермент может гидролизовать до 50% от общего количества фосфатидилинозитолов клеточной мембраны. При гидролизе фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата ($ФИФ_2$) образуются продукты диацилглицерол (ДАГ) и

инозитол-1,4,5-трифосфат ($ИФ_3$), служащие вторичными посредниками в трансмембранной передаче сигнала по инозитолфосфатному пути.

Е. Протеинкиназы

Все полярные сигнальные молекулы, действующие на клетку-мишень через мембранные рецепторы, осуществляют свою биологическую функцию путём фосфорилирования специфических белков и ферментов, регулирующих метаболизм в клетке. Фосфорилирование изменяет (увеличивает или уменьшает) их активность. Катализируют фосфорилирование белков (протеинов) протеинкиназы по аминокислотным остаткам серина, треонина, тирозина. Протеинкиназы могут быть субъединицей мембранного рецептора, например тирозиновая протеинкиназа рецептора инсулина, активность которой регулируется гормоном. Другая группа — протеинкиназы, регулируемые вторичными вестниками гормонального сигнала (цАМФ, цГМФ, Ca^{2+}, ДАГ), например протеинкиназа А, протеинкиназа С, протеинкиназа G, кальмодулинзависимые протеинкиназы и др.

1. Протеинкиназы А

Протеинкиназы А (цАМФ-стимулируемые) участвуют в аденилатциклазной системе передачи сигнала. Протеинкиназа А состоит из 4 субъединиц R_2C_2 — двух регуляторных субъединиц (R_2) и двух каталитических (C_2) (см. рис. 5-41). Комплекс R_2C_2 не обладает ферментативной активностью.

Комплекс R_2C_2 разными способами прикрепляется к мембране. Некоторые формы протеинкиназы А «заякориваются» с помощью алифатического остатка миристиновой кислоты каталитических субъединиц. Во многих тканях протеинкиназа А связана с «заякоренным» белком $AKAP_s$ (от англ. *cAMP-dependent protein kinase anchoring proteins*). $AKAP_s$ имеет центр связывания для регуляторных субъединиц протеинкиназы А. С помощью белка $AKAP_s$ протеинкиназа А связывается с мембраной в области локализации ферментов, катализирующих образование цАМФ (аденилатциклаза) или его гидролиз (фосфодиэстераза), а также белков, в регуляции активности которых фермент принимает участие, например потенциалзависимые Ca^{2+}-каналы.

Регуляторные субъединицы протеинкиназы А имеют специфические центры для связывания цАМФ. Присоединение цАМФ к регуляторным субъединицам приводит к изменению конформации последних и снижению сродства к каталитическим субъединицам С, происходит диссоциация по схеме:

$$цАМФ_4 + R_2C_2 \rightarrow цАМФ_4\ R_2 + C + C$$

Субъединицы С представляют собой активную форму протеинкиназы А, которая катализирует реакции фосфорилирования белков по серину и треонину. Каталитические субъединицы С у разных типов протеинкиназ А не идентичны, они различаются прежде всего специфичностью в отношении белков-субстратов.

2. Протеинкиназы С

Протеинкиназы С участвуют в инозитолфосфатной системе передачи сигнала. Фермент состоит из двух функционально различных доменов — регуляторного и каталитического. Регуляторный домен содержит 2 структуры («**цинковые пальцы**»), образованные фрагментами пептидной цепи, богатыми цистеином, и содержащими 2 иона цинка (см. раздел 1). «Цинковые пальцы» участвуют в связывании диацилглицерола. Другой фрагмент регуляторного домена имеет высокое сродство к Ca^{2+}. Повышение концентрации кальция в цитозоле увеличивает сродство протеинкиназы С к фосфатидилсерину мембраны. Транслокация протеинкиназы С к мембране позволяет ферменту связаться с ДАГ, который ещё больше повышает сродство протеинкиназы С к ионам кальция (рис. 5-38). Наиболее распространённые изоформы протеинкиназы С активируются Ca^{2+}, диацилглицеролом и фосфатидилсерином.

Каталитический домен имеет центр, связывающий АТФ и белок-субстрат. Активная форма фермента протеинкиназы С фосфорилирует белки по остаткам серина и треонина. Снижение концентрации ионов кальция в клетке нарушает связь протеинкиназы С с фосфатидилсерином и диацилглицеролом, фермент переходит в неактивную форму и отделяется от мембраны.

3. Протеинкиназы G

В отличие от протеинкиназы А, протеинкиназа G присутствует не во всех тканях, её обнаруживают в лёгких, мозжечке, гладких мышцах и тромбоцитах. Изоформы протеинкиназы G

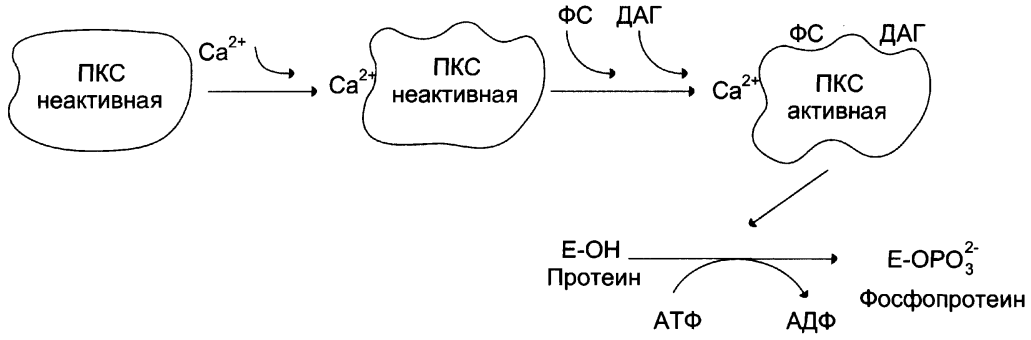


Рис. 5-38. Регуляция активности протеинкиназы С (ПКС). ФС — фосфатидилсерин; ДАГ — диацилглицерол.

могут быть связаны с мембраной или находиться в цитоплазме. Растворимая протеинкиназа G состоит из двух идентичных субъединиц, каждая из которых имеет два центра для связывания цГМФ. Присоединение цГМФ к регуляторным центрам вызывает конформационные изменения субъединиц и повышает каталитическую активность фермента (рис. 5-39). Протеинкиназа G, подобно протеинкиназе А и С, специфична в отношении определённых белковых субстратов, которые она фосфорилирует по остаткам серина и треонина.

Ж. Фосфодиэстеразы

Фосфодиэстеразы — ферменты, катализирующие превращение цАМФ (рис. 5-40) или цГМФ в неактивные метаболиты АМФ или ГМФ. Фосфодиэстеразы, снижая концентрации вторичных посредников, разрывают цепь превращений, вызванных активатором рецептора.

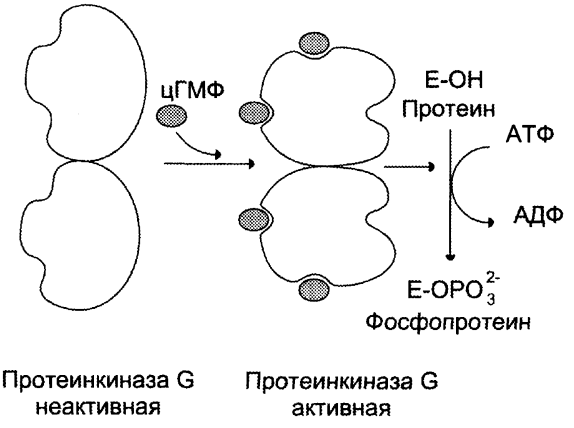


Рис. 5-39. Регуляция активности протеинкиназы G (ПКG).

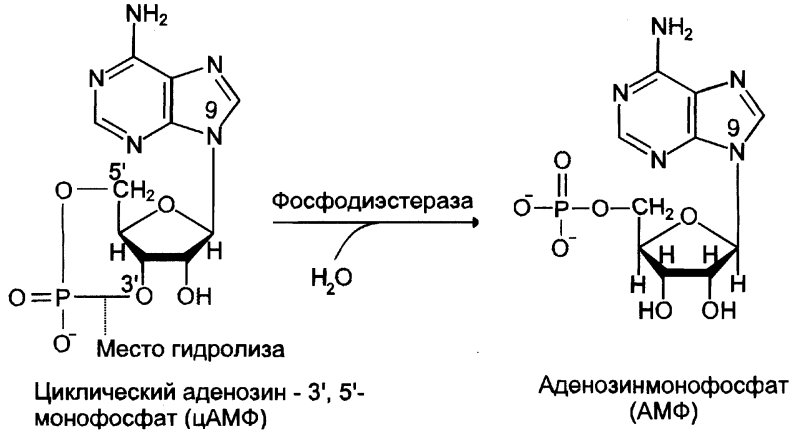


Рис. 5-40. Превращение цАМФ в АМФ.

Фосфодиэстеразы присутствуют в клетках тканей в 2 формах: в форме растворимого белка и мембранносвязанного. Формы фермента, связанные с мембраной, в разных тканях составляют 5–40%. В одной и той же ткани могут присутствовать разные формы фосфодиэстеразы, различающиеся по сродству к субстратам, молекулярному весу, заряду, регуляторным свойствам и локализации в клетке.

Фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов не обладают абсолютной специфичностью, поэтому, как правило, одна и та же форма фермента способна гидролизовать как цАМФ, так и цГМФ. Однако скорости гидролиза этих двух нуклеотидов под действием одной и той же фосфодиэстеразы могут значительно различаться. Это зависит от того, какая фосфодиэстераза присутствует в клетке — более специфичная в отношении цАМФ или более специфичная к цГМФ, от соотношения концентраций цАМФ и цГМФ в клетке и от действия регуляторов фосфодиэстеразы.

В большинстве тканей присутствует фосфодиэстераза-1, более специфичная к цАМФ, активируемая Ca^{2+}, комплексом 4 Ca^{2+}-кальмодулин и цГМФ.

3. Аденилатциклазная система

При участии аденилатциклазной системы реализуются эффекты сотни различных по своей природе сигнальных молекул — гормонов, нейромедиаторов, эйкозаноидов.

Функционирование системы трансмембранной передачи сигналов обеспечивают белки: R_s-рецептор сигнальной молекулы, которая активирует аденилатциклазу, и R_i-рецептор сигнальной молекулы, которая ингибирует аденилатциклазу; G_s-стимулирующий и G_i-ингибирующий аденилатциклазу белки; ферменты аденилатциклаза (АЦ) и протеинкиназа А (ПКА) (рис. 5-41).

Последовательность событий, приводящих к активации аденилатциклазы:

- связывание активатора аденилатциклазной системы, например гормона (Г) с рецептором (R_s), приводит к изменению конформации рецептора и увеличению его сродства к G_s-белку. В результате образуется комплекс [Г][R][G-ГДФ];
- присоединение [Г][R] к G-ГДФ снижает сродство α-субъединицы G_s-белка к ГДФ и увеличивает сродство к ГТФ. ГДФ замещается на ГТФ;
- это вызывает диссоциацию комплекса. Отделившаяся субъединица α, связанная с молекулой ГТФ, обладает сродством к аденилатциклазе:

$$[Г][R][G\text{-}ГТФ] \rightarrow [Г][R] + \alpha\text{-}ГТФ + \beta\gamma;$$

- взаимодействие α-субъединицы с аденилатциклазой приводит к изменению конформации фермента и его активации, увеличивается скорость образования цАМФ из АТФ;
- конформационные изменения в комплексе [α-ГТФ][АЦ] стимулируют повышение ГТФ-фосфатазной активности α-субъединицы. Протекает реакция дефосфорилирования ГТФ, и один из продуктов реакции — неорганический фосфат (P_i) отделяется от α-субъединицы, а комплекс [α-ГДФ] сохраняется; скорость гидролиза определяет время проведения сигнала;
- образование в активном центре α-субъединицы молекулы ГДФ снижает его сродство к аденилатциклазе, но увеличивает сродство к βγ-субъединицам. G_s-белок возвращается к неактивной форме;
- если рецептор связан с активатором, например гормоном, цикл функционирования G_s белка повторяется.

Активация протеинкиназы А (ПКА)

- Молекулы цАМФ могут обратимо соединяться с регуляторными субъединицами ПКА.
- Присоединение цАМФ к регуляторным субъединицам (R) вызывает диссоциацию комплекса C_2R_2 на комплекс $цАМФ_4$ R_2 и С + С.
- Активная протеинкиназа А фосфорилирует специфические белки по серину и треонину, в результате изменяются конформация и активность фосфорилированных белков, а это приводит к изменению скорости и направления регулируемых ими процессов в клетке.
- Концентрация цАМФ в клетке может регулироваться, она зависит от соотношения активностей ферментов аденилатциклазы и фосфодиэстеразы.

Большую роль в регуляции внутриклеточной сигнальной системы играет белок $AKAP_s$. «Заякоренный» белок $AKAP_s$ участвует в сборке ферментных комплексов, включающих не толь-

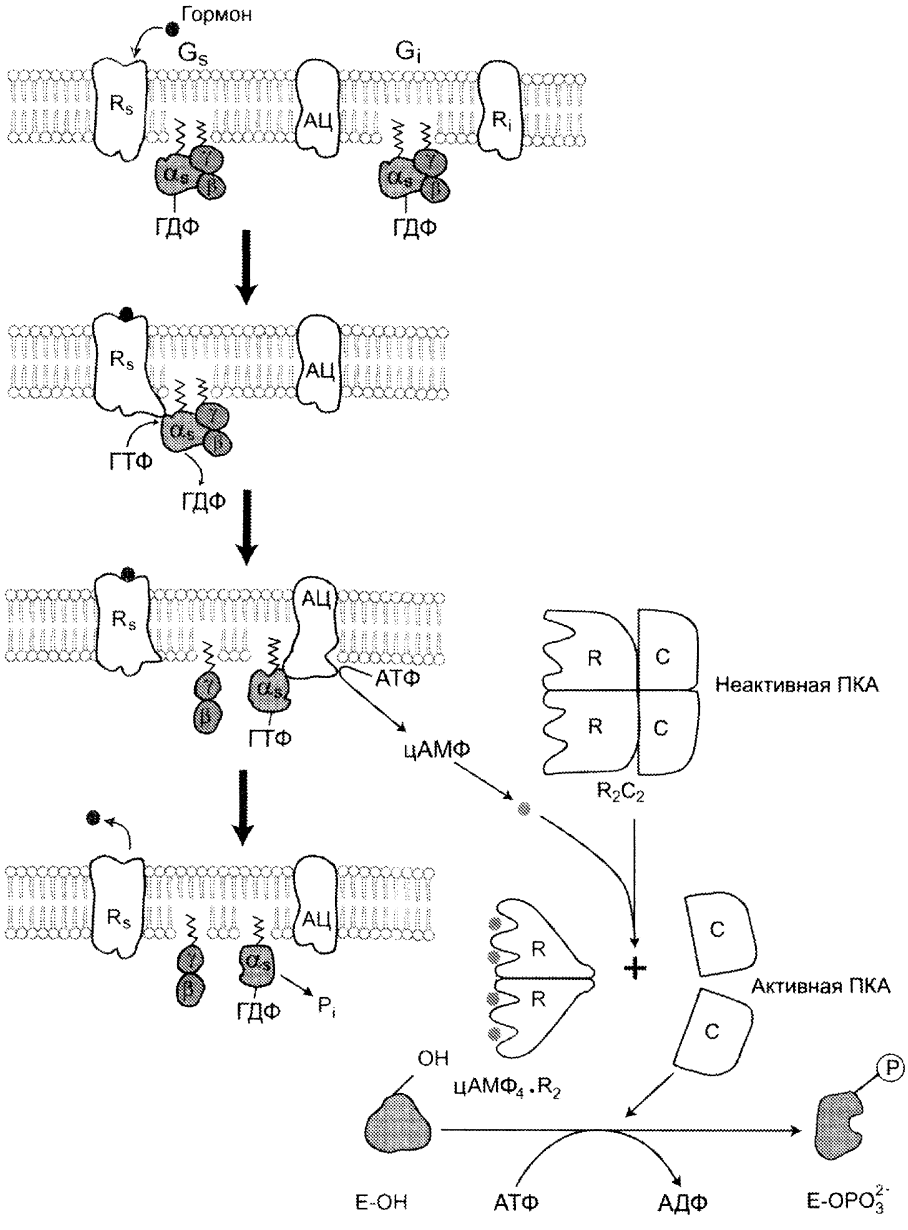


Рис. 5-41. Аденилатциклазная система.

ко протеинкиназу А, но и фосфодиэстеразу и фосфопротеинфосфатазу.

Каскадный механизм усиления и подавления сигнала. Передача сигнала от мембранного рецептора через G-белок на фермент аденилатциклазу служит примером каскадной системы усиления этого сигнала. Одна молекула, активирующая рецептор, может «включать» несколько G-белков, и затем каждый активирует несколько молекул аденилатциклазы с образованием тысяч молекул цАМФ. На этом этапе сигнал усиливается в 10^2—10^3 раз. Образующийся цАМФ «включают» другой фермент — протеинкиназу А, усиливая сигнал ещё в 1000 раз. Фосфорилирование ферментов протеинкиназой А ещё больше усиливает сигнал, в результате суммарное усиление равно 10^6—10^7 раз. Таким образом, по механизму каскадного усиления одна молекула регулятора

способна изменить активность миллионов других молекул.

Но для любой из систем трансмембранной передачи сигнала клетка имеет другую систему, подавляющую этот сигнал. Каждый из этапов в ферментном каскаде находится под контролем специальных подавляющих этот сигнал механизмов. Например, длительное действие гормона приводит к десенсибилизации мембранных рецепторов: они либо инактивируются, либо вместе с гормоном погружаются в клетку посредством эндоцитоза. В результате десенсибилизации рецепторов степень активации аденилатциклазной системы снижается. Если в клетке длительное время повышена концентрация цАМФ (повышена активность протеинкиназы А), может происходить фосфорилирование кальциевых каналов, что приводит к повышению концентрации Ca^{2+} в клетке. Кальций активирует Ca^{2+}-зависимую фосфодиэстеразу, катализирующую превращение цАМФ в АМФ. В результате инактивации протеинкиназы А (R_2C_2) снижается скорость фосфорилирования специфических ферментов. Завершает «выключение» системы фосфопротеинфосфатаза, дефосфорилирующая фосфопротеины.

Влияние бактериальных токсинов на активность аденилатциклазы (АДФ-рибозилирование G-белков)

Для изучения функционирования G-белков аденилатциклазной системы были использованы экзогенные бактериальные яды — холерный и коклюшный токсины. Токсины в экспериментальных условиях повышают активность аденилатциклазы практически во всех клетках организма; так, холерный токсин может стимулировать секрецию тиреоидных гормонов клетками щитовидной железы, стероидных гормонов клетками надпочечников, распад жиров в жировых клетках. Реакция разных клеток на холерный токсин вызвана повышением уровня цАМФ в этих клетках.

Холерный токсин — олигомерный белок. Одна из субъединиц — фермент АДФ-рибозилтрансфераза; проникая в клетку, она катализирует присоединение АДФ-рибозы к α_s-субъединице комплекса [α_s-ГТФ][АЦ] (этап активации аденилатциклазы).

$$NAD^+ + [\alpha_s\text{-ГТФ}][\text{АЦ}] \rightarrow [\text{АДФ-рибозил-}\alpha_s\text{-ГТФ}][\text{АЦ}] + \text{никотинамид} + H^+.$$

АДФ-рибозилирование ингибирует проявление ГТФ-фосфатазной активности α_s-субъединицы, не происходит дефосфорилирование ГТФ. Цикл функционирования G_s-белка останавливается на этапе активации фермента аденилатциклазы, отвечающего за образование цАМФ из АТФ. Фермент аденилатциклаза сохраняет повышенную активность в течение длительного времени.

Субъединица коклюшного токсина, проникая в клетку, катализирует АДФ-рибозилирование α_i-субъединицы активированного G_i-белка ($\alpha_i\beta\gamma$-ГТФ).

$$NAD^+ + [\alpha_i\beta\gamma\text{-ГТФ}] \rightarrow [\text{АДФ-рибозил-}\alpha_i\beta\gamma\text{-ГТФ}] + \text{никотинамид} + H^+.$$

Модифицированная α_i-субъединица сохраняет высокое сродство к $\beta\gamma$-субъединицам, т.е. G_i-белок теряет способность диссоциировать на α_i-ГТФ и $\beta\gamma$-субъединицы. Таким образом, ингибирующий сигнал (α_i-ГТФ) не достигает аденилатциклазы, значит в этом случае возможна только её активация при связывании с α_s-ГТФ. Действие коклюшного токсина на клетки тканей всегда приводит к повышению уровня цАМФ.

Симптомы холеры и коклюша развиваются в результате действия токсинов, вырабатываемых соответствующими микроорганизмами.

И. Инозитолфосфатная система

Функционирование инозитолфосфатной системы трансмембранной передачи сигнала (рис. 5-42) обеспечивают: R (рецептор), фосфолипаза С, G_{plc} — белок, активирующий фосфолипазу С, белки и ферменты мембран и цитозоля.

Последовательность событий, приводящих к активации фосфолипазы С:

- связывание сигнальной молекулы, например гормона с рецептором (R), вызывает изменение конформации и увеличение сродства к G_{plc}-белку.
- образование комплекса [Г][R][G_{plc}-ГДФ] приводит к снижению сродства α-протомера G_{plc}-белка к ГДФ и увеличению сродства к ГТФ. ГДФ заменяется на ГТФ.
- это вызывает диссоциацию комплекса; отделившаяся α-субъединица, связанная с молекулой ГТФ, приобретает сродство к фосфолипазе С.

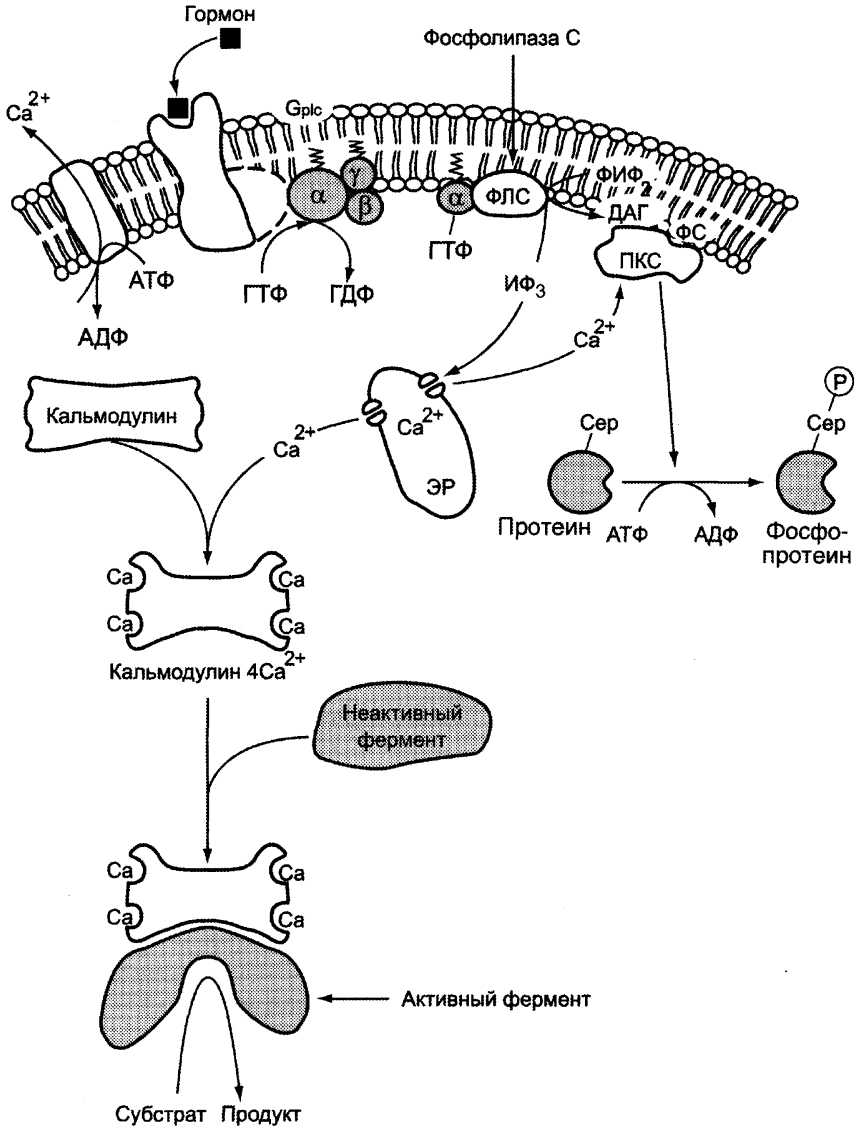


Рис. 5-42. Инозитолфосфатная система.

- α-ГТФ взаимодействует с фосфолипазой С и активирует её. Под действием фосфолипазы-С происходит гидролиз липида мембраны фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата ($ФИФ_2$).
- в ходе гидролиза образуется и выходит в цитозоль гидрофильное вещество инозитол-1,4,5-трифосфат ($ИФ_3$). Другой продукт реакции диацилглицерол (ДАГ) остаётся в мембране и участвует в активации фермента протеинкиназы С (ПКС).
- инозитол-1,4,5-трифосфат ($ИФ_3$) связывается специфическими центрами Ca^{2+}-канала мембраны ЭР, это приводит к изменению конформации белка и открытию канала — Ca^{2+} поступает в цитозоль. В отсутствие в цитозоле $ИФ_3$ канал закрыт.

Активация протеинкиназы С

- Повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле клетки увеличивает скорость взаимодействия Ca^{2+} с неактивным цитозольным ферментом протеинкиназой С (ПКС) и белком кальмодулином, таким образом сигнал, принятый рецептором клетки, раздваивается.

- Связывание протеинкиназы С с ионами кальция позволяет ферменту вступать в кальций-опосредованное взаимодействие с молекулами «кислого» фосфолипида мембраны, фосфатидилсерина (ФС). Диацилглицерол, занимая специфические центры в протеинкиназе С, ещё более увеличивает её сродство к ионам кальция.
- На внутренней стороне мембраны образуется ферментативный комплекс — [ПКС][Ca^{2+}][ДАГ][ФС] — активная протеинкиназа С, фосфорилирующая специфические ферменты по серину и треонину.

Участие белка кальмодулина в инозитолфосфатной передаче сигнала

В клетках многих тканей присутствует белок кальмодулин, который функционирует как внутриклеточный рецептор Ca^{2+}, он имеет 4 центра для связывания Ca^{2+}. Комплекс [кальмодулин]-[4 Ca^{2+}] не обладает ферментативной активностью, но взаимодействие комплекса с различными белками и ферментами приводит к их активации.

Саморегуляция системы

Как и большинство систем трансмембранной передачи сигналов, инозитолфосфатная система имеет не только механизм усиления, но и механизм подавления сигнала. Присутствующие в цитозоле инозитол-1,4,5-трифосфат ($ИФ_3$) и диацилглицерол (ДАГ) в мембране могут в результате серии реакций опять превращаться в фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат ($ФИФ_2$). Ферменты, катализирующие восстановление фосфолипида, активируются фосфорилированием протеинкиназой С.

Концентрация Ca^{2+} в клетке снижается до исходного уровня при действии Ca^{2+}-АТФ-аз цитоплазматической мембраны и ЭР, а также Na^+/Ca^{2+}- и H^+/Ca^{2+}-транслоказ (активный антипорт) клеточной и митохондриальной мембран.

Функционирование транслоказ Ca^{2+} и Ca^{2+}-АТФ-аз может активироваться:

- комплексом [кальмодулин][4 Ca^{2+}];
- протеинкиназой А (фосфорилированием);
- протеинкиназой С (фосфорилированием).

Понижение концентрации Ca^{2+} в клетке и диацилглицерола в мембране приводит к изменению конформации протеинкиназы С, снижению её сродства к фосфатидилсерину, фермент диссоциирует в цитозоль (неактивная форма).

Фосфорилированные протеинкиназой С ферменты и белки под действием фосфопротеинфосфатазы переходят в дефосфорилированную форму.

К. Передача сигнала с помощью внутриклеточных рецепторов

Передача сигнала липидорастворимых стероидных гормонов и тироксина возможна только при прохождении этих гормонов через плазматическую мембрану клеток-мишеней (рис. 5-43).

Рецепторы гормонов могут находиться в цитозоле или в ядре. Цитозольные рецепторы связаны с белком-шапероном (часто это группа белков-шаперонов). Ядерные и цитозольные рецепторы стероидных и тиреоидных гормонов содержат ДНК-связывающий домен, характеризующийся наличием двух структур «цинковых пальцев».

Последовательность событий, приводящих к активации транскрипции:

- гормон проходит через двойной липидный слой клеточной мембраны.
- взаимодействие гормона с рецептором (R) приводит к изменению конформации рецептора и снижению сродства к белкам-шаперонам, отделяющимся от комплекса гормон—рецептор.
- комплекс гормон—рецептор проходит в ядро, взаимодействует с регуляторной нуклеотидной последовательностью в ДНК — энхансером или сайленсером.
- увеличивается (при взаимодействии с энхансером) или уменьшается (при взаимодействии с сайленсером) доступность промотора для РНК-полимеразы.
- соответственно увеличивается или уменьшается скорость транскрипции структурных генов.
- увеличивается или уменьшается скорость трансляции.
- изменяется количество белков, которые могут влиять на метаболизм и функциональное состояние клетки.

Эффекты гормонов, которые передают сигнал через внутриклеточные рецепторы, нельзя наблюдать сразу, так как на протекание матричных процессов (транскрипцию и трансляцию) требуются часы.

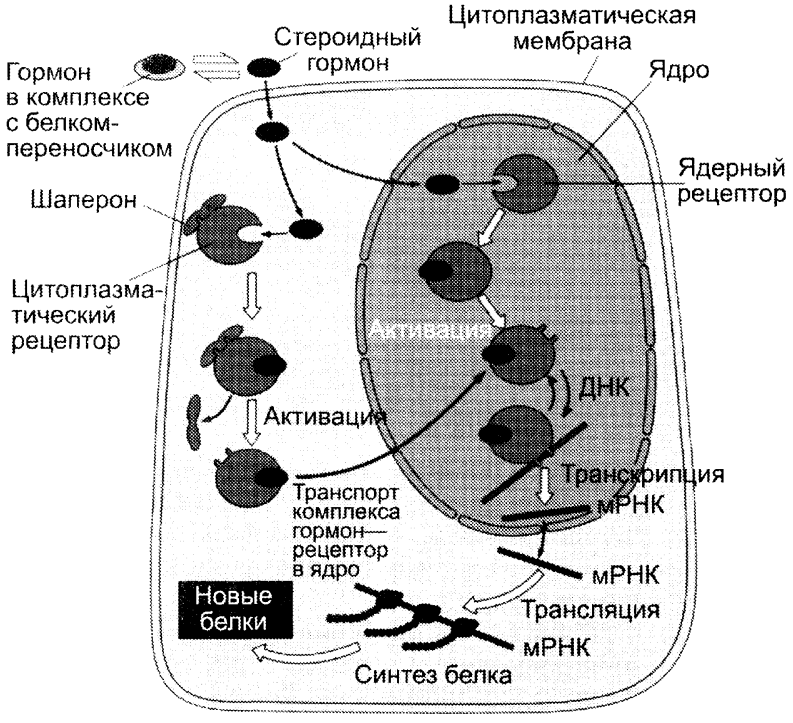


Рис. 5-43. Передача сигнала на внутриклеточные рецепторы.

Л. Специфичность сигнализации

Для исследователей, имеющих представление о количестве сигнальных молекул, о соответствующем количестве рецепторов, о трансмембранных системах передачи сигналов, вторичных посредниках, остаётся загадкой, как протеинкиназы выбирают соответствующий фермент метаболического пути для фосфорилирования. Исследователи для объяснения этого явления предлагают «гипотезу мишени» (от англ. *targeting hypothesis*). По этой гипотезе специфичность протеинкиназ и фосфопротеинфосфатаз достигается путём образования компартментов на мембране, в состав которых входят не только сами протеинкиназы и фосфопротеинфосфатазы, но и специфические белки-субстраты. Наличие остатка миристиновой или пальмитиновой кислоты в структуре белков-субстратов — условие их «заякоривания» в соответствующем мембранном компартменте.

Однако в большинстве случаев процесс активации какого-либо метаболического процесса находится под контролем не одной, а нескольких систем внутриклеточной сигнализации, поэтому важным фактором ответа клеток служит взаимосвязь этих систем.

РАЗДЕЛ 6

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН

Живые организмы находятся в постоянной и неразрывной связи с окружающей средой. Эта связь осуществляется в процессе обмена веществ. Обмен веществ включает 3 этапа: поступление веществ в организм, метаболизм и выделение конечных продуктов из организма.

Поступление веществ в организм происходит в результате дыхания (кислород) и питания. В ЖКТ продукты питания перевариваются (расщепляются до простых веществ). При переваривании происходит гидролиз полимеров (белков, полисахаридов и других сложных органических веществ) до мономеров, всасывающихся в кровь и включающихся в промежуточный обмен.

Промежуточный обмен (внутриклеточный метаболизм) включает 2 типа реакций: катаболизм и анаболизм (рис. 6-1).

Катаболизм — процесс расщепления органических молекул до конечных продуктов. Конечные продукты превращений органических веществ у животных и человека — CO_2, H_2O и мочевина. В процессы катаболизма включаются метаболиты, образующиеся как при пищеварении, так и при распаде структурно-функциональных компонентов клеток.

Реакции катаболизма сопровождаются выделением энергии (экзергонические реакции).

Анаболизм объединяет биосинтетические процессы, в которых простые строительные блоки соединяются в сложные макромолекулы, необходимые для организма. В анаболических реакциях используется энергия, освобождающаяся при катаболизме (эндергонические реакции).

I. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ

Процессы катаболизма в клетках животных сопровождаются потреблением кислорода, который необходим для реакций окисления. В результате этих реакций происходит освобождение энергии, которая необходима организмам в процессах жизнедеятельности для осуществления различных видов работы. Небиологические системы могут совершать работу за счёт тепловой энергии, биологические системы функционируют в изотермическом режиме и для осуще-

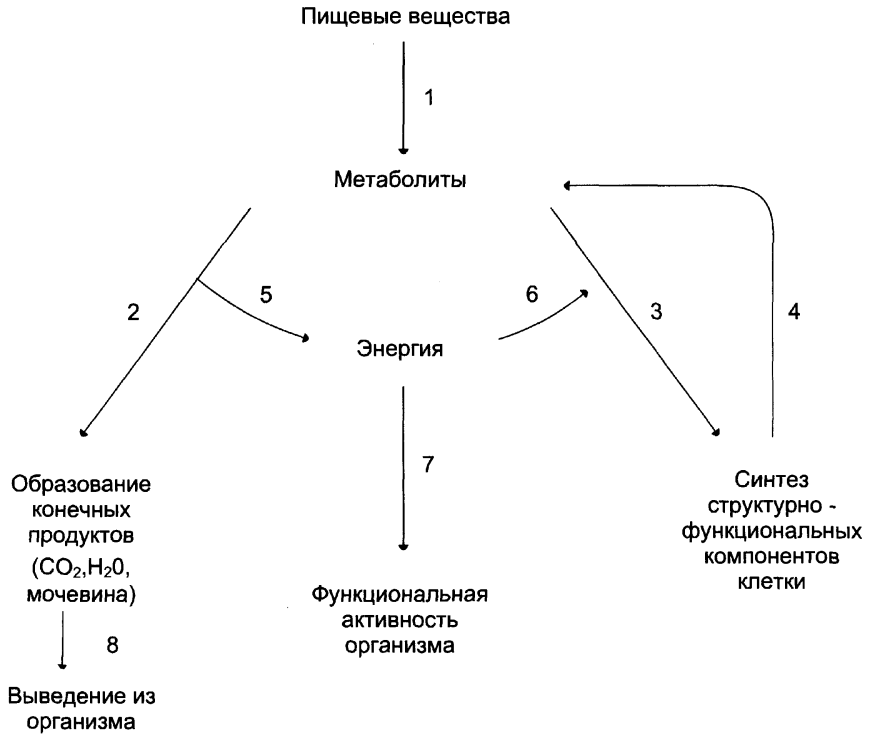


Рис. 6-1. Общая схема обмена веществ и энергии. 1 — пищеварение; 2 — катаболизм; 3 — анаболизм; 4 — распад структурно-функциональных компонентов клеток; 5 — экзергонические реакции; 6,7 — эндергонические реакции; 8 — выведение из организма.

ствления процессов жизнедеятельности используют химическую энергию. Изучением превращений энергии, сопровождающих химические реакции, занимается биоэнергетика, или биохимическая термодинамика.

А. Свободная энергия и законы термодинамики

Живые организмы с точки зрения термодинамики — открытые системы. Между системой и окружающей средой возможен обмен энергии, который происходит в соответствии с законами термодинамики.

1. Законы термодинамики

Первый закон — закон сохранения энергии; его можно сформулировать так: общая энергия системы и окружающей среды — величина постоянная.

Внутри рассматриваемой системы энергия может переходить от одной её части к другой или превращаться из одной формы в другую.

Второй закон гласит, что все физические и химические процессы в системе стремятся к необратимому переходу полезной энергии в хаотическую, неуправляемую форму. Мерой перехода или неупорядоченности системы служит величина, называемая энтропией (S), она достигает максимума, когда система приходит в истинное равновесие с окружающей средой.

2. Свободная энергия

Каждое органическое соединение, поступающее в организм извне или входящее в состав живой материи, обладает определённым запасом внутренней энергии (E). Часть этой внутренней энергии может быть использована для совершения полезной работы. Такую энергию системы называют свободной энергией (G).

При постоянных температуре и давлении соотношение между изменением свободной энергии системы (ΔG) и изменением энтропии (ΔS) можно представить следующим уравнением:

$\Delta G = \Delta H - T \times S$, где ΔH — изменение энтальпии (внутренней энергии или теплоты, содер-

жащейся в системе); T — абсолютная температура. В условиях, при которых протекают биохимические реакции, ΔH приблизительно равно ΔE (изменению внутренней энергии системы в результате реакции). Для биологических систем измерение свободной энергии производят обычно при стандартных условиях, когда pH 7,0, температура 25 °C, все растворы находятся в концентрации 1 моль/л, а все газы при давлении в 1 атм.

При стандартных условиях все функции обозначают как $\Delta G^{0'}$, $\Delta S^{0'}$ и $\Delta H^{0'}$. Изменение стандартной свободной энергии ($\Delta G^{0'}$) можно вычислить, зная константу равновесия ($K'eq$) химической реакции.

3. Эндергонические и экзергонические реакции

Направление химической реакции определяется значением ΔG. Если эта величина отрицательна, то реакция протекает самопроизвольно и сопровождается уменьшением свободной энергии. Такие реакции называют экзергоническими. Если при этом абсолютное значение ΔG велико, то реакция идёт практически до конца, и её можно рассматривать как необратимую.

Если ΔG положительно, то реакция будет протекать только при поступлении свободной энергии извне; такие реакции называют эндергоническими.

Если абсолютное значение ΔG велико, то система устойчива, и реакция в таком случае практически не осуществляется. При ΔG, равном нулю, система находится в равновесии (табл. 6-1).

4. Сопряжение экзергонических и эндергонических процессов в организме

В биологических системах термодинамически невыгодные (эндергонические) реакции могут протекать лишь за счёт энергии экзергонических реакций. Такие реакции называют энергетически сопряжёнными. Многие из этих реакций происходят при участии аденозинтрифосфата (АТФ), играющего роль сопрягающего фактора.

Рассмотрим подробнее энергетику сопряжённых реакций на примере фосфорилирования глюкозы.

Реакция фосфорилирования глюкозы свободным фосфатом с образованием глюкозо-6-фосфата является эндергонической:

(1) Глюкоза+ H_3PO_4 → Глюкозо-6-фосфат + H_2O (ΔG = +13,8 кДж/моль).

Для протекания такой реакции в сторону образования глюкозо-6-фосфата необходимо её сопряжение с другой реакцией, величина свободной энергии которой больше, чем требуется для фосфорилирования глюкозы.

(2) АТФ → АДФ + H_3PO_4
(ΔG = −30,5 кДж/моль).

При сопряжении процессов (1) и (2) в реакции, катализируемой гексокиназой (см. раздел 7), фосфорилирование глюкозы легко протекает в физиологических условиях; равновесие реакции сильно сдвинуто вправо, и она практически необратима:

(3) Глюкоза + АТФ → Глюкозо-6-фосфат + АДФ (ΔG = −16,7 кДж/моль).

Б. Характеристика высокоэнергетических фосфатов. Цикл АТФ–АДФ

В живых организмах существует целая группа органических фосфатов, гидролиз которых приводит к освобождению большого количества свободной энергии. Такие соединения называют высокоэнергетическими фосфатами (табл. 6-2).

Таблица 6-1. Соотношение между величинами K'_{eq} и $\Delta G^{0'}$ и направлением химических реакций

K'_{eq}	$\Delta G^{0'}$	**Направление реакции при исходных концентрациях компонентов 1 М**
>1,0	Отрицательно	Слева направо
1,0	Равно нулю	Состояние равновесия
<1,0	Положительно	Справа налево

Таблица 6-2. Свободная энергия гидролиза некоторых органических фосфатов

Соединение	Продукты реакции	$-\Delta G^{0'}$, ккал/моль	$-\Delta G^{0'}$, кДж/моль
Фосфоенолпируват	Пируват + H_3PO_4	14,8	61,86
1,3-Бисфосфоглицерат	3-фосфоглицерат + H_3PO_4	13,0	54,34
Карбамоилфосфат	Карбамат + H_3PO_4	12,0	51,83
Креатинфосфат	Креатин + H_3PO_4	10,3	43,05
Ацетилфосфат	Уксусная кислота + H_3PO_4	10,3	43,05
АТФ	АДФ + H_3PO_4	7,3	30,51
АДФ	АМФ + H_3PO_4	6,6	27,59
Дифосфат($H_4P_2O_7$)	2 H_3PO_4	6,6	27,59
Глюкозо-1-фосфат	Глюкоза + H_3PO_4	5,0	20,90
Фруктозо-6-фосфат	Фруктоза + H_3PO_4	3,8	15,88
Глюкозо-6-фосфат	Глюкоза + H_3PO_4	3,3	13,79
Глицеролфосфат	Глицерин + H_3PO_4	2,2	8,36

Как видно из табл. 6-2, разные фосфорилированные соединения обладают разным запасом свободной энергии. К группе высокоэнергетических фосфатов, помимо АТФ, относят енолфосфаты, ангидриды и фосфогуанидины. Соединения, расположенные в нижней части таблицы, составляют группу низкоэнергетических фосфатов. Центральное место среди этих соединений занимает АТФ (рис. 6-2).

АТФ — молекула, богатая энергией, поскольку она содержит две фосфоангидридные связи (β, γ). При гидролизе концевой фосфоангидридной связи АТФ превращается в АДФ и ортофосфат P_i. При этом изменение свободной энергии составляет −7,3 ккал/моль. При условиях, существующих в клетке в норме (pH 7,0, температура 37 °C), фактическое значение $\Delta G^{0'}$ для процесса гидролиза составляет около −12 ккал/моль. Величина свободной энергии гидролиза АТФ делает возможным его образование из АДФ за счёт переноса фосфатного остатка от таких высокоэнергетических фосфатов, как, например, фосфоенол-

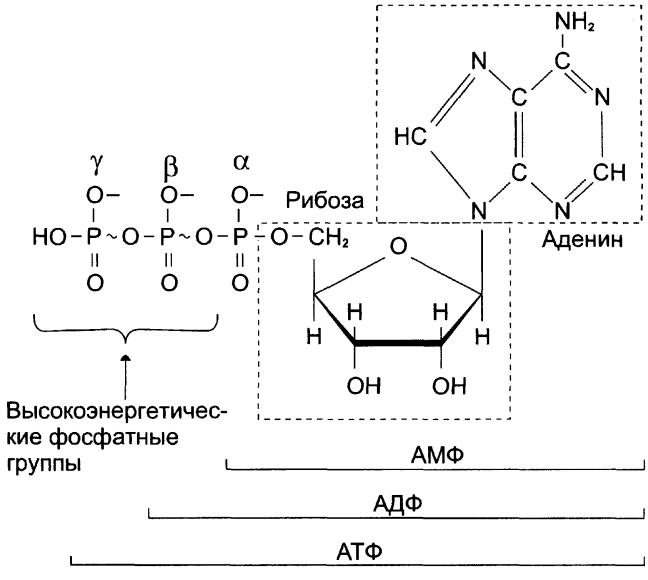


Рис. 6-2. Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ). В молекуле АТФ две высокоэнергетические (макроэргические) связи β и γ; они обозначены на рисунке знаком ~ (тильда).

пируват или 1,3-бисфосфоглицерат; в свою очередь, АТФ может участвовать в таких эндергонических реакциях, как фосфорилирование глюкозы или глицерина. АТФ выступает в роли донора энергии в эндергонических реакциях многих анаболических процессов. Некоторые биосинтетические реакции в организме могут протекать при участии других нуклеозидтрифосфатов, аналогов АТФ; к ним относят гуанозинтрифосфат (ГТФ), уридинтрифосфат (УТФ) и цитидинтрифосфат (ЦТФ). Все эти нуклеотиды, в свою очередь, образуются при использовании свободной энергии концевой фосфатной группы АТФ. Наконец, за счёт свободной энергии АТФ совершаются различные виды работы, лежащие в основе жизнедеятельности организма, например, такие как мышечное сокращение или активный транспорт веществ.

Таким образом, АТФ — главный, непосредственно используемый донор свободной энергии в биологических системах. В клетке молекула АТФ расходуется в течение одной минуты после её образования. У человека количество АТФ, равное массе тела, образуется и разрушается каждые 24 ч.

Использование АТФ как источника энергии возможно только при условии непрерывного синтеза АТФ из АДФ за счёт энергии окисления органических соединений (рис. 6-3). Цикл АТФ–АДФ — основной механизм обмена энергии в биологических системах, а АТФ — универсальная «энергетическая валюта».

В. Окислительно-восстановительные реакции. Окислительно-восстановительный потенциал

Под окислением понимают отщепление электронов, а под восстановлением — присоединение электронов. Окисление донора электронов всегда сопровождается восстановлением акцептора электронов. Этот принцип окислительно-восстановительных процессов применим и к биохимическим системам. В любой окислительно-восстановительной реакции участвует акцептор электронов (окислитель) и донор электронов (восстановитель). Например:

$$(1)\ Cu + O \rightarrow Cu^{2+}O^{2-}.$$

Суммарную реакцию (1) можно условно разделить на 2 полуреакции (2), (3):

$$(2)\ Cu - 2e \rightarrow Cu^{2+}.$$

$$(3)\ O + 2e \rightarrow O^{2-}.$$

В каждой из них участвует окисленная и восстановленная форма одного соединения; их называют сопряжённой парой, или редокс-парой.

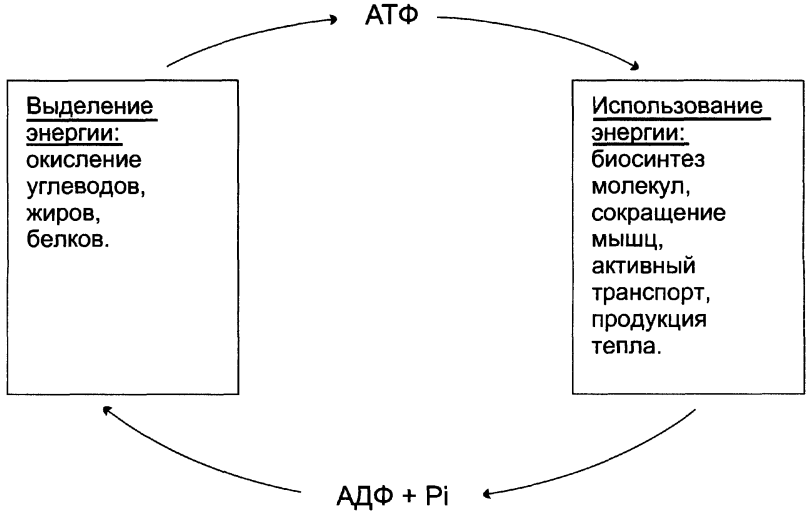


Рис. 6-3. Цикл АТФ–АДФ.

Таблица 6-3. Стандартные окислительно-восстановительные потенциалы некоторых сопряжённых пар

Окислительно-восстановительная пара	E_0', V
$2H^+/H_2$	–0,42
$NAD^+/NADH$	–0,32
$NADP^+/NADPH$	–0,32
NADH-дегидрогеназа (FMN-форма)	–0,30
NADH-дегидрогеназа ($FMNH_2$-форма)	
FAD-белок/$FADH_2$-белок	–0,05
Сукцинат/фумарат	+0,03
Убихинон/убихинол	+0,04
цит. b Fe^{3+}/цит. b Fe^{2+}	+0,07
цит. c_1 Fe^{3+}/цит. c_1 Fe^{2+}	+0,23
цит. c Fe^{3+}/цит. c Fe^{2+}	+0,25
цит. a Fe^{3+}/цит. a Fe^{2+}	+0,29
цит. a_3 Fe^{3+}/цит. a_3 Fe^{2+}	+0,55
1/2 O_2 + 2 H^+ + 2e/H_2O	+0,82

Разные редокс-пары обладают различным сродством к электрону. Те, у которых это сродство меньше, отдают электрон тем, у кого оно больше. Мерой сродства редокс-пары к электрону служит окислительно-восстановительный потенциал, или редокс-потенциал (E_0'), величина которого непосредственно связана с изменением свободной энергии. Величину E_o' выражают в вольтах; чем она меньше (отрицательнее), тем меньше сродство вещества к электронам. Чем больше сродство, тем больше восстановительный потенциал.

Редокс-потенциалы E_0' связаны с изменением свободной энергии уравнением Нернста:

$$\Delta G^{0'} = - nF\Delta E_o',$$

где n — число перенесённых в реакции электронов; F — постоянная Фарадея (23 061 ккал $В^{-1}моль^{-1}$); $\Delta E_o'$ — разность редокс-потенциалов электрон-донорной и электрон-акцепторной пар.

Величина $\Delta E_o'$ — стандартная величина окислительно-восстановительного потенциала; её определяют в стандартных условиях, когда концентрации всех веществ равны 1 М, давление газов составляет 1 атм, а pH 7,0 (табл. 6-3).

Г. Основные этапы трансформации энергии катаболических процессов

Энергия освобождается в процессе ферментативного окисления метаболитов специфическими дегидрогеназами. В реакциях дегидрирования электроны и протоны переходят от органических субстратов на коферменты NAD- и FAD-зависимых дегидрогеназ. Электроны, обладающие высоким энергетическим потенциалом, передаются от восстановленных коферментов NADH и $FADH_2$ к кислороду через цепь переносчиков, локализованных во внутренней мембране митохондрий. Восстановление молекулы O_2 происходит в результате переноса 4 электронов. При каждом присоединении к кислороду 2 электронов, поступающих к нему по цепи переносчиков, из матрикса поглощаются 2 протона, в результате чего образуется молекула H_2O.

Окисление органических веществ в клетках, сопровождающееся потреблением кислорода и синтезом воды, называют тканевым дыханием, а цепь переноса электронов (ЦПЭ) — дыхательной цепью.

Электроны, поступающие в ЦПЭ, по мере их продвижения от одного переносчика к другому теряют свободную энергию. Значительная часть этой энергии запасается в форме АТФ, а часть энергии рассеивается в виде тепла. Кроме того, электроны с высоким энергетическим потенциалом, возникающие при окислении различных субстратов, могут быть использованы в реакциях биосинтеза, для которых помимо АТФ требуются восстановительные эквиваленты, например NADPH.

Д. Ферменты и коферменты, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях

Перенос электронов от окисляемых субстратов к кислороду происходит в несколько этапов. В нём участвует большое количество промежуточных переносчиков, каждый из которых способен присоединять электроны от предыдущего компонента и передавать следующему. Так возникает цепь окислительно-восстановительных реакций, в результате чего происходят восстановление O_2 и синтез H_2O. В дыхательную цепь митохондрий входит большое число переносчиков (рис. 6-4).

За исключением убихинона (KoQ), все компоненты ЦПЭ — белки. В составе этих белков содержатся различные небелковые компоненты: FMN, Fe в составе железо-серных белков и в составе порфириновых колец, ионы Cu.

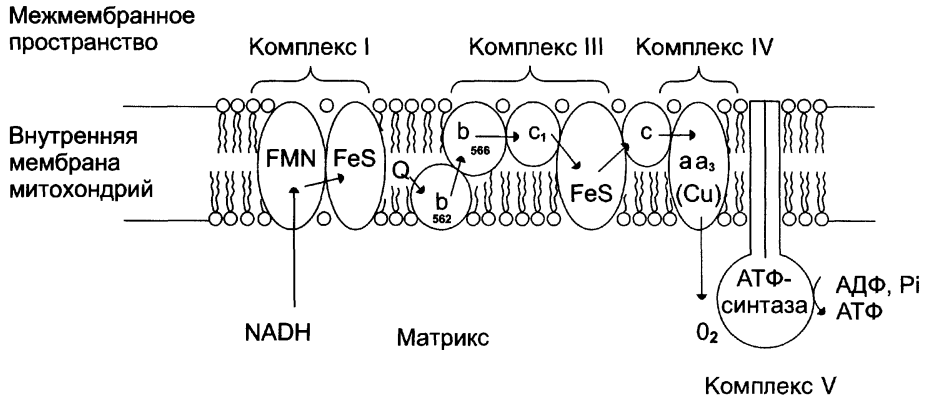


Рис. 6-4. Митохондриальная цепь переноса электронов. Комплекс I содержит FMN и не менее пяти железо-серных белков (FeS). Комплекс III включает две разные формы цитохрома b (с максимумами поглощения 562 и 566), один FeS-белок и цитохром c_1. Комплекс IV содержит цитохромы a_1 и a_3 и два иона меди. Комплекс II (сукцинатдегидрогеназа) на рисунке не показан (см. рис. 6-13). Комплекс V – АТФ-синтаза.

1. Первичные акцепторы водорода

Первичные акцепторы водорода окислительно-восстановительных реакций относят к 2 типам дегидрогеназ: никотинамидзависимым, содержащим в качестве коферментов производные никотиновой кислоты, и флавинзависимым, содержащим производные рибофлавина (см. раздел 2).

Никотинамидзависимые дегидрогеназы содержат в качестве коферментов NAD^+ или $NADP^+$ (см. раздел 2). NAD^+ и $NADP^+$ — производные витамина РР. Эти коферменты входят в состав активных центров дегидрогеназ, но могут обратимо диссоциировать из комплекса с апоферментами и включаются в состав фермента в ходе реакции. Субстраты NAD- и NADP-зависимых дегидрогеназ находятся в матриксе митохондрий и в цитозоле. Рабочей частью никотинамидных коферментов служит никотинамид (рис. 6-5).

Большинство дегидрогеназ, поставляющих электроны в ЦПЭ, содержат NAD^+. Они катализируют реакции типа:

$$R\text{-}CHOH\text{-}R_1 + NAD^+ \leftrightarrow R\text{-}CO\text{-}R_1 + NADH + H^+.$$

Таким образом, NAD^+, присоединяя протоны и электроны от различных субстратов, служит главным коллектором энергии окисляемых веществ и главным источником электронов, обладающих высоким энергетическим потенциалом, для ЦПЭ.

NADPH не является непосредственным донором электронов в ЦПЭ, а используется почти исключительно в восстановительных биосинтезах (см. раздел 8). Однако возможно включение электронов с NADPH в ЦПЭ благодаря действию пиридиннуклеотид трансгидрогеназы, катализирующей реакцию:

$$NADPH + NAD^+ \leftrightarrow NADP^+ + NADH.$$

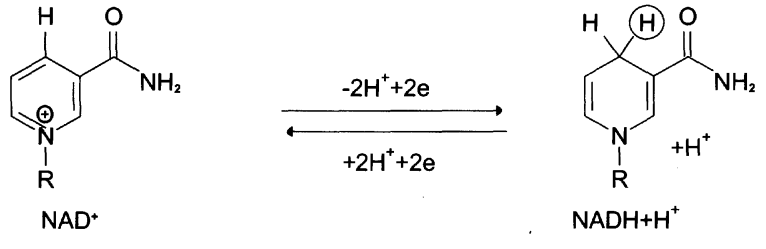


Рис. 6-5. Структурные формулы рабочей части коферментов NAD^+ и $NADP^+$. В окисленной форме никотинамидные коферменты обозначают как NAD^+ и $NADP^+$, так как они несут положительный заряд на атоме азота пиридинового кольца. В реакциях дегидрирования из двух атомов водорода, отщепляемых от окисляемого субстрата, никотинамидное кольцо присоединяет ион водорода и два электрона в форме гидрид-иона ($:H^-$). Второй ион переходит в среду. В обратной реакции NADH (NADPH) выступают в качестве доноров электронов и протонов.

Флавиновые дегидрогеназы содержат в качестве коферментов FAD или FMN. Эти коферменты образуются в организме человека из витамина B_2 (см. раздел 2). Флавиновые коферменты прочно связаны с апоферментами. Рабочей частью FAD и FMN служит изоаллоксазиновая сопряжённая циклическая система (рис. 6-6).

FAD служит акцептором электронов от многих субстратов в реакциях типа:

$$R\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}R_1 + E\ (FAD) \leftrightarrow R\text{-}CH{=}CH\text{-}R_1 + E\ (FADH_2),$$

где E — белковая часть фермента.

Большинство FAD-зависимых дегидрогеназ — растворимые белки, локализованные в матриксе митохондрий. Исключение составляет сукцинатдегидрогеназа, находящаяся во внутренней мембране митохондрий. К FMN-содержащим ферментам принадлежит NADH-дегидрогеназа, которая также локализована во внутренней мембране митохондрий; она окисляет NADH, образующийся в митохондриальном матриксе.

2. Цепь переноса электронов от NADH и $FADH_2$ на кислород

Перенос электронов от NADH к O_2 включает ряд переносчиков, которые локализованы во внутренней мембране митохондрий. За исключением убихинона и цитохрома C, это сложные белковые комплексы.

NADH-дегидрогеназа (NADH-Q-редуктаза, комплекс I) состоит из нескольких полипептидных цепей. Роль простетической группы играет FMN. Единственный субстрат фермента — NADH, с которого 2 электрона и протон переносятся на FMN с образованием $FMNH_2$. Второй протон поглощается из матрикса. Реакция протекает по уравнению:

$$NADH + H^+ + E\ (FMN) \rightarrow NAD^+ + E\ (FMNH_2).$$

С $FMNH_2$ электроны переносятся затем на ряд железо-серных белков (FeS), играющих роль второй простетической группы в молекуле NADH-дегидрогеназы. Атомы железа в этих белках (негемовое железо) собраны в несколько групп, так называемых железо-серных центров. FeS-центры входят в состав многих белков (флавопротеинов, цитохромов), участвующих в окислительно-восстановительных реакциях. Известны 3 типа FeS-центров (FeS, Fe_2S_2, Fe_4S_4), в которых атом железа связан с атомом серы остатков цистеина или неорганической серы. Строение железо-серных центров показано на рис. 6-7.

NADH-дегидрогеназа содержит несколько центров типа Fe_2S_2 и Fe_4S_4. Атомы железа в таких центрах могут принимать и отдавать электроны поочерёдно, переходя в ферро- (Fe^{2+}) и ферри- (Fe^{3+}) состояния. От железо-серных центров электроны переносятся на кофермент Q (убихинон) (рис. 6-8).

Обозначение этого жирорастворимого хинона происходит от первой буквы английского названия хинона (*quinone*), а название убихинон отражает его широкую распространённость в природе (*ubiquitous* — вездесущий). Молекулы убихинона в зависимости от источника, из которого они выделены, различаются длиной углеводородной цепи, которая у млекопитающих содержит 10 изопреноидных звеньев и обозначается как Q_{10}. В процессе переноса электронов с NADH-дегидрогеназы через FeS на убихинон он обратимо превращается в гидрохинон. Убихинон выполняет коллекторную функцию, присоединяя электроны от NADH-дегидрогеназы и других флавинзависимых дегидрогеназ, в частности, от сукцинатдегидрогеназы. Убихинон участвует в реакциях типа:

$$E\ (FMNH_2) + Q \rightarrow E\ (FMN) + QH_2.$$

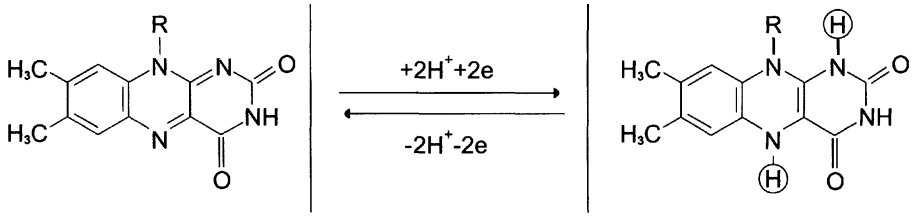


Рис. 6-6. Структурные формулы рабочей части коферментов FAD и FMN. В ходе реакции FAD и FMN присоединяют 2 электрона и, в отличие от NAD^+, оба теряемых субстратом протона.

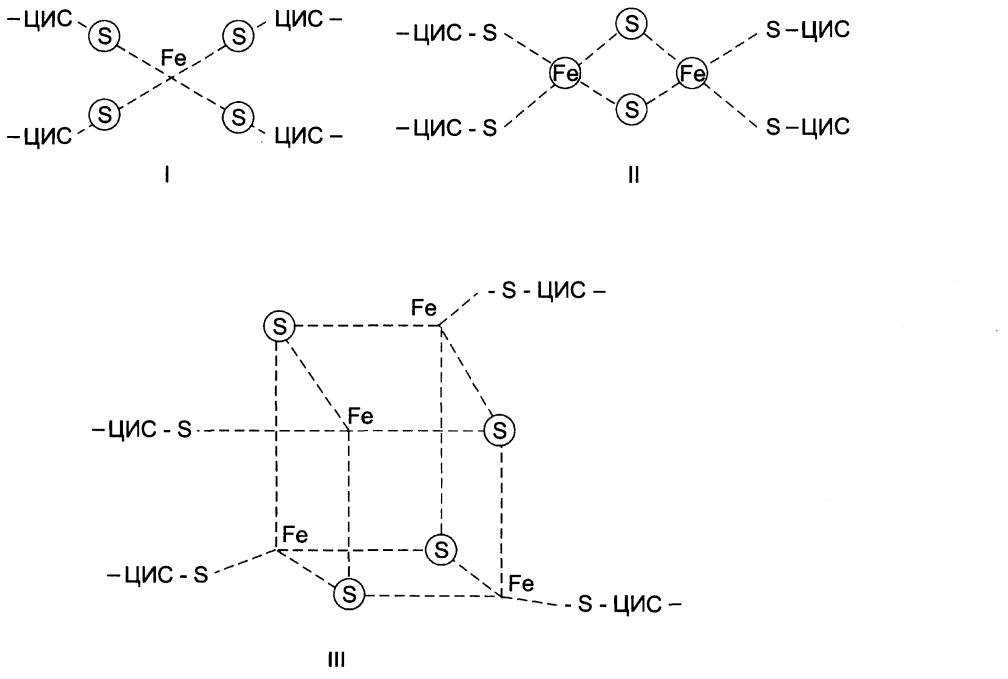
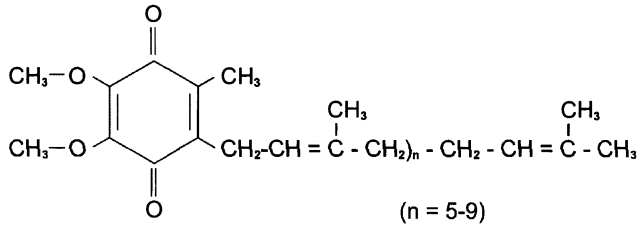
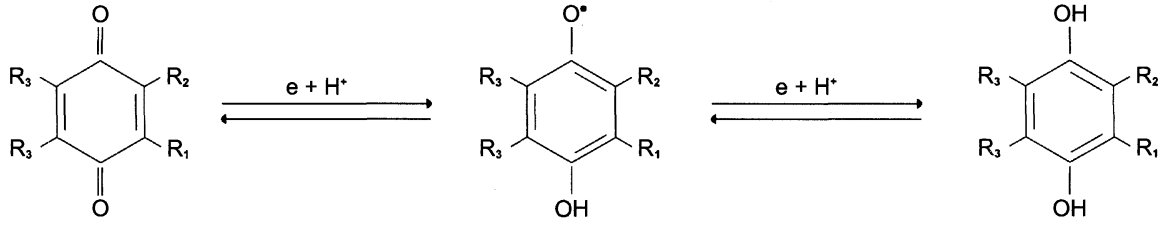


Рис. 6-7. Строение железо-серных центров. I — FeS-центр; атом железа связан координационными связями с четырьмя атомами серы, принадлежащими четырём остаткам цистеина в белке. II — Fe_2S_2-центр; каждый из двух атомов железа связан координационными связями с двумя атомами неорганической серы и двумя остатками цистеина в белке; III — Fe_4S_4-центр; четыре атома железа связаны с четырьмя атомами серы и четырьмя остатками цистеина в белке. Атомы железа в FeS-центрах могут находиться в окисленном (Fe^{3+}) или восстановленном (Fe^{2+}) состоянии.



Убихинон (кофермент Q)



Окисленная форма Q

Семихинон (форма свободного радикала) $HQ^{\bullet}$

Восстановленная форма QH_2

Рис. 6-8. Структура убихинона (кофермента Q). n — число изопреноидных звеньев. Убихинон может принимать один электрон и превращаться в семихинон или 2 электрона и полностью восстанавливаться в гидрохинон (убихинол).

Цитохромы или гемопротеины присутствуют во всех типах организмов. В клетках эукариотов они локализованы в митохондриальных мембранах и в ЭР. Известно около 30 различных цитохромов. Все цитохромы в качестве простетической группы содержат гем (см. раздел 1). Их многообразие обусловлено:

- различием боковых цепей в структуре гема;
- различием в структуре полипептидных цепей;
- различием в способе связи полипептидных цепей с гемом.

В зависимости от способности поглощать свет в определённой части спектра все цитохромы делят на группы a, b, c. Внутри каждой группы отдельные виды с уникальными спектральными свойствами обозначают цифровыми индексами (b, b_1, b_2 и т.д.).

Структурные особенности разных видов цитохромов определяют различие в их окислительно-восстановительных потенциалах. В ЦПЭ участвуют 5 типов цитохромов (a, a_3, b, c, c_1). За исключением цитохрома c, все цитохромы находятся во внутренней мембране митохондрий в виде сложных белковых комплексов (табл. 6-4).

QH_2-дегидрогеназа (коэнзим Q-цитохром c-редуктаза, комплекс III) состоит из 2 типов цитохромов (b_1 и b_2) и цитохрома c_1. QH_2-дегидрогеназа переносит электроны от убихинола на цитохром c. Внутри комплекса III электроны передаются от цитохромов b на FeS-центры, на цитохром c_1, а затем на цитохром c. Группы гема, подобно FeS-центрам, переносят только по одному электрону. Таким образом, от молекулы QH_2 2 электрона переносятся на 2 молекулы цитохрома b. В качестве промежуточного продукта в этих реакциях переноса электронов возможно образование свободного радикала семихинона. В цитохромах типа b гем не связан ковалентно с белком, а в цитохромах c_1 и c он присоединяется к белку при помощи тиоэфирных связей (рис. 6-9). Эти связи образуются путём присоединения 2 цистеиновых остатков к винильным группам гема.

Цитохром c — периферический водорастворимый мембранный белок с молекулярной массой 12 500 Д, имеющий одну полипептидную цепь из 100 аминокислотных остатков, и молекулу гема, ковалентно связанную с полипептидом.

Цитохромоксидаза (комплекс IV) состоит из 2 цитохромов типа aa_3, каждый из которых имеет центр связывания с кислородом. Цитохромы a и a_3 имеют характерную железопорфириновую простетическую группу, называемую гемом A и отличающуюся от гема цитохромов c и c_1 (рис. 6-10). Он содержит формильную группу вместо одной из метильных групп и углеводородную цепь вместо одной из винильных групп.

Другая особенность комплекса a-a_3 — наличие в нём ионов меди, связанных с белковой

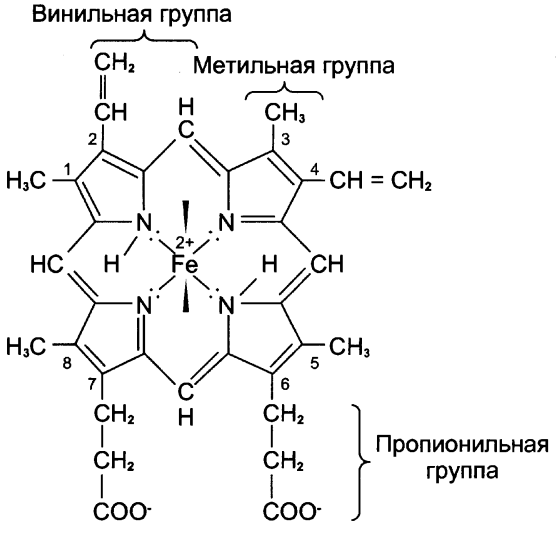


Рис. 6-9. Структура гема цитохромов b, c, c_1.

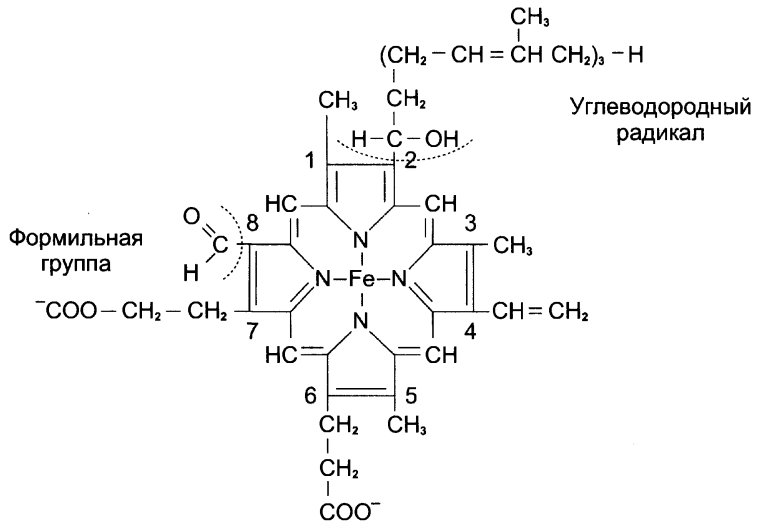


Рис. 6-10. Строение гема А.

частью в так называемых CuA-центрах. Перенос электронов комплексом a-a_3 включает реакции:

$$Cu^{+} \leftrightarrow Cu^{2+} + e,$$

$$Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+} + e.$$

Комплекс цитохромов a-a_3 непосредственно реагирует с молекулярным кислородом. Некоторые характеристики компонентов ЦПЭ приведены в табл. 6-4.

Е. Организация дыхательной цепи в митохондриях

Основные переносчики электронов встроены во внутреннюю мембрану митохондрий и организованы в 4 комплекса, расположенных в определённой последовательности (векторно). В этой последовательности их стандартные окислительно-восстановительные потенциалы становятся более положительными по мере приближения к кислороду (табл. 6-3, рис. 6-11).

Каждое звено этой цепи специфично в отношении донора и акцептора электронов.

На первом этапе дегидрогеназы катализируют отщепление водорода от различных субстратов. Если субстратами служат α-гидроксикислоты малат, изоцитрат, 3-гидроксибутират, водород переносится на NAD^{+}. Образовавшийся NADH в дыхательной цепи, в свою очередь, окисляется NADH-дегидрогеназой (комплекс I).

Таблица 6-4. Компоненты митохондриальной цепи переноса электронов

Название компонента	Простетическая группа	Донор e	Акцептор e
NADH-дегидрогеназа, комплекс I	FMN, FeS	NADH	KoQ
Коэнзим Q, убихинон		Комплекс I	Комплекс III (bc_1)
QH_2-дегидрогеназа, комплекс III	FeS, гем b_1 ($_{562}$), гем b_2 ($_{566}$), гем c_1	QH_2	Цитохром c
Цитохром c	Гем c	Комплекс III	Комплекс IV
Цитохромоксидаза, комплекс IV	Гем A Cu^{2+}	Цитохром c	O_2
Сукцинатдегидрогеназа, комплекс II	FAD, FeS	Сукцинат	KoQ

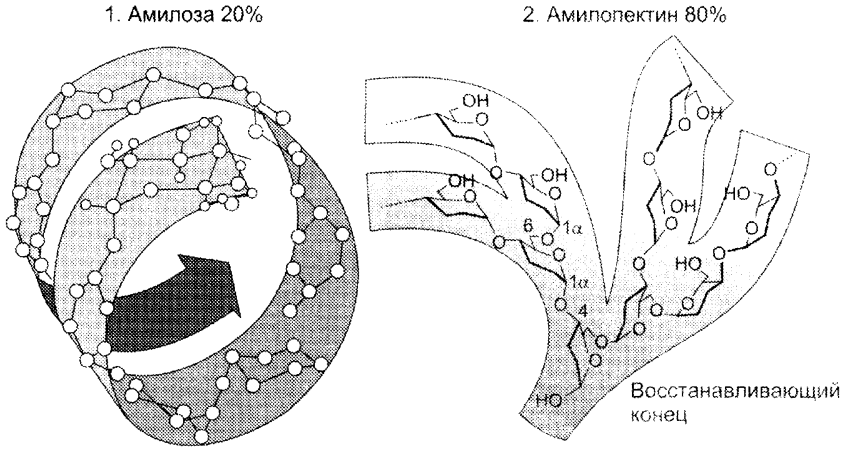


Рис. 7-9. Строение крахмала.

Гликоген представляет собой структурный аналог крахмала, но имеет большую степень ветвления: примерно на каждые 10 остатков глюкозы приходится одна α-1,6-гликозидная связь.

II. ПЕРЕВАРИВАНИЕ УГЛЕВОДОВ

Эпителиальные клетки кишечника способны всасывать только моносахариды. Поэтому процесс переваривания заключается в ферментативном гидролизе гликозидных связей в углеводах, имеющих олиго- или полисахаридное строение (рис. 7-10).

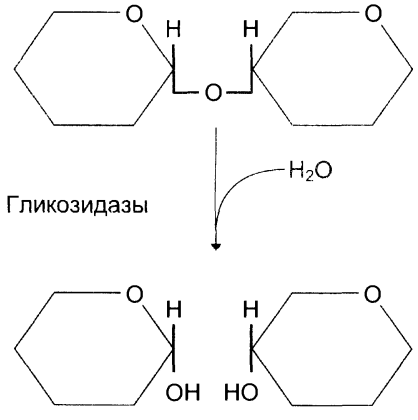


Рис. 7-10. Гидролиз гликозидной связи.

А. Переваривание углеводов в ротовой полости

В ротовой полости пища измельчается при пережёвывании, смачиваясь при этом слюной. Слюна на 99% состоит из воды и обычно имеет pH 6,8. В слюне присутствует гидролитический фермент **α-амилаза (α-1,4-гликозидаза)**, расщепляющая в крахмале α-1,4-гликозидные связи. В ротовой полости не может происходить полное расщепление крахмала, так как действие фермента на крахмал кратковременно. Кроме того, амилаза слюны не расщепляет α-1,6-гликозидные связи (связи в местах разветвлений), поэтому крахмал переваривается лишь частично с образованием крупных фрагментов — декстринов и небольшого количества мальтозы. Следует отметить, что амилаза слюны не гидролизует гликозидные связи в дисахаридах.

Действие амилазы слюны прекращается в резко кислой среде содержимого желудка (pH 1,5–2,5). Однако внутри пищевого комка активность амилазы может некоторое время сохраняться, пока pH не изменится в кислую сторону. Желудочный сок не содержит ферментов, расщепляющих углеводы. В желудочном содержимом возможен лишь незначительный кислотный гидролиз гликозидных связей.

Б. Переваривание углеводов в кишечнике

Последующие этапы переваривания нерасщеплённого или частично расщеплённого крахмала, а

II. ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ АДФ

Так как электроны всегда стремятся переходить от электроотрицательных систем к электроположительным, их транспорт по ЦПЭ к кислороду сопровождается снижением свободной энергии.

При сравнении величин электрохимических потенциалов переносчиков электронов (табл. 6-3) видно, что снижение свободной энергии происходит на каждом этапе ЦПЭ, и энергия электронов выделяется порциями.

Вместе с тем в дыхательной цепи можно выделить 3 участка, в которых перенос электронов сопровождается относительно большим снижением свободной энергии (рис. 6-11). Эти этапы способны обеспечить энергией синтез АТФ, так как количество выделяющейся свободной энергии приблизительно равно энергии, необходимой для синтеза АТФ из АДФ и фосфата. Экспериментально было подтверждено, что процесс переноса электронов по ЦПЭ и синтез АТФ энергетически сопряжены.

Первый процесс — перенос электронов от восстановленных коферментов NADH и $FADH_2$ через ЦПЭ на кислород — экзергонический. Например:

$$NADH + H^+ + 1/2\ O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O + 52\ \text{ккал/моль}(\approx 220\ \text{кДж/моль}). \quad (1)$$

Второй процесс — фосфорилирование АДФ, или синтез АТФ, — эндергонический:

$$АДФ + H_3PO_4 + 7{,}3\ \text{ккал/моль}\ (30{,}5\ \text{кДж/моль}) = АТФ + H_2O. \quad (2)$$

Синтез АТФ из АДФ и H_3PO_4 за счёт энергии переноса электронов по ЦПЭ называют окислительным фосфорилированием.

А. Механизм сопряжения окисления и фосфорилирования

Каким же образом осуществляется сопряжение этих двух процессов? Наиболее обоснованный ответ на этот вопрос даёт хемиосмотическая теория Митчелла, предложенная им в 1961 г. Основные положения были подтверждены и разработаны детально совместными усилиями многих исследователей в последующие годы.

1. Протонный градиент и электрохимический потенциал

Перенос электронов по дыхательной цепи от NADH к кислороду сопровождается выкачиванием протонов из матрикса митохондрий через внутреннюю мембрану в межмембранное пространство. На эту работу затрачивается часть энергии электронов, переносимых по ЦПЭ.

Протоны, перенесённые из матрикса в межмембранное пространство, не могут вернуться обратно в матрикс, так как внутренняя мембрана непроницаема для протонов. Таким образом, создаётся протонный градиент, при котором концентрация протонов в межмембранном пространстве больше, а pH меньше, чем в матриксе. Кроме того, каждый протон несёт положительный заряд, и вследствие этого появляется разность потенциалов по обе стороны мембраны: отрицательный заряд на внутренней стороне и положительный — на внешней. В совокупности электрический и концентрационный градиенты составляют электрохимический потенциал $\Delta\mu H^+$ — источник энергии для синтеза АТФ. Так как наиболее активный транспорт протонов в межмембранное пространство, необходимый для образования $\Delta\mu H^+$, происходит на участках ЦПЭ, соответствующих расположению комплексов I, III и IV, эти участки называют пунктами сопряжения дыхания и фосфорилирования (рис. 6-11, 6-13).

Механизм транспорта протонов через митохондриальную мембрану в пунктах сопряжения недостаточно ясен. Однако установлено, что важную роль в этом процессе играет KoQ. Наиболее детально механизм переноса протонов при участии KoQ изучен на уровне комплекса III (рис. 6-14).

KoQ переносит электроны от комплекса I к комплексу III и протоны из матрикса в межмембранное пространство, совершая своеобразные циклические превращения, называемые Q-циклами. Донором электронов для комплекса III служит восстановленный убихинон (QH_2), а акцептором — цитохром c. Цитохром c находится с внешней стороны внутренней мембраны митохондрий; там же располагается активный центр цитохрома c_1, с которого электроны переносятся на цитохром c.

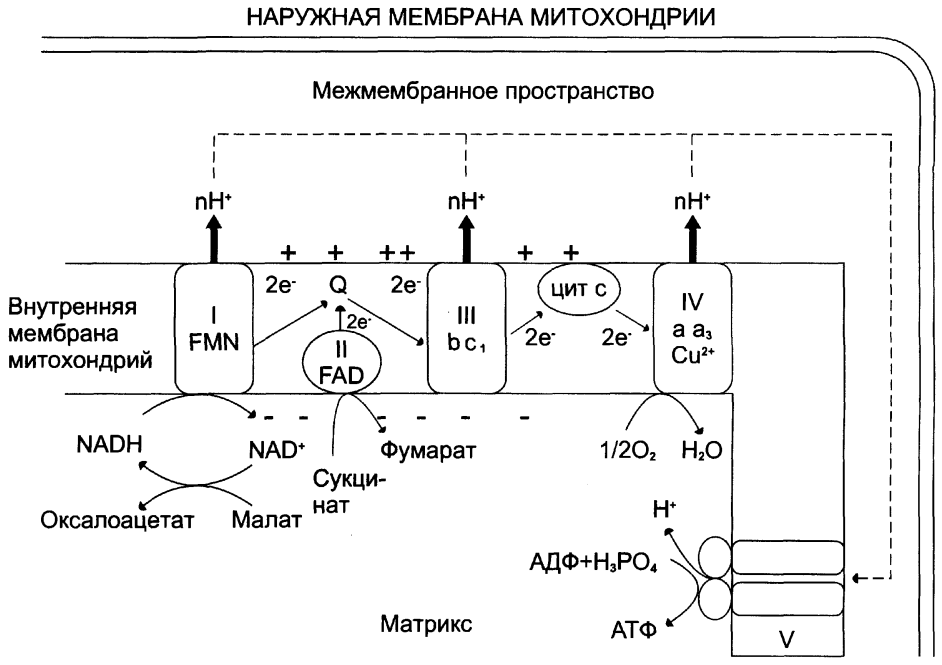


Рис. 6-13. Сопряжение дыхания и синтеза АТФ в митохондриях. I — NADH-дегидрогеназа; II — сукцинат дегидрогеназа; III — QH_2-дегидрогеназа; IV — цитохромоксидаза; V — АТФ-синтаза. Энергия протонного потенциала (электрохимического потенциала $\Delta\mu H^+$) используется для синтеза АТФ, если протоны возвращаются в матрикс через ионные каналы АТФ-синтазы.

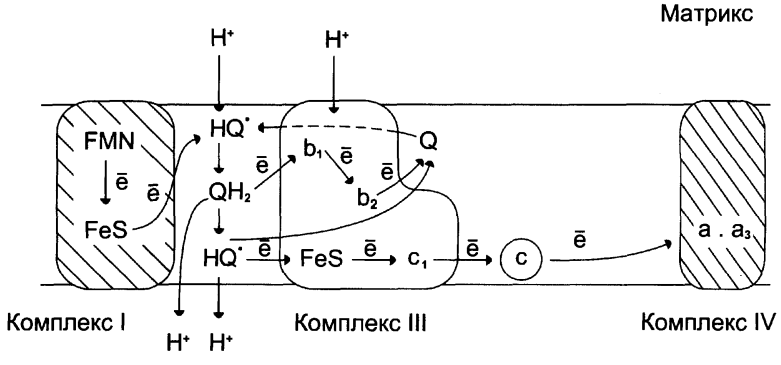


Рис. 6-14. Сопряжение переноса электронов через дыхательный комплекс III с транспортом H^+ через мембрану. Восстановленный убихинон (QH_2) взаимодействует с Fe^{3+} гема b_1 и, восстанавливая его, освобождает протон в водную фазу, превращаясь в семихинон ($HQ^\bullet$). Электрон от гема b_1 переносится на Fe^{3+} гема b_2. $HQ^\bullet$ отдаёт второй электрон на FeS-центр, расположенный ближе к наружной поверхности мембраны; при этом второй протон оказывается в межмембранном пространстве; электрон передаётся на цитохром c_1, а далее на цитохром с. Окисленный Q диффундирует к внутренней стороне мембраны, где получает электрон от гема b_2 и протон из матрикса, превращаясь в $HQ^\bullet$. $HQ^\bullet$ получает электрон от комплекса I и протон из матрикса; в мембране образуется QH_2, и весь процесс повторяется сначала.

В мембране существует стационарный общий фонд Q/QH_2, из которого каждая молекула QH_2 в одном цикле обеспечивает перенос протонов из матрикса в межмембранное пространство и электронов, которые в конечном итоге поступают на кислород. На работу, совершаемую при выкачивании протонов, расходуется часть свободной энергии, которая освобождается при переносе электронов по градиенту редокс-потенциала. Энергия электрохимического потенциала ($\Delta\mu H^+$) используется для синтеза АТФ, если протоны возвра-

щаются в матрикс через ионные каналы АТФ-синтазы.

2. Строение АТФ-синтазы и синтез АТФ

АТФ-синтаза (H^+-АТФ-аза) — интегральный белок внутренней мембраны митохондрий. Он расположен в непосредственной близости к дыхательной цепи. АТФ-синтаза состоит из 2 белковых комплексов, обозначаемых как F_0 и F_1 (рис. 6-15).

Гидрофобный комплекс F_0 погружён в мембрану. Он служит основанием, которое фиксирует АТФ-синтазу в мембране. Комплекс F_0 состоит из нескольких субъединиц, образующих канал, по которому протоны переносятся в матрикс.

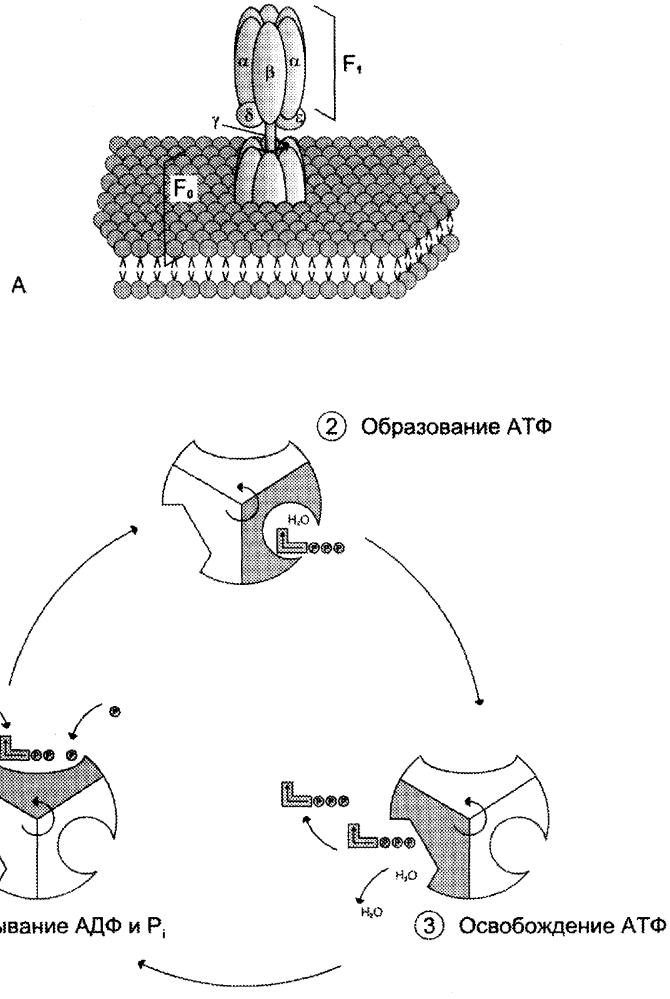


Рис. 6-15. Строение и механизм действия АТФ-синтазы. А — F_0 и F_1 — комплексы АТФ-синтазы. В состав F_0 входят полипептидные цепи, которые образуют канал, пронизывающий мембрану насквозь. По этому каналу протоны возвращаются в матрикс из межмембранного пространства; белок F_1 выступает в матрикс с внутренней стороны мембраны и содержит 9 субъединиц, 6 из которых образуют 3 пары α и β («головка»), прикрывающие стержневую часть, которая состоит из 3 субъединиц γ, δ и ε. γ и ε подвижны и образуют стержень, вращающийся внутри неподвижной головки и связанный с комплексом F_0. В активных центрах, образованных парами субъединиц α и β, происходит связывание АДФ, неорганического фосфата (P_i) и АТФ. Б — Каталитический цикл синтеза АТФ включает 3 фазы, каждая из которых проходит поочерёдно в 3 активных центрах: 1 — связывание АДФ и H_3PO_4; 2 — образование фосфоангидридной связи АТФ; 3 — освобождение конечного продукта. При каждом переносе протонов через канал F_0 в матрикс все 3 активных центра катализируют очередную фазу цикла. Энергия электрохимического потенциала расходуется на поворот стержня, в результате которого циклически изменяется конформация α- и β-субъединиц и происходит синтез АТФ.

Комплекс F_1 выступает в митохондриальный матрикс. Он состоит из 9 субъединиц (3α, 3β, γ, ε, δ). Субъединицы α и β уложены попарно, образуя «головку»; между α- и β-субъединицами располагаются 3 активных центра, в которых происходит синтез АТФ; γ-, ε-, δ- субъединицы связывают комплекс F_1 с F_0.

Повышение концентрации протонов в межмембранном пространстве активирует АТФ-синтазу. Электрохимический потенциал $\Delta\mu H^+$ заставляет протоны двигаться по каналу АТФ-синтазы в матрикс. Параллельно под действием $\Delta\mu H^+$ происходят конформационные изменения в парах α, β-субъединиц белка F_1, в результате чего из АДФ и неорганического фосфата образуется АТФ. Электрохимический потенциал, генерируемый в каждом из 3 пунктов сопряжения в ЦПЭ, используется для синтеза одной молекулы АТФ.

3. Коэффициент окислительного фосфорилирования

Окисление молекулы NADH в ЦПЭ сопровождается образованием 3 молекул АТФ; электроны от FAD-зависимых дегидрогеназ поступают в ЦПЭ на KoQ, минуя первый пункт сопряжения. Поэтому образуются только 2 молекулы АТФ. Отношение количества фосфорной кислоты (P), использованной на фосфорилирование АДФ, к атому кислорода (O), поглощённого в процессе дыхания, называют коэффициентом окислительного фосфорилирования и обозначают P/O. Следовательно, для NADH P/O = 3, для сукцината P/O = 2. Эти величины отражают теоретический максимум синтеза АТФ, фактически эта величина меньше.

4. Дыхательный контроль

Окисление субстратов и фосфорилирование АДФ в митохондриях прочно сопряжены. Скорость использования АТФ регулирует скорость потока электронов в ЦПЭ. Если АТФ не используется и его концентрация в клетках возрастает, то прекращается и поток электронов к кислороду. С другой стороны, расход АТФ и превращение его в АДФ увеличивает окисление субстратов и поглощение кислорода. Зависимость интенсивности дыхания митохондрий от концентрации АДФ называют дыхательным контролем. Механизм дыхательного контроля характеризуется высокой точностью и имеет важное значение, так как в результате его действия скорость синтеза АТФ соответствует потребностям клетки в энергии. Запасов АТФ в клетке не существует. Относительные концентрации АТФ/АДФ в тканях изменяются в узких пределах, в то время как потребление энергии клеткой, т.е. частота оборотов цикла АТФ–АДФ, может меняться в десятки раз.

Общее содержание АТФ в организме 30–50 г, но каждая молекула АТФ в клетке «живёт» меньше минуты. В сутки у человека синтезируется 40–60 кг АТФ и столько же распадается. Увеличение концентрации АДФ немедленно приводит к ускорению дыхания и фосфорилирования.

Б. Транспорт АТФ и АДФ через мембраны митохондрий

В большинстве эукариотических клеток синтез основного количества АТФ происходит внутри митохондрии, а основные потребители АТФ расположены вне её. С другой стороны, в матриксе митохондрий должна поддерживаться достаточная концентрация АДФ. Эти заряженные молекулы не могут самостоятельно пройти через липидный слой мембран. Внутренняя мембрана непроницаема для заряженных и гидрофильных веществ, но в ней содержится определённое количество транспортёров, избирательно переносящих подобные молекулы из цитозоля в матрикс и из матрикса в цитозоль.

В мембране есть белок АТФ/АДФ-антипортер, осуществляющий перенос этих метаболитов через мембрану (рис. 6-16). Молекула АДФ поступает в митохондриальный матрикс только при условии выхода молекулы АТФ из матрикса.

Движущая сила такого обмена — мембранный потенциал переноса электронов по ЦПЭ. Расчёты показывают, что на транспорт АТФ и АДФ расходуется около четверти свободной энергии протонного потенциала. Другие транспортёры тоже могут использовать энергию электрохимического градиента. Так переносится внутрь митохондрии неорганический фосфат, необходимый для синтеза АТФ. Непосредственным источником свободной энергии для транспорта Ca^{2+} в матрикс также служит протонный потенциал, а не энергия АТФ.

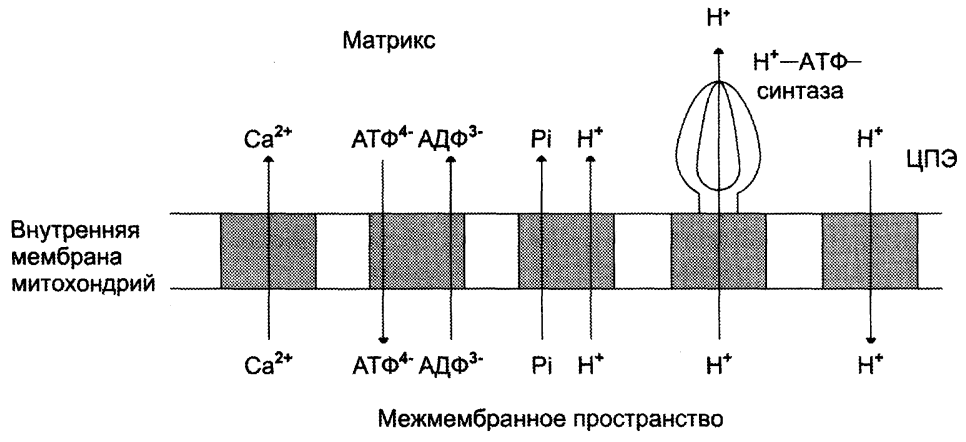


Рис. 6-16. Схема трансмембранного переноса веществ за счёт энергии $\Delta\mu\mathbf{H}$. Потоки различных веществ (АТФ, АДФ, H_3PO_4, Ca^{2+}) проходят через специфические транспортёры, при этом затрачивается энергия электрохимического потенциала мембраны.

В. Разобщение дыхания и фосфорилирования

Некоторые химические вещества (протонофоры) могут переносить протоны или другие ионы (ионофоры) из межмембранного пространства через мембрану в матрикс, минуя протонные каналы АТФ-синтазы. В результате этого исчезает электрохимический потенциал и прекращается синтез АТФ. Это явление называют разобщением дыхания и фосфорилирования. В результате разобщения количество АТФ снижается, а АДФ увеличивается. В этом случае скорость окисления NADH и $FADH_2$ возрастает, возрастает и количество поглощённого кислорода, но энергия выделяется в виде теплоты, и коэффициент P/O резко снижается. Как правило, разобщители — липофильные вещества, легко проходящие через липидный слой мембраны. Одно из таких веществ — 2,4-динитрофенол (рис. 6-17), легко переходящий из ионизированной формы в неионизированную, присоединяя протон в межмембранном пространстве и перенося его в матрикс.

Примерами разобщителей могут быть также некоторые лекарства, например дикумарол — антикоагулянт (см. раздел 14) или метаболиты, которые образуются в организме, билирубин — продукт катаболизма гема (см. раздел 13), тироксин — гормон щитовидной железы (см. раздел 11). Все эти вещества проявляют разобщающее действие только при их высокой концентрации.

Г. Терморегуляторная функция ЦПЭ

На синтез молекул АТФ расходуется примерно 40–45% всей энергии электронов, переносимых по ЦПЭ, приблизительно 25% тратится на работу по переносу веществ через мембрану. Остальная часть энергии рассеивается в виде теплоты и используется теплокровными животными на поддержание температуры тела. Кроме того, дополнительное образование теплоты может происходить при разобщении дыхания и фосфорилирования. Разобщение окислительного фосфорилирования может быть биологически полезным. Оно позволяет генерировать тепло для поддержания температуры тела у новорождённых, у зимнеспящих животных и у всех млекопитающих в процессе адаптации к холоду. У новорождённых, а также зимнеспящих животных существует особая ткань, специализирующаяся на теплопродукции посредством разобщения дыхания и фосфорилирования — бурый жир. Бурый жир содержит много митохондрий. В мембране митохондрий имеется большой избыток дыхательных ферментов по сравнению с АТФ-синтазой. Около 10% всех белков приходится на так называемый разобщающий белок (РБ-1) — термогенин. Бурый жир имеется у новорождённых, но его практически нет у взрослого человека. В последние годы появились факты, свидетельствующие о существовании в митохондриях разных органов и тканей млекопитающих разобщающих белков,

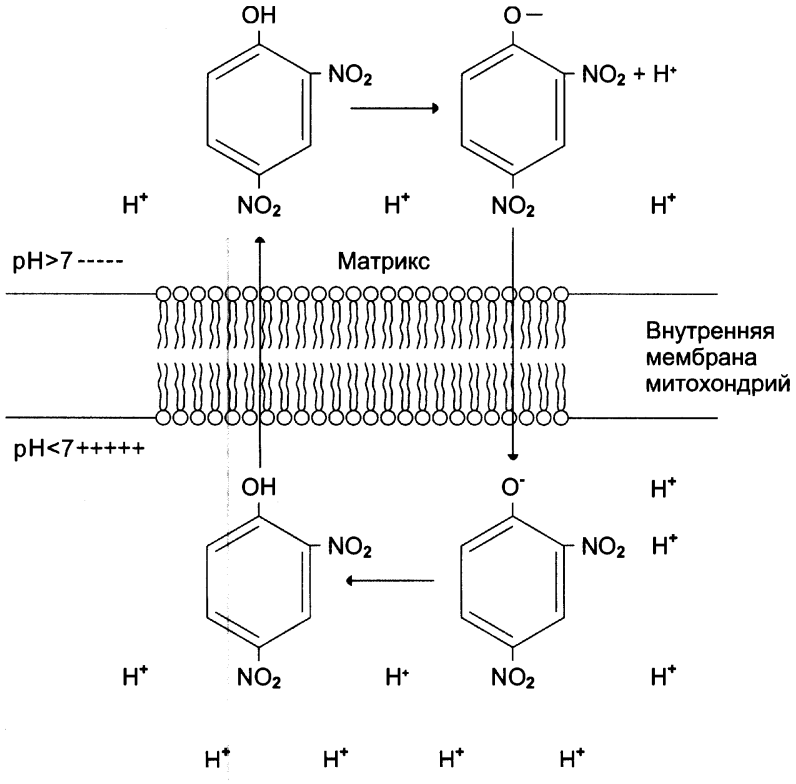


Рис. 6-17. Механизм разобщения дыхания и фосфорилирования. Протонированная форма 2,4-динитрофенола переносит протоны через внутреннюю мембрану митохондрий и препятствует образованию протонного градиента.

похожих по своей структуре на РБ-1 бурой жировой ткани. По своей структуре термогенин близок к АТФ/АДФ-антипортеру, но не способен к транспорту нуклеотидов, хотя сохранил способность переносить анионы жирных кислот, служащих разобщителями (рис. 6-18).

На внешней стороне мембраны анион жирной кислоты присоединяет протон и в таком виде пересекает мембрану; на внутренней стороне мембраны диссоциирует, отдавая протон в матрикс и тем самым снижает протонный градиент. Образующийся анион возвращается на наружную сторону мембраны с помощью АТФ/АДФ-антипортера.

При охлаждении стимулируется освобождение норадреналина из окончаний симпатических нервов. В результате происходят активация липазы в жировой ткани и мобилизация жира из жировых депо (см. раздел 8). Образующиеся свободные жирные кислоты служат не только «топливом», но и важнейшим регулятором разобщения дыхания и фосфорилирования.

III. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЙ ЭТАП КАТАБОЛИЗМА — ОСНОВНОЙ ИСТОЧНИК ДОНОРОВ ВОДОРОДА ДЛЯ ЦПЭ

Углеводы, жирные кислоты и большинство аминокислот окисляются в конечном счёте через цикл лимонной кислоты до CO_2 и H_2O. Прежде, чем эти вещества вовлекаются в заключительный этап катаболизма, их углеродный скелет превращается в двухуглеродный фрагмент в форме ацетил-КоА (рис. 6-19). Именно в этой форме большая часть «топливных» молекул включается в цикл лимонной кислоты.

Ацетил-КоА образуется в специфических реакциях катаболизма жирных кислот и некоторых аминокислот (см. разделы 8 и 9). Однако главным источником ацетил-КоА служит пировиноградная кислота, образующаяся в реакциях катаболизма глюкозы и некоторых аминокислот (см. разделы 7, 9).

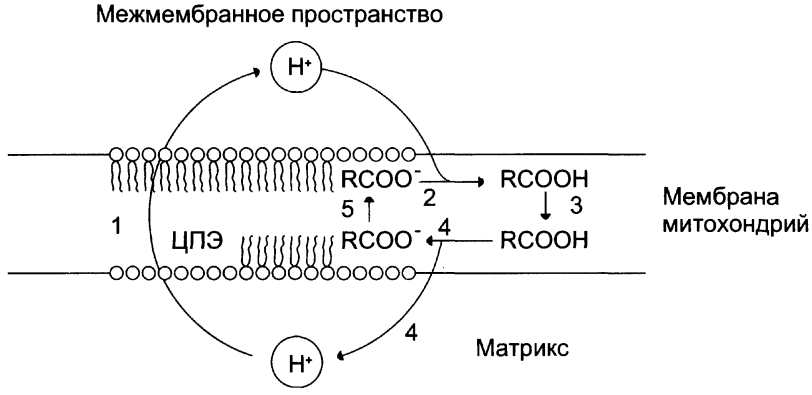


Рис. 6-18. Механизм разобщающего действия жирных кислот. 1— выкачивание протонов дыхательной цепью; 2 — протонирование аниона жирной кислоты; 3 — диффузия протонированной жирной кислоты к внутренней поверхности мембраны; 4 — диссоциация RCOOH с образованием $RCOO^-$ и иона H^+; 5 — перенос $RCOO^-$ посредством АТФ/АДФ-антипортера или разобщающего белка к наружной поверхности митохондриальной мембраны.

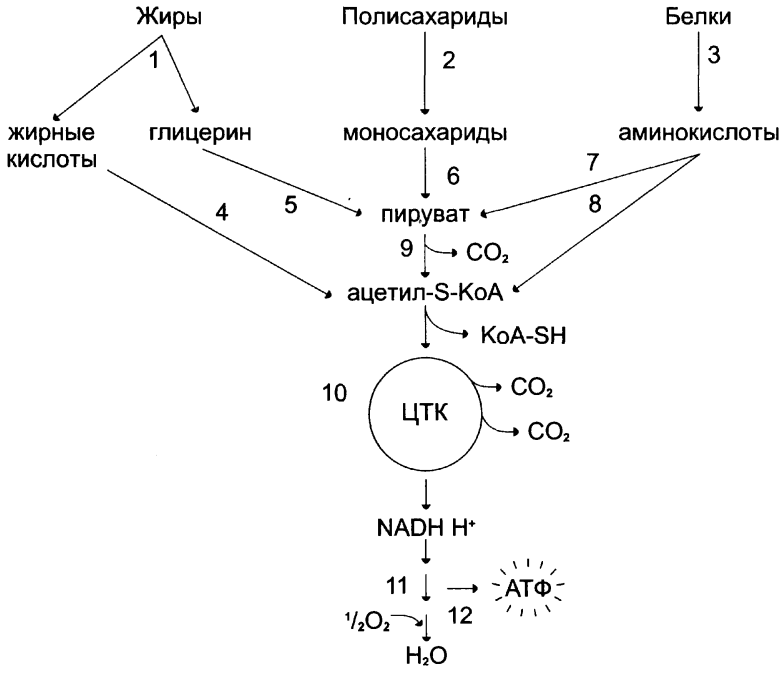


Рис. 6-19. Катаболизм основных пищевых веществ. 1–3 — пищеварение; 4–8 — специфические пути катаболизма; 9–10 — заключительный (общий путь) катаболизма; 11 — ЦПЭ; 12 — окислительное фосфорилирование.

Превращение пирувата в ацетил-КоА происходит при участии набора ферментов, структурно объединённых в пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК). Ацетильный остаток — ацетил-КоА далее окисляется в цикле лимонной кислоты до CO_2 и H_2O. В этих реакциях окисления принимают участие NAD- и FAD-зависимые дегидрогеназы, поставляющие электроны и протоны в ЦПЭ, по которой они передаются на O_2.

А. Окислительное декарбоксилирование пирувата

Окислительное декарбоксилирование пирувата происходит в матриксе митохондрий. Транспорт пирувата в митохондриальный матрикс через внутреннюю мембрану митохондрий осуществляется при участии специального белка-переносчика по механизму симпорта с H^+ (рис. 6-20).

Превращение пирувата в ацетил-КоА описывают следующим суммарным уравнением:

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + NAD^+ + HSKoA \rightarrow$$
$$CH_3\text{-}CO \sim SKoA + NADH + H^+ + CO_2.$$

В ходе этой реакции происходит окислительное декарбоксилирование пирувата, в результате которого карбоксильная группа удаляется в виде CO_2, а ацетильная группа включается в состав ацетил-КоА. Один атом водорода оказывается в составе NADH, а другой в виде H^+ поступает в среду. Реакция необратима, поскольку $\Delta G^{0\prime} = -33{,}5$ кДж/моль.

1. Строение пируватдегидрогеназного комплекса

Процесс окислительного декарбоксилирования пирувата катализирует сложноорганизованный пируватдегидрогеназный комплекс. В пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК) входят 3 фермента: пируватдекарбоксилаза (E_1), дигидролипоилтрансацетилаза (E_2) и дигидролипоилдегидрогеназа (E_3), а также 5 коферментов: тиаминдифосфат (ТДФ), липоевая кислота, FAD, NAD^+ и КоА. Кроме того, в состав комплекса входят регуляторные субъединицы: протеинкиназа и фосфопротеинфосфатаза (табл. 6-5).

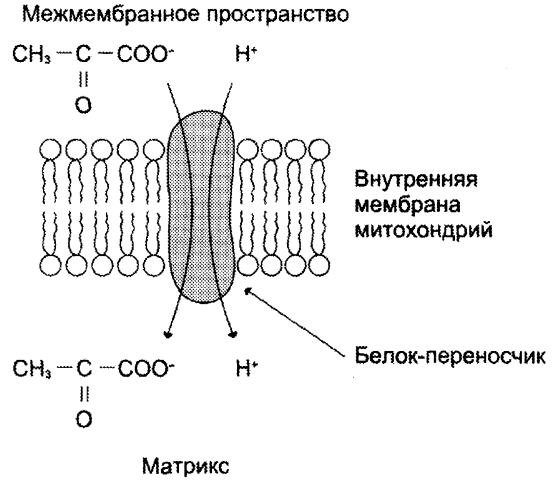


Рис. 6-20. Транспорт пирувата через митохондриальную мембрану.

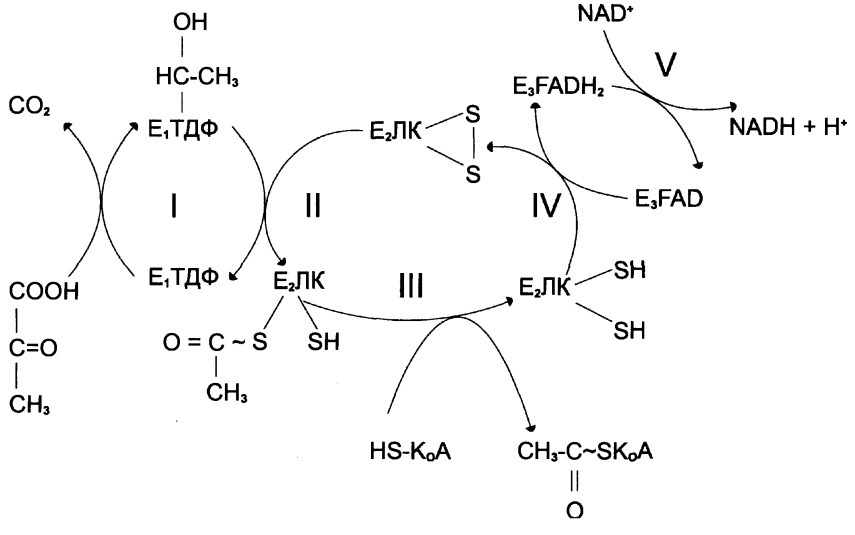


Рис. 6-21. Последовательность реакций, катализируемых ПДК. I — E_1 катализирует декарбоксилирование пирувата и перенос C_2-фрагмента на ТДФ; II — E_2 катализирует окисление гидроксиэтильной группы и перенос C_2-фрагмента на липоевую кислоту (ЛК); III — ацетилированная дигидролипоилтрансацетилаза взаимодействует с КоА с образованием восстановленной формы липоевой кислоты и ацетил-КоА; IV — окисленная форма трансацетилазы регенерируется при участии E_3; V — окисленная форма E_3 регенерируется при участии NAD^+.

Таблица 6-5. Пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК) млекопитающих

Фермент		Число мономеров	Кофермент	Витамин
1. Пируватдекарбоксилаза (пируватдегидрогеназа)	E_1	120 (30 тетрамеров)	ТДФ	B_1
2. Дигидролипоилтрансацетилаза	E_2	180 (60 тримеров)	Липоамид КоА	Липоевая кислота (ЛК) Пантотеновая кислота
3. Дигидролипоилдегидрогеназа	E_3	12 (6 димеров)	FAD NAD^+	B_2 PP

Все эти ферменты и коферменты объединены в мультиферментную систему, содержащую разные количества каждого из ферментов и имеющую молекулярную массу более 6×10^6.

В центре комплекса располагается дигидролипоилтрансацетилаза (E_2), образуя его ядро. К дигидролипоилтрансацетилазе присоединены молекулы: пируватдекарбоксилазы (E_1) и дигидролипоилдегидрогеназы (E_3).

Пируватдекарбоксилаза содержит прочно связанный с белковой частью ТДФ, а дигидролипоилдегидрогеназа — FAD.

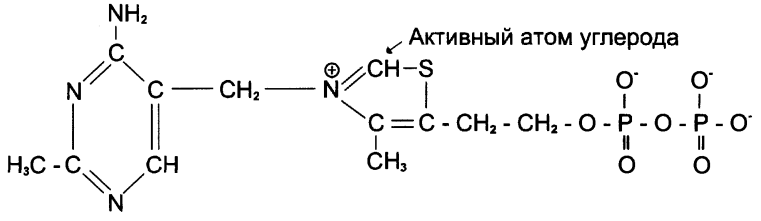
Липоиллизиновые группы центрального фермента (E_2) функционируют как поворотные «кронштейны», переносящие атомы водорода и ацетильные группы от одной ферментной молекулы комплекса к другой.

2. Окислительное декарбоксилирование пирувата

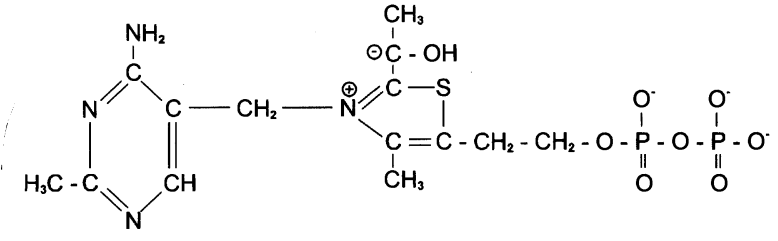
Превращение пирувата в ацетил-КоА включает 5 стадий (рис. 6-21).

Стадия I. На этой стадии пируват соединяется с ТДФ в составе E_1 и подвергается декарбоксилированию.

Пируват + E_1-ТДФ → Гидроксиэтил-ТДФ + CO_2.



Тиаминдифосфат (ТДФ)



Гидроксиэтил-ТДФ

Рис. 6-22. Тиаминдифосфат (ТДФ) и гидроксиэтил-ТДФ. Рабочей частью ТДФ служит тиазоловое кольцо, к которому присоединяется продукт декарбоксилирования пирувата — гидроксиэтил.

В результате этой реакции образуется производное ТДФ с гидроксиэтильной группой при тиазоловом кольце (рис. 6-22).

Стадия II. Дигидролипоилтрансацетилаза (E_2) катализирует перенос атома водорода и ацетильной группы от ТДФ на окисленную форму липоиллизиновых групп с образованием ацетилтиоэфира липоевой кислоты (рис. 6-21).

Стадия III. На стадии III КоА взаимодействует с ацетильным производным E_2, в результате чего образуются ацетил-КоА и полностью восстановленный липоильный остаток, простетическая группа E_2 (рис. 6-23).

Стадия IV. На стадии IV дигидролипоилдегидрогеназа (E_3) катализирует перенос атомов водорода от восстановленных липоильных групп на FAD — простетическую группу фермента E_3.

Стадия V. На стадии V восстановленный $FADH_2$ передаёт водород на NAD^+ с образованием NADH.

Пируватдегидрогеназный комплекс характеризуется большим отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом, который обеспечивает наряду с восстановлением кофермента (NADH) образование высокоэнергетической тиоэфирной связи в ацетил-КоА.

Структурное объединение 3 видов ферментов создаёт возможности для координации отдельных этапов сложной ферментативной реакции. Все промежуточные продукты реакции окислительного декарбоксилирования пирувата прочно связаны с комплексом, что увеличивает суммарную скорость процесса и сводит к минимуму побочные реакции.

Пируватдегидрогеназный комплекс, как и все белки, участвующие в реакциях ЦТК, кодируется ядерной ДНК. Транспорт субъединиц ПДК в митохондрии происходит сложным путём за счёт энергии АТФ или трансмембранного электрохимического потенциала при участии белков теплового шока, или шаперонов (см. раздел 1), предотвращающих их преждевременный фолдинг до поступления в митохондриальный матрикс или внутреннюю мембрану митохондрий.

3. Связь окислительного декарбоксилирования пирувата с ЦПЭ

Окислительное декарбоксилирование пирувата сопровождается образованием NADH, поставляющим электроны в дыхательную цепь и обеспечивающим синтез 3 молей АТФ на 1 моль пирувата путём окислительного фосфорилирования.

Так как отношения АДФ/АТФ и NADH/NAD^+ в клетке относительно постоянны, ускорение утилизации АТФ приводит к повышению концентрации АДФ и ускорению окисления NADH в дыхательной цепи. Повышение концентрации NAD^+, в свою очередь, стимулирует окислительное декарбоксилирование пирувата. Напротив, повышение концентрации АТФ и NADH снижает скорость этого процесса. Таким образом, изменения отношений АДФ/АТФ и NADH/NAD^+ — важнейшие сигналы, отражающие энергетические потребности клетки и регулирующие скорость окислительного декарбоксилирования пирувата. Каталитическая активность пируватдегидрогеназного комплекса снижается, когда в клетках имеется достаточно «топлива» в виде жирных кислот и ацетил-КоА.

Б. Цикл лимонной кислоты

Цикл лимонной кислоты (цитратный цикл, цикл Кребса, цикл трикарбоновых кислот, ЦТК) — заключительный этап катаболизма, в котором углерод ацетильного остатка ацетил-

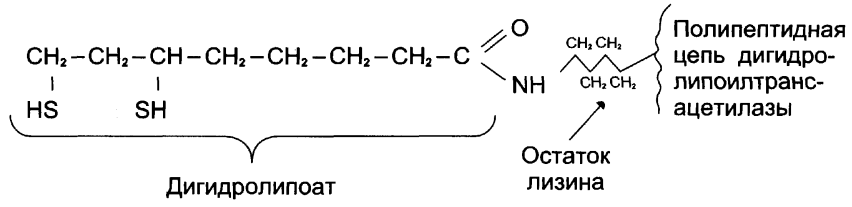


Рис. 6-23. Липоевая кислота в составе дигидролипоилтрансацетилазы (E_2). Липоевая кислота или липоильная группа могут существовать в окисленной (дисульфидной ЛК-SS) и восстановленной (ЛК-$(SH)_2$) формах. В составе дигидролипоилтрансацетилазы липоевая кислота связана с белком через остаток лизина амидной связью. Липоевая кислота играет роль витамина или фактора роста у некоторых микроорганизмов, тогда как высшие животные способны её синтезировать.

КоА окисляется до 2 молекул CO_2. Атомы водорода, освобождающиеся в окислительно-восстановительных реакциях, доставляются в ЦПЭ при участии NAD- и FAD-зависимых дегидрогеназ, в результате чего происходят синтез воды и окислительное фосфорилирование АДФ. Связь между атомами углерода в ацетил-КоА устойчива к окислению. В условиях организма окисление ацетильного остатка происходит в несколько этапов, образующих циклический процесс из 8 реакций (рис. 6-24).

1. Последовательность реакций цитратного цикла

Образование цитрата

В реакции образования цитрата углеродный атом метильной группы ацетил-КоА связывается с карбонильной группой оксалоацетата (рис. 6-24); одновременно расщепляется тиоэфирная связь и освобождается коэнзим А ($\Delta G^{0'}$= −37,6 кДж/моль).

Равновесие реакции в клетке сильно сдвинуто вправо, о чём свидетельствует отрицательная величина стандартной свободной энергии. Реакция сопровождается потерей большого количества энергии в виде теплоты. Катализирует реакцию цитратсинтаза, фермент, локализованный в матриксе митохондрий.

Превращение цитрата в изоцитрат

Вторая реакция цитратного цикла — обратимое превращение цитрата в изоцитрат (рис. 6-24). Фермент, катализирующий эту реакцию, назван аконитазой по промежуточному продукту, цис-аконитовой кислоте, которая предположительно образуется в реакции. Однако это соединение не обнаруживается в свободном виде, так как не отделяется от активного центра фермента до завершения реакции.

Окислительное декарбоксилирование изоцитрата

Эту реакцию катализирует изоцитратдегидрогеназа. Существуют 2 формы изоцитратдегидрогеназы: одна содержит в качестве кофермен-

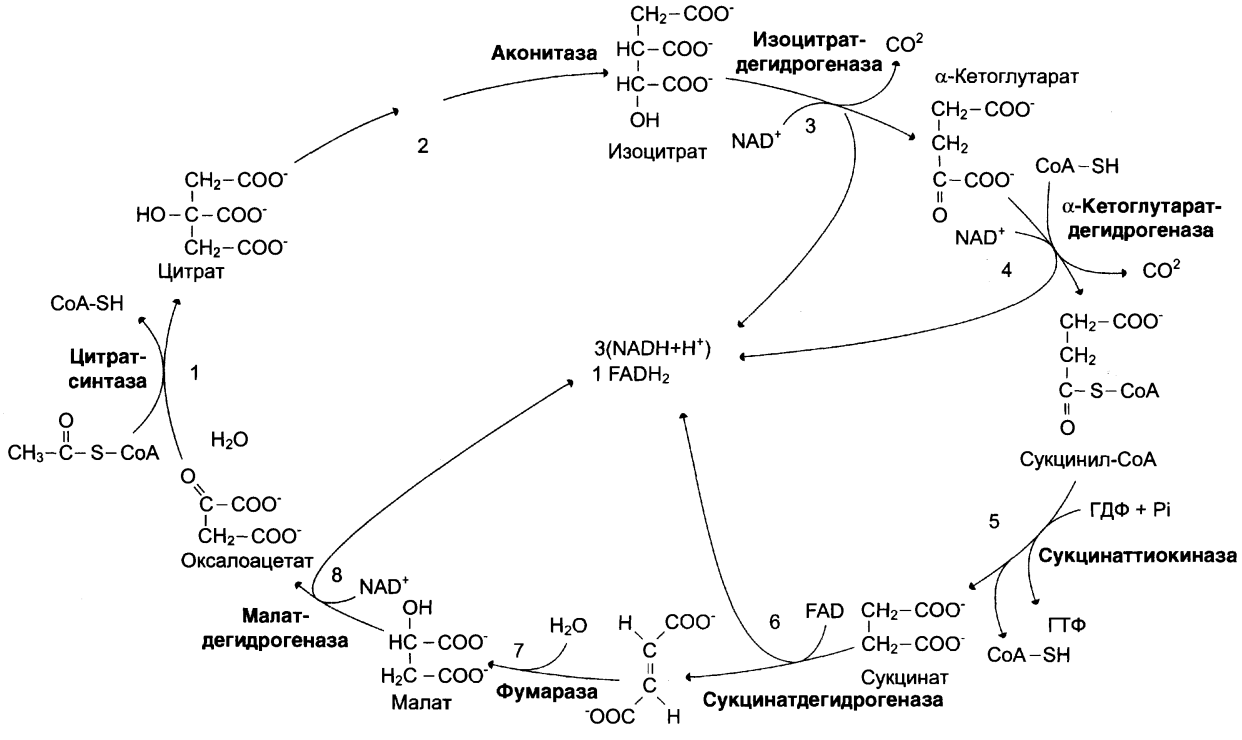


Рис. 6-24. Общая схема цитратного цикла. Цифры 1–8 обозначают реакции цитратного цикла. Цикл начинается с того, что ацетильный остаток конденсируется с оксалоацетатом, в результате чего образуется шестиуглеродное соединение — цитрат. На образование цитрата в каждом обороте цикла расходуется одна молекула оксалоацетата; в результате завершения цикла происходит регенерация оксалоацетата. Таким образом, одна молекула оксалоацетата может многократно использоваться для окисления ацетильных остатков.

та NAD^+, вторая — $NADP^+$. NAD-зависимый фермент локализован в митохондриях и участвует в ЦТК; (NADP-зависимый фермент, присутствующий и в митохондриях, и в цитоплазме, играет иную метаболическую роль). В результате действия этого фермента на изоцитрат образуется α-кетоглутарат (см. рис. 6-24).

Реакция, катализируемая NAD-зависимой изоцитратдегидрогеназой, — самая медленная реакция цитратного цикла. АДФ — аллостерический активатор фермента.

Окислительное декарбоксилирование α-кетоглутарата

В этой реакции α-кетоглутарат подвергается окислительному декарбоксилированию с образованием в качестве конечных продуктов сукцинил-КоА, CO_2 и $NADH + H^+$. В результате этой реакции образуется сукцинил-КоА (см. рис. 6-24).

Реакцию катализирует α-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс, который по структуре и функциям сходен с пируватдегидрогеназным комплексом (ПДК). Подобно ПДК, он состоит из 3 ферментов: α-кетоглутаратдекарбоксилазы, дигидролипоилтранссукцинилазы и дигидролипоилдегидрогеназы. Кроме того, в этот ферментный комплекс входят 5 коферментов: тиаминдифосфат, кофермент А, липоевая кислота, NAD^+ и FAD. Существенное отличие этой ферментной системы от ПДК — то, что она не имеет сложного механизма регуляции, какой характерен для ПДК. В частности, в этом комплексе отсутствуют регуляторные субъединицы. Равновесие реакции окислительного декарбоксилирования α-кетоглутарата сильно сдвинуто в сторону образования сукцинил-КоА, и её можно считать однонаправленной.

Превращение сукцинил-КоА в сукцинат

Сукцинил-КоА — высокоэнергетическое соединение. Изменение свободной энергии гидролиза этого тиоэфира составляет $\Delta G^{0'} = -35{,}7$ кДж/моль. В митохондриях разрыв тиоэфирной связи сукцинил-КоА сопряжён с реакцией фосфорилирования гуанозиндифосфата (ГДФ) до гуанозинтрифосфата (ГТФ).

$$\text{Сукцинил-КоА} \rightarrow \text{Сукцинат} \ (\Delta G^0 = -10{,}36 \text{ кДж/моль}).$$

Эту сопряжённую реакцию (см. рис. 6-24) катализирует сукцинаттиокиназа. Промежуточный этап реакции — фосфорилирование молекулы фермента по одному из гистидиновых остатков активного центра. Затем остаток фосфорной кислоты присоединяется к ГДФ с образованием ГТФ.

С ГТФ концевая фосфатная группа может переноситься на АДФ с образованием АТФ; эту обратимую реакцию катализирует нуклеозиддифосфаткиназа.

$$\text{ГТФ} + \text{АДФ} \leftrightarrow \text{ГДФ} + \text{АТФ}.$$

Образование высокоэнергетической фосфоангидридной связи за счёт энергии субстрата (сукцинил-КоА) — пример субстратного фосфорилирования.

Дегидрирование сукцината

Образовавшийся на предыдущем этапе сукцинат превращается в фумарат под действием сукцинатдегидрогеназы (см. рис. 6-24). Этот фермент — флавопротеин, молекула которого содержит прочно связанный кофермент FAD.

Сукцинат дегидрогеназа прочно связана с внутренней митохондриальной мембраной. Она состоит из 2 субъединиц, одна из которых связана с FAD. Кроме того, обе субъединицы содержат железо-серные центры; одна — Fe_2S_2, а другая — Fe_4S_4. В железо-серных центрах атомы железа меняют свою валентность, участвуя в транспорте электронов.

Образование малата из фумарата

Образование малата происходит при участии фермента фумаратгидратазы (см. рис. 6-24). Этот фермент более известен как фумараза.

Фумараза — олигомерный белок, состоящий из 4 идентичных полипептидных цепей. Он расположен в матриксе митохондрий. Фумаразу относят к ферментам с абсолютной субстратной специфичностью: она катализирует гидратацию только транс-формы фумарата.

Дегидрирование малата

В заключительной стадии цитратного цикла малат дегидрируется с образованием оксалоацетата (см. рис. 6-24). Реакцию катализирует NAD-зависимая малатдегидрогеназа, содержащаяся в матриксе митохондрий.

Равновесие малатдегидрогеназной реакции сильно сдвинуто влево. Тем не менее, в интактных клетках эта реакция идёт слева направо, потому что продукт реакции, оксалоацетат, активно используется в цитратсинтазной реак-

ции. В цитозоле содержится изоформа малатдегидрогеназы, также NAD-зависимая, но не принимающая участие в цитратном цикле. Обе изоформы малатдегидрогеназы — димеры.

2. Общая характеристика и энергетическое значение цитратного цикла

Образованием оксалоацетата завершается один оборот цитратного цикла. В одном обороте цикла лимонной кислоты в 2 реакциях декарбоксилирования (превращение изоцитрата в α-кетоглутарат и α-кетоглутарата в сукцинил-КоА) происходит образование 2 молекул CO_2. В 4 реакциях цитратного цикла происходит дегидрирование с образованием восстановленных коферментов: 3 молекул $NADH+H^+$ и 1 молекулы $FADH_2$ в составе сукцинатдегидрогеназы.

Наконец, на один оборот цикла затрачивается 2 молекулы воды: одна — на стадии образования цитрата, вторая — на стадии гидратации фумарата.

Восстановленные коферменты (3 молекулы NADH и 1 молекула $FADH_2$), образованные в цикле лимонной кислоты, отдают электроны в ЦПЭ на кислород — конечный акцептор электронов. Восстановленный кислород взаимодействует с протонами с образованием воды.

На каждую молекулу NADH при образовании молекулы воды в процессе тканевого дыхания синтезируются 3 молекулы АТФ, а на каждую молекулу $FADH_2$ — 2 молекулы АТФ (рис. 6-25).

Таким образом, каждый оборот цикла лимонной кислоты сопровождается синтезом 11 молекул АТФ путём окислительного фосфорилирования. Одна молекула АТФ образуется путём субстратного фосфорилирования.

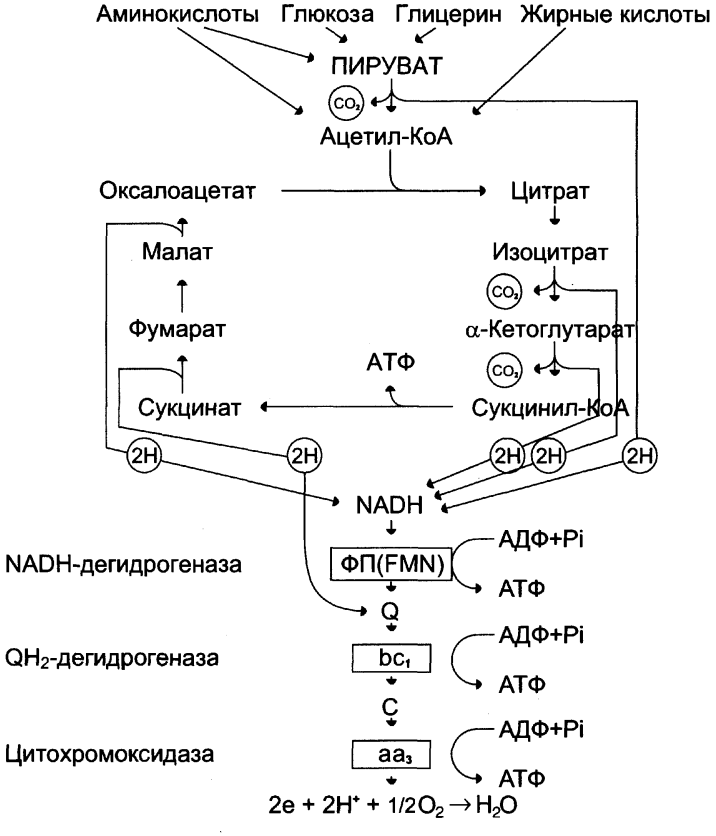


Рис. 6-25. Схема взаимосвязи общего пути катаболизма и ЦПЭ.

В итоге на каждый ацетильный остаток, включённый в цитратный цикл, образуется 12 молекул АТФ.

3. Регуляция общего пути катаболизма

Скорость синтеза АТФ строго соответствует энергетическим потребностям клетки. Это достигается согласованной регуляцией всех этапов заключительного пути катаболизма, включающего превращение пирувата в ацетил-КоА, цитратный цикл и ЦПЭ. В большинстве тканей, где главная функция общего пути катаболизма — обеспечение клетки энергией, важную роль в регуляции играет дыхательный контроль.

Увеличение скорости утилизации АТФ для совершения различных видов работы увеличивает концентрацию АДФ, что ускоряет окисление NADH в ЦПЭ и, следовательно, повышает скорость реакций, катализируемых NAD-зависимыми дегидрогеназами. Окисление пирувата и ацетил-КоА может происходить только в том случае, если электроны и протоны от NADH и $FADH_2$ поступают в ЦПЭ. Таким образом, отношения АДФ/АТФ и $NADH/NAD^+$ — главные модуляторы скорости реакций общего пути катаболизма (ОПК).

Как известно, скорость метаболических путей, которые должны обеспечивать постоянный уровень конечных продуктов, таких, как АТФ, регулируется на уровне реакций, катализируемых регуляторными ферментами. На заключительном этапе катаболизма наиболее важные регуляторные ферменты — пируватдегидрогеназный комплекс, цитратсинтаза, изоцитратдегидрогеназа и α-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс.

Регуляция пируватдегидрогеназного комплекса. Регуляция на уровне ПДК имеет важное значение для обеспечения цитратного цикла «топливными» молекулами ацетил-КоА.

Образование ацетил-КоА из пирувата — необратимый ключевой этап метаболизма. Животные не способны к превращению ацетил-КоА в глюкозу. Активность пируватдегидрогеназного комплекса регулируется различными способами: доступностью субстратов, ингибированием продуктами реакции, аллостерически и путём ковалентной модификации.

Ковалентная модификация ПДК осуществляется фосфорилированием и дефосфорилированием. В состав ПДК входят 2 регуляторных субъединицы. Одна из них, киназа ПДК, фосфорилирует ПДК в определённых участках по остаткам серина. При фосфорилировании ПДК инактивируется. Другая регуляторная субъединица, фосфатаза, дефосфорилирует фермент, превращая его в активную форму (рис. 6-26).

При повышении концентрации АДФ ПДК находится в нефосфорилированной активной форме. Этот эффект усиливается в некоторых клетках при повышении концентрации внутриклеточного Ca^{2+}, который активирует фосфатазу ПДК. Такой механизм активации ПДК особенно важен в мышцах и жировой ткани.

Продукты пируватдегидрогеназной реакции (ацетил-КоА и NADH) аллостерически активируют киназу ПДК. Активированная киназа фосфорилирует и инактивирует ПДК. Таким образом, при накоплении NADH и ацетил-КоА тормозится превращение пирувата в ацетил-КоА. Такая ситуация создаётся, например, в

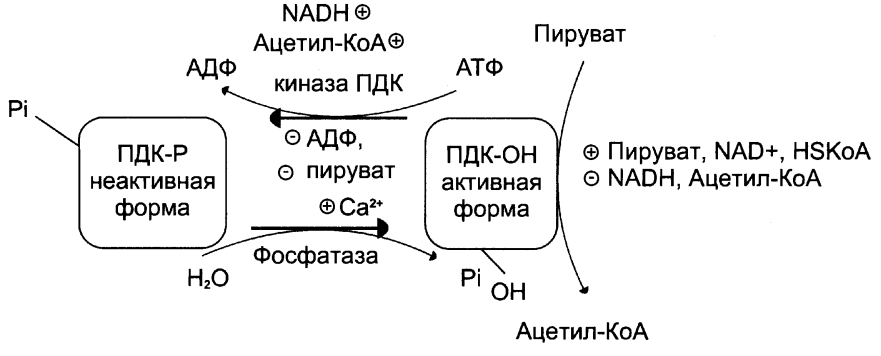


Рис. 6-26. Регуляция пируватдегидрогеназного комплекса. ПДК аллостерически активируется АДФ, NAD^+, КоА, Ca^{2+} и пируватом; ацетил-КоА, NADH и АТФ активируют киназу и ингибируют ПДК. Фосфатаза активируется Ca^{2+}.

печени при голодании: из жировых депо в печень поступают жирные кислоты, из которых образуется ацетил-КоА. В присутствии высокомолекулярных жирных кислот ингибирование ПДК усиливается. Пируват при этом не окисляется и может быть использован для синтеза глюкозы (см. раздел 7).

Пируват аллостерически активирует нефосфорилированную форму ПДК, действуя согласованно с другими субстратами — NAD^+ и КоА. Активация ПДК происходит также под влиянием инсулина. Один из эффектов инсулина — повышение концентрации внутримитохондриального Ca^{2+}. При повышении концентрации Ca^{2+} ПДК активируется (см. рис. 6-26). Этот механизм особенно важен в жировой ткани, где ацетил-КоА необходим для синтеза жирных кислот (см. раздел 8). В клетках миокарда ПДК активируется адреналином, однако это влияние адреналина не связано с изменением концентрации цАМФ.

Регуляция цитратного цикла. В большинстве случаев скорость реакций в метаболических циклах определяется их начальными реакциями. В ЦТК важнейшая регуляторная реакция — образование цитрата из оксалоацетата и ацетил-КоА, катализируемая цитратсинтазой. Эта реакция ускоряется при повышении концентрации оксалоацетата — субстрата реакции и тормозится продуктом реакции — цитратом. Когда отношение $NADH/NAD^+$ снижается, скорость окисления малата в оксалоацетат возрастает. Повышение концентрации оксалоацетата ускоряет цитратсинтазную реакцию. Скорость реакции снижается при повышении концентрации АТФ, сукцинил-КоА и длинноцепочечных жирных кислот. Однако точный механизм влияния этих метаболитов на цитратсинтазу недостаточно ясен (рис. 6-27).

Изоцитратдегидрогеназа, олигомерный фермент, состоит из 8 субъединиц. Присоединение изоцитрата к первой субъединице вызывает кооперативное изменение конформации других, увеличивая скорость присоединения субстрата. Фермент аллостерически активируется АДФ и Ca^{2+}, которые присоединяются к ферменту в разных аллостерических центрах. В присутствии АДФ конформация всех субъединиц меняется таким образом, что связывание изоцитрата происходит значительно быстрее. Таким образом, при концентрации изоцитрата, которая существует в митохондриальном матриксе, небольшие изменения концентрации АДФ могут вызвать значительное изменение скорости реакции. Увеличение активности изоцитратдегидрогеназы снижает концентрацию цитрата, что, в свою очередь, уменьшает ингибирование цитратсинтазы продуктом реакции. При повышении концентрации NADH активность фермента снижается.

α-Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс, имеющий сходное строение с пируватдегидрогеназным, в отличие от последнего, не имеет в своём составе регуляторных субъединиц. Главный механизм регуляции α-кетоглутаратдегидрогеназного комплекса — ингибирование реакции NADH и сукцинил-КоА.

α-Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс, как и изоцитратдегидрогеназа, активируется Ca^{2+}, а при повышении концентрации АТФ скорости обеих реакций снижаются.

В регуляции цитратного цикла существует множество дополнительных механизмов, обеспечивающих необходимый уровень метаболитов и их участие в других метаболических путях.

Компартментализация ферментов, участвующих в реакциях окислительного декарбоксилирования пирувата и цикла лимонной кислоты, играет важную роль в регуляции этих процессов.

Внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для анионов и катионов, в том числе и для промежуточных продуктов цитратного цикла, которые могут быть перенесены через мембрану только при участии специальных белков. Поэтому ферменты цитратного цикла имеют больше возможностей для взаимодействия с продуктами предыдущих реакций, чем в случае свободного удаления этих продуктов из митохондрий.

Доступность субстратов возрастает также в результате образования ферментных комплексов. Малатдегидрогеназа и цитратсинтаза образуют непрочные комплексы, в которых цитратсинтаза может использовать оксалоацетат, непосредственно образующийся малатдегидрогеназой.

В ПДК и α-кетоглутаратдегидрогеназном комплексе субстраты непосредственно передаются от одного фермента к другому: только трансацилаза может взаимодействовать с промежуточным продуктом, связанным с ТДФ, а дигидро-

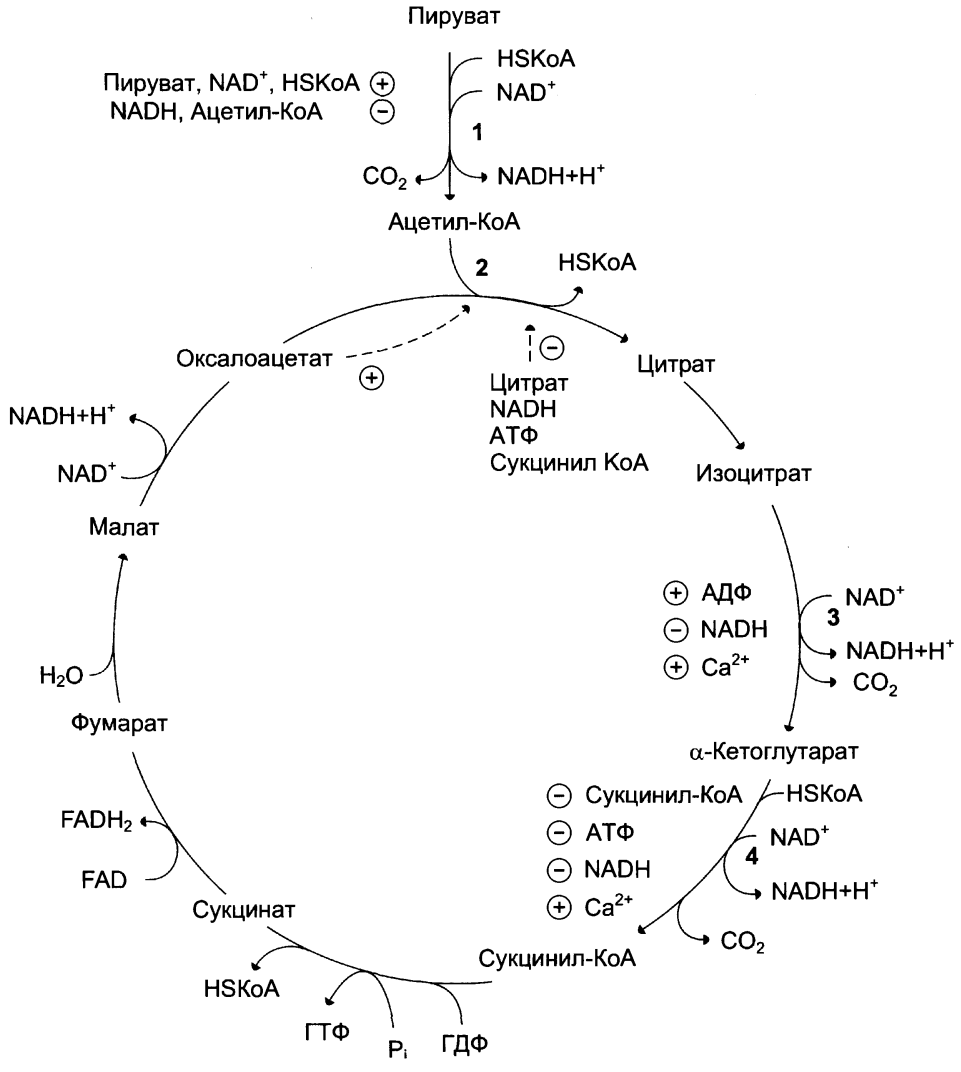


Рис. 6-27. Регуляция общего пути катаболизма. 1 — ПДК активируется пируватом, NAD^+, KoA; ингибируется NADH и ацетил-KoA; 2 — цитратсинтаза (реакция ускоряется при повышении концентрации оксалоацетата и замедляется при повышении концентрации цитрата, NADH, АТФ и сукцинил-KoA); 3 — изоцитратдегидрогеназа аллостерически активируется АДФ, ионами кальция, ингибируется NADH; 4 — α-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс ингибируется NADH, АТФ и сукцинил-KoA, а активируется ионами кальция.

липоилдегидрогеназа — с дигидролипоевой кислотой.

NAD^+, NADH, KoA, ацетил-KoA и сукцинил-KoA не имеют транспортных белков в мембране митохондрий. Поэтому эти соединения не могут пройти через митохондриальную мембрану.

Накопление ацил-KoA производных, таких как ацетил-KoA или сукцинил-KoA, в митохондриальном матриксе ингибирует другие реакции, для которых необходим KoA.

Тесная связь цитратного цикла и ЦПЭ поддерживается благодаря использованию в этих реакциях общего фонда NAD^+ и NADH.

B. Анаболические функции цитратного цикла

Цикл лимонной кислоты — один из амфиболических путей метаболизма. В нём осуществляются не только окислительные превращения энергетических субстратов до конечных продук-

тов CO_2 и H_2O, но и происходит образование субстратов для других метаболических путей (рис. 6-28).

Некоторые промежуточные продукты цикла лимонной кислоты: α-кетоглутарат, сукцинат, оксалоацетат могут использоваться для синтеза заменимых аминокислот (см. раздел 9).

Убыль промежуточных продуктов цикла восполняется в реакциях, катализируемых специфическими ферментами. В нормальных условиях реакции, отвлекающие промежуточные продукты из цикла и восполняющие их убыль, находятся в состоянии динамического равновесия, так что концентрация этих продуктов в митохондриях остаётся постоянной.

Реакции, обеспечивающие пополнение фонда промежуточных продуктов ЦТК, называются анаплеротическими (пополняющими). Важнейшая из них — реакция синтеза оксалоацетата из пирувата. Эту реакцию катализирует митохондриальный фермент — пируваткарбоксилаза.

$$CH_3 - CO - COOH + CO_2 + АТФ \xrightarrow[карбоксилаза]{пируват-} HOOC - CO - CH_2 - COOH + АДФ + H_3PO_4.$$

Пируваткарбоксилаза — сложный олигомерный фермент. Молекула фермента содержит 4 простетические группы, представленные биотином (см. раздел 3), который ковалентно связан амидной связью с ε-аминогруппами остатков лизина, находящегося в активном центре фермента (рис. 6-29).

Если для цикла лимонной кислоты не хватает оксалоацетата или какого-нибудь другого промежуточного продукта, то карбоксилирование пирувата ускоряется. В этой реакции в качестве источника энергии используется АТФ.

Реакция протекает в 2 стадии. На первой стадии происходит активация CO_2 путём присоединения к одному из атомов азота в молекуле биотина. Эта реакция сопряжена с гидролизом АТФ.

$$АТФ + CO_2 + \text{Е-биотин} + H_2O \rightarrow АДФ + H_3PO_4 + \text{Е-биотин-}COO^- + 2\ H^+.$$

На второй стадии активированная карбоксильная группа переносится на пируват.

$$\text{Е-биотин-}COO^- + \text{Пируват} \rightarrow \text{Е-биотин} + \text{Оксалоацетат}.$$

Пируваткарбоксилаза — регуляторный фермент. Если концентрация ацетил-КоА увеличивается, то он действует как аллостерический активатор пируваткарбоксилазы, ускоряя образование оксалоацетата. Таким образом, избыток ацетил-КоА способствует активации цитратного цикла.

Метаболиты цитратного цикла используются не только как субстраты синтеза углеродного

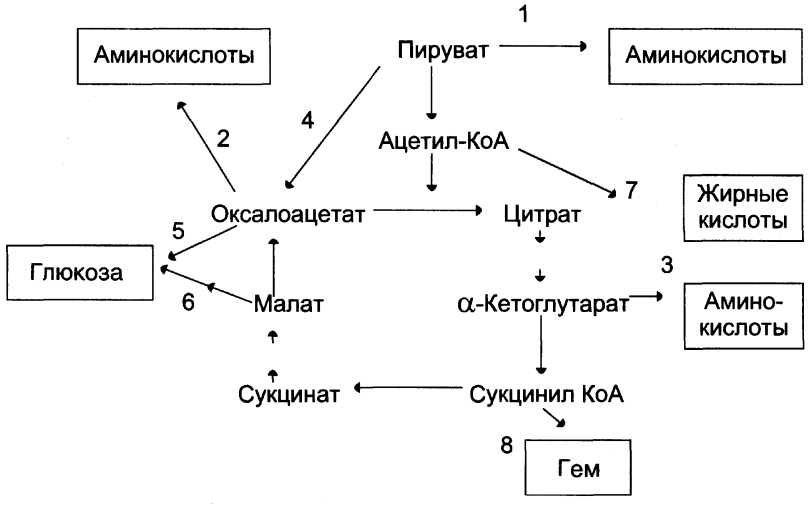


Рис. 6-28. Использование метаболитов ЦТК в синтезе различных соединений. Синтез заменимых аминокислот (1, 2, 3), глюкозы (4, 5, 6), жирных кислот (7), гема (8).

Рис. 6-29. Простетическая группа пируват карбоксилазы. Карбоксильная группа биотина образует амидную связь с ε-аминогруппой лизина в активном центре фермента. CO_2 активируется, образуя N-карбоксипроизводное биотина.

скелета ряда соединений, но и являются донорами водорода для образования восстановленных коферментов, участвующих в реакциях синтеза жирных кислот, стероидов и других веществ (см. разделы 8, 10, 11). Два метаболита цитратного цикла могут дегидрироваться при участии NADP-зависимых дегидрогеназ: малата и изоцитрата. Например, малат может поступать из митохондрий в цитозоль клетки. В цитозоле находится NADP-зависимая дегидрогеназа (маликфермент), катализирующая реакцию:

$$HOOC - CHOH - CH_2 - COOH + NADP^+$$

$$\xrightarrow[\text{фермент}]{\text{малик-}} CH_3 - CO{\cdot}COOH + CO_2 + NADPH_2.$$

Малат и изоцитрат обеспечивают образование около половины общего фонда NADPH, используемого в восстановительных синтезах; вторая половина образуется в пентозофосфатном пути превращения глюкозы (см. раздел 7).

Г. Гипоэнергетические состояния

Все живые клетки постоянно нуждаются в АТФ для осуществления различных видов жизнедеятельности.

Клетки мозга потребляют большое количество АТФ для синтеза нейромедиаторов, регенерации нервных клеток, поддержания необходимого градиента Na^+ и K^+, для проведения нервного импульса; почки используют АТФ в процессе реабсорбции различных веществ при образовании мочи; в печени происходит синтез гликогена, жиров, белков и многих других соединений; в миокарде постоянно совершается механическая работа, необходимая для циркуляции крови; скелетные мышцы в покое потребляют незначительные количества АТФ, но при физической нагрузке эти потребности возрастают в десятки раз (табл. 6-6).

Вместе с тем запасов АТФ в клетках практически не существует. Так, в условиях прекращения синтеза АТФ в миокарде его запасы истощаются за несколько секунд.

Как мы уже знаем, для постоянного синтеза АТФ клеткам необходим приток метаболитов как субстратов дыхания и кислорода как конечного акцептора электронов в реакциях окисления, сопряжённых с синтезом АТФ.

Нарушения какого-либо этапа метаболизма, приводящие к прекращению синтеза АТФ, гибельны для клетки.

Таблица 6-6. Скорость потребления O_2 и АТФ в некоторых тканях

Ткань	Потребление O_2, мкмоль/г ткани/мин	Потребление АТФ, мкмоль/г ткани/мин
Мозг	1,7	10,2
Сердце	4,5	27,0
Почки	7,1	42,6
Печень	1,6	9,6
Мышцы (в покое)	0,08	0,5

Состояния, при которых синтез АТФ снижен, объединяют термином «гипоэнергетические». Причинами гипоэнергетических состояний могут быть голодание, гиповитаминозы B_1, PP, B_2; гипоксия.

Гипоксия может возникнуть: при недостатке кислорода во вдыхаемом воздухе; при заболеваниях лёгких и нарушении лёгочной вентиляции; при нарушениях кровообращения, вызванных заболеваниями сердца, спазмом и тромбозом сосудов, кровопотерей. Причинами гипоксии могут быть также наследственные или приобрётенные нарушения структуры гемоглобина (см. разделы 1, 4).Частой причиной гипоэнергетических состояний могут быть нарушения процессов использования кислорода в клетках.

Причинами этих нарушений могут быть:

- действие ингибиторов и разобщителей в ЦПЭ;
- железодефицитные анемии;
- снижение уровня гемоглобина и других железосодержащих белков (цитохромов, FeS-белков), в результате чего нарушаются перенос электронов и синтез АТФ;
- наследственные дефекты ферментов ЦПЭ и цитратного цикла.

Примерно 13 из 100 белков, участвующих в окислительном фосфорилировании, кодируются митохондриальной ДНК: 7 субъединиц комплекса I, субъединица комплекса III, 3 субъединицы комплекса IV и 2 субъединицы комплекса V, а также необходимые компоненты их трансляции. Остальные митохондриальные белки синтезируются в ядре.

Ядерная ДНК кодирует более 70 субъединиц белков, участвующих в окислительном фосфорилировании. Нарушения окислительного фосфорилирования в основном связаны с мутациями в митохондриальной ДНК, которые случаются примерно в 10 раз чаще, чем в ядерной. Ткани с высокой потребностью в АТФ (ЦНС, скелетные мышцы, миокард, почки и печень) наиболее чувствительны к нарушениям окислительного фосфорилирования.

Дефекты митохондриальной ДНК наследуются по материнской линии, так как митохондрии из клеток сперматозоидов не проникают в оплодотворённую яйцеклетку. Мутации митохондриальной ДНК — частая причина, так как митохондрии не имеют такой же эффективной системы репарации ДНК, как ядро (см. раздел 4). Даже у здоровых индивидуумов соматические мутации снижают с возрастом возможности окислительного фосфорилирования. В этих случаях способность к синтезу АТФ ниже тканеспецифического уровня нормальных клеток.

IV. ОБРАЗОВАНИЕ ТОКСИЧНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЦПЭ

В ЦПЭ поглощается около 90% поступающего в клетки O_2. Остальная часть O_2 используется в других окислительно-восстановительных реакциях. Ферменты, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях с использованием кислорода, делятся на 2 группы: оксидазы и оксигеназы.

Оксидазы используют молекулярный кислород только в качестве акцептора электронов, восстанавливая его до H_2O или H_2O_2.

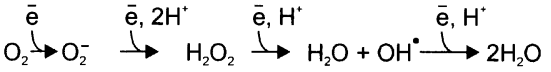
Оксигеназы включают один (монооксигеназы) или два (диоксигеназы) атома кислорода в образующийся продукт реакции.

Хотя эти реакции не сопровождаются синтезом АТФ, они необходимы для многих специфических реакций в обмене аминокислот (см. раздел 9), синтезе жёлчных кислот и стероидов (см. разделы 8, 11), в реакциях обезвреживания чужеродных веществ в печени (см. раздел 12).

В большинстве реакций с участием молекулярного кислорода его восстановление происходит поэтапно с переносом одного электрона на каждом этапе. При одноэлектронном переносе происходит образование промежуточных высокореактивных форм кислорода.

В невозбуждённом состоянии кислород нетоксичен. Образование токсических форм кислорода связано с особенностями его молекулярной структуры. O_2 содержит 2 неспаренных электрона с параллельными спинами, которые не могут образовывать термодинамически стабильную пару и располагаются на разных орбиталях. Каждая из этих орбиталей может принять ещё один электрон.

Полное восстановление O_2 происходит в результате 4 одноэлектронных переходов:



Супероксид → пероксид → гидроксильный радикал

Супероксид, пероксид и гидроксильный радикал — активные окислители, что представляет серьёзную опасность для многих структурных компонентов клетки (рис. 6-30).

Активные формы кислорода могут отщеплять электроны от многих соединений, превращая их в новые свободные радикалы, инициируя цепные окислительные реакции (см. раздел 8).

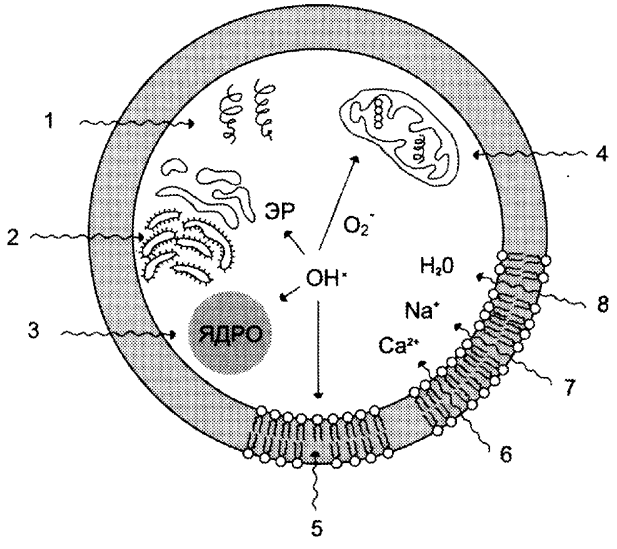


Рис. 6-30. Повреждающее действие свободных радикалов на компоненты клетки. 1 — разрушение белков; 2 — повреждение ЭР; 3 — разрушение ядерной мембраны и повреждение ДНК; 4 — разрушение мембран митохондрий; 5 — ПОЛ клеточной мембраны; 6, 7, 8 — проникновение в клетку воды и ионов.

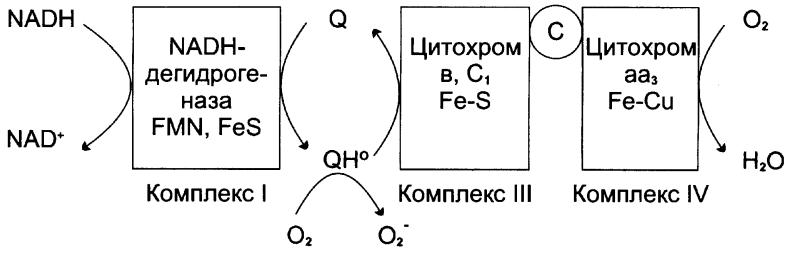


Рис. 6-31. Образование супероксида в ЦПЭ. «Утечка» электронов в ЦПЭ может происходить при переносе электронов с участием коэнзима Q. При восстановлении убихинон превращается в анион-радикал семихинона. Этот радикал неферментативно взаимодействует с O_2 с образованием супероксидного радикала. Комплекс II на рисунке не указан.

Большая часть активных форм кислорода образуется при переносе электронов в ЦПЭ, прежде всего, при функционировании QH_2-дегидрогеназного комплекса. Это происходит в результате неферментативного переноса («утечки») электронов с QH_2 на кислород (рис. 6-31).

В отличие от рассмотренного механизма на этапе переноса электронов при участии цитохромоксидазы (комплекс IV) «утечка» электронов не происходит благодаря наличию в ферменте специальных активных центров, содержащих Fe и Cu и восстанавливающих O_2 без освобождения промежуточных свободных радикалов.

В фагоцитирующих лейкоцитах (гранулоцитах, макрофагах и эозинофилах) в процессе фагоцитоза усиливаются поглощение кислорода и образование активных радикалов. Активные формы кислорода образуются в результате активации NADPH-оксидазы, преимущественно локализованной на наружной стороне плазматической мембраны, инициируя так называемый «респираторный взрыв» с образованием активных форм кислорода (см. раздел 14).

Защита организма от токсического действия активных форм кислорода связана с наличием во всех клетках высокоспецифичных ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, а также с действием антиоксидантов (см. раздел 8).

РАЗДЕЛ 7

ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Углеводы входят в состав живых организмов и вместе с белками, липидами и нуклеиновыми кислотами определяют специфичность их строения и функционирования. К углеводам относят соединения, обладающие разнообразными и зачастую сильно отличающимися функциями. Углеводы участвуют во многих метаболических процессах, но прежде всего они являются основными поставщиками энергии. На долю углеводов приходится примерно 75% массы пищевого суточного рациона и более 50% от суточного количества необходимых калорий. Однако неправильно сводить функцию углеводов только к энергетическому обеспечению процессов жизнедеятельности организма. Следует отметить и структурную роль углеводов. Так, в виде гликозаминогликанов углеводы входят в состав межклеточного матрикса. Большое число белков (ферменты, белки-транспортёры, белки-рецепторы, гормоны) — гликопротеины, углеводная составляющая которых повышает их специфичность. Например, различия в строении олигосахаридных фрагментов клеточной оболочки эритроцитов обеспечивают групповую принадлежность крови. Из углеводов в процессе метаболизма образуется большое число органических соединений, которые служат исходными субстратами для синтеза липидов, аминокислот, нуклеотидов. Производные углеводов — глюкурониды — участвуют в детоксикации ксенобиотиков и инактивации веществ эндогенного происхождения. Углеводы могут быть синтезированы в организме с использованием других метаболитов: некоторых аминокислот, глицерина, молочной кислоты. Углеводы нельзя считать незаменимыми компонентами пищи. Однако если исключить углеводы из диеты, то следствием может быть гипогликемия, для компенсации которой будут расходоваться белки и липиды. Таким образом, углеводы — обязательные пищевые компоненты, потому что помимо их основной энергетической функции (клеточные «дрова») углеводы участвуют во многих метаболических клеточных процессах.

I. СТРОЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

Термин «углеводы», предложенный в XIX столетии, был основан на предположении, что все углеводы содержат 2 компонента — углерод и воду, и их элементарный состав можно выразить общей формулой $C_m(H_2O)_n$. Хотя из этого правила есть исключения и оно не абсолютно точно, тем не менее указанное определение позволяет наиболее просто характеризовать класс углеводов в целом. К тому же попытка, предпринятая Комиссией по химической номенклатуре, заменить термин «углеводы» на «глициды» не удалась. Новый термин не получил широкого признания. Термин «углеводы» укоренился и общепризнан.

Углеводы можно разделить на 3 основные группы в зависимости от количества составляющих их мономеров: моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

А. Моносахариды

Моносахариды — производные многоатомных спиртов, содержащие карбонильную группу. В зависимости от положения в молекуле карбонильной группы моносахариды подразделяют на альдозы и кетозы.

Альдозы содержат функциональную альдегидную группу −HC=O, тогда как кетозы содержат кетонную группу >C=O. Название моносахарида зависит от числа составляющих его углеродных атомов, например альдотриозы, кетотриозы, альдогексозы, кетогексозы и т.д.

Моносахариды по строению можно отнести к простым углеводам, так как они не гидролизуются при переваривании, в отличие от сложных, которые при гидролизе распадаются с образованием простых углеводов. Строение основных представителей моносахаридов показано на рис. 7-1.

В пище человека (фрукты, мёд, соки) содержится небольшое количество моносахаридов, в основном глюкоза и фруктоза.

Глюкоза является альдогексозой. Она может существовать в линейной и циклической формах. Циклическая форма глюкозы, предпочтительная в термодинамическом отношении, обусловливает химические свойства глюкозы. Как и все гексозы, глюкоза имеет 4 асимметричных углеродных атома, обусловливающих наличие стереоизомеров. Возможно образование 16 стереоизомеров, наиболее важные из которых D- и L-глюкоза. Эти типы изомеров зеркально отображают друг друга (рис. 7-2).

Расположение H- и OH-групп относительно пятого углеродного атома определяет принадлежность глюкозы к D- или L-ряду. В организме млекопитающих моносахариды находятся в D-конфигурации, так как к этой форме глюкозы специфичны ферменты, катализирующие её превращения. В растворе при образовании циклической формы моносахарида образуются ещё 2 изомера (α- и β-изомеры), называемые аномерами, обозначающие определённую конформацию H- и OH-групп относительно C_1 (рис. 7-3). У α-D-глюкозы OH-группа располагается ниже плоскости кольца, а у β-D-глюкозы, наоборот, над плоскостью кольца.

Фруктоза является кетогексозой (кетогруппа находится у второго углеродного атома). Фруктоза так же, как и глюкоза, существует в циклической форме, образуя α- и β-аномеры (рис. 7-4).

Б. Реакции моносахаридов

Присутствие гидроксильных, альдегидных и кетонных групп позволяет моносахаридам вступать в реакции, характерные для спиртов, альдегидов или кетонов. Эти реакции довольно многочисленны. В данном разделе будут описаны лишь некоторые из них, причём в основном имеющие наибольшее биологическое значение.

В этом разделе основные реакции моносахаридов рассмотрены на примере D-глюкозы (рис. 7-5), хотя надо иметь в виду, что в метаболизме углеводов принимают участие и другие моносахариды, а также их производные.

Мутаротация, или аномеризация — взаимопревращение аномерных форм моносахаридов. α- и β-формы аномеров находятся в растворе в состоянии равновесия. При достижении этого равновесия происходит мутаротация — размыкание и замыкание пиранового кольца и, соответственно, изменение расположения H- и OH-групп при первом углероде моносахарида.

Образование гликозидов. Гликозидная связь имеет важное биологическое значение, потому что именно с помощью этой связи осуществляется ковалентное связывание моносахаридов в составе олиго- и полисахаридов. При образовании гликозидной связи аномерная OH-группа одного моносахарида взаимодействует с OH-группой дру-

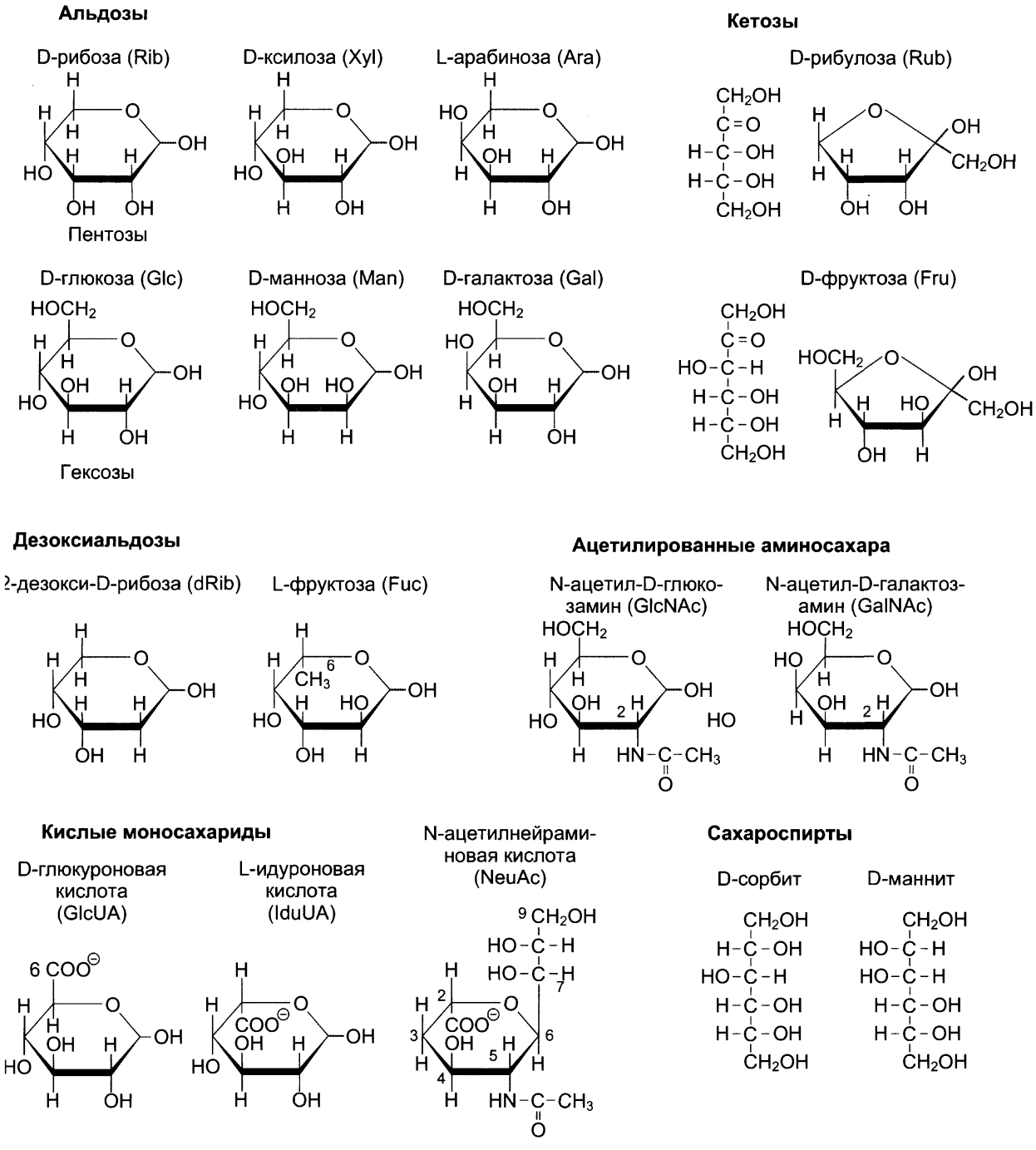


Рис. 7-1. Важнейшие моносахариды.

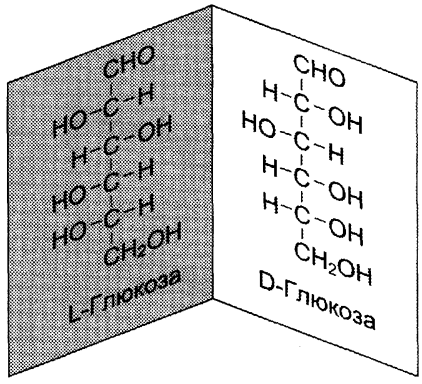


Рис. 7-2. D- и L-изомеры глюкозы.

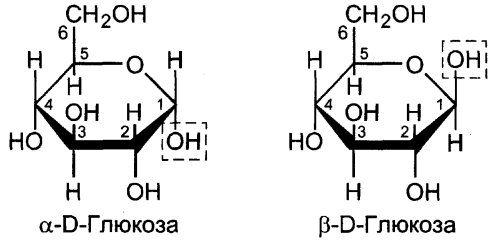


Рис. 7-3. α- и β-аномеры D-глюкозы.

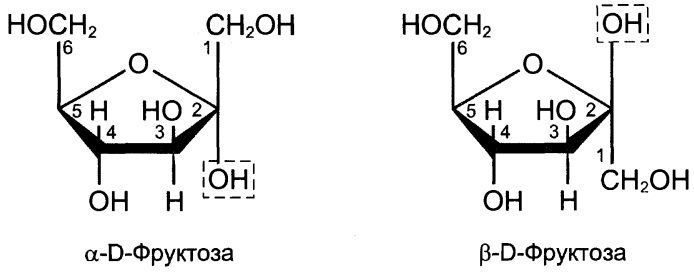


Рис. 7-4. α- и β-аномеры D-фруктозы.

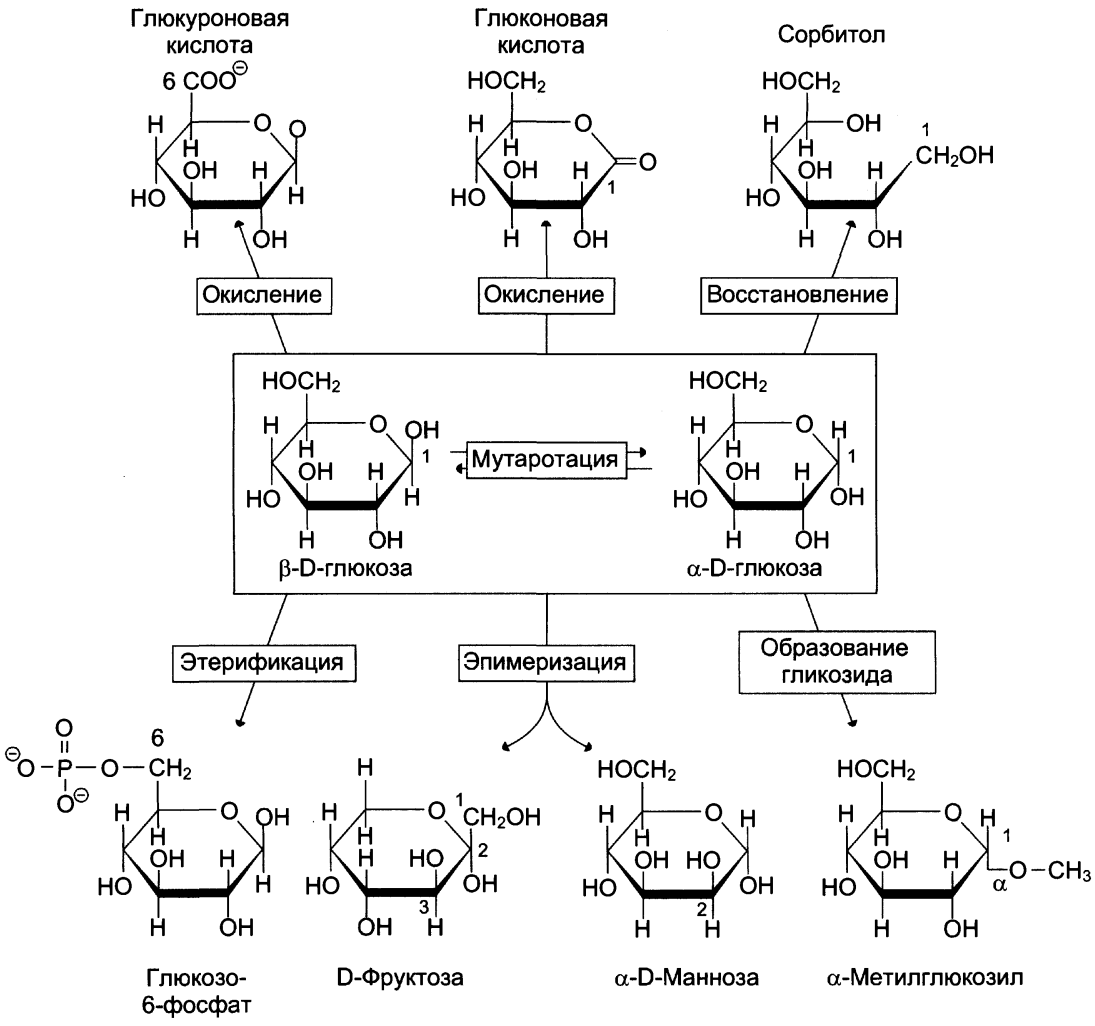


Рис. 7-5. Реакции моносахаридов.

гого моносахарида или спирта. При этом происходят отщепление молекулы воды и образование О-гликозидной связи. Все линейные олигомеры (кроме дисахаридов) или полимеры содержат мономерные остатки, участвующие в образовании двух гликозидных связей, кроме концевых остатков, образующих только одну гликозидную связь. Некоторые гликозидные остатки могут образовывать три гликозидные связи, что характерно для разветвлённых олиго- и полисахаридов. Олиго- и полисахариды могут иметь концевой остаток моносахарида со свободной аномерной ОН-группой, не использованной при образовании гликозидной связи. В этом случае при размыкании цикла возможно образование свободной карбонильной группы, способной окисляться. Такие олиго- и полисахариды обладают восстанавливающими свойствами и поэтому называются восстанавливающими, или редуцирующими (рис. 7-6).

Аномерная ОН-группа моносахарида может взаимодействовать с NH_2-группой других соединений, что приводит к образованию N-гликозидной связи. Подобная связь присутствует в нуклеотидах и гликопротеинах (рис. 7-7).

Этерификация. Это реакция образования эфирной связи между ОН-группами моносахаридов и различными кислотами. В метаболизме углеводов важную роль играют фосфоэфиры — эфиры моносахаридов и фосфорной кислоты. В метаболизме глюкозы особое мес-

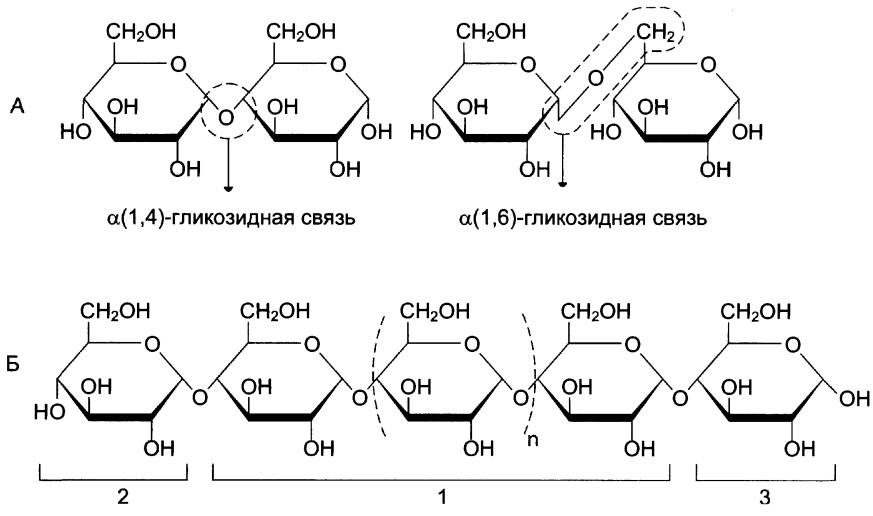


Рис. 7-6. Строение полисахарида. А. Образование α-1,4- и α-1,6-гликозидных связей. **Б.** Строение линейного полисахарида: 1 — α-1,4-гликозидные связи между мономерами; 2 — невосстанавливающий конец (невозможно образование свободной карбонильной группы у аномерного углерода); 3 — восстанавливающий конец (возможно размыкание цикла с образованием свободной карбонильной группы у аномерного углерода).

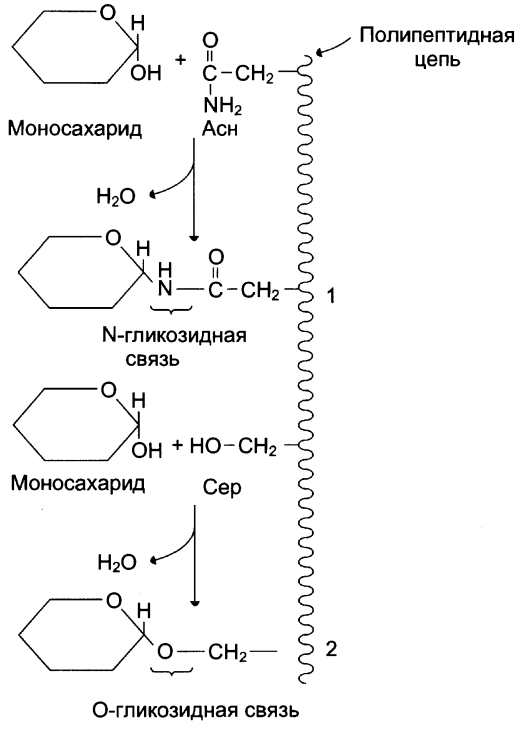


Рис. 7-7. Образование O- и N-гликозидных связей в гликопротеинах. 1 — N-гликозидная связь между амидной группой аспарагина и OH-группой моносахарида; 2 — O-гликозидная связь между OH-группой серина и OH-группой моносахарида.

то занимает глюкозо-6-фосфат. Образование глюкозо-6-фосфата происходит в ходе АТФ-зависимой реакции при участии ферментов, относящихся к группе киназ. АТФ в данной реакции выступает как донор фосфатной группы. Фосфоэфиры моносахаридов могут образовываться и без использования АТФ. Например, глюкозо-1-фосфат образуется из гликогена при участии H_3PO_4. Физиологическое значение фосфоэфиров моносахаридов заключается в том, что они представляют собой метаболически активные структуры. Реакция фосфорилирования моносахаридов важна для метаболизма ещё и потому, что клеточная мембрана мало проницаема для этих соединений, т.е. клетка удерживает моносахариды благодаря тому, что они находятся в фосфорилированной форме.

Окисление и восстановление. При окислении концевых групп глюкозы -CHO и $-CH_2OH$ образуются 3 различных производных. При окислении группы -CHO образуется глюконовая кислота. Если окислению подвергается концевая группа $-CH_2OH$, образуется глюкуроновая кислота. А если окисляются обе концевые группы, то образуется сахарная кислота, содержащая 2 карбоксильные группы. Восстановление первого углерода приводит к образованию сахароспирта — сорбитола.

В. Олигосахариды

Олигосахариды содержат несколько (от двух до десяти) остатков моносахаридов, соединённых гликозидной связью. Дисахариды — наиболее распространённые олигомерные углеводы, встречающиеся в свободной форме, т.е. не связанной с другими соединениями. По химической природе дисахариды представляют собой гликозиды, которые содержат 2 моносахарида, соединённые гликозидной связью в α- или β-конфигурации. В пище содержатся в основном такие дисахариды, как сахароза, лактоза и мальтоза (рис. 7-8).

Сахароза — дисахарид, состоящий из α-D-глюкозы и β-D-фруктозы, соединённых α,β-1,2-гликозидной связью. В сахарозе обе аномерные OH-группы остатков глюкозы и фруктозы участвуют в образовании гликозидной связи. Следовательно, сахароза не относится к восстанавливающим сахарам. Сахароза — растворимый дисахарид со сладким вкусом. Источником сахарозы служат растения, особенно сахарная свёкла, сахарный тростник. Последнее объясняет возникновение тривиального названия сахарозы — «тростниковый сахар».

Лактоза — молочный сахар; важнейший дисахарид молока млекопитающих. В коровьем молоке содержится до 5% лактозы, в женском молоке — до 8%. В лактозе аномерная OH-группа первого углеродного атома остатка D-галактозы связана β-гликозидной связью с четвёртым углеродным атомом D-глюкозы (β-1,4-связь). Поскольку аномерный атом углерода остатка глюкозы не участвует в образовании гликозидной связи, следовательно, лактоза относится к восстанавливающим сахарам.

Мальтоза поступает с продуктами, содержащими частично гидролизованный крахмал, например, солод, пиво. Мальтоза также образуется при расщеплении крахмала в кишечнике. Мальтоза состоит из двух остатков D-глюкозы, соединённых α-1,4-гликозидной связью.

Изомальтоза — промежуточный продукт, образующийся при расщеплении крахмала в кишечнике. Состоит из двух остатков D-глюкозы, но соединены эти моносахариды α-1,6-гликозидной связью.

Г. Полисахариды

Структурные различия между полисахаридами определяются:

- строением моносахаридов, составляющих цепь;
- типом гликозидных связей, соединяющих мономеры в цепи;
- последовательностью остатков моносахаридов в цепи.

В зависимости от строения остатков моносахаридов полисахариды можно разделить на **гомополисахариды** (все мономеры идентичны) и **гетерополисахариды** (мономеры различны). Оба типа полисахаридов могут иметь как линейное расположение мономеров, так и разветвлённое.

В зависимости от выполняемых ими функций полисахариды можно разделить на 3 основные группы:

- резервные полисахариды, выполняющие энергетическую функцию. Эти полисахариды служат источником глюкозы, используемым организмом по мере необходимости. Резервная функция этих углеводов обеспечивается их полимерной природой. Полиса-

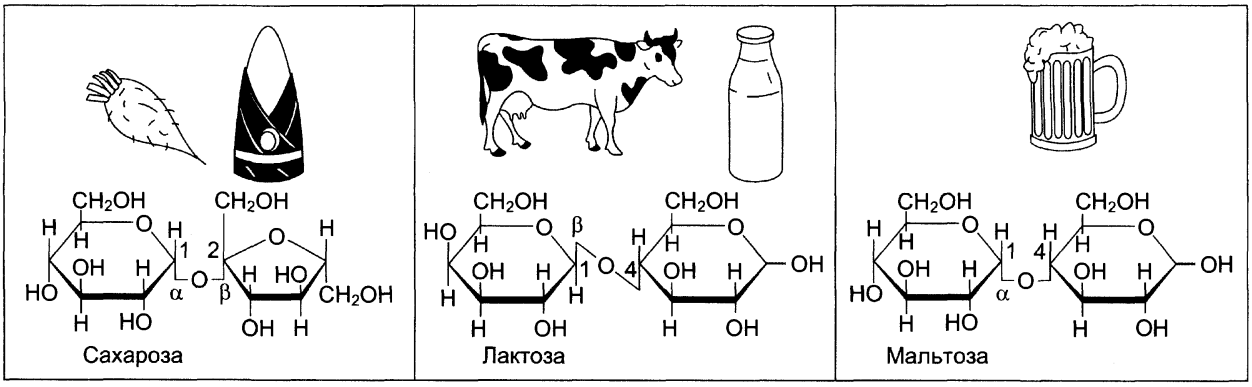


Рис. 7-8. Дисахариды пищи.

хариды менее растворимы, чем моносахариды, следовательно они не влияют на осмотическое давление и поэтому могут накапливаться в клетке, например, крахмал — в клетках растений, гликоген — в клетках животных;

- структурные полисахариды, обеспечивающие клеткам и органам механическую прочность (см. раздел 15);
- полисахариды, входящие в состав межклеточного матрикса, принимают участие в образовании тканей, а также в пролиферации и дифференцировке клеток. Полисахариды межклеточного матрикса водорастворимы и сильно гидратированы (см. раздел 15).

В пище человека в основном содержатся полисахариды растительного происхождения — крахмал, целлюлоза. В меньшем количестве поступает полисахарид животных — гликоген.

Крахмал — наиболее важный углеводный компонент пищевого рациона. Это резервный полисахарид растений, содержащийся в наибольшем количестве (до 45% от массы сухого вещества) в зёрнах злаков (пшеница, кукуруза, рис и др.), а также луковицах, стеблях и клубнях растений (в картофеле примерно 65%). Крахмал — разветвлённый полисахарид, состоящий из остатков глюкозы (гомогликан). Он находится в клетках растений в виде гранул, практически нерастворим в воде.

Крахмал состоит из амилозы и амилопектина (рис. 7-9). Амилоза — неразветвлённый полисахарид, включающий 200–300 остатков глюкозы, связанных α-1,4-гликозидной связью. Благодаря α-конфигурации глюкозного остатка, полисахаридная цепь имеет конформацию спирали. Синяя окраска при добавлении йода к раствору крахмала обусловлена наличием такой спирали. Амилопектин имеет разветвлённую структуру. В местах ветвления остатки глюкозы соединены α-1,6-гликозидными связями. Линейные участки содержат примерно 20–25 остатков глюкозы. При этом формируется древовидная структура, в которой имеется лишь одна аномерная ОН-группа. Крахмал — высокомолекулярное соединение, включающее сотни тысяч остатков глюкозы. Его молекулярная масса составляет порядка 10^5–10^8 Д.

Целлюлоза (клетчатка) — основной структурный полисахарид растений. Это самое распространённое органическое соединение на земле. Доля целлюлозы в клеточных стенках растений составляет 40–50%. Целлюлоза имеет молекулярную массу порядка 10^6 Д, длина молекулы может доходить до 6–8 мкм.

Целлюлоза — линейный полисахарид гомогликан, построенный из остатков глюкозы, соединённых между собой β-1,4-гликозидными связями. Пищеварительная система человека не имеет ферментов, гидролизующих β-связи в полисахаридах. Поэтому целлюлоза — неиспользуемый углевод, но этот пищевой компонент необходим для нормального протекания переваривания.

Гликоген — полисахарид животных и человека. Так же, как крахмал в растениях, гликоген в клетках животных выполняет резервную функцию, но, так как в пище содержится лишь небольшое количество гликогена, он не имеет пищевого значения.

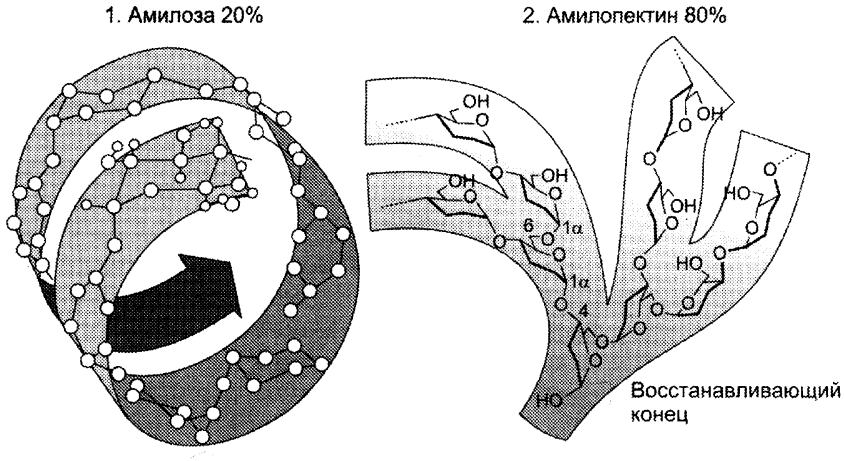


Рис. 7-9. Строение крахмала.

Гликоген представляет собой структурный аналог крахмала, но имеет большую степень ветвления: примерно на каждые 10 остатков глюкозы приходится одна α-1,6-гликозидная связь.

II. ПЕРЕВАРИВАНИЕ УГЛЕВОДОВ

Эпителиальные клетки кишечника способны всасывать только моносахариды. Поэтому процесс переваривания заключается в ферментативном гидролизе гликозидных связей в углеводах, имеющих олиго- или полисахаридное строение (рис. 7-10).

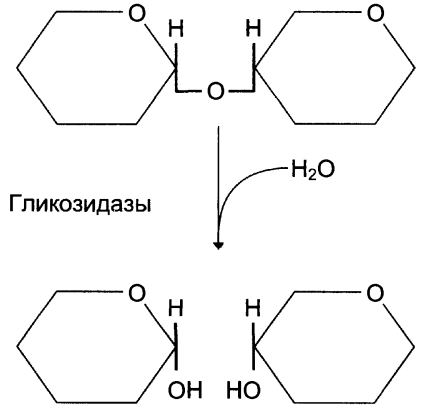


Рис. 7-10. Гидролиз гликозидной связи.

А. Переваривание углеводов в ротовой полости

В ротовой полости пища измельчается при пережёвывании, смачиваясь при этом слюной. Слюна на 99% состоит из воды и обычно имеет pH 6,8. В слюне присутствует гидролитический фермент **α-амилаза (α-1,4-гликозидаза)**, расщепляющая в крахмале α-1,4-гликозидные связи. В ротовой полости не может происходить полное расщепление крахмала, так как действие фермента на крахмал кратковременно. Кроме того, амилаза слюны не расщепляет α-1,6-гликозидные связи (связи в местах разветвлений), поэтому крахмал переваривается лишь частично с образованием крупных фрагментов — декстринов и небольшого количества мальтозы. Следует отметить, что амилаза слюны не гидролизует гликозидные связи в дисахаридах.

Действие амилазы слюны прекращается в резко кислой среде содержимого желудка (pH 1,5–2,5). Однако внутри пищевого комка активность амилазы может некоторое время сохраняться, пока pH не изменится в кислую сторону. Желудочный сок не содержит ферментов, расщепляющих углеводы. В желудочном содержимом возможен лишь незначительный кислотный гидролиз гликозидных связей.

Б. Переваривание углеводов в кишечнике

Последующие этапы переваривания нерасщеплённого или частично расщеплённого крахмала, а

также других углеводов пищи происходит в тонком кишечнике в разных его отделах под действием гидролитических ферментов — гликозидаз.

Панкреатическая α-амилаза

В двенадцатиперстной кишке pH среды желудочного содержимого нейтрализуется, так как секрет поджелудочной железы имеет pH 7,5–8,0 и содержит бикарбонаты (HCO_3^-). С секретом поджелудочной железы в кишечник поступает **панкреатическая α-амилаза**. Этот фермент гидролизует α-1,4-гликозидные связи в крахмале и декстринах.

Продукты переваривания крахмала на этом этапе — дисахарид мальтоза, содержащая 2 остатка глюкозы, связанные α-1,4-связью. Из тех остатков глюкозы, которые в молекуле крахмала находятся в местах разветвления и соединены α-1,6-гликозидной связью, образуется дисахарид изомальтоза. Кроме того, образуются олигосахариды, содержащие 3–8 остатков глюкозы, связанные α-1,4- и α-1,6-связями (рис. 7-11).

α-Амилаза поджелудочной железы, так же, как α-амилаза слюны, действует как эндогликозидаза. Панкреатическая α-амилаза не расщепляет α-1,6-гликозидные связи в крахмале. Этот фермент также не гидролизует β-1,4-гликозидные связи, которыми соединены остатки глюкозы в молекуле целлюлозы. Целлюлоза, таким образом, проходит через кишечник неизменённой. Тем не менее непереваренная целлюлоза выполняет важную функцию балластного вещества, придавая пище дополнительный объём и положительно влияя на процесс переваривания. Кроме того, в толстом кишечнике целлюлоза может подвергаться действию бактериальных ферментов и частично расщепляться с образованием спиртов, органических кислот и CO_2. Продукты бактериального расщепления целлюлозы важны как стимуляторы перистальтики кишечника.

Мальтоза, изомальтоза и триозосахариды, образующиеся в верхних отделах кишечника из крахмала, — промежуточные продукты. Дальнейшее их переваривание происходит под действием специфических ферментов в тонком кишечнике. Дисахариды пищи сахароза и лактоза также гидролизуются специфическими дисахаридазами в тонком кишечнике.

Особенность переваривания углеводов в тонком кишечнике заключается в том, что активность специфических олиго- и дисахаридаз в просвете кишечника низкая. Но ферменты активно действуют на поверхности эпителиальных клеток кишечника.

Тонкий кишечник изнутри имеет форму пальцеобразных выростов — ворсинок, покрытых эпителиальными клетками. Эпителиальные клетки, в свою очередь, покрыты микроворсинками, обращёнными в просвет кишечника. Эти клетки вместе с ворсинками образуют щёточную каёмку, благодаря которой увеличивается поверхность контакта гидролитических ферментов и их субстратов в содержимом кишечника. На 1 мм^2 поверхности тонкой кишки у человека приходится 80–140 млн ворсинок.

Ферменты, расщепляющие гликозидные связи в дисахаридах (дисахаридазы), образуют ферментативные комплексы, локализованные на наружной поверхности цитоплазматической мембраны энтероцитов.

Сахаразо-изомальтазный комплекс

Этот ферментативный комплекс состоит из двух полипептидных цепей и имеет доменное строение. Сахаразо-изомальтазный комплекс прикрепляется к мембране микроворсинок кишечника с помощью гидрофобного (трансмембранного) домена, образованного N-концевой частью полипептида. Каталитический центр выступает в просвет кишечника (рис. 7-12). Связь этого пищеварительного фермента с мембраной способствует эффективному поглощению продуктов гидролиза клеткой.

Сахаразо-изомальтазный комплекс гидролизует сахарозу и изомальтозу, расщепляя α-1,2- и α-1,6-гликозидные связи. Кроме того, оба ферментных домена имеют мальтазную и мальтотриазную активности, гидролизуя α-1,4-гликозидные связи в мальтозе и мальтотриозе (трисахарид, образующийся из крахмала). На долю сахаразо-изомальтазного комплекса приходится 80% от всей мальтазной активности кишечника. Но несмотря на присущую ему высокую мальтазную активность, этот ферментативный комплекс назван в соответствии с основной специфичностью. К тому же сахаразная субъединица — единственный фермент в кишечнике, гидролизующий сахарозу. Изомальтазная субъединица с большей скоростью гидролизует гликозидные связи в изомальтозе, чем в мальтозе и мальтотриозе (рис. 7-13, 7-14).

В тощей кишке содержание сахаразо-изомальтазного ферментативного комплекса достаточ-

но высокое, но оно снижается в проксимальной и дистальной частях кишечника.

Гликоамилазный комплекс

Этот ферментативный комплекс катализирует гидролиз α-1,4-связи между глюкозными остатками в олигосахаридах, действуя с восстанавливающего конца. По механизму действия этот фермент относят к экзогликозидазам. Комплекс расщепляет также связи в мальтозе, действуя как мальтаза. В гликоамилазный комплекс входят две разные каталитические субъединицы, имеющие небольшие различия в субстратной специфичности. Гликоамилазная активность комплекса наибольшая в нижних отделах тонкого кишечника.

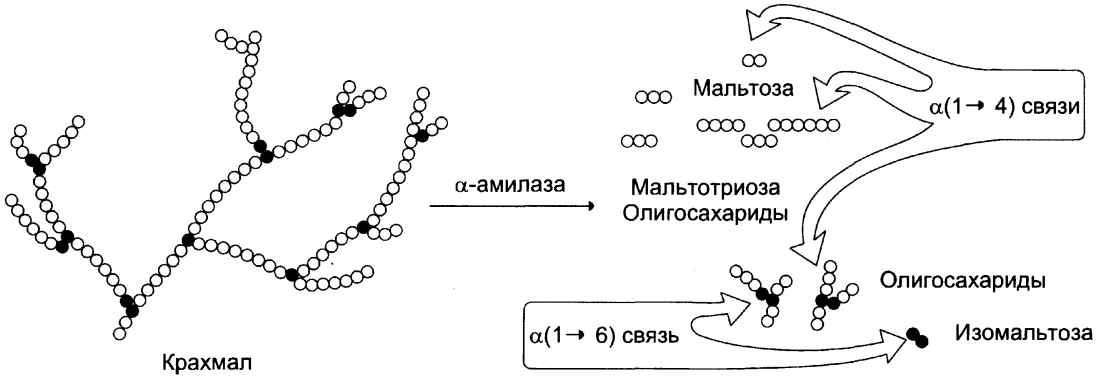


Рис. 7-11. Гидролиз крахмала панкреатической α-амилазой.

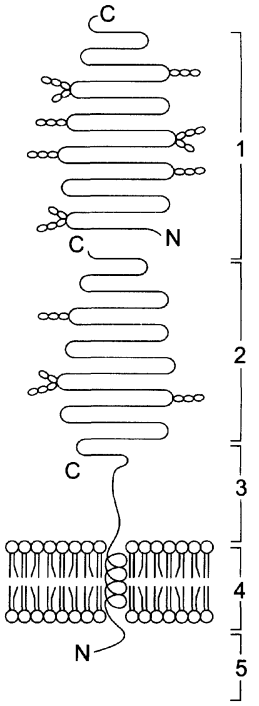


Рис. 7-12. Сахаразо-изомальтазный комплекс. 1 — сахараза; 2 — изомальтаза; 3 — связывающий домен; 4 — трансмембранный домен; 5 — цитоплазматический домен.

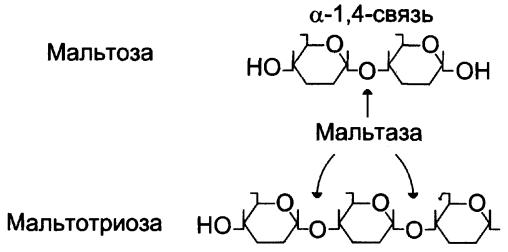


Рис. 7-13. Действие сахаразо-изомальтазного комплекса на мальтозу и мальтотриозу.

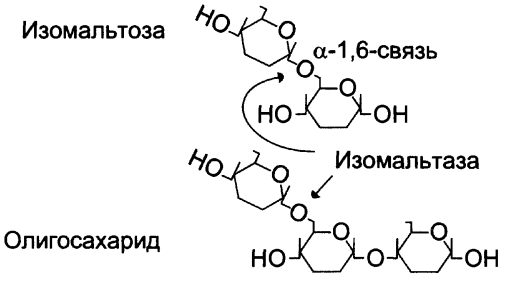


Рис. 7-14. Действие сахаразо-изомальтазного комплекса на изомальтозу и олигосахарид.

β-Гликозидазный комплекс (лактаза)

Лактаза расщепляет β-1,4-гликозидные связи между галактозой и глюкозой в лактозе (рис. 7-15).

Этот ферментативный комплекс по химической природе является гликопротеином. Лактаза, как и другие гликозидазные комплексы, связана с щёточной каемкой и распределена неравномерно по всему тонкому кишечнику. Активность лактазы колеблется в зависимости от возраста. Так, активность лактазы у плода особенно повышена в поздние сроки беременности и сохраняется на высоком уровне до 5—7-летнего возраста. Затем активность фермента снижается, составляя у взрослых 10% от уровня активности, характерного для детей.

Трегалаза — также гликозидазный комплекс, гидролизующий связи между мономерами в трегалозе — дисахариде, содержащемся в грибах. Трегалоза состоит из двух глюкозных остатков, связанных гликозидной связью между первыми аномерными атомами углерода (рис. 7-16).

Совместное действие всех перечисленных ферментов завершает переваривание пищевых олиго- и полисахаридов с образованием моносахаридов, основной из которых — глюкоза. Кроме глюкозы, из углеводов пищи также образуются фруктоза и галактоза, в меньшем количестве — манноза, ксилоза, арабиноза. Общая схема переваривания углеводов представлена на рис. 7-17.

III. МЕХАНИЗМ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПЕРЕНОСА ГЛЮКОЗЫ И ДРУГИХ МОНОСАХАРИДОВ В КЛЕТКИ

Моносахариды, образовавшиеся в результате переваривания, всасываются эпителиальными клетками тощей и подвздошной кишок с помощью специальных механизмов транспорта через мембраны этих клеток.

А. Всасывание моносахаридов в кишечнике

Транспорт моносахаридов в клетки слизистой оболочки кишечника может осуществляться разными способами: путём облегчённой диффузии и активного транспорта. В случае активного транспорта глюкоза и Na^+ проходят через мембраны с люминальной стороны, связываясь с разными участками белка-переносчика. При этом Na^+ поступает в клетку по градиенту концентрации, и одновременно глюкоза транспортируется против градиента концентрации (вторично-активный транспорт, см. раздел 5). Следовательно, чем больше градиент Na^+, тем больше поступление глюкозы в энтероциты. Если концентрация Na^+ во внеклеточной жидкости уменьшается, транспорт глюкозы снижается. Градиент концентрации Na^+, являющийся движущей силой активного симпорта, создаётся работой Na^+,K^+-АТФ-азы. Перенос в клетки слизистой оболочки кишечника по механизму вторично-активного транспорта характерен также для галактозы.

При разной концентрации глюкозы в просвете кишечника «работают» различные механизмы транспорта. Благодаря активному транспорту эпителиальные клетки кишечника могут поглощать глюкозу при её очень низкой концентрации в просвете кишечника. Если же концентра-

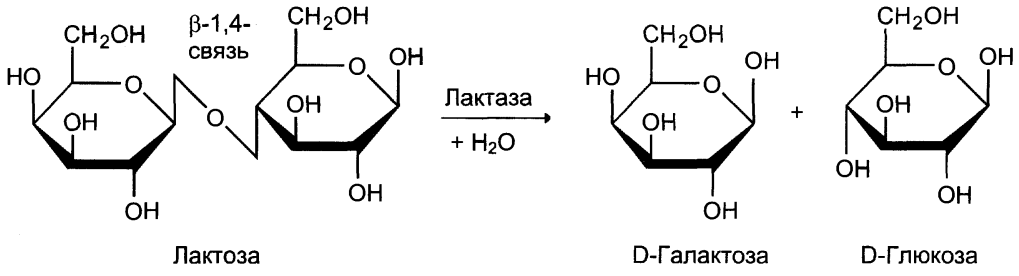


Рис. 7-15. Действие лактазы.

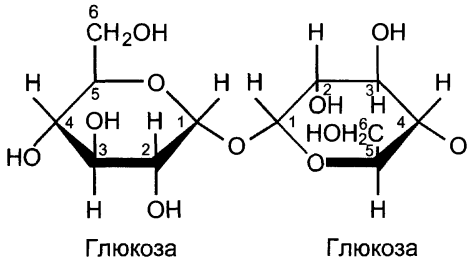


Рис. 7-16. Строение трегалозы.

ция глюкозы в просвете кишечника велика, то она может транспортироваться в клетку путём облегчённой диффузии. Таким же способом может всасываться и фруктоза. Следует отметить, что скорость всасывания глюкозы и галактозы гораздо выше, чем других моносахаридов. Способы транспорта моносахаридов через мембрану эпителиальных клеток кишечника представлены на рис. 7-18.

После всасывания моносахариды (главным образом, глюкоза) покидают клетки слизистой оболочки кишечника через мембрану, обращённую к кровеносному капилляру, с помощью облегчённой диффузии. Часть глюкозы (более половины) через капилляры кишечных ворсинок попадает в кровеносную систему и по воротной вене доставляется в печень. Остальное количество глюкозы поступает в клетки других тканей.

Б. Транспорт глюкозы из крови в клетки

Потребление глюкозы клетками из кровотока происходит также путём облегчённой диффузии. Следовательно, скорость трансмембранного потока глюкозы зависит только от градиента её концентрации. Исключение составляют клетки мышц и жировой ткани, где облегчённая диффузия регулируется инсулином (гормон поджелудочной железы). В отсутствие инсулина плазматическая мембрана этих клеток непроницаема для глюкозы, так как она не содержит белки-переносчики (транспортёры) глюкозы. Транспортёры глюкозы называют также рецепторами глюкозы. Например, описан транспортёр глюкозы, выделенный из эритроцитов. Это трансмембранный белок, полипептидная цепь которого построена из 492 аминокислотных остатков и имеет доменную структуру. Полярные домены белка расположены по разные стороны мембраны, гидрофобные располагаются в мембране, пересекая её несколько раз. Транспортёр имеет участок связывания глюкозы на внешней стороне мембраны. После присоединения глюкозы конформация белка изменяется, в результате чего глюкоза оказывается связанной с белком в участке, обращённом внутрь клетки. Затем глюкоза отделяется от транспортёра, переходя внутрь клетки (см. раздел 5).

Считают, что способ облегчённой диффузии по сравнению с активным транспортом предотвращает транспорт ионов вместе с глюкозой, если она транспортируется по градиенту концентрации.

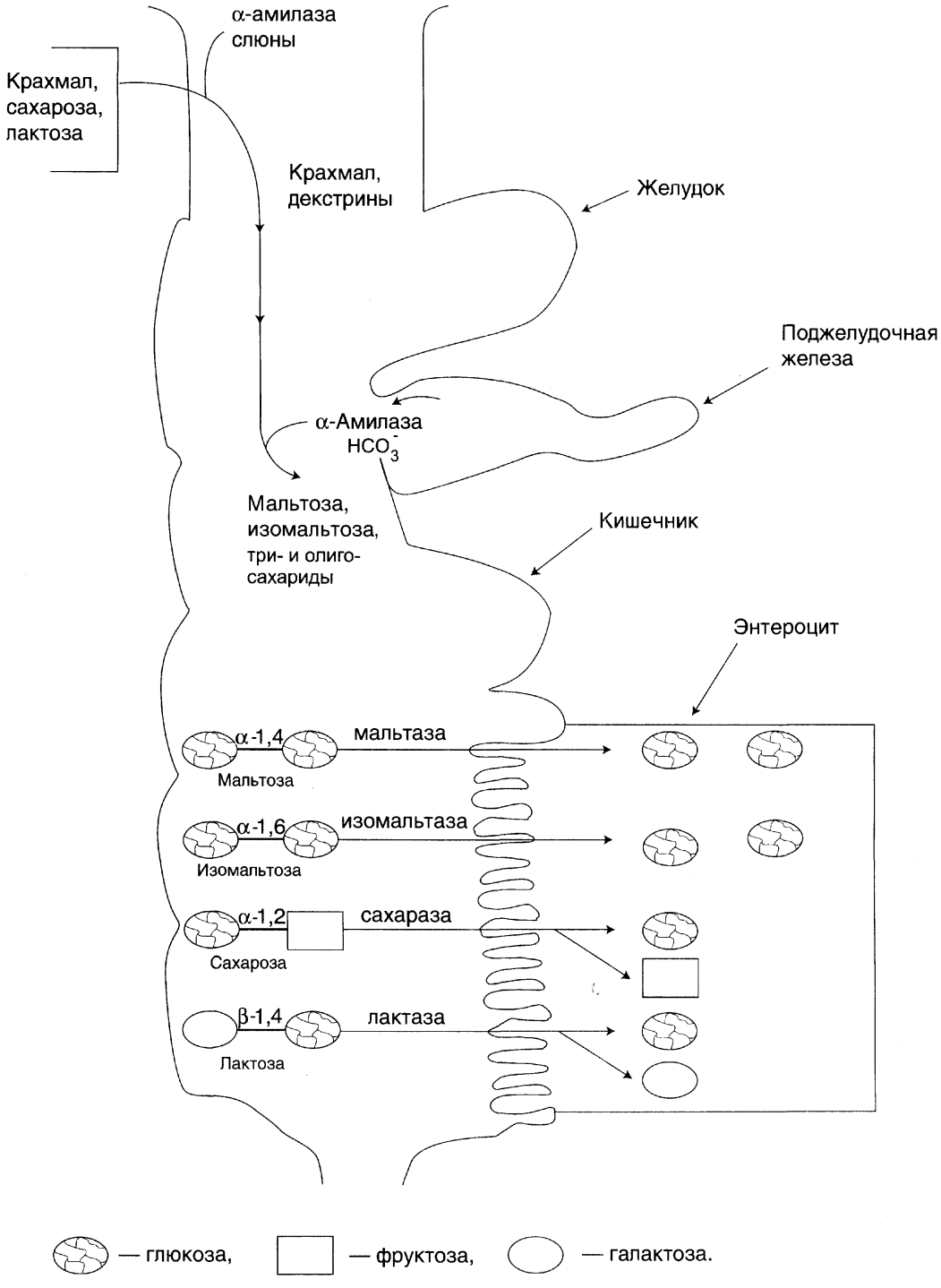


Рис. 7-17. Переваривание углеводов.

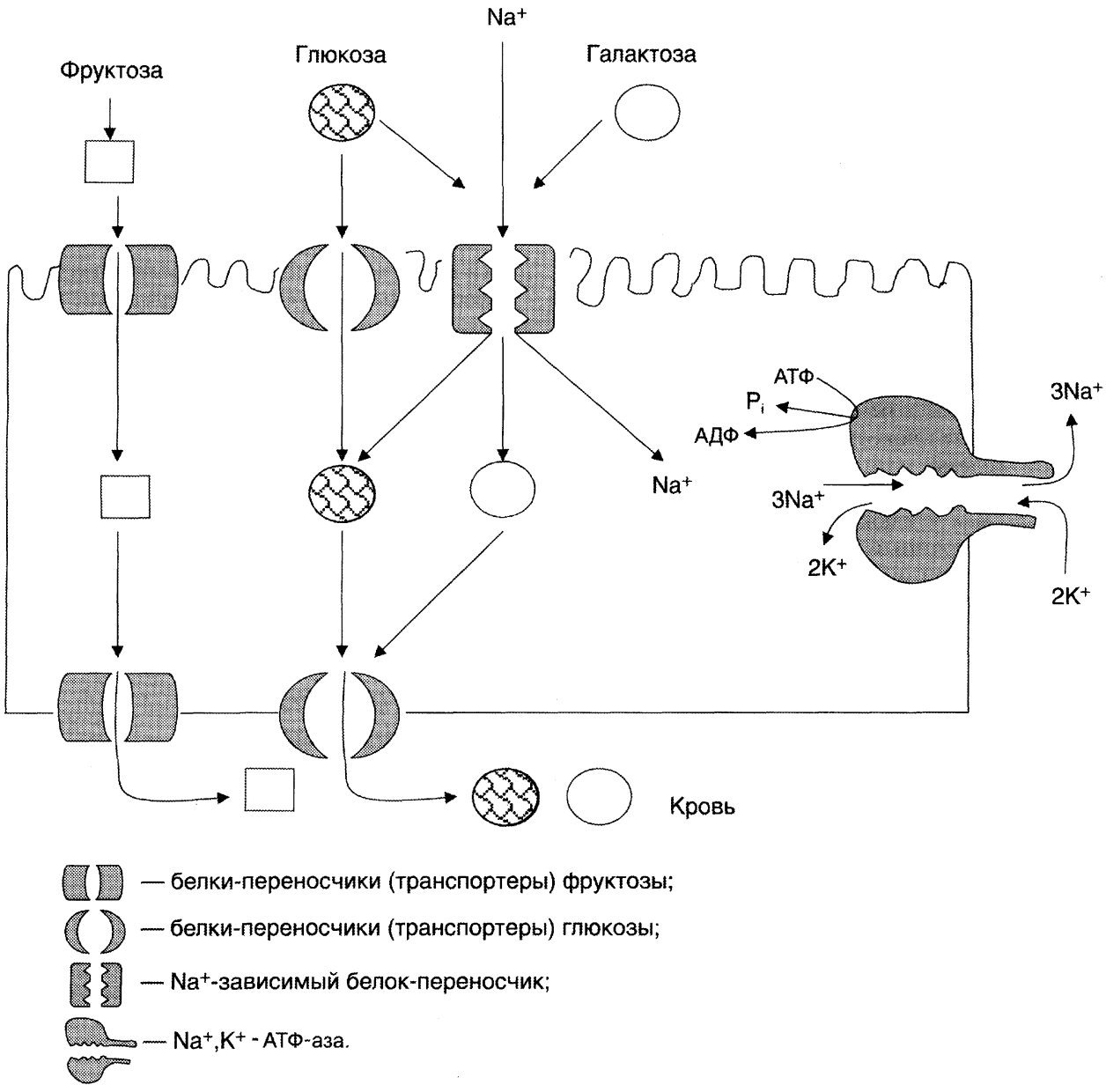


Рис. 7-18. Всасывание углеводов в кишечнике. Всасывание моносахаридов из кишечника происходит путём облегчённой диффузии с помощью специальных белков-переносчиков (транспортёров). Кроме того, глюкоза и галактоза транспортируются в энтероцит путём вторично-активного транспорта, зависимого от градиента концентрации ионов натрия. Белки-транспортёры, зависимые от градиента Na^+, обеспечивают всасывание глюкозы из просвета кишечника в энтероцит против градиента концентрации. Концентрация Na^+, необходимая для этого транспорта, обеспечивается Na^+,K^+-АТФ-азой, которая работает как насос, откачивая из клетки Na^+ в обмен на K^+. В отличие от глюкозы, фруктоза транспортируется системой, не зависящей от градиента натрия.

Глюкозные транспортёры (ГЛЮТ) обнаружены во всех тканях. Существует несколько разновидностей ГЛЮТ (табл. 7-1), они пронумерованы в соответствии с порядком их обнаружения.

Структура белков семейства ГЛЮТ отличается от белков, транспортирующих глюкозу через мембрану в кишечнике и почках против градиента концентрации.

Описанные 5 типов ГЛЮТ имеют сходные первичную структуру и доменную организацию.

- ГЛЮТ-1 обеспечивает стабильный поток глюкозы в мозг;
- ГЛЮТ-2 обнаружен в клетках органов, выделяющих глюкозу в кровь. Именно при участии ГЛЮТ-2 глюкоза переходит в кровь из энтероцитов и печени. ГЛЮТ-2 участвует в транспорте глюкозы в β-клетки поджелудочной железы;
- ГЛЮТ-3 обладает большим, чем ГЛЮТ-1, сродством к глюкозе. Он также обеспечивает постоянный приток глюкозы к клеткам нервной и других тканей;
- ГЛЮТ-4 — главный переносчик глюкозы в клетки мышц и жировой ткани;
- ГЛЮТ-5 встречается, главным образом, в клетках тонкого кишечника. Его функции известны недостаточно.

Все типы ГЛЮТ могут находиться как в плазматической мембране, так и в цитозольных везикулах. ГЛЮТ-4 (и в меньшей мере ГЛЮТ-1) почти полностью находятся в цитоплазме клеток. Влияние инсулина на такие клетки приводит к перемещению везикул, содержащих ГЛЮТ, к плазматической мембране, слиянию с ней и встраиванию транспортёров в мембрану. После чего возможен облегчённый транспорт глюкозы в эти клетки. После снижения концентрации инсулина в крови транспортёры глюкозы снова перемещаются в цитоплазму, и поступление глюкозы в клетку прекращается (рис. 7-19).

Перемещение глюкозы из первичной мочи в клетки почечных канальцев происходит вторично-активным транспортом, подобно тому, как это осуществляется при всасывании глюкозы из просвета кишечника в энтероциты. Благодаря этому глюкоза может поступать в клетки даже в том случае, если её концентрация в первичной моче меньше, чем в клетках. При этом глюкоза реабсорбируется из первичной мочи почти полностью (99%).

Известны различные нарушения в работе транспортёров глюкозы. Наследственный дефект этих белков может лежать в основе инсулинонезависимого сахарного диабета (см. раздел 11). В то же время причиной нарушения работы транспортёра глюкозы может быть не только дефект самого белка. Нарушения функции ГЛЮТ-4 возможны на следующих этапах:

- передача сигнала инсулина о перемещении этого транспортёра к мембране;
- перемещение транспортёра в цитоплазме;
- включение в состав мембраны;
- отшнуровывание от мембраны и т.д.

IV. НАРУШЕНИЯ ПЕРЕВАРИВАНИЯ И ВСАСЫВАНИЯ УГЛЕВОДОВ

В основе патологии переваривания и всасывания углеводов могут быть причины двух типов:

- дефекты ферментов, участвующих в гидролизе углеводов в кишечнике;
- нарушение всасывания продуктов переваривания углеводов в клетки слизистой оболочки кишечника.

Таблица 7-1. Распределение белков-транспортёров глюкозы (ГЛЮТ)

Типы ГЛЮТ	Локализация в органах
ГЛЮТ-1	Преимущественно в мозге, плаценте, почках, толстом кишечнике
ГЛЮТ-2	Преимущественно в печени, почках, β-клетках островков Лангерханса, энтероцитах
ГЛЮТ-3	Во многих тканях, включая мозг, плаценту, почки
ГЛЮТ-4	В мышцах (скелетной, сердечной), жировой ткани
(инсулинзависимый)	Содержится в отсутствие инсулина почти полностью в цитоплазме
ГЛЮТ-5	В тонком кишечнике. Возможно, является переносчиком фруктозы.

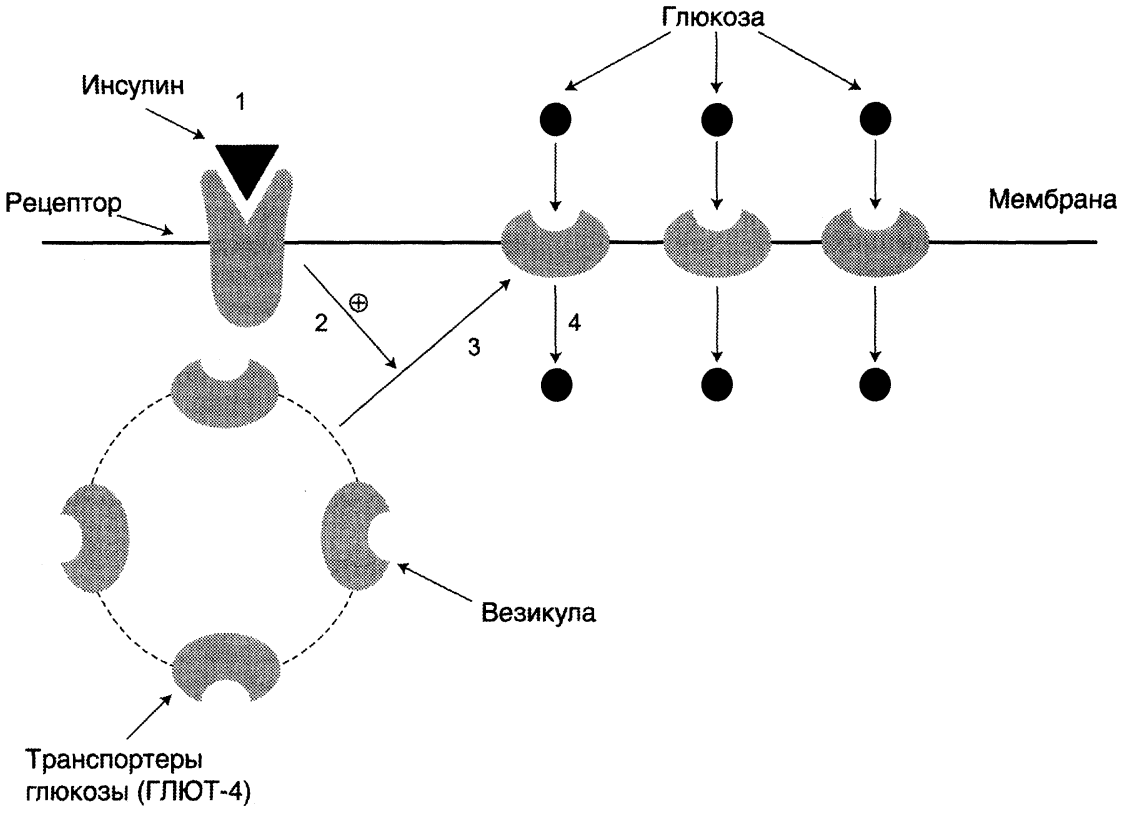


Рис. 7-19. Влияние инсулина на перемещение транспортёров глюкозы из цитоплазмы в плазматическую мембрану. 1 — связывание инсулина с рецептором; 2 — участок инсулинового рецептора, обращённый внутрь клетки, стимулирует перемещение транспортёров глюкозы. 3, 4 — транспортёры в составе содержащих их везикул перемещаются к плазматической мембране клетки, включаются в её состав и переносят глюкозу в клетку.

В обоих случаях возникает осмотическая диарея, которую вызывают нерасщеплённые дисахариды или невсосавшиеся моносахариды. Эти невостребованные углеводы поступают в дистальные отделы кишечника, изменяя осмотическое давление содержимого кишечника. Кроме того, оставшиеся в просвете кишечника углеводы частично подвергаются ферментативному расщеплению микроорганизмами с образованием органических кислот и газов. Всё вместе приводит к притоку воды в кишечник, увеличению объёма кишечного содержимого, усилению перистальтики, спазмам и болям, а также метеоризму.

Термином «мальабсорбция» называют недостаточное всасывание переваренных продуктов углеводов. Но поскольку клинические проявления при недостаточном переваривании и всасывании сходны, то термином «мальабсорбция» называют оба вида нарушений.

А. Нарушения переваривания углеводов в кишечнике

Нарушения переваривания могут быть связаны как с недостаточной активностью отдельных дисахаридаз, так и с недостаточностью всего ферментативного комплекса, например сахаразо-изомальтазного.

Известны наследственные и приобретённые формы недостаточности активности ферментов. Симптомы врождённых форм проявляются достаточно рано, например после первых кормлений грудным молоком (при дефиците лактазы), после перехода на искусственное вскармливание или при добавлении в рацион сахара и крахмала (при дефиците α-амилазы или специфических дисахаридаз). В случае недостаточного лечения врождённые формы патологии сопровождаются хроническим дисбак-

териозом и нарушениями физического развития ребёнка.

Приобретённые формы патологии могут наблюдаться при кишечных заболеваниях, например гастритах, колитах, энтеритах. Следует заметить, что в этих случаях особенно заметно снижение активности лактазы. Как уже говорилось, активность лактазы в кишечнике ниже, чем других дисахаридаз, поэтому уменьшение её активности становится заметным для организма в первую очередь.

Дефицит лактазы у взрослых людей может иметь и другую причину. Возможно снижение экспрессии гена лактазы возрастного характера. Уже упоминалось, что активность лактазы у взрослых людей в норме значительно ниже, чем у детей. Поэтому снижение активности лактазы относительно уже имеющегося низкого уровня у отдельных людей может проявляться непереносимостью молока. Носителями патологии, связанной с дефицитом лактазы, являются чаще всего лица африканского и азиатского происхождения. Средняя частота данной формы патологии в странах Европы составляет 7–12%, в Китае — 80%, в отдельных районах Африки — до 97%. Подобные наблюдения распространения лактазной недостаточности связывают с исторически сложившимся рационом питания и отсутствием молочного скотоводства в упомянутых регионах. Примеры и причины нарушения переваривания дисахаридов перечислены в табл. 7-2.

Существуют редкие формы нарушения переваривания углеводов. Например, известна наследственная недостаточность трегалазы, которая проявляется диспепсией после употребления грибов, содержащих трегалозу.

В отдельных случаях мальабсорбция может быть вызвана несколькими причинами. Например, после операции на желудке возможны ухудшение смешивания пищи с пищеварительными соками, снижение их секреции, ускорение прохождения пищи через кишечник, колонизация бактериями слепой и приводящей петель.

Б. Нарушения всасывания моносахаридов

Нарушения всасывания могут быть следствием дефекта какого-либо компонента (белка или фермента), участвующего в системе транспорта моносахаридов через мембрану. Описаны патологии, связанные с дефектом натрийзависимого белка переносчика глюкозы.

Для диагностики различных нарушений переваривания используют пробы с нагрузкой опре-

Таблица 7-2. Нарушения переваривания дисахаридов

Причина заболевания	Клинические проявления и лабораторные данные
Наследственный дефицит лактазы	Встречается относительно редко. После приёма молока наблюдаются рвота, диарея, спазмы и боли в животе, метеоризм. Симптомы развиваются сразу после рождения.
Недостаточность лактазы вследствие снижения экспрессии гена фермента в онтогенезе	Характерна для взрослых и детей старшего возраста. Является следствием возрастного снижения количества лактазы. Симптомы непереносимости молока аналогичны наследственной форме дефицита лактозы.
Недостаточность лактазы вторичного характера	Это временная, приобретённая форма. Непереносимость молока может быть следствием кишечных заболеваний, например, колитов, гастритов. Кроме того, временный дефицит лактазы может быть следствием операций на ЖКТ.
Наследственная недостаточность сахаразо-изомальтазного комплекса	Проявляется, когда в рацион детей добавляют сахарозу и крахмал. Больные дети обычно неохотно едят сладкое. После нагрузки сахарозой отмечается незначительная гипергликемия. Другие сахара (глюкоза, фруктоза, лактоза) переносятся хорошо.
Приобретённая недостаточность сахаразо-изомальтазного комплекса	Может возникать вследствие кишечных заболеваний. Проявляется диспепсией, провоцируемой крупами, крахмалом, а также пивом и другими напитками на основе солода.

делёнными углеводами. Недостаточность кишечных дисахаридаз можно диагностировать с помощью введения дисахарида и последующего определения концентрации глюкозы в крови. Для большей чувствительности этот тест проводят, вводя сначала дисахарид (50 г), а затем эквивалентное количество составляющих его моносахаридов (по 25 г каждого). После нагрузки концентрация глюкозы в крови увеличивается примерно на 50% относительно нормы. При патологии отмечают незначительную гипергликемию.

Если тест при нагрузке моносахаридом сопровождается адекватным повышением его концентрации в крови, а нагрузка дисахаридом не даёт нормальной реакции, то это, скорее всего, указывает на дефект кишечной дисахаридазы, а не системы транспорта.

О недостаточности лактазы можно судить, определяя водород в выдыхаемом воздухе (водородный тест). Водород образуется в результате действия бактериальных ферментов на лактозу.

V. МЕТАБОЛИЗМ ГЛЮКОЗЫ В КЛЕТКЕ

После всасывания в кишечнике моносахариды поступают в воротную вену и далее преимущественно в печень. Поскольку в составе основных углеводов пищи преобладает глюкоза, её можно считать основным продуктом переваривания углеводов. Другие моносахариды, поступающие из кишечника в процессе метаболизма, могут превращаться в глюкозу или продукты её метаболизма. Часть глюкозы в печени депонируется в виде гликогена, а другая часть через общий кровоток доставляется и используется разными тканями и органами. При нормальном рационе питания концентрация глюкозы в крови поддерживается на уровне 3,3–5,5 ммоль/л (60–100 мг/дл). А в период пищеварения её концентрация может повышаться примерно до 150 мг/дл (8 ммоль/л).

А. Фосфорилирование глюкозы

В дальнейших превращениях в клетках глюкоза и другие моносахариды участвуют только в виде фосфорных эфиров. Фосфорилирование свободных моносахаридов — обязательная реакция на пути их использования, она приводит к образованию более реакционно-способных соединений и поэтому может рассматриваться как реакция активации.

Глюкоза, поступающая в клетки органов и тканей, сразу же подвергается фосфорилированию с использованием АТФ. Эту реакцию во многих тканях катализирует фермент гексокиназа, а в печени и поджелудочной железе — фермент глюкокиназа. Фосфорилирование глюкозы — практически необратимая реакция, так как она протекает с использованием значительного количества энергии. Образование глюкозо-6-фосфата в клетке — своеобразная «ловушка» для глюкозы, так как мембрана клетки непроницаема для фосфорилированной глюкозы (нет соответствующих транспортных белков). Кроме того, фосфорилирование уменьшает концентрацию свободной глюкозы в цитоплазме. В результате создаются благоприятные условия для облегчённой диффузии глюкозы в клетки из крови.

Глюкокиназа. Фосфорилирование глюкозы в гепатоцитах в период пищеварения обеспечивается свойствами глюкокиназы, которая имеет высокое значение K_m — 10 ммоль/л. В этот период концентрация глюкозы в воротной вене больше, чем в других отделах кровяного русла и может превышать 10 ммоль/л, а следовательно, активность глюкокиназы в гепатоцитах повышается. Следует отметить, что активность глюкокиназы, в отличие от гексокиназы, не ингибируется продуктом катализируемой реакции — глюкозо-6-фосфатом. Это обстоятельство обеспечивает повышение концентрации глюкозы в клетке в фосфорилированной форме, соответственно её уровню в крови. Как уже упоминалось, глюкоза проникает в гепатоциты путём облегчённой диффузии при участии транспортёра ГЛЮТ-2 (независимого от инсулина). ГЛЮТ-2, так же, как глюкокиназа, имеет высокую K_m, что способствует повышению скорости поступления глюкозы в гепатоциты в период пищеварения, следовательно, ускоряет её фосфорилирование и дальнейшее использование для депонирования.

Хотя инсулин и не влияет на транспорт глюкозы, он усиливает приток глюкозы в гепатоциты в период пищеварения косвенным путём, индуцируя синтез глюкокиназы и ускоряя тем самым фосфорилирование глюкозы.

Преимущественное потребление глюкозы гепатоцитами, обусловленное свойствами глю-

кокиназы, предотвращает чрезмерное повышение её концентрации в крови в абсорбтивном периоде. Это, в свою очередь, снижает последствия протекания нежелательных реакций с участием глюкозы, например гликозилирования белков.

Гексокиназа отличается от глюкокиназы высоким сродством к глюкозе (K_m <0,1 ммоль/л). Следовательно, этот фермент, в отличие от глюкокиназы, активен при низкой концентрации глюкозы в крови, что характерно для постабсорбтивного состояния. Печень в этот период поглощает гораздо меньше глюкозы, так как скорость её внутриклеточного фосфорилирования глюкокиназой резко снижается. Тогда как потребление глюкозы мозгом, эритроцитами и другими тканями обеспечивается активной в этих условиях гексокиназой. Фермент гексокиназа может катализировать фосфорилирование не только D-глюкозы, но и других гексоз, хотя и с меньшей скоростью. Активность гексокиназы изменяется в зависимости от потребностей клетки в энергии. В качестве регуляторов выступают соотношение АТФ/АДФ и внутриклеточный уровень глюкозо-6-фосфата (продукта катализируемой реакции). При снижении расхода энергии в клетке повышается уровень АТФ (относительно АДФ) и глюкозо-6-фосфата. В этом случае активность гексокиназы снижается, и, следовательно, уменьшается скорость поступления глюкозы в клетку.

Следует отметить, что в разных тканях гексокиназа присутствует в различных изоформах, отличающихся величиной K_m. Глюкокиназа печени (и почек) является изоформой IV (гексокиназа IV). В клетках мышц содержится гексокиназа II, а в клетках опухолевых тканей преобладает гексокиназа III, с более высоким, чем у гексокиназы II, сродством к глюкозе.

Б. Дефосфорилирование глюкозо-6-фосфата

Превращение глюкозо-6-фосфата в глюкозу возможно в печени, почках и клетках эпителия кишечника. В клетках этих органов имеется фермент глюкозо-6-фосфатаза, катализирующая отщепление фосфатной группы гидролитическим путём:

Глюкозо-6-фосфат $+H_2O \rightarrow$ Глюкоза $+ H_3PO_4$

Образовавшаяся свободная глюкоза способна диффундировать из этих органов в кровь. В других органах и тканях глюкозо-6-фосфатазы нет, и поэтому дефосфорилирование глюкозо-6-фосфата невозможно. Пример подобного необратимого проникновения глюкозы в клетку — мышцы, где глюкозо-6-фосфат может использоваться только в метаболизме этой клетки.

В. Метаболизм глюкозо-6-фосфата

Глюкозо-6-фосфат может использоваться в клетке в различных превращениях, основными из которых являются: синтез гликогена, катаболизм с образованием CO_2 и H_2O или лактата, синтез пентоз. Распад глюкозы до конечных продуктов служит источником энергии для организма. Вместе с тем в процессе метаболизма глюкозо-6-фосфата образуются промежуточные продукты, используемые в дальнейшем для синтеза аминокислот, нуклеотидов, глицерина и жирных кислот. Таким образом, глюкозо-6-фосфат — не только субстрат для окисления, но и строительный материал для синтеза новых соединений (рис. 7-20).

VI. МЕТАБОЛИЗМ ГЛИКОГЕНА

Многие ткани синтезируют в качестве резервной формы глюкозы гликоген. Синтез и распад гликогена обеспечивают постоянство концентрации глюкозы в крови и создают депо для её использования тканями по мере необходимости.

А. Строение и функции гликогена

Гликоген — разветвлённый гомополимер глюкозы, в котором остатки глюкозы соединены в линейных участках α-1,4-гликозидной связью. В точках ветвления мономеры соединены α-1,6-гликозидными связями. Эти связи образуются примерно с каждым десятым остатком глюкозы. Следовательно, точки ветвления в гликогене встречаются примерно через каждые десять остатков глюкозы. Так возникает древообразная структура с молекулярной массой $>10^7$ Д, что соответствует приблизительно 50 000 остатков глюкозы (рис. 7-21). Таким образом, в молекуле гликогена имеется только одна свободная аномерная ОН-группа и, следовательно, только один восстанавливающий (редуцирующий) конец.

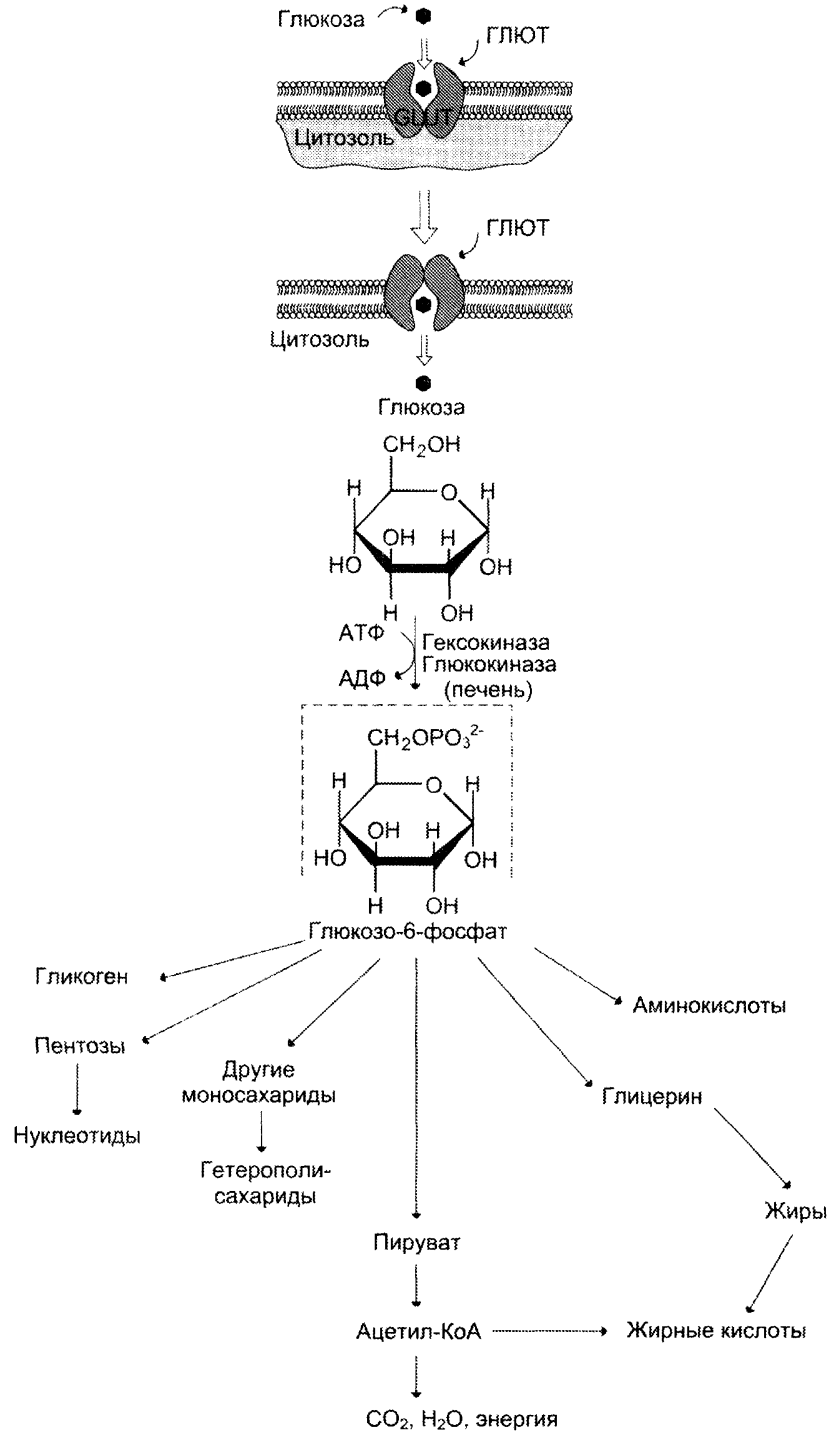


Рис. 7-20. Метаболизм глюкозо-6-фосфата.

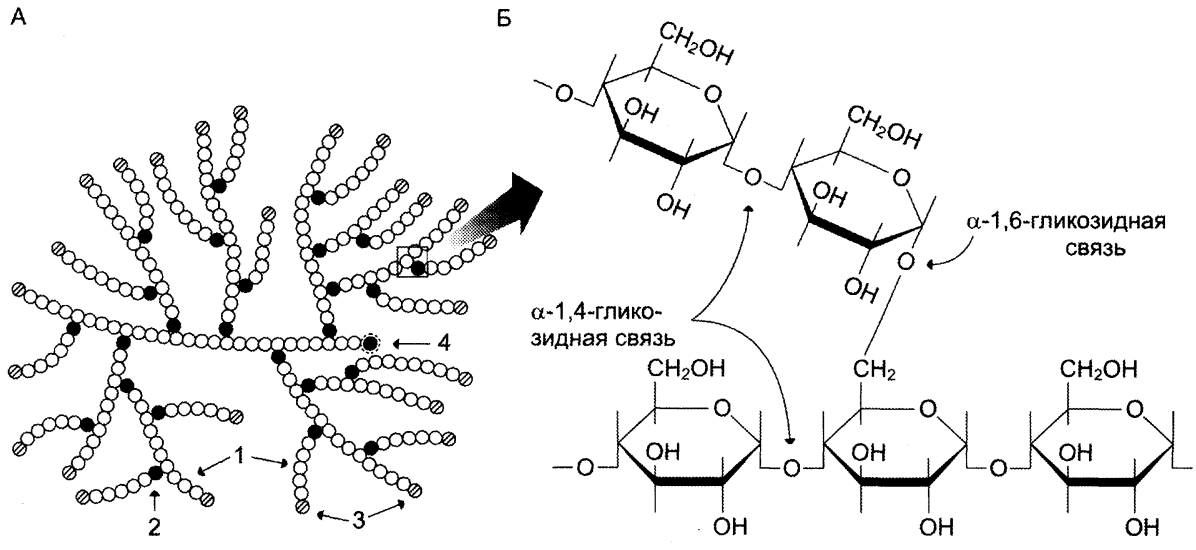


Рис. 7-21. Структура гликогена. А. Строение молекулы гликогена: 1 — остатки глюкозы, соединённые α-1,4-гликозидной связью; 2 — остатки глюкозы, соединённые α-1,6-гликозидной связью; 3 — нередуцирующие концевые мономеры; 4 — редуцирующий концевой мономер. Б. Строение отдельного фрагмента молекулы гликогена.

В клетках животных гликоген — основной резервный полисахарид. При полимеризации глюкозы снижается растворимость образующейся молекулы гликогена и, следовательно, её влияние на осмотическое давление в клетке. Это обстоятельство объясняет, почему в клетке депонируется гликоген, а не свободная глюкоза.

Гликоген хранится в цитозоле клетки в форме гранул диаметром 10—40 нм. С гранулами связаны и некоторые ферменты, участвующие в метаболизме гликогена, что облегчает их взаимодействие с субстратом. Разветвлённая структура гликогена обусловливает большое количество концевых мономеров, что способствует работе ферментов, отщепляющих или присоединяющих мономеры при распаде или синтезе гликогена, так как эти ферменты могут одновременно работать на нескольких ветвях молекулы. Гликоген депонируется главным образом в печени и скелетных мышцах.

После приёма пищи, богатой углеводами, запас гликогена в печени может составлять примерно 5% от её массы. В мышцах запасается около 1% гликогена, однако масса мышечной ткани значительно больше и поэтому общее количество гликогена в мышцах в 2 раза больше, чем в печени. Гликоген может синтезироваться во многих клетках, например в нейронах, макрофагах, клетках жировой ткани, но содержание его в этих тканях незначительно. В организме может содержаться до 450 г гликогена.

Распад гликогена печени служит в основном для поддержания уровня глюкозы в крови в постабсорбтивном периоде. Поэтому содержание гликогена в печени изменяется в зависимости от ритма питания. При длительном голодании оно снижается почти до нуля. Гликоген мышц служит резервом глюкозы — источника энергии при мышечном сокращении. Мышечный гликоген не используется для поддержания уровня глюкозы в крови. Как уже упоминалось ранее, в клетках мышц нет фермента глюкозо-6-фосфатазы, и образование свободной глюкозы невозможно. Расход гликогена в мышцах зависит в основном от физической нагрузки (рис. 7-22).

Б. Синтез гликогена (гликогеногенез)

Гликоген синтезируется в период пищеварения (через 1—2 ч после приёма углеводной пищи). Следует отметить, что синтез гликогена из глюкозы (рис. 7-23), как и любой анаболический процесс, является эндергоническим, т.е. требующим затрат энергии.

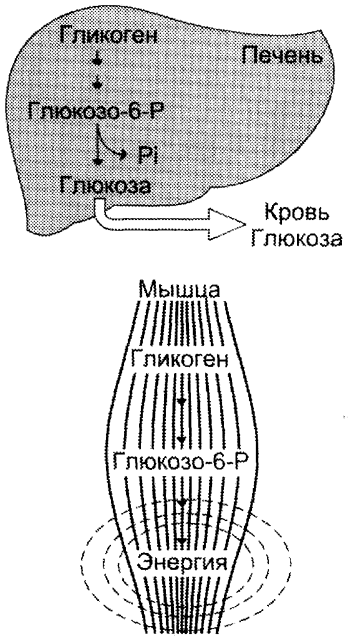


Рис. 7-22. Функции гликогена в печени и мышцах.

Глюкоза, поступающая в клетку, фосфорилируется при участии АТФ (реакция 1). Затем глюкозо-6-фосфат в ходе обратимой реакции превращается в глюкозо-1-фосфат (реакция 2) под действием фермента фосфоглюкомутазы. Глюкозо-1-фосфат по термодинамическому состоянию мог бы служить субстратом для синтеза гликогена. Но в силу обратимости реакции глюкозо-6-фосфат ↔ глюкозо-1-фосфат синтез гликогена из глюкозо-1-фосфата и его распад оказались бы также обратимыми и поэтому неконтролируемыми. Чтобы синтез гликогена был термодинамически необратимым, необходима дополнительная стадия образования уридиндифосфатглюкозы из УТФ и глюкозо-1-фосфата (реакция 3). Фермент, катализирующий эту реакцию, назван по обратной реакции: **УДФ-глюкопирофосфорилаза**. Однако в клетке обратная реакция не протекает, потому что образовавшийся в ходе прямой реакции пирофосфат очень быстро расщепляется пирофосфатазой на 2 молекулы фосфата (рис. 7-24).

Реакция образования УДФ-глюкозы обусловливает необратимость всей серии реакций, протекающих при синтезе гликогена. Этим же объясняется невозможность протекания распа-

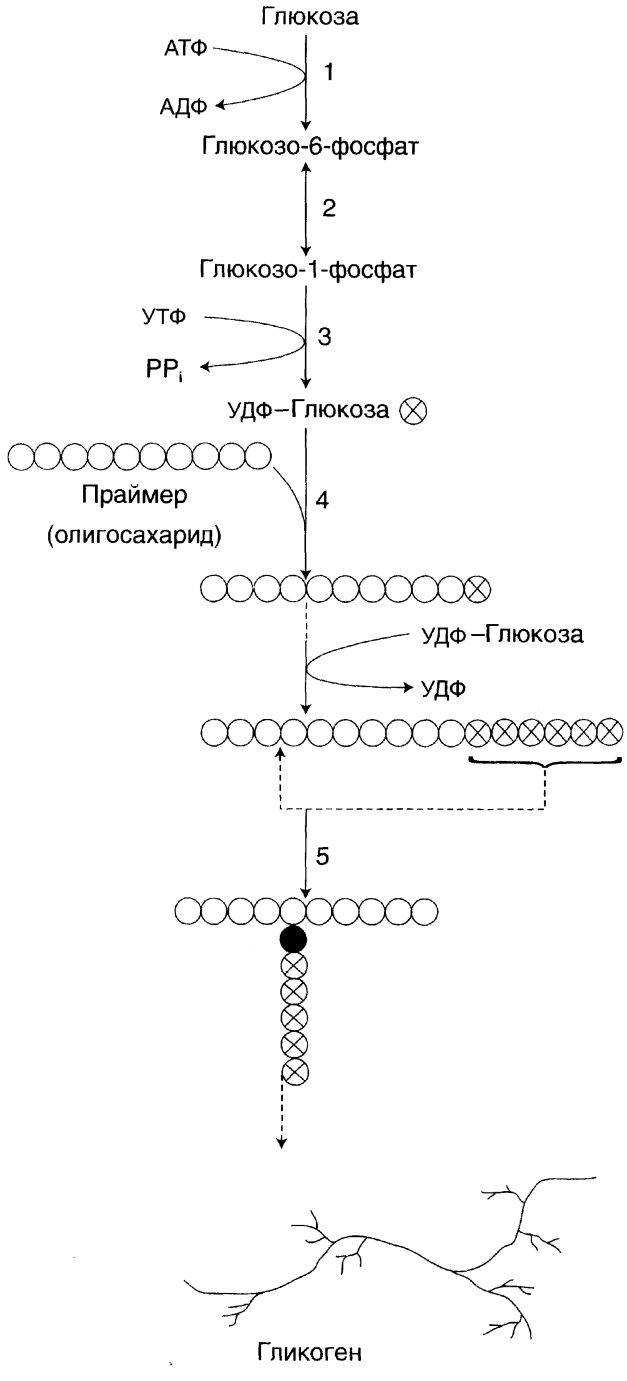


Рис. 7-23. Синтез гликогена. 1 — глюкокиназа или гексокиназа; 2 — фосфоглюкомутаза; 3 — УДФ-глюкопирофосфорилаза; 4 — гликогенсинтаза (глюкозилтрансфераза); 5 — фермент «ветвления» (амило-1,4→1,6-глюкозилтрансфераза), светлые и заштрихованные кружки — глюкозные остатки, закрашенные кружки — глюкозные остатки в точке ветвления.

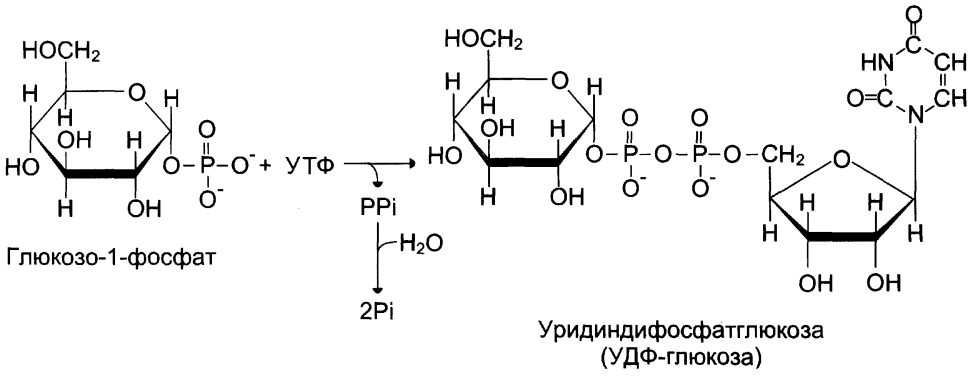


Рис. 7-24. Образование УДФ-глюкозы.

да гликогена путём простого обращения процесса его синтеза.

Образованная **УДФ-глюкоза** далее используется как донор остатка глюкозы при синтезе гликогена (рис. 7-23, реакция 4). Эту реакцию катализирует фермент **гликогенсинтаза (глюкозилтрансфераза)**. Поскольку в данной реакции не используется АТФ, фермент называют синтазой, а не синтетазой. Нуклеотидная часть УДФ-глюкозы играет существенную роль в действии гликоген синтазы, выполняя функцию «рукоятки», при помощи которой фермент располагает глюкозу в полисахаридной цепи в нужном положении. Кроме того, нуклеотидная часть УДФ-глюкозы, по-видимому, необходима для узнавания субстрата при катализе.

Так как гликоген в клетке никогда не расщепляется полностью, синтез гликогена осуществляется путём удлинения уже имеющейся молекулы полисахарида, называемой «**затравка**», или «**праймер**». К «затравке» последовательно присоединяются молекулы глюкозы. Строением молекулы «затравки» как бы предопределяется тип связи, который возникает в реакции трансгликозилирования. Таким образом, синтезируется полисахарид, аналогичный по строению с «затравочным». В состав «затравки» может входить белок гликогенин, в котором к ОН-группе одного из тирозиновых остатков присоединена олигосахаридная цепочка (примерно 8 остатков глюкозы). Глюкозные остатки переносятся гликогенсинтазой на нередуцирующий конец олигосахарида и связываются α-1,4-гликозидными связями. По окончании синтеза гликогенин остаётся включённым в гранулу гликогена.

Разветвлённая структура гликогена образуется при участии амило-1,4→1,6-глюкозилтрансферазы, называемой ферментом «ветвления» (от англ. *branching enzyme*). Как только гликогенсинтаза удлиняет линейный участок примерно до 11 глюкозных остатков, фермент ветвления переносит её концевой блок, содержащий 6—7 остатков, на внутренний остаток глюкозы этой или другой цепи. В точке ветвления концевой остаток глюкозы олигосахарида соединяется с гидроксильной группой в C_6-положении с образованием α-1,6-гликозидной связи. Новая точка ветвления может быть образована на расстоянии не менее 4 остатков от любой уже существующей. Таким образом, по мере синтеза гликогена многократно возрастает число ветвлений. Концы цепей служат точками роста молекулы при её синтезе и началом при её распаде.

В. Распад гликогена (гликогенолиз)

Распад гликогена или его мобилизация происходят в ответ на повышение потребности организма в глюкозе. Гликоген печени распадается в основном в интервалах между приёмами пищи, кроме того, этот процесс в печени и мышцах ускоряется во время физической работы.

Распад гликогена (рис. 7-25) происходит путём последовательного отщепления остатков глюкозы в виде глюкозо-1-фосфата. Гликозидная связь расщепляется с использованием неорганического фосфата, поэтому процесс называется фосфоролизом, а фермент гликоген-фосфорилазой.

Так же как и синтез, расщепление гликогена начинается с нередуцирующего конца полиса-

харидной цепи. При этом наличие разветвлённой структуры гликогена облегчает быстрое высвобождение глюкозных остатков, так как чем больше концов имеет молекула гликогена, тем больше молекул гликогенфосфорилазы могут действовать одновременно.

Гликогенфосфорилаза расщепляет только α-1,4-гликозидные связи (реакция 1). Последовательное отщепление глюкозных остатков прекращается, когда до точки ветвления остаётся 4 мономера. Подобная особенность в действии гликогенфосфорилазы обусловлена размером и строением её активного центра.

Дальнейший распад гликогена требует участия двух других ферментов. Сначала три оставшихся до точки ветвления глюкозных остатка переносятся при участии олигосахаридтрансферазы (реакция 2) на нередуцирующий конец соседней цепи, удлиняя её и таким образом создавая условия для действия фосфорилазы. Оставшийся в точке ветвления глюкозный остаток гидролитически отщепляется с помощью α-1,6-глюкозидазы в виде свободной глюкозы (реакция 3), после чего неразветвлённый участок гликогена может вновь атаковаться фосфорилазой.

Считают, что перенос трёх остатков глюкозы и удаление мономера из точки ветвления (реакции 2 и 3) катализирует один и тот же фермент, который обладает двумя разными ферментативными активностями — трансферазной и гликозидазной. Его называют «деветвящим» ферментом (от англ. *debranching enzyme*).

Продукт действия гликогенфосфорилазы — глюкозо-1-фосфат — затем изомеризуется в глюкозо-6-фосфат фосфоглюкомутазой. Далее глюкозо-6-фосфат включается в процесс катаболизма или другие метаболические пути. В печени (но не в мышцах) глюкозо-6-фосфат может гидролизоваться с образованием глюкозы, которая выделяется в кровь. Эту реакцию катализирует фермент глюкозо-6-фосфатаза. Реакция протекает в просвете ЭР, куда с помощью специального белка транспортируется глюкозо-6-фосфат. Фермент локализован на мембране ЭР таким образом, что его активный центр обращён в просвет ЭР. Продукты гидролиза (глюкоза и неорганический фосфат) возвращаются в цитоплазму также с помощью транспортных систем.

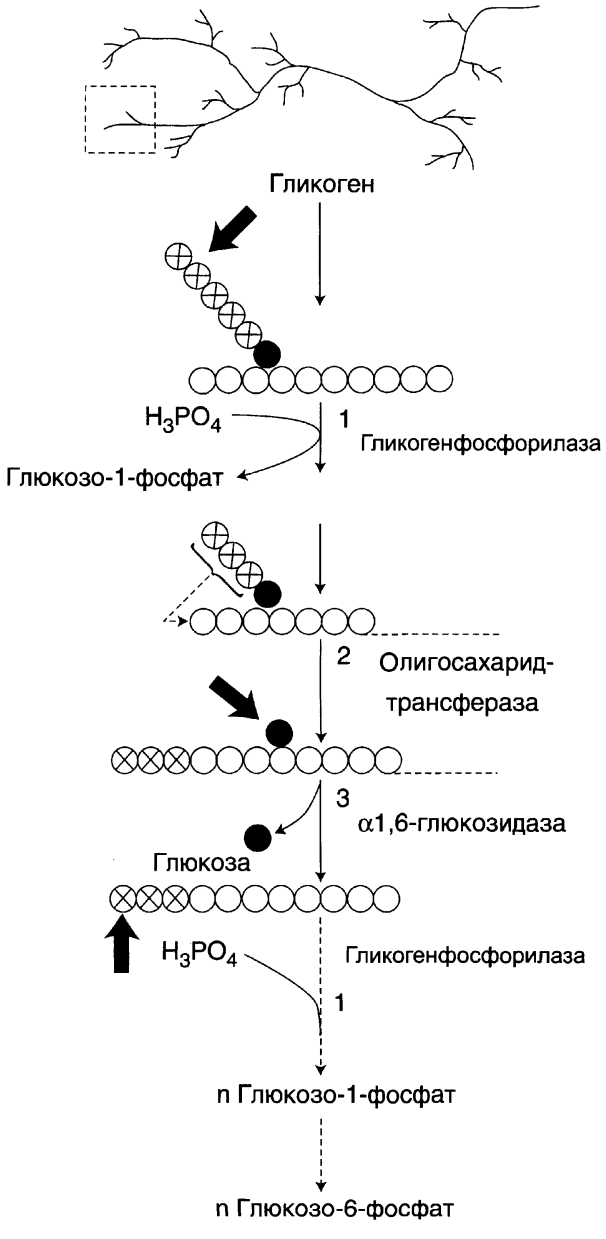


Рис. 7-25. Распад гликогена. В рамке — фрагмент гликогена с точкой ветвления. Закрашенный кружок — глюкозный остаток, связанный α-1,6-гликозидной связью; светлые и заштрихованные кружки — глюкозные остатки в линейных участках и боковых ветвях, связанные α-1,4-гликозидной связью. 1 — гликогенфосфорилаза; 2 — олигосахаридтрансфераза; 3 — α-1,6-глюкозидаза.

Г. Биологическое значение обмена гликогена в печени и мышцах

На рисунке 7-26 приведена общая схема синтеза и распада гликогена и регуляция этих процессов гормонами.

Сравнение этих процессов позволяет сделать следующие выводы:

- синтез и распад гликогена протекают по разным метаболическими путям;
- печень запасает глюкозу в виде гликогена не столько для собственных нужд, сколько для поддержания постоянной концентрации глюкозы в крови, и, следовательно, обеспечивает поступление глюкозы в другие ткани. Присутствие в печени глюкозо-6-фосфатазы обусловливает эту главную функцию печени в обмене гликогена;
- функция мышечного гликогена заключается в освобождении глюкозо-6-фосфата, потребляемого в самой мышце для окисления и использования энергии;
- синтез гликогена — процесс эндергонический. Так на включение одного остатка глюкозы в полисахаридную цепь используется 1 моль АТФ и 1 моль УТФ;
- распад гликогена до глюкозо-6-фосфата не требует энергии;
- необратимость процессов синтеза и распада гликогена обеспечивается их регуляцией.

VII. РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА ГЛИКОГЕНА

Процессы накопления глюкозы в виде гликогена и его распада должны быть согласованы с потребностями организма в глюкозе как источнике энергии. Одновременное протекание этих метаболических путей невозможно, так как в этом случае образуется «холостой» цикл, существование которого приводит только к бесполезной трате АТФ.

Изменение направления процессов в метаболизме гликогена обеспечивают регуляторные механизмы, в которых участвуют гормоны. Переключение процессов синтеза и мобилизации гликогена происходит при смене абсорбтивного периода на постабсорбтивный или состояния покоя организма на режим физической работы. В переключении этих метаболических путей в печени участвуют гормоны инсулин, глюкагон и адреналин, а в мышцах — инсулин и адреналин.

А. Характеристика гормонов, регулирующих обмен гликогена

Первичным сигналом для синтеза и секреции инсулина и глюкагона является изменение уровня глюкозы в крови. В норме концентрация глюкозы в крови соответствует 3,3—5,5 ммоль/л (60—100 мг/дл).

Инсулин — белковый гормон, синтезируется и секретируется в кровь β-клетками островков Лангерханса поджелудочной железы. β-клетки чувствительны к изменениям содержания глюкозы в крови и секретируют инсулин в ответ на повышение её содержания после приёма пищи. Транспортный белок (ГЛЮТ-2), обеспечивающий поступление глюкозы в β-клетки, отличается низким сродством к ней. Следовательно, этот белок транспортирует глюкозу в клетку поджелудочной железы лишь после того, как её содержание в крови будет выше нормального уровня (более 5,5 ммоль/л).

В β-клетках глюкоза фосфорилируется глюкокиназой, имеющей также высокую K_m для глюкозы — 12 ммоль/л. Скорость фосфорилирования глюкозы глюкокиназой в β-клетках прямо пропорциональна её концентрации в крови.

Синтез инсулина регулируется глюкозой. Глюкоза (или её метаболиты), по-видимому, непосредственно участвуют в регуляции экспрессии гена инсулина. Секреция инсулина и глюкагона также регулируется глюкозой, которая стимулирует секрецию инсулина из β-клеток и подавляет секрецию глюкагона из α-клеток. Кроме того, сам инсулин снижает секрецию глюкагона (см. раздел 11).

Глюкагон — «гормон голода», вырабатываемый α-клетками поджелудочной железы в ответ на снижение уровня глюкозы в крови. По химической природе глюкагон — пептид.

Адреналин выделяется из клеток мозгового вещества надпочечников в ответ на сигналы нервной системы, идущие из мозга при возникновении экстремальных ситуаций (например, бегство или борьба), требующих внезапной мышечной деятельности. Адреналин является сигналом «тревоги». Он должен мгновенно обеспечить мышцы и мозг источником энергии.

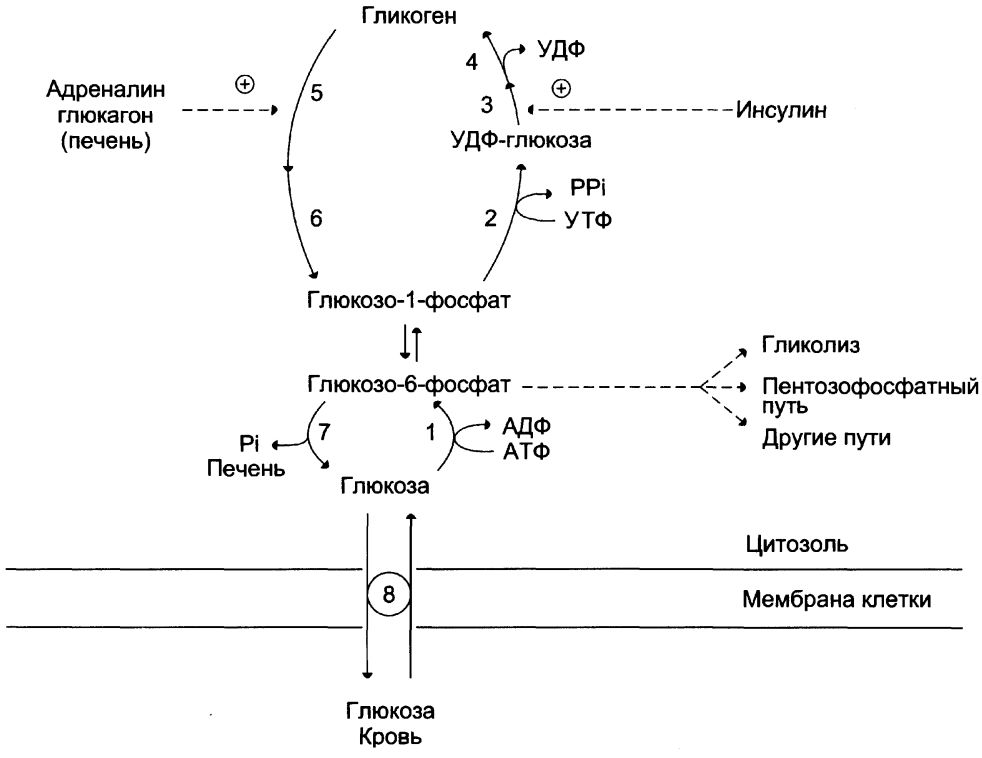


Рис. 7-26. Синтез и распад гликогена. 1 — гексокиназа или глюкокиназа (печень); 2 — УДФ-глюкопирофосфорилаза; 3 — гликогенсинтаза; 4 — амило-1,4→1,6-глюкозилтрансфераза (фермент ветвления); 5 — гликогенфосфорилаза; 6 — «деветвящий» фермент; 7 — глюкозо-6-фосфатаза (печень); 8 — транспортные системы ГЛЮТ.

Б. Регуляция активности гликогенфосфорилазы и гликогенсинтазы

Поскольку синтез и распад гликогена протекают по различным метаболическим путям, эти процессы могут контролироваться реципрокно. Влияние гормонов на синтез и распад гликогена осуществляется путём изменения в противоположных направлениях активности двух ключевых ферментов: гликогенсинтазы и гликогенфосфорилазы с помощью их фосфорилирования и дефосфорилирования (рис. 7-27).

Гликогенфосфорилаза существует в 2 формах: 1) фосфорилированная — активная (форма а); 2) дефосфорилированная — неактивная (форма в). Фосфорилирование осуществляется путём переноса фосфатного остатка с АТФ на гидроксильную группу одного из сериновых остатков фермента. Следствие этого — конформационные изменения молекулы фермента и его активация.

Взаимопревращения 2 форм гликогенфосфорилазы обеспечиваются действием ферментов киназы фосфорилазы и фосфопротеинфосфатазы (фермент, структурно связанный с молекулами гликогена). В свою очередь, активность киназы фосфорилазы и фосфопротеинфосфатазы также регулируется путём фосфорилирования и дефосфорилирования.

Активация киназы фосфорилазы происходит под действием протеинкиназы А — ПКА (цАМФ-зависимой). цАМФ сначала активирует протеинкиназу А, которая фосфорилирует киназу фосфорилазы, переводя её в активное состояние, а та, в свою очередь, фосфорилирует гликогенфосфорилазу. Синтез цАМФ стимулируется адреналином и глюкагоном (см. раздел 5).

Активация фосфопротеинфосфатазы происходит в результате реакции фосфорилирования, катализируемой специфической протеинкиназой, которая, в свою очередь, активируется инсулином посредством каскада реакций с участием Ras-

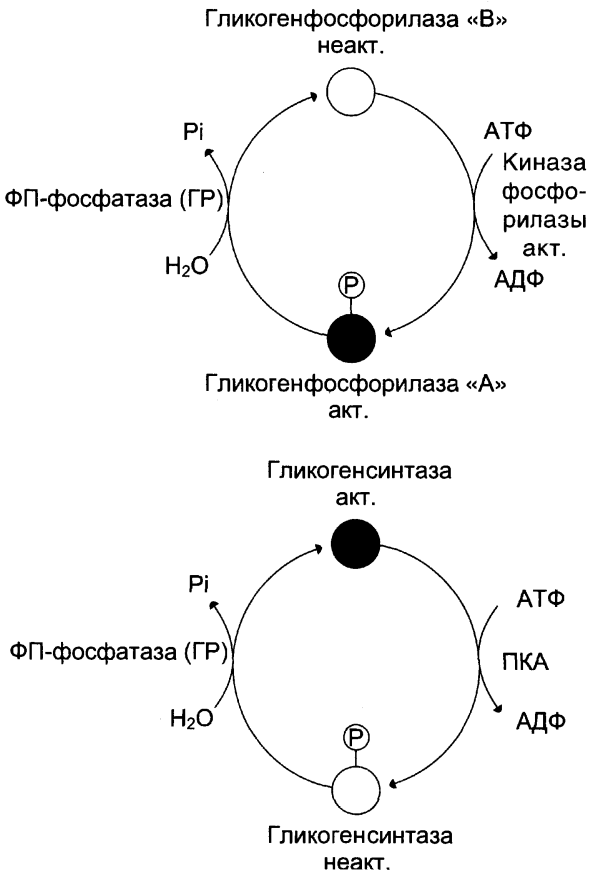


Рис. 7-27. Изменение активности гликогенфосфорилазы и гликогенсинтазы. Кружками обозначены молекулы фермента: активные — чёрные, неактивные — белые. ФП-фосфатаза (ГР) — фосфопротеинфосфатаза гранул гликогена.

белка, а также других белков и ферментов (сигнальный Ras-путь, см. раздел 11). Активируемая инсулином протеинкиназа фосфорилирует и тем самым активирует фосфопротеинфосфатазу. Активная фосфопротеинфосфатаза дефосфорилирует и, следовательно, инактивирует киназу фосфорилазы и гликогенфосфорилазу (рис. 7-28).

Активность гликогенсинтазы также изменяется в результате фосфорилирования и дефосфорилирования (см. выше рис. 7-27). Однако есть существенные различия в регуляции гликогенфосфорилазы и гликогенсинтазы:

- фосфорилирование гликогенсинтазы катализирует ПК А и вызывает её инактивацию;
- дефосфорилирование гликогенсинтазы под действием фосфопротеинфосфатазы, наоборот, её активирует.

В. Регуляция метаболизма гликогена в печени

Как уже отмечалось, первичный сигнал для синтеза инсулина и глюкагона — изменение концентрации глюкозы в крови. Инсулин и глюкагон постоянно присутствуют в крови, но при смене абсорбтивного периода на постабсорбтивный изменяется их относительная концентрация, что является главным фактором, переключающим метаболизм гликогена в печени. Отношение концентрации инсулина в крови к концентрации глюкагона называют «**инсулин-глюкагоновый индекс**». В постабсорбтивном периоде инсулин-глюкагоновый индекс снижается, и решающее значение в регуляции концентрации глюкозы в крови приобретает концентрация глюкагона.

Глюкагон для гепатоцитов служит внешним сигналом о необходимости выделения в кровь глюкозы за счёт распада гликогена (гликогенолиза) или синтеза глюкозы из других веществ — глюконеогенеза (этот процесс будет изложен позднее). Гормон связывается с рецептором на плазматической мембране и активирует при посредничестве G-белка аденилатциклазу, которая катализирует образование цАМФ из АТФ (см. раздел 5). Далее следует каскад реакций, приводящий в печени к активации гликогенфосфорилазы и ингибированию гликогенсинтазы (рис. 7-29). Этот механизм приводит к высвобождению из гликогена глюкозо-1-фосфата, который превращается в глюкозо-6-фосфат. Затем под влиянием глюкозо-6-фосфатазы образуется свободная глюкоза, способная выйти из клетки в кровь. Таким образом, глюкагон в печени, стимулируя распад гликогена, способствует поддержанию глюкозы в крови на постоянном уровне.

Адреналин стимулирует выведение глюкозы из печени в кровь, для того чтобы снабдить ткани (в основном мозг и мышцы) «топливом» в экстремальной ситуации. Эффект адреналина в печени обусловлен фосфорилированием (и активацией) гликогенфосфорилазы. Адреналин имеет сходный с глюкагоном механизм действия (рис. 7-29). Но возможно включение и другой эффекторной системы передачи сигнала в клетку печени (рис. 7-30).

Какая система передачи сигнала в клетку будет использована, зависит от типа рецепторов, с

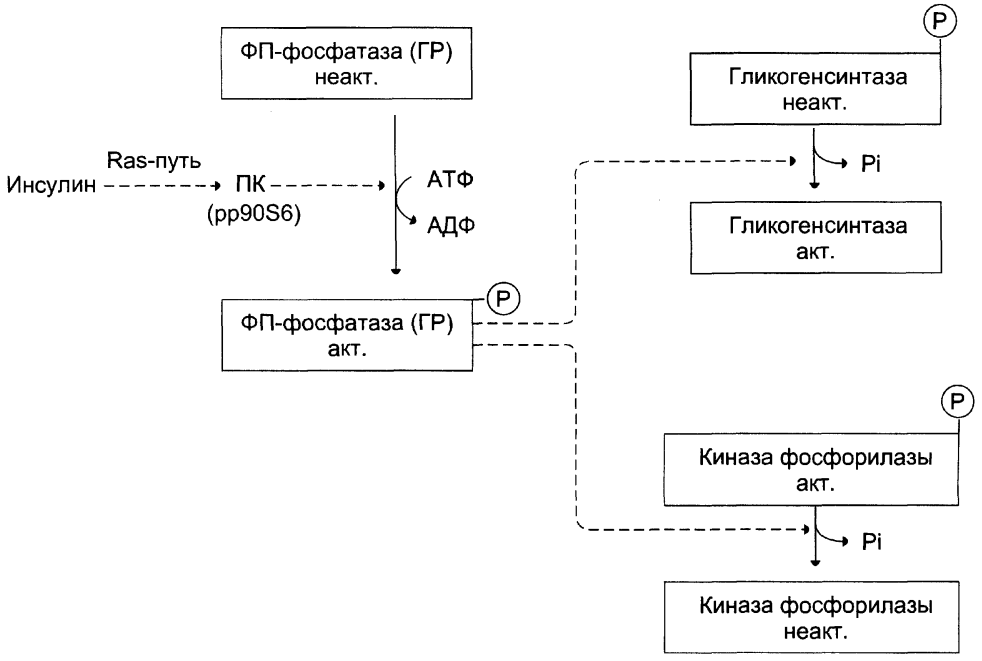


Рис. 7-28. Влияние инсулина на активность гликогенсинтазы и киназы фосфорилазы. ФП-фосфатаза (ГР) — фосфопротеинфосфатаза гранул гликогена. ПК (pp90S6) — протеинкиназа, активируемая инсулином.

которыми взаимодействует адреналин. Так, взаимодействие адреналина с β_2-рецепторами клеток печени приводит в действие аденилатциклазную систему. Взаимодействие же адреналина с α_1-рецепторами «включает» инозитолфосфатный механизм трансмембранной передачи гормонального сигнала. Результат действия обеих систем — фосфорилирование ключевых ферментов и переключение процессов с синтеза гликогена на его распад. Следует отметить, что тип рецепторов, который в наибольшей степени вовлекается в ответ клетки на адреналин, зависит от концентрации его в крови.

В период пищеварения преобладает влияние инсулина, так как инсулин-глюкагоновый индекс в этом случае повышается. В целом инсулин влияет на обмен гликогена противоположно глюкагону. Инсулин снижает концентрацию глюкозы в крови в период пищеварения, действуя на метаболизм печени следующим образом:

- снижает уровень цАМФ в клетках, фосфорилируя (опосредованно через Ras-путь) и тем самым активируя протеинкиназу B (цАМФ-независимую). Протеинкиназа B, в свою очередь, фосфорилирует и активирует фосфодиэстеразу цАМФ — фермент, гидролизующий цАМФ с образованием АМФ. Механизм влияния инсулина на уровень цАМФ в клетке подробнее будет изложен в разделе 11;
- активирует (через Ras-путь) фосфопротеинфосфатазу гранул гликогена, которая дефосфорилирует гликогенсинтазу и таким образом её активирует. Кроме того, фосфопротеинфосфатаза дефосфорилирует и, следовательно, инактивирует киназу фосфорилазы и гликогенфосфорилазу;
- индуцирует синтез глюкокиназы, тем самым ускоряя фосфорилирование глюкозы в клетке. Следует напомнить, что регуляторным фактором в метаболизме гликогена является также величина K_m глюкокиназы, которая много выше, чем K_m гексокиназы. Смысл этих различий понятен: печень не должна потреблять глюкозу для синтеза гликогена, если её количество в крови в пределах нормы.

Всё это вместе приводит к тому, что инсулин одновременно активирует гликогенсинтазу и ингибирует гликогенфосфорилазу, переключая процесс мобилизации гликогена на его синтез.

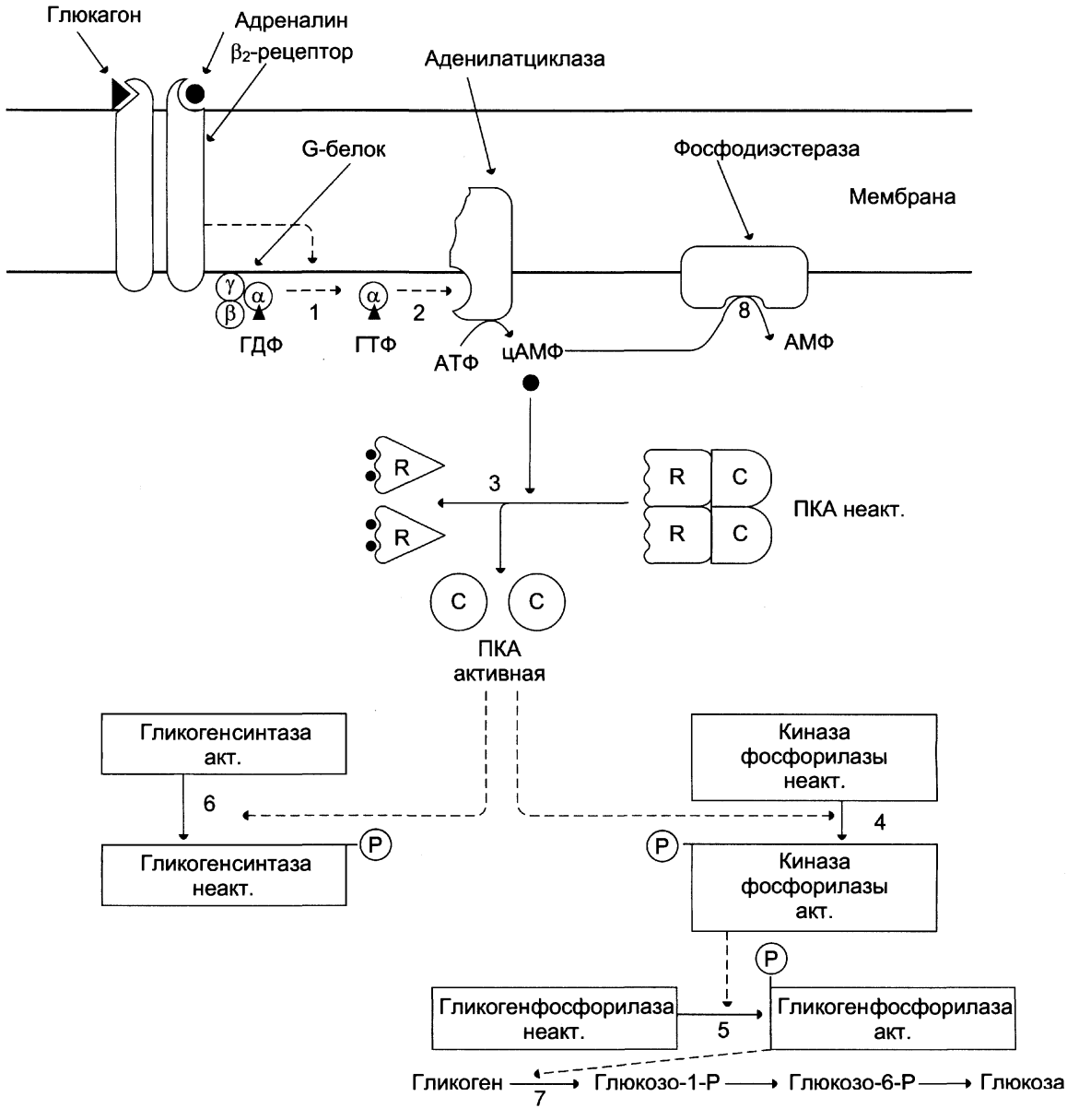


Рис. 7-29. Регуляция синтеза и распада гликогена в печени глюкагоном и адреналином. 1 — глюкагон и адреналин взаимодействуют со специфическими мембранными рецепторами. Комплекс гормон-рецептор влияет на конформацию G-белка, вызывая диссоциацию его на протомеры и замену в α-субъединице ГДФ на ГТФ; 2 — α-субъединица, связанная с ГТФ, активирует аденилатциклазу, катализирующую синтез цАМФ из АТФ; 3 — в присутствии цАМФ протеинкиназа А (цАМФ-зависимая) обратимо диссоциирует, освобождая обладающие каталитической активностью субъединицы С; 4 — протеинкиназа А фосфорилирует и активирует киназу фосфорилазы; 5 — киназа фосфорилазы фосфорилирует гликогенфосфорилазу, переводя её в активную форму; 6 — протеинкиназа А фосфорилирует также гликогенсинтазу, переводя её в неактивное состояние; 7 — в результате ингибирования гликогенсинтазы и активации гликогенфосфорилазы гликоген включается в процесс распада; 8 — фосфодиэстераза катализирует распад цАМФ и тем самым прерывает действие гормонального сигнала. Комплекс α-субъединица-ГТФ затем распадается, α-, β- и γ-субъединицы G-белка реассоциируются.

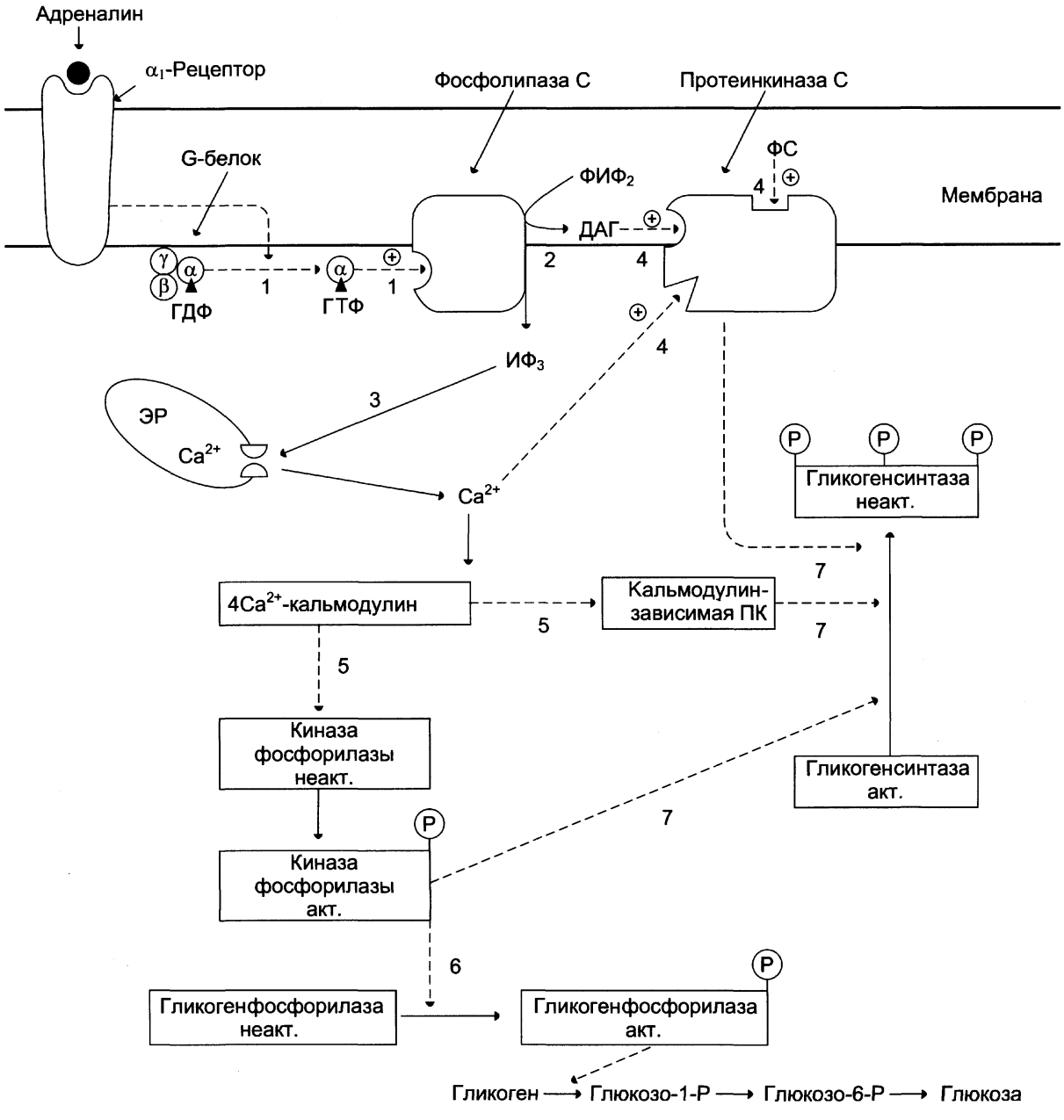


Рис. 7-30. Регуляция синтеза и распада гликогена в печени адреналином и Ca^{2+}. $ФИФ_2$ — фосфатидилинозитолбисфосфат; $ИФ_3$ — инозитол-1,4,5-трифосфат; ДАГ — диацилглицерол; ЭР — эндоплазматический ретикулум; ФС — фосфодитилсерин. 1 — взаимодействие адреналина с α_1-рецептором трансформирует сигнал через активацию G-белка на фосфолипазу С, переводя её в активное состояние; 2 — фосфолипаза С гидролизует $ФИФ_2$ на $ИФ_3$ и ДАГ; 3 — $ИФ_3$ активирует мобилизацию Ca^{2+} из ЭР; 4 — Ca^{2+}, ДАГ и фосфодитилсерин активируют протеинкиназу С. Протеинкиназа С фосфорилирует гликогенсинтазу, переводя её в неактивное состояние; 5 — комплекс $4Ca^{2+}$-кальмодулин активирует киназу фосфорилазы и кальмодулинзависимые протеинкиназы; 6 — киназа фосфорилазы фосфорилирует гликогенфосфорилазу и тем самым её активирует; 7 — активные формы трёх ферментов (кальмодулинзависимая протеинкиназа, киназа фосфорилазы и протеинкиназа С) фосфорилируют гликогенсинтазу в различных центрах, переводя её в неактивное состояние.

В печени существует и аллостерическая регуляция гликогенфосфорилазы, обеспечивающая внутриклеточные потребности в глюкозе, но гормональные сигналы имеют приоритет над внутриклеточными и преследуют другие физиологические цели. Ранее (см. раздел 6) рассматривалось значение изменения в клетке уровней АТФ, АДФ и АМФ как показателя, отражающего потребности клетки в энергии. Замедление утилизации АТФ сопровождается снижением активности гликогенфосфорилазы и уменьшением скорости распада гликогена. Напротив, увеличение расходования АТФ ведёт к повышению уровня АМФ, активации гликогенфосфорилазы и ускорению распада гликогена. АТФ и АМФ являются аллостерическими эффекторами по отношению к гликогенфосфорилазе. Существует также и метаболический контроль активности гликогенфосфорилазы. Так, при повышении концентрации глюкозо-6-фосфата активность этого фермента в клетках печени снижается.

Г. Регуляция метаболизма гликогена в мышцах

Регуляция обмена гликогена в мышцах обеспечивает энергетическим материалом как интенсивную работу мышц (бег или борьба), так и энергозатраты в состоянии покоя.

В экстремальных ситуациях в мышечных клетках мобилизация гликогена ускоряется адреналином. Связывание адреналина с β-рецепторами, ассоциированными с аденилатциклазной системой, приводит к образованию цАМФ в клетке, а затем фосфорилированию и активации киназы фосфорилазы и гликогенфосфорилазы (рис. 7-31).

Образование цАМФ, стимулированное адреналином, служит сигналом к увеличению производства энергии в результате ускорения расщепления гликогена. Именно в ходе распада, образованного из гликогена глюкозо-6-фосфата, синтезируется АТФ.

Инактивация гликогенсинтазы под влиянием адреналина в мышечных клетках проходит так же, как и в печени.

В состоянии покоя при низких концентрациях адреналина в крови гликогенфосфорилаза мышц находится в дефосфорилированном — неактивном состоянии (форма В), но распад гликогена всё-таки происходит. Это объясняется тем, что гликогенфосфорилаза активируется способом, не связанным с её фосфорилированием, так как уровень цАМФ в клетке низкий. В данной ситуации происходит аллостерическая активация гликогенфосфорилазы В. Активаторами фермента служат АМФ и H_3PO_4, образующиеся в клетке при распаде АТФ (рис. 7-31, путь 1).

При умеренных мышечных сокращениях, т.е. в ситуации, не требующей участия в регуляции цАМФ, аллостерическим способом активируется киназа фосфорилазы (рис. 7-31, путь 2). В данном случае аллостерическими эффекторами служат ионы Ca^{2+}, концентрация которых резко возрастает при сокращении мышц в ответ на сигнал от двигательного нерва. Активность фермента снижается сразу же, как только концентрация Ca^{2+} в клетке уменьшается после поступления сигнала к расслаблению мышц. Таким образом, роль ионов Ca^{2+} заключается не только в инициации мышечного сокращения, но также в обеспечении его энергозатрат.

Активация киназы фосфорилазы с помощью ионов Ca^{2+} опосредована кальмодулином. Кальмодулин в данном случае — прочно связанная субъединица фермента (рис. 7-32). Мышечная киназа фосфорилазы состоит из субъединиц 4 типов: α, β, γ и δ, объединённых в комплекс. Фермент включает 4 таких комплекса. Каталитической активностью обладает γ-субъединица. Субъединицы α и β выполняют регуляторную функцию. Они содержат остатки серина, фосфорилируемые ПК А. δ-Субъединица связывает 4 иона кальция; она идентична белку кальмодулину. Связывание ионов кальция вызывает конформационные изменения, что приводит к активации каталитического центра γ-субъединицы, хотя молекула остаётся в дефосфорилированном состоянии.

В мышцах в период пищеварения, если он совпадает с состоянием покоя, происходит стимуляция синтеза гликогена. Мышечная работа во время пищеварения замедляет процесс синтеза гликогена, так как при этом мышцы используют для окисления глюкозу крови, поступающую из кишечника.

В переключении мобилизации гликогена на запасание глюкозы участвует инсулин. Как уже говорилось, глюкоза поступает в мышечные и жировые клетки с помощью глюкозо-транспортёров ГЛЮТ-4. Транспортёры в отсутствие инсулина находятся в цитоплазме клеток, и глюкоза клетками не используется, так как в мемб-

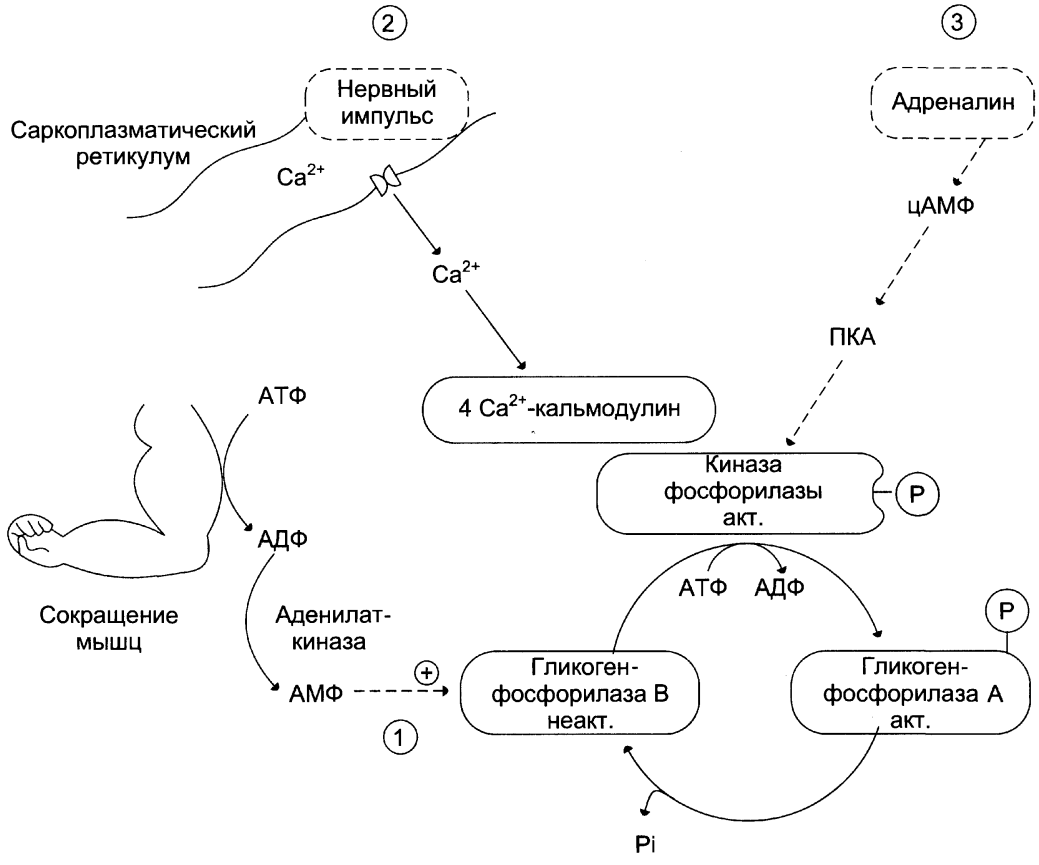


Рис. 7-31. Активация гликогенфосфорилазы мышц. 1 — аллостерическая активация гликогенфосфорилазы В. В процессе мышечного сокращения происходит разрушение АТФ с образованием АМФ, который является аллостерическим активатором гликогенфосфорилазы В; 2 — нервный импульс инициирует освобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. Ca^{2+} образует комплекс с кальмодулином, способный активировать киназу фосфорилазы; 3 — активация гликогенфосфорилазы адреналином через аденилатциклазную систему.

ране нет белков-переносчиков. Инсулин стимулирует перемещение ГЛЮТ-4 и встраивание их в мембрану клеток. Механизм подобного влияния инсулина изучен недостаточно, но определены его основные этапы. Цепь событий при стимуляции инсулином потребления глюкозы мышцами и жировыми клетками выглядит следующим образом:

- рецептор инсулина (IR) — инсулинстимулируемая тирозиновая протеинкиназа — обязательный посредник всех действий инсулина (см. раздел 5);
- активированный инсулином IR фосфорилирует специфические цитоплазматические белки — субстраты инсулина (IRS);
- фосфорилированный субстрат (в основном IRS-1) соединяется с фосфатидилинозитол-3-киназой (ФИ-3-киназа) и активирует этот фермент;
- активная ФИ-3-киназа катализирует фосфорилирование по позиции 3 ряд компонентов инозитолфосфатной сигнальной системы, приводящей к стимуляции транслокации ГЛЮТ из цитозоля в плазматическую мембрану;
- глюкоза с помощью ГЛЮТ-4 поступает в мышечные клетки и включается в синтез гликогена.

Влияние инсулина на скорость синтеза гликогена в мышцах осуществляется посредством изменения активности гликогенсинтазы и гликогенфосфорилазы — ключевых ферментов, о чём уже говорилось при обсуждении влияния инсулина на метаболизм гликогена в печени.

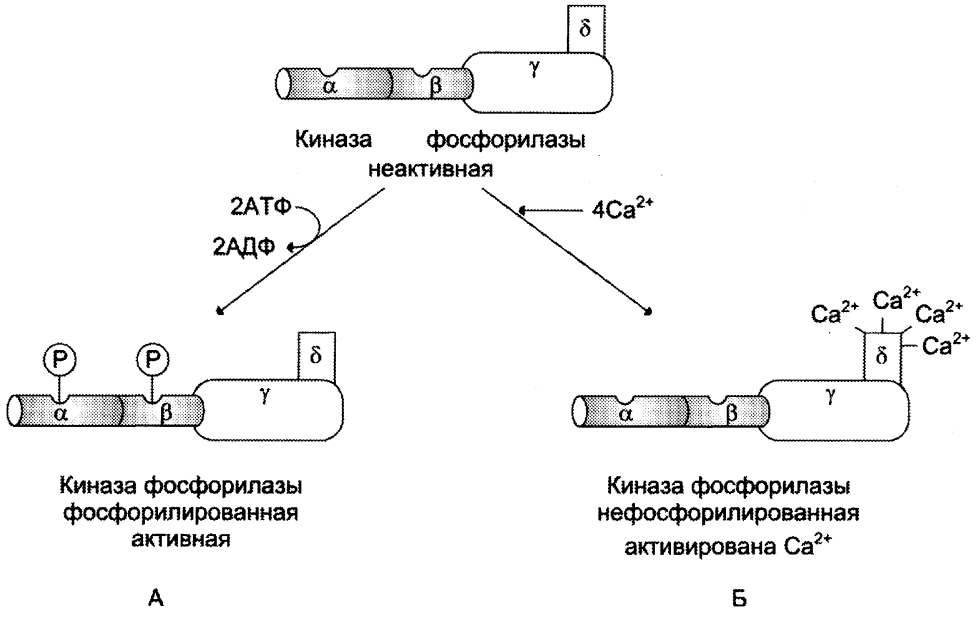


Рис. 7-32. Регуляция активности киназы фосфорилазы. Фермент состоит из 4 идентичных белковых комплексов. Каждый комплекс содержит 4 разных субъединицы α, β, γ, δ. На рисунке показан один из тетрамеров. Каталитической активностью обладает γ-субъединица. α– и β– протомеры выполняют регуляторную функцию, они фосфорилируются при участии ПК А. Кальмодулин — δ-субъединица, прочно связанная с ферментом. А — активация киназы фосфорилазы в результате фосфорилирования; Б — активация киназы фосфорилазы после присоединения Ca^{2+} к кальмодулину.

Д. Нарушения обмена гликогена

Гликогеновые болезни — группа наследственных нарушений, в основе которых лежит снижение или отсутствие активности ферментов, катализирующих реакции синтеза или распада гликогена, либо нарушение регуляции этих ферментов.

1. Гликогенозы — заболевания, обусловленные дефектом ферментов, участвующих в распаде гликогена. Они проявляются или необычной структурой гликогена, или его избыточным накоплением в печени, сердечной или скелетных мышцах, почках, лёгких и других органах. В таблице 7-3 описаны некоторые типы гликогенозов, различающихся характером и локализацией ферментного дефекта.

Следует отметить, что термин «гликогеноз» был впервые предложен К.Ф. Кори и Г.Т. Кори. Они же предложили систему нумерации этих болезней. Однако в настоящее время преобладает деление гликогенозов на 2 группы: печёночные и мышечные.

Печёночные формы гликогенозов ведут к нарушению использования гликогена для поддержания уровня глюкозы в крови. Поэтому общий симптом для этих форм — гипогликемия в постабсорбтивный период.

Болезнь Гирке (тип I) отмечают наиболее часто. Описание основных симптомов этого типа гликогеноза и их причин может служить основанием для понимания симптомов всех остальных типов. Причина этого заболевания — наследственный дефект глюкозо-6-фосфатазы — фермента, обеспечивающего выход глюкозы в кровоток после её высвобождения из гликогена клеток печени. Болезнь Гирке проявляется гипогликемией, гипертриацилглицеролемией (повышением содержания триацилглицеролов), гиперурикемией (повышением содержания мочевой кислоты).

Гипогликемия — следствие нарушения реакции образования свободной глюкозы из глюкозо-6-фосфата. Кроме того, вследствие дефекта глюкозо-6-фосфатазы происходит

Таблица 7-3. Характеристика некоторых гликогеновых болезней

Гликогенозы			
форма гликогеноза	**дефектный фермент**	**проявления болезни**	**тип, название болезни**
Печёночная	Глюкозо-6-фосфатаза	Гипогликемия, гиперацилглицеролемия, гиперурикемия, ацидоз (вследствие накопления лактата), характерное выражение лица («лицо китайской куклы»).	I Болезнь Гирке
	Амило-1,6-глюкозидаза («деветвящий» фермент)	Накопление гликогена с короткими внешними ветвями (лимитодекстрин). Остальные проявления менее выражены, чем при типе I.	III Болезнь Форбса–Кори, лимитодекстриноз
	Амило-1,4→1,6 глюкозилтрансфераза («ветвящий» фермент)	Накопление структурно изменённого гликогена с очень длинными наружными ветвями и редкими точками ветвления.	IV Болезнь Андерсена
	Фосфорилаза	Накопление гликогена нормальной структуры. Умеренная гипогликемия, гепатомегалия, клинические проявления похожи, но менее выражены, чем при гликогенозах I и III типов.	VI Болезнь Херса
	Киназа фосфорилазы	Аналогичны VI типу	IX
	Протеинкиназа А	Аналогичны VI типу	X
Мышечные	Гликогенфосфорилаза	Боли в мышцах, судороги при физической нагрузке (даже умеренной). Накопление в мышцах гликогена нормальной структуры.	V Болезнь МакАрдла
	Фосфофруктокиназа	Аналогичны V типу	VII
	Фосфоглицеромутаза	Аналогичны V типу	
	Лактатдегидрогеназа (М-протомер)	Аналогичны V типу	
Смешанные	Лизосомная α-1,4-гликозидаза	Генерализованное накопление гликогена в лизосомах, а затем в цитозоле	II Болезнь Помпе

накопление в клетках печени субстрата — глюкозо-6-фосфата, который вовлекается в процесс катаболизма, где он превращается в пируват и лактат. В крови повышается количество лактата, поэтому возможен ацидоз. В тяжёлых случаях результатом гипогликемии могут быть судороги. Гипогликемия сопровождается уменьшением содержания инсулина и снижением отношения инсулин/глюкагон, что, в свою очередь, ведёт к ускорению липолиза жировой ткани в результате действия глюкагона и выходу в кровь жирных кислот (см. раздел 8).

Гипертриацилглицеролемия возникает в результате снижения активности ЛП-липазы жировой ткани — фермента, активируемого инсулином и обеспечивающего усвоение ТАГ клетками жировой ткани (см. раздел 8).

Гиперурикемия возникает в результате следующих событий:

- увеличиваются содержание в клетках глюкозо-6-фосфата и его использование в пентозофосфатном пути с образованием рибозо-5-фосфата — субстрата для синтеза пуриновых нуклеотидов;
- увеличивается образование мочевой кислоты вследствие избыточного синтеза, а следовательно, и катаболизма пуриновых нуклеотидов, конечным продуктом которого является мочевая кислота.
- снижается выведение мочевой кислоты вследствие увеличения продукции лактата и изменения pH мочи в кислую сторону, что затрудняет выведение уратов — труднорастворимых солей мочевой кислоты.

При диагностике данной патологии определяют активность глюкозо-6-фосфатазы в биоптатах печени. Кроме того, используют тест со стимуляцией глюкагоном или адреналином, который в случае болезни даёт отрицательный результат, т.е. после инъекции гормона уровень глюкозы в крови изменяется незначительно.

Лечение состоит в ограничении употребления продуктов, содержащих глюкозу. Рекомендуется исключить из диеты продукты, содержащие сахарозу и лактозу, так как образующиеся из них галактоза и фруктоза после превращения в глюкозо-6-фосфат ведут к дальнейшему накоплению гликогена. Для предотвращения гипогликемии используют метод частого кормления. Этим можно предупредить симптомы гипогликемии.

Гликогеноз I типа наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Уже в раннем периоде наиболее заметный признак — гепатомегалия. У больных детей короткое туловище, большой живот, увеличены почки. Больные дети отстают в физическом развитии.

Описанное заболевание иногда обозначают как гликогеноз типа Ia, так как существует его разновидность — тип Ib. Гликогеноз Ib представляет собой редко встречающуюся патологию, которая характеризуется тем, что дефектен фермент транслоказа глюкозо-6-фосфата, обеспечивающий транспорт фосфорилированной глюкозы в ЭР. Поэтому, несмотря на достаточную активность глюкозо-6-фосфатазы, отщепление неорганического фосфата и выход глюкозы в кровь нарушен. Клиническая картина гликогеноза типа Ib такая же, как при гликогенозе Ia.

Болезнь Кори (тип III) весьма распространена. Она составляет 1/4 всех случаев печёночных гликогенозов. Накапливаемый гликоген аномален по структуре, так как дефектен фермент амило-1,6-глюкозидаза, гидролизующий гликозидные связи в местах разветвлений («деветвящий фермент», от англ. *debranching enzyme*). Недостаток глюкозы в крови проявляется быстро, поскольку гликогенолиз возможен, но в незначительном объёме. В отличие от гликогеноза I типа, лактоацидоз и гиперурикемия не отмечаются. Болезнь отличается более лёгким течением.

Болезнь Андерсен (тип IV) — крайне редкое аутосомно-рецессивное заболевание, возникающее вследствие дефекта ветвящего фермента — амило-1,4-1,6-глюкозилтрансферазы. Содержание гликогена в печени не сильно увеличено, но структура его изменена, и это препятствует его распаду. Молекула гликогена имеет мало точек ветвления, а также очень длинные и редкие боковые ветви. В то же время гипогликемия выражена умеренно. Болезнь развивается быстро, отягощается ранним циррозом печени и практически не поддаётся лечению. Дефект фермента ветвления обнаруживается не только в печени, но также в лейкоцитах, мышцах, фибробластах, но ранние и преобладающие проявления болезни обусловлены нарушением функции печени.

Болезнь Херса (тип VI) также проявляется симптомами, обусловленными поражением печени. Данный гликогеноз — следствие дефекта гликогенфосфорилазы. В гепатоцитах накапливается гликоген нормальной структуры. Течение болезни сходно с гликогенозом I типа, но симптомы выражены в меньшей степени. Сниженная активность гликогенфосфорилазы обнаруживается также в лейкоцитах. Болезнь Херса — редкий тип гликогеноза; наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

Дефект киназы фосфорилазы (тип IX) встречается только у мальчиков, так как этот признак сцеплен с Х-хромосомой.

Дефект протеинкиназы А (тип X), так же как и дефект киназы фосфорилазы, проявляется симптомами, сходными с болезнью Херса.

Мышечные формы гликогенозов характеризуются нарушением в энергоснабжении скелетных мышц. Эти болезни проявляются при физических нагрузках и сопровождаются болями и судорогами в мышцах, слабостью и быстрой утомляемостью.

Болезнь МакАрдла (тип V) — аутосомно-рецессивная патология, при которой полностью отсутствует в скелетных мышцах активность гликогенфосфорилазы. Поскольку активность этого фермента в гепатоцитах нормальная, то гипогликемия не наблюдается (строение фермента в печени и мышцах кодируются разными генами). Тяжёлые физические нагрузки плохо переносятся и могут сопровождаться судорогами, однако при физических нагрузках гиперпродукция лактата не наблюдается, что подчёркивает значение внемышечных источников энергии для сокращения мышц, например, таких как жирные кислоты, замещающие при данной патологии глюкозу (см. раздел 8). Хотя болезнь не сцеплена с полом, большая частота заболевания характерна для мужчин.

Дефект фосфофруктокиназы характерен для гликогеноза VII типа. Больные могут выполнять умеренные физические нагрузки. Течение болезни сходно с гликогенозом V типа, но основные проявления менее выражены.

Дефект фосфоглицеромутазы и дефект М-субъединицы ЛДГ (ненумерованные по классификации Кори, см. табл. 7-3) характерны для мышечных форм гликогенозов. Проявления этих патологий аналогичны болезни МакАрдла. Дефект фосфоглицеромутазы в мышцах описан только у одного больного.

2. Агликогенозы

Агликогеноз (гликогеноз 0 по классификации) — заболевание, возникающее в результате дефекта гликогенсинтазы. В печени и других тканях больных наблюдают очень низкое содержание гликогена. Это проявляется резко выраженной гипогликемией в постабсорбтивном периоде. Характерный симптом — судороги, проявляющиеся особенно по утрам. Болезнь совместима с жизнью, но больные дети нуждаются в частом кормлении.

VIII. КАТАБОЛИЗМ ГЛЮКОЗЫ

Катаболизм глюкозы — основной поставщик энергии для процессов жизнедеятельности организма.

А. Основные пути катаболизма глюкозы

Окисление глюкозы до CO_2 и H_2O (аэробный распад). Аэробный распад глюкозы можно выразить суммарным уравнением:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + H_2O + 2820\ \text{кДж/моль}.$$

Этот процесс включает несколько стадий (рис. 7-33).

- Аэробный гликолиз — процесс окисления глюкозы с образованием двух молекул пирувата;
- Общий путь катаболизма, включающий превращение пирувата в ацетил-КоА и его дальнейшее окисление в цитратном цикле;
- ЦПЭ на кислород, сопряжённая с реакциями дегидрирования, происходящими в процессе распада глюкозы.

Анаэробный распад

В определённых ситуациях обеспечение кислородом тканей может не соответствовать их потребностям. Например, на начальных стадиях интенсивной мышечной работы при стрессе сердечные сокращения могут не достигать нужной частоты, а потребности мышц в кислороде для аэробного распада глюкозы велики. В подобных случаях включается процесс, который протекает без кислорода и заканчивается образованием лактата из пировиноградной кислоты. Этот про-

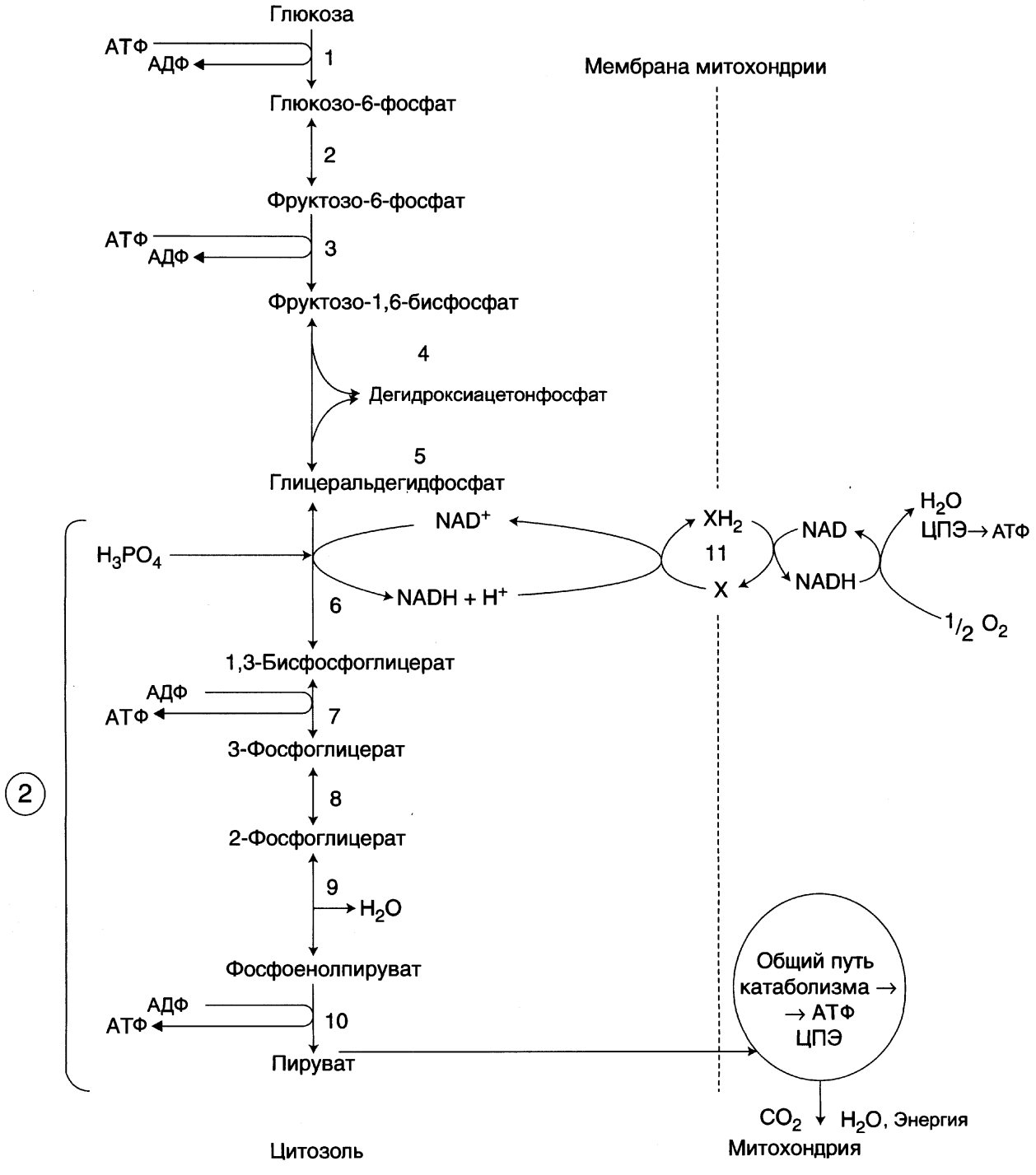


Рис. 7-33. Аэробный распад глюкозы. 1–10 — реакции аэробного гликолиза; 11 — малат-аспартатный челночный механизм транспорта водорода в митохондрии; 2 (в кружке) — стехиометрический коэффициент.

цесс называют анаэробным распадом, или анаэробным гликолизом. Анаэробный распад глюкозы энергетически малоэффективен, но именно этот процесс может стать единственным источником энергии для мышечной клетки в описанной ситуации. В дальнейшем, когда снабжение мышц кислородом будет достаточным в результате перехода сердца на ускоренный ритм, анаэробный распад переключается на аэробный. Пути катаболизма глюкозы и их энергетический эффект показаны на рис. 7-34.

Б. Аэробный гликолиз

Аэробным гликолизом называют процесс окисления глюкозы до пировиноградной кислоты, протекающий в присутствии кислорода. Все ферменты, катализирующие реакции этого процесса, локализованы в цитозоле клетки.

1. Этапы аэробного гликолиза

В аэробном гликолизе можно выделить 2 этапа.

1. Подготовительный этап, в ходе которого глюкоза фосфорилируется и расщепляется на две молекулы фосфотриоз. Эта серия реакций протекает с использованием 2 молекул АТФ.
2. Этап, сопряжённый с синтезом АТФ. В результате этой серии реакций фосфотриозы превращаются в пируват. Энергия, высвобождающаяся на этом этапе, используется для синтеза 10 моль АТФ.

2. Реакции аэробного гликолиза

Превращение глюкозо-6-фосфата в 2 молекулы глицеральдегид-3-фосфата

Глюкозо-6-фосфат, образованный в результате фосфорилирования глюкозы с участием АТФ, в ходе следующей реакции превращается в фруктозо-6-фосфат. Эта обратимая реакция изомеризации протекает под действием фермента глюкозофосфатизомеразы.

Затем следует ещё одна реакция фосфорилирования с использованием фосфатного остатка и энергии АТФ. В ходе этой реакции, катализируемой фосфофруктокиназой, фруктозо-6-фосфат превращается в фруктозо-1,6-бисфосфат. Данная реакция, так же, как гексокиназная, практически необратима, и, кроме того, она наиболее медленная из всех реакций гликолиза. Реакция, катализируемая фосфофруктокиназой, определяет скорость всего гликолиза, поэтому, регулируя активность фосфофруктокиназы, можно изменять скорость катаболизма глюкозы.

Фруктозо-1,6-бисфосфат далее расщепляется на 2 триозофосфата: глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат. Реакцию катализирует фермент **фруктозобисфосфатальдолаза**, или просто **альдолаза**. Этот фермент катализирует как реакцию альдольного расщепления, так и аль-

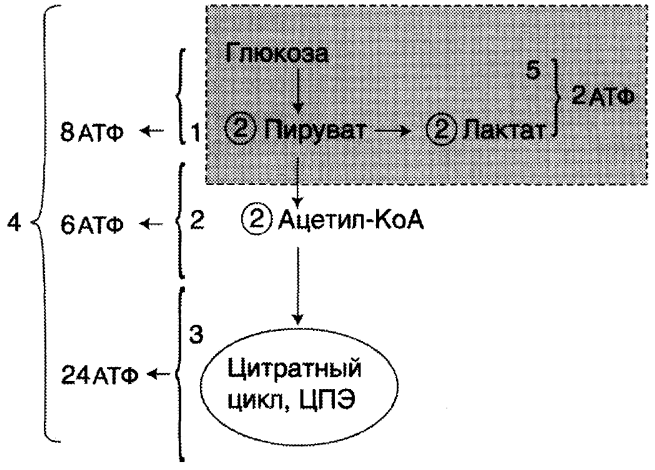


Рис. 7-34. Пути катаболизма глюкозы. 1 — аэробный гликолиз; 2, 3 — общий путь катаболизма; 4 — аэробный распад глюкозы; 5 — анаэробный распад глюкозы (в рамке); 2 (в кружке) — стехиометрический коэффициент.

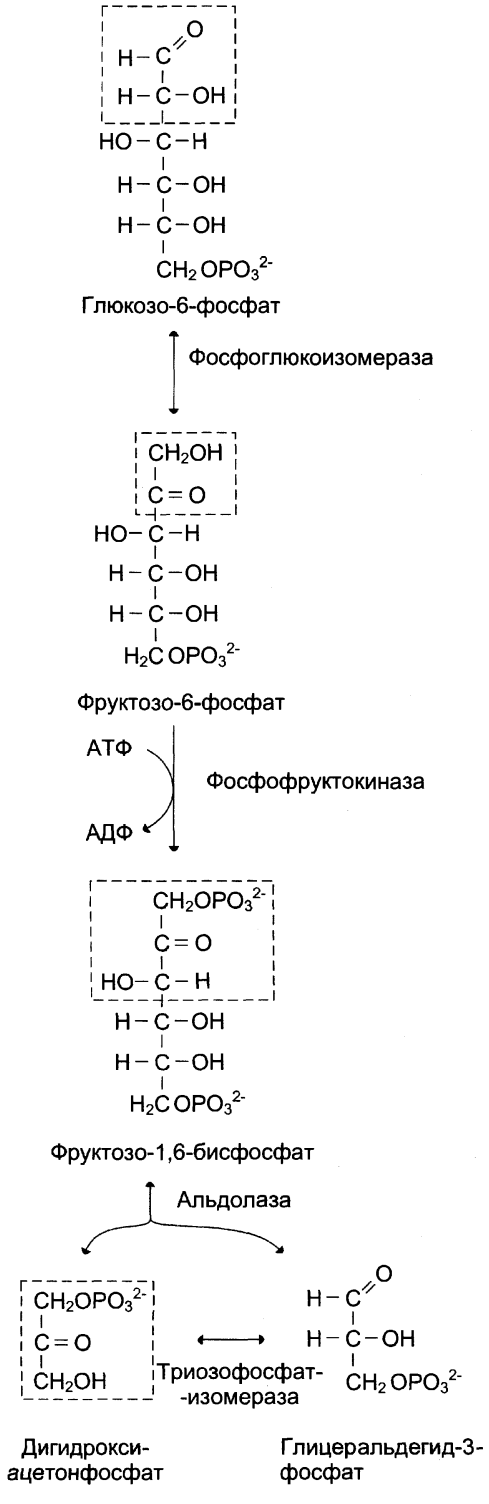


Рис. 7-35. Превращение глюкозо-6-фосфата в триозофосфаты.

дольной конденсации, т.е. обратимую реакцию. Продукты реакции альдольного расщепления — изомеры. В последующих реакциях гликолиза используется только глицеральдегид-3-фосфат, поэтому дигидроксиацетонфосфат превращается с участием фермента триозофосфатизомеразы в глицероальдегид-3-фосфат (рис. 7-35).

В описанной серии реакций дважды происходит фосфорилирование с использованием АТФ. Однако расходование двух молекул АТФ (на одну молекулу глюкозы) далее будет компенсировано синтезом большего количества АТФ.

Превращение глицеральдегид-3-фосфата в пируват

Эта часть аэробного гликолиза включает реакции, связанные с синтезом АТФ. Наиболее сложной в данной серии реакций является реакция превращения глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-бисфосфоглицерат. Это превращение — первая реакция окисления в ходе гликолиза. Реакцию катализирует **глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа**, которая является NAD-зависимым ферментом. Значение данной реакции заключается не только в том, что образуется восстановленный кофермент, окисление которого в дыхательной цепи сопряжено с синтезом АТФ, но также и в том, что свободная энергия окисления концентрируется в макроэргической связи продукта реакции. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа содержит в активном центре остаток цистеина, сульфгидрильная группа которого принимает непосредственное участие в катализе. Окисление глицеральдегид-3-фосфата приводит к восстановлению NAD и образованию с участием H_3PO_4 высокоэнергетической ангидридной связи в 1,3-бисфосфоглицерате в положении 1. В следующей реакции высокоэнергетический фосфат передаётся на АДФ с образованием АТФ. Фермент, катализирующий это превращение, назван по обратной реакции фосфоглицераткиназой (киназы называются по субстрату, находящемуся в уравнении реакции по одну сторону с АТФ). Данная серия реакций показана на рис. 7-36.

Образование АТФ описанным способом не связано с дыхательной цепью, и его называют субстратным фосфорилированием АДФ. Образованный 3-фосфоглицерат уже не содержит макроэргической связи. В следующих реакциях происходят внутримолекулярные перестройки, смысл которых сводится к тому, что низкоэнер-

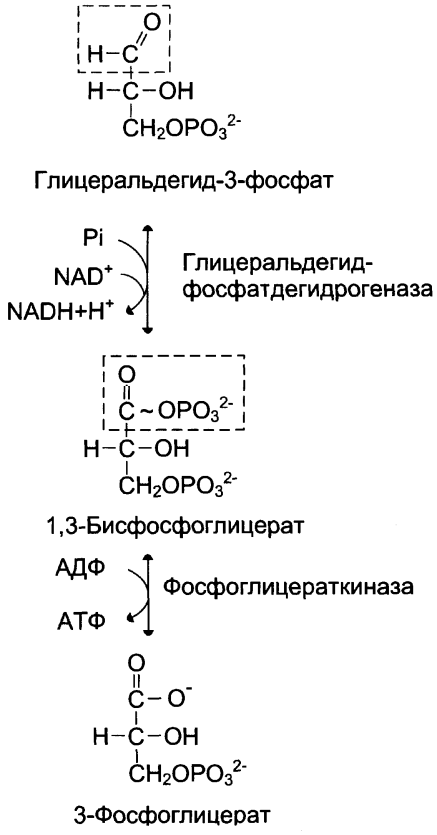


Рис. 7-36. Превращение глицеральдегид-3-фосфата в 3-фосфоглицерат.

гетический фосфоэфир переходит в соединение, содержащее высокоэнергетический фосфат. Внутримолекулярные преобразования заключаются в переносе фосфатного остатка из положения 3 в фосфоглицерате в положение 2. Затем от образовавшегося 2-фосфоглицерата отщепляется молекула воды при участии фермента енолазы. Название дегидратирующего фермента дано по обратной реакции. В результате реакции образуется замещённый енол — фосфоенолпируват. Образованный фосфоенолпируват — макроэргическое соединение, фосфатная группа которого переносится в следующей реакции на АДФ при участии пируваткиназы (фермент также назван по обратной реакции, в которой происходит фосфорилирование пирувата, хотя подобная реакция в таком виде не имеет места).

Превращение фосфоенолпирувата в пируват — необратимая реакция. Это вторая в ходе гликолиза реакция субстратного фосфорилирования. Образующаяся енольная форма пирувата затем неферментативно переходит в более термодинамически стабильную кетоформу. Описанная серия реакций представлена на рис. 7-37.

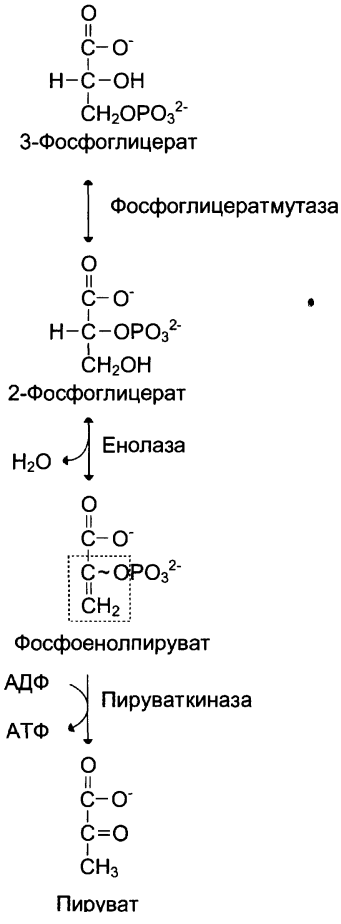


Рис. 7-37. Превращение 3-фосфоглицерата в пируват.

Схема 10 реакций, протекающих при аэробном гликолизе, и дальнейшее окисление пирувата представлены на рис. 7-33.

3. Окисление цитоплазматического NADH в митохондриальной дыхательной цепи. Челночные системы

NADH, образующийся при окислении глицеральдегид-3-фосфата в аэробном гликолизе, подвергается окислению путём переноса атомов водорода в митохондриальную дыхательную цепь. Однако цитозольный NADH не способен передавать водород на дыхательную цепь, потому что

митохондриальная мембрана для него непроницаема. Перенос водорода через мембрану происходит с помощью специальных систем, называемых «челночными». В этих системах водород транспортируется через мембрану при участии пар субстратов, связанных соответствующими дегидрогеназами, т.е. с обеих сторон митохондриальной мембраны находится специфическая дегидрогеназа. Известны 2 челночные системы. В первой из этих систем водород от NADH в цитозоле передаётся на дигидроксиацетонфосфат ферментом глицерол-3-фосфатдегидрогеназой (NAD-зависимый фермент, назван по обратной реакции). Образованный в ходе этой реакции глицерол-3-фосфат, окисляется далее ферментом внутренней мембраны митохондрий — глицерол-3-фосфатдегидрогеназой (FAD-зависимым ферментом). Затем протоны и электроны с $FADH_2$ переходят на убихинон и далее по ЦПЭ (рис. 7-38).

Глицеролфосфатная челночная система работает в клетках белых мышц и гепатоцитов. Однако в клетках сердечных мышц митохондриальная глицерол-3-фосфатдегидрогеназа отсутствует. Вторая челночная система, в которой участвуют малат, цитозольная и митохондриальная малатдегидрогеназы, является более универсальной. В цитоплазме NADH восстанавливает оксалоацетат в малат (рис. 7-39, реакция 1), который при участии переносчика проходит в митохондрии, где окисляется в оксалоацетат NAD-зависимой малатдегидрогеназой (реакция 2). Восстановленный в ходе этой реакции NAD отдаёт водород в митохондриальную ЦПЭ. Однако образованный из малата оксалоацетат выйти самостоятельно из митохондрий в цитозоль не может, так как мембрана митохондрий для него непроницаема. Поэтому оксалоацетат превращается в аспартат, который и транспортируется в цитозоль, где снова превращается в оксалоацетат. Превращения оксалоацетата в аспартат и обратно связаны с присоединением и отщеплением аминогруппы (реакции трансаминирования, см. раздел 9). Эта челночная система называется малат-аспартатной (рис. 7-39). Результат её работы — регенерация цитоплазматического NAD^+ из NADH.

Обе челночные системы существенно отличаются по количеству синтезированного АТФ. В первой системе соотношение Р/О равно 2, так как водород вводится в ЦПЭ на уровне KoQ. Вторая система энергетически более эффективна, так как передаёт водород в ЦПЭ через митохондриальный NAD^+ и соотношение Р/О близко к 3.

4. Баланс АТФ при аэробном гликолизе и распаде глюкозы до CO_2 и H_2O

Выход АТФ при аэробном гликолизе

На образование фруктозо-1,6-бисфосфата из одной молекулы глюкозы требуется 2 молекулы АТФ (реакции 1 и 3 на рис. 7-33). Реакции, связанные с синтезом АТФ, происходят после распада глюкозы на 2 молекулы фосфотриозы, т.е. на втором этапе гликолиза. На этом этапе происходят 2 реакции субстратного фосфорилирования и синтезируются 2 молекулы АТФ (реакции 7 и 10). Кроме того, одна молекула глицеральдегид-3-фосфата дегидрируется (реакция 6), а NADH передаёт водород в митохондриальную ЦПЭ, где синтезируется 3 молекулы АТФ путём окислительного фосфорилирования. В данном случае количество АТФ (3 или 2) зависит от типа челночной системы. Следовательно, окисление до пирувата одной молекулы глицеральдегид-3-фосфата сопряжено с синтезом 5 молекул АТФ. Учитывая, что из глюкозы образуются 2 молекулы фосфотриозы, полученную величину нужно умножить на 2 и затем вычесть 2 молекулы АТФ, затраченные на первом этапе. Таким образом, выход АТФ при аэробном гликолизе составляет (5×2) − 2 = 8 АТФ.

Выход АТФ при аэробном распаде глюкозы до конечных продуктов

В результате гликолиза образуется пируват, который далее окисляется до CO_2 и H_2O в ОПК, описанном в разделе 6. Теперь можно оценить энергетическую эффективность гликолиза и ОПК, которые вместе составляют процесс аэробного распада глюкозы до конечных продуктов (табл. 7-4).

Таким образом, выход АТФ при окислении 1 моль глюкозы до CO_2 и H_2O составляет 38 моль АТФ.

В процессе аэробного распада глюкозы происходят 6 реакций дегидрирования. Одна из них протекает в гликолизе и 5 в ОПК (см. раздел 6). Субстраты для специфических NAD-зависимых дегидрогеназ: глицеральдегид-3-фосфат, пируват, изоцитрат, α-кетоглутарат, малат. Одна реакция дегидрирования в цитратном цикле под

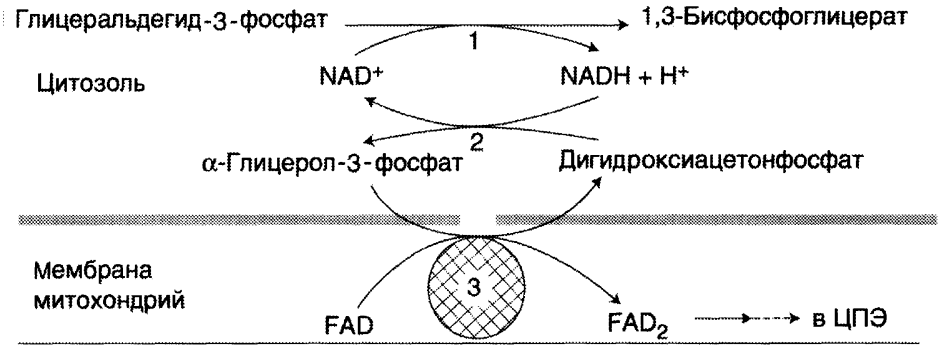


Рис. 7-38. Глицерофосфатная челночная система. 1 — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; 2 — глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (цитозольный фермент, назван по обратной реакции); 3 — глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (митохондриальный флавиновый фермент).

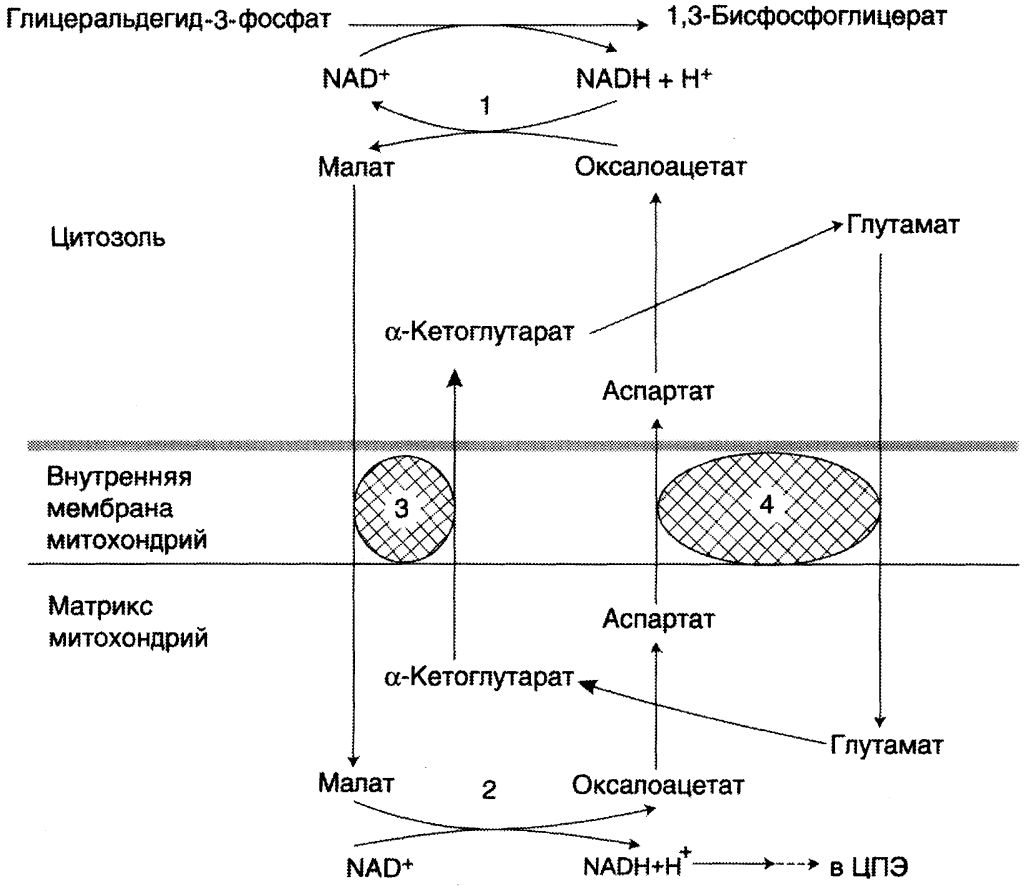


Рис. 7-39. Малат-аспартатная челночная система. 1, 2 — окислительно-восстановительные реакции, обеспечивающие транспорт водорода из цитозоля в митохондрии на ЦПЭ; 3, 4 — транслоказы, обеспечивающие транспорт α-кетоглутарата, аспартата и глутамата и через мембрану митохондрий.

Таблица 7-4. Этапы аэробного распада глюкозы

Этапы аэробного распада глюкозы	Количество использованного АТФ, моль	Количество синтезированного АТФ, моль
I. Аэробный гликолиз		
Глюкоза → 2 Пируват	-2	+10
II. Окислительное декарбоксилирование пирувата	-	
2 (Пируват → Ацетил-КоА)		+6
III. Цитратный цикл		
2 (Ацетил-КоА → $CO_2 + H_2O$)		+24
Суммарный выход АТФ при окислении 1 моль глюкозы		+38

действием сукцинатдегидрогеназы происходит с участием кофермента FAD. Общее количество АТФ, синтезированное путём окислительного фофорилирования, составляет 17 моль АТФ на 1 моль глицеральдегидфосфата. К этому необходимо прибавить 3 моль АТФ, синтезированных путём субстратного фосфорилирования (две реакции в гликолизе и одна в цитратном цикле).

Учитывая, что глюкоза распадается на 2 фосфотриозы и что стехиометрический коэффициент дальнейших превращений равен 2, полученную величину надо умножить на 2, а из результата вычесть 2 моль АТФ, использованные на первом этапе гликолиза.

В. Анаэробный распад глюкозы (анаэробный гликолиз)

Анаэробным гликолизом называют процесс расщепления глюкозы с образованием в качестве конечного продукта лактата. Этот процесс протекает без использования кислорода и поэтому не зависит от работы митохондриальной дыхательной цепи. АТФ образуется за счёт реакций субстратного фосфорилирования. Суммарное уравнение процесса:

$$C_6H_{12}0_6 + 2\ H_3PO_4 + 2\ АДФ = 2\ C_3H_6O_3 + 2\ АТФ + 2\ H_2O.$$

1. Реакции анаэробного гликолиза

При анаэробном гликолизе (рис. 7-40) в цитозоле протекают все 10 реакций, идентичных аэробному гликолизу. Лишь 11-я реакция, где происходит восстановление пирувата цитозольным NADH, является специфической для анаэробного гликолиза (рис. 7-41). Восстановление пирувата в лактат катализирует лактатдегидрогеназа (реакция обратимая, и фермент назван по обратной реакции). С помощью этой реакции обеспечивается регенерация NAD^+ из NADH без участия митохондриальной дыхательной цепи в ситуациях, связанных с недостаточным снабжением клеток кислородом. Роль акцептора водорода от NADH (подобно кислороду в дыхательной цепи) выполняет пируват. Таким образом, значение реакции восстановления пирувата заключается не в образовании лактата, а в том, что данная цитозольная реакция обеспечивает регенерацию NAD^+. К тому же лактат не является конечным продуктом метаболизма, удаляемым из организма. Это вещество выводится в кровь и утилизируется, превращаясь в печени в глюкозу, или при доступности кислорода превращается в пируват, который вступает в общий путь катаболизма, окисляясь до CO_2 и H_2O. Строение лактатдегидрогеназы, механизм действия и значение определения активности этого фермента для диагностики заболеваний описывались ранее в разделе 2.

Баланс АТФ при анаэробном гликолизе

Анаэробный гликолиз по сравнению с аэробным менее эффективен. В этом процессе катаболизм 1 моль глюкозы без участия митохондриальной дыхательной цепи сопровождается синтезом 2 моль АТФ и 2 моль лактата. АТФ образуется за счёт 2 реакций субстратного фос-

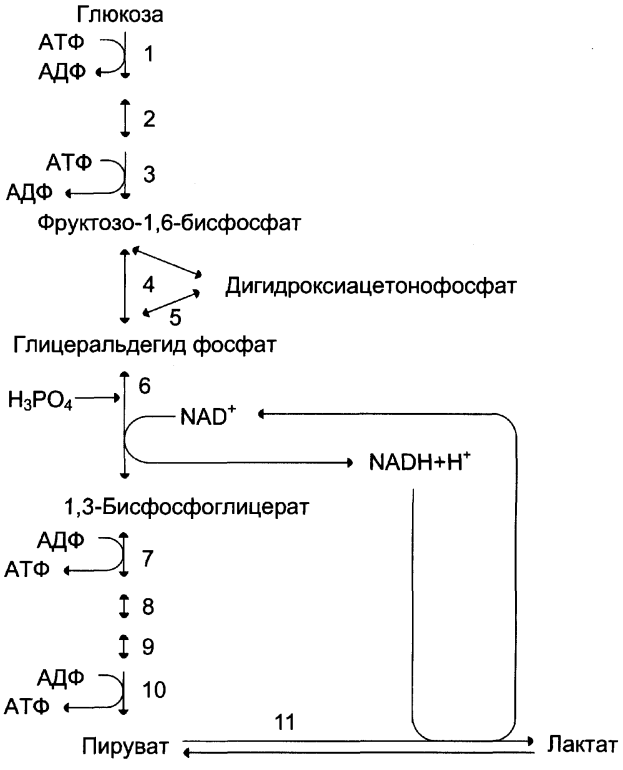


Рис. 7-40. Анаэробный гликолиз.

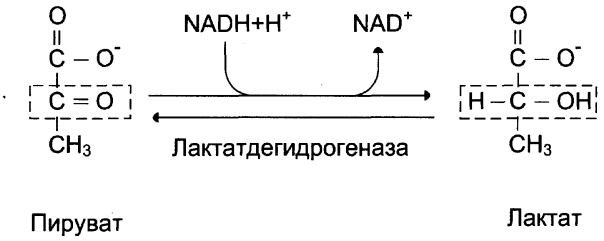


Рис. 7-41. Восстановление пирувата в лактат.

форилирования. Поскольку глюкоза распадается на 2 фосфотриозы, то с учётом стехиометрического коэффициента, равного 2, количество моль синтезированного АТФ равно 4. Учитывая 2 моль АТФ, использованных на первом этапе гликолиза, получаем конечный энергетический эффект процесса, равный 2 моль АТФ. Таким образом, 10 цитозольных ферментов, катализирующих превращение глюкозы в пируват, вместе с лактатдегидрогеназой обеспечивают в анаэробном гликолизе синтез 2 моль АТФ (на 1 моль глюкозы) без участия кислорода.

Г. Значение катаболизма глюкозы

Основное физиологическое назначение катаболизма глюкозы заключается в использовании энергии, освобождающейся в этом процессе для синтеза АТФ.

Энергия, выделяющаяся в процессе полного распада глюкозы до CO_2 и H_2O, составляет 2880 кДж/моль. Если эту величину сравнить с энергией гидролиза высокоэнергетических связей — 38 моль АТФ (50 кДж на моль АТФ), то получим: 50×38 = 1900 кДж, что составляет 65% от всей энергии, выделяющейся при полном распаде глюкозы. Такова эффективность использования энергии распада глюкозы для синтеза АТФ. Необходимо учитывать, что реальная эффективность процесса может быть ниже. Точно оценить выход АТФ можно только при субстратном фосфорилировании, а соотношение между поступлением водорода в дыхательную цепь и синтезом АТФ является приблизительным.

Аэробный распад глюкозы происходит во многих органах и тканях и служит основным, хотя и не единственным, источником энергии для жизнедеятельности. Некоторые ткани находятся в наибольшей зависимости от катаболизма глюкозы как источника энергии. Например, клетки мозга расходуют до 100 г глюкозы в сутки, окисляя её аэробным путём. Поэтому недостаточное снабжение мозга глюкозой или гипоксия проявляются симптомами, свидетельствующими о нарушении функций мозга (головокружения, судороги, потеря сознания).

Анаэробный распад глюкозы происходит в мышцах, в первые минуты мышечной работы, в эритроцитах (в которых отсутствуют митохондрии), а также в разных органах в условиях ограниченного снабжении их кислородом, в том числе в клетках опухолей. Для метаболизма клеток опухолей характерно ускорение как аэробного, так и анаэробного гликолиза. Но преимущественный анаэробный гликолиз и увеличение синтеза лактата служит показателем повышенной скорости деления клеток при недостаточной обеспеченности их системой кровеносных сосудов.

Кроме энергетической функции, процесс катаболизма глюкозы может выполнять и анаболические функции. Метаболиты гликолиза используются для синтеза новых соединений. Так,

фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат участвуют в образовании рибозо-5-фосфата — структурного компонента нуклеотидов; 3-фосфоглицерат может включаться в синтез аминокислот, таких как серин, глицин, цистеин (см. раздел 9). В печени и жировой ткани ацетил-КоА, образующийся из пирувата, используется как субстрат при биосинтезе жирных кислот, холестерина, а дигидроксиацетонфосфат как субстрат для синтеза глицерол-3-фосфата (см. раздел 8).

Д. Регуляция катаболизма глюкозы

Поскольку основное значение гликолиза состоит в синтезе АТФ, его скорость должна коррелировать с затратами энергии в организме.

Большинство реакций гликолиза обратимы, за исключением трёх, катализируемых гексокиназой (или глюкокиназой), фосфофруктокиназой и пируваткиназой. Регуляторные факторы, изменяющие скорость гликолиза, а значит и образование АТФ, направлены на необратимые реакции. Показателем потребления АТФ является накопление АДФ и АМФ. Последний образуется в реакции, катализируемой аденилаткиназой:

2 АДФ $\leftrightarrow$ АМФ + АТФ

Даже небольшой расход АТФ ведёт к заметному увеличению АМФ. Отношение уровня АТФ к АДФ и АМФ характеризует энергетический статус клетки (см. раздел 6), а его составляющие служат аллостерическими регуляторами скорости как общего пути катаболизма, так и гликолиза. На рисунке 7-42 показана аллостерическая регуляция скорости катаболизма глюкозы в скелетных мышцах.

Существенное значение для регуляции гликолиза имеет изменение активности фосфофруктокиназы, потому что этот фермент, как упоминалось ранее, катализирует наиболее медленную реакцию процесса.

Фосфофруктокиназа активируется АМФ, но ингибируется АТФ. АМФ, связываясь с аллостерическим центром фосфофруктокиназы, увеличивает сродство фермента к фруктозо-6-фосфату и повышает скорость его фосфорилирования. Эффект АТФ на этот фермент — пример гомотропного аллостеризма (см. раздел 2), поскольку АТФ может взаимодействовать как с аллостерическим, так и с активным центром, в последнем случае как субстрат.

При физиологических значениях АТФ активный центр фосфофруктокиназы всегда насыщен субстратами (в том числе АТФ). Повышение уровня АТФ относительно АДФ снижает скорость реакции, поскольку АТФ в этих условиях действует как ингибитор: связывается с аллостерическим центром фермента, вызывает конформационные изменения и уменьшает сродство к его субстратам.

Изменение активности фосфофруктокиназы способствует регуляции скорости фосфорилирования глюкозы гексокиназой. Снижение активности фосфофруктокиназы при высоком уровне АТФ ведёт к накоплению как фруктозо-6-фосфата, так и глюкозо-6-фосфата, а последний ингибирует гексокиназу. Следует напомнить, что гексокиназа во многих тканях (за исключением печени и β-клеток поджелудочной железы) ингибируется глюкозо-6-фосфатом.

При высоком уровне АТФ снижается скорость цикла лимонной кислоты и дыхательной цепи. В этих условиях процесс гликолиза также замедляется. Следует напомнить, что аллостерическая регуляция ферментов ОПК и дыхательной цепи также связана с изменением концентрации таких ключевых продуктов, как NADH, АТФ и некоторых метаболитов. Так, NADH, накапливаясь в том случае, если не успевает окислиться в дыхательной цепи, ингибирует некоторые аллостерические ферменты цитратного цикла (см. раздел 6).

Физиологическая роль гликолиза в печени и жировой ткани несколько иная, чем в других тканях. В печени и жировой ткани гликолиз в период пищеварения функционирует в основном как источник субстратов для синтеза жиров. Регуляция гликолиза в печени имеет свои особенности и будет рассмотрена позже.

Е. 2,3-Бисфосфоглицератный цикл

В гликолитическом пути может протекать дополнительная реакция, катализируемая бисфосфоглицератмутазой, превращающей 1,3-бисфосфоглицерат в 2,3-бисфосфоглицерат (2,3-БФГ), который может при участии 2,3-бисфосфоглицератфосфатазы превращаться в 3-фосфоглицерат — метаболит гликолиза (рис. 7-43).

В большинстве тканей 2,3-БФГ образуется в небольших количествах. В эритроцитах этот метаболит образуется в значительных количе-

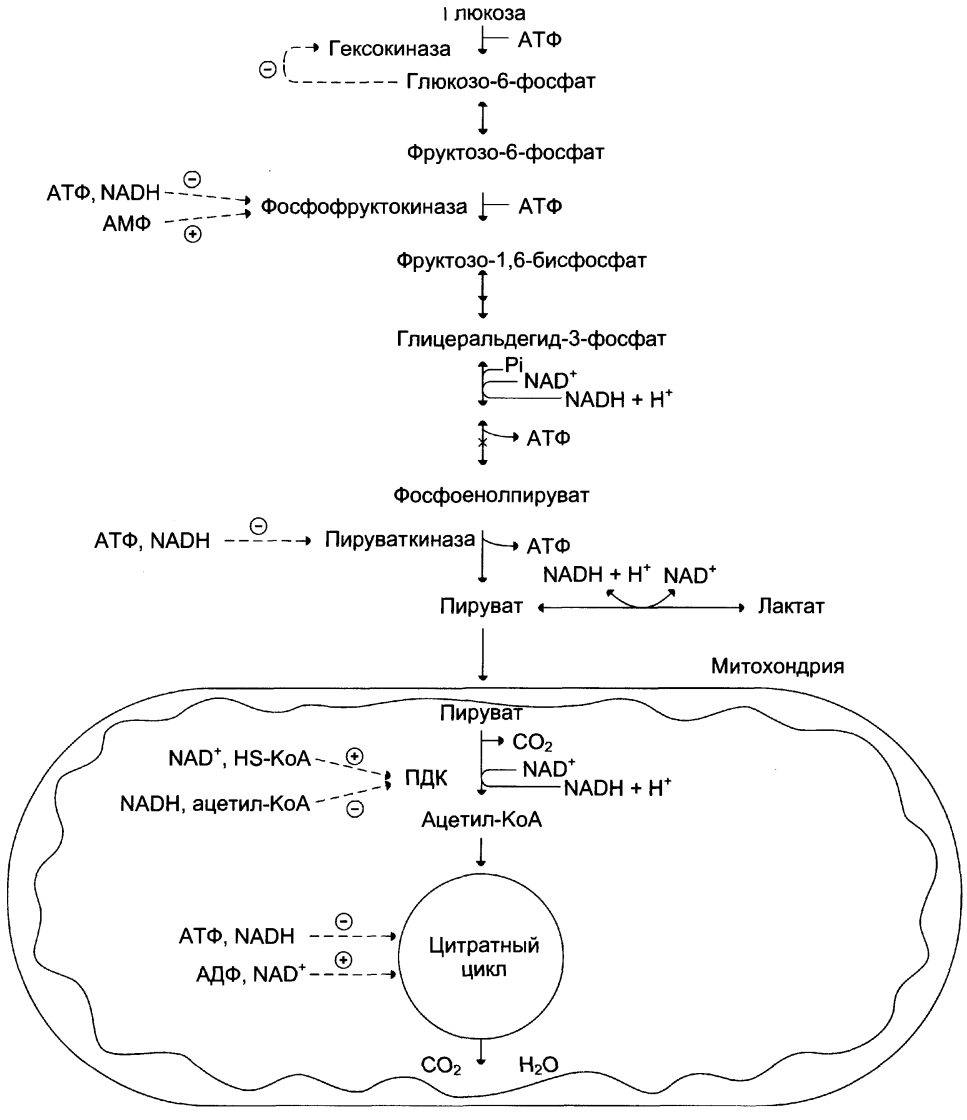


Рис. 7-42. Регуляция катаболизма глюкозы в скелетных мышцах.

ствах и выполняет роль аллостерического регулятора функции гемоглобина. 2,3-БФГ, связываясь с гемоглобином, понижает его сродство к кислороду, способствует диссоциации кислорода и переходу его в ткани (см. раздел 1).

Образование 2,3-БФГ предполагает потерю энергии макроэргической связи в 1,3-бисфосфоглицерате, которая не переносится на АТФ, а рассеивается в форме теплоты, что означает снижение энергетического эффекта гликолиза.

IX. СИНТЕЗ ГЛЮКОЗЫ В ПЕЧЕНИ (ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ)

Некоторые ткани, например мозг, нуждаются в постоянном поступлении глюкозы. Когда поступление углеводов в составе пищи недостаточно, содержание глюкозы в крови некоторое время поддерживается в пределах нормы за счёт расщепления гликогена в печени. Однако запасы гликогена в печени невелики. Они значительно уменьшаются к 6–10 ч голодания и практи-

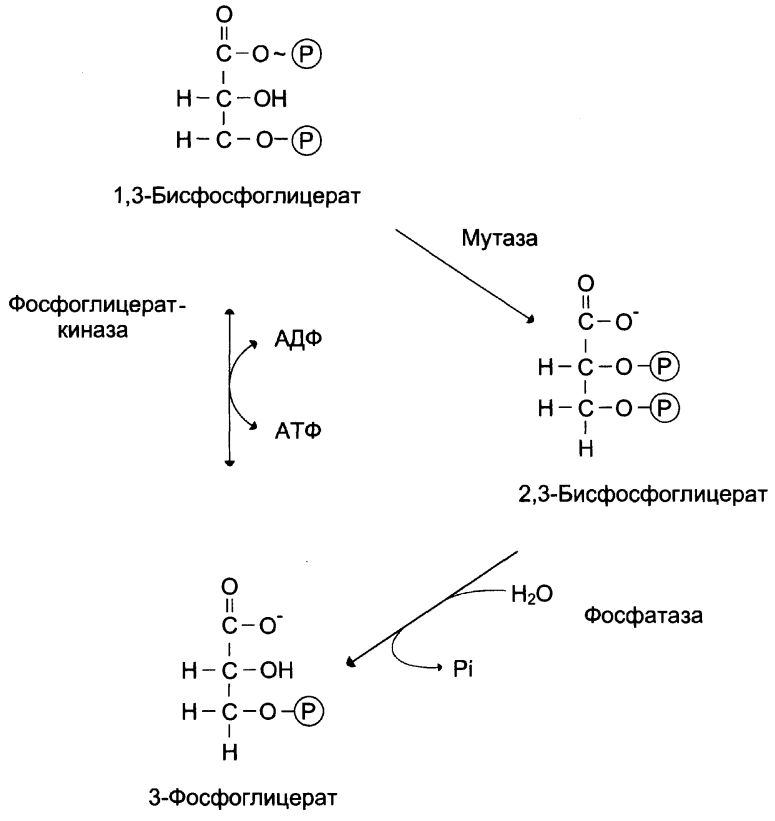


Рис. 7-43. Образование и превращение 2,3-бисфосфоглицерата.

чески полностью исчерпываются после суточного голодания. В этом случае в печени начинается **синтез глюкозы *de novo* — глюконеогенез**. Глюконеогенез — процесс синтеза глюкозы из веществ неуглеводной природы. Его основной функцией является поддержание уровня глюкозы в крови в период длительного голодания и интенсивных физических нагрузок. Процесс протекает в основном в печени и менее интенсивно в корковом веществе почек, а также в слизистой оболочке кишечника. Эти ткани могут обеспечивать синтез 80—100 г глюкозы в сутки. На долю мозга при голодании приходится большая часть потребности организма в глюкозе. Это объясняется тем, что клетки мозга не способны, в отличие от других тканей, обеспечивать потребности в энергии за счёт окисления жирных кислот (см. раздел 8).

Кроме мозга, в глюкозе нуждаются ткани и клетки, в которых аэробный путь распада невозможен или ограничен, например эритроциты (они лишены митохондрий), клетки сетчатки, мозгового слоя надпочечников и др.

Первичные субстраты глюконеогенеза — лактат, аминокислоты и глицерол. Включение этих субстратов в глюконеогенез зависит от физиологического состояния организма.

- Лактат — продукт анаэробного гликолиза. Он образуется при любых состояниях организма в эритроцитах и работающих мышцах. Таким образом, лактат используется в глюконеогенезе постоянно.
- Глицерол высвобождается при гидролизе жиров в жировой ткани в период голодания или при длительной физической нагрузке.
- Аминокислоты образуются в результате распада мышечных белков и включаются в глюконеогенез при длительном голодании или продолжительной мышечной работе.

На рисунке 7-44 показаны пункты включения первичных субстратов в глюконеогенез.

А. Реакции глюконеогенеза

Большинство реакций глюконеогенеза протекает за счёт обратимых реакций гликолиза (рис. 7-45, реакции 9, 8, 7, 6, 5, 4, 2) и катализируется теми же ферментами. Однако 3 реакции гликолиза термодинамически необратимы. На этих стадиях реакции глюконеогенеза протекают другими путями.

Необходимо отметить, что гликолиз протекает в цитозоле, а часть реакций глюконеогенеза происходит в митохондриях.

Рассмотрим более подробно те реакции глюконеогенеза, которые отличаются от реакций гликолиза и происходят в глюконеогенезе с использованием других ферментов. Рассмотрим процесс синтеза глюкозы из пирувата.

1. Образование фосфоенолпирувата из пирувата — первая из необратимых стадий глюконеогенеза

Образование фосфоенолпирувата из пирувата происходит в ходе двух реакций (рис. 7-45, реакции 11, 12), первая из которых протекает в митохондриях. Пируват, образующийся из лактата или из некоторых аминокислот, транспортируется в матрикс митохондрий и там карбоксилируется с образованием оксалоацетата (рис. 7-46). **Пируваткарбоксилаза**, катализирующая данную реакцию, — митохондриальный фермент, коферментом которого является биотин. Реакция протекает с использованием АТФ.

Дальнейшие превращения оксалоацетата протекают в цитозоле. Следовательно, на этом этапе должна существовать система транспорта оксалоацетата через митохондриальную мембрану, которая для него непроницаема. Оксалоацетат в митохондриальном матриксе восстанавливается с образованием малата (рис. 7-47) при участии NADH (обратная реакция цитратного цикла). Образовавшийся малат затем проходит через митохондриальную мембрану с помощью специальных переносчиков. Кроме того, оксалоацетат способен транспортироваться из митохондрий в цитозоль в виде аспартата в ходе малат-аспартатного челночного механизма, рассмотренного ранее (рис. 7-39).

В цитозоле малат вновь превращается в оксалоацетат в ходе реакции окисления с участием кофермента NAD^+. Обе реакции: восстановление оксалоацетата и окисление малата катализируют малатдегидрогеназа, но в первом случае это митохондриальный фермент, а во втором — цитозольный. Образованный в цитозоле из малата оксалоацетат затем превращается в фосфоенолпируват в ходе реакции, катализируемой фосфоенолпируваткарбоксикиназой — ГТФ-зависимым ферментом (рис. 7-48). Название фермента дано по обратной реакции.

Схема всех реакций, протекающих на первой необратимой стадии глюконеогенеза, представлена на рис. 7-49.

Следует отметить, что этот обходной участок глюконеогенеза требует расхода двух молекул с макроэргическими связями (АТФ и ГТФ) в расчёте на одну молекулу исходного вещества — пирувата. В пересчёте на синтез одной молекулы глюкозы из двух молекул пирувата расход составляет 2 моль АТФ и 2 моль ГТФ или 4 моль АТФ (для удобства рассуждений предлагается считать, что энергозатраты на синтез АТФ и ГТФ равны). После образования фосфоенолпирувата все остальные реакции также

Рис. 7-44. Включение субстратов в глюконеогенез.

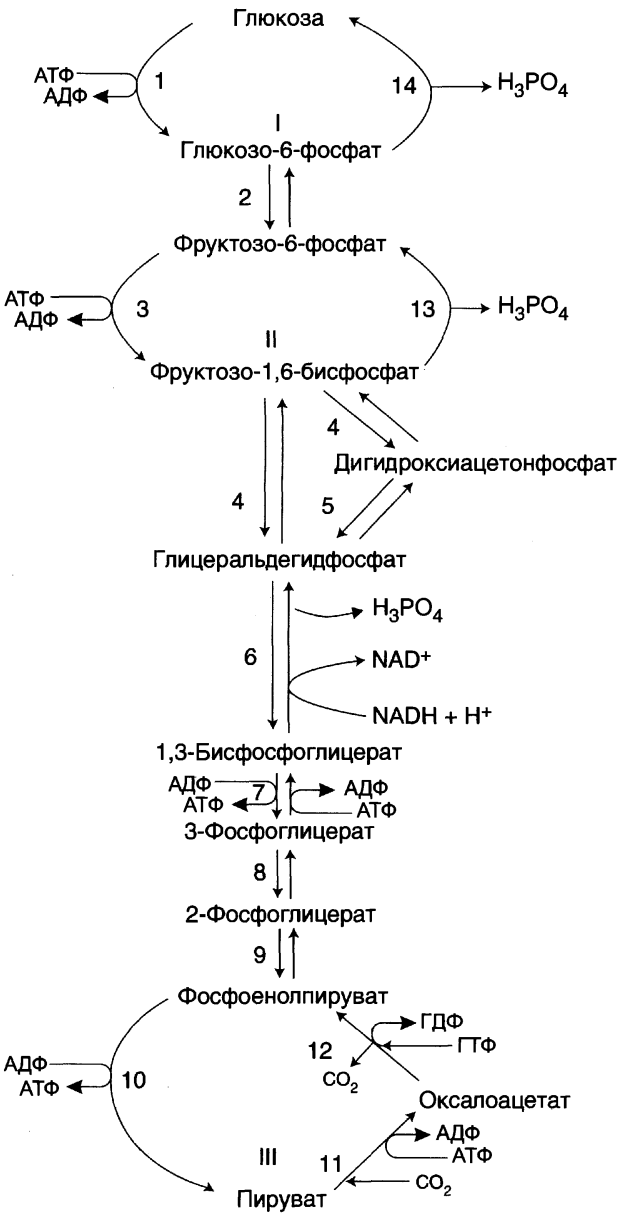


Рис. 7-45. Гликолиз и глюконеогенез. Ферменты обратимых реакций гликолиза и глюконеогенеза: 2 — фосфоглюкоизомераза; 4 — альдолаза; 5 — триозофосфатизомераза; 6 — глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; 7 — фосфоглицераткиназа; 8 — фосфоглицератмутаза; 9 — енолаза. Ферменты необратимых реакций глюконеогенеза: 11 — пируваткарбоксилаза; 12 — фосфоенолпируваткарбоксикиназа; 13 — фруктозо-1,6-бисфосфатаза; 14 — глюкозо-6-фосфатаза. I–III — субстратные циклы.

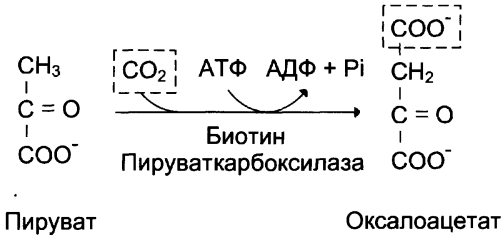


Рис. 7-46. Образование оксалоацетата из пирувата.

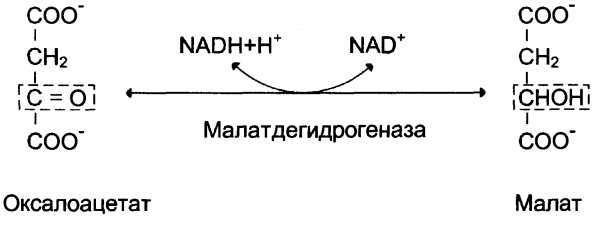


Рис. 7-47. Превращение оксалоацетата в малат.

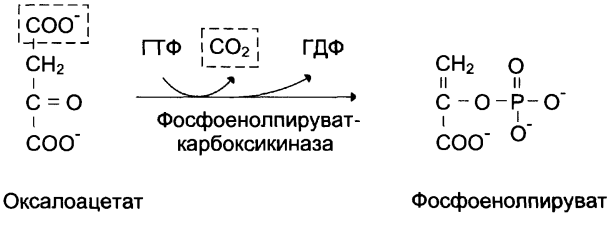


Рис. 7-48. Превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват.

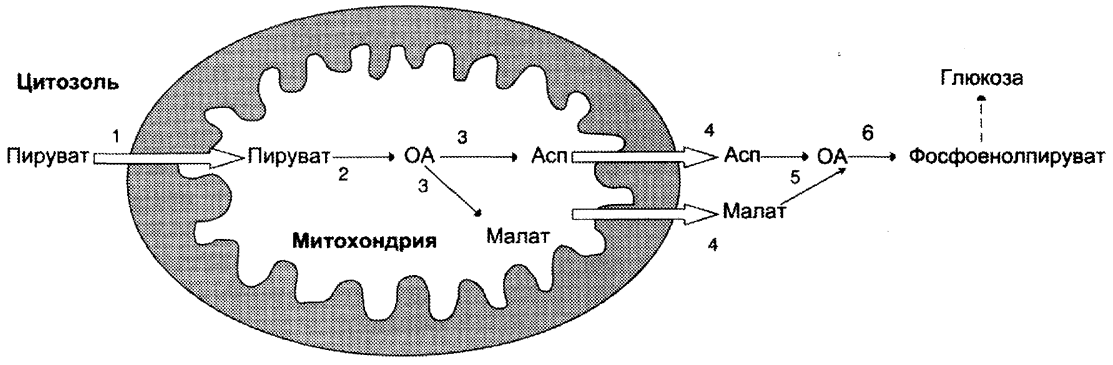


Рис. 7-49. Образование оксалоацетата, транспорт в цитозоль и превращение в фосфоенолпируват. 1 — транспорт пирувата из цитозоля в митохондрию; 2 — превращение пирувата в оксалоацетат (ОА); 3 — превращение ОА в малат или аспартат; 4 — транспорт аспартата и малата из митохондрии в цитозоль; 5 — превращение аспартата и малата в ОА; 6 — превращение ОА в фосфоенолпируват.

протекают в цитозоле вплоть до образования фруктозо-1,6-бисфосфата и катализируются гликолитическими ферментами.

2. Гидролиз фруктозо-1,6-бисфосфата и глюкозо-6-фосфата

Отщепление фосфатной группы из фруктозо-1,6-бисфосфата и глюкозо-6-фосфата — также необратимые реакции глюконеогенеза. В ходе гликолиза эти реакции катализируют специфические киназы с использованием энергии АТФ. В глюконеогенезе они протекают без участия АТФ и АДФ и ускоряются не киназами, а фосфатазами — ферментами, принадлежащими к классу гидролаз. Ферменты фруктозо-1,6-бисфосфатаза и глюкозо-6-фосфатаза катализируют отщепление фосфатной группы от фруктозо-1,6-бисфосфата и глюкозо-6-фосфата. После чего свободная глюкоза выходит из клетки в кровь. Схема всех реакций глюконеогенеза представлена на рис. 7-45.

Итак, в печени существуют 4 фермента, которые принимают участие только в глюконеогенезе и катализируют обходные реакции необратимых стадий гликолиза. Это — пируваткарбоксилаза, фосфоенолпируваткарбоксикиназа, фруктозо-1,6-бисфосфатаза и глюкозо-6-фосфатаза.

3. Энергетический баланс глюконеогенеза из пирувата

В ходе этого процесса расходуются 6 моль АТФ на синтез 1 моль глюкозы из 2 моль пирувата. Четыре моль АТФ расходуются на стадии синтеза фосфоенолпирувата из оксалоацетата и ещё 2 моль АТФ на стадиях образования 1,3-бисфосфоглицерата из 3-фосфоглицерата.

Суммарный результат глюконеогенеза из пирувата выражается следующим уравнением:

$$2\ \text{Пируват} + 4\ \text{АТФ} + 2\ \text{ГТФ} + 2\ (\text{NADH} + \text{H}^+) + 4\ \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Глюкоза} + 4\ \text{АДФ} + 2\ \text{ГДФ} + 6\ \text{H}_3\text{PO}_4 + 2\ \text{NAD}^+.$$

Б. Синтез глюкозы из лактата

Лактат, образованный в анаэробном гликолизе, не является конечным продуктом метаболизма. Использование лактата связано с его превращением в печени в пируват. Лактат как источник пирувата важен не столько при голодании, сколько при нормальной жизнедеятельности организма. Его превращение в пируват и дальнейшее использование последнего являются способом утилизации лактата.

Лактат, образовавшийся в интенсивно работающих мышцах или в клетках с преобладающим анаэробным способом катаболизма глюкозы, поступает в кровь, а затем в печень. В печени отношение NADH/NAD^+ ниже, чем в сокращающейся мышце, поэтому лактатдегидрогеназная реакция протекает в обратном направлении, т.е. в сторону образования пирувата из лактата. Далее пируват включается в глюконеогенез, а образовавшаяся глюкоза поступает в кровь и поглощается скелетными мышцами. Эту

последовательность событий называют **«глюкозо-лактатным циклом»**, или **«циклом Кори»** (рис. 7-50). Цикл Кори выполняет 2 важнейшие функции: 1 — обеспечивает утилизацию лактата; 2 — предотвращает накопление лактата и, как следствие этого, опасное снижение pH (лактоацидоз). Часть пирувата, образованного из лактата, окисляется печенью до CO_2 и H_2O. Энергия окисления может использоваться для синтеза АТФ, необходимого для реакций глюконеогенеза.

Лактоацидоз. Термин «ацидоз» обозначает увеличение кислотности среды организма (снижение pH) до значений, выходящих за пределы нормы. При ацидозе либо увеличивается продукция протонов, либо происходит снижение их экскреции (в некоторых случаях и то и другое). Метаболический ацидоз возникает при увеличении концентрации промежуточных продуктов обмена (кислотного характера) вследствие увеличения их синтеза или уменьшения скорости распада или выведения. При нарушении кислотно-основного состояния организма быстро включаются буферные системы компенсации (через 10–15 мин). Лёгочная компенсация обеспечивает стабилизацию соотношения HCO_3^-/H_2CO_3, которая в норме соответствует 1:20, а при ацидозе уменьшается. Лёгочная компенсация достигается увеличением объёма вентиляции и, следовательно, ускорением выведения CO_2 из организма. Однако основную роль в компенсации ацидоза играют почечные механизмы с участием аммиачного буфера (см. раздел 9). Одной из причин метаболического ацидоза может быть накопление молочной кислоты. В норме лактат в печени превращается обратно в глюкозу путём глюконеогенеза либо окисляется. Кроме печени, другим потребителем лактата служат почки и сердечная мышца, где лактат может окисляться до CO_2 и H_2O и использоваться как источник энергии, особенно при физической работе.

Уровень лактата в крови — результат равновесия между процессами его образования и утилизации. Кратковременный компенсированный лактоацидоз встречается довольно часто даже у здоровых людей при интенсивной мышечной работе. У нетренированных людей лактоацидоз при физической работе возникает как следствие относительного недостатка кислорода в мышцах и развивается достаточно быстро. Компенсация осуществляется путём гипервентиляции.

При некомпенсированном лактоацидозе содержание лактата в крови увеличивается до 5 ммоль/л (в норме до 2 ммоль/л). При этом pH крови может составлять 7,25 и менее (в норме 7,36–7,44).

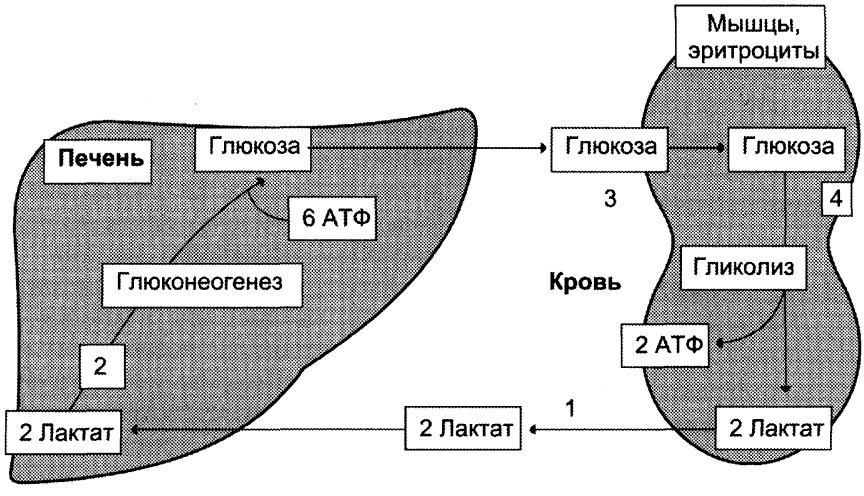


Рис. 7-50. Цикл Кори (глюкозо-лактатный цикл). 1 — поступление лактата из сокращающейся мышцы с током крови в печень; 2 — синтез глюкозы из лактата в печени; 3 — поступление глюкозы из печени с током крови в работающую мышцу; 4 — использование глюкозы как энергетического субстрата сокращающейся мышцей и образование лактата.

Повышение содержания лактата в крови может быть следствием нарушения метаболизма пирувата (рис. 7-51).

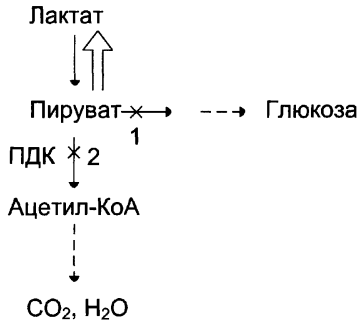


Рис. 7-51. Нарушения метаболизма пирувата при лактоацидозе. 1 — нарушение использования пирувата в глюконеогенезе; 2 — нарушение окисления пирувата.

Так, при гипоксии, возникающей вследствие нарушения снабжения тканей кислородом или кровью, уменьшается активность пируватдегидрогеназного комплекса и снижается окислительное декарбоксилирование пирувата. В этих условиях равновесие реакции пируват↔лактат сдвинуто в сторону образования лактата. Кроме того, при гипоксии уменьшается синтез АТФ, что следовательно, ведёт к снижению скорости глюконеогенеза — другого пути утилизации лактата. Повышение концентрации лактата и снижение внутриклеточного pH отрицательно влияют на активность всех ферментов, в том числе и пируваткарбоксилазы, катализирующей начальную реакцию глюконеогенеза.

Возникновению лактоацидоза также способствуют нарушения глюконеогенеза при печёночной недостаточности различного происхождения. Кроме того, лактоацидозом может сопровождаться гиповитаминоз B_1, так как производное этого витамина (тиаминдифосфат) выполняет коферментную функцию в составе ПДК при окислительном декарбоксилировании пирувата (см. раздел 6). Дефицит тиамина может возникать, например, у алкоголиков с нарушенным режимом питания.

Итак, причинами накопления молочной кислоты и развития лактоацидоза могут быть:

- активация анаэробного гликолиза вследствие тканевой гипоксии различного происхождения;
- поражения печени (токсические дистрофии, цирроз и др.);
- нарушение использования лактата вследствие наследственных дефектов ферментов глюконеогенеза, недостаточности глюкозо-6-фосфатазы;
- нарушение работы ПДК вследствие дефектов ферментов или гиповитаминозов;
- применение ряда лекарственных препаратов, например бигуанидов (блокаторы глюконеогенеза, используемые при лечении сахарного диабета).

В. Синтез глюкозы из аминокислот

В условиях голодания часть белков мышечной ткани распадается до аминокислот, которые далее включаются в процесс катаболизма. Аминокислоты, которые при катаболизме превращаются в пируват или метаболиты цитратного цикла, могут рассматриваться как потенциальные предшественники глюкозы и гликогена и носят название гликогенных. Например, оксалоацетат, образующийся из аспарагиновой кислоты, является промежуточным продуктом как цитратного цикла, так и глюконеогенеза.

Из всех аминокислот, поступающих в печень, примерно 30% приходится на долю аланина. Это объясняется тем, что при расщеплении мышечных белков образуются аминокислоты, многие из которых превращаются сразу в пируват или сначала в оксалоацетат, а затем в пируват. Последний превращается в аланин, приобретая аминогруппу от других аминокислот. Аланин из мышц переносится кровью в печень, где снова преобразуется в пируват, который частично окисляется и частично включается в глюконеогенез. Следовательно, существует следующая последовательность событий (**глюкозо-аланиновый цикл**): глюкоза в мышцах → пируват в мышцах → аланин в мышцах → аланин в печени → глюкоза в печени → глюкоза в мышцах (рис. 7-52). Весь цикл не приводит к увеличению количества глюкозы в мышцах, но он решает проблемы транспорта аминного азота из мышц в печень и предотвращает лактоацидоз.

Г. Синтез глюкозы из глицерола

Глицерол образуется при гидролизе триацилглицеролов, главным образом в жировой ткани. Использовать его могут только те ткани, в кото-

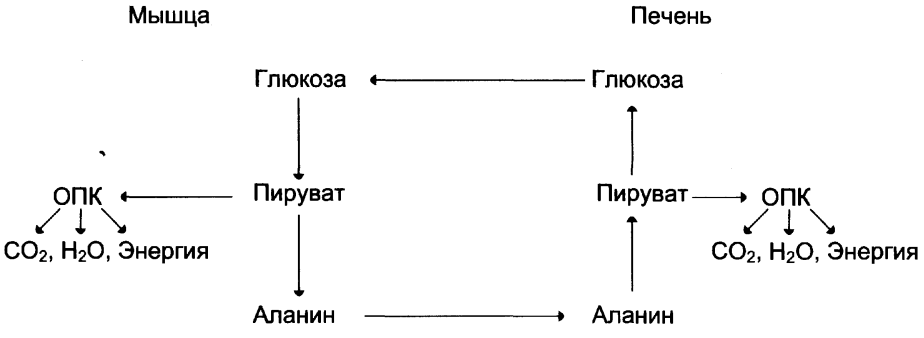


Рис. 7-52. Глюкозо-аланиновый цикл.

рых имеется фермент глицерол киназа, например печень, почки. Этот АТФ-зависимый фермент катализирует превращение глицерола в α-глицерофосфат (глицерол-3-фосфат). При включении глицерол-3-фосфата в глюконеогенез происходит его дегидрирование NAD-зависимой дегидрогеназой с образованием дигидроксиацетонфосфата (рис. 7-53), который далее превращается в глюкозу.

X. РЕГУЛЯЦИЯ ГЛИКОЛИЗА И ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА В ПЕЧЕНИ

По сравнению с другими органами печень отличается наиболее сложным обменом глюкозы. Кроме пары противоположных процессов (синтеза и распада гликогена), в печени могут происходить ещё два противоположно направленных процесса — гликолиз и глюконеогенез. В большинстве других органов происходит только гликолиз. Переключение печени с гликолиза на глюконеогенез и обратно происходит с участием инсулина и глюкагона и осуществляется с помощью:

- аллостерической регуляции активности ферментов;
- ковалентной модификации ферментов путём фосфорилирования/дефосфорилирования;
- индукции/репрессии синтеза ключевых ферментов.

Регуляторные воздействия направлены на ферменты, катализирующие необратимые стадии гликолиза и глюконеогенеза, сочетание которых называют «субстратными», или «холостыми» циклами.

А. Регуляция скорости реакций гликолиза и глюконеогенеза, составляющих субстратные циклы

«Субстратные» циклы — парные комбинации процессов синтеза и распада метаболитов. Как уже упоминалось, сочетание процессов синтеза и распада гликогена или необратимых реакций гликолиза и соответствующих им необратимых реакций глюконеогенеза может составить подобный цикл. Название «субстратный цикл» означает объединение реакций синтеза и распада субстрата. Название «холостой» отражает результат работы подобного цикла, заключающийся в бесполезном расходовании АТФ. Хотя существование «холостых» циклов нелогично, тем не менее они могут функционировать. Более того, эти циклы могут быть мишенью регуляторных воздействий, так как составляющие их реакции катализируют разные ферменты. Реципрокное изменение активности этих ферментов предотвращает одновременное протекание противоположных процессов.

Изменение в печени гликолитического направления на глюконеогенез и обратно при смене абсорбтивного состояния на постабсорбтивное или при голодании происходит главным образом в результате регуляции активности ферментов, катализирующих реакции субстратных циклов. Эти циклы обозначены цифрами I, II, III на рис. 7-54, представляющем общую картину регуляции гликолиза и глюконеогенеза в печени.

Направление реакции первого субстратного цикла регулируется главным образом концентрацией глюкозы. При пищеварении концентрация глюкозы в крови повышается (до 8—10 ммоль/л). Активность глюкокиназы в этих условиях максимальна. Вследствие этого ускоряется гликолитическая реакция образования глюкозо-6-фосфата. Кроме того, инсулин индуцирует синтез глюкокиназы и ускоряет тем самым фосфорилирование глюкозы. Поскольку глюкокиназа печени не ингибируется глюкозо-6-фосфатом (в отличие от гексокиназы мышц), то основная часть глюкозо-6-фосфата в абсорбтивном периоде направляется на синтез гликогена и по гликолитическому пути.

Направление реакций второго субстратного цикла зависит от активности фосфофруктокиназы и фосфатазы фруктозо-1,6-бисфосфата. Активность этих ферментов зависит от концентрации фруктозо-2,6-бисфосфата. **Фруктозо-2,6-бисфосфат** — метаболит, образующийся в незначительных количествах из фруктозо-6-фосфата и выполняющий только регуляторные функции. Образование фруктозо-2,6-бисфосфата путём фосфорилирования фруктозо-6-фосфата катализирует **бифункциональный фермент** (БИФ), который катализирует также и обратную реакцию (рис. 7-55, А). Однако превращение фруктозо-2,6-бисфосфата в фруктозо-6-фосфат не является обратимым процессом. Образование фруктозо-2,6-бисфосфата требует затрат АТФ, а при образовании фруктозо-6-фосфата из фруктозо-2,6-бисфосфата гидролитически отщепляется неорганический фосфат.

В реакции фосфорилирования фруктозо-6-фосфата фермент проявляет киназную активность, а при дефосфорилировании образованного фруктозо-2,6-бисфосфата — фосфатазную. Это обстоятельство и определило название фермента «бифункциональный».

Киназная активность БИФ проявляется, когда фермент находится в дефосфорилированной форме (БИФ-ОН). Дефосфорилированная форма БИФ характерна для абсорбтивного периода, когда инсулин/глюкагоновый индекс высокий. В этот период количество фруктозо-2,6-бисфосфата увеличивается (рис. 7-55, Б).

При низком инсулин-глюкагоновом индексе, характерном для периода длительного голодания, происходит фосфорилирование БИФ, и он функционирует как фосфатаза. Результат — снижение количества фруктозо-2,6-бисфосфата.

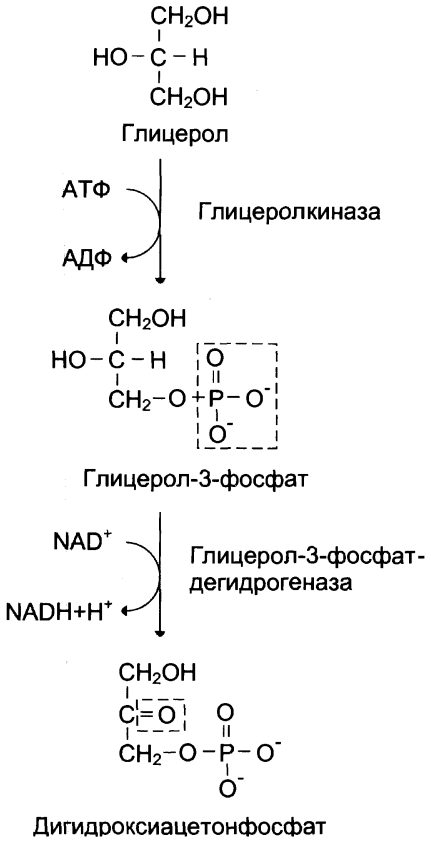


Рис. 7-53. Превращение глицерола в дигидроксиацетонфосфат.

Киназную и фосфатазную реакции катализируют разные активные центры БИФ, но в каждом из двух состояний фермента (фосфорилированном и дефосфорилированном) один из активных центров ингибирован. Регуляторное влияние фруктозо-2,6-бисфосфата заключается в том, что он аллостерически активирует фосфофруктокиназу (фермент гликолиза). При этом фруктозо-2,6-бисфосфат снижает ингибирующее действие АТФ на этот фермент в абсорбтивном периоде и повышает его сродство к фруктозо-6-фосфату. В то же время фруктозо-2,6-бисфосфат ингибирует фруктозо-1,6-бисфосфатазу (фермент глюконеогенеза). Итак, в абсорбтивном периоде уровень фруктозо-2,6-бисфосфата повышается, что приводит к активации фосфофруктокиназы и ускорению гликолиза.

Результатом уменьшения количества фруктозо-2,6-бисфосфата в постабсорбтивном перио-

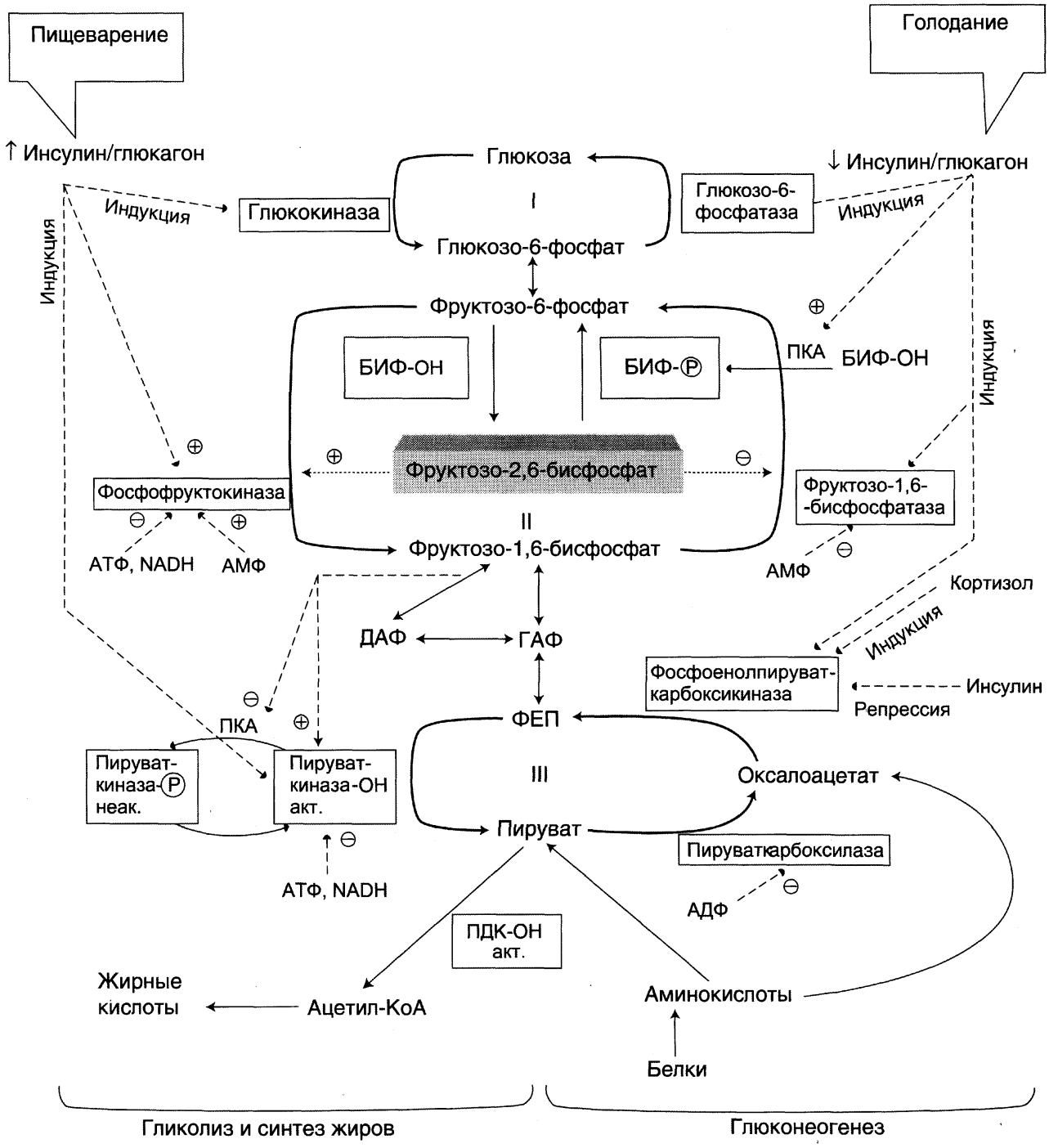


Рис. 7-54. Регуляция метаболизма глюкозы в печени. БИФ — бифункциональный фермент (фруктозо-2,6-бисфосфатаза/фосфофруктокиназа-2); БИФ-ОН — дефосфорилированный фермент; БИФ-Р — фосфорилированный фермент, ПДК-ОН — дефосфорилированный пируватдегидрогеназный комплекс; ПК-ОН — дефосфорилированная пируваткиназа; ГАФ — глицеральдегидфосфат; ДАФ — дигидроксиацетонфосфат, ФЕП — фосфоенолпируват. I–III — субстратные циклы: в рамках — регуляторные ферменты гликолиза и глюконеогенеза.

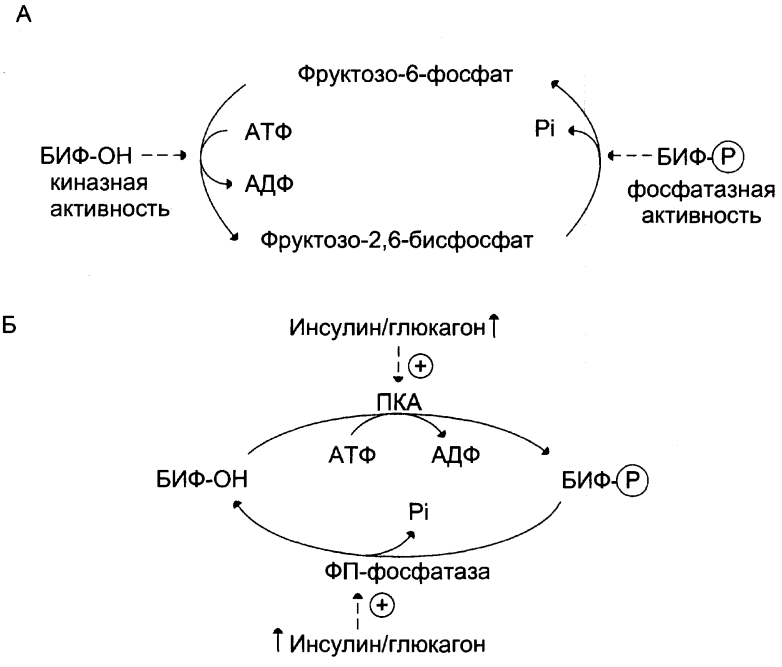


Рис. 7-55. Реакции, катализируемые бифункциональным ферментом (БИФ) в печени (А). Регуляция активности БИФ (Б).

де будет снижение активности фосфофруктокиназы, замедление гликолиза и переключение гликолиза на глюконеогенез. Регуляторное влияние фруктозо-2,6-бисфосфата представлено на рис. 7-56.

В регуляции третьего субстратного цикла основная роль принадлежит пируваткиназе, фосфорилированная форма которой неактивна, а дефосфорилированная — активна (рис. 7-57).

В период пищеварения инсулин активирует фосфопротеинфосфатазу, которая дефосфорилирует пируваткиназу, переводя её в активное состояние. Кроме того, инсулин в печени влияет на количество ферментов, индуцируя синтез пируваткиназы и репрессируя синтез фосфоенолпируваткарбоксикиназы. Следовательно, гликолитическая реакция фосфоенолпируват → пируват ускоряется при пищеварении. Эта же реакция замедляется в постабсорбтивном состоянии под влиянием глюкагона, который опосредованно через цАМФ-зависимую протеинкиназу фосфорилирует и инактивирует пируваткиназу.

При длительном голодании глюкагон ускоряет глюконеогенез. Это достигается не только путём фосфорилирования пируваткиназы и снижением скорости гликолиза, но и путём индукции синтеза ферментов глюконеогенеза: фосфоенолпируваткарбоксикиназы, фруктозо-1,6-бисфосфатазы и глюкозо-6-фосфатазы. Известно, что глюкагон, фосфорилируя опосредованно транскрипционные факторы, влияет на их активность и таким образом индуцирует синтез этих ферментов глюконеогенеза. Кроме того, синтез фосфоенолпируваткарбоксикиназы при длительном голодании индуцируется кортизолом, однако это происходит в результате включения другого механизма действия, характерного для стероидных гормонов (см. разделы 5, 11).

Координация скорости реакции II и III субстратных циклов достигается с помощью фруктозо-1,6-бисфосфата — продукта II субстратного цикла (гликолитическое направление), который является аллостерическим активатором пируваткиназы. В период пищеварения вследствие ускорения начальных стадий гликолиза концентрация фруктозо-1,6-бисфосфата повышается, что приводит к дополнительной активации пируваткиназы.

Общая картина регуляции процессов, составляющих метаболизм глюкозы в печени, представлена на рис. 7-54.

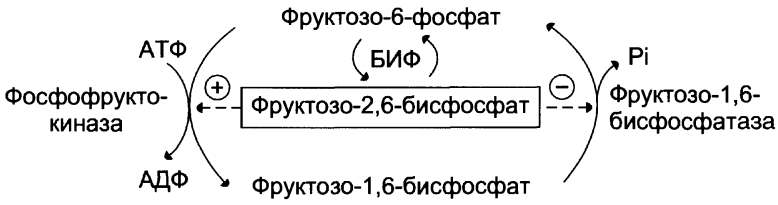


Рис. 7-56. Регуляция реакций II субстратного цикла фруктозо-2,6-бисфосфатом.

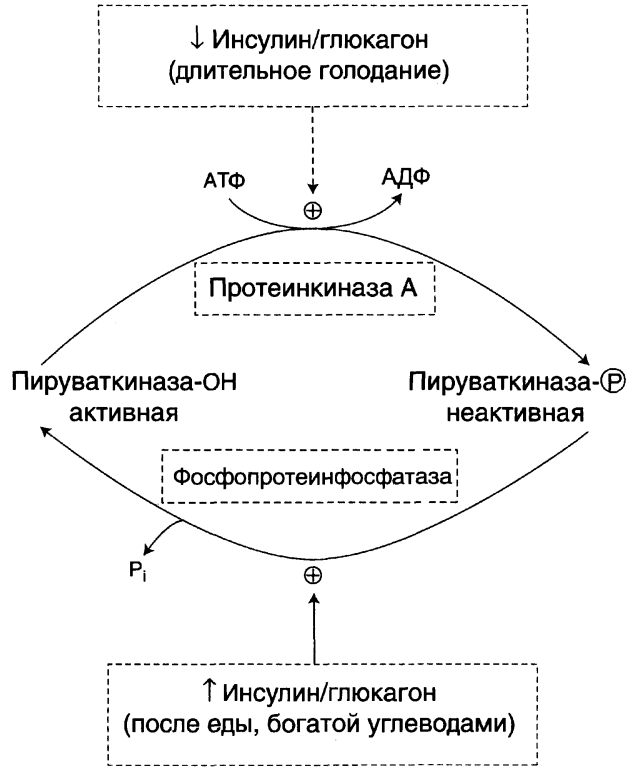


Рис. 7-57. Регуляция пируваткиназы в печени.

Необходимо отметить, что противоположные реакции каждого из субстратных циклов могут протекать одновременно. Соответственно, гликолиз и глюконеогенез в печени в какой-то мере тоже могут происходить одновременно, хотя их относительные скорости изменяются. Так, при пищеварении преобладает гликолитическое направление, а в постабсорбтивном состоянии — направление глюконеогенеза. Например, реакция глюконеогенеза пируват → оксалоацетат может протекать при любых состояниях организма. Это объясняется необходимостью поддерживать концентрацию оксалоацетата на определённом уровне, потому что оксалоацетат используется не только в глюконеогенезе, но и в других процессах, таких как цитратный цикл, трансмембранный перенос веществ, синтез аминокислот.

Б. Значение гликолиза в печени для синтеза жиров

Основным значением ускорения гликолиза в печени в период пищеварения является образование дигидроксиацетонфосфата и ацетил-

КоА — исходных веществ для синтеза жира. Образование ацетил-КоА из пирувата в ходе реакции, катализируемой ПДК, регулируется разными способами и подробно описывалось в разделе 6.

В абсорбтивном периоде ПДК находится в дефосфорилированной (активной) форме, следовательно, декарбоксилирование пирувата ускоряется. Образуемый ацетил-КоА используется в основном двумя путями: для синтеза жирных кислот и в цитратном цикле. В период пищеварения ускоряются образование ацетил-КоА и его использование для синтеза жирных кислот. Необходимый для синтеза жира α-глицерофосфат образуется в реакции восстановления из дигидроксиацетонфосфата (рис. 7-58). Подробно этот процесс рассматривается в разделе 8.

В. Аллостерическая регуляция аэробного распада глюкозы и глюконеогенеза в печени энергетическим статусом клетки

Аллостерическая регуляция скорости гликолиза, зависимая от изменения соотношения АТФ/АДФ, направлена на изменение скорости использования глюкозы непосредственно клетками печени. Глюкоза в клетках печени используется не только для синтеза гликогена и жиров, но также и как источник энергии для синтеза АТФ. *Основными потребителями* АТФ в гепатоцитах являются процессы трансмембранного переноса веществ, синтез белков, гликогена, жиров, глюконеогенез. От скорости утилизации АТФ в этих процессах зависит скорость его синтеза. АТФ, АДФ и АМФ, а также NAD^+ и NADH служат аллостерическими эффекторами некоторых гликолитических ферментов и ферментов глюконеогенеза. В частности, АМФ активирует фосфофруктокиназу и ингибирует фруктозо-1,6-бисфосфатазу. АТФ и NADH ингибируют пируваткиназу, а АДФ ингибирует пируваткарбоксилазу.

Следовательно, при усилении расходования АТФ и снижении его концентрации с одновременным увеличением концентрации АМФ, активируется гликолиз и образование АТФ, а глюконеогенез при этом замедляется. Кроме того, от соотношения АТФ/АДФ, АМФ и NAD/NADH зависит скорость реакций общего пути катаболизма (см. раздел 6).

XI. РЕГУЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

Результат регуляции метаболических путей превращения глюкозы — постоянство концентрации глюкозы в крови.

Концентрация глюкозы в артериальной крови в течение суток поддерживается на постоянном уровне 60—100 мг/дл (3,3—5,5 ммоль/л). После приёма углеводной пищи уровень глюкозы возрастает в течение примерно 1 ч до 150 мг/дл

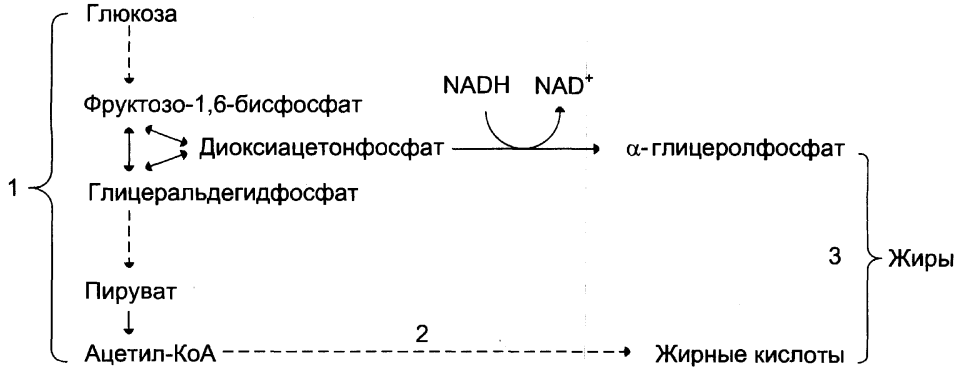


Рис. 7-58. Синтез жира из углеводов. 1 — окисление глюкозы до пирувата и окислительное декарбоксилирование пирувата приводят к образованию ацетил-КоА; 2 — ацетил-КоА является строительным блоком для синтеза жирных кислот; 3 — жирные кислоты и α-глицеролфосфат, образующийся в реакции восстановления дигидроксиацетонфосфата, участвуют в синтезе триацилглицеролов.

(~8 ммоль/л, алиментарная гипергликемия), а затем возвращается к нормальному уровню (примерно через 2 ч). На рисунке 7-59 представлен график изменений концентрации глюкозы в крови в течение суток при трёхразовом приёме пищи.

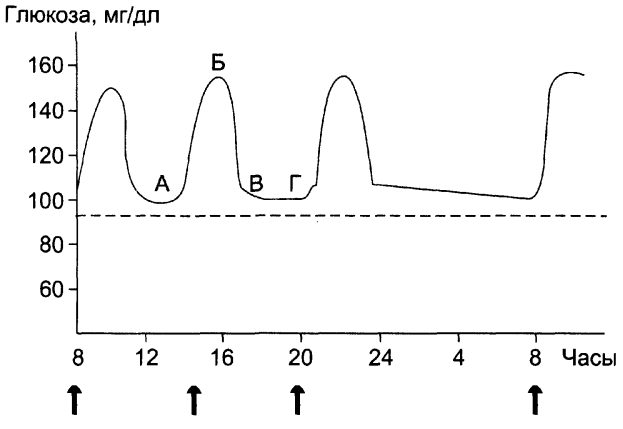


Рис. 7-59. Изменение концентрации глюкозы в крови в течение суток. А, Б — период пищеварения; В, Г — постабсорбтивный период. Стрелкой указано время приёма пищи, пунктиром показана нормальная концентрация глюкозы.

А. Регуляция содержания глюкозы в крови в абсорбтивном и постабсорбтивном периодах

Для предотвращения чрезмерного повышения концентрации глюкозы в крови при пищеварении основное значение имеет потребление глюкозы печенью и мышцами, в меньшей мере — жировой тканью. Следует напомнить, что более половины всей глюкозы (60%), поступающей из кишечника в воротную вену, поглощается печенью. Около 2/3 этого количества откладывается в печени в форме гликогена, остальная часть превращается в жиры и окисляется, обеспечивая синтез АТФ. Ускорение этих процессов инициируется повышением инсулин-глюкагонового индекса. Другая часть глюкозы, поступающей из кишечника, попадает в общий кровоток. Примерно 2/3 этого количества поглощается мышцами и жировой тканью. Это обусловлено увеличением проницаемости мембран мышечных и жировых клеток для глюкозы под влиянием высокой концентрации инсулина. Глюкоза в мышцах откладывается в форме гликогена, а в жировых клетках превращается в жиры. Остальная часть глюкозы общего кровотока поглощается другими клетками (инсулинонезависимыми).

При нормальном ритме питания и сбалансированном рационе концентрация глюкозы в крови и снабжение глюкозой всех органов поддерживается главным образом за счёт синтеза и распада гликогена. Лишь к концу ночного сна, т.е. к концу самого большого перерыва между приёмами пищи, может несколько увеличиться роль глюконеогенеза, значение которого будет возрастать, если завтрак не состоится и голодание продолжится (рис. 7-60).

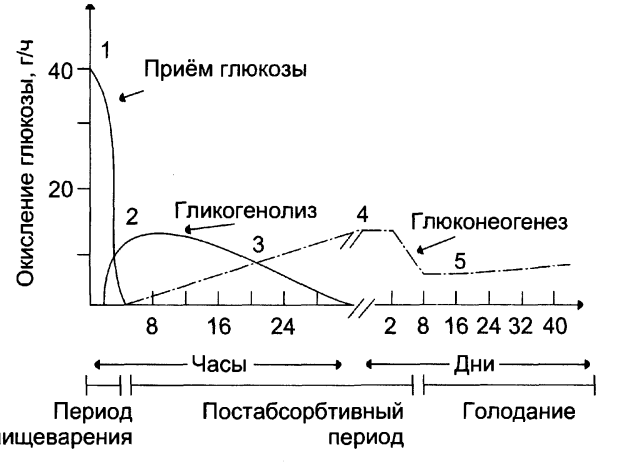


Рис. 7-60. Источники глюкозы в крови в период пищеварения и во время голодания. 1 — в период пищеварения углеводы пищи являются основным источником глюкозы в крови; 2 — в постабсорбтивный период печень поставляет глюкозу в кровь за счёт процессов гликогенолиза и глюконеогенеза, причём в течение 8–12 ч уровень глюкозы в крови поддерживается в основном за счёт распада гликогена; 3 — глюконеогенез и гликоген в печени участвуют в равной степени в поддержании нормальной концентрации глюкозы; 4 — в течение суток гликоген печени практически полностью исчерпывается, и скорость глюконеогенеза увеличивается; 5 — при длительном голодании (1 нед и более) скорость глюконеогенеза уменьшается, но глюконеогенез остаётся единственным источником глюкозы в крови.

Б. Регуляция содержания глюкозы в крови при длительном голодании

При голодании в течение первых суток исчерпываются запасы гликогена в организме, и в дальнейшем источником глюкозы служит

только глюконеогенез (из лактата, глицерина и аминокислот). Глюконеогенез при этом ускоряется, а гликолиз замедляется вследствие низкой концентрации инсулина и высокой концентрации глюкагона (механизм этого явления описан ранее). Но, кроме того, через 1-2 сут существенно проявляется действие и другого механизма регуляции — индукции и репрессии синтеза некоторых ферментов: снижается количество гликолитических ферментов и, наоборот, повышается количество ферментов глюконеогенеза. Изменение синтеза ферментов также связано с влиянием инсулина и глюкагона (механизм действия рассматривается в разделе 11).

Начиная со второго дня голодания достигается максимальная скорость глюконеогенеза из аминокислот и глицерина. Скорость глюконеогенеза из лактата остаётся постоянной. В результате синтезируется около 100 г глюкозы ежесуточно, главным образом в печени.

Следует отметить, что при голодании глюкоза не используется мышечными и жировыми клетками, поскольку в отсутствие инсулина не проникает в них и таким образом сберегается для снабжения мозга и других глюкозозависимых клеток. Поскольку при других условиях мышцы — один из основных потребителей глюкозы, то прекращение потребления глюкозы мышцами при голодании имеет существенное значение для обеспечения глюкозой мозга. При достаточно продолжительном голодании (несколько дней и больше) мозг начинает использовать и другие источники энергии (см. раздел 8).

Вариантом голодания является несбалансированное питание, в частности такое, когда по калорийности рацион содержит мало углеводов — углеводное голодание. В этом случае также активируется глюконеогенез, и для синтеза глюкозы используются аминокислоты и глицерол, образующиеся из пищевых белков и жиров.

В. Регуляция содержания глюкозы в крови в период покоя и во время физической нагрузки

Как в период покоя, так и во время продолжительной физической работы сначала источником глюкозы для мышц служит гликоген, запасённый в самих мышцах, а затем глюкоза крови. Известно, что 100 г гликогена расходуется на бег примерно в течение 15 мин, а запасы гликогена в мышцах после приёма углеводной пищи могут составлять 200–300 г. На рисунке 7-61 представлены значения гликогена печени и глюконеогенеза для обеспечения глюкозой работы мышц разной интенсивности и продолжительности. Регуляция мобилизации гликогена в мышцах и печени, а также глюконеогенеза в печени описана ранее (главы VII, X).

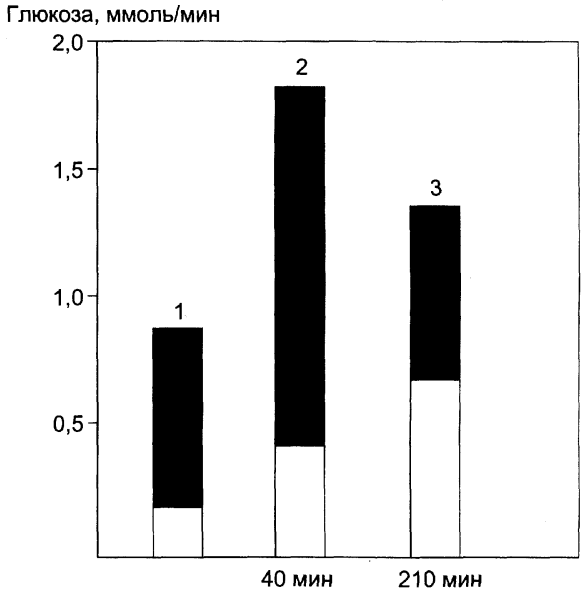


Рис. 7-61. Вклад гликогена печени и глюконеогенеза в поддержание уровня глюкозы крови в период покоя и во время продолжительных физических упражнений. Тёмная часть столбика — вклад гликогена печени в поддержание уровня глюкозы в крови; светлая — вклад глюконеогенеза. При увеличении продолжительности физической нагрузки с 40 мин (2) до 210 мин (3) распад гликогена и глюконеогенез практически в равной степени обеспечивают кровь глюкозой. 1 — состояние покоя (постабсорбтивный период); 2, 3 — физическая нагрузка.

Итак, изложенные сведения позволяют сделать вывод о том, что координация скоростей гликолиза, глюконеогенеза, синтеза и распада гликогена с участием гормонов обеспечивает:

- предотвращение чрезмерного повышения концентрации глюкозы в крови после приёма пищи;

- запасание гликогена и его использование в промежутках между приёмами пищи;
- снабжение глюкозой мышц, потребность которых в энергии быстро возрастает при мышечной работе;
- снабжение глюкозой клеток, которые при голодании в качестве источника энергии используют преимущественно глюкозу (нервные клетки, эритроциты, мозговое вещество почек, семенники).

XII. ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ ПРЕВРАЩЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ

Пентозофосфатный путь, называемый также гексомонофосфатным шунтом, служит альтернативным путём окисления глюкозо-6-фосфата. Пентозофосфатный путь состоит из 2 фаз (частей) — окислительной и неокислительной.

В окислительной фазе глюкозо-6-фосфат необратимо окисляется в пентозу — рибулозо-5-фосфат, и образуется восстановленный NADPH.

В неокислительной фазе рибулозо-5-фосфат обратимо превращается в рибозо-5-фосфат и метаболиты гликолиза.

Пентозофосфатный путь обеспечивает клетки рибозой для синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов и гидрированным коферментом NADPH, который используется в восстановительных процессах.

Суммарное уравнение пентозофосфатного пути выражается следующим образом:

3 Глюкозо-6-фосфат + 6 $NADP^+$ → 3 CO_2 + 6 ($NADPH + H^+$) + 2 Фруктозо-6-фосфат + Глицеральдегид-3-фосфат.

Ферменты пентозофосфатного пути, так же, как и ферменты гликолиза, локализованы в цитозоле.

Наиболее активно пентозофосфатный путь протекает в жировой ткани, печени, коре надпочечников, эритроцитах, молочной железе в период лактации, семенниках.

А. Окислительный этап

В окислительной части пентозофосфатного пути глюкозо-6-фосфат подвергается окислительному декарбоксилированию, в результате которого образуются пентозы. Этот этап включает 2 реакции дегидрирования.

Первая реакция дегидрирования — превращение глюкозо-6-фосфата в глюконолактон-6-фосфат — катализируется $NADP^+$-зависимой глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой и сопровождается окислением альдегидной группы у первого атома углерода и образованием одной молекулы восстановленного кофермента NADPH.

Далее глюконолактон-6-фосфат быстро превращается в 6-фосфоглюконат при участии фермента глюконолактонгидратазы.

Фермент 6-фосфоглюконатдегидрогеназа катализирует вторую реакцию дегидрирования окислительной части, в ходе которой происходит также и декарбоксилирование. При этом углеродная цепь укорачивается на один атом углерода, образуется рибулозо-5-фосфат и вторая молекула гидрированного NADPH (рис. 7-62).

Восстановленный NADPH ингибирует первый фермент окислительного этапа пентозофосфатного пути — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу. Превращение NADPH в окисленное состояние $NADP^+$ приводит к ослаблению ингибирования фермента. При этом скорость соответствующей реакции возрастает, и образуется большее количество NADPH.

Суммарное уравнение окислительного этапа пентозофосфатного пути можно представить в виде:

Глюкозо-6-фосфат + 2 $NADP^+$ + H_2O → Рибулозо-5-фосфат + 2 ($NADPH + H^+$) + CO_2.

Реакции окислительного этапа служат основным источником NADPH в клетках. Гидриро-ванные коферменты снабжают водородом биосинтетические процессы, окислительно-восстановительные реакции, включающие защиту клеток от активных форм кислорода. NADPH как донор водорода участвует в анаболических процессах, например в синтезе холестерина. Это источник восстановительных эквивалентов для цитохрома P_{450}, катализирующего образование гидроксильных групп при синтезе стероидных гормонов, жёлчных кислот, при катаболизме лекарственных веществ и других чужеродных соединений (см. разделы 8, 11, 12). Высокая активность фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы обнаружена в фагоцитирующих лейкоцитах, где NADPH-оксидаза использует восстановленный NADPH для образования супероксидного иона из молекулярного кислорода. Супероксидный ион генерирует другие активные формы кислорода, под действием которых и

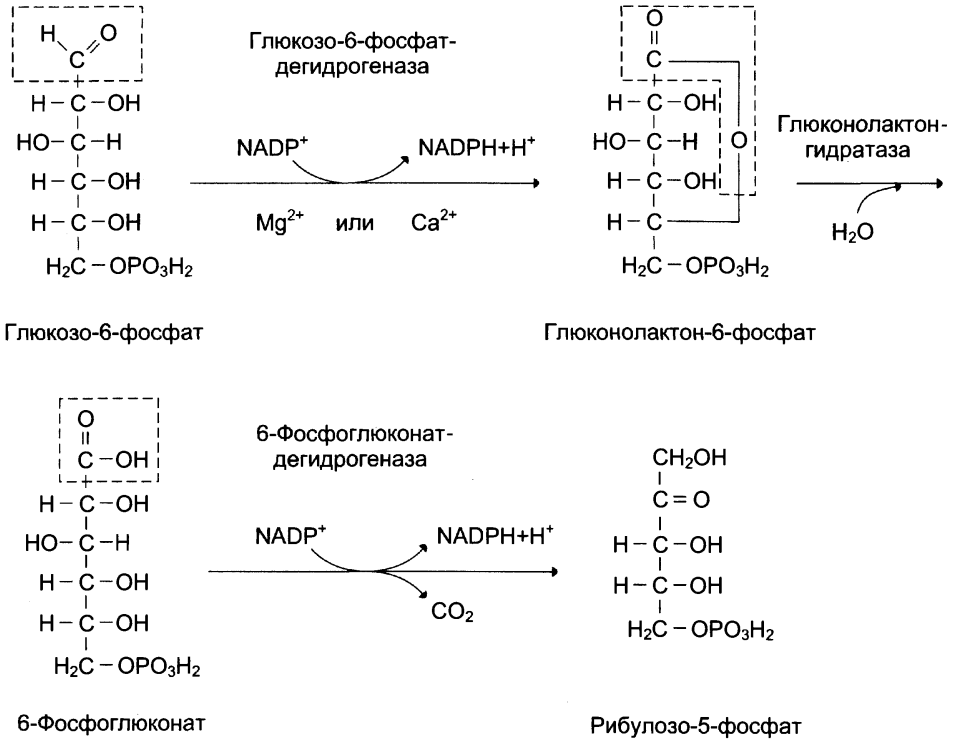


Рис. 7-62. Окислительный этап пентозофосфатного пути.

повреждаются молекулы ДНК, белков, липидов бактериальных клеток. Синтез жирных кислот из углеводов в печени является основным путём утилизации NADPH и обеспечивает регенерацию окисленной формы $NADP^+$. В печени глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, как и ключевые ферменты гликолиза и биосинтеза жирных кислот, индуцируется при увеличении соотношения инсулин/глюкагон после приёма богатой углеводами пищи.

Несмотря на то, что NADPH образуется также при окислении малата до пирувата и диоксида углерода (при участии $NADP^+$-зависимой малатдегидрогеназы) и дегидрировании изоцитрата (при участии $NADP^+$-зависимой изоцитратдегидрогеназы), в большинстве случаев потребности клеток в восстановительных эквивалентах удовлетворяются за счёт пентозофосфатного пути.

Реакции окислительного пути протекают только в том случае, если восстановленный кофермент NADPH возвращается в исходное окисленное состояние $NADP^+$ при участии NADPH-зависимых дегидрогеназ (т.е. при условии использования гидрированного NADPH в восстановительных процессах). Если потребности клетки в NADPH незначительны, рибозо-5-фосфат образуется в результате обратимых реакций неокислительного этапа пентозофосфатного пути, используя в качестве исходных веществ метаболиты гликолиза — глицеральдегид-3-фосфат и фруктозо-6-фосфат.

Б. Неокислительный этап

Неокислительный этап пентозофосфатного пути включает серию обратимых реакций, в результате которых рибулозо-5-фосфат превращается в рибозо-5-фосфат и ксилулозо-5-фосфат, и далее за счёт переноса углеродных фрагментов в метаболиты гликолиза — фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат. В этих превращениях принимают участие ферменты: эпимераза, изомераза, транскетолаза и трансальдолаза. Транскетолаза в качестве кофермента использует тиаминдифосфат. Неокислительный этап пентозофосфатного пути не включает реакции де-

гидрирования и поэтому используется только для синтеза пентоз.

Рибулозо-5-фосфат служит субстратом для двух ферментов. Фермент рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза изменяет стехиометрическое положение одной ОН-группы у третьего атома углерода, превращая рибулозо-5-фосфат в ксилулозо-5-фосфат. Другой фермент — рибулозо-5-фосфат-изомераза — катализирует превращение рибулозо-5-фосфата в рибозо-5-фосфат (рис. 7-63). Рибозо-5-фосфат, образующийся в неокислительной фазе, обеспечивает клетки рибозой, необходимой для синтеза нуклеотидов, которые служат предшественниками и структурными компонентами коферментов дегидрогеназ и нуклеиновых кислот.

Ферменты транскетолаза и трансальдолаза катализируют перенос двух- и трёхуглеродных фрагментов, соответственно используя в качестве донора углеродных фрагментов кетозу, а альдозу — в качестве акцептора. Эти реакции протекают в 2 этапа: сначала происходит отщепление углеродного фрагмента от молекулы-донора, а затем — перенос этого фрагмента на молекулу, выполняющую роль акцептора. Транскетолаза в неокислительной фазе пентозофосфатного пути катализирует 2 реакции. В первой реакции (рис. 7-64) транскетолаза расщепляет связь С-С между кетогруппой и соседним атомом углерода в молекуле ксилулозо-5-фосфат, в результате чего кетосахар превращается в альдозу, глицеральдегид-3-фосфат, содержащую на 2 атома углерода меньше. Образующийся после расщепления двухуглеродный фрагмент остаётся ковалентно связанным в каталитическом центре фермента с коферментом тиаминдифосфатом. Далее фермент переносит двухуглеродный фрагмент на альдегидную группу альдосахара, образую новую кетозу — седогептулозо-7-фосфат.

Трансальдолаза переносит трёхуглеродный фрагмент от седогептулозо-7-фосфата на глицеральдегид-3-фосфат, образуя эритрозо-4-фосфат и фруктозо-6-фосфат (рис. 7-65).

Эта реакция подобна реакции альдольного расщепления гликолитического пути, за исключением того, что в данном случае трёхуглеродный фрагмент, содержащий кетогруппу, переносится на альдосахар глицеральдегид-3-фосфат, а в гликолитическом пути кетофрагмент высвобождается в виде дигидроксиацетонфосфата.

В следующей реакции, катализируемой транскетолазой, происходит перенос двухуглеродного фрагмента от ксилулозо-5-фосфата на эритрозо-4-фосфат. Продуктами этой реакции являются фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат (рис. 7-66).

Так как все реакции неокислительного этапа обратимы, образование рибозо-5-фосфата может происходить не только в результате изомерного превращения продукта окислительной фазы пентозофосфатного пути рибулозо-5-фосфата в рибозо-5-фосфат под действием изомеразы, но также и из промежуточных продуктов гликолиза — фруктозо-6-фосфата и глицеральдегид-3-фосфата. Последовательность превращений, приводящих к образованию рибозо-5-фосфата из таких продуктов гликолитического пути, можно представить в виде:

2 Фруктозо-6-фосфат + Глицеральдегид-3-фосфат → 2 Ксилулозо-5-фосфат + Рибозо-5-фосфат

2 Ксилулозо-5-фосфат → 2 Рибулозо-5-фосфат

2 Рибулозо-5-фосфат → 2 Рибозо-5-фосфат.

Суммарный результат метаболизма 3 молекул рибулозо-5-фосфата в неокислительной фазе пентозофосфатного пути — образование 2 молекул фруктозо-6-фосфата и 1 молекулы глицеральдегид-3-фосфата. Далее фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат могут превратиться в глюкозу. С учётом стехиометрического коэффициента, равного 2, для образования 5 молекул глюкозы (содержащих 30 атомов углерода) потребуются 4 молекулы фруктозо-6-фосфата и 2 молекулы глицеральдегид-3-фосфата (в сумме содержащие также 30 атомов углерода) или, соответственно, 6 молекул рибулозо-5-фосфата. Таким образом, неокислительный путь можно представить как процесс возвращения пентоз в фонд гексоз.

В. Пентозофосфатный цикл

Окислительный этап образования пентоз и неокислительный этап (путь возвращения пентоз в гексозы) составляют вместе циклический процесс.

Такой процесс можно описать общим уравнением:

6 Глюкозо-6-фосфат + 12 $NADP^+$ + 2 H_2O → 5 Глюкозо-6-фосфат + 12 NADPH +12 H^+ + 6 CO_2.

Это означает, что из 6 молекул глюкозы образуются 6 молекул рибулозо-5-фосфат (пентозы) и 6 молекул CO_2. Ферменты неокислительной

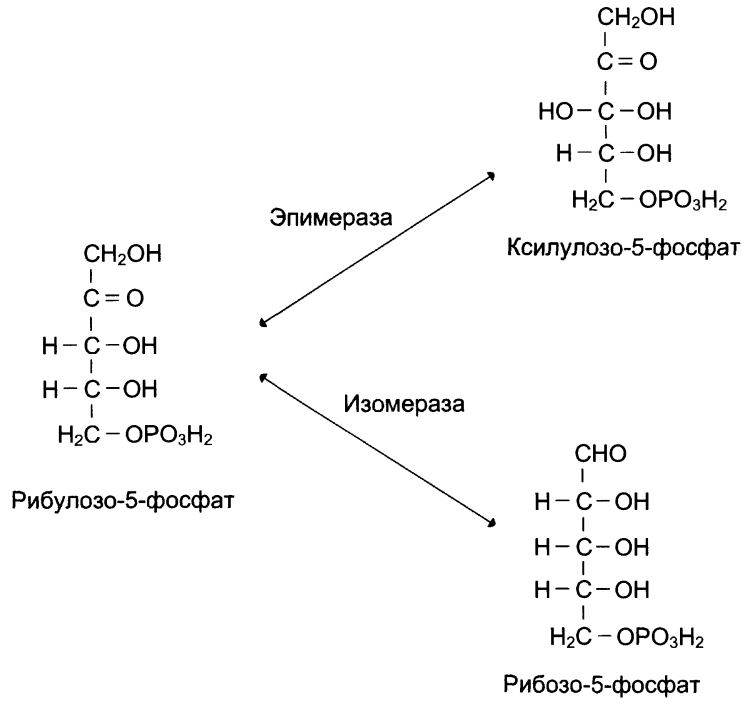


Рис. 7-63. Превращения рибулозо-5-фосфата.

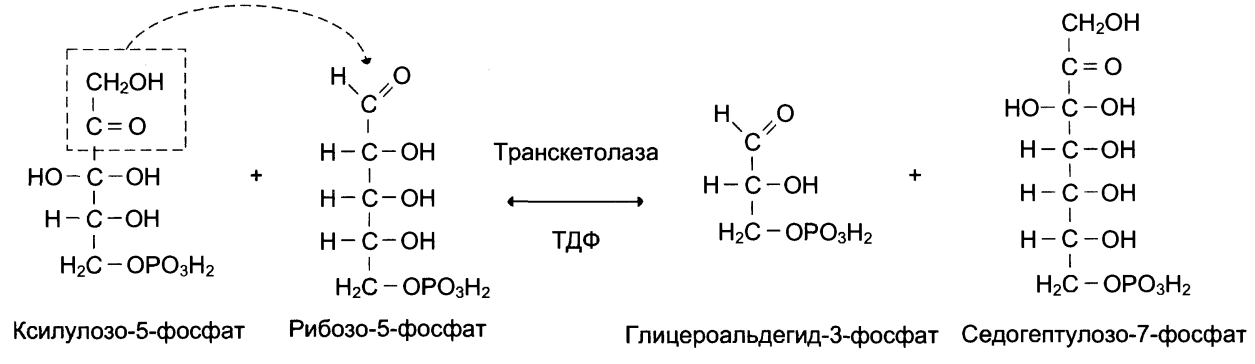


Рис. 7-64. Реакция переноса двухуглеродного фрагмента, катализируемая транскетолазой.

фазы превращают 6 молекул рибулозо-5-фосфат в 5 молекул глюкозы (гексозы). При последовательном проведении этих реакций единственным полезным продуктом является NADPH, образующийся в окислительной фазе пентозофосфатного пути. Такой процесс называют пентозофосфатным циклом (рис. 7-67).

Протекание пентозофосфатного цикла позволяет клеткам продуцировать NADPH, необходимый для синтеза жиров, не накапливая пентозы.

Энергия, выделяющаяся при распаде глюкозы, трансформируется в энергию высокоэнергетического донора водорода — NADPH. Гидрированный NADPH служит источником водорода для восстановительных синтезов, а энергия NADPH преобразуется и сохраняется во вновь синтезированных веществах, напри-

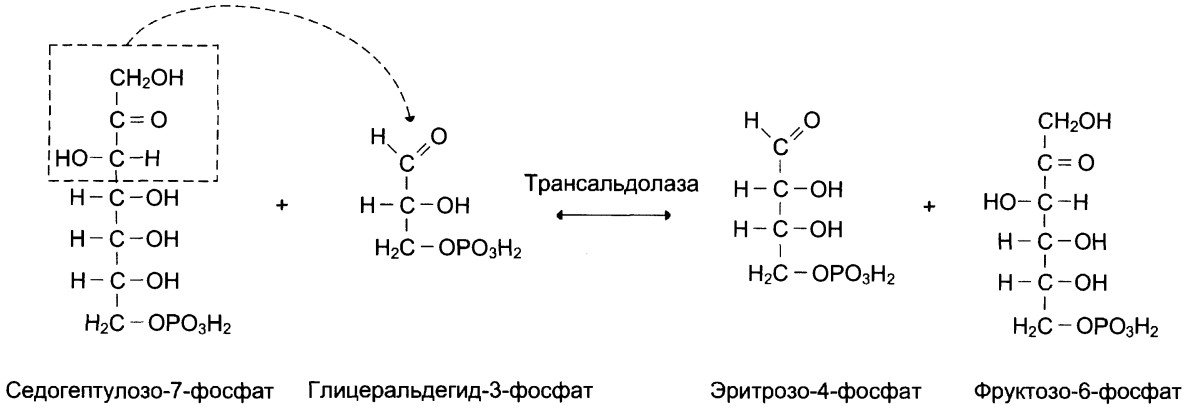


Рис. 7-65. Реакция, катализируемая трансальдолазой.

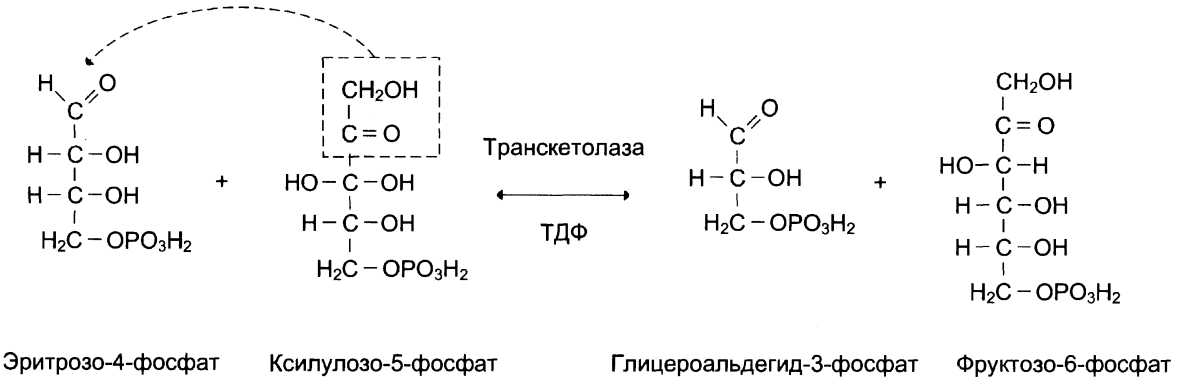


Рис. 7-66. Реакция, катализируемая транскетолазой.

мер жирных кислотах, высвобождается при их катаболизме и используется клетками.

Г. Дефект глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы в эритроцитах

Неферментативное окисление гемоглобина (Fe^{2+}) в метгемоглобин (Fe^{3+}) приводит к одноэлектронному восстановлению кислорода и появлению реакционно-способного анион-радикала — супероксида O_2^-, который служит предшественником других активных форм кислорода: пероксида водорода H_2O_2 и гидроксильного радикала OH^-. Активные формы кислорода являются сильнейшими окислителями и поэтому способны вызывать серьёзные повреждения молекул ДНК, белков, ненасыщенных липидов.

В эритроцитах, как и в большинстве клеток, присутствует тиолсодержащий трипептид — глутатион (γ-глутамил-цистенил-глицин). Восстановленная форма глутатиона (Г-SH) содержит SH-группу (рис. 7-68), которая может служить донором электронов в реакциях восстановления. Под действием фермента глутатионпероксидазы восстановленный глутатион превращает молекулу пероксида водорода в молекулу воды, а сам переходит в окисленное состояние (Г-SS-Г). Регенерацию восстановленного глутатиона обеспечивает глутатионредуктаза, используя в качестве донора водорода гидрированный NADPH. Для эритроцитов единственным источником получения NADPH служит пентозофосфатный путь, для других тканей существует альтернативный способ — при участии NADH-зависимой малатдегидрогеназы (малик-фермент).

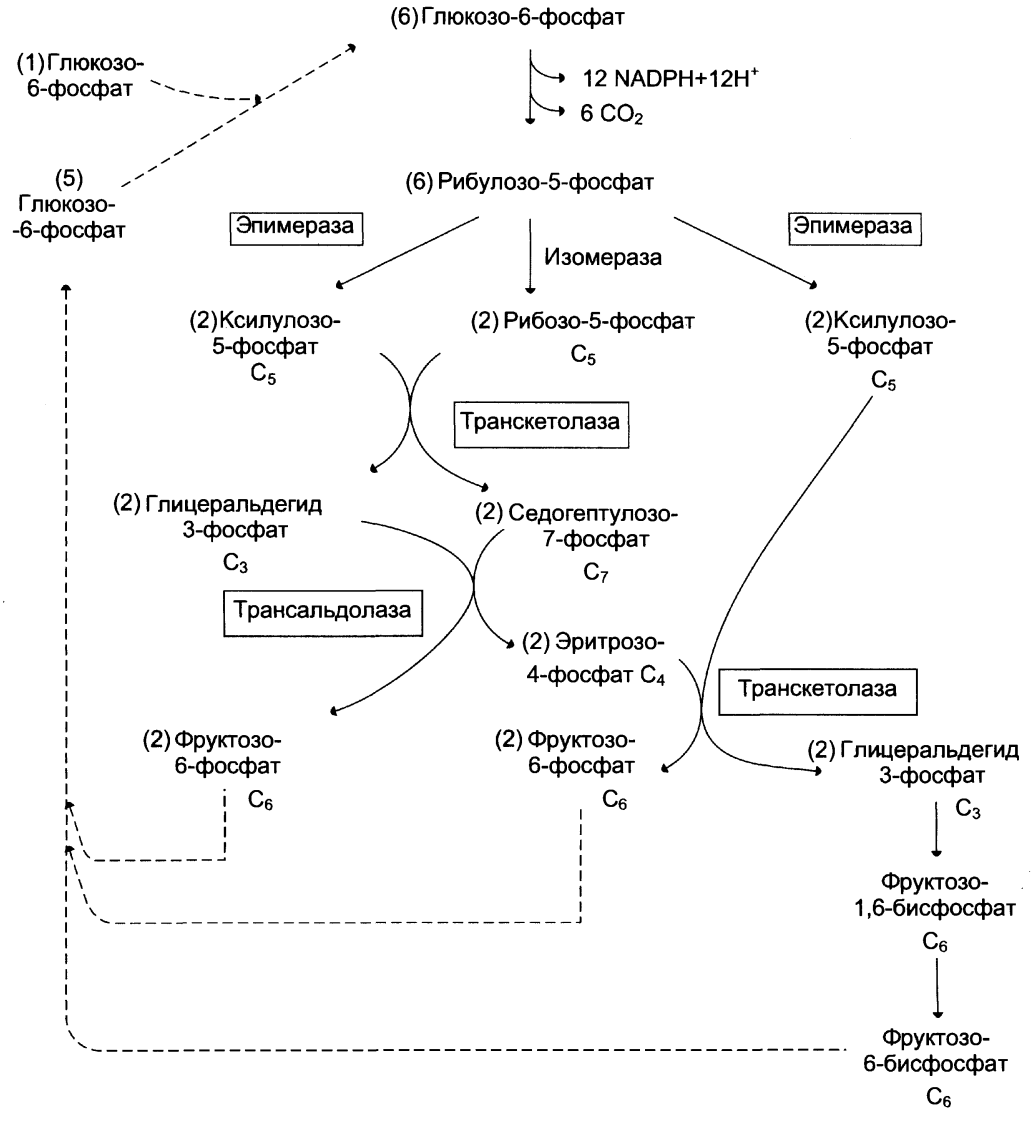


Рис. 7-67. Пентозофосфатный цикл в жировой ткани.

Взаимодействие восстановленного глутатиона с пероксидом водорода в эритроцитах предохраняет цистеиновые остатки в протомерах гемоглобина от окисления. При генетическом дефекте глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы концентрация восстановленного кофермента NADPH уменьшается, в результате чего резко снижается концентрация восстановленного глутатиона, а в клетке, соответственно, увеличивается количество активных форм кислорода. В этом случае окисление SH-групп молекул гемоглобина в эритроцитах приводит к образованию перекрёстных дисульфидных связей и агрегации протомеров гемоглобина с формированием телец Хайнца (см. раздел 14). В присутствии телец Хайнца пластичность мембраны нарушается, и она теряет способность к деформации при прохождении эритроцитов через капилляры. Это вызывает нарушение целостности мембраны, что приводит к гемолизу эритроцитов. Некоторые лекарственные вещества, например антималярийный препарат примахин, сульфаниламиды, также снижают способность

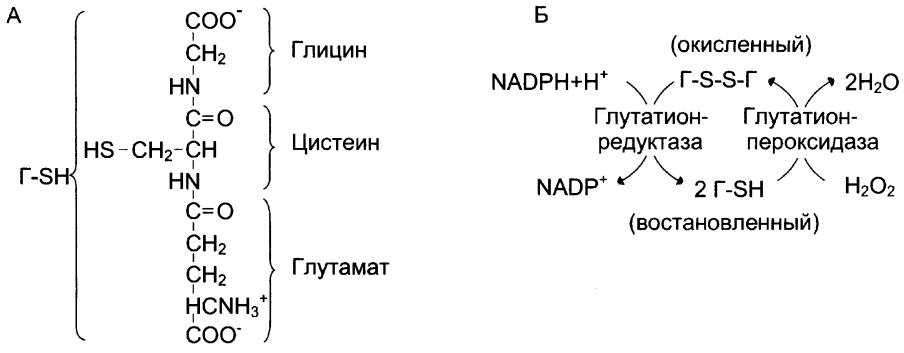


Рис. 7-68. Восстановление глутатиона под действием глутатионредуктазы. А — строение глутатиона; Б — восстановление глутатиона.

эритроцитов бороться с активными формами кислорода.

XIII. МЕТАБОЛИЗМ ФРУКТОЗЫ И ГАЛАКТОЗЫ

Метаболизм фруктозы и галактозы включает пути использования их для синтеза других веществ (гетерополисахаридов, лактозы и др.) и участие в энергообеспечении организма. В последнем случае фруктоза и галактоза превращаются в печени либо в глюкозу, либо в промежуточные продукты её метаболизма. Таким образом, в результате фруктоза и галактоза наряду с глюкозой могут быть окислены до CO_2 и H_2O или использованы на синтез гликогена и триацилглицеролов.

Причиной нарушения метаболизма фруктозы и галактозы может быть дефект ферментов, катализирующих промежуточные реакции их обмена. Эти нарушения встречаются относительно редко, но могут представлять достаточно серьёзную опасность, так как накапливаемые промежуточные метаболиты фруктозы и галактозы обладают токсичностью.

А. Метаболизм фруктозы

Значительное количество фруктозы, образующееся при расщеплении сахарозы, прежде чем поступить в систему воротной вены, превращается в глюкозу уже в клетках кишечника. Другая часть фруктозы всасывается с помощью белка-переносчика, т.е. путём облегчённой диффузии.

Метаболизм фруктозы (рис. 7-69) начинается с реакции фосфорилирования (реакция 1), катализируемой фруктокиназой с образованием фруктозо-1-фосфата. Фермент обнаружен в печени, а также в почках и кишечнике. Этот фермент обладает абсолютной специфичностью, поэтому, в отличие от глюкокиназы, инсулин не влияет на его активность. Последнее обстоятельство объясняет, почему уровень выведения фруктозы в моче у больных сахарным диабетом и здоровых не отличается. Фруктозо-1-фосфат не может превращаться во фруктозо-6-фосфат из-за отсутствия соответствующего фермента. Вместо этого фруктозо-1-фосфат далее расщепляется фруктозо-1-фосфатальдолазой (альдолаза В) на глицеральдегид и дигидроксиацетон-3-фосфат (реакция 2). Последний является промежуточным продуктом гликолиза и образуется в ходе реакции, катализируемой фруктозо-1,6-бисфосфосфатальдолазой (альдолаза А). Глицеральдегид может включаться в гликолиз после его фосфорилирования с участием АТФ (реакция 3). Две молекулы триозофосфатов либо распадаются по гликолитическому пути, либо конденсируются с образованием фруктозо-1,6-бисфосфата и далее участвуют в глюконеогенезе (реакции 8, 7, 5, 9). Фруктоза в печени включается главным образом во второй путь. Часть дигидроксиацетон-3-фосфата может восстанавливаться до глицерол-3-фосфата и участвовать в синтезе триацилглицеролов.

Следует отметить, что включение фруктозы в метаболизм через фруктозо-1-фосфат минует стадию, катализируемую фосфофруктокиназой (реакция 6), которая является пунктом метабо-

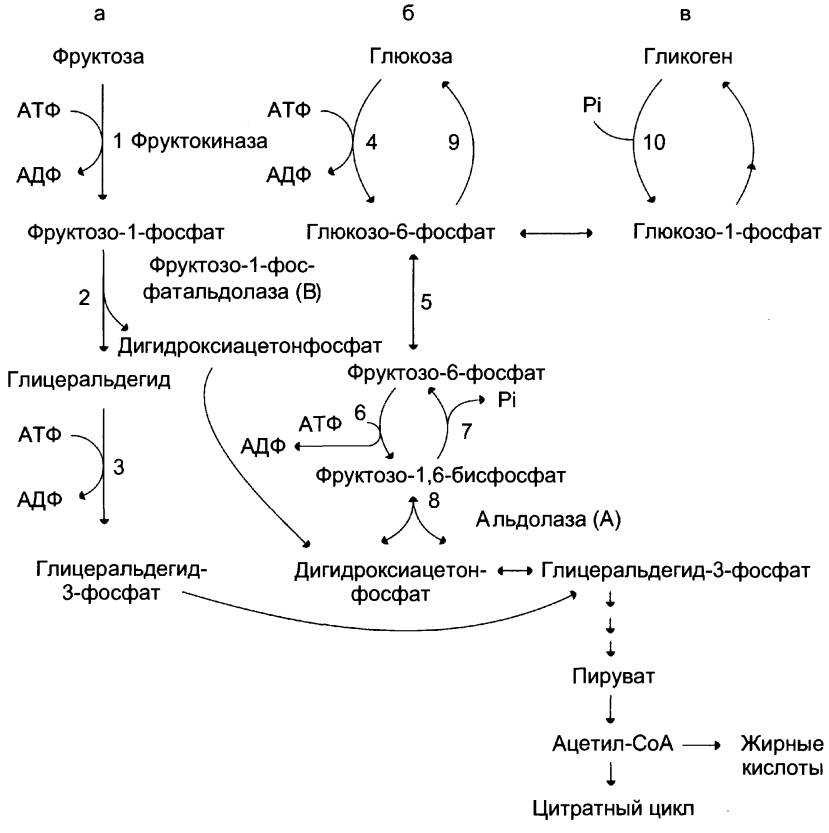


Рис. 7-69. Метаболизм фруктозы. а — превращение фруктозы в дигидроксиацетон-3-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат; б — путь включения фруктозы в гликолиз и глюконеогенез; в — путь включения фруктозы в синтез гликогена.

литического контроля скорости катаболизма глюкозы. Этим обстоятельством можно объяснить, почему увеличение количества фруктозы ускоряет в печени процессы, ведущие к синтезу жирных кислот, а также их этерификацию с образованием триацилглицеролов.

Б. Нарушения метаболизма фруктозы

Нарушения метаболизма фруктозы, причиной которых является дефект ферментов, отражены в табл. 7-5.

Недостаточность фруктокиназы клинически не проявляется. Фруктоза накапливается в крови и выделяется с мочой, где её можно обнаружить лабораторными методами. Очень важно не перепутать эту безвредную аномалию с сахарным диабетом. Данное заболевание известно как доброкачественная эссенциальная фруктозурия и встречается с частотой 1:130 000.

Наследственная непереносимость фруктозы, возникающая при генетически обусловленном дефекте фруктозо-1-фосфатальдолазы, не проявляется, пока ребёнок питается грудным молоком, т.е. пока пища не содержит фруктозы. Симптомы возникают, когда в рацион добавляют фрукты, соки, сахарозу. Рвота, боли в животе, диарея, гипогликемия и даже кома и судороги возникают через 30 мин после приёма пищи, содержащей фруктозу. У маленьких детей и подростков, продолжающих принимать фруктозу, развиваются хронические нарушения функций печени и почек. Непереносимость фруктозы — достаточно частая аутосомно-рецессивная форма патологии.

Дефект альдолазы фруктозо-1-фосфата сопровождается накоплением фруктозо-1-фосфата, который ингибирует активность фосфоглюкомутазы, превращающей глюкозо-1-фосфат в глюкозо-6-фосфат и обеспечивающей включение продукта гликогенфосфорилазной реакции

Таблица 7-5. Нарушения метаболизма фруктозы

Неактивный фермент	Блокируемая реакция	Локализация фермента	Клинические проявления и лабораторные данные
Фруктокиназа	Фруктоза + АТФ → Фруктозо-1-фосфат + АДФ	Печень Почки Энтероциты	Фруктоземия, фруктозурия
Фруктозо-1-фосфатальдолаза	Фруктозо-1-фосфат → Дигидроксиацетон-3-фосфат + Глицеральдегид	Печень	Рвота, боли в животе, диарея, гипогликемия, Гипофосфатемия, фруктоземия, гиперурикемия, хроническая недостаточность функций печени, почек.

в метаболизм. Поэтому происходит торможение распада гликогена на стадии образования глюкозо-1-фосфата, в результате чего развивается гипогликемия. Как следствие, ускоряется мобилизация липидов и окисление жирных кислот. Следствием ускорения окисления жирных кислот и синтеза кетоновых тел, замещающих энергетическую функцию глюкозы, может быть метаболический ацидоз (см. раздел 8), так как кетоновые тела являются кислотами и при высоких концентрациях снижают pH крови.

Результатом торможения гликогенолиза и гликолиза является снижение синтеза АТФ. Кроме того, накопление фосфорилированной фруктозы ведёт к нарушению обмена неорганического фосфата и гипофосфатемии.

Для пополнения внутриклеточного фосфата ускоряется распад адениловых нуклеотидов. Продукты распада этих нуклеотидов включаются в катаболизм, проходя стадии образования гипоксантина, ксантина и, наконец, мочевой кислоты. Повышение количества мочевой кислоты и снижение экскреции уратов в условиях метаболического ацидоза проявляются в виде гиперурикемии. Следствием гиперурикемии может быть подагра даже в молодом возрасте (см. раздел 10).

В. Метаболизм галактозы

Галактоза образуется в кишечнике в результате гидролиза лактозы. Чтобы превратить галактозу в глюкозу, необходимо изменить оптическую конфигурацию H- и OH-групп C_4 атома в галактозе, т.е. провести реакцию эпимеризации. Эта реакция в клетке возможна только с УДФ-производным галактозы. УДФ-галактоза образуется из УДФ-глюкозы (метаболит в синтезе гликогена) в ходе реакции, катализируемой уридилфосфат-4-эпимеразой (рис. 7-70, 7-71).

Однако включению галактозы в описанную реакцию эпимеризации предшествует её фосфорилирование с образованием галактозо-1-фосфата (реакция 1 на рис. 7-70). Далее галактозо-1-фосфат замещает остаток глюкозы в УДФ-глюкозе с образованием УДФ-галактозы (реакция 2), т.е. прямая реакция фосфорилированной галактозы с УТФ не происходит.

Реакцию 2 можно рассматривать как перенос уридильного остатка с УДФ-глюкозы на галактозу, поэтому фермент назван галактозо-1-фосфатуридилтрансферазой (ГАЛТ).

Затем галактоза в составе нуклеотида включается в реакцию эпимеризации, в которой участвует эпимераза — NAD-зависимый фермент, катализирующий окисление и восстановление галактозы по C_4 углеродному атому (реакция 3).

Эпимераза может работать и в другом направлении, преобразуя УДФ-глюкозу в УДФ-галактозу. Эта обратная эпимеризация важна для синтеза галактозильных остатков в гликолипидах и гликопротеинах. Кроме того, галактоза необходима для синтеза лактозы в грудных железах. В период лактации галактоза не является незаменимым компонентом пищи, так как может образовываться из глюкозы.

Глюкозо-1-фосфат, образованный в реакции 2, может включаться в разные метаболические пути: 1) синтез гликогена после реакции с УДФ и образования УДФ-глюкозы; 2) превращение в пе-

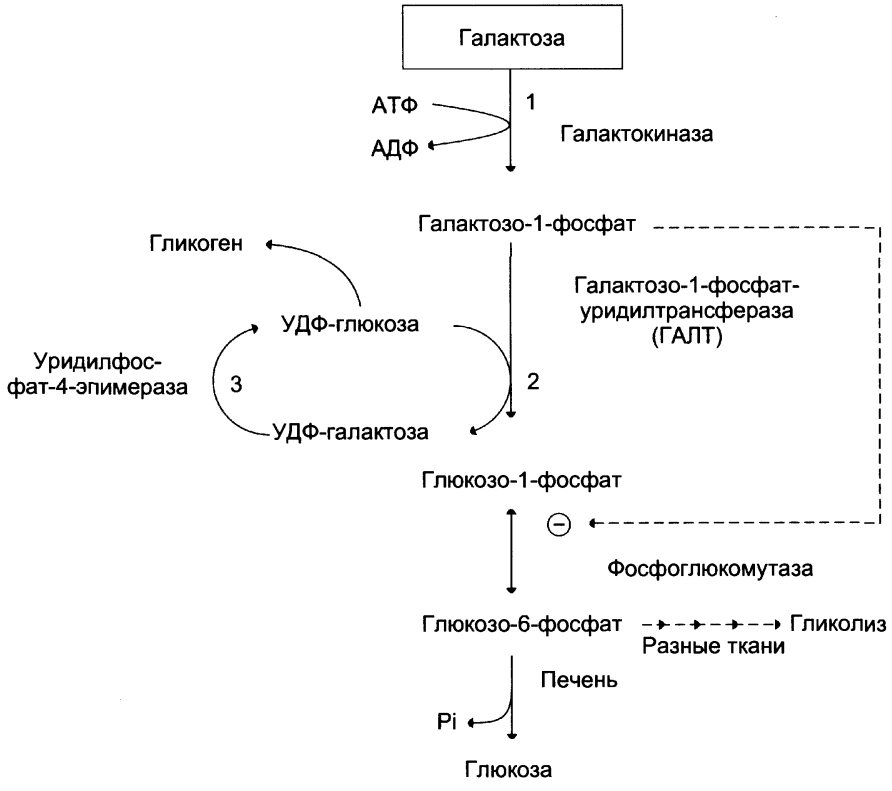


Рис. 7-70. Обмен галактозы.

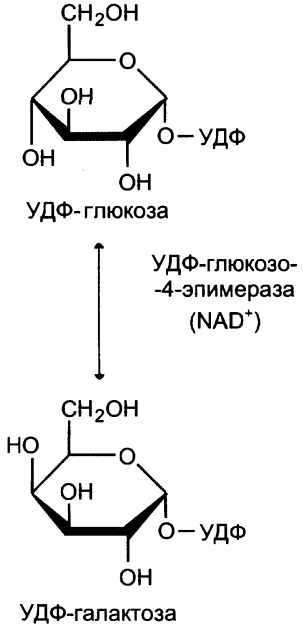


Рис. 7-71. Реакция эпимеризации УДФ-глюкозы в УДФ-галактозу.

чени в свободную глюкозу и поддержание её концентрации в крови; 3) катаболизм, сопряжённый с синтезом АТФ, и т.д. (см. рис. 7-70).

Г. Нарушения метаболизма галактозы

Обмен галактозы особенно интересен в связи с наследственным заболеванием — галактоземией.

Галактоземия возникает при нарушении обмена галактозы, обусловленном наследственным дефектом любого из трёх ферментов, включающих галактозу в метаболизм глюкозы (табл. 7-6).

Галактоземия, вызванная недостаточностью галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы (ГАЛТ), наиболее хорошо изучена. Это заболевание проявляется очень рано, и особенно опасно для детей, так как основным источником углеводов для них служит материнское молоко, содержащее лактозу. Ранние симптомы дефекта ГАЛТ: рвота, диарея, дегидратация, уменьшение массы тела, желтуха. Они появляются вскоре после рождения, как только ребёнок начинает получать молоко. В крови, моче и тканях повышается концентрация галактозы и галактозо-1-фосфата. В тканях глаза (в хрусталике) галактоза восстанавливается альдоредуктазой с образованием галактитола (дульцита). В этой реакции в качестве донора водорода используется NADPH. Восстановление галактозы происходит и в ходе нормального метаболизма, но протекает с небольшой скоростью. При галактоземии галактитол накапливается в стекловидном теле и связывает большое количество воды. Вследствие этого нарушается баланс электролитов, а чрезмерная гидратация хрусталика приводит к развитию катаракты, которая наблюдается уже через несколько дней после рождения.

Тяжёлые последствия дефекта ГАЛТ наблюдают в печени. Это связано с накоплением галактозо-1-фосфата и его токсическим действием на гепатоциты. В результате возникают нарушения функции печени: гепатомегалия, жировая дистрофия. В почках таких больных также повышена концентрация галактитола и галактозо-1-фосфата, что влияет на их функции. Отмечают нарушения в клетках полушарий головного мозга и мозжечка, в тяжёлых случаях — отёк мозга, задержку умственного развития, возможен летальный исход.

Для галактоземии, вызванной дефектом галактокиназы, тоже характерна катаракта, но при этом заболевании, в отличие от дефекта ГАЛТ, не отмечают нарушений функций печени, почек, мозга. Наиболее тяжёлые последствия снижения активности ГАЛТ связывают с влиянием галактозо-1-фосфата на активность других ферментов, участвующих в углеводном

Таблица 7-6. Нарушения обмена галактозы

Дефектный фермент (частота)	Блокируемая реакция	Клинические проявления и лабораторные данные
Галактокиназа (1:500 000)	Галактоза + АТФ → Галактозо-1 фосфат + АДФ	Галактоземия, галактозурия, катаракта. Активность фермента в эритроцитах нормальная.
Галактозо-1-фосфат-уридилтрансфераза (1:40 000)	Галактозо-1 фосфат + УДФ-глюкоза → УДФ-галактоза + Глюкозо-1-фосфат	Галактоземия, галактозурия, галактозо-1-фосфатемия, катаракта. Тенденция к гипогликемии, компенсаторная мобилизация жиров, цирроз печени, нарушения функции почек. Гепатомегалия, задержка психического развития. Активность фермента в эритроцитах снижена.
Уридилфосфат-4-эпимераза (1:1 000 000)	УДФ-глюкоза ↔ УДФ-галактоза	Галактоземия, галактозурия. Тяжёлых клинических проявлений нет. Описаны единичные случаи заболевания.

Таблица 7-7. Некоторые варианты генетического дефекта ГАЛТ

Изменения в структуре ГАЛТ	Проявления
Асн→Асп	Признак Дюарта. У гетерозигот при этом варианте активность фермента составляет 75% от нормальной. Гомозиготный фенотип Дюарта обычно связан с 50% потерей активности. Пациенты с синдромом Дюарта могут быть здоровыми, несмотря на структурную аномалию ГАЛТ.
Глн→Арг	Проявляется как тяжёлая галактоземия. Причина — мутация типа замены нуклеотида 591 в гене фермента. Активность ГАЛТ составляет 10% от нормы. Эта форма встречается в 70% случаев заболевания галактоземией среди европеоидов, частота — 1:338 886.
Сер→Лей	Заболевание описано у чернокожих пациентов и названо «чёрный признак». Галактоземия проявляется как результат недостаточной активности ГАЛТ в печени и эритроцитах. Активность ГАЛТ в печени составляет 10% от нормы. Тем не менее отмечалась утилизация некоторого количества галактозы, что объяснялось развитием альтернативного пути. Причина — мутация типа замены 1158-го нуклеотида в гене фермента.
Арг→Три	Тяжёлая форма галактоземии. Причина — миссенс-мутация нуклеотида 1025 в гене фермента. Активность ГАЛТ отсутствует.
Лиз→Асн	Широко распространённая мутация при галактоземии.

обмене (фосфоглюкомутазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы).

Известно несколько форм галактоземии, причиной которой является недостаточность ГАЛТ (табл. 7-7).

Некоторые дефекты в строении ГАЛТ приводят лишь к частичной потере активности фермента. Поскольку в норме ГАЛТ присутствует в организме в избытке, то снижение его активности до 50%, а иногда и ниже может клинически не проявляться.

При диагностике галактоземии исследуют мочу на содержание галактозы, собранную после нескольких кормлений молоком. При обнаружении у ребёнка катаракты его обследуют на недостаточность галактокиназы и ГАЛТ. Наличие галактозы в моче при отсутствии нарушений функции печени указывает на дефект галактокиназы. При обследовании проведение теста с нагрузкой галактозой не рекомендуется, так как этот тест опасен для больных. Лечение заключается в удалении галактозы из рациона.

РАЗДЕЛ 8

ОБМЕН ЛИПИДОВ

Термин «липиды» объединяет вещества, обладающие общим физическим свойством — гидрофобностью, т.е. нерастворимостью в воде. По структуре липиды настолько разнообразны, что у них отсутствует общий признак химического строения. Липиды разделяют на классы, в которые объединяют молекулы, имеющие сходное химическое строение и общие биологические свойства.

Основную массу липидов в организме составляют жиры — триацилглицеролы, служащие формой депонирования энергии. Жиры располагаются преимущественно в подкожной жировой ткани и выполняют также функции теплоизоляционной и механической защиты.

Фосфолипиды — большой класс липидов, получивший своё название из-за остатка фосфорной кислоты, придающего им свойства амфифильности. Благодаря этому свойству фосфолипиды формируют бислойную структуру мембран, в которую погружены белки. Клетки или отделы клеток, окружённые мембранами, отличаются по составу и набору молекул от окружающей среды, поэтому химические процессы в клетке разделены и ориентированы в пространстве, что необходимо для регуляции метаболизма.

Стероиды, представленные в животном мире холестеролом и его производными, выполняют разнообразные функции. Холестерол — важный компонент мембран и регулятор свойств гидрофобного слоя. Производные холестерола (жёлчные кислоты) необходимы для переваривания жиров. Стероидные гормоны, синтезируемые из холестерола, участвуют в регуляции энергетического, водно-солевого обменов, половых функций. Кроме стероидных гормонов, многие производные липидов выполняют регуляторные функции и действуют, как и гормоны, в очень низких концентрациях. Например, тромбоцитактивирующий фактор — фосфолипид особой структуры — оказывает сильное влияние на агрегацию тромбоцитов в концентрации 10^{-12} М; эйкозаноиды, производные полиеновых жирных кислот, вырабатываемые почти всеми типами клеток, вызывают разнообразные биологические эффекты в концентрациях не более 10^{-9} М. Из приведённых примеров следует, что липиды обладают широким спектром биологических функций.

В тканях человека количество разных классов липидов существенно различается. В жировой ткани жиры составляют до 75%

сухого веса. В нервной ткани липидов содержится до 50% сухого веса, основные из них фосфолипиды и сфингомиелины (30%), холестерол (10%), ганглиозиды и цереброзиды (7%). В печени общее количество липидов в норме не превышает 10–13%.

Нарушения обмена липидов приводят к развитию многих заболеваний, но среди людей наиболее распространены два из них — ожирение и атеросклероз.

I. СТРУКТУРА, КЛАССИФИКАЦИЯ И СВОЙСТВА ОСНОВНЫХ ЛИПИДОВ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

Липиды разных классов существенно отличаются по структуре и функциям. Большинство липидов имеют в своём составе жирные кислоты, связанные сложноэфирной связью с глицеролом, холестеролом или амидной связью с аминоспиртом сфингозином.

А. Структура, состав и свойства жирных кислот и ацилглицеролов

Жирные кислоты в организме человека имеют чётное число атомов углерода, что связано с особенностями их биосинтеза, при котором к углеводородному радикалу жирной кислоты последовательно добавляются двухуглеродные фрагменты.

Жирные кислоты — структурные компоненты различных липидов. В составе триацилглицеролов жирные кислоты выполняют функцию депонирования энергии, так как их радикалы содержат богатые энергией CH_2-группы. При окислении CH-связей энергии выделяется больше, чем при окислении углеводов, в которых атомы углерода уже частично окислены (-HCOH-). В составе фосфолипидов и сфинголипидов жирные кислоты образуют внутренний гидрофобный слой мембран, определяя его свойства. Жиры и фосфолипиды организма при нормальной температуре тела имеют жидкую консистенцию, так как количество ненасыщенных жирных кислот преобладает над насыщенными. В фосфолипидах мембран ненасыщенных кислот может быть до 80–85%, а в составе жиров подкожного жира — до 60%.

В свободном, неэтерифицированном состоянии жирные кислоты в организме содержатся в небольшом количестве, например в крови, где они транспортируются в комплексе с белком альбумином.

Жирные кислоты липидов человека представляют собой углеводородную неразветвлённую цепь, на одном конце которой находится карбоксильная группа, а на другом — метильная группа (ω-углеродный атом). Большинство жирных кислот в организме содержат чётное число атомов углерода — от 16 до 20 (табл. 8-1 и 8-2). Жирные кислоты, не содержащие двойных связей, называют насыщенными. Основной насыщенной жирной кислотой в липидах человека является пальмитиновая (до 30–35%). Жирные кислоты, содержащие двойные связи, называют ненасыщенными. Ненасыщенные жирные кислоты представлены моноеновыми (с одной двойной связью) и полиеновыми (с двумя и большим числом двойных связей). Если в составе жирной кислоты содержатся две и более двойных связей, то они располагаются через CH_2-группу. Имеется несколько способов изображения структуры жирных кислот. При обозначении жирной кислоты цифровым символом (табл. 8-1, вторая графа) общее количество атомов углерода представлено цифрой до двоеточия, после двоеточия указывают число двойных связей. Позицию двойной связи обозначают знаком Δ, после которого указывают номер атома углерода, ближайшего к карбоксилу, у которого находится двойная связь. Например, C18:1Δ9 означает, что жирная кислота содержит 18 атомов углерода и одну двойную связь у 9-го атома углерода, считая от углеродного атома карбоксильной группы. Позиция двойной связи может быть указана и другим способом — по расположению первой двойной связи, считая от метильного ω-атома углерода жирной кислоты. Например, линолевая кислота может быть обозначена как C18:2Δ9,12 или C18:2ω-6. По положению первой двойной связи от метильного углерода **полиеновые жирные кислоты** делят на семейства ω-3 и ω-6.

Двойные связи в жирных кислотах в организме человека имеют цис-конфигурацию. Это означает, что ацильные фрагменты находятся

по одну сторону двойной связи. Цис-конфигурация двойной связи делает алифатическую цепь жирной кислоты изогнутой, что нарушает упорядоченное расположение насыщенных радикалов жирных кислот в фосфолипидах мембран (рис. 8-1) и снижает температуру плавления. Чем больше двойных связей в жирных кислотах липидов, тем ниже температура их плавления. В таблице 8-1 выделены основные жирные кислоты в липидах человека.

Жирные кислоты с транс-конфигурацией двойной связи могут поступать в организм с пищей, например в составе маргарина. В этих кислотах отсутствует излом, характерный для цис-связи, поэтому жиры, содержащие такие ненасыщенные кислоты, имеют более высокую температуру плавления, т.е. более твёрдые по консистенции.

Большинство жирных кислот синтезируется в организме человека, однако полиеновые кис-

Таблица 8-1. Строение жирных кислот

Название кислоты	Cn : m	ω	Структура кислот
	Насыщенные		
Миристиновая	14:0		CH_3-$(CH_2)_{12}$COOH
Пальмитиновая	16:0		CH_3-$(CH_2)_{14}$COOH
Стеариновая	18:0		CH_3-$(CH_2)_{16}$COOH
	Моноеновые		
Пальмитооле-иновая	16:1Δ9		CH_3-$(CH_2)_5$CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH
Олеиновая	18:1Δ9		CH_3-$(CH_2)_7$CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH
	Полиеновые		
Линолевая*	18:2Δ9,12	6	CH_3-$(CH_2)_4$-CH=CH-CH_2-CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH
α-Линоленовая*	18:3Δ9, 12, 15	3	CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-$(CH_2)_7$-COOH
Эйкозатриеновая	20:3Δ8, 11, 14	6	
Арахидоновая**	20:4Δ5, 8, 11, 14	6	CH_3-$(CH_2)_3$-$(CH_2$-CH=CH$)_4$ $(CH_2)_3$COOH
Эйкозапентаеновая (тимнодоновая)	20:5Δ5, 8, 11, 14, 17	3	CH_3-CH_2-(CH=CH-$CH_2)_5(CH_2)_2$COOH
Докозопентаеновая (клупанодоновая)	22:5Δ7, 10, 13, 16, 19	3	
Докозагексаеновая	22:6Δ4, 7, 10, 13, 16, 19	3	

Примечания: Cn:m — число атомов углерода (n) и число двойных связей (m) в молекуле жирной кислоты; w (6, 3) — номер углеродного атома, у которого находится первая двойная связь, считая от w- (метильного) атома углерода; D — позиция двойной связи, считая с первого, карбоксильного атома углерода; * — жирные кислоты, которые не синтезируются в организме (незаменимые); ** — арахидоновая кислота может синтезироваться из линолевой кислоты.

Таблица 8-2. Состав жирных кислот подкожного жира человека

Название кислоты	Cn:m	Содержание, %
Миристиновая	14:0	2–4
Пальмитиновая	16:0	23–30
Пальмитоолеиновая	16:1	3–5
Стеариновая	18:0	8–12
Олеиновая	18:1	20–25
Линолевая	18:2	10–15
Линоленовая	18:3	<2
Эйкозатриеновая	20:3	<1
Арахидоновая	20:4	<2
Эйкозапентаеновая	20:5	<1
Общее количество:		
Насыщенных кислот		33–38
Ненасыщенных кислот		42–58

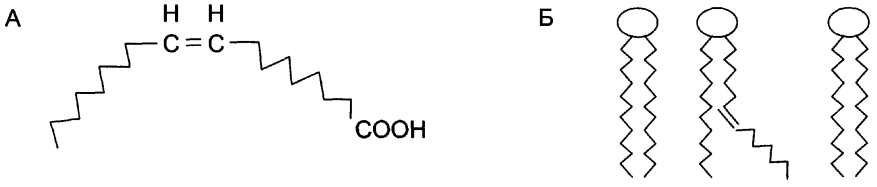


Рис. 8-1. Конфигурации радикалов жирных кислот. А – излом радикала жирной кислоты при двойной связи в цис-конфигурации; Б – нарушение упорядоченного расположения радикалов насыщенных жирных кислот в гидрофобном слое мембран ненасыщенной кислотой с цис-конфигурацией двойной связи.

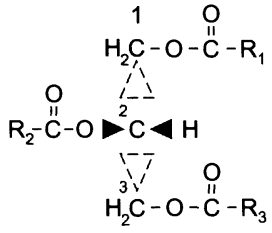
лоты (линолевая и α-линоленовая) не синтезируются и должны поступать с пищей. Эти жирные кислоты называют **незаменимыми**, или **эссенциальными**. Основные источники полиеновых жирных кислот для человека — жидкие растительные масла и рыбий жир, в котором содержится много кислот семейства ω-3 (табл. 8-1, 8-3).

Ацилглицеролы — сложные эфиры трёхатомного спирта глицерола и жирных кислот. Глицерол может быть связан с одной, двумя или тремя жирными кислотами, соответственно образуя моно-, ди- или триацилглицеролы (МАГ, ДАГ, ТАГ). Основную массу липидов в организме человека составляют триацилглицеролы — жиры. У человека с массой тела 70 кг в норме содержится до 10 кг жиров. Они запасаются в жировых клетках — адипоцитах и используются при голодании как источники энергии.

Моно- и диацилглицеролы образуются на промежуточных этапах распада и синтеза триацилглицеролов. Атомы углерода в глицероле по-разному ориентированы в пространстве (рис. 8-2), поэтому ферменты различают их и специфически присоединяют жирные кислоты у первого, второго и третьего атомов углерода.

Номенклатура и состав природных триацилглицеролов. В молекуле природного жира содержатся разные жирные кислоты. Как правило, в позициях 1 и 3 находятся более насыщенные жирные кислоты, а во второй позиции — полиеновая кислота. В названии триацилглицерола перечисляются названия радикалов жирных кислот, начиная с первого углеродного атома глицерола, например пальмитоил-линоленоил-олеоилглицерол.

Жиры, содержащие преимущественно насыщенные кислоты, являются твёрдыми (говяжий, бараний жиры), а содержащие большое ко-



▶ - связь находится над плоскостью изображения

▷ - связь находится под плоскостью изображения

Рис. 8-2. Пространственное расположение углеродных атомов глицерола.

Таблица 8-3. Состав жирных кислот и температура плавления некоторых пищевых жиров

Жиры	Температура плавления, °С	Насыщенные кислоты, %	Ненасыщенные жирные кислоты, %				
			18:1	18:2	18:3	20:4	20:5
Молочный*	+(28–33)	52–70	27–40	3–5	<1	сл.	–
Свиной	+(36–46)	37–45	37–50	8–10	1	сл.	–
Говяжий	+(44–51)	53–60	42–43	3–5	<1	–	–
Бараний	+(46–55)	55–65	36–43	3	0	–	–
Рыбий	–(2–7)	16–20	20–22	2	3	3	6–8
Масла							
Подсолнечное	–(16–19)	10–12	21–34	51–68	2	–	–
Оливковое	(0–6)	10–19	64–85	4–14	<1	–	–
Кукурузное	–(10–20)	10–14	38–40	43–47	<3	–	–

Примечания: сл. — кислоты, присутствующие в незначительных (следовых) количествах. В рыбьем жире, кроме указанных кислот, присутствуют 22:5 жирная кислота (клупанодоновая) — до 10% и 22:6 (цервоновая) — до 10%, которые необходимы для формирования структур фосфолипидов нервной системы человека. В других типах природных жиров они практически отсутствуют; * – жирные кислоты с числом атомов углерода от 4 до 10 содержатся в основном в липидах молока.

личество ненасыщенных кислот — жидкими. Жидкие жиры или масла обычно имеют растительное происхождение (табл. 8-3).

Из животных пищевых жиров наиболее насыщен бараний жир, который практически не содержит незаменимых кислот. Ценными пищевыми жирами являются рыбий жир и растительные масла, содержащие незаменимые жирные кислоты. В организме рыб полиеновые жирные кислоты ω-3 и ω-6 также не синтезируются, рыбы получают их с пищей (водоросли, планктон).

Б. Структура и классификация фосфолипидов и сфинголипидов

Фосфолипиды — разнообразная группа липидов, содержащих в своём составе остаток фосфорной кислоты. Фосфолипиды делят на глицерофосфолипиды, основу которых составляет трёхатомный спирт глицерол, и сфингофосфолипиды — производные аминоспирта сфингозина. Фосфолипиды имеют амфифильные свойства, так как содержат алифатические радикалы жирных кислот и различные по-

лярные группы. Благодаря своим свойствам фосфолипиды не только являются основой всех клеточных мембран, но и выполняют другие функции: образуют поверхностный гидрофильный слой липопротеинов крови, выстилают поверхность альвеол, предотвращая слипание стенок во время выдоха. Некоторые фосфолипиды участвуют в передаче гормонального сигнала в клетки. Сфингомиелины являются фосфолипидами, формирующими структуру миелиновых оболочек и других мембранных структур нервных клеток.

Глицерофосфолипиды. Структурная основа глицерофосфолипидов — глицерол. Глицерофосфолипиды (ранее используемые названия — фосфоглицериды или фосфоацилглицеролы) представляют собой молекулы, в которых две жирные кислоты связаны сложноэфирной связью с глицеролом в первой и второй позициях; в третьей позиции находится остаток фосфорной кислоты, к которому, в свою очередь, могут быть присоединены различные заместители, чаще всего аминоспирты (табл. 8-4, рис. 8-3). Если в третьем положении имеется только фосфорная кислота, то глицерофосфолипид называется фосфатидной кислотой. Её остаток называют «**фосфатидил**»; он входит в название остальных глицерофосфолипидов, после которого указывают название заместителя атома водорода в фосфорной кислоте, например фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин и т.д.

Фосфатидная кислота в свободном состоянии в организме содержится в небольшом количестве (см. раздел 5, табл. 5), но является промежуточным продуктом на пути синтеза как триацилглицеролов, так и глицерофосфолипидов. У глицерофосфолипидов, как и у триацилглицеролов, во второй позиции находятся преимущественно полиеновые кислоты; в молекуле фосфатидилхолина, входящего в структуру мембран, это чаще всего арахидоновая кислота. Жирные кислоты фосфолипидов мембран отличаются от других липидов человека преобладанием полиеновых кислот (до 80–85%), что обеспечивает жидкое состояние гидрофобного слоя, необходимое для функционирования белков, входящих в структуру мембран.

Плазмалогены. Плазмалогены — фосфолипиды, у которых в первом положении глицерола находится не жирная кислота, а остаток спирта с длинной алифатической цепью, связанный простой эфирной связью.

Характерный признак плазмалогенов — двойная связь между первым и вторым атомами углерода в алкильной группе (рис. 8-4). Плазмалогены бывают 3 видов: фосфатидальэтаноламины, фосфатидальхолины и фосфатидальсерины. Плазмалогены составляют до 10% фосфолипидов мембран нервной ткани; особенно много их в миелиновых оболочках нервных клеток.

Некоторые типы плазмалогенов вызывают очень сильные биологические эффекты, дей-

Таблица 8-4. Классификация глицерофосфолипидов и сфинголипидов

Ацилглицеролы	Фосфолипиды	Сфинголипиды
Триацилглицеролы	Сфингомиелины*	
	Глицерофосфолипиды:	Гликолипиды:
Диацилглицеролы	Фосфатидилхолин	Цероброзиды
Моноацилглицеролы	Фосфатидилсерин	Глобозиды
	Фосфатидилэтаноламин	Сульфатиды
	Фосфатидилглицерол	Ганглиозиды
	Фосфатидилинозитолбисфосфат	
	Фосфатидная кислота	
	Кардиолипин (дифосфатидилглицерол)	

* Сфингомиелины относят как к фосфолипидам, так и сфинголипидам.

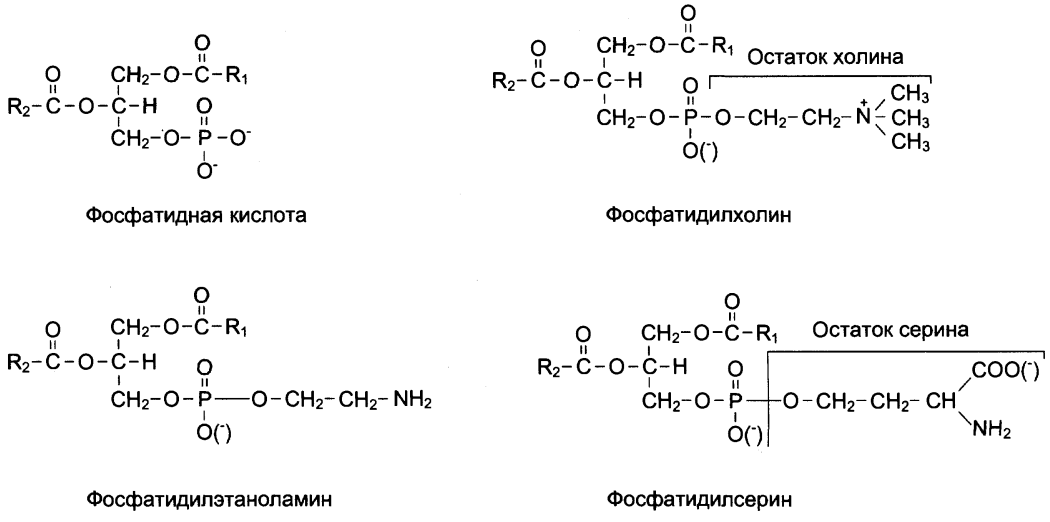


Рис. 8-3. Основные глицерофосфолипиды в организме человека.

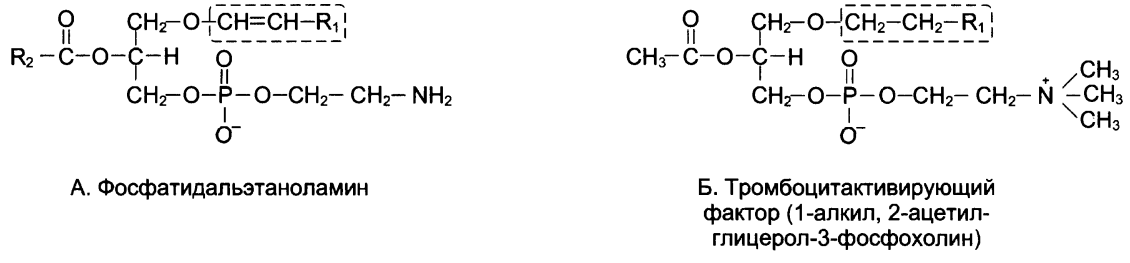


Рис. 8-4. Плазмалогены.

ствуя как медиаторы. Например, тромбоцитактивирующий фактор (ТАФ) стимулирует агрегацию тромбоцитов. ТАФ отличается от других плазмалогенов отсутствием двойной связи в алкильном радикале и наличием ацетильной группы во втором положении глицерола вместо жирной кислоты.

ТАФ выделяется из фагоцитирующих клеток крови в ответ на раздражение и стимулирует агрегацию тромбоцитов, участвуя таким образом в свёртывании крови. Этот фактор обусловливает также развитие некоторых признаков воспаления и аллергических реакций.

Сфинголипиды

Аминоспирт сфингозин, состоящий из 18 атомов углерода, содержит гидроксильные группы и аминогруппу. Сфингозин образует большую группу липидов, в которых жирная кислота связана с ним через аминогруппу. Продукт взаимодействия сфингозина и жирной кислоты называют **«церамид»** (рис. 8-5). В церамидах жирные кислоты связаны необычной (амидной) связью, а гидроксильные группы способны взаимодействовать с другими радикалами. Церамиды отличаются радикалами жирных кислот, входящих в их состав. Обычно это жирные кислоты с большой длиной цепи — от 18 до 26 атомов углерода.

Сфингомиелины. В результате присоединения к ОН-группе церамида фосфорной кислоты, связанной с холином, образуется сфингомиелин (рис. 8-5). Сфингомиелины — основные компоненты миелина и мембран клеток мозга и нервной ткани. Сфингомиелины, как и глицерофосфолипиды, имеют амфифильные свой-

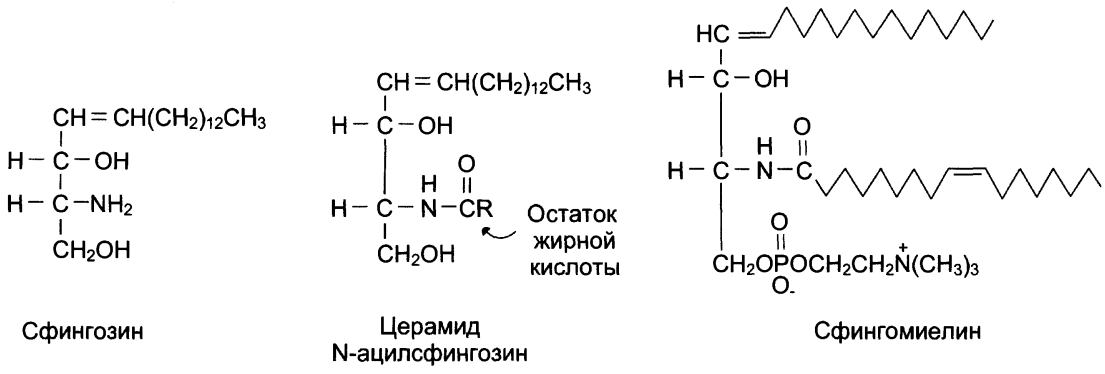


Рис. 8-5. Производные сфингозина: церамид и сфингомиелин.

ства, обусловленные, с одной стороны, радикалом жирной кислоты и алифатической цепью самого сфингозина, а с другой — полярной областью фосфорилхолина.

Гликолипиды. Церамиды — основа большой группы липидов — гликолипидов (см. выше табл. 8-4). Водород в гидроксильной группе церамида может быть замещён на разные углеводные фрагменты, что определяет принадлежность гликолипида к определённому классу. Гликолипиды находятся в основном в мембранах клеток нервной ткани. Названия «цереброзиды» и «ганглиозиды» указывают на ткани, откуда они впервые были выделены.

Цереброзиды. Цереброзиды имеют в своём составе моносахариды. Наиболее распространены цереброзиды, имеющие в своём составе галактозу (галактоцереброзид), реже — глюкозу (глюкоцереброзид). Цереброзиды содержат необычные жирные кислоты, например, галактоцереброзид френозин содержит цереброновую кислоту — 2-гидроксикислоту, содержащую 24 атома углерода (рис. 8-6).

Глобозиды. Глобозиды отличаются от цереброзидов тем, что имеют в своём составе несколько углеводных остатков, связанных с церамидом:

церамид–глюкоза–галактоза–галактоза–N-ацетилгалактоза

Цереброзиды и глобозиды относят к нейтральным сфинголипидам, так как они не содержат заряженных групп.

Сульфатиды. Гидроксил у третьего углеродного атома моносахарида, входящего в состав цереброзида, может связывать остаток серной кислоты, т.е. сульфатироваться. В этом случае образуются сульфатиды, обладающие свойствами кислот и поэтому называемые кислыми сфинголипидами (рис. 8-7). При физиологических значениях pH сульфатированный углеводный остаток имеет отрицательный заряд. Около 25% цереброзидов мозга представляют собой сульфатированные производные. Сульфатиды в значительных количествах находят в белом веществе мозга.

Ганглиозиды — наиболее сложные по составу липиды. Они содержат несколько углеводных остатков, среди которых присутствует N-ацетилнейраминовая кислота. Нейраминовая кислота представляет собой углевод, состоящий из 9 атомов углерода и входящий в группу сиаловых кислот.

Строение ганглиозида G_{m2} может быть представлено следующей схемой:

Церамид – глюкоза – галактоза – N-ацетилгалактозамин
|
N-ацетилнейраминовая кислота

Номенклатура ганглиозидов. Ганглиозиды обозначают буквой G, например G_{m2}. Нижний индекс в виде букв M, D, T и Q означает, что молекула ганглиозида содержит 1, 2, 3 или 4 остатка сиаловых кислот. Цифра у нижнего индекса обозначает специфическую последовательность углеводов в ганглиозиде (рис. 8-8).

Ганглиозиды содержатся в основном в ганглиозных клетках нервной ткани, откуда они и

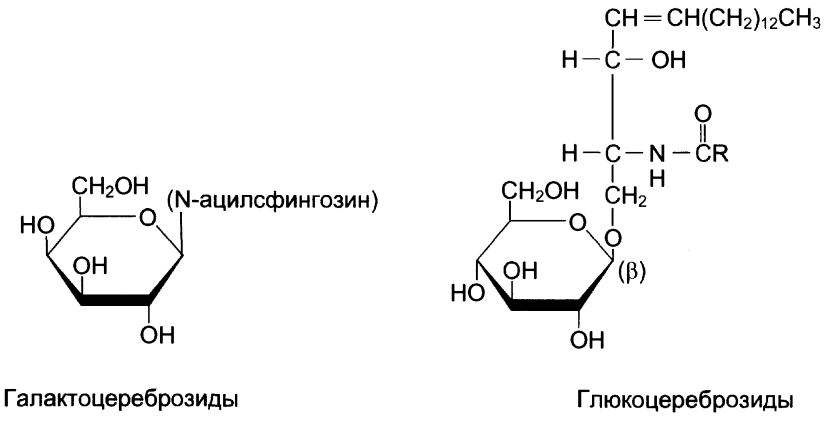


Рис. 8-6. Цереброзиды.

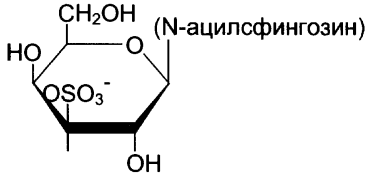


Рис. 8-7. Сульфатиды.

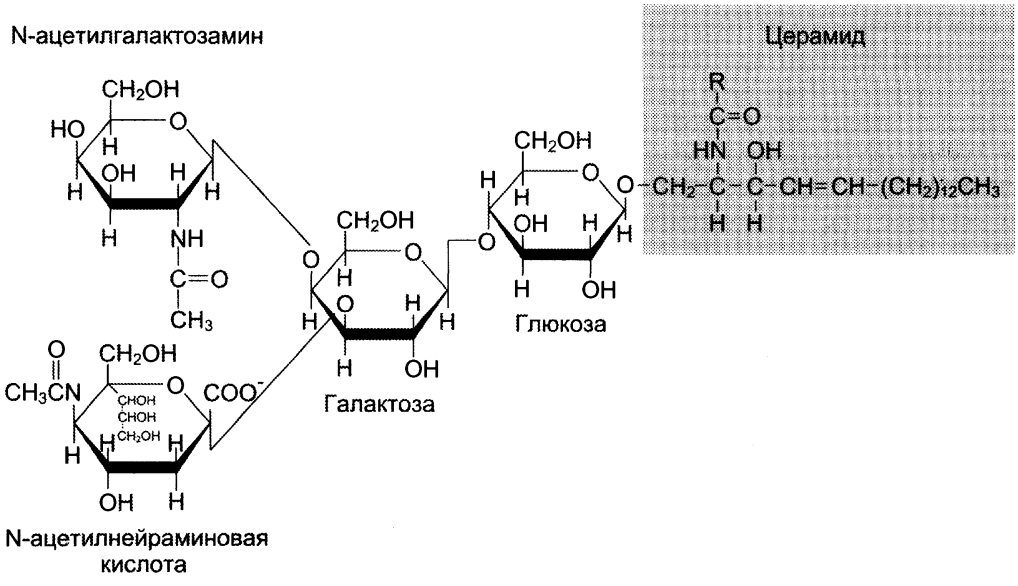


Рис. 8-8. Ганглиозид G_{m2}.

получили своё название. Однако ганглиозиды находятся и в плазматических мембранах многих клеток — эритроцитов, гепатоцитов, клеток селезёнки и других органов. Главная роль ганглиозидов определяется их участием в осуществлении межклеточных контактов. Некоторые ганглиозиды служат своеобразными рецепторами для ряда бактериальных токсинов.

В. Стероиды

Стероиды — производные восстановленных конденсированных циклических систем — циклопентанпергидрофенантренов.

В организме человека основной стероид — холестерол, остальные стероиды — его производные. Растения, грибы и дрожжи не синтезируют холестерол, но образуют разнообразные фитостеролы и микостеролы, не усваиваемые организмом человека. Бактерии не способны синтезировать стероиды.

Холестерол входит в состав мембран и влияет на структуру бислоя, увеличивая её жёсткость. Из холестерола синтезируются жёлчные кислоты, стероидные гормоны и витамин D_3. Нарушение обмена холестерола приводит к развитию атеросклероза.

Холестерол представляет собой молекулу, содержащую 4 конденсированных кольца, обозначаемые латинскими буквами A, B, C, D, разветвлённую боковую цепь из 8 углеродных атомов в положении 17, 2 «ангулярные» метильные группы (18 и 19) и гидроксильную группу в положении 3. Наличие гидроксильной группы позволяет относить холестерол к спиртам, поэтому его правильное химическое название «холестерол», однако в медицинской литературе часто используют термин «холестерин».

Присоединение жирных кислот сложноэфирной связью к гидроксильной группе приводит к образованию эфиров холестерола (рис. 8-9).

В неэтерифицированной форме холестерол входит в состав мембран различных клеток. Гидроксильная группа холестерола обращена к водному слою, а жёсткая гидрофобная часть молекулы погружена во внутренний гидрофобный слой мембраны (см. рис. 5-3).

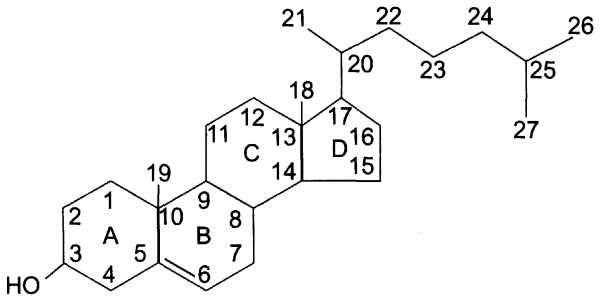
В крови 2/3 холестерола находится в этерифицированной форме и 1/3 — в виде свободного холестерола. Эфиры холестерола служат формой его депонирования в некоторых клетках (например, печени, коры надпочечников, половых желёз). Из этих депо холестерол используется для синтеза жёлчных кислот и стероидных гормонов.

Жёлчные кислоты. Жёлчные кислоты обладают поверхностно-активными свойствами и участвуют в переваривании жиров, эмульгируя их и делая доступными для действия панкреатической липазы.

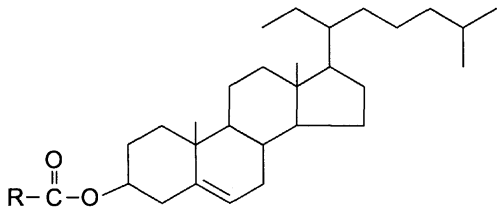
Жёлчные кислоты — производные холестерола с пятиуглеродной боковой цепью в положении 17, которая заканчивается карбоксильной группой. В организме человека синтезируются две жёлчные кислоты: холевая, которая содержит три гидроксильные группы в положениях 3, 7, 12 (рис. 8-10), и хенодезоксихолевая, содержащая две гидроксильные группы в положениях 3 и 7. Так как карбоксильные группы этих жёлчных кислот имеют pK~6, они не полностью диссоциированы при физиологических значениях pH в кишечнике и не являются эффективными эмульгаторами. В печени эмульгирующие свойства жёлчных кислот увеличиваются за счёт реакции конъюгации, в которой к карбоксильной группе жёлчных кислот присоединяются таурин или глицин, полностью ионизированные при pH кишечного сока. Эти производные — конъюгированные жёлчные кислоты — находятся в ионизированной форме и поэтому называются солями жёлчных кислот. Именно они служат главными эмульгаторами жиров в кишечнике.

II. ПЕРЕВАРИВАНИЕ И ВСАСЫВАНИЕ ПИЩЕВЫХ ЛИПИДОВ

С пищей в организм ежедневно поступает от 80 до 150 г липидов. Основную массу составляют жиры, наряду с глюкозой служащие главными источниками энергии. Хотя калорийность жиров значительно выше, чем углеводов (9 по сравнению с 4,7 ккал/моль), при рациональном питании жиры обеспечивают не более 30% от общего количества калорий, поступающих с пищей. Жидкие жиры (масла) содержат в своём составе полиеновые жирные кислоты, которые не синтезируются в организме; поэтому жидкие жиры должны составлять не менее одной трети жиров пищи. С липидами в организм поступают

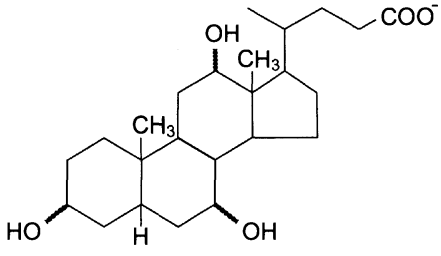


Холестерол

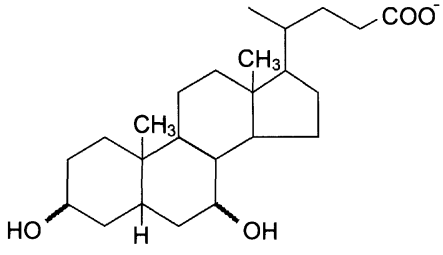


Эфир холестерола

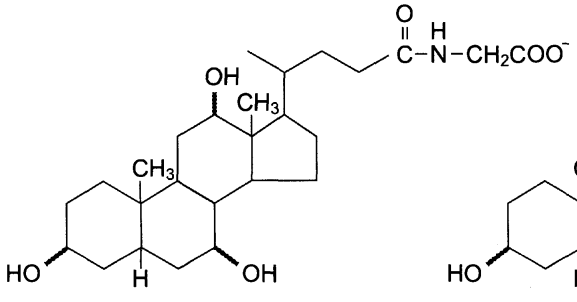
Рис. 8-9. Холестерол и его эфиры.



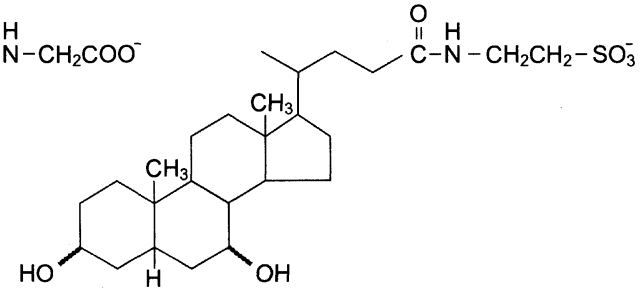
Холевая кислота



Хенодезоксихолевая кислота



Гликохолевая кислота



Таурохенодезоксихолевая кислота

Рис. 8-10. Жёлчные кислоты.

и жирорастворимые витамины A, D, E, K. Переваривание липидов пищи происходит в кишечнике. Основные продукты гидролиза (жирные кислоты и 2-моноацилглицеролы) после всасывания подвергаются ресинтезу и последующей упаковке в хиломикроны (ХМ) в клетках слизистой оболочки кишечника.

А. Эмульгирование жиров

Жиры составляют до 90% липидов, поступающих с пищей. Переваривание жиров происходит в тонком кишечнике, однако уже в желудке небольшая часть жиров гидролизуется под действием «липазы языка». Этот фермент синтезируется железами на дорсальной поверхности языка и относительно устойчив при кислых значениях pH желудочного сока. Поэтому он действует в течение 1–2 ч на жиры пищи в желудке. Однако вклад этой липазы в переваривание жиров у взрослых людей незначителен. Основной процесс переваривания происходит в тонкой кишке.

Так как жиры — нерастворимые в воде соединения, то они могут подвергаться действию ферментов, растворённых в воде только на границе раздела фаз вода/жир. Поэтому действию панкреатической липазы, гидролизующей жиры, предшествует эмульгирование жиров. Эмульгирование (смешивание жира с водой) происходит в тонком кишечнике под действием солей жёлчных кислот (рис. 8-11). Жёлчные кислоты синтезируются в печени из холестерола и секретируются в жёлчный пузырь. Содержимое жёлчного пузыря — жёлчь. Это вязкая жёлто-зелёная жидкость, содержащая главным образом жёлчные кислоты; в небольшом количестве имеются фосфолипиды и холестерол. Жёлчные кислоты предстáвляют собой в основном конъюгированные жёлчные кислоты: таурохолевую, гликохолевую и другие (см. выше рис. 8-10). После приёма жирной пищи жёлчный пузырь сокращается и жёлчь изливается в просвет двенадцатиперстной кишки. Жёлчные кислоты действуют как детергенты, располагаясь на поверхности капель жира и снижая поверхностное натяжение. В результате крупные капли жира распадаются на множество мелких, т.е. происходит эмульгирование жира. Эмульгирование приводит к увеличению площади поверхности раздела фаз жир/вода, что ускоряет гидролиз жира панкреатической липазой. Эмульгированию способствует и перистальтика кишечника.

Б. Гормоны, активирующие переваривание жиров

При поступлении пищи в желудок, а затем в кишечник клетки слизистой оболочки тонкого кишечника начинают секретировать в кровь пептидный гормон **холецистокинин** (панкреозимин). Этот гормон действует на жёлчный пузырь, стимулируя его сокращение, и на экзокринные клетки поджелудочной железы, стимулируя секрецию пищеварительных ферментов, в том числе панкреатической липазы. Другие клетки слизистой оболочки тонкого кишечника в ответ на поступление из желудка кислого содержимого выделяют гормон секретин. **Секретин** — гормон пептидной природы, стимулирующий секрецию бикарбоната (HCO_3^-) в сок поджелудочной железы.

В. Переваривание жиров панкреатической липазой

Переваривание жиров — гидролиз жиров панкреатической липазой. Оптимальное значение pH для панкреатической липазы ≈8 достигается путём нейтрализации кислого содержимого, поступающего из желудка, бикарбонатом, выделяющимся в составе сока поджелудочной железы:

$$H^+ + HCO_3^- \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow H_2O + CO_2 \uparrow.$$

Выделяющийся углекислый газ способствует дополнительному перемешиванию содержимого тонкой кишки.

Панкреатическая липаза выделяется в полость тонкой кишки из поджелудочной железы вместе с белком колипазой. Колипаза попадает в полость кишечника в неактивном виде и частичным протеолизом под действием трипсина превращается в активную форму. Колипаза своим гидрофобным доменом связывается с поверхностью мицеллы эмульгированного жира. Другая часть молекулы способствует формированию такой конформации панкреатической липазы, при которой активный центр фермента максимально приближен к своим субстратам — молекулам жиров (рис. 8-12), поэтому скорость реакции гидролиза жира резко возрастает.

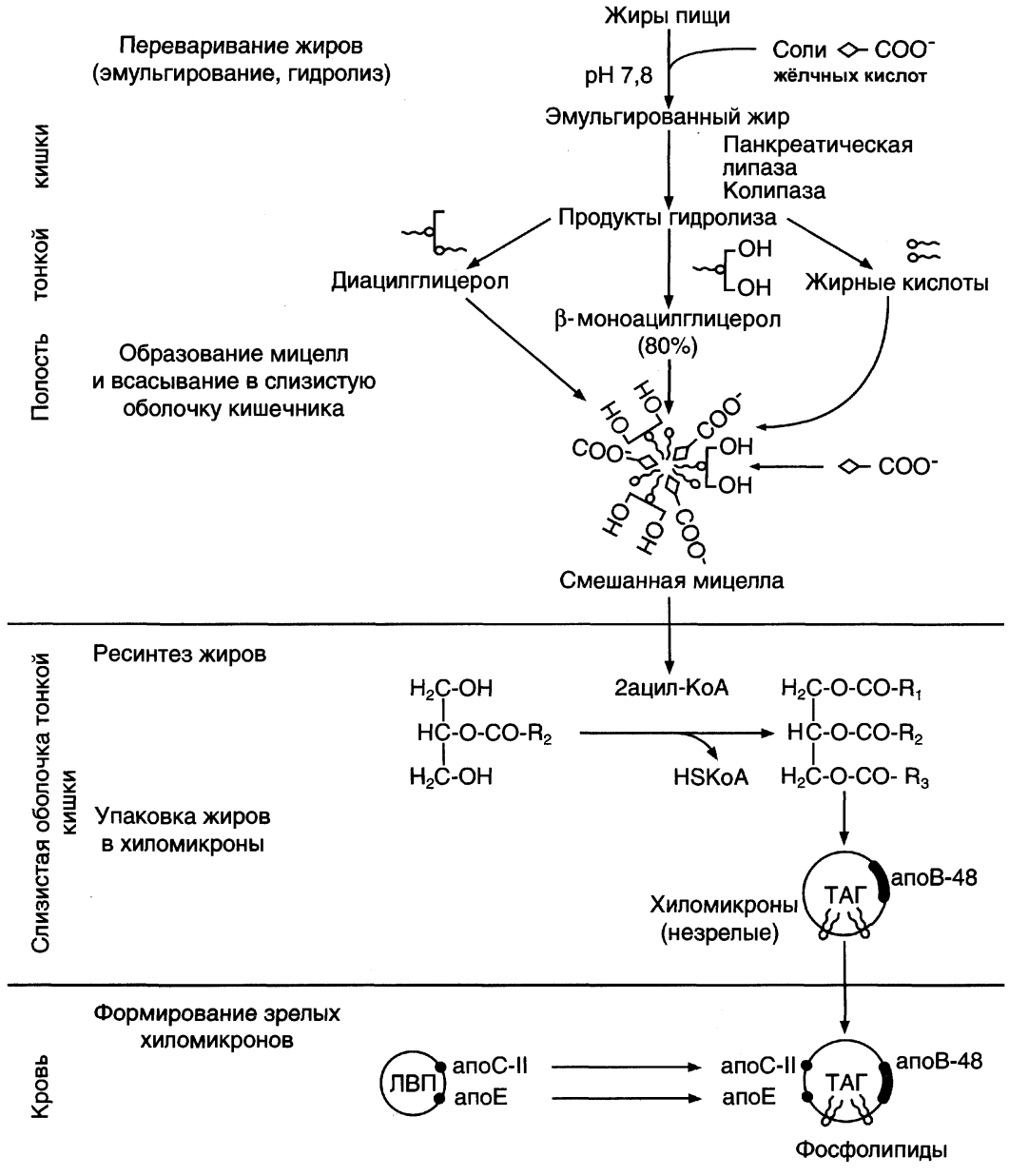


Рис. 8-11. Этапы поступления экзогенных жиров в организм.

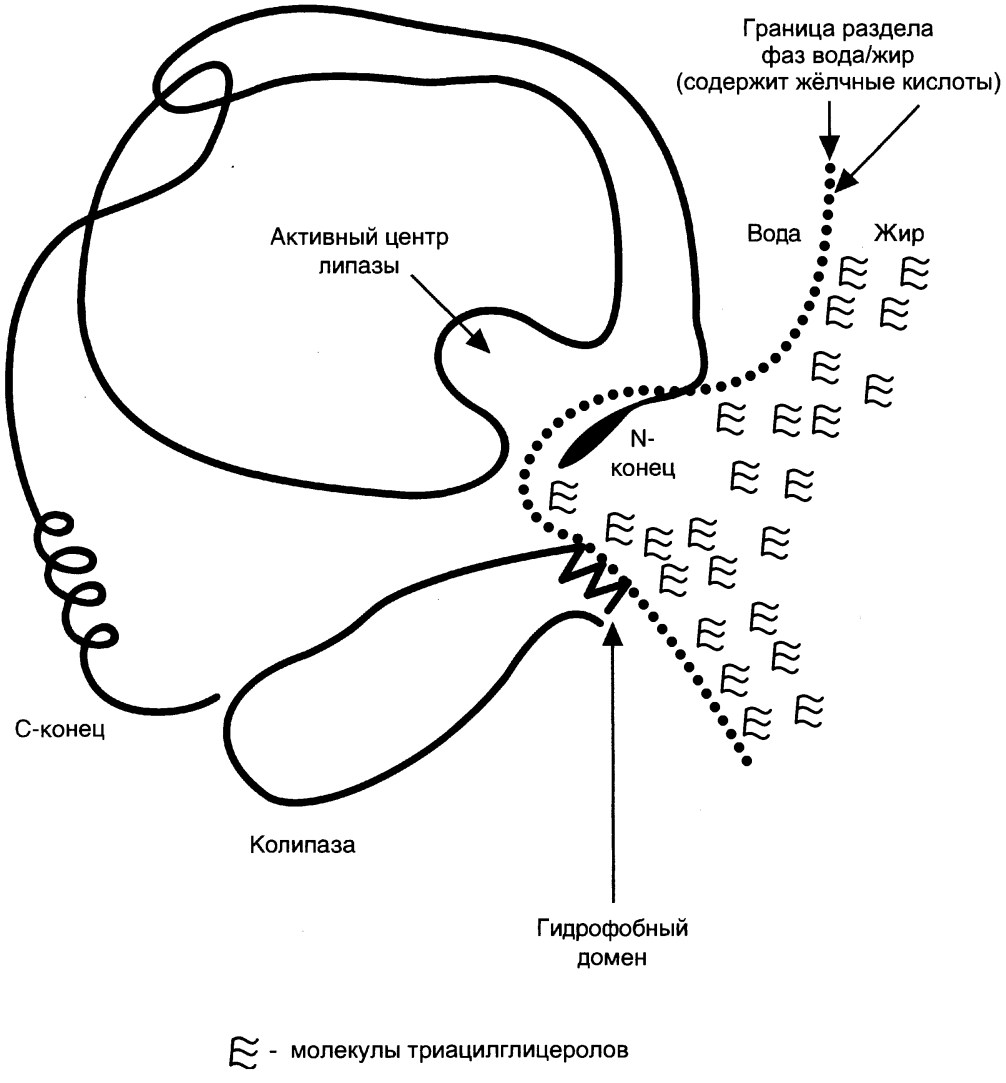


Рис. 8-12. Расположение панкреатической липазы и колипазы на границе раздела фаз вода/жир.

Панкреатическая липаза гидролизует жиры преимущественно в положениях 1 и 3 (рис. 8-13), поэтому основными продуктами гидролиза являются свободные жирные кислоты и 2-моноацилглицеролы (β-моноацилглицеролы).

Молекулы 2-моноацилглицеролов также обладают детергентными свойствами и способствуют эмульгированию жира.

Г. Переваривание других липидов

Кроме жиров, с пищей поступают фосфолипиды, эфиры холестерола, однако количество этих липидов в составе пищи значительно меньше, чем жиров (≈10%).

Переваривание глицерофосфолипидов

В переваривании глицерофосфолипидов участвуют несколько ферментов, синтезирующихся в поджелудочной железе. Фосфолипаза A_2 гидролизует сложноэфирную связь у второго атома углерода глицерола, превращая глицерофосфолипиды в соответствующие лизофосфолипиды. На рисунке 8-14 представлен пример гидролиза фосфатидилхолинов при переваривании.

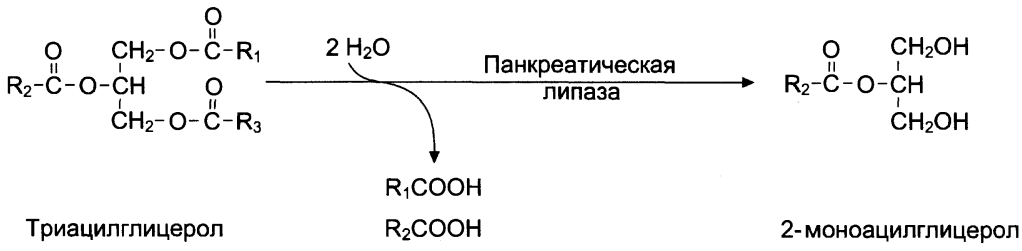


Рис. 8-13. Гидролиз триацилглицеролов панкреатической липазой.

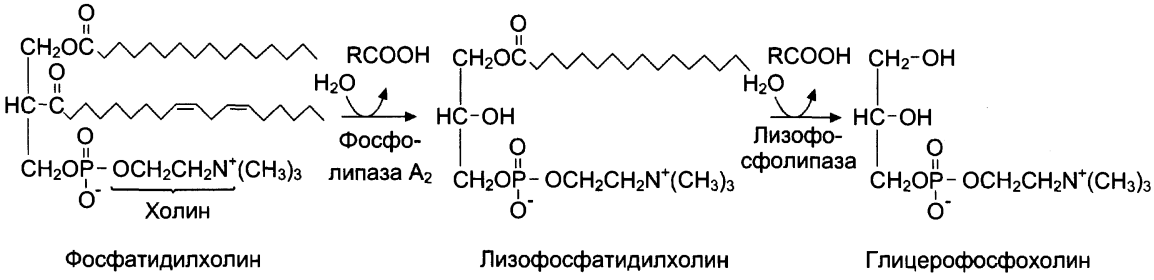


Рис. 8-14. Переваривание фосфатидилхолинов.

Фосфолипаза A_2 секретируется в кишечник в виде профермента и активируется уже в полости кишечника путём частичного протеолиза. Для проявления активности фосфолипазы A_2 необходимы ионы кальция.

Жирная кислота в положении 1 отщепляется под действием лизофосфолипазы, а глицерофосфохолин гидролизуется далее до глицерола, холина и фосфорной кислоты, которые всасываются. Лизофосфолипиды — эффективные эмульгаторы жира, ускоряющие его переваривание.

Переваривание эфиров холестерола

В составе пищи холестерол находится в основном в виде эфиров. Гидролиз эфиров холестерола происходит под действием холестеролэстеразы — фермента, который также синтезируется в поджелудочной железе и секретируется в кишечник (рис. 8-15). Продукты гидролиза (холестерол и жирные кислоты) всасываются в составе смешанных мицелл.

Д. Переваривание жира у грудных детей

У грудных детей и детей младшего возраста основной пищей служит молоко. Молоко содержит жиры, в состав которых входят в основном жирные кислоты с короткой и средней длиной алифатических цепей (4—12 атомов углерода). Жиры в составе молока находятся уже в эмульгированном, смешанном с водой виде, поэтому они сразу же доступны для гидролиза ферментами. На жиры молока в желудке детей действует липаза, которая синтезируется в железах языка (липаза языка). Кроме того, в желудке детей грудного и младшего возраста вырабатывается желудочная липаза, которая активна при нейтральном значении pH, характерном для желудочного сока детей, и не активна у взрослых (pH желудочного сока ~1,5). Эта липаза гидролизует жиры, отщепляя, в основном, жирные кислоты у третьего атома углерода глицерола. Далее гидролиз жиров молока продолжается в кишечнике под действием панкреатической липазы. Жирные кислоты с короткой цепью, как водорастворимые, всасываются частично уже в желудке. Остальные жирные кислоты всасываются в тонком кишечнике. Для детей грудного возраста основным источником энергии являются жиры, в то время как у взрослых людей при нормальном питании основным источником энергии служит глюко-

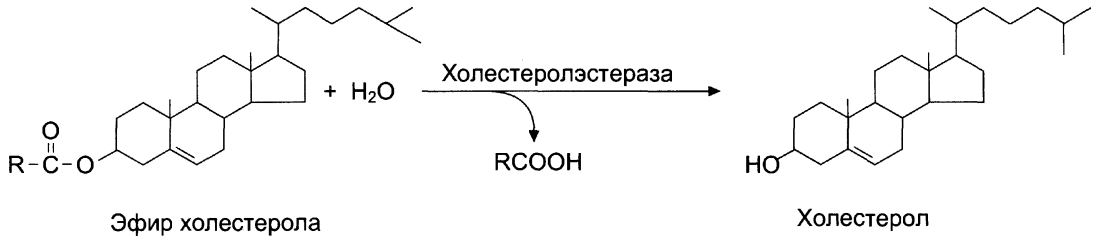


Рис. 8-15. Гидролиз эфиров холестерола в тонкой кишке.

за. Вследствие этого нарушение переваривания и всасывания жиров у детей более опасно, чем у взрослых.

Е. Всасывание продуктов гидролиза липидов в тонком кишечнике. Ресинтез жиров

Образование смешанных мицелл и всасывание продуктов гидролиза

Продукты гидролиза липидов — жирные кислоты с длинным углеводородным радикалом, 2-моноацилглицеролы, холестерол, а также соли жёлчных кислот образуют в просвете кишечника структуры, называемые смешанными мицеллами. Смешанные мицеллы построены таким образом, что гидрофобные части молекул обращены внутрь мицеллы, а гидрофильные — наружу, поэтому мицеллы хорошо растворяются в водной фазе содержимого тонкой кишки. Стабильность мицелл обеспечивается в основном солями жёлчных кислот. Мицеллы сближаются со щёточной каймой клеток слизистой оболочки тонкого кишечника, и липидные компоненты мицелл диффундируют через мембраны внутрь клеток. Вместе с продуктами гидролиза липидов всасываются жирорастворимые витамины A, D, E, K и соли жёлчных кислот. Наиболее активно соли жёлчных кислот всасываются в подвздошной кишке. Жёлчные кислоты далее попадают через воротную вену в печень, из печени вновь секретируются в жёлчный пузырь и далее опять участвуют в эмульгировании жиров. Этот путь жёлчных кислот называют «**энтерогепатическая циркуляция**». Каждая молекула жёлчных кислот за сутки проходит 5–8 циклов, и около 5% жёлчных кислот выделяется с фекалиями.

Всасывание жирных кислот со средней длиной цепи, образующихся, например, при переваривании липидов молока, происходит без участия смешанных мицелл. Эти жирные кислоты из клеток слизистой оболочки тонкого кишечника попадают в кровь, связываются с белком альбумином и транспортируются в печень.

Ресинтез жиров в слизистой оболочке тонкого кишечника

После всасывания продуктов гидролиза жиров жирные кислоты и 2-моноацилглицеролы в клетках слизистой оболочки тонкого кишечника включаются в процесс ресинтеза с образованием триацилглицеролов (рис. 8-16). Жирные кислоты вступают в реакцию этерификации только в активной форме в виде производных коэнзима А, поэтому первая стадия ресинтеза жиров — реакция активации жирной кислоты: $HS\ KoA + RCOOH + АТФ \rightarrow R{-}CO \sim KoA + АМФ + H_4P_2O_7$.

Реакция катализируется ферментом ацил-KoA-синтетазой (тиокиназой). Затем ацил~KoA участвует в реакции этерификации 2-моноацилглицерола с образованием сначала диацилглицерола, а затем триацилглицерола. Реакции ресинтеза жиров катализируют ацилтрансферазы.

В реакциях ресинтеза жиров участвуют, как правило, только жирные кислоты с длинной углеводородной цепью. В ресинтезе жиров участвуют не только жирные кислоты, всосавшиеся из кишечника, но и жирные кислоты, синтезированные в организме, поэтому по составу ресинтезированные жиры отличаются от жиров, полученных с пищей. Однако возможности «адаптировать» в процессе ресинтеза состав пищевых жиров к составу жиров организма человека ограничены, поэтому при поступлении с пищей жиров с необычными жирными кислота-

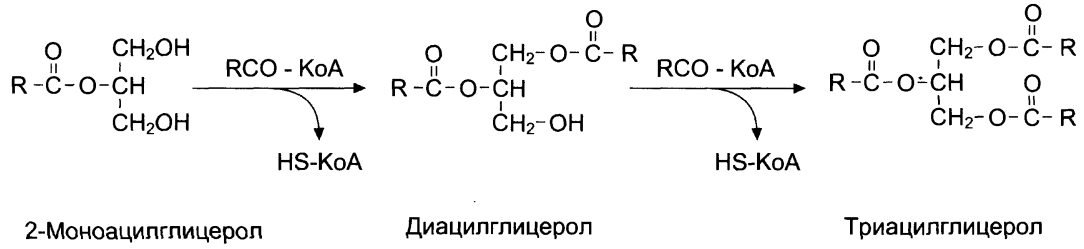


Рис. 8-16. Ресинтез жиров в клетках слизистой оболочки тонкой кишки.

ми, например бараньего жира, в адипоцитах появляются жиры, содержащие кислоты, характерные для бараньего жира (насыщенные разветвлённые жирные кислоты). В клетках слизистой оболочки кишечника происходит активный синтез глицерофосфолипидов, необходимых для формирования структуры липопротеинов — транспортных форм липидов в крови.

Образование эфиров холестерола

В клетках слизистой оболочки тонкой кишки всосавшиеся молекулы холестерола также превращаются в эфиры путём взаимодействия с ацил-КоА (рис. 8-17). Эту реакцию катализирует ацилхолестеролацилтрансфераза (АХАТ). От активности этого фермента зависит скорость поступления экзогенного холестерола в организм.

В клетках эпителия тонкой кишки из жиров, образовавшихся в результате ресинтеза, а также из эфиров холестерола, жирорастворимых витаминов, поступивших с пищей, формируются липопротеиновые комплексы — хиломикроны (ХМ). ХМ далее доставляют жиры в периферические ткани.

Нарушения переваривания и всасывания жиров. Стеаторея

Нарушение переваривания жиров может быть следствием нескольких причин. Одна из них — нарушение секреции жёлчи из жёлчного пузыря при механическом препятствии оттоку жёлчи. Это состояние может быть результатом сужения просвета жёлчного протока камнями, образующимися в жёлчном пузыре, или сдавлением жёлчного протока опухолью, развивающейся в окружающих тканях. Уменьшение секреции жёлчи приводит к нарушению эмульгирования пищевых жиров и, следовательно, к снижению способности панкреатической липазы гидролизовать жиры.

Нарушение секреции сока поджелудочной железы и, следовательно, недостаточная секреция панкреатической липазы также приводят к снижению скорости гидролиза жиров. В обоих случаях нарушение переваривания и всасывания жиров приводит к увеличению количества жиров в фекалиях — возникает стеаторея (жирный стул). В норме содержание жиров в фекалиях составляет не более 5%. При стеаторее нарушается всасывание жирорастворимых витаминов (A, D, E, K) и незаменимых жирных кислот, поэтому при длительно текущей стеаторее развивается недостаточность этих незаменимых факторов питания с соответствующими клиническими симптомами (см. раздел 3). При нарушении переваривания жиров плохо перевариваются и вещества нелипидной природы, так как жир обволакивает частицы пищи и препятствует действию на них ферментов.

III. ТРАНСПОРТ ЖИРОВ ИЗ КИШЕЧНИКА ХИЛОМИКРОНАМИ

Липиды в водной среде (а значит, и в крови) нерастворимы, поэтому для транспорта липидов кровью в организме образуются комплексы липидов с белками — липопротеины.

А. Общая характеристика липопротеинов

Все типы липопротеинов имеют сходное строение — гидрофобное ядро и гидрофильный слой на поверхности (рис. 8-18). Гидрофильный слой образован белками, которые называют апопротеинами, и амфифильными молекулами липи-

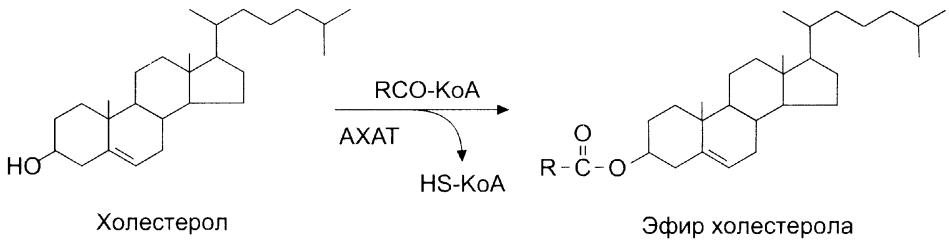


Рис. 8-17. Реакция этерификации холестерола в клетках слизистой оболочки тонкой кишки. АХАТ — ацилхолестерол-ацилтрансфераза.

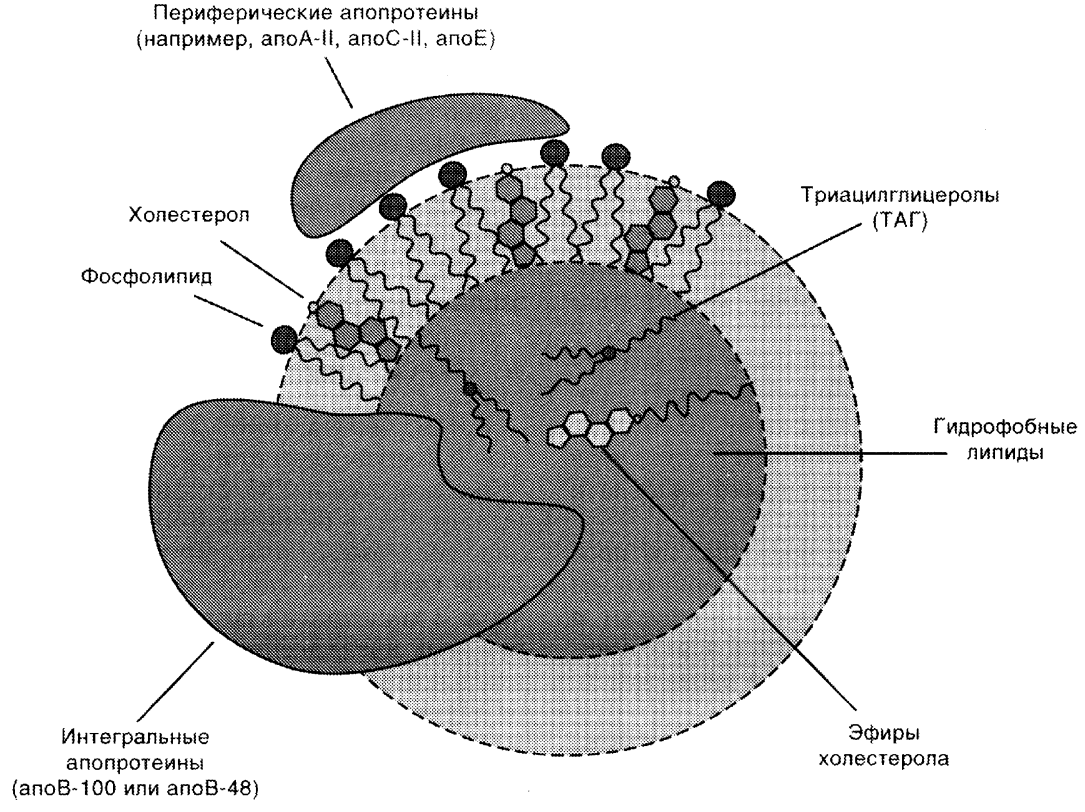


Рис. 8-18. Липопротеины плазмы крови.

дов — фосфолипидами и холестеролом. Гидрофильные группы этих молекул обращены к водной фазе, а гидрофобные части — к гидрофобному ядру липопротеина, в котором находятся транспортируемые липиды. Некоторые апопротеины интегральные и не могут быть отделены от липопротеина, а другие могут свободно переноситься от одного типа липопротеина к другому. Апопротеины выполняют несколько функций:

- формируют структуру липопротеинов;
- взаимодействуют с рецепторами на поверхности клеток и таким образом определяют, какими тканями будет захватываться данный тип липопротеинов;
- служат ферментами или активаторами ферментов, действующих на липопротеины.

В организме синтезируются следующие типы липопротеинов (см. ниже табл. 8-5): хиломикроны (ХМ), липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеины промежуточной плотности (ЛППП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП) и липопротеины высокой плотности (ЛПВП).

Каждый из типов ЛП образуется в разных тканях и транспортирует определённые липиды. Например, ХМ транспортируют экзогенные (пищевые жиры) из кишечника в ткани, поэтому триацилглицеролы составляют до 85% массы этих частиц.

ЛП хорошо растворимы в крови, не коалесцируют, так как имеют небольшой размер и отрицательный заряд на поверхности. Некоторые ЛП легко проходят через стенки капилляров кровеносных сосудов и доставляют липиды к клеткам.

Большой размер ХМ не позволяет им проникать через стенки капилляров, поэтому из клеток кишечника они сначала попадают в лимфатическую систему и потом через главный грудной проток вливаются в кровь вместе с лимфой.

Методы исследования. Состав ЛП крови можно исследовать разными методами (рис. 8-19). Метод ультрацентрифугирования позволяет разделить ЛП, используя их различие в плотности, которая зависит от соотношения количества липидов и белков в частице. Так как жир имеет меньшую, чем вода, плотность, то ХМ, содержащие более 85% жиров, располагаются на поверхности сыворотки крови, а ЛПВП, содержащие наибольшее количество белков, имеют самую большую плотность и при центрифугировании располагаются в нижней части центрифужной пробирки. Так как ЛП впервые были выделены из сыворотки крови методом ультрацентрифугирования, то в названии указывают плотность частиц. Однако метод ультрацентрифугирования непригоден для широкого использования, поэтому в клинических лабораториях обычно применяют метод электрофореза. Скорость движения частиц при электрофорезе зависит от их заряда и размера. Заряд, в свою очередь, зависит от количества белков на поверхности ЛП (табл. 8-5). При электрофорезе в геле все типы ЛП движутся к положительному полюсу; ближе к старту располагаются ХМ, а ЛПВП, имеющие наибольшее количество белков и наименьший размер, удаляются от старта дальше других частиц.

Состав ЛП крови значительно изменяется в течение суток. В абсорбтивный период (особенно при употреблении жирной пищи) в крови появляются ХМ. Богатая углеводами пища способствует образованию ЛПОНП, так как эти ЛП транспортируют жиры, синтезированные в печени из углеводов. В постабсорбтивный период и при голодании в крови присутствуют только ЛПНП и ЛПВП, основная функция которых заключается в транспорте холестерола.

Б. Образование хиломикронов

Жиры, образовавшиеся в результате ресинтеза в клетках слизистой оболочки кишечника, упаковываются в ХМ. Основной апопротеин в составе ХМ — белок апоВ-48. Этот белок закодирован в том же гене, что и белок ЛПОНП — В-100 (табл. 8-5), который синтезируется в печени. В кишечнике в результате посттранскрипционных превращений «считывается» последовательность мРНК, которая кодирует только 48% от длины белка В-100, поэтому этот белок называется апоВ-48. Белок апоВ-48 синтезируется в шероховатом ЭР и там же гликозилируется. Затем в аппарате Гольджи происходит формирование ХМ, называемых «незрелыми». По механизму экзоцитоза они выделяются в хилус, образующийся в лимфатической системе кишечных ворсинок, и через главный грудной лимфатический проток попадают в кровь. В лимфе и крови с ЛПВП на ХМ переносятся

Таблица 8-5. Липопротеины — транспортные формы липидов

Типы липопротеинов	Хиломикроны (ХМ)	ЛПОНП	ЛППП	ЛПНП	ЛПВП
Состав, %					
Белки	2	10	11	22	50
ФЛ	3	18	23	21	27
ХС	2	7	8	8	4
ЭХС	3	10	30	42	16
ТАГ	85	55	26	7	3
Функции	Транспорт липидов из клеток кишечника (экзогенных липидов)	Транспорт липидов, синтезируемых в печени (эндогенных липидов)	Промежуточная форма превращения ЛПОНП в ЛПНП под действием фермента ЛП-липазы	Транспорт холестерола в ткани	Удаление избытка холестерола из клеток и других липопротеинов. Донор апопротеинов A, C-II
Место образования	Эпителий тонкого кишечника	Клетки печени	Кровь	Кровь (из ЛПОНП и ЛППП)	Клетки печени — ЛПВП-предшественники
Плотность, г/мл	0,92–0,98	0,96–1,00		1,00–1,06	1,06–1,21
Диаметр частиц, нМ	Больше 120	30–100		21–100	7–15
Основные аполипопротеины	B-48 C-II E	B-100 C-II E	B-100 E	B-100	A-I C-II E

Примечания: ФЛ — фосфолипиды; ХС — холестерол; ЭХС — эфиры холестерола; ТАГ — триацилглицеролы.

Функции апопротеинов

- B-48 — основной белок ХМ;
- B-100 — основной белок ЛПОНП, ЛПНП, ЛППП, взаимодействует с рецепторами ЛПНП;
- C-II — активатор ЛП-липазы, переносится с ЛПВП на ХМ и ЛПОНП в крови;
- E — взаимодействует с рецепторами ЛПНП;
- A-I — активатор фермента лецитин:холестеролацилтрансферазы (ЛХАТ).

апопротеины E (апоE) и C-II (апоC-II); ХМ превращаются в «зрелые». ХМ имеют довольно большой размер, поэтому после приёма жирной пищи они придают плазме крови опалесцирующий, похожий на молоко, вид. ХМ транспортируют жир к различным тканям, где он утилизируется, поэтому концентрация ХМ в крови постепенно снижается, и плазма опять становится прозрачной. ХМ исчезают из крови в течение нескольких часов.

При редком наследственном заболевании — дефекте гена апопротеина B — нарушается синтез белков апоB-100 в печени и апоB-48 в кишечнике. В результате в клетках слизистой оболочки кишечника не формируются ХМ, а в печени — ЛПОНП. В клетках этих органов накапливаются капельки жира. Такое заболевание называется абеталипопротеинемия, так как второе название ЛПОНП — пре-β-липопротеины.

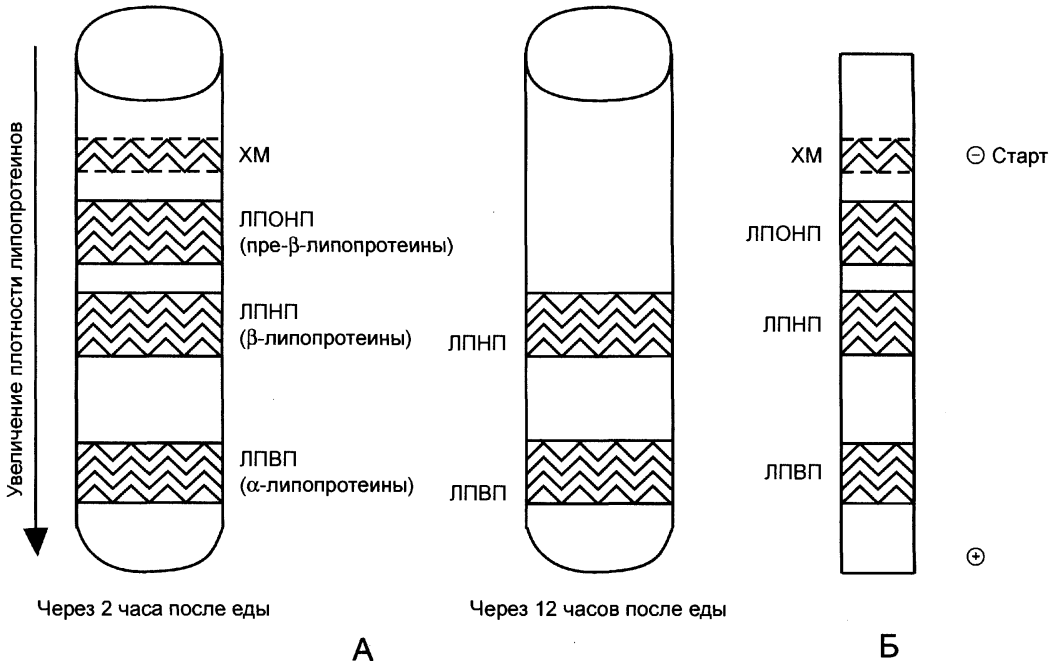


Рис. 8-19. Разделение липопротеинов сыворотки крови. А — метод ультрацентрифугирования. Б — метод электрофореза в полиакриламидном геле через 2 ч после еды.

В. Использование экзогенных жиров тканями

Действие липопротеинлипазы на ХМ. В крови триацилглицеролы, входящие в состав зрелых ХМ, гидролизуются ферментом липопротеинлипазой, или ЛП-липазой (рис. 8-20). ЛП-липаза связана с гепарансульфатом (гетерополисахаридом), находящимся на поверхности эндотелиальных клеток, выстилающих стенки капилляров кровеносных сосудов. ЛП-липаза гидролизует молекулы жиров до глицерола и 3 молекул жирных кислот. На поверхности ХМ различают 2 фактора, необходимых для активности ЛП-липазы — апоС-II и фосфолипиды. АпоС-II активирует этот фермент, а фосфолипиды участвуют в связывании фермента с поверхностью ХМ.

ЛП-липаза синтезируется в клетках многих тканей: жировой, мышечной, в лёгких, селезёнке, клетках лактирующей молочной железы. Изоферменты ЛП-липазы в разных тканях отличаются по значению K_m: ЛП-липаза жировой ткани имеет в 10 раз более высокое значение K_m, чем, например, ЛП-липаза сердца, поэтому гидролиз жиров ХМ в жировой ткани происходит в абсорбтивный период. Жирные кислоты поступают в адипоциты и используются для синтеза жиров. В постабсорбтивном состоянии, когда количество жиров в крови снижается, ЛП-липаза сердечной мышцы продолжает гидролизовать жиры в составе ЛПОНП, которые присутствуют в крови в небольшом количестве, и жирные кислоты используются этой тканью как источники энергии, даже при низкой концентрации жиров в крови. ЛП-липазы нет в печени, но на поверхности клеток этого органа имеется другой фермент — печёночная липаза, не действующая на зрелые ХМ, но гидролизующая жиры в ЛППП, которые образуются из ЛПОНП.

Судьба жирных кислот, глицерола и остаточных хиломикронов. В результате действия ЛП-липазы на жиры ХМ образуются жирные кислоты и глицерол. Основная масса жирных кислот проникает в ткани (рис. 8-20). В жировой ткани в абсорбтивный период жирные кислоты депонируются в виде триацилглицеролов, в сердечной мышце и работающих скелетных мышцах используются как источник энергии. Другой продукт гидролиза жиров, глицерол, растворим в крови, транспортируется в печень, где в абсорбтивный период может быть использован для синтеза жиров.

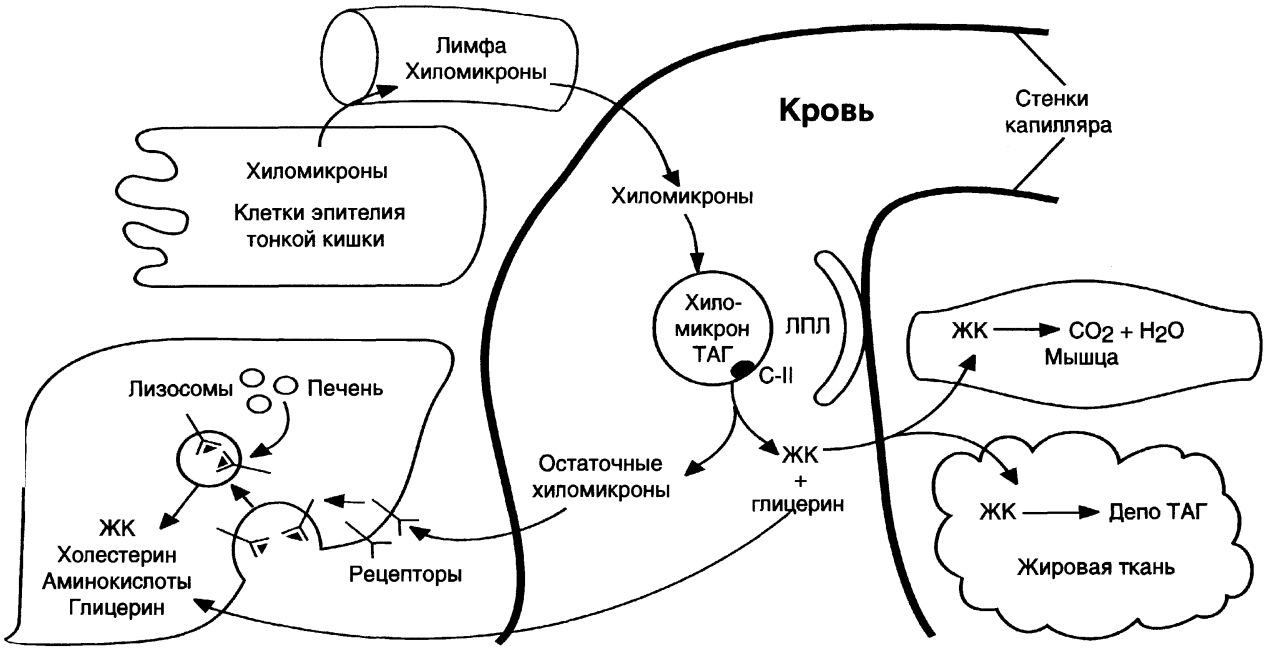


Рис. 8-20. Путь экзогенных жиров и хиломикронов. *ЛПЛ — липопротеинлипаза, ЖК — жирные кислоты.

В результате действия ЛП-липазы на ХМ количество жиров в них снижается на 90%, уменьшаются размеры частиц, апопротеин С-II переносится обратно на ЛПВП. Образовавшиеся частицы называются остаточными ХМ. Они содержат в себе фосфолипиды, холестерол, жирорастворимые витамины и апопротеины В-48 и Е. Остаточные ХМ захватываются гепатоцитами, которые имеют рецепторы, взаимодействующие с этими апопротеинами. Путём эндоцитоза остаточные ХМ попадают внутрь клеток, и ферментами лизосом белки и липиды гидролизуются, а затем утилизируются. Жирорастворимые витамины и экзогенный холестерол используются в печени или транспортируются в другие ткани.

Гиперхиломикронемия, гипертриглицеролемия. После приёма пищи, содержащей жиры, развивается физиологическая гипертриглицеролемия и, соответственно, гиперхиломикронемия, которая может продолжаться до нескольких часов.

Скорость удаления ХМ из кровотока зависит от:

- активности ЛП-липазы;
- присутствия ЛПВП, поставляющих апо-протеины С-II и Е для ХМ;
- активности переноса апоС-II и апоЕ на ХМ.

Генетические дефекты любого из белков, участвующих в метаболизме ХМ, приводят к развитию семейной гиперхиломикронемии — гиперлипопротеинемии типа I. У таких больных в постабсорбтивном периоде концентрация триацилглицеролов повышена (более 200 мг/дл), плазма крови по виду напоминает молоко и при оставлении на холоде (+4 °С) в ней всплывают белые жирные хлопья, что характерно для гипертриглицеролемии и гиперхиломикронемии.

В тяжёлых случаях при этом заболевании происходит отложение триацилглицеролов в коже и сухожилиях в виде ксантом, у пациентов рано нарушается память, появляются боли в животе из-за сужения просвета сосудов и уменьшения кровотока, нарушается функция поджелудочной железы, что часто бывает причиной смерти больных. Если концентрация триацилглицеролов в крови превышает 4000 мг/дл, то липиды откладываются в сетчатке глаза, однако это не всегда влияет на зрительную функцию. При лечении гиперхиломикронемий необходимо прежде все-

го снизить потребление жиров с пищей, так как ХМ транспортируют экзогенные жиры.

IV. ОБМЕН ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛОВ

Приём пищи человеком происходит иногда со значительными интервалами, поэтому в организме выработались механизмы депонирования источников энергии. Жиры — наиболее выгодная и основная форма депонирования энергии. Запасы гликогена в организме не превышают 300 г и обеспечивают организм энергией не более суток. Депонированный жир может обеспечивать организм энергией при голодании в течение длительного времени (до 7–8 нед). Синтез жиров активируется в абсорбтивный период и происходит в основном в жировой ткани и печени. Но если жировая ткань — место депонирования жира, то печень выполняет важную роль превращения части углеводов, поступающих с пищей, в жиры, которые затем секретируются в кровь в составе ЛПОНП и доставляются в другие ткани (в первую очередь, в жировую). Синтез жиров в печени и жировой ткани стимулируется инсулином. Мобилизация жира активируется в тех случаях, когда глюкозы недостаточно для обеспечения энергетических потребностей организма: в постабсорбтивный период, при голодании и физической работе под действием гормонов глюкагона, адреналина, соматотропина. Жирные кислоты поступают в кровь и используются тканями как источники энергии.

A. Синтез жиров в жировой ткани и печени

Синтез жиров происходит в абсорбтивный период в печени и жировой ткани. Непосредственными субстратами в синтезе жиров являются ацил-КоА и глицерол-3-фосфат. Метаболический путь синтеза жиров в печени и жировой ткани одинаков, за исключением разных путей образования глицерол-3-фосфата.

Образование глицерол-3-фосфата

Синтез жиров в печени и жировой ткани идёт через образование промежуточного продукта — фосфатидной кислоты (рис. 8-21).

Предшественник фосфатидной кислоты — глицерол-3-фосфат, образующийся в печени двумя путями:

- восстановлением дигидроксиацетонфосфата — промежуточного метаболита гликолиза;
- фосфорилированием глицеролкиназой свободного глицерола, поступающего в печень из крови (продукт действия ЛП-липазы на жиры ХМ и ЛПОНП).

В жировой ткани глицеролкиназа отсутствует, и восстановление дигидроксиацетонфосфата — единственный путь образования глицерол-3-фосфата. Следовательно, синтез жиров в жировой ткани может происходить только в абсорбтивный период, когда глюкоза поступает в адипоциты с помощью белка-переносчика глюкозы ГЛЮТ-4, активного только в присутствии инсулина, и распадается по пути гликолиза.

Синтез жиров в жировой ткани

В жировой ткани для синтеза жиров используются в основном жирные кислоты, освободившиеся при гидролизе жиров ХМ и ЛПОНП (рис. 8-22). Жирные кислоты поступают в адипоциты, превращаются в производные КоА и взаимодействуют с глицерол-3-фосфатом, образуя сначала лизофосфатидную кислоту, а затем фосфатидную. Фосфатидная кислота после дефосфорилирования превращается в диацилглицерол, который ацилируется с образованием триацилглицерола.

Кроме жирных кислот, поступающих в адипоциты из крови, в этих клетках идёт и синтез жирных кислот из продуктов распада глюкозы. В адипоцитах для обеспечения реакций синтеза жира распад глюкозы идёт по двум путям: гликолиз, обеспечивающий образование глицерол-3-фосфата и ацетил-КоА, и пентозофосфатный путь, окислительные реакции которого обеспечивают образование NADPH, служащего донором водорода в реакциях синтеза жирных кислот.

Молекулы жиров в адипоцитах объединяются в крупные жировые капли, не содержащие воды, и поэтому являются наиболее компактной формой хранения топливных молекул. Подсчитано, что, если бы энергия, запасаемая в жирах, хранилась в форме сильно гидратированных молекул гликогена, то масса тела человека увеличилась бы на 14–15 кг.

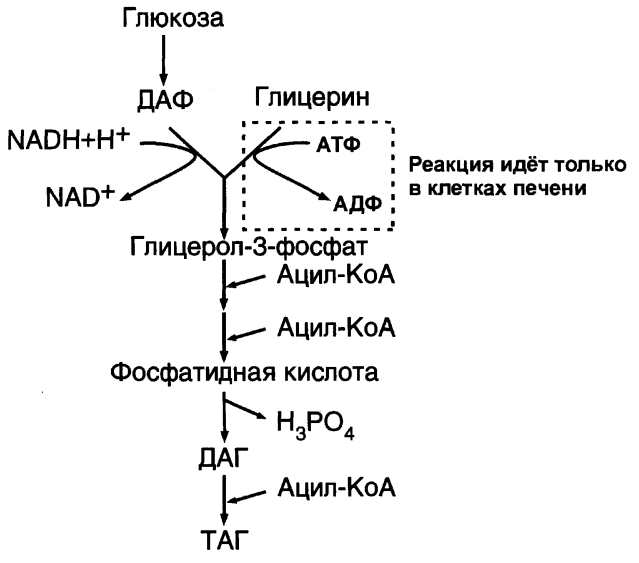


Рис. 8-21. Синтез жиров в печени и жировой ткани.

Синтез ТАГ в печени. Образование ЛПОНП в печени и транспорт жиров в другие ткани

Печень — основной орган, где идёт синтез жирных кислот из продуктов гликолиза. В гладком ЭР гепатоцитов жирные кислоты активируются и сразу же используются для синтеза жиров, взаимодействуя с глицерол-3-фосфатом. Как и в жировой ткани, синтез жиров идёт через образование фосфатидной кислоты. Синтезированные в печени жиры упаковываются в ЛПОНП и секретируются в кровь (рис. 8-23).

В состав ЛПОНП, кроме жиров, входят холестерол, фосфолипиды и белок — апоВ-100. Это очень «длинный» белок, содержащий 11 536 аминокислот. Одна молекула апоВ-100 покрывает поверхность всего липопротеина.

ЛПОНП из печени секретируются в кровь (рис. 8-23), где на них, как и на ХМ, действует ЛП-липаза. Жирные кислоты поступают в ткани, в частности в адипоциты, и используются для синтеза жиров. В процессе удаления жиров из ЛПОНП под действием ЛП-липазы ЛПОНП сначала превращаются в ЛППП, а затем в ЛПНП. В ЛПНП основными липидными компонентами служат холестерол и его эфиры, поэтому ЛПНП являются липопротеинами, доставляющими холестерол в периферические ткани. Глицерол, освободившийся из липопротеинов, кровью транспортируется в печень, где опять может использоваться для синтеза жиров.

Скорость синтеза жирных кислот и жиров в печени существенно зависит от состава пищи. Если в пище содержится более 10% жиров, то скорость синтеза жиров в печени резко снижается.

Б. Мобилизация жиров из жировой ткани

Адипоциты (место депонирования жиров) располагаются в основном под кожей, образуя подкожный жировой слой, и в брюшной полости, образуя большой и малый сальники. Мобилизация жиров, т.е. гидролиз до глицерола и жирных кислот, происходит в постабсорбтивный период, при голодании и активной физической работе. Гидролиз внутриклеточного жира осуществляется под действием фермента гормончувствительной липазы — ТАГ-липазы. Этот фермент отщепляет одну жирную кислоту у первого углеродного атома глицерола с образованием диацилглицерола, а затем другие липазы гидролизуют его до глицерола и жирных кислот, которые поступают в кровь. Глицерол как водорастворимое вещество транспортируется кровью в свободном виде, а жирные кислоты (гидрофобные молекулы) в комплексе с белком плазмы — альбумином.

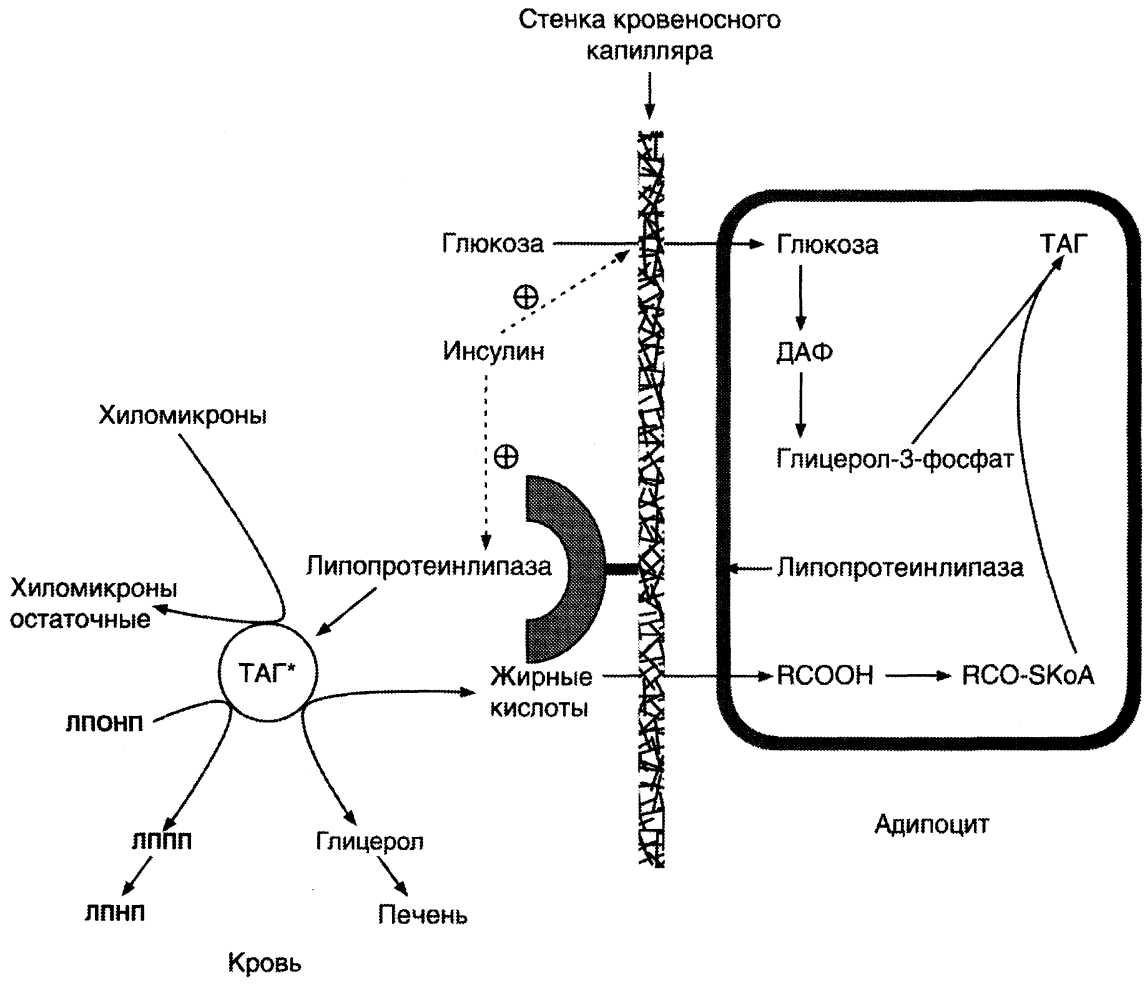


Рис. 8-22. Депонирование жира в адипоцитах в абсорбтивном периоде. После еды при повышении концентрации глюкозы в крови увеличивается секреция инсулина. Инсулин активирует транспорт глюкозы внутрь адипоцитов, действуя на ГЛЮТ-4, и синтез ЛП-липазы в адипоцитах и её экспонирование на поверхности стенки капилляров. ЛП-липаза, связанная с эндотелием сосудов, гидролизует жиры в составе ХМ и ЛПОНП. АпоС-II на поверхности ХМ и ЛПОНП активирует ЛП-липазу. Жирные кислоты проникают в адипоцит, а глицерол транспортируется в печень. Так как в адипоцитах нет фермента глицеролкиназы, то свободный глицерол не может использоваться для синтеза ТАГ в этой ткани. Активированные жирные кислоты взаимодействуют с глицерол-3-фосфатом, образующимся из дигидроксиацетонфосфата, и через фосфатидную кислоту превращаются в ТАГ, которые депонируются в адипоцитах. Сокращения: ТАГ* — триацилглицеролы в составе ХМ и ЛПОНП; ДАФ — дигидроксиацетонфосфат.

В. Гормональная регуляция синтеза и мобилизации жиров

Какой процесс будет преобладать в организме — синтез жиров (липогенез) или их распад (липолиз), зависит от поступления пищи и физической активности. В абсорбтивном состоянии под действием инсулина происходит липогенез, в постабсорбтивном состоянии — липолиз, активируемый глюкагоном. Адреналин, секреция которого увеличивается при физической активности, также стимулирует липолиз.

Регуляция синтеза жиров. В абсорбтивный период при увеличении соотношения инсулин/

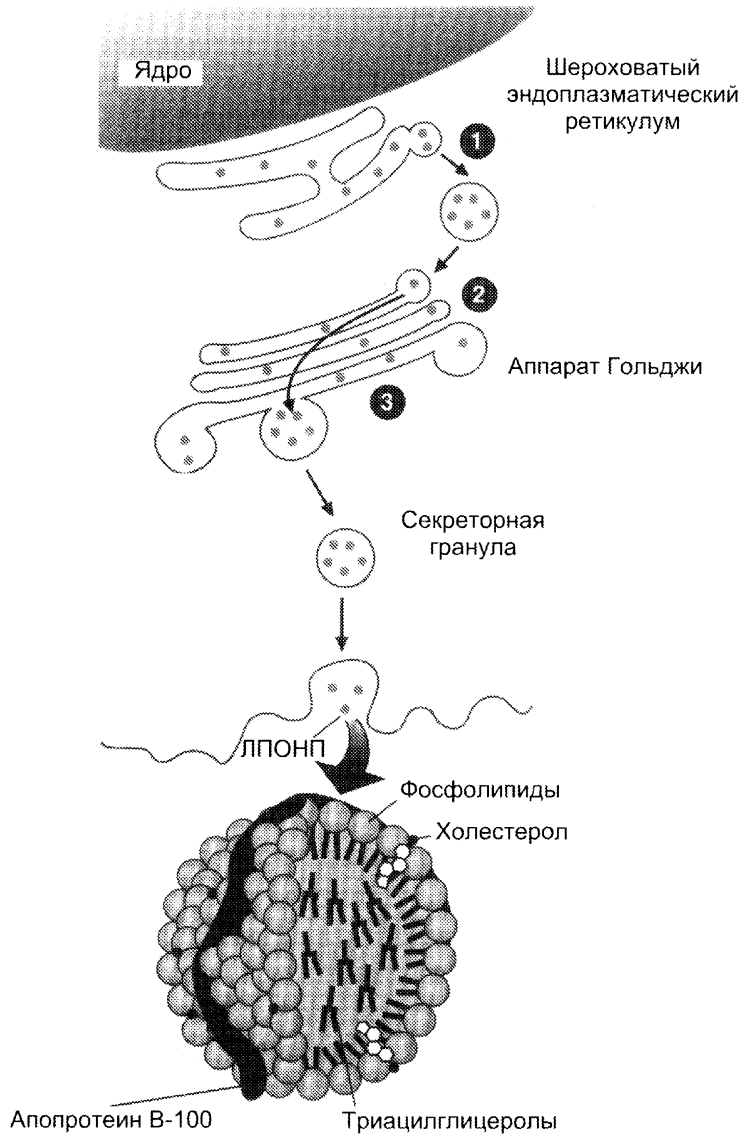


Рис. 8-23. Синтез и секреция ЛПОНП в печени. Белки, синтезированные в шероховатом ЭР (1), в аппарате Гольджи (2), формируют комплекс с ТАГ, называемый ЛПОНП. ЛПОНП комплектуются в секреторных гранулах (3), транспортируются к клеточной мембране и секретируются в кровь.

глюкагон в печени активируется синтез жиров. В жировой ткани индуцируется синтез ЛП-липазы в адипоцитах и осуществляется её экспонирование на поверхность эндотелия; следовательно, в этот период увеличивается поступление жирных кислот в адипоциты. Одновременно инсулин активирует белки-переносчики глюкозы — ГЛЮТ-4. Поступление глюкозы в адипоциты и гликолиз также активируются. В результате образуются все необходимые компоненты для синтеза жиров: глицерол-3-фосфат и активные формы жирных кислот. В печени инсулин, действуя через различные механизмы, активирует ферменты путём дефосфорилирования и индуцирует их синтез. В результате увеличиваются активность и синтез ферментов, участву-

ющих в превращении части глюкозы, поступающей с пищей, в жиры. Это — регуляторные ферменты гликолиза, пируватдегидрогеназный комплекс и ферменты, участвующие в синтезе жирных кислот из ацетил-КоА. Результат действия инсулина на обмен углеводов и жиров в печени — увеличение синтеза жиров и секреция их в кровь в составе ЛПОНП. ЛПОНП доставляют жиры в капилляры жировой ткани, где действие ЛП-липазы обеспечивает быстрое поступление жирных кислот в адипоциты, где они депонируются в составе триацилглицеринов.

Запасание жиров в жировой ткани — основная форма депонирования источников энергии в организме человека (табл. 8-6). Запасы жиров в организме человека массой 70 кг составляют 10 кг, но у многих людей количество жиров может быть значительно больше.

Жиры образуют в адипоцитах жировые вакуоли. Жировые вакуоли иногда заполняют значительную часть цитоплазмы. Скорость синтеза и мобилизации подкожного жира происходит неравномерно в разных частях организма, что связано с неодинаковым распределением рецепторов гормонов на адипоцитах.

Регуляция мобилизации жиров. Мобилизация депонированных жиров стимулируется глюкагоном и адреналином и, в меньшей степени, некоторыми другими гормонами (соматотропным, кортизолом). В постабсорбтивный период и при голодании глюкагон, действуя на адипоциты через аденилатциклазную систему, активирует протеинкиназу А, которая фосфорилирует и, таким образом, активирует гормончувствительную липазу, что инициирует липолиз и выделение жирных кислот и глицерина в кровь. При физической активности увеличивается секреция адреналина, который действует через β-адренергические рецепторы адипоцитов, активирующие аденилатциклазную систему (рис. 8-24). В настоящее время обнаружено 3 типа β-рецепторов: β_1, β_2, β_3, активация которых приводит к липолитическому действию. К наибольшему липолитическому действию приводит активация β_3-рецепторов. Адреналин одновременно действует и на α_2-рецепторы адипоцитов, связанные с ингибирующим G-белком, что инактивирует аденилатциклазную систему. Вероятно, действие адреналина двояко: при низких концентрациях в крови преобладает его антилиполитическое действие через α_2-рецепторы, а при высокой — преобладает липолитическое действие через β-рецепторы.

Для мышц, сердца, почек, печени при голодании или физической работе жирные кислоты становятся важным источником энергии. Печень перерабатывает часть жирных кислот в кетоновые тела, используемые мозгом, нервной тканью и некоторыми другими тканями как источники энергии.

В результате мобилизации жиров концентрация жирных кислот в крови увеличивается приблизительно в 2 раза (рис. 8-25), однако абсолютная концентрация жирных кислот в крови невелика даже в этот период. $T_{1/2}$ жирных кислот в крови тоже очень мал (менее 5 мин), что означает существование быстрого потока жирных кислот из жировой ткани к другим органам. Когда постабсорбтивный период сменяется абсорбтивным, инсулин активирует специфическую фосфатазу, которая дефосфорилирует гормончувствительную липазу, и распад жиров останавливается.

Г. Нарушения жирового обмена. Ожирение

Жировая ткань составляет 20–25% от общей массы тела у женщин и 15–20% у мужчин. Однако избыточное накопление жира в адипоци-

Таблица 8-6. Запасы энергии в организме человека (масса 70 кг)

Форма энергии	Локализация	Количество энергии, ккал
Глюкоза и жирные кислоты	Кровь	100
Гликоген	Печень/мышцы	760
Жиры	Жировая ткань	110 000
Белки	Скелетные мышцы	25 000

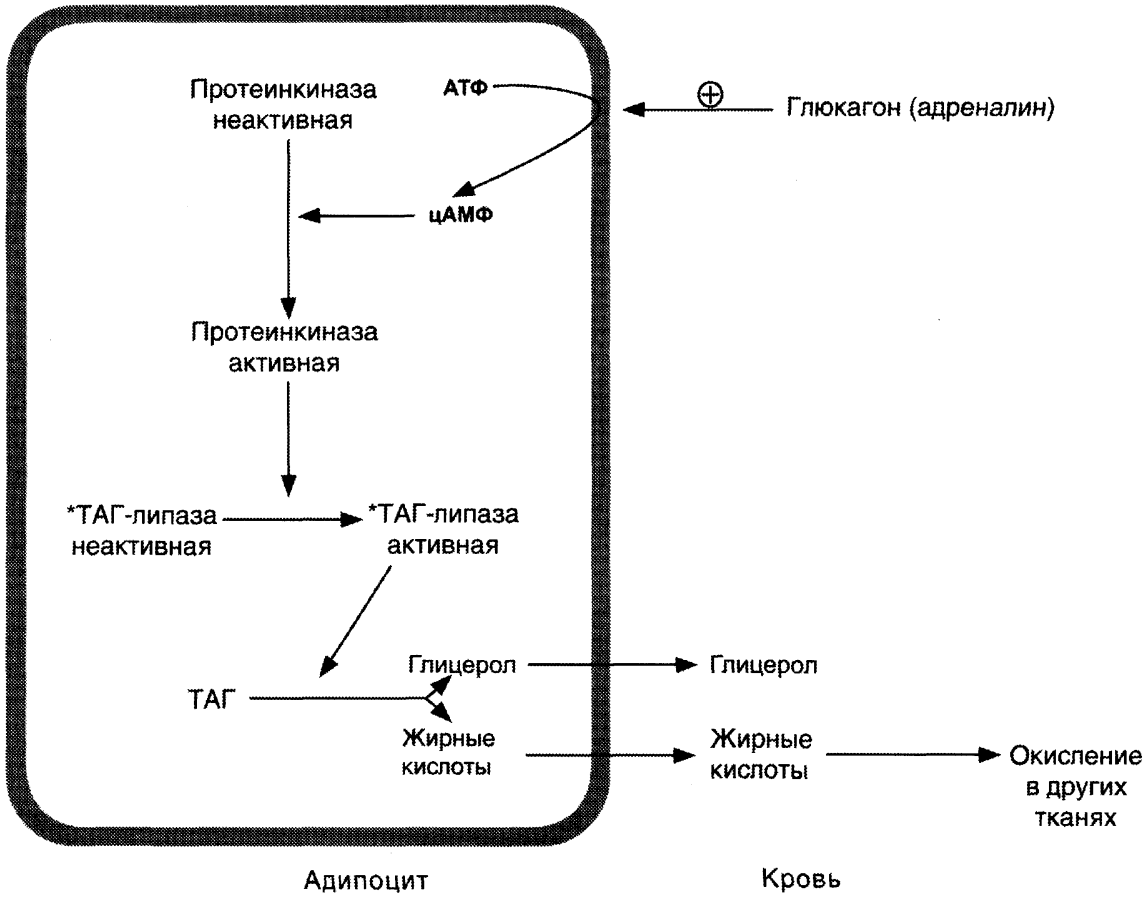


Рис. 8-24. Гормональная регуляция мобилизации жиров в постабсорбтивном периоде, при голодании и физической работе. При голодании увеличивается секреция глюкагона, при физической работе — адреналина. Эти гормоны, действуя через аденилатциклазную систему, стимулируют мобилизацию жиров. *ТАГ-липаза имеет и другие названия: гормончувствительная липаза, тканевая липаза.

тах (ожирение) широко распространено. Среди взрослого населения некоторых стран около 50% людей страдает ожирением. Ожирение — важнейший фактор риска развития инфаркта миокарда, инсульта, сахарного диабета, артериальной гипертензии и желчнокаменной болезни.

Ожирением считают состояние, когда масса тела превышает 20% от «идеальной» для данного индивидуума. Образование адипоцитов происходит ещё во внутриутробном состоянии, начиная с последнего триместра беременности, и заканчивается в препубертатный период. После этого жировые клетки могут увеличиваться в размерах при ожирении или уменьшаться при похудании, но их количество не изменяется в течение жизни.

Первичное ожирение

Первичное ожирение характеризуется множеством гормональных и метаболических особенностей у лиц, страдающих этим заболеванием. В самом общем виде можно сказать, что первичное ожирение развивается в результате алимен-

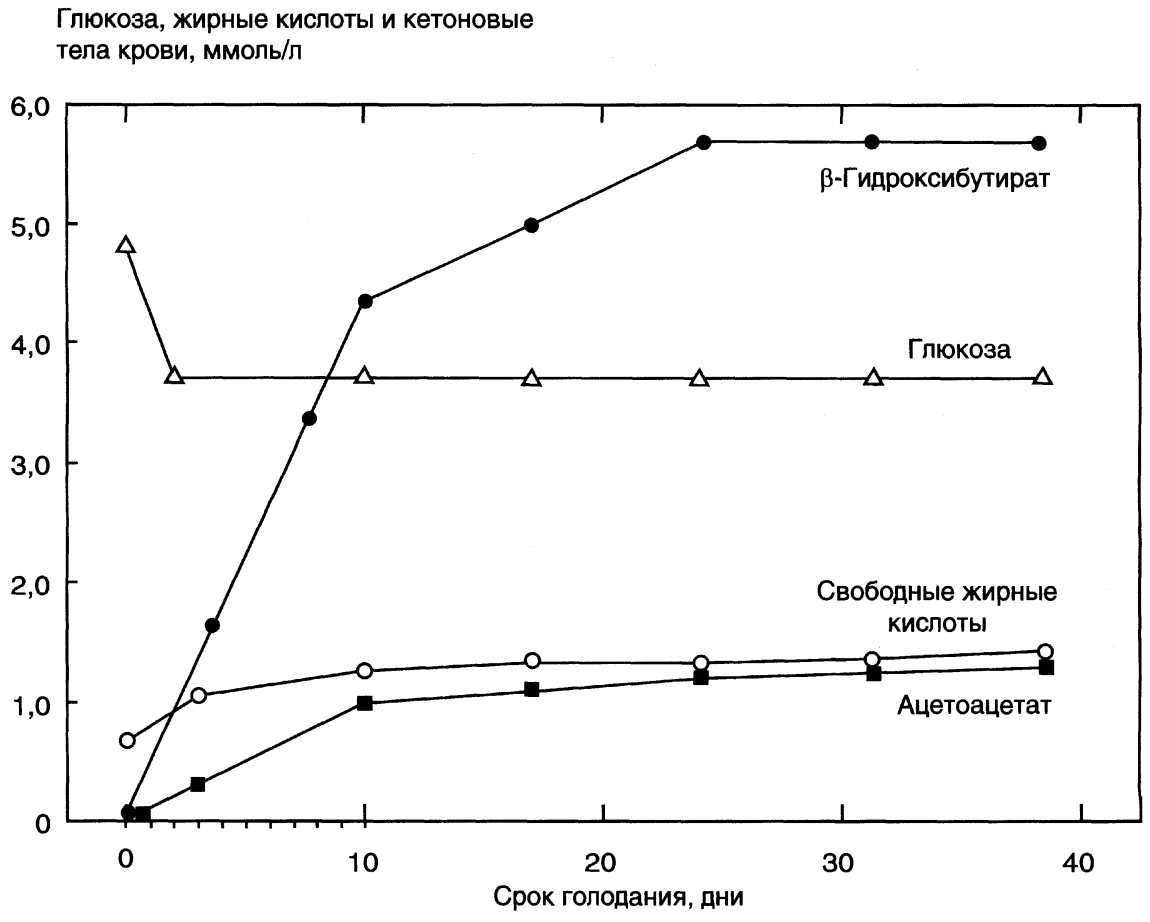


Рис. 8-25. Изменение концентрации жирных кислот, кетоновых тел и глюкозы в крови при голодании.

тарного дисбаланса — избыточной калорийности питания по сравнению с расходами энергии.

Суточные потребности организма в энергии складываются из:

- основного обмена — энергии, необходимой для поддержания жизни; основной обмен измеряют по поглощению кислорода или выделению тепла человеком в состоянии покоя утром, после 12-часового перерыва в еде;
- энергии, необходимой для физической активности.

Затраты энергии, необходимые для физической активности, разделяют на 3 уровня:

I — 30% энергии от основного обмена (у людей, ведущих сидячий образ жизни);

II — 60–70% от энергии основного обмена (у людей, которые 2 ч в день имеют умеренную физическую нагрузку);

III — 100% и более от энергии основного обмена (у людей, которые в течение нескольких часов в день занимаются тяжёлой физической работой).

В зависимости от интенсивности нагрузки и возраста суточная потребность в энергии колеблется у женщин от 2000 до 3000 ккал в день, а у мужчин — от 2300 до 4000 ккал.

Количество потребляемой пищи определяется многими факторами, в том числе и химическими регуляторами чувства голода и насыщения. Эти чувства определяются концентрацией в крови глюкозы и гормонов, которые инициир-

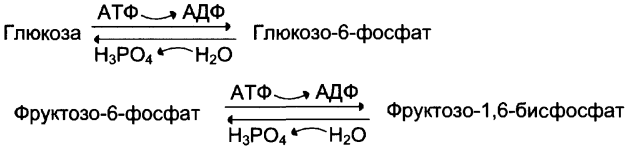
руют чувство насыщения: холецистокинина, нейротензина, бомбезина, лептина.

Причины первичного ожирения:

- генетические нарушения (до 80% случаев ожирения — результат генетических нарушений);
- состав и количество потребляемой пищи, метод питания в семье;
- уровень физической активности;
- психологические факторы.

Генетические факторы в развитии ожирения. Метаболические различия между тучными и худыми людьми до настоящего времени не могут быть определены однозначно. Существует несколько теорий, объясняющих эти различия:

- генетически детерминированная разница в функционировании «бесполезных» циклов (субстратных циклов, раздел 7). Эти циклы состоят из пары метаболитов, превращаемых друг в друга с помощью двух ферментов. Одна из этих реакций идёт с затратой АТФ. Например:



- если эти субстраты превращаются друг в друга с одинаковой скоростью, то происходит «бесполезный» расход АТФ и, соответственно, источников энергии, например жиров;
- у людей, склонных к ожирению, вероятно, имеется более прочное сопряжение дыхания и окислительного фосфорилирования, т.е. более эффективный метаболизм;
- возможно, разное соотношение аэробного и анаэробного гликолиза. Анаэробный гликолиз (как менее эффективный) «сжигает» гораздо больше глюкозы, в результате снижается её переработка в жиры;
- у отдельных индивидуумов имеется различие в активности Na^+/K^+-АТФ:азы, работа которой требует до 30% энергии, потребляемой клетками.

Роль лептина в регуляции массы жировой ткани

У человека и животных имеется «ген ожирения» — *obese gene* (*ob*). Продуктом экспрессии этого гена служит белок лептин, состоящий из 167 аминокислот, который синтезируется и секретируется адипоцитами и взаимодействует с рецепторами гипоталамуса. В результате его действия снижается секреция нейропептида Y. Нейропептид Y стимулирует пищевое поведение, поиск и потребление пищи у животных. Другие пептиды, участвующие в регуляции чувства сытости, например холецистокинин, также влияют на секрецию нейропептида Y. Таким опосредованным путём лептин выступает регулятором жировой массы, необходимой для роста и репродукции. Уровень лептина у больных ожирением может быть различным.

У 80% больных концентрация лептина в крови тучных людей больше в 4 раза, чем у людей с нормальной массой тела. В этих случаях имеется генетический дефект рецепторов лептина в гипоталамусе, поэтому, несмотря на продукцию лептина, центр голода в гипоталамусе продолжает секрецию нейропептида Y.

20% больных имеют изменения в первичной структуре лептина. К настоящему времени описаны 5 одиночных мутаций в гене лептина, которые приводят к развитию ожирения. У этих больных наблюдают повышение отложения жиров в жировой ткани, чрезмерное потребление пищи, низкую физическую активность и развитие сахарного диабета типа II. Патогенез ожирения при дефекте гена *ob* может быть следующим: низкий уровень лептина в крови служит сигналом недостаточного количества запаса жиров в организме; этот сигнал включает механизмы, приводящие к увеличению аппетита и в результате к увеличению массы тела.

Следовательно, можно сделать вывод о том, что первичное ожирение — не просто следствие переедания, а результат действия многих факторов, т.е. ожирение — полигенное заболевание.

Вторичное ожирение — ожирение, развивающееся в результате какого-либо основного заболевания, чаще всего эндокринного. Например, к развитию ожирения приводят гипотиреоз, синдром Иценко–Кушинга, гипогонадизм и многие другие заболевания (см. раздел 11).

V. ОБМЕН ЖИРНЫХ КИСЛОТ И КЕТОНОВЫХ ТЕЛ

Жирные кислоты поступают с пищей или синтезируются в организме (кроме полиено-

вых кислот). Субстраты, необходимые для синтеза жирных кислот, образуются при катаболизме глюкозы и таким образом, часть глюкозы превращается сначала в жирные кислоты, а затем в жиры. Хотя специфический путь катаболизма жирных кислот заканчивается образованием ацетил-КоА, служащим исходным субстратом для синтеза жирных кислот, процессы синтеза и окисления жирных кислот необратимы. Они происходят в разных компартментах клеток (биосинтез протекает в цитозоле, а окисление — в митохондриях) и катализируются разными ферментами. Окисление жирных кислот как источников энергии увеличивается в постабсорбтивный период, при голодании и физической работе. В этих состояниях их концентрация в крови увеличивается в результате мобилизации из жировых депо, и они активно окисляются печенью, мышцами и другими тканями. При голодании часть жирных кислот в печени превращается в другие «топливные» молекулы — кетоновые тела. Они, в отличие от жирных кислот, могут использоваться нервной тканью как источник энергии. При голодании и длительной физической работе кетоновые тела служат источником энергии для мышц и некоторых других тканей.

А. β-Окисление жирных кислот

β-Окисление — специфический путь катаболизма жирных кислот, при котором от карбоксильного конца жирной кислоты последовательно отделяется по 2 атома углерода в виде ацетил-КоА. Метаболический путь — β-окисление — назван так потому, что реакции окисления жирной кислоты происходят у β-углеродного атома. Реакции β-окисления и последующего окисления ацетил-КоА в ЦТК служат одним из основных источников энергии для синтеза АТФ по механизму окислительного фосфорилирования. β-Окисление жирных кислот происходит только в аэробных условиях.

Активация жирных кислот

Перед тем, как вступить в различные реакции, жирные кислоты должны быть активированы, т.е. связаны макроэргической связью с коферментом А:

$$RCOOH + HSKoA + АТФ \rightarrow RCO \sim KoA + АМФ + PPi.$$

Реакцию катализирует фермент ацил-КоА синтетаза. Выделившийся в ходе реакции пирофосфат гидролизуется ферментом пирофосфатазой: $H_4P_2O_7 + H_2O \rightarrow 2\ H_3PO_4$.

Выделение энергии при гидролизе макроэргической связи пирофосфата смещает равновесие реакции вправо и обеспечивает полноту протекания реакции активации.

Ацил-КоА синтетазы находятся как в цитозоле, так и в матриксе митохондрий. Эти ферменты отличаются по специфичности к жирным кислотам с различной длиной углеводородной цепи. Жирные кислоты с короткой и средней длиной цепи (от 4 до 12 атомов углерода) могут проникать в матрикс митохондрий путём диффузии. Активация этих жирных кислот происходит в матриксе митохондрий. Жирные кислоты с длинной цепью, которые преобладают в организме человека (от 12 до 20 атомов углерода), активируются ацил-КоА синтетазами, расположенными на внешней мембране митохондрий.

Транспорт жирных кислот с длинной углеводородной цепью в митохондриях

β-Окисление жирных кислот происходит в матриксе митохондрий, поэтому после активации жирные кислоты должны транспортироваться внутрь митохондрий. Жирные кислоты с длинной углеводородной цепью переносятся через плотную внутреннюю мембрану митохондрий с помощью карнитина. Карнитин поступает с пищей или синтезируется из незаменимых аминокислот лизина и метионина. В реакциях синтеза карнитина участвует витамин С (аскорбиновая кислота).

В наружной мембране митохондрий находится фермент карнитинацилтрансфераза I (карнитинпальмитоилтрансфераза I), катализирующий реакцию с образованием ацилкарнитина.

Образовавшийся ацилкарнитин проходит через межмембранное пространство к наружной стороне внутренней мембраны и транспортируется с помощью карнитинацилкарнитинтранслоказы на внутреннюю поверхность внутренней мембраны митохондрий, где фермент карнитинацилтрансфераза II катализирует перенос ацила на внутримитохондриальный КоА (рис. 8-26). Таким образом, ацил-КоА становится доступным для ферментов β-окисления. Свободный карнитин возвращается на цитозольную сторону внут-

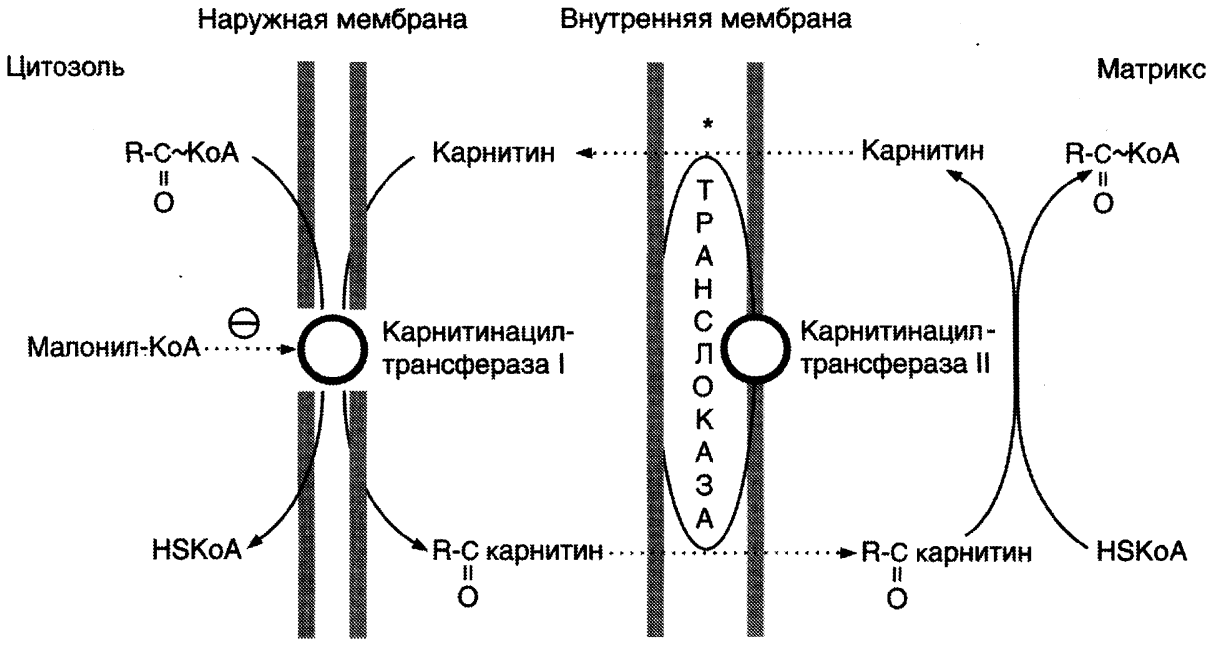


Рис. 8-26. Перенос жирных кислот с длинным углеводородным радикалом через мембраны митохондрий. Фермент карнитинацилтрансфераза I — регуляторный фермент β-окисления; ингибируется малонил-КоА — промежуточным метаболитом, образующимся при биосинтезе жирных кислот. * — карнитинацилкарнитинтранслоказа.

ренней мембраны митохондрий той же транслоказой.

На внутренней поверхности внутренней мембраны находится фермент карнитинацил трансфераза II, катализирующий обратный перенос ацила с карнитина на внутримитохондриальный КоА. После этого ацил-КоА включается в реакции β-окисления.

β-Окисление жирных кислот — специфический путь катаболизма жирных кислот, протекающий в матриксе митохондрий только в аэробных условиях и заканчивающийся образованием ацетил-КоА. Водород из реакций β-окисления поступает в ЦПЭ, а ацетил-КоА окисляется в цитратном цикле, также поставляющем водород для ЦПЭ. Поэтому β-окисление жирных кислот — важнейший метаболический путь, обеспечивающий синтез АТФ в дыхательной цепи.

β-Окисление начинается с дегидрирования ацил-КоА FAD-зависимой ацил-КоА дегидрогеназой с образованием двойной связи между α- и β-атомами углерода в продукте реакции — еноил-КоА. Восстановленный в этой реакции кофермент $FADH_2$ передаёт атомы водорода в ЦПЭ на кофермент Q. В результате синтезируются 2 молекулы АТФ (рис. 8-27). В следующей реакции β-окисления по месту двойной связи присоединяется молекула воды таким образом, что ОН-группа находится у β-углеродного атома ацила, образуя β-гидроксиацил-КоА. Затем β-гидроксиацил-КоА окисляется NAD^+-зависимой дегидрогеназой. Восстановленный NADH, окисляясь в ЦПЭ, обеспечивает энергией синтез 3 молекул АТФ. Образовавшийся β-кетоацил-КоА подвергается тиолитическому расщеплению ферментом тиолазой, так как по месту разрыва связи С—С через атом серы присоединяется молекула кофермента А. В результате этой последовательности из 4 реакций от ацил-КоА отделяется двухуглеродный остаток — ацетил-КоА. Жирная кислота, укороченная на 2 атома углерода, опять проходит реакции дегидрирования, гидратации, дегидрирования, отщепления ацетил-КоА. Эту последовательность реакций обычно называют «циклом β-окисления», имея в виду, что одни и те же реакции повторяются с радикалом жирной кислоты до тех пор, пока вся кислота не превратится в ацетильные остатки.

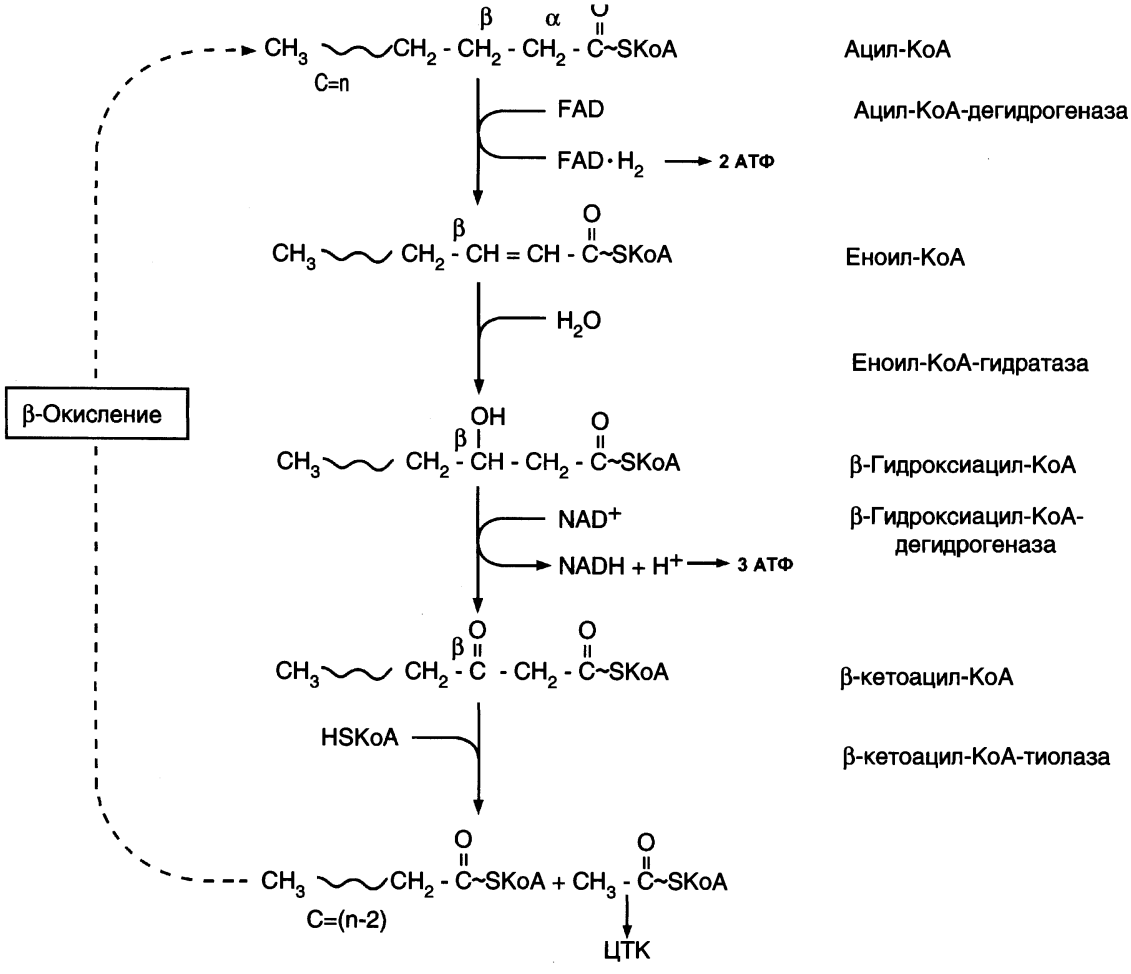


Рис. 8-27. β-Окисление жирных кислот.

Продуктами каждого цикла β-окисления являются $FADH_2$, NADH и ацетил-КоА. Хотя реакции в каждом «цикле» одни и те же, остаток кислоты, который входит в каждый последующий цикл, короче на 2 углеродных атома. В последнем цикле окисляется жирная кислота из 4 атомов углерода, поэтому образуются 2 молекулы ацетил-КоА, а не 1, как в предыдущих. Суммарное уравнение β-окисления, например пальмитоил-КоА может быть представлено таким образом:

$C_{15}H_{31}CO\text{-}KoA + 7\ FAD + 7\ NAD^+ + 7\ HSKoA \rightarrow$
$8\ CH_3\text{-}CO\text{-}KoA + 7\ FADH_2 + 7\ (NADH + H^+).$

Если рассчитывать выход АТФ при окислении пальмитиновой кислоты (табл. 8-7), то из общей суммы молекул АТФ необходимо вычесть 2 молекулы, так как на активацию жирной кислоты тратится энергия 2 макроэргических связей (см. реакцию активации жирной кислоты).

Во многих тканях окисление жирных кислот — важный источник энергии. Это ткани с высокой активностью ферментов ЦТК и дыхательной цепи — клетки красных скелетных мышц, сердечная мышца, почки. Эритроциты, в которых отсутствуют митохондрии, не могут

Таблица 8-7. Синтез АТФ при полном окислении пальмитиновой кислоты

β-Окисление	Количество молекул АТФ
7 NADH (от пальмитоил-КоА до ацетил-КоА), окисление каждой молекулы кофермента в ЦПЭ обеспечивает синтез 3 молекул АТФ	21
7 $FADH_2$, окисление каждой молекулы кофермента в ЦПЭ обеспечивает синтез 2 молекул АТФ	14
Окисление каждой из 8 молекул ацетил-КоА в ЦТК обеспечивает синтез 12 молекул АТФ	96
Суммарное количество молекул АТФ, синтезированных при окислении одной молекулы пальмитоил-КоА	**131**

окислять жирные кислоты. Жирные кислоты не служат источником энергии для мозга и других нервных тканей, так как жирные кислоты не проходят через гематоэнцефалический барьер, как и другие гидрофобные вещества. В экспериментах показано, что скорость обмена жирных кислот в нервной ткани существенно меньше, чем в других тканях.

Регуляция скорости β-окисления

β-Окисление — метаболический путь, прочно связанный с работой ЦПЭ и общего пути катаболизма. Поэтому его скорость регулируется потребностью клетки в энергии, т.е. соотношениями АТФ/АДФ и $NADH/NAD^+$, так же, как и скорость реакций ЦПЭ и общего пути катаболизма (см. раздел 6). Скорость β-окисления в тканях зависит от доступности субстрата, т.е. от количества жирных кислот, поступающих в митохондрии. Концентрация свободных жирных кислот в крови повышается при активации липолиза в жировой ткани при голодании под действием глюкагона и при физической работе под действием адреналина. В этих условиях жирные кислоты становятся преимущественным источником энергии для мышц и печени, так как в результате β-окисления образуются NADH и ацетил-КоА, ингибирующие пируватдегидрогеназный комплекс. Превращение пирувата, образующегося из глюкозы, в ацетил-КоА замедляется. Накапливаются промежуточные метаболиты гликолиза и, в частности, глюкозо-6-фосфат. Глюкозо-6-фосфат ингибирует гексокиназу и, следовательно, препятствует использованию глюкозы в процессе гликолиза. Таким образом, преимущественное использование жирных кислот как основного источника энергии в мышечной ткани и печени сберегает глюкозу для нервной ткани и эритроцитов.

Скорость β-окисления зависит также от активности фермента карнитинацилтрансферазы I. В печени этот фермент ингибируется малонил-КоА, веществом, образующимся при биосинтезе жирных кислот. В абсорбтивный период в печени активируется гликолиз и увеличивается образование ацетил-КоА из пирувата. Первая реакция синтеза жирных кислот — превращение ацетил-КоА в малонил-КоА. Малонил-КоА ингибирует β-окисление жирных кислот, которые могут использоваться для синтеза жира.

Окисление ненасыщенных жирных кислот

Около половины жирных кислот в организме человека ненасыщенные. β-Окисление этих кислот идёт обычным путём до тех пор, пока двойная связь не окажется между третьим и четвёртым атомами углерода (рис. 8-28). Затем фермент еноил-КоА изомераза перемещает двойную связь из положения 3—4 в положение 2—3 и изменяет цис-конформацию двойной связи на транс-, которая требуется для β-окисления. В этом цикле β-окисления первая реакция дегидрирования не происходит, так как двойная связь в радикале жирной кислоты уже имеется. Далее циклы β-окисления продолжаются, не отличаясь от обычного пути.

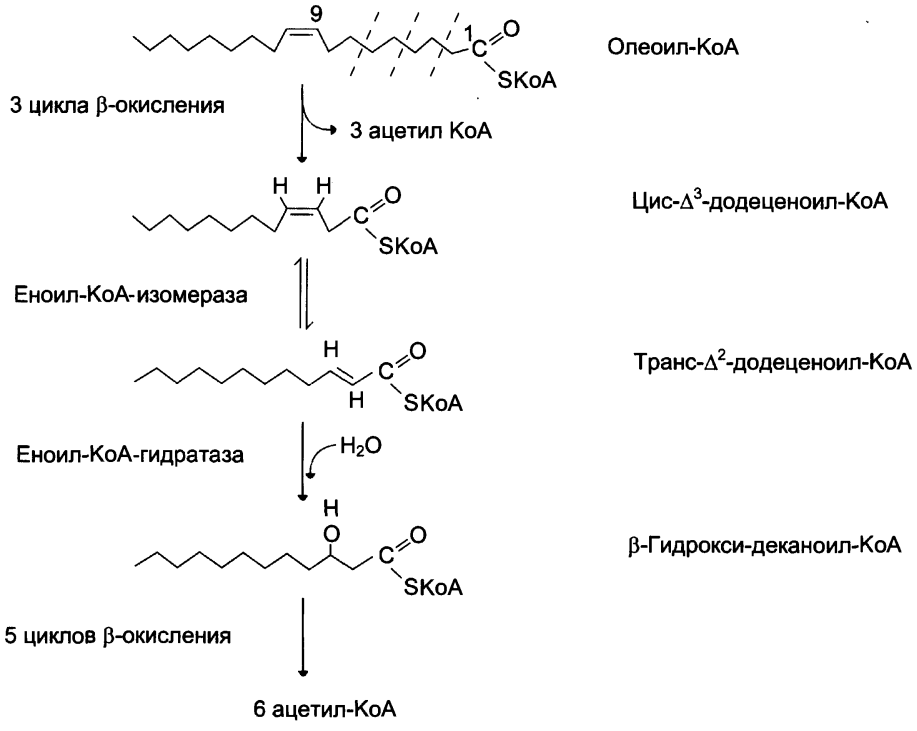


Рис. 8-28. Окисление жирных кислот с одной двойной связью.

α-Окисление жирных кислот. В липидах мозга и других отделах нервной ткани преобладают жирные кислоты с очень длинной цепью — более 20 углеродных атомов. Они окисляются по типу α-окисления, при котором от жирной кислоты отщепляется по одному атому углерода, выделяющемуся в виде CO_2 (рис. 8-29).

Этот путь катаболизма жирных кислот не связан с синтезом АТФ. α-Окислению подвергаются также жирные кислоты с разветвлённой углеводородной цепью, например фитановая, поступающая в организм с растительной пищей (рис. 8-30). Фитановая кислота образуется из фитола, который входит в состав хлорофилла. В этой кислоте у каждого третьего атома углерода находится метильная группа, что делает невозможным β-окисление данной кислоты. При α-окислении фитановой кислоты вначале удаляется метильная группа, а затем происходит цикл β-окисления.

Б. Нарушения окисления жирных кислот

Нарушение переноса жирных кислот в митохондрии. Скорость переноса жирных кислот внутрь митохондрий, а следовательно и скорость процесса β-окисления, зависит от доступности карнитина и скорости работы фермента карнитинацилтрансферазы I. β-Окисление могут нарушать следующие факторы:

- длительный гемодиализ, в ходе которого организм теряет карнитин;
- длительная ацидурия, при которой карнитин выводится как основание с органическими кислотами;
- лечение больных сахарным диабетом препаратами сульфонилмочевины, ингибирующими карнитинацилтрансферазу I;
- низкая активность ферментов, синтезирующих карнитин;
- наследственные дефекты карнитинацилтрансферазы I.

У людей с наследственными дефектами карнитинацилтрансферазы I или ферментов синтеза карнитина в скелетных мышцах снижается скорость поступления жирных кислот в матрикс митохондрий и, соответственно, скорость β-окисления. В этих случаях жирные кислоты с длинной цепью не используются как источники энергии. У таких людей снижена способность к

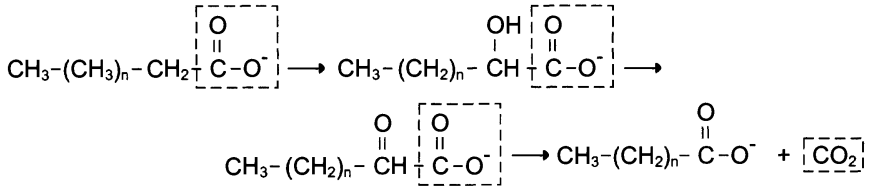


Рис. 8-29. α-Окисление жирных кислот.

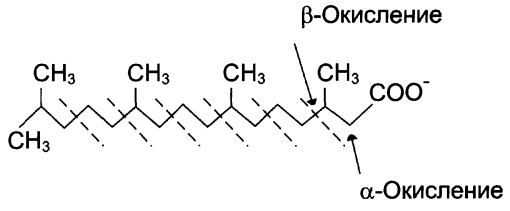


Рис. 8-30. Окисление фитановой кислоты.

физической активности; в мышечных клетках могут накапливаться жиры, образуя вакуоли.

Генетический дефект дегидрогеназы жирных кислот со средней длиной углеводородной цепи

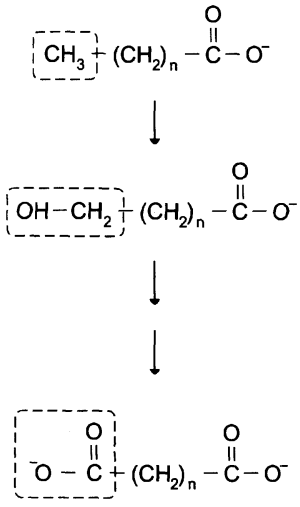
В митохондриях имеется 3 вида ацил-КоА-дегидрогеназ, окисляющих жирные кислоты с длинной, средней или короткой цепью радикала. Жирные кислоты по мере укорочения радикала в процессе β-окисления могут последовательно окисляться этими ферментами. Генетический дефект дегидрогеназы жирных кислот со средней длиной радикала наиболее распространён по сравнению с другими наследственными заболеваниями — 1:15 000. Частота дефектного гена среди европейской популяции — 1:40. Это аутосомно-рецессивное заболевание, возникающее в результате замены Т на А в 985-й позиции гена. Активность этой дегидрогеназы особенно важна для грудных детей, у которых жиры молока служат основным источником энергии, а в триацилглицеролах молока преобладают жирные кислоты со средней длиной цепи. Невозможность использовать жирные кислоты как источники энергии приводит к увеличению скорости окисления глюкозы. В результате у детей развивается гипогликемия — причина внезапной детской смертности (10% от общего числа умерших новорождённых). Если такие дети выживают, то после голодания в течение 6—8 ч у них развиваются гипогликемические приступы (слабость, головокружение, рвота, потеря сознания). Введение глюкозы приводит к исчезновению симптомов.

Во всех случаях, когда нарушается β-окисление, жирные кислоты накапливаются в клетках и распадаются по пути ω-окисления, которое в норме идёт с очень низкой скоростью. Окисление происходит по метильному ω-атому углерода (рис. 8-31), и в результате образуются дикарбоновые кислоты, выделяющиеся с мочой. Определение этих кислот в моче может служить диагностическим признаком нарушения β-окисления.

Нарушение окисления фитановой кислоты. При редком наследственном заболевании — болезни Рефсума, развивающейся вследствие генетического дефекта одного из ферментов, участвующих в α-окислении, фитановая кислота, поступающая с пищей, не окисляется и накапливается в организме, в основном в нервной ткани. Это приводит к нарушению структуры нервной ткани и развитию многих неврологических симптомов.

В. ОБМЕН КЕТОНОВЫХ ТЕЛ

При голодании, длительной физической работе и в случаях, когда клетки не получают достаточного количества глюкозы, жирные кисло-



Продукты ω-окисления – дикарбоновые кислоты, выделяющиеся с мочой:

1. $^{-}OOC-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-COO^{-}$
2. $^{-}OOC-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-COO^{-}$

Рис. 8-31. ω-Окисление жирных кислот. ω-Окисление жирных кислот активируется в тех случаях, когда активность β-окисления жирных кислот снижена. 1 — адипиновая кислота; 2 — субериновая кислота.

ты используются многими тканями как основной источник энергии. В отличие от других тканей мозг и другие отделы нервной ткани практически не используют жирные кислоты в качестве источника энергии. В печени часть жирных кислот превращается в кетоновые тела, которые окисляются мозгом, нервной тканью, мышцами, обеспечивая достаточное количество энергии для синтеза АТФ и уменьшая потребление глюкозы. К кетоновым телам относят β-гидроксибутират, ацетоацетат и ацетон. Первые две молекулы могут окисляться в тканях, обеспечивая синтез АТФ. Ацетон образуется только при высоких концентрациях кетоновых тел в крови и, выделяясь с мочой, выдыхаемым воздухом и потом, позволяет организму избавляться от избытка кетоновых тел.

Синтез кетоновых тел в печени. При низком соотношении инсулин/глюкагон в крови в жировой ткани активируется распад жиров. Жирные кислоты поступают в печень в большем количестве, чем в норме, поэтому увеличивается скорость β-окисления (рис. 8-32). Скорость реакций ЦТК в этих условиях снижена, так как оксалоацетат используется для глюконеогенеза. В результате скорость образования ацетил-КоА превышает способность ЦТК окислять его. Ацетил-КоА накапливается в митохондриях печени и используется для синтеза кетоновых тел. Синтез кетоновых тел происходит только в митохондриях печени.

Синтез кетоновых тел начинается с взаимодействия двух молекул ацетил-КоА, которые под действием фермента тиолазы образуют ацетоацетил-КоА (рис. 8-33). С ацетоацетил-КоА взаимодействует третья молекула ацетил-КоА, образуя 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА (ГМГ-КоА). Эту реакцию катализирует фермент ГМГ-КоА-синтаза. Далее ГМГ-КоА-лиаза катализирует расщепление ГМГ-КоА на свободный ацетоацетат и ацетил-КоА.

Ацетоацетат может выделяться в кровь или превращаться в печени в другое кетоновое тело — β-гидроксибутират путём восстановления.

В клетках печени при активном β-окислении создаётся высокая концентрация NADH. Это способствует превращению большей части ацетоацетата в β-гидроксибутират, поэтому основное кетоновое тело в крови — именно β-гидроксибутират. При голодании для многих тканей жирные кислоты и кетоновые тела становятся основными топливными молекулами. Глюкоза используется в первую очередь нервной тканью и эритроцитами.

При высокой концентрации ацетоацетата часть его неферментативно декарбоксилируется, превращаясь в ацетон. Ацетон не утилизируется тканями, но выделяется с выдыхаемым воздухом и мочой. Таким путём организм удаляет избыточное количество кетоновых тел, которые не успевают окисляться, но, являясь водорастворимыми кислотами, вызывают ацидоз.

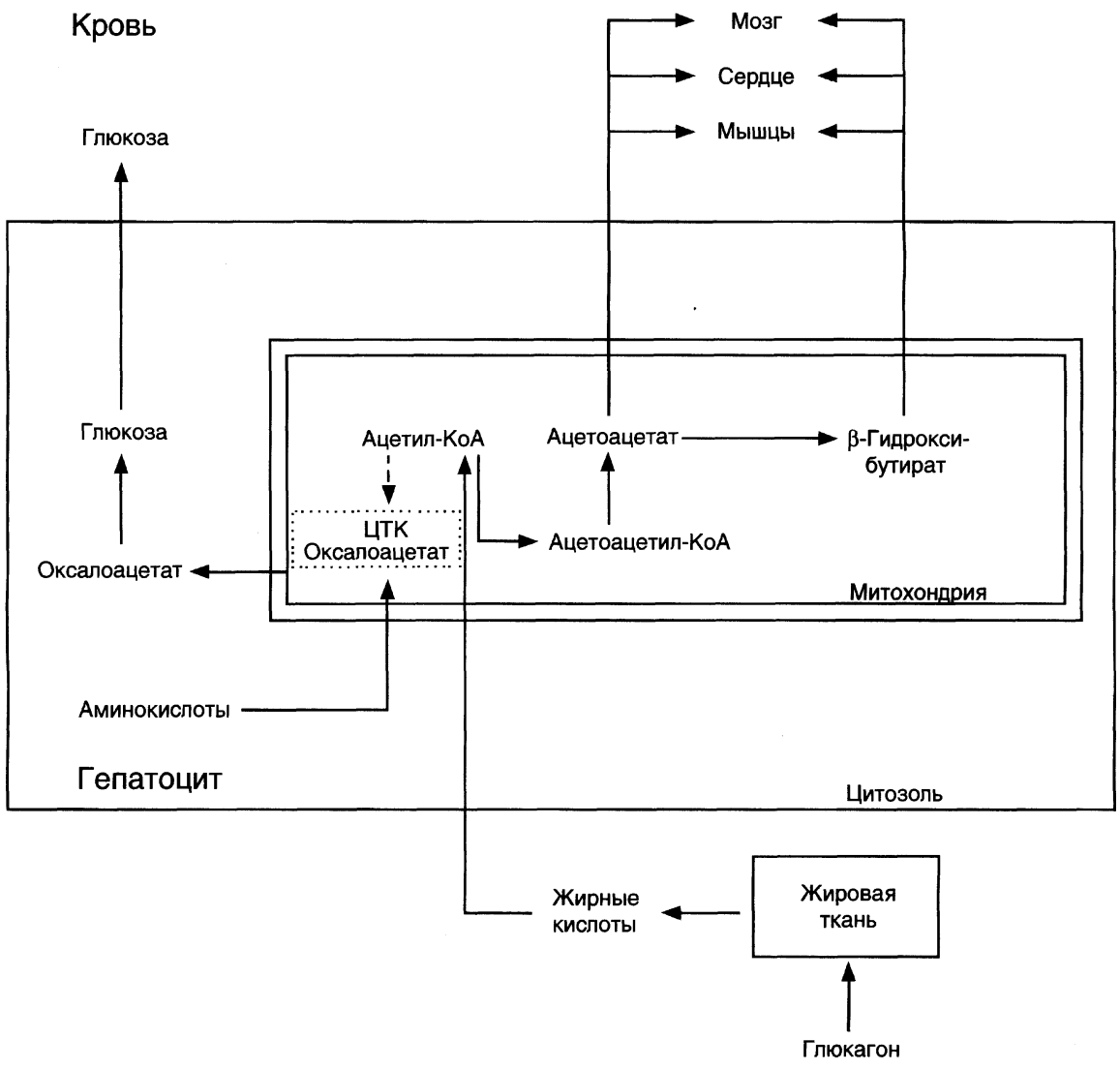


Рис. 8-32. Активация синтеза кетоновых тел при голодании. Точечные линии — скорость метаболических путей снижена; сплошные линии — скорость метаболических путей повышена. При голодании в результате действия глюкагона активируются липолиз в жировой ткани и β-окисление в печени. Количество оксалоацетата в митохондриях уменьшается, так как он, восстановившись до малата, выходит в цитозоль, где опять превращается в оксалоацетат и используется в глюконеогенезе. В результате скорость реакций ЦТК снижается и, соответственно, замедляется окисление ацетил-КоА. Концентрация ацетил-КоА в митохондриях увеличивается, и активируется синтез кетоновых тел. Синтез кетоновых тел увеличивается также при сахарном диабете (см. раздел 11).

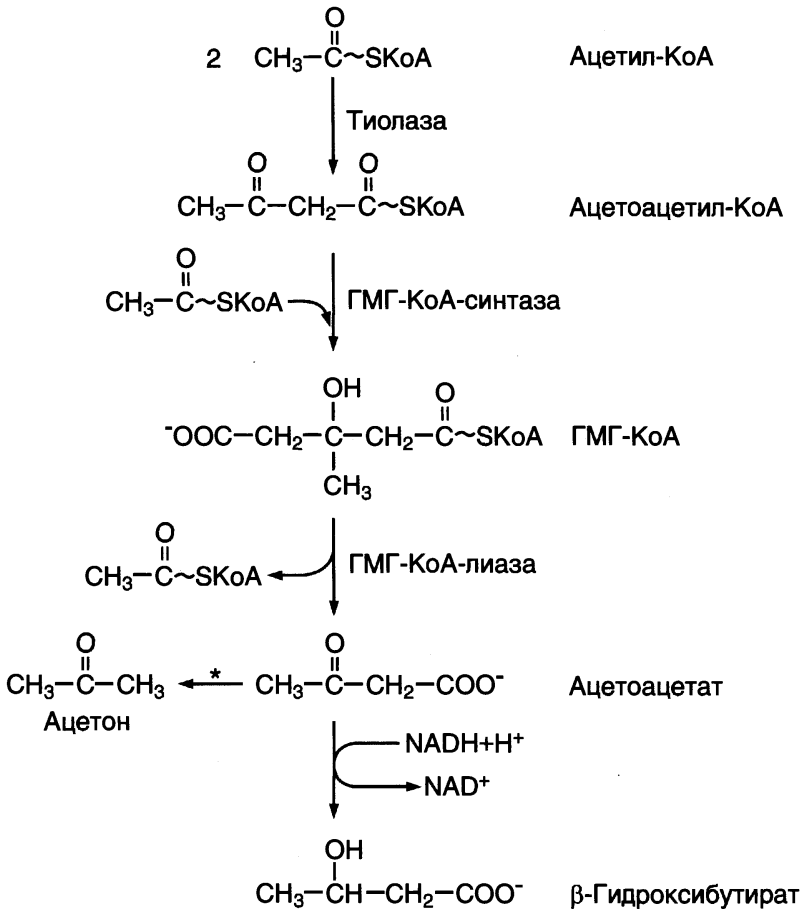


Рис. 8-33. Синтез кетоновых тел в митохондриях гепатоцитов. Регуляторный фермент синтеза кетоновых тел (ГМГ-КоА-синтаза) ингибируется свободным КоА. * — реакция идёт неферментативно при высокой концентрации кетоновых тел в крови.

Регуляция синтеза кетоновых тел. Регуляторный фермент синтеза кетоновых тел — ГМГ-КоА синтаза.

- ГМГ-КоА-синтаза — индуцируемый фермент; его синтез увеличивается при повышении концентрации жирных кислот в крови. Концентрация жирных кислот в крови увеличивается при мобилизации жиров из жировой ткани под действием глюкагона, адреналина, т.е. при голодании или физической работе.
- ГМГ-КоА-синтаза ингибируется высокими концентрациями свободного кофермента А.
- Когда поступление жирных кислот в клетки печени увеличивается, КоА связывается с ними, концентрация свободного КоА снижается, и фермент становится активным.
- Если поступление жирных кислот в клетки печени уменьшается, то, соответственно, увеличивается концентрация свободного КоА, ингибирующего фермент. Следовательно, скорость синтеза кетоновых тел в печени зависит от поступления жирных кислот.

Окисление кетоновых тел в периферических тканях

При длительном голодании кетоновые тела становятся основным источником энергии для скелетных мышц, сердца и почек. Таким обра-

зом глюкоза сохраняется для окисления в мозге и эритроцитах. Уже через 2-3 дня после начала голодания концентрация кетоновых тел в крови достаточна для того, чтобы они проходили в клетки мозга и окислялись, снижая его потребности в глюкозе.

β-Гидроксибутират (рис. 8-34), попадая в клетки, дегидрируется NAD-зависимой дегидрогеназой и превращается в ацетоацетат. Ацетоацетат активируется, взаимодействуя с сукцинил-КоА — донором КоА:

Ацетоацетат + Сукцинил-КоА → Ацетоацетил-КоА + Сукцинат.

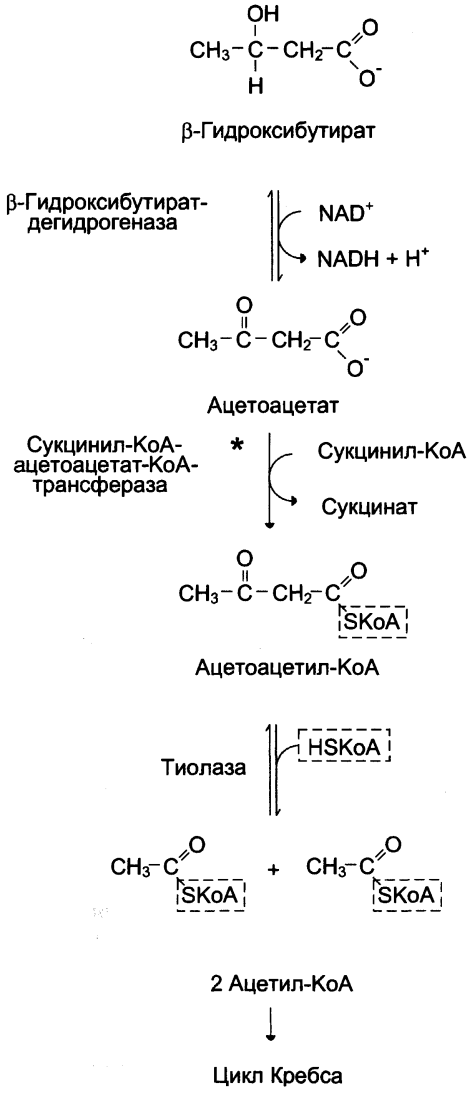


Рис. 8-34. Окисление кетоновых тел в тканях. * — реакция активации ацетоацетата.

Реакцию катализирует сукцинил-КоА-ацетоацетат-КоА-трансфераза. Этот фермент не синтезируется в печени, поэтому печень не использует кетоновые тела как источники энергии, а производит их «на экспорт». Кетоновые тела — хорошие топливные молекулы; окисление одной молекулы β-гидроксибутирата до CO_2 и H_2O обеспечивает синтез 27 молекул АТФ. Эквивалент одной макроэргической связи АТФ (в молекуле сукцинил-КоА) используется на активацию ацетоацетата, поэтому суммарный выход АТФ при окислении одной молекулы β-гидроксибутирата — 26 молекул.

Кетоацидоз. В норме концентрация кетоновых тел в крови составляет 1—3 мг/дл (до 0,2 мМ/л), но при голодании значительно увеличивается. Увеличение концентрации кетоновых тел в крови называют кетонемией, выделение кетоновых тел с мочой — кетонурией. Накопление кетоновых тел в организме приводит к кетоацидозу: уменьшению щелочного резерва (компенсированному ацидозу), а в тяжёлых случаях — к сдвигу pH (некомпенсированному ацидозу), так как кетоновые тела (кроме ацетона) являются водорастворимыми органическими кислотами (pK~3,5), способными к диссоциации:

$CH_3\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}COOH \leftrightarrow CH_3\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}COO^- + H^+$.

Ацидоз достигает опасных величин при сахарном диабете, так как концентрация кетоновых тел при этом заболевании может доходить до 400—500 мг/дл. Тяжёлая форма ацидоза — одна из основных причин смерти при сахарном диабете. Накопление протонов в крови нарушает связывание кислорода гемоглобином, влияет на ионизацию функциональных групп белков, нарушая их конформацию и функцию.

Г. Биосинтез жирных кислот

С пищей в организм поступают разнообразные жирные кислоты, в том числе и незаменимые. Значительная часть заменимых жирных кислот синтезируется в печени, в меньшей степени — в жировой ткани и лактирующей молочной железе. Источником углерода для синтеза жирных кислот служит ацетил-КоА, образующийся при распаде глюкозы в абсорбтивном периоде. Таким образом, избыток углеводов, поступающих в организм, трансформируется в жирные кислоты, а затем в жиры.

1. Синтез пальмитиновой кислоты

Образование ацетил-КоА и его транспорт в цитозоль

Синтез жирных кислот происходит в абсорбтивный период. Активный гликолиз и последующее окислительное декарбоксилирование пирувата способствуют увеличению концентрации ацетил-КоА в матриксе митохондрий. Так как синтез жирных кислот происходит в цитозоле клеток, то ацетил-КоА должен быть транспортирован через внутреннюю мембрану митохондрий в цитозоль. Однако внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для ацетил-КоА, поэтому в матриксе митохондрий ацетил-КоА конденсируется с оксалоацетатом с образованием цитрата при участии цитратсинтазы:

Ацетил-КоА + Оксалоацетат → Цитрат + HS-КоА.

Затем транслоказа переносит цитрат в цитоплазму (рис. 8-35).

Перенос цитрата в цитоплазму происходит только при увеличении количества цитрата в митохондриях, когда изоцитратдегидрогеназа и α-кетоглутаратдегидрогеназа ингибированы высокими концентрациями NADH и АТФ. Эта ситуация создаётся в абсорбтивном периоде, когда клетка печени получает достаточное количество источников энергии. В цитоплазме цитрат расщепляется под действием фермента цитратлиазы:

Цитрат + HSКоА + АТФ → Ацетил-КоА + АДФ + Pi + Оксалоацетат.

Ацетил-КоА в цитоплазме служит исходным субстратом для синтеза жирных кислот, а оксалоацетат в цитозоле подвергается следующим превращениям (см. схему ниже).

Пируват транспортируется обратно в матрикс митохондрий. Восстановленный в результате действия малик-фермента NADPH используется как донор водорода для последующих реакций синтеза жирных кислот. Другой источник NADPH — окислительные стадии пентозофосфатного пути катаболизма глюкозы.

Образование малонил-КоА из ацетил-КоА — регуляторная реакция в биосинтезе жирных кислот.

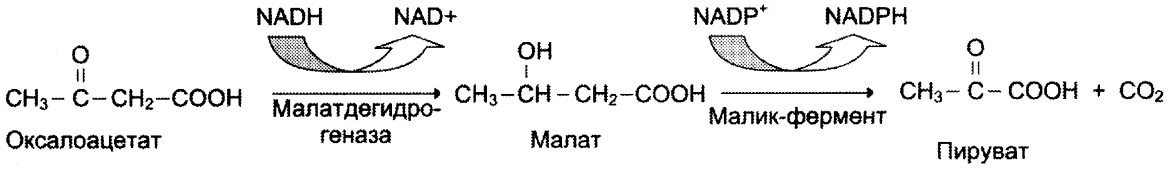
Первая реакция синтеза жирных кислот — превращение ацетил-КоА в малонил-КоА. Фермент, катализирующий эту реакцию (ацетил-КоА-карбоксилаза), относят к классу лигаз. Он содержит ковалентно связанный биотин (рис. 8-36). В первой стадии реакции CO_2 ковалентно связывается с биотином за счёт энергии АТФ, во второй стадии COO^- переносится на ацетил-КоА с образованием малонил-КоА. Активность фермента ацетил-КоА-карбоксилазы определяет скорость всех последующих реакций синтеза жирных кислот.

Реакции, катализируемые синтазой жирных кислот, — ферментным комплексом, катализирующим реакции синтеза пальмитиновой кислоты, описывается ниже.

После образования малонил-КоА синтез жирных кислот продолжается на мультиферментном комплексе — синтазе жирных кислот (пальмитоилсинтетазе). Этот фермент состоит из 2 идентичных протомеров, каждый из которых имеет доменное строение и, соответственно, 7 центров, обладающих разными каталитическими активностями (рис. 8-37). Этот комплекс последовательно удлиняет радикал жирной кислоты на 2 углеродных атома, донором которых служит малонил-КоА. Конечный продукт работы этого комплекса — пальмитиновая кислота, поэтому прежнее название этого фермента — пальмитоилсинтетаза.

Первая реакция — перенос ацетильной группы ацетил-КоА на тиоловую группу цистеина ацетилтрансацилазным центром (рис. 8-38). Затем от малонил-КоА остаток малонила переносится на сульфгидрильную группу ацилпереносящего белка малонилтрансацилазным центром. После этого комплекс готов к первому циклу синтеза.

Ацетильная группа конденсируется с остатком малонила по месту отделившегося CO_2. Реакция катализируется кетоацилсинтазным центром. Образовавшийся радикал ацетоацети-



Схема

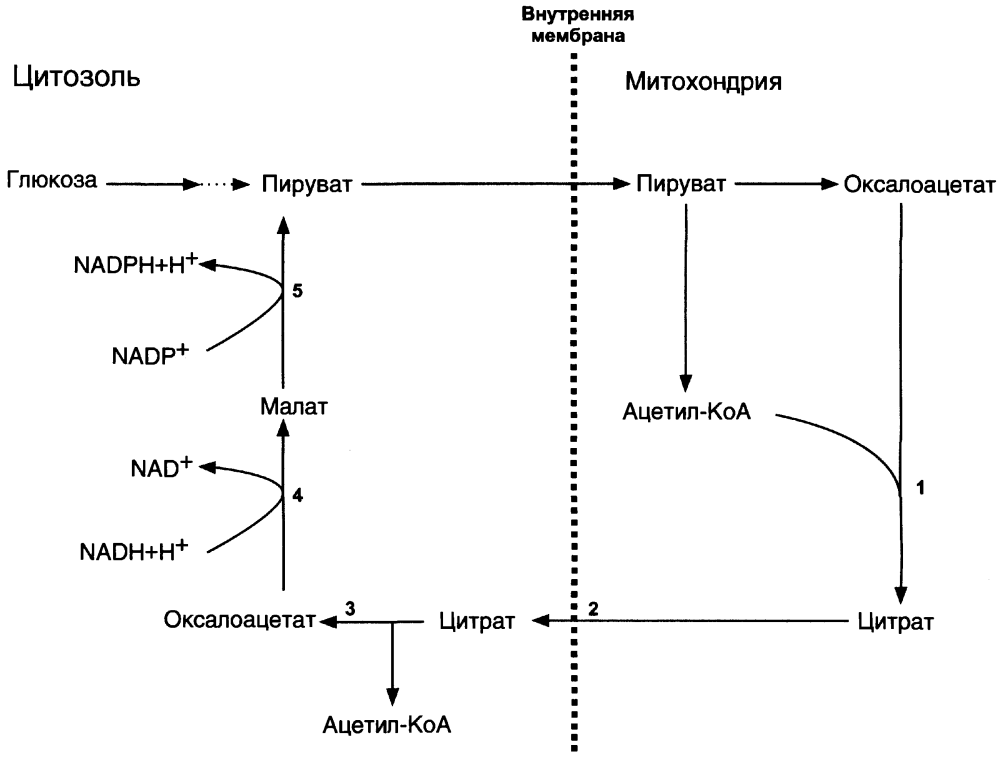


Рис. 8-35. Перенос ацетильных остатков из митохондрий в цитозоль. Действующие ферменты: 1 — цитратсинтаза; 2 — транслоказа; 3 — цитратлиаза; 4 — малатдегидрогеназа; 5 — малик-фермент.

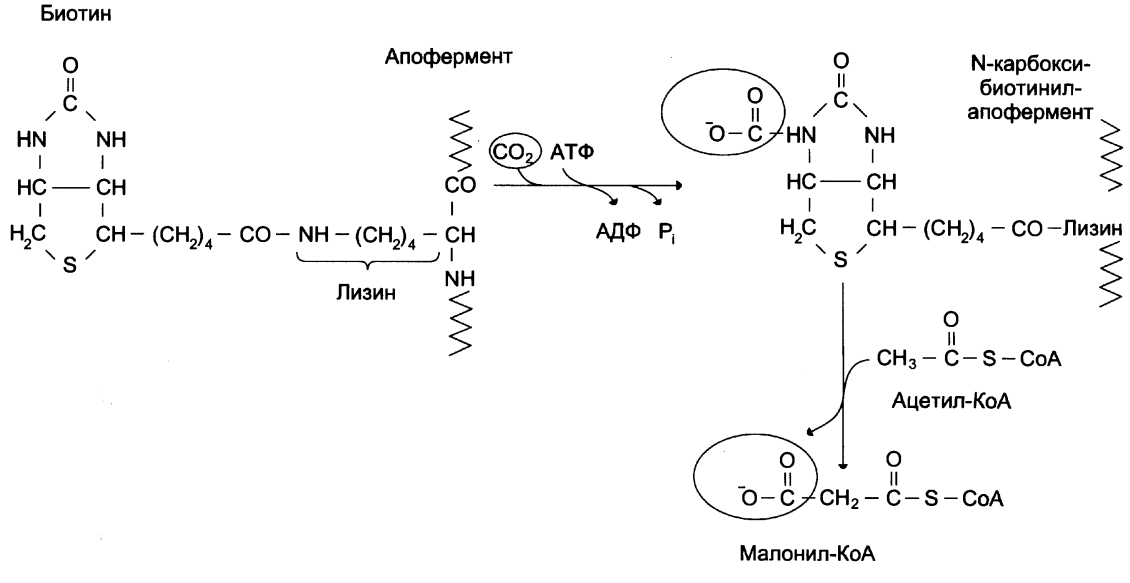


Рис. 8-36. Роль биотина в реакции карбоксилирования ацетил-КоА.

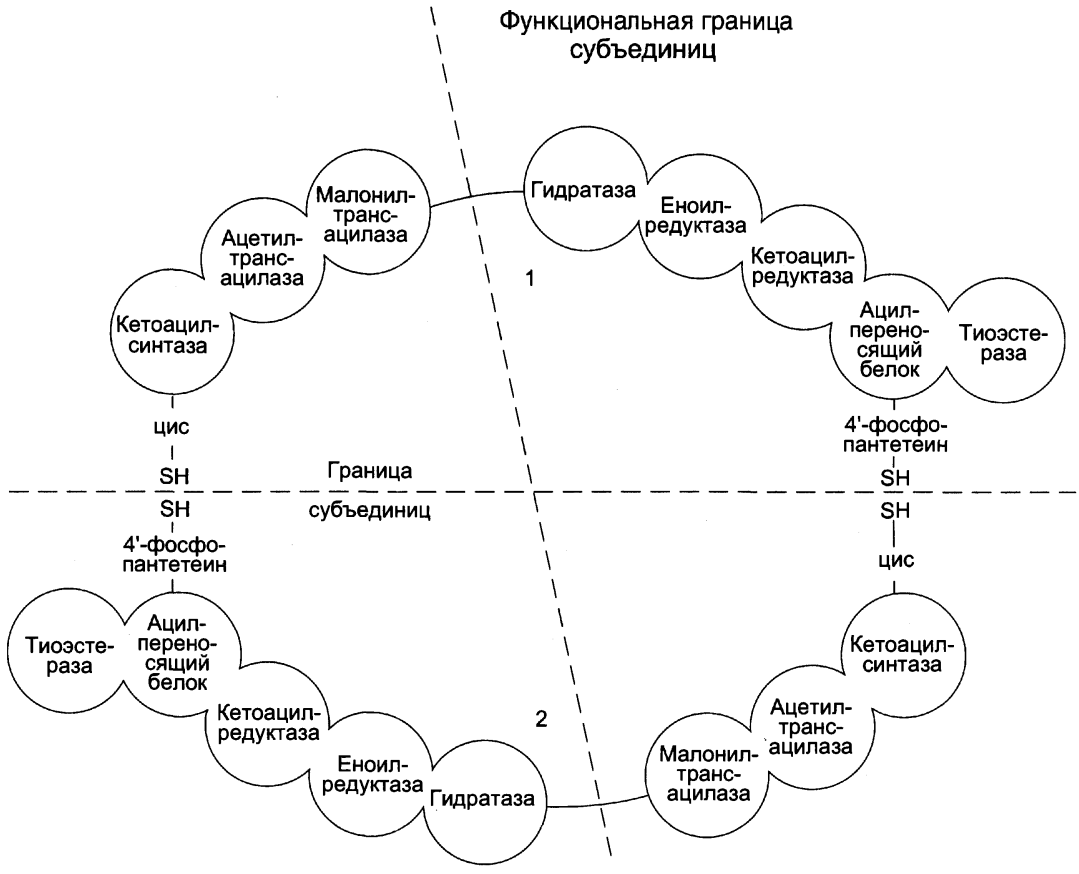


Рис. 8-37. Строение мультиферментного комплекса — синтазы жирных кислот. Комплекс — димер из двух идентичных полипептидных цепей, каждый из которых имеет 7 активных центров и ацилпереносящий белок (АПБ). SH-группы протомеров принадлежат различным радикалам. Одна SH-группа принадлежит цистеину, другая — остатку фосфопантетеиновой кислоты. SH-группа цистеина одного мономера расположена рядом с SH-группой 4-фосфопантетеината другого протомера. Таким образом, протомеры фермента расположены «голова к хвосту». Хотя каждый мономер содержит все каталитические центры, функционально активен комплекс из 2 протомеров. Поэтому реально синтезируются одновременно 2 жирных кислоты. Для упрощения в схемах обычно изображают последовательность реакций при синтезе одной молекулы кислоты.

ла последовательно восстанавливается кетоацилредуктазой, затем дегидратируется и опять восстанавливается еноилредуктазой — активными центрами комплекса. В результате первого цикла реакций образуется радикал бутирила, связанный с субъединицей синтазы жирных кислот.

Перед вторым циклом радикал бутирила переносится из позиции 2 в позицию 1 (где находился ацетил в начале первого цикла реакций). Затем остаток бутирила подвергается тем же превращениям и удлиняется на 2 углеродных атома, происходящих из малонил-КоА.

Аналогичные циклы реакций повторяются до тех пор, пока не образуется радикал пальмитиновой кислоты, который под действием тиоэстеразного центра гидролитически отделяется от ферментного комплекса, превращаясь в свободную пальмитиновую кислоту (пальмитат, рис. 8-38, 8-39).

Суммарное уравнение синтеза пальмитиновой кислоты из ацетил-КоА и малонил-КоА имеет следующий вид:

$$CH_3\text{-}CO\text{-}SKoA + 7\ HOOC\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}SKoA + 14\ (NADPH + H^+) \rightarrow C_{15}H_{31}COOH + 7\ CO_2 + 6\ H_2O + 8\ HSKoA + 14\ NADP^+.$$

Основные источники водорода для синтеза жирных кислот

В каждом цикле биосинтеза пальмитиновой кислоты проходят 2 реакции восстановления,

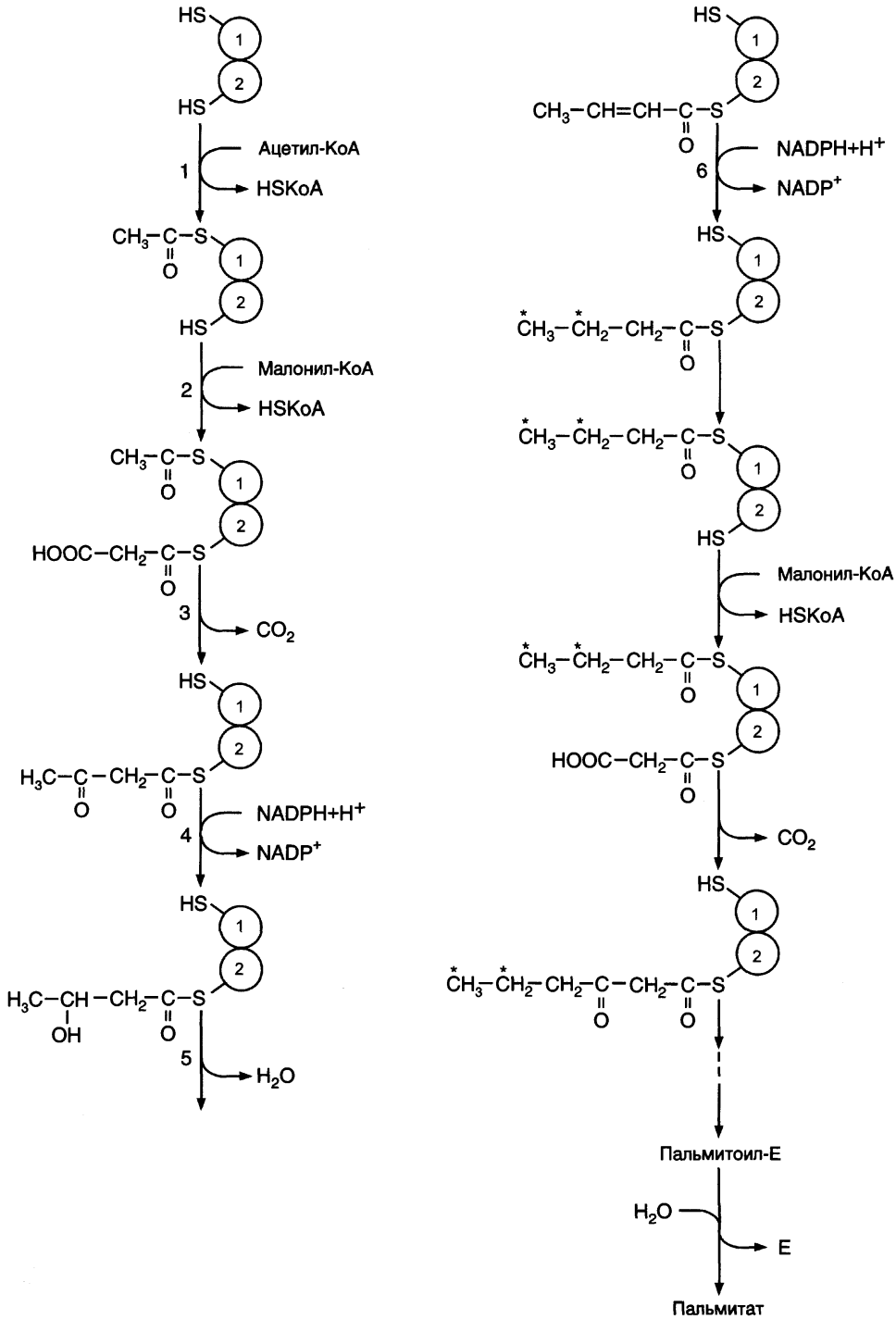


Рис. 8-38. Синтез пальмитиновой кислоты. Синтаза жирных кислот: в первом протомере SH-группа принадлежит цистеину, во втором — фосфопантетеину. После окончания первого цикла радикал бутирила переносится на SH-группу первого протомера. Затем повторяется та же последовательность реакций, что и в первом цикле. Пальмитоил-Е — остаток пальмитиновой кислоты, связанный с синтазой жирных кислот. В синтезированной жирной кислоте только 2 дистальных атома углерода, обозначенные *, происходят из ацетил-КоА, остальные — из малонил-КоА.

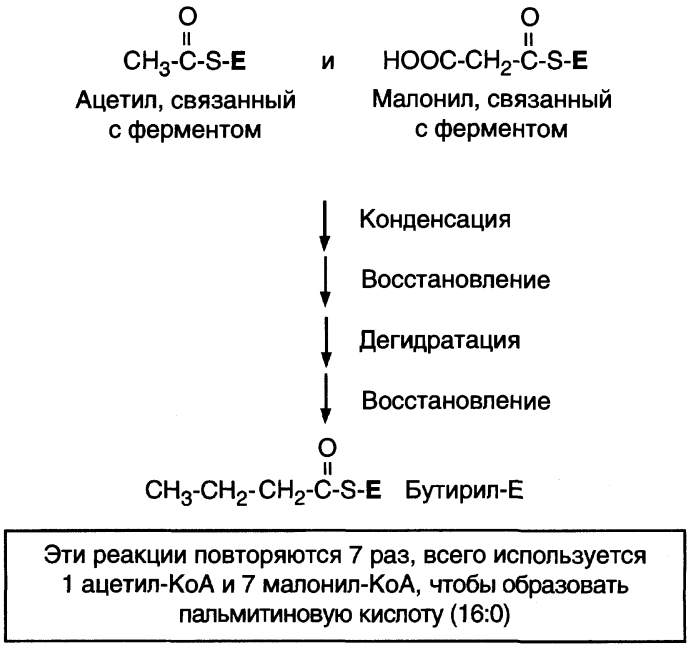


Рис. 8-39. Общая схема реакций синтеза пальмитиновой кислоты.

донором водорода в которых служит кофермент NADPH. Восстановление $NADP^+$ происходит в реакциях:

- дегидрирования в окислительных стадиях пентозофосфатного пути катаболизма глюкозы;
- дегидрирования малата малик-ферментом;
- дегидрирования изоцитрата цитозольной NADP-зависимой дегидрогеназой.

2. Регуляция синтеза жирных кислот

Регуляторный фермент синтеза жирных кислот — ацетил-КоА-карбоксилаза. Этот фермент регулируется несколькими способами.

Ассоциация/диссоциация комплексов субъединиц фермента. В неактивной форме ацетил-КоА-карбоксилаза представляет собой отдельные комплексы, каждый из которых состоит из 4 субъединиц. Активатор фермента — цитрат; он стимулирует объединение комплексов, в результате чего активность фермента увеличивается. Ингибитор — пальмитоил-КоА; он вызывает диссоциацию комплекса и снижение активности фермента (рис. 8-40).

Фосфорилирование/дефосфорилирование ацетил-КоА-карбоксилазы. В постабсорбтивном состоянии или при физической работе глюкагон или адреналин через аденилатциклазную систему активируют протеинкиназу А и стимулируют фосфорилирование субъединиц ацетил-КоА карбоксилазы. Фосфорилированный фермент неактивен, и синтез жирных кислот останавливается. В абсорбтивный период инсулин активирует фосфатазу, и ацетил-КоА карбоксилаза переходит в дефосфорилированное состояние (рис. 8-41). Затем под действием цитрата происходит полимеризация протомеров фермента, и он становится активным. Кроме активации фермента, цитрат выполняет и другую функцию в синтезе жирных кислот. В абсорбтивный период в митохондриях клеток печени накапливается цитрат, в составе которого остаток ацетила транспортируется в цитозоль.

Индукция синтеза ферментов. Длительное потребление богатой углеводами и бедной жирами пищи приводит к увеличению секреции инсулина, который стимулирует индукцию синтеза ферментов: ацетил-КоА-карбоксилазы, синтазы жирных кислот, цит-

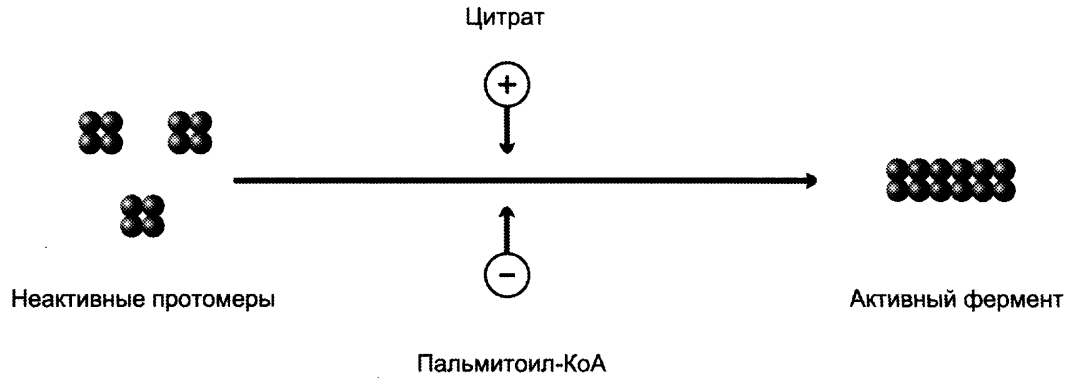


Рис. 8-40. Ассоциация/диссоциация комплексов ацетил-КоА-карбоксилазы.

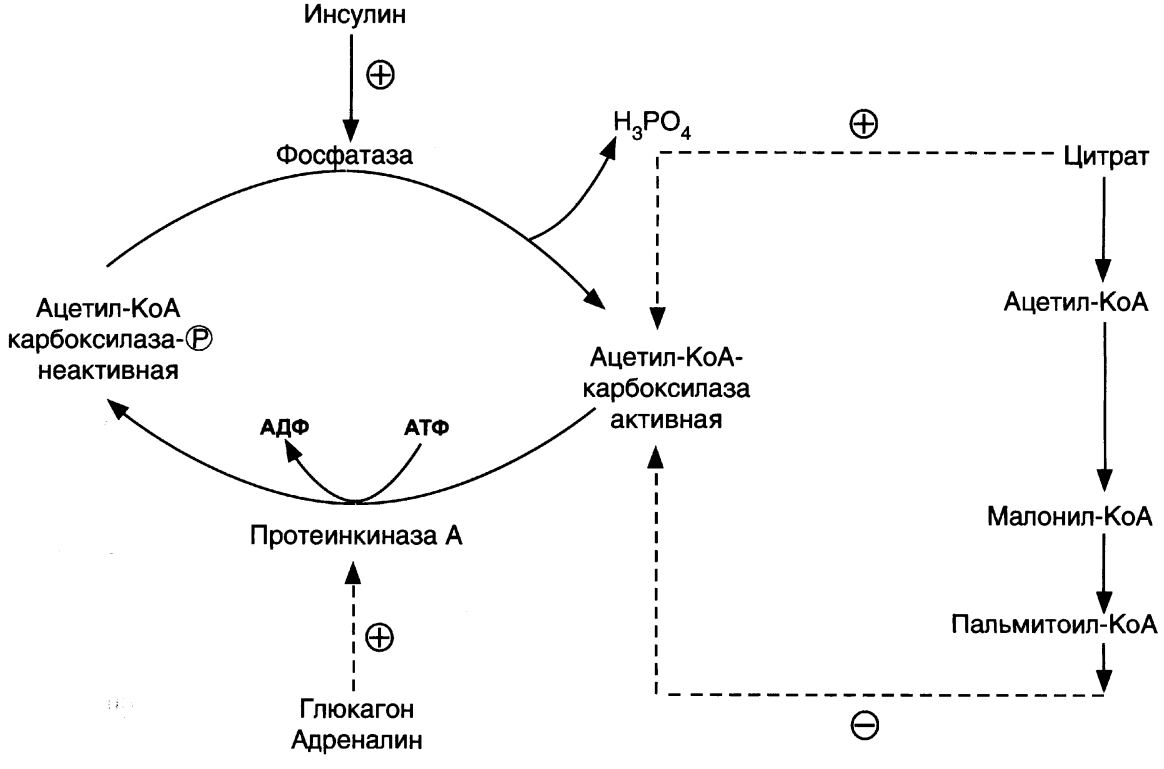


Рис. 8-41. Регуляция ацетил-КоА-карбоксилазы.

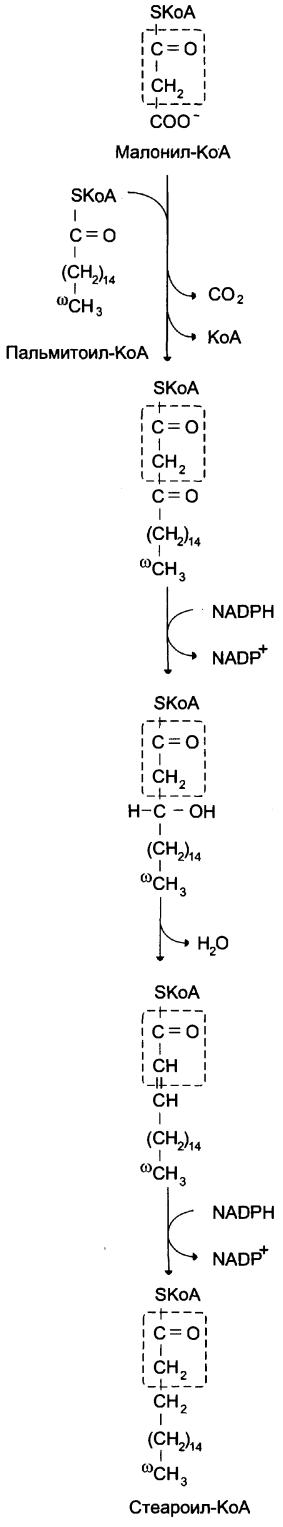


Рис. 8-42. Удлинение пальмитиновой кислоты в ЭР. Радикал пальмитиновой кислоты удлиняется на 2 углеродных атома, донором которых служит малонил-КоА.

ратлиазы, изоцитратдегидрогеназы. Следовательно, избыточное потребление углеводов приводит к ускорению превращения продуктов катаболизма глюкозы в жиры. Голодание или богатая жирами пища приводит к снижению синтеза ферментов и, соответственно, жиров.

3. Синтез жирных кислот из пальмитиновой кислоты

Удлинение жирных кислот. В ЭР происходит удлинение пальмитиновой кислоты с участием малонил-КоА. Последовательность реакций сходна с той, что происходит при синтезе пальмитиновой кислоты, однако в данном случае жирные кислоты связаны не с синтазой жирных кислот, а с КоА. Ферменты, участвующие в элонгации, могут использовать в качестве субстратов не только пальмитиновую, но и другие жирные кислоты (рис. 8-42), поэтому в организме могут синтезироваться не только стеариновая кислота, но и жирные кислоты с большим числом атомов углерода.

Основной продукт элонгации в печени — стеариновая кислота (C18:0), однако в ткани мозга образуется большое количество жирных кислот с более длинной цепью — от C_{20} до C_{24}, которые необходимы для образования сфинголипидов и гликолипидов.

В нервной ткани происходит синтез и других жирных кислот — α-гидроксикислот. Оксидазы со смешанными функциями гидроксилируют C_{22} и C_{24} кислоты с образованием лигноцериновой и цереброновой кислот, обнаруживаемых только в липидах мозга.

Образование двойных связей в радикалах жирных кислот. Включение двойных связей в радикалы жирных кислот называется десатурацией. Основные жирные кислоты, образующиеся в организме человека в результате десатурации (рис. 8-43), — пальмитоолеиновая (C16:1Δ9) и олеиновая (C18:1Δ9).

Образование двойных связей в радикалах жирных кислот происходит в ЭР в реакциях с участием молекулярного кислорода, NADH и цитохрома b_5. Ферменты десатуразы жирных кислот, имеющиеся в организме человека, не могут образовывать двойные связи в радикалах жирных кислот дистальнее девятого атома углерода, т.е. между девятым и

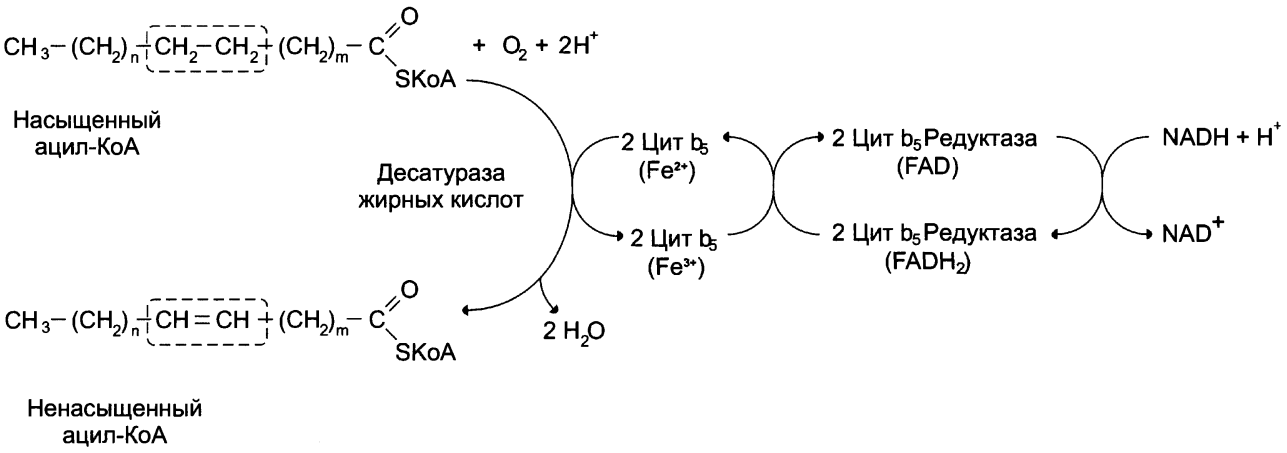


Рис. 8-43. Образование ненасыщенных жирных кислот.

метильным атомами углерода. Поэтому жирные кислоты семейства ω-3 и ω-6 не синтезируются в организме, являются незаменимыми и обязательно должны поступать с пищей, так как выполняют важные регуляторные функции.

Для образования двойной связи в радикале жирной кислоты требуется молекулярный кислород, NADH, цитохром b_5 и FAD-зависимая редуктаза цитохрома b_5. Атомы водорода, отщепляемые от насыщенной кислоты, выделяются в виде воды. Один атом молекулярного кислорода включается в молекулу воды, а другой также восстанавливается до воды с участием электронов NADH, которые передаются через $FADH_2$ и цитохром b_5.

VI. ЭЙКОЗАНОИДЫ

Эйкозаноиды — биологически активные вещества, синтезируемые большинством клеток из полиеновых жирных кислот, содержащих 20 углеродных атомов (слово «эйкоза» по гречески означает 20).

Эйкозаноиды, включающие в себя простагландины, тромбоксаны, лейкотриены и ряд других веществ, — высокоактивные регуляторы клеточных функций. Они имеют очень короткий $T_{1/2}$, поэтому оказывают эффекты как «гормоны местного действия», влияя на метаболизм продуцирующей их клетки по аутокринному механизму, и на окружающие клетки — по паракринному механизму. Эйкозаноиды участвуют во многих процессах: регулируют тонус ГМК и вследствие этого влияют на АД, состояние бронхов, кишечника, матки. Эйкозаноиды регулируют секрецию воды и натрия почками, влияют на образование тромбов. Разные типы эйкозаноидов участвуют в развитии воспалительного процесса, происходящего после повреждения тканей или инфекции. Такие признаки воспаления, как боль, отёк, лихорадка, в значительной мере обусловлены действием эйкозаноидов. Избыточная секреция эйкозаноидов приводит к ряду заболеваний, например бронхиальной астме и аллергическим реакциям.

А. Субстраты для синтеза эйкозаноидов

Главный субстрат для синтеза эйкозаноидов у человека — арахидоновая кислота (20:4, ω-6), так как её содержание в организме человека значительно больше остальных полиеновых кислот-предшественников эйкозаноидов (см. выше табл. 8-1).

В меньшем количестве для синтеза эйкозаноидов используются эйкозапентаеновая (20:5, ω-3) и эйкозатриеновая (20:3, ω-6) жирные кислоты.

Полиеновые кислоты с 20 атомами углерода поступают в организм человека с пищей или образуются из незаменимых (эссенциальных) жирных кислот с 18 атомами углерода, также поступающими с пищей (рис. 8-44).

Полиеновые жирные кислоты, которые могут служить субстратами для синтеза эйкозаноидов, входят в состав глицерофосфолипидов

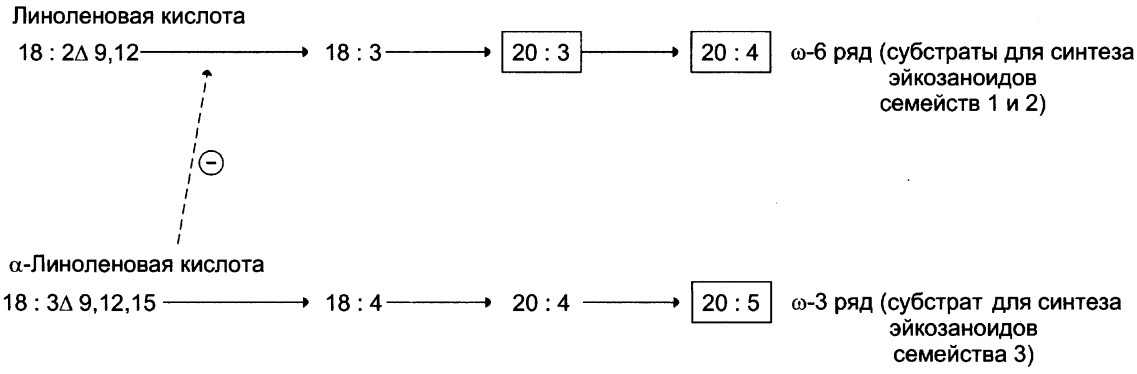


Рис. 8-44. Синтез полиеновых жирных кислот с 20 углеродными атомами в организме человека.

мембран. Под действием ассоциированной с мембраной фосфолипазы A_2 жирная кислота отщепляется от глицерофосфолипида и используется для синтеза эйкозаноидов.

Б. Структура, номенклатура и биосинтез простагландинов и тромбоксанов

Хотя субстраты для синтеза эйкозаноидов имеют довольно простую структуру (полиеновые жирные кислоты), из них образуется большая и разнообразная группа веществ. Наиболее распространены в организме человека простагландины, которые впервые были выделены из предстательной железы, откуда и получили свое название. Позже было показано, что и другие ткани организма синтезируют простагландины и другие эйкозаноиды.

1. Структура и номенклатура простагландинов и тромбоксанов

Простагландины (рис. 8-45) обозначают символами, например PG A, где PG обозначает слово «простагландин», а буква A обозначает заместитель в пятичленном кольце в молекуле эйкозаноида.

Каждая из указанных групп простагландинов состоит из 3 типов молекул, отличающихся по числу двойных связей в боковых цепях. Число двойных связей обозначают нижним цифровым индексом, например, $PG\ E_2$.

Число двойных связей в боковых цепях простагландинов зависит от структуры предшественника — полиеновой кислоты, из которой образовались простагландины. Две двойные связи полиеновой кислоты используются при образовании кольца в молекуле простагландина, а количество оставшихся двойных связей в радикалах, связанных с кольцом, определяет серию простагландина: 1 — если одна двойная связь, 2 — если две двойные связи и 3 — если в радикалах имеются три двойных связи.

PG I — простациклины. Имеют 2 кольца в своей структуре: одно пятичленное, как и другие простагландины, а другое — с участием атома кислорода. Их также подразделяют в зависимости от количества двойных связей в радикалах ($PG\ I_2$, $PG\ I_3$).

Тромбоксаны. В отличие от простагландинов, тромбоксаны синтезируются только в тромбоцитах, откуда и происходит их название, и стимулируют их агрегацию при образовании тромба.

Тромбоксаны имеют шестичленное кольцо, включающее атом кислорода (рис. 8-46). Так же, как и другие эйкозаноиды, тромбоксаны могут содержать различное число двойных связей в боковых цепях, образуя $ТХ\ A_2$ или $ТХ\ A_3$, отличающиеся по активности. $ТХ\ B_2$ — продукт катаболизма $ТХ\ A_2$ и активностью не обладает.

2. Циклооксигеназный путь: синтез простагландинов и тромбоксанов

Активация фосфолипаз. Синтез простагландинов начинается только после отделения полиеновых кислот от фосфолипида мембраны под действием ферментов (рис. 8-47). Активация фосфолипаз, ассоциированных с мембранами, происходит под действием многих факторов:

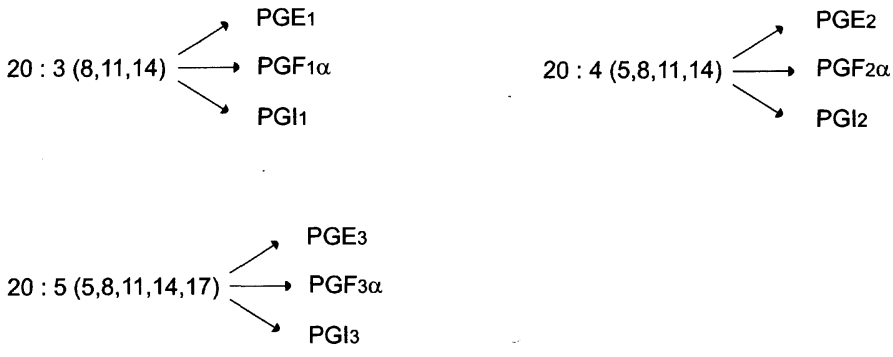
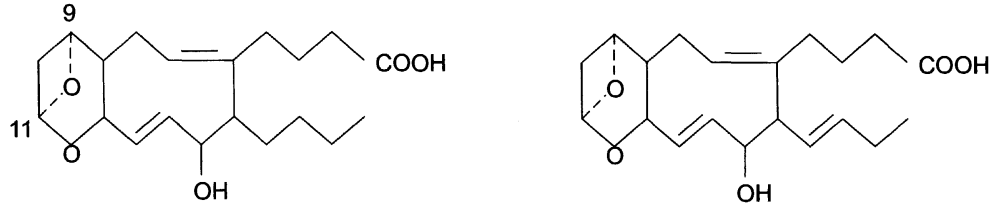


Рис. 8-45. Семейства простагландинов.



ТХА 2 (тромбоксан A_2) ТХA_3

Рис. 8-46. Структура тромбоксанов. ТХ A_2 синтезируется из арахидоновой кислоты; ТХ A_3 синтезируется из эйкозапентаеновой кислоты.

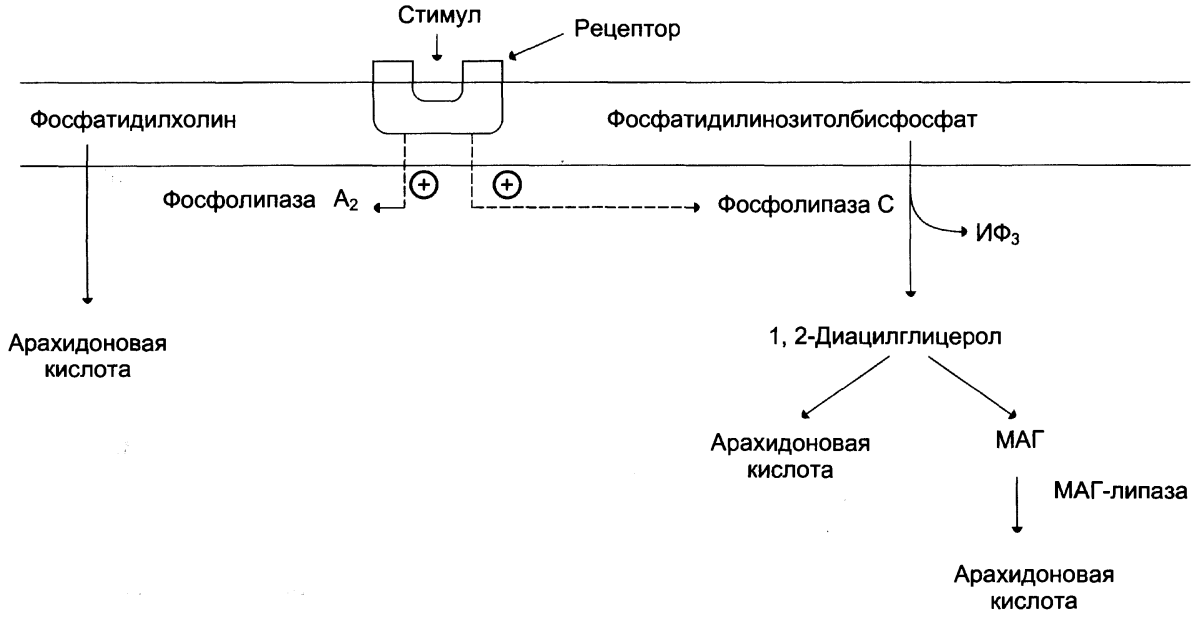


Рис. 8-47. Отделение арахидоновой кислоты от глицерофосфолипидов. МАГ — моноацилглицерол; $ИФ_3$ — инозитолтрифосфат.

гормонов, гистамина, цитокинов, механического воздействия.

Связывание стимулирующего агента с рецептором может активировать или фосфолипазу A_2 или фосфолипазу С. Это зависит от типа клетки и типа рецепторов.

После отделения арахидоновой кислоты от фосфолипида она выходит в цитозоль и в различных типах клеток превращается в разные эйкозаноиды. В клетках имеется 2 основных пути превращения арахидоновой кислоты: циклооксигеназный, приводящий к синтезу простагландинов, простациклинов и тромбоксанов, и липоксигеназный, заканчивающийся образованием лейкотриенов или других эйкозаноидов (рис. 8-48).

Синтез простагландинов. Фермент, катализирующий первый этап синтеза простагландинов, называется PG H_2 синтазой и имеет 2 каталитических центра. Один из них называют циклооксигеназой, другой — пероксидазой. Этот фермент представляет собой димер гликопротеинов, состоящий из идентичных полипептидных цепей. Фермент имеет гидрофобный домен, погружённый в липидный слой мембран ЭР, и каталитический домен, обращённый в полость ЭР. В активном центре циклооксигеназы находится тирозин (385), в активном центре пероксидазы — простетическая группа — гем. В организме имеются 2 типа циклооксигеназ (PG H_2 синтаз). Циклооксигеназа 1 — конститутивный фермент, синтезирующийся с постоянной скоростью. Синтез циклооксигеназы 2 увеличивается при воспалении и индуцируется соответствующими медиаторами — цитокинами.

Оба типа циклооксигеназ катализируют включение 4 атомов кислорода в арахидоновую кислоту и формирование пятичленного кольца. В результате образуется нестабильное гидропероксидпроизводное, называемое PG G_2. Гидропероксид у 15-го атома углерода быстро восстанавливается до гидроксильной группы пероксидазой с образованием PG H_2. До образования PG H_2 путь синтеза разных типов простагландинов одинаков. Дальнейшие превращения PG H_2 специфичны для каждого типа клеток.

Например, PG H_2 в клетках ГМК может быть восстановлен под действием PG E синтазы с образованием PG E_2 или под действием PG D синтазы с образованием PG D_2. В тромбоцитах содержится фермент тромбоксансинтаза, превращающий тот же исходный PG H_2 в ТХ A_2, обладающий сильным сосудосуживающим действием. В клетках эндотелия под действием фермента простациклинсинтазы из PG H_2 синтезируется PG I_2 (простациклин), имеющий сосудорасширяющее действие.

В. Структура и синтез лейкотриенов, ГЭТЕ, липоксинов

Лейкотриены также образуются из эйкозаноевых кислот, однако в их структуре отсутствуют циклы, как у простагландинов, и они имеют 3 сопряжённые двойные связи, хотя общее число двойных связей в молекуле больше (рис. 8-49). Лейкотриены C_4, D_4 и E_4 имеют заместители в виде трипептида глутатиона, дипептида глицилцистеина или цистеина, соответственно.

Липоксигеназный путь синтеза, приводящий к образованию большого количества разных эйкозаноидов, начинается с присоединения молекулы кислорода к одному из атомов углерода у двойной связи, с образованием гидропероксидов — гидропероксидэйкозатетраеноатов (ГПЭТЕ). Далее гидропероксиды превращаются в соответствующие гидроксиэйкозатетроеноаты (ГЭТЕ).

Структура и синтез лейкотриенов и ГЭТЕ

Синтез лейкотриенов идёт по пути, отличному от пути синтеза простагландинов, и начинается с образования гидроксипероксидов — гидропероксидэйкозатетраеноатов (ГПЭТЕ). Эти вещества или восстанавливаются с образованием гидроксиэйкозатетроеноатов (ГЭТЕ) или превращаются в лейкотриены или липоксины. ГЭТЕ отличаются по положению гидроксильной группы у 5-го, 12-го или 15-го атома углерода, например: 5-ГЭТЕ, 12-ГЭТЕ.

Липоксигеназы действуют в 5-й, 12-й или 15-й позиции арахидоновой кислоты в зависимости от типа ткани. Например, в ПЯЛ содержится в основном 5-липоксигеназа, в тромбоцитах — 12-липоксигеназа, в эозинофилах — 15-липоксигеназа.

В лейкоцитах и тучных клетках 5-ГПЭТЕ превращается в эпоксид-лейкотриен A_4 (LT A_4), где нижний индекс 4 обозначает общее количество двойных связей. Наличие 3 сопряжённых двойных связей обусловливает название «лейкотриен».

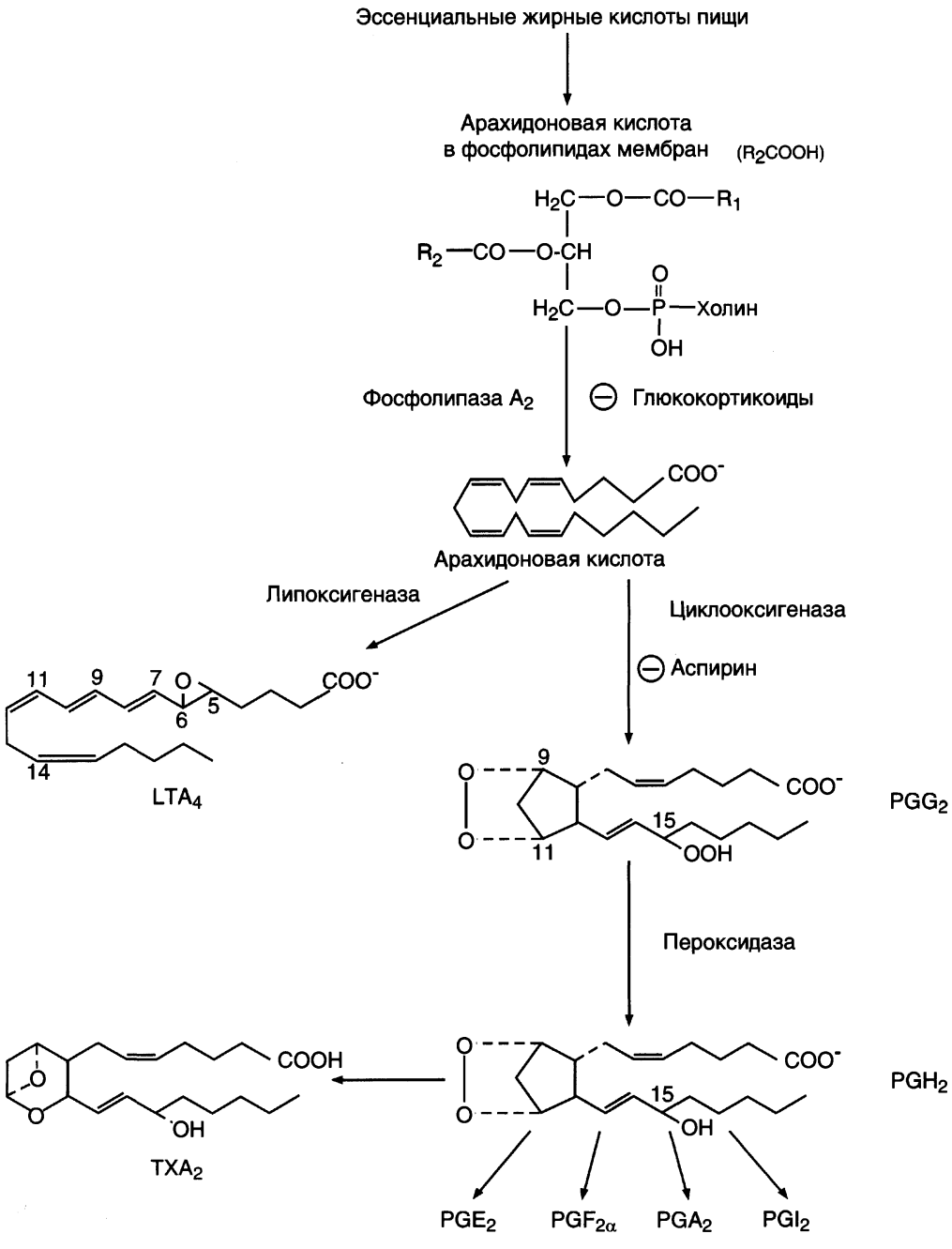


Рис. 8-48. Синтез эйкозаноидов из арахидоновой кислоты. Глюкокортикоиды ингибируют синтез всех типов эйкозаноидов, так как ингибируют фосфолипазу A_2, и таким образом уменьшают количество субстрата для их синтеза. Аспирин и другие противовоспалительные препараты нестероидного действия ингибируют только циклооксигеназный путь.

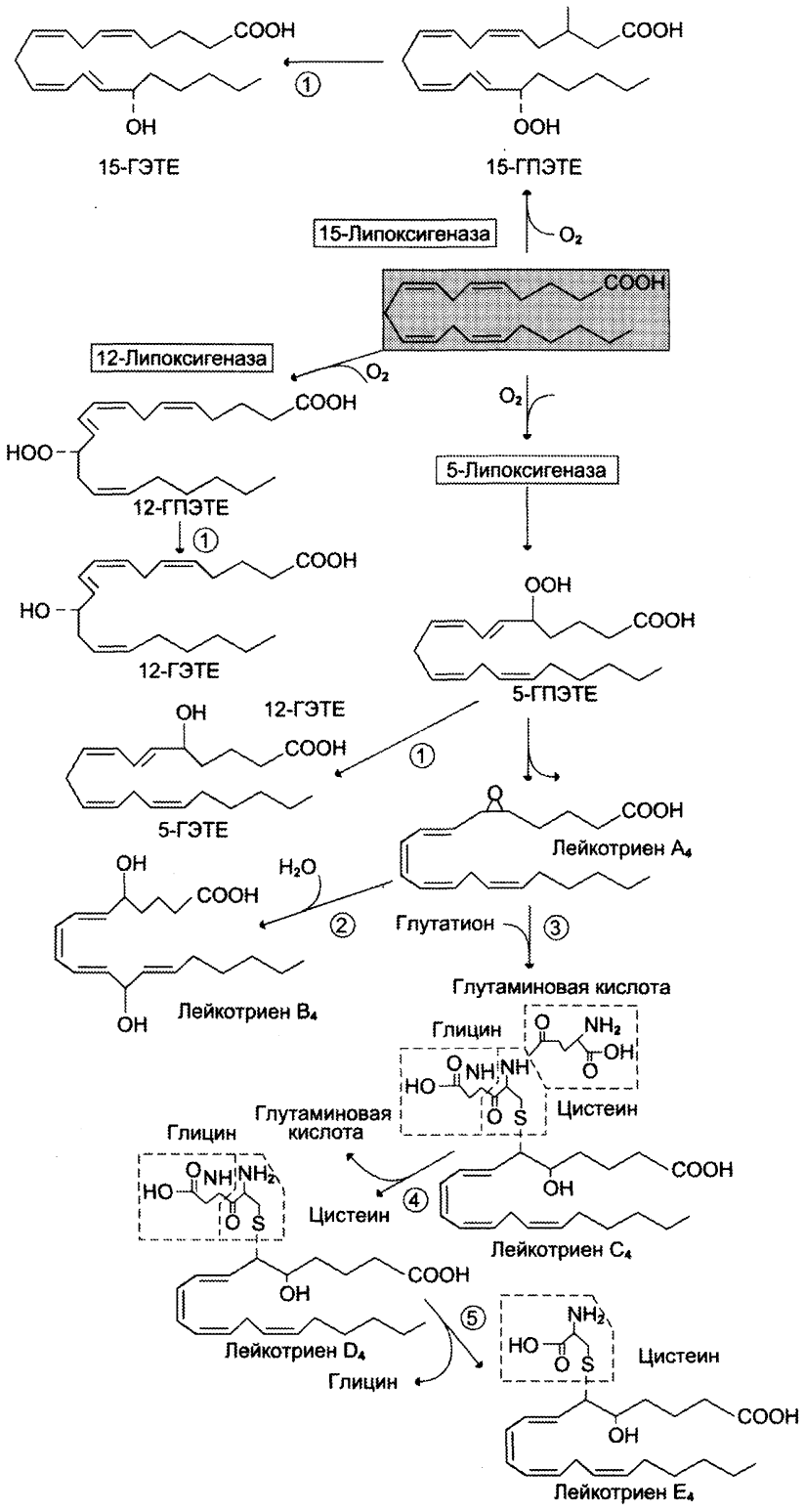


Рис. 8-49. Липоксигеназный путь синтеза эйкозаноидов.

Другие типы лейкотриенов образуются из LT A_4. LT B_4 образуется под действием эпоксид-гидролазы в лейкоцитах и клетках эпителия сосудов. Другой путь приводит к образованию группы лейкотриенов: LT C_4, LT D_4, LT E_4. Их синтез начинается с присоединения трипептида глутатиона к 6-му атому углерода с образованием LT C_4 в реакции, катализируемой глутатион-S-трансферазой. В следующей реакции удаляется глутамат, и LT D_4 содержит дипептид глицилцистеин. На последней стадии отщепляется глицин, и LT E_4 содержит только цистеин.

Липоксины (например, основной липоксин A_4) включают 4 сопряжённых двойных связи и 3 гидроксильных группы.

Синтез липоксинов начинается с действия на арахидоновую кислоту 15-липоксигеназы, затем происходит ряд реакций, приводящих к образованию липоксина A_4 (рис. 8-50).

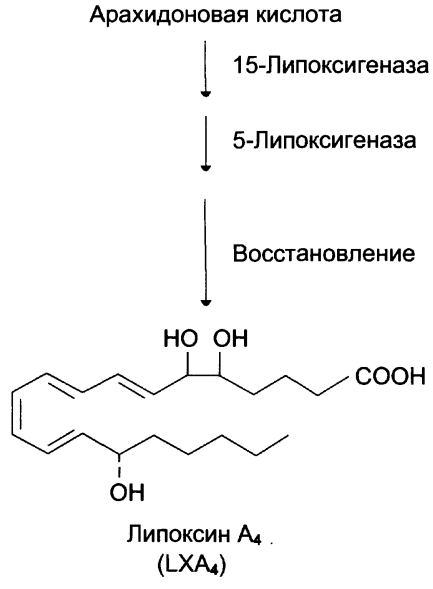


Рис. 8-50. Строение и синтез липоксина A_4.

Г. Механизмы действия эйкозаноидов, основные биологические эффекты

Эйкозаноиды — гормоны местного действия по ряду признаков:

- образуются в различных тканях и органах, а не только в эндокринных железах;
- действуют по аутокринному или паракринному механизмам;
- концентрация эйкозаноидов в крови меньше, чем необходимо, чтобы вызвать ответ в клетках-мишенях.

Только при некоторых патологических состояниях эйкозаноиды могут оказывать системное действие, если их концентрация в крови увеличивается до количеств, когда они могут оказать действие на ГМК всего органа, например кишечника, лёгких, кровеносных сосудов.

Механизмы действия эйкозаноидов

Один и тот же тип эйкозаноида может действовать по паракринному и по аутокринному механизму. Например, ТХ A_2, продуцируемый тромбоцитами при их активации, действует на сами тромбоциты, увеличивая их способность к агрегации, и в то же время действует на окружающие ГМК кровеносных сосудов, способствуя их сокращению. Таким образом создаются условия для образования тромба и предотвращения кровотечения в области повреждения сосудов.

Эйкозаноиды действуют на клетки через специальные рецепторы. Некоторые рецепторы эйкозаноидов связаны с аденилатциклазной системой и протеинкиназой А — это рецепторы PGE, PG D, PC I. PG $F_2\alpha$, ТХ A_2, эндоперекиси (ГПЭТЕ) и лейкотриены действуют через механизмы, увеличивающие уровень кальция в цитозоле клеток-мишеней. Во многих клетках эйкозаноиды влияют на степень активации аденилатциклазной системы в ответ на действие других факторов, например гормонов. В этих случаях эйкозаноиды влияют на конформацию G-белков в плазматической мембране клеток. Если эйкозаноид связывается со стимулирующими G_s-белками, то эффект основного стимулирующего агента увеличивается; если с G_i-ингибирующими — эффект снижается. Эйкозаноиды действуют на клетки почти всех тканей организма. Избыточная продукция эйкозаноидов наблюдается при многих заболеваниях.

Роль эйкозаноидов в развитии воспаления

Воспаление — реакция организма на повреждение или инфекцию, направленная на уничтожение инфекционного агента и восстановление повреждённых тканей. Продукция медиаторов воспаления — эйкозаноидов, гистамина, кининов (пептидных гормонов местного действия) — активируется каскадами реакций, запускающимися при внедрении инфекционных агентов или

повреждении тканей. Фактором, лимитирующим скорость синтеза эйкозаноидов, служит освобождение жирной кислоты под действием фосфолипазы A_2. Фосфолипаза A_2 связана с мембранами клеток и активируется многими факторами: гистамином, кининами, механическим воздействием на клетку, контактом комплекса антиген–антитело с поверхностью клетки. Активация фосфолипазы A_2 приводит к увеличению синтеза эйкозаноидов.

Многие эйкозаноиды выполняют функцию медиаторов воспаления и действуют на всех этапах воспаления. В результате увеличивается проницаемость капилляров, транссудат и лейкоциты проходят через сосудистую стенку. Лейкотриен B_4 и липоксин A_4 являются мощными факторами хемотаксиса; взаимодействуя с рецепторами, стимулируют движение лейкоцитов в область воспаления и секрецию ими лизосомальных ферментов и фагоцитоз чужеродных частиц.

Симптомы воспаления — покраснение, жар, отёк и боль. Покраснение и жар вызываются факторами, увеличивающими приток крови к месту повреждения. Отёк — результат увеличения притока жидкости из капилляров и движения клеток белой крови в область воспаления. Боль вызывается химическими компонентами (продуктами распада тканей, протонами) и сдавлением нервных окончаний. В развитии этих признаков воспаления участвуют разные типы эйкозаноидов (табл. 8-8).

Роль эйкозаноидов в тромбообразовании

Свёртывание крови можно рассматривать как процесс, который поддерживается в состоянии равновесия противодействующими системами: свёртывания и противосвёртывания. В условиях патологии или при действии фармакологических средств это равновесие может смещаться в ту или другую сторону. В норме клетки эндотелия сосудов продуцируют простациклин I_2, ко-

Таблица 8-8. Характеристика биологического действия основных типов эйкозаноидов

Эйкозаноид	Основное место синтеза	Основное биологическое действие
PG E_2	Большинство тканей, особенно почки	Расслабляет гладкую мускулатуру, расширяет сосуды, инициирует родовую активность, подавляет миграцию лимфоцитов, пролиферацию Т-клеток.
PG $F_{2\alpha}$	Большинство тканей	Сокращает гладкую мускулатуру, суживает сосуды, бронхи, стимулирует сокращения матки.
PG D_3	Клетки гладкой мускулатуры	Вызывает расширение сосудов, снижает агрегацию тромбоцитов и лейкоцитов.
PG I_2	Сердце, клетки эндотелия сосудов	Уменьшает агрегацию тромбоцитов, расширяет сосуды. В клетках-мишенях увеличивает образование цАМФ.
ТХ A_2	Тромбоциты	Стимулирует агрегацию тромбоцитов, суживает сосуды и бронхи, в клетках уменьшает образование цАМФ.
ТХ A_3	Тромбоциты	Обладает функциями, одинаковыми с ТХ A_2, но значительно менее эффективен.
LT B_4	Клетки белой крови, клетки эпителия	Стимулирует хемотаксис и агрегацию лейкоцитов, освобождение лизосомальных ферментов лейкоцитов. Увеличивает проницаемость сосудов.
Группа лейкотриенов LT $C_4 \rightarrow$ LT $D_4 \rightarrow$ LT $E_4 \rightarrow$	Клетки белой крови, альвеолярные макрофаги	Стимулируют расширение сосудов, увеличивают их проницаемость. Вызывают сокращение бронхов. Основные компоненты «медленно реагирующей субстанции» анафилаксии.
LX A_4	Лейкоциты	Активирует хемотаксис и стимулирует образование супероксид аниона в лейкоцитах.

торый препятствует агрегации тромбоцитов и сужению сосудов (рис. 8-51). При разрушении клеток эндотелия (например, в результате образования атеросклеротической бляшки) синтез PGI_2 снижается. Тромбоциты контактируют с повреждённой стенкой сосуда, в результате чего активируется фосфолипаза A_2. Это приводит к увеличению секреции ТХ A_2, стимулирующего агрегацию тромбоцитов и образование тромба в области повреждения сосуда (рис. 8-52), что часто приводит к развитию инфаркта.

При изучении факторов риска инфаркта миокарда было показано, что люди, потребляющие большое количество рыбьего жира, значительно меньше подвержены этому заболеванию, так как у них реже образуются тромбы в сосудах сердца. Оказалось, что на семейства эйкозаноидов, синтезируемых в организме, влияет состав жирных кислот пищи (см. выше табл. 8-3). Если с пищей поступает больше эйкозапентаеновой кислоты (20:5, ω-3), в большом количестве содержащейся в рыбьем жире, то эта кислота включается преимущественно в фосфолипиды мембран (вместо арахидоновой) и после действия фосфолипазы A_2 служит основным субстратом для синтеза эйкозаноидов. Это имеет существенное влияние на свёртывание крови.

При обычной диете с преобладанием арахидоновой кислоты (20:4, ω-6) над эйкозапентаеновой действие ТХ A_2 уравновешено действием PG I_2 (рис. 8-53) и другими простагландинами. В случае диеты с преобладанием ω-3 кислот в клетках эндотелия образуются более сильные ингибиторы тромбообразования (PG I_3, PG E_3, PG D_3), что снижает риск образования тромба и развития инфаркта миокарда.

Инактивация эйкозаноидов

Все типы эйкозаноидов быстро инактивируются. $T_{1/2}$ эйкозаноидов составляет от нескольких секунд до нескольких минут. Простагландины инактивируются путём окисления гидроксильной группы в положении 15, важнейшей для их активности, до кетогруппы. Двойная связь в положении 13 восстанавливается. Затем происходит β-окисление боковой цепи, а после него — ω-окисление. Конечные продукты (дикарбоновые кислоты) выделяются с мочой. Активный ТХ A_2

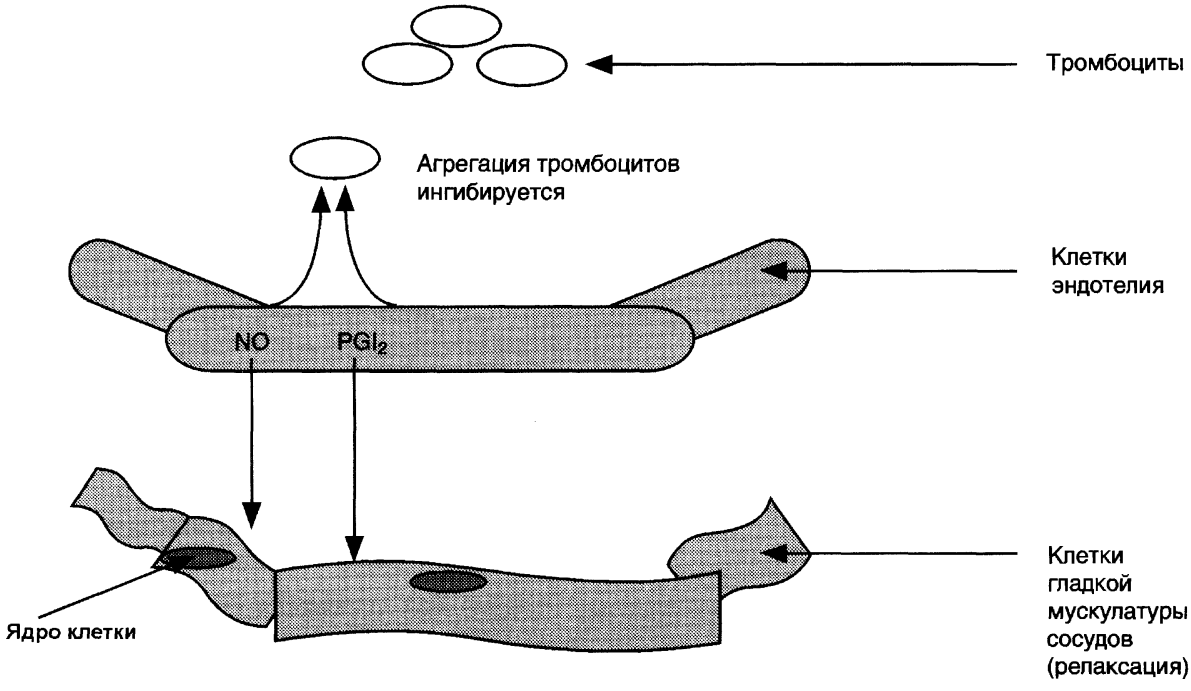


Рис. 8-51. Роль простациклинов в регуляции тонуса клеток гладкой мускулатуры стенок сосудов и агрегации тромбоцитов. В норме клетки эндотелия продуцируют PG I_2, который вызывает релаксацию ГМК и ингибирует агрегацию тромбоцитов. Тромбоциты в неактивном состоянии не продуцируют тромбоксаны. NO (оксид азота) — вазодилататор.

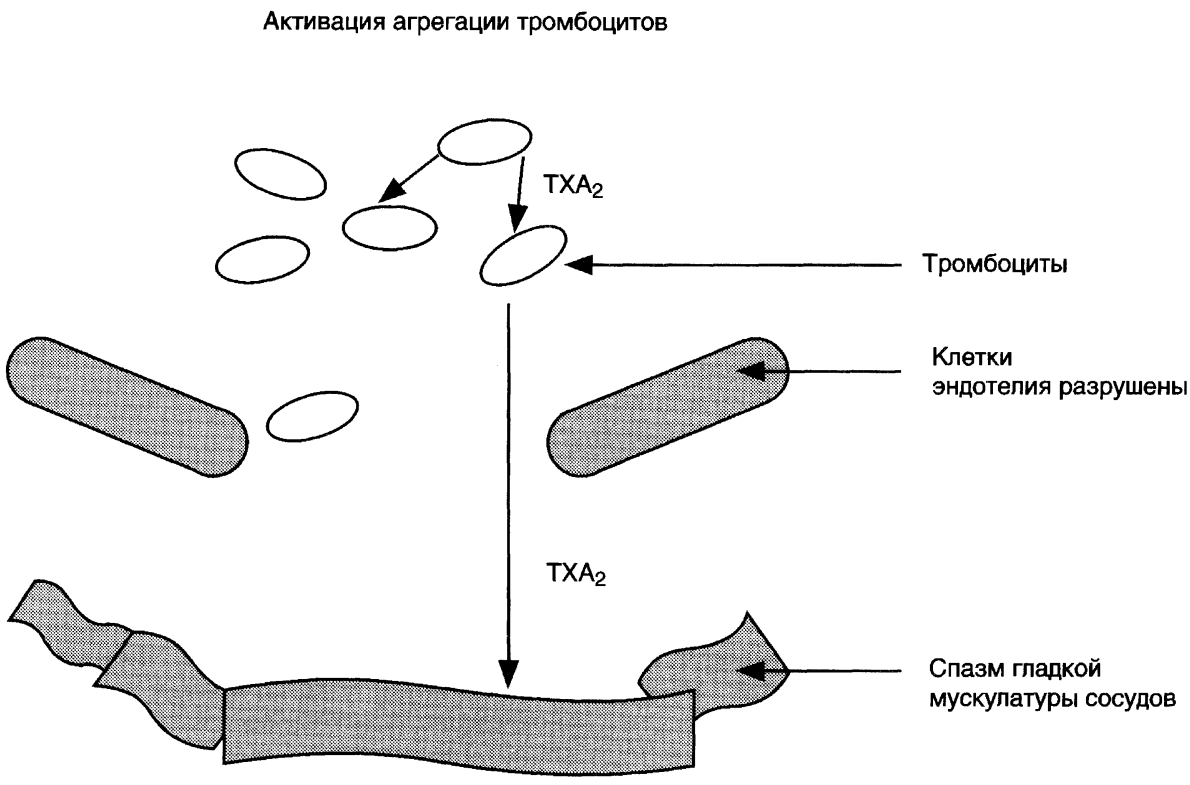


Рис. 8-52. Нарушение синтеза эйкозаноидов в области повреждения эндотелия. В области повреждения стенки сосуда преобладает действие ТХ A_2, стимулирующего агрегацию тромбоцитов и сокращение стенок сосуда. В результате на повреждённом участке образуется тромб, происходит резкое сужение просвета сосуда. В миокарде это может привести к развитию инфаркта миокарда.

быстро превращается в биологически неактивный ТХ B_2 путём разрыва кислородного мостика между 9-м и 11-м атомами углерода с образованием гидроксильных групп.

Д. Лекарственные препараты — ингибиторы синтеза эйкозаноидов

Механизм действия аспирина и других противовоспалительных препаратов нестероидного действия

Аспирин — препарат, подавляющий основные признаки воспаления. Механизм противовоспалительного действия аспирина стал понятен, когда обнаружили, что он ингибирует циклооксигеназу. Следовательно, он уменьшает синтез медиаторов воспаления и, таким образом, уменьшает воспалительную реакцию. Циклооксигеназа необратимо ингибируется путём ацетилирования серина в положении 530 в активном центре (рис. 8-54). Однако эффект действия аспирина не очень продолжителен, так как экспрессия гена этого фермента не нарушается и продуцируются новые молекулы фермента. Другие нестероидные противовоспалительные препараты (например, ибупрофен и ацетаминофен) действуют по конкурентному механизму, связываясь в активном центре фермента, и также снижают синтез простагландинов.

Механизм действия стероидных противовоспалительных препаратов на синтез эйкозаноидов

Стероидные препараты обладают гораздо более сильным противовоспалительным действием, чем препараты нестероидного ряда. Механизм их действия заключается в индукции синтеза белков — липокортинов (или макрокортинов), которые ингибируют активность фосфолипазы A_2 и уменьшают синтез всех типов эйкозаноидов, так

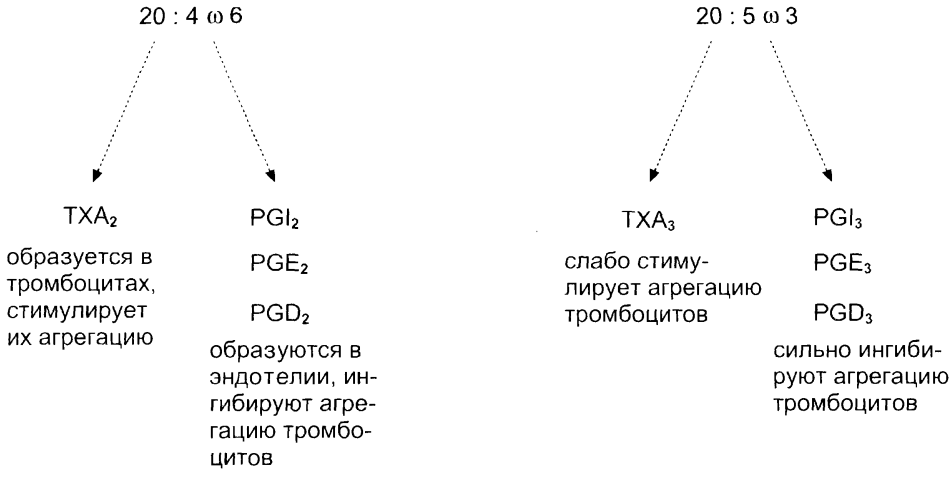


Рис. 8-53. Синтез тромбоксанов и простагландинов из арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот.

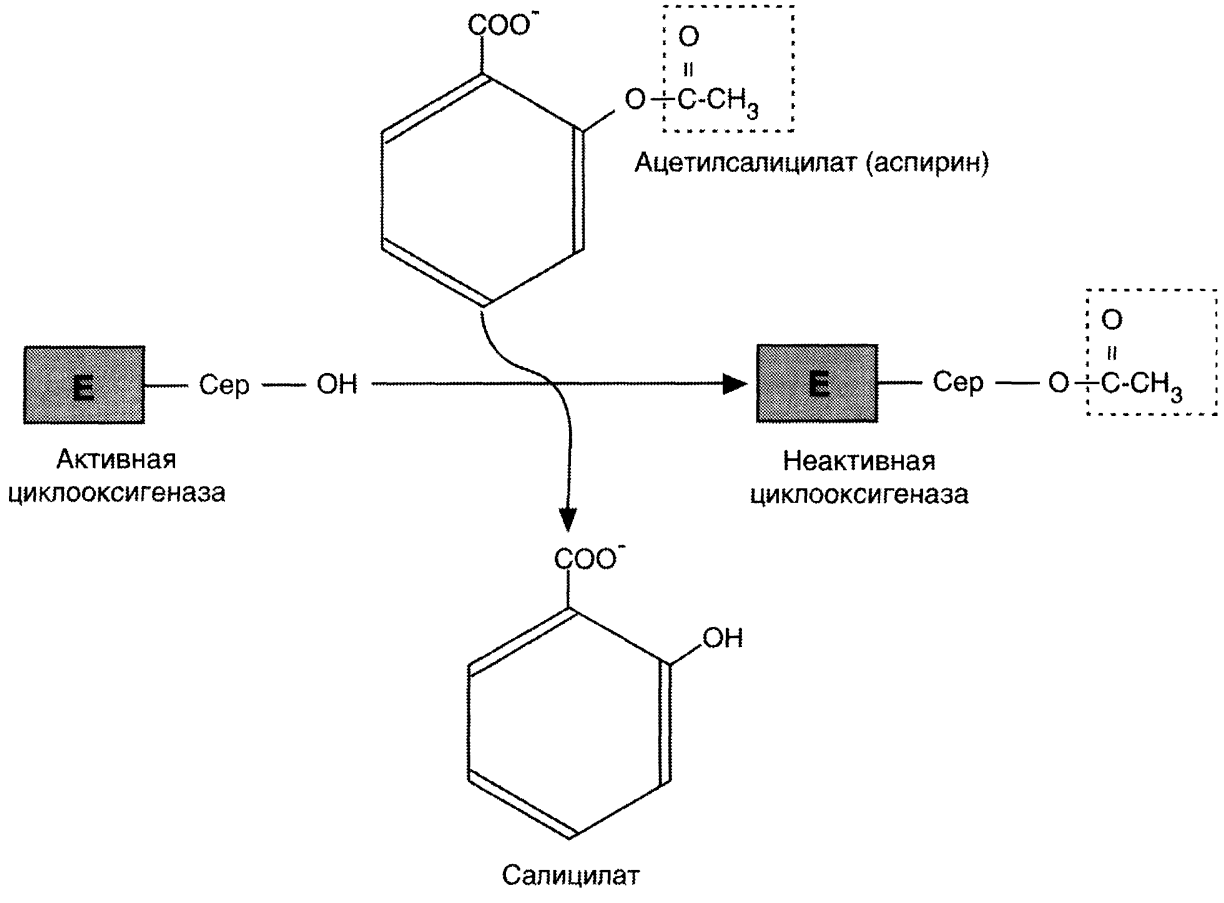


Рис. 8-54. Механизм инактивации циклооксигеназы аспирином. Ацетильный остаток переносится с молекулы аспирина на ОН-группу фермента и необратимо ингибирует его.

как препятствуют освобождению субстрата для синтеза эйкозаноидов — арахидоновой кислоты (или её аналога).

Использование стероидных противовоспалительных препаратов особенно важно для больных, страдающих бронхиальной астмой. Развитие симптомов этого заболевания (бронхоспазм и экссудация слизи в просвет бронхов) обусловлено, в частности, избыточной продукцией лейкотриенов тучными клетками, лейкоцитами и клетками эпителия бронхов. Приём аспирина у больных, имеющих изоформу липоксигеназы с высокой активностью, может вызвать приступ бронхиальной астмы. Причина «аспириновой» бронхиальной астмы заключается в том, что аспирин и другие нестероидные противовоспалительные препараты ингибируют только циклооксигеназный путь превращений арахидоновой кислоты и, таким образом, увеличивают доступность субстрата для действия липоксигеназы и, соответственно, синтеза лейкотриенов. Стероидные препараты ингибируют использование арахидоновой кислоты и по липоксигеназному и по циклооксигеназному пути, поэтому они не могут вызывать бронхоспазма.

Использование производных эйкозаноидов в качестве лекарств

Хотя действие всех типов эйкозаноидов до конца не изучено, имеются примеры успешного использования лекарств — аналогов эйкозаноидов для лечения различных заболеваний. Например, аналоги PG E_1 и PG E_2 подавляют секрецию соляной кислоты в желудке, блокируя гистаминовые рецепторы II типа в клетках слизистой оболочки желудка. Эти лекарства, известные как H_2-блокаторы, ускоряют заживление язв желудка и двенадцатиперстной кишки. Способность PG E_2 и PG $F_2\alpha$ стимулировать сокращение мускулатуры матки используют для стимуляции родовой деятельности.

VII. ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ, РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ КЛЕТКИ

Кислород, необходимый организму для функционирования ЦПЭ и многих других реакций, является одновременно и токсическим веществом, если из него образуются так называемые активные формы.

К активным формам кислорода относят:

$OH^{\bullet}$ — гидроксильный радикал;

$O_2^{\bullet-}$ — супероксидный анион;

H_2O_2 — пероксид водорода.

Активные формы кислорода образуются во многих клетках в результате последовательного одноэлектронного присоединения 4 электронов к 1 молекуле кислорода. Конечный продукт этих реакций — вода, но по ходу реакций образуются химически активные формы кислорода. Наиболее активен гидроксильный радикал, взаимодействующий с большинством органических молекул. Он отнимает от них электрон и инициирует таким образом цепные реакции окисления. Эти свободнорадикальные реакции окисления могут выполнять полезные функции, например, когда клетки белой крови с участием активных форм кислорода разрушают фагоцитированные клетки бактерий. Но в остальных клетках свободнорадикальное окисление приводит к разрушению органических молекул, в первую очередь липидов, и, соответственно, мембранных структур клеток, что часто заканчивается их гибелью. Поэтому в организме функционирует эффективная система ингибирования перекисного окисления липидов (ПОЛ).

А. Источники активных форм кислорода

ЦПЭ как источник активных форм кислорода

Утечка электронов из ЦПЭ и непосредственное их взаимодействие с кислородом — основной путь образования активных форм кислорода в большинстве клеток.

Кофермент Q в ЦПЭ принимает от доноров последовательно по одному электрону, превращаясь в форму семихинона (рис. 8-55) — $KoQH^{\bullet}$ (см. раздел 6).

Этот радикал может непосредственно взаимодействовать с кислородом, образуя супероксидный анион $O_2^{\bullet-}$, который, в свою очередь, может превращаться в другие активные формы кислорода:

$$O_2 \xrightarrow{\bar{e}} O_2^{\bullet-} \xrightarrow{\bar{e},\ 2H^+} H_2O_2 \xrightarrow{e,\ H^+} H_2O + OH^{\bullet}$$

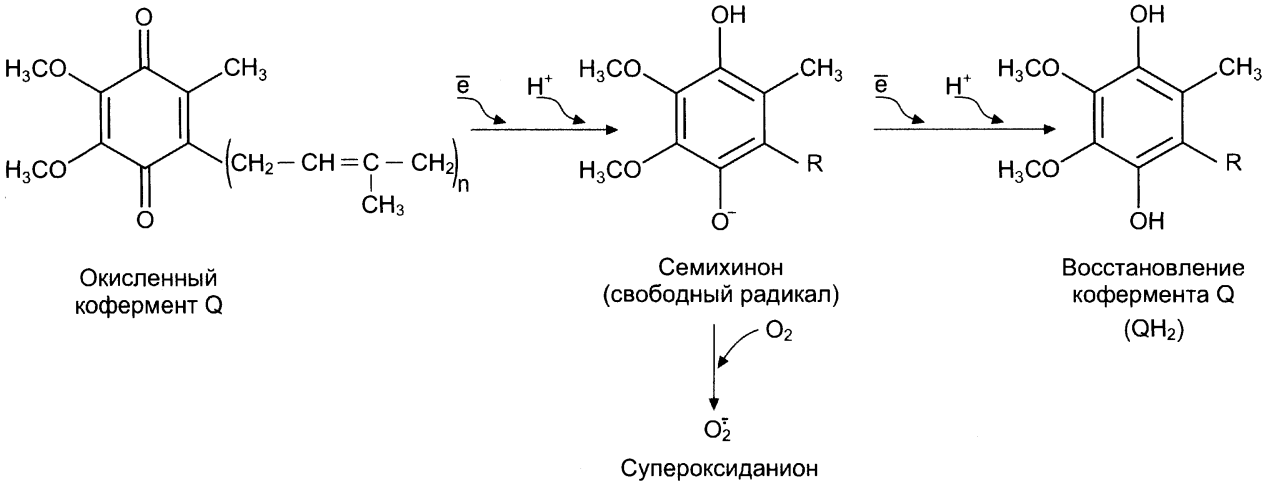


Рис. 8-55. Реакции последовательного восстановления убихинона в дыхательной цепи.

Реакции, катализируемые оксидазами и оксигеназами

Многие оксидазы — ферменты, непосредственно восстанавливающие кислород, образуют пероксид водорода — H_2O_2. Оксидазы образуют пероксид водорода по схеме:

$$O_2 + SH_2 \rightarrow S + H_2O_2,$$

где SH_2 — окисляемый субстрат.

Примеры таких оксидаз — оксидазы аминокислот, супероксид дисмутаза, оксидазы, локализованные в пероксисомах. Оксидазы пероксисом окисляют, в частности, жирные кислоты с очень длинной углеродной цепью (более 20 углеродных атомов) до более коротких, которые далее подвергаются β-окислению в митохондриях.

Монооксигеназы, например цитохром P_{450}, включающий один атом кислорода в окисляемую молекулу, и диоксигеназы, включающие оба атома кислорода, также служат источниками активных форм кислорода.

Пероксид водорода химически не очень активен, но способствует образованию наиболее токсичной формы кислорода — гидроксильного радикала ($OH^{\bullet}$) по следующей реакции:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}.$$

Наличие в клетках Fe^{2+} или ионов других переходных металлов увеличивает скорость образования гидроксильных радикалов и других активных форм кислорода. Например, в эритроцитах окисление иона железа гемоглобина способствует образованию супероксидного аниона.

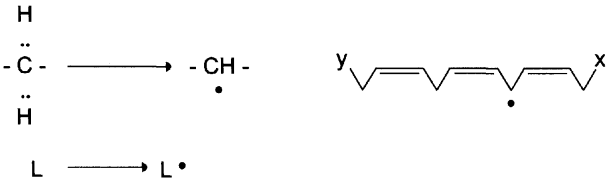
Б. Перекисное окисление липидов

Реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) являются свободнорадикальными и постоянно происходят в организме. Свободнорадикальное окисление нарушает структуру многих молекул. В белках окисляются некоторые аминокислоты. В результате разрушается структура белков, между ними образуются ковалентные «сшивки», всё это активирует протеолитические ферменты в клетке, гидролизующие повреждённые белки. Активные формы кислорода легко нарушают и структуру ДНК. Неспецифическое связывание Fe^{2+} молекулой ДНК облегчает образование гидроксильных радикалов, которые разрушают структуру азотистых оснований. Но наиболее подвержены действию активных форм кислорода жирные кислоты, содержащие двойные связи, расположенные через CH_2-группу. Именно от этой CH_2-группы свободный радикал (инициатор окисления) легко отнимает электрон, превращая липид, содержащий эту кислоту, в свободный радикал.

ПОЛ — цепные реакции, обеспечивающие расширенное воспроизводство свободных радикалов, частиц, имеющих неспаренный электрон, которые инициируют дальнейшее распространение перекисного окисления.

Стадии перекисного окисления липидов

1) Инициация: образование свободного радикала (L•)



Инициирует реакцию чаще всего гидроксильный радикал, отнимающий водород от CH_2-групп полиеновой кислоты, что приводит к образованию липидного радикала.

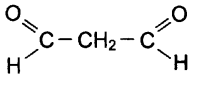
2) Развитие цепи:

$$L\bullet + O_2 \rightarrow LOO\bullet$$
$$LOO\bullet + LH \rightarrow LOOH + LR\bullet$$

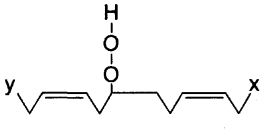
Развитие цепи происходит при присоединении O_2, в результате чего образуется липопероксирадикал LOO• или пероксид липида LOOH.

ПОЛ представляет собой свободнорадикальные цепные реакции, т.е. каждый образовавшийся радикал инициирует образование нескольких других.

3) Разрушение структуры липидов



Малоновый диальдегид



Гидропероксид жирной кислоты

Конечные продукты перекисного окисления полиеновых кислот — малоновый диальдегид и гидропероксид кислоты.

4) Обрыв цепи — взаимодействие радикалов между собой:

$LOO\bullet + L\bullet \rightarrow LOOH + LH$

$L\bullet + \text{vit E} \rightarrow LH + \text{vit E}\bullet$

$\text{vit E}\bullet + L\bullet \rightarrow LH + \text{vit E}_{\text{окисл.}}$

Развитие цепи может останавливаться при взаимодействии свободных радикалов между собой или при взаимодействии с различными антиоксидантами, например, витамином Е, который отдаёт электроны, превращаясь при этом в стабильную окисленную форму.

В. Повреждение клеток в результате перекисного окисления липидов

Активные формы кислорода повреждают структуру ДНК, белков и различные мембранные структуры клеток. В результате появления в гидрофобном слое мембран гидрофильных зон за счёт образования гидропероксидов жирных кислот в клетки могут проникать вода, ионы натрия, кальция, что приводит к набуханию клеток, органелл и их разрушению. Активация перекисного окисления характерна для многих заболеваний: дистрофии мышц (болезнь Дюшенна), болезни Паркинсона, при которых ПОЛ разрушает нервные клетки в стволовой части мозга, при атеросклерозе, развитии опухолей. Перекисное окисление активируется также в тканях, подвергшихся сначала ишемии, а затем реоксигенации, что происходит, например, при спазме коронарных артерий и последующем их расширении.

Такая же ситуация возникает при образовании тромба в сосуде, питающем миокард. Формирование тромба приводит к окклюзии просвета сосуда и развитию ишемии в соответствующем участке миокарда (гипоксия ткани). Если принять быстрые лечебные меры по разрушению тромба, то в ткани восстанавливается снабжение кислородом (реоксигенация). Показано, что в момент реоксигенации резко возрастает образование активных форм кислорода, которые могут повреждать клетку. Таким образом, даже несмотря на быстрое восстановление кровообращения, в соответствующем участке миокарда происходит повреждение клеток за счёт активации перекисного окисления.

Изменение структуры тканей в результате ПОЛ можно наблюдать на коже: с возрастом увеличивается количество пигментных пятен на коже, особенно на дорсальной поверхности ладоней. Этот пигмент называют липофусцин, представляющий собой смесь липидов и белков, связанных между собой поперечными ковалентными связями и денатурированными в результате взаимодействия с химически активными группами продуктов ПОЛ. Этот пигмент фагоцитируется, но не гидролизуется ферментами лизосом, и поэтому накапливается в клетках, нарушая их функции.

ПОЛ происходит не только в живых организмах, но и в продуктах питания, особенно при

неправильном приготовлении и хранении пищи. Прогоркание жиров, образование более тёмного слоя на поверхности сливочного масла, появление специфического запаха у молочных продуктов — всё это признаки ПОЛ. В продукты питания, содержащие ненасыщенные липиды, обычно добавляют антиоксиданты — вещества, ингибирующие ПОЛ и сохраняющие структуру компонентов пищи.

Г. Системы защиты клеток от активных форм кислорода

Ферменты антиоксидантного действия

К ферментам, защищающим клетки от действия активных форм кислорода, относят супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу. Наиболее активны эти ферменты в печени, надпочечниках и почках, где содержание митохондрий, цитохрома P_{450} и пероксисом особенно велико. Супероксиддисмутаза (СОД) превращает супероксидные анионы в пероксид водорода:

$2\ O_2^{\bullet-} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$.

Изоферменты СОД находятся и в цитозоле и в митохондриях и являются как бы первой линией защиты, потому что супероксидный анион образуется обычно первым из активных форм кислорода при утечке электронов из дыхательной цепи.

СОД — индуцируемый фермент, т.е. синтез его увеличивается, если в клетках активируется перекисное окисление.

Пероксид водорода, который может инициировать образование самой активной формы OH•, разрушается ферментом каталазой:

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

Каталаза находится в основном в пероксисомах, где образуется наибольшее количество пероксида водорода, а также в лейкоцитах, где она защищает клетки от последствий «респираторного взрыва» (см. раздел 6).

Глутатионпероксидаза — важнейший фермент, обеспечивающий инактивацию активных форм кислорода, так как он разрушает и пероксид водорода и гидропероксиды липидов. Он катализирует восстановление пероксидов с помощью трипептида глутатиона (γ-глутамилцистеинилглицин). Сульфгидрильная группа глутатиона (GSH) служит донором электронов и, окисляясь, образует дисульфидную форму глутатиона, в которой 2 молекулы глутатиона связаны через дисульфидную группу.

$H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow 2\ H_2O + G\text{-}S\text{-}S\text{-}G$.

Окисленный глутатион восстанавливается глутатионредуктазой:

$GS\text{-}SG + NADPH + H^+ \rightarrow 2\ GSH + NADP^+$.

Глутатионпероксидаза, которая восстанавливает гидропероксиды липидов в составе мембран, в качестве кофермента использует селен (необходимый микроэлемент пищи). При его недостатке активность антиоксидантной защиты снижается.

Витамины, обладающие антиоксидантным действием

Витамин Е (α-токоферол) — наиболее распространённый антиоксидант в природе — является липофильной молекулой, способной инактивировать свободные радикалы непосредственно в гидрофобном слое мембран и таким образом предотвращать развитие цепи перекисного окисления. Различают 8 типов токоферолов, но α-токоферол наиболее активен.

Витамин Е отдаёт атом водорода свободному радикалу пероксида липида (ROO•), восстанавливая его до гидропероксида (ROOH) и таким образом останавливает развитие ПОЛ (рис. 8-56).

Свободный радикал витамина Е, образовавшийся в результате реакции, стабилен и не способен участвовать в развитии цепи. Наоборот, радикал витамина Е непосредственно взаимодействует с радикалами липидных перекисей, восстанавливая их, а сам превращается в стабильную окисленную форму — токоферолхинон.

Витамин С (аскорбиновая кислота) также является антиоксидантом и участвует с помощью двух различных механизмов в ингибировании ПОЛ. Во-первых, витамин С восстанавливает окисленную форму витамина Е и таким образом поддерживает необходимую концентрацию этого антиоксиданта непосредственно в мембранах клеток. Во-вторых, витамин С, будучи водорастворимым витамином и сильным восстановителем, взаимодействует с водорастворимыми активными формами кислорода — $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2, OH• и инактивирует их.

β-Каротин, предшественник витамина А, также обладает антиоксидантным действием и ингибирует ПОЛ. Показано, что растительная

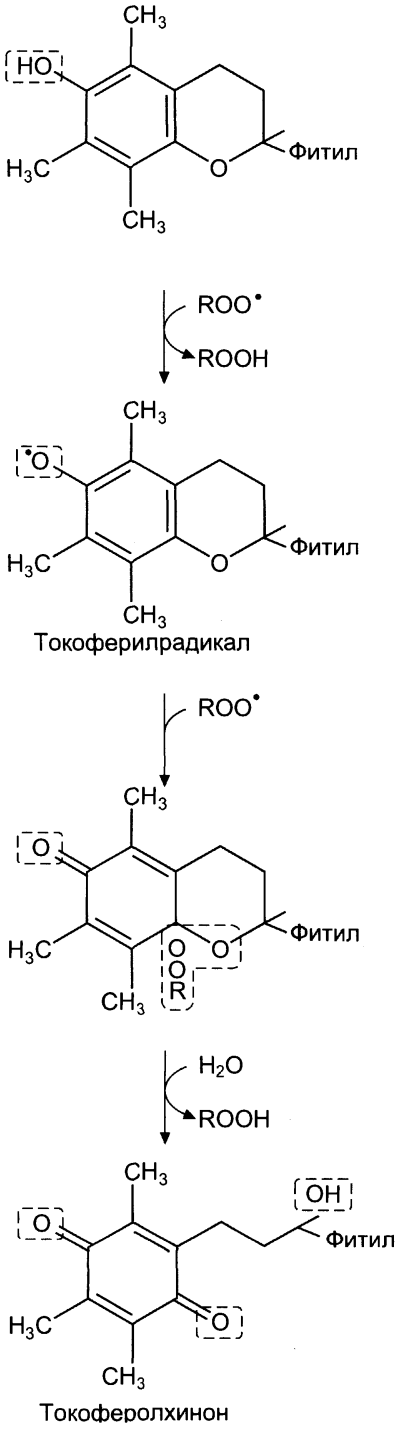


Рис. 8-56. Механизм антиоксидантного действия витамина Е. Витамин Е (а-токоферол) ингибирует свободнорадикальное окисление путём отдачи электрона, что приводит к инактивации радикала липида, а витамин Е превращается в стабильный, полностью окисленный токоферолхинон.

диета, обогащённая витаминами Е, С, каротиноидами, существенно уменьшает риск развития атеросклероза и заболеваний ССС, подавляет развитие катаракты — помутнения хрусталика глаза, обладает антиканцерогенным действием. Имеется много доказательств в пользу того, что положительное действие этих компонентов пищи связано с ингибированием ПОЛ и других молекул и, следовательно, с поддержанием нормальной структуры компонентов клеток.

VIII. ОБМЕН И ФУНКЦИИ ФОСФОЛИПИДОВ

Метаболизм фосфолипидов тесно связан со многими процессами в организме: образованием и разрушением мембранных структур клеток, формированием ЛП, мицелл жёлчи, образованием в альвеолах лёгких поверхностного слоя, предотвращающего слипание альвеол во время выдоха. Нарушения обмена фосфолипидов — причина многих заболеваний, в частности, респираторного дистресс-синдрома новорождённых, жирового гепатоза, наследственных заболеваний, связанных с накоплением гликолипидов, — лизосомных болезней. При лизосомных болезнях снижается активность гидролаз, локализованных в лизосомах и участвующих в расщеплении гликолипидов.

А. Обмен глицерофосфолипидов

Синтез фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилсеринов

Начальные этапы синтеза глицерофосфолипидов и жиров происходят одинаково до образования фосфатидной кислоты. Фосфатидная кислота может синтезироваться двумя разными путями: через глицеральдегид-3-фосфат и через дигидроксиацетонфосфат (рис. 8-57).

На следующем этапе фосфатидаза отщепляет от фосфатидной кислоты фосфатный остаток, в результате чего образуется диацилглицерол. Дальнейшие превращения диацилглицерола также могут идти разными путями. Один из вариантов — образование активной формы «полярной головки» фосфолипида: холин, серин или этаноламин превращаются в ЦДФ-холин, ЦДФ-серин (рис. 8-58) или ЦДФ-этаноламин.

Далее диацилглицерол взаимодействует с ЦДФ-производными, при этом выделяется ЦМФ, и

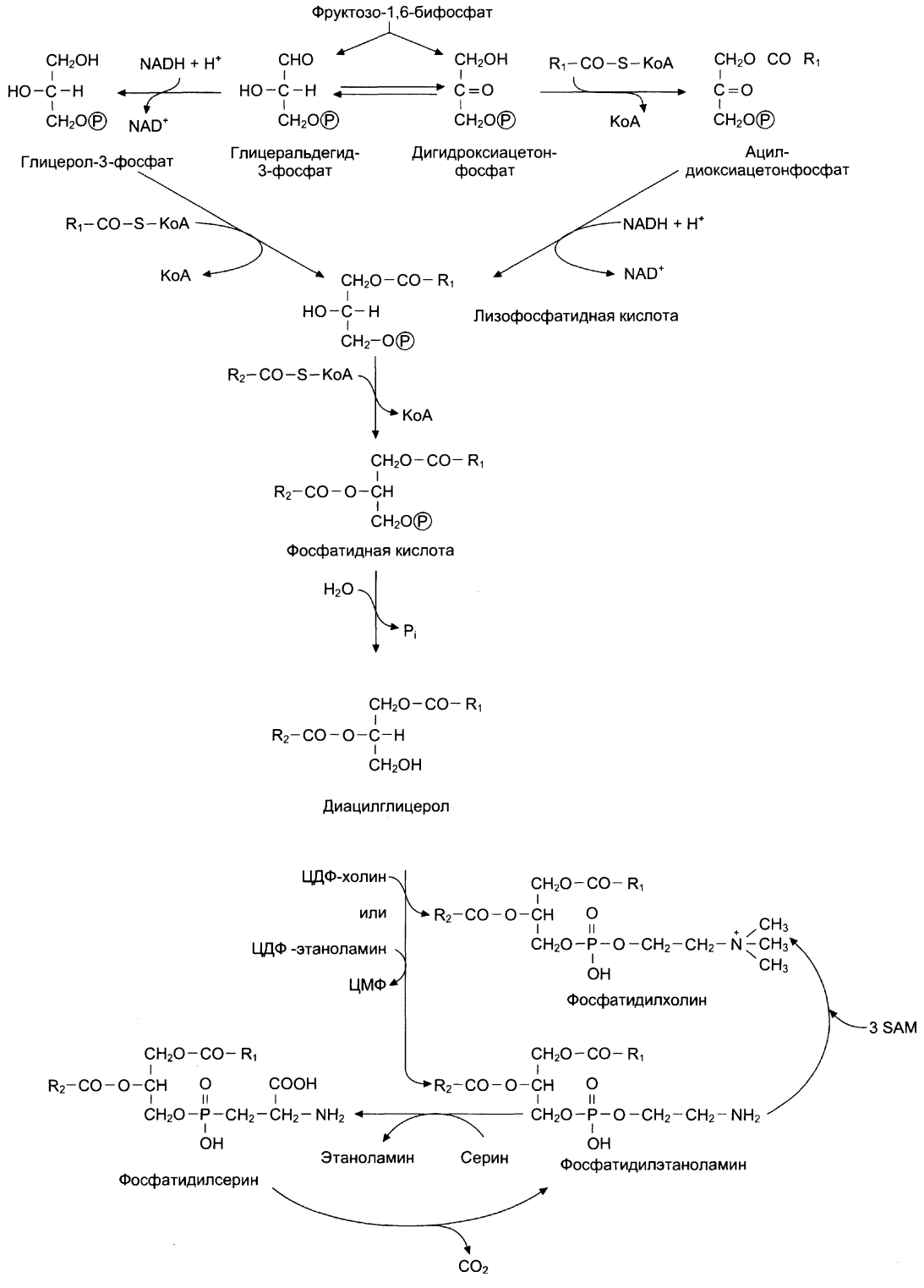


Рис. 8-57. Схема синтеза глицерофосфолипидов. R_1 — радикал насыщенной жирной кислоты; R_2 — радикал полиеновой жирной кислоты; SAM — S-аденозилметионин.

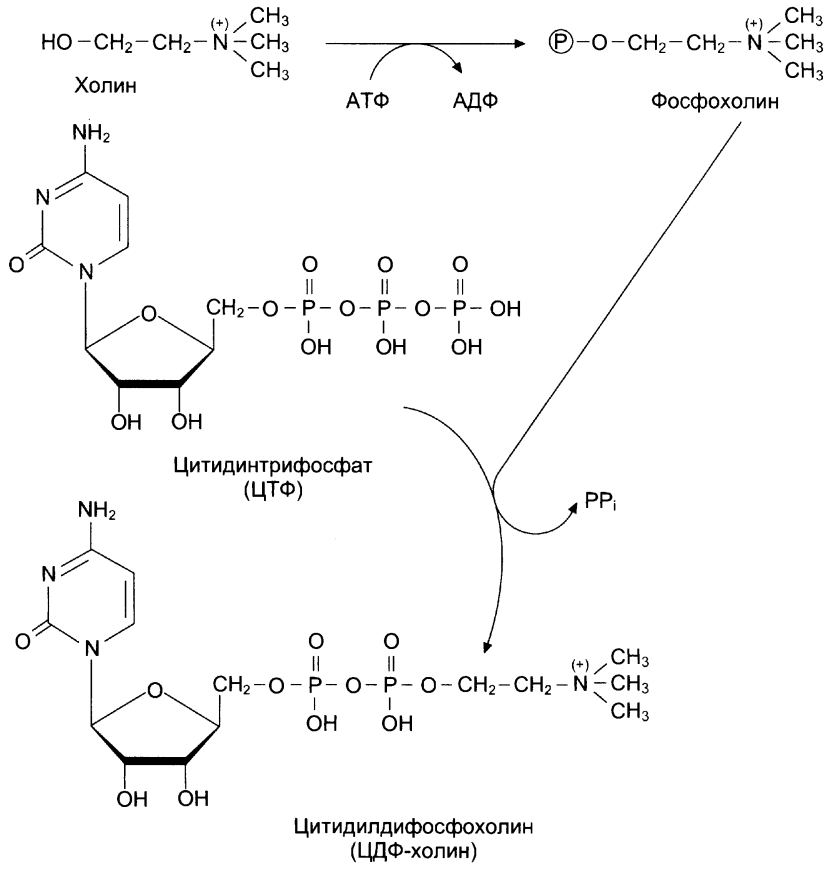


Рис. 8-58. Синтез ЦДФ-холина. «Полярная головка» фосфатидилхолина превращается за счёт энергии АТФ в активную форму — фосфохолин, который затем присоединяется к ЦТФ с одновременным удалением PP_i, что сдвигает равновесие реакции вправо. Образовавшийся ЦДФ-холин — донор холина для синтеза молекул фосфатидилхолинов. ЦДФ-холин — цитидилдифосфохолин; ЦМФ — цитидилмонофосфат; Р — остаток фосфорной кислоты.

образуется соответствующий фосфолипид, например фосфатидилхолин. Между глицерофосфолипидами возможны различные взаимопревращения. Фосфатидилхолин может образовываться и другим путём: из фосфатидилэтаноламина, получая последовательно 3 метильные группы от SAM. Фосфатидилсерин может превращаться в фосфатидилэтаноламин путём декарбоксилирования. Фосфатидилэтаноламин может превращаться в фосфатидилсерин путём обмена этаноламина на серин.

Дипальмитоилфосфатидилхолин — основной компонент сурфактанта лёгких

Сурфактант — внеклеточный липидный слой с небольшим количеством гидрофобных белков, выстилающий поверхность лёгочных альвеол и предотвращающий слипание стенок альвеол во время выдоха (рис. 8-59). Основной компонент сурфактанта — дипальмитоилфосфатидилхолин, составляющий до 80% от всех фосфолипидов, входящих в состав сурфактанта. Кроме того, в сурфактант входят гидрофобные белки, общее количество которых не превышает 10—20%.

Синтез дипальмитоилфосфатидилхолина (лецитина) в пневмоцитах II типа происходит в процессе эмбрионального развития и резко увеличивается в период от 32 до 36 нед беременности.

Важным показателем нормального формирования сурфактанта служит соотношение фосфатидилхолин/сфингомиелин >4 (рис. 8-60). Это соотношение можно определять, исследуя состав

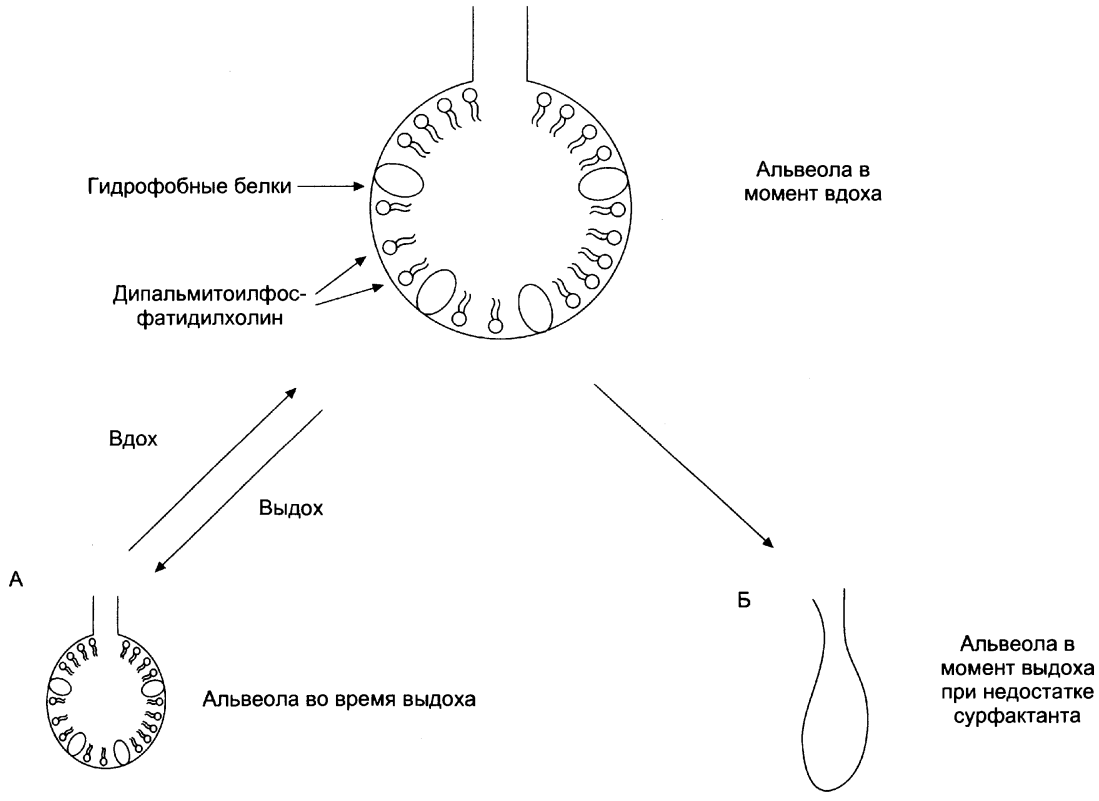


Рис. 8-59. Влияние сурфактанта на функцию альвеол. А — сурфактант уменьшает поверхностное натяжение жидкости, выстилающей поверхность альвеол, и предотвращает слипание стенок альвеол во время выдоха. Меньшее давление воздуха необходимо, чтобы наполнить альвеолы воздухом; Б — в отсутствие сурфактанта или при его недостаточном образовании (у недоношенных детей) стенки альвеол во время выдоха спадаются, и требуется давление воздуха в 10 раз большее, чтобы наполнить альвеолы.

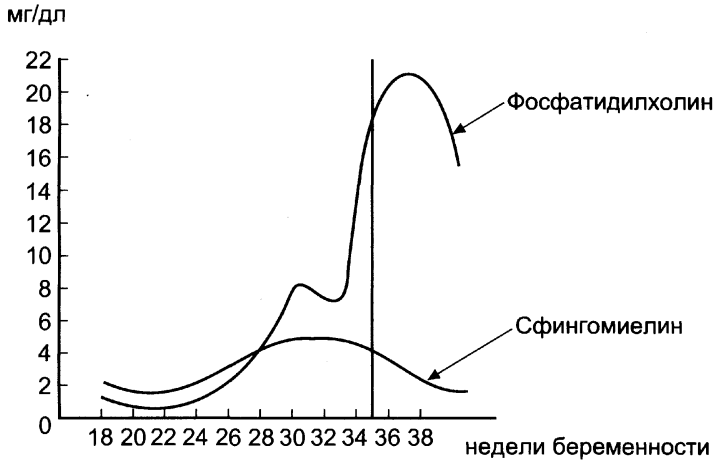


Рис. 8-60. Изменение соотношения фосфатидилхолин/сфингомиелин в амниотической жидкости в различные периоды беременности. На 35-й неделе беременности концентрация фосфатидилхолина увеличивается по отношению к сфингомиелину в 4 раза, что характеризует нормальное развитие лёгких.

амниотической жидкости. Недостаточное формирование сурфактанта у недоношенных детей после рождения приводит к развитию респираторного дистресс-синдрома — основной причины смерти у этой группы новорождённых. Соотношение фосфатидилхолин/сфингомиелин <2 указывает на высокий риск развития респираторного дистресс-синдрома. В случае необходимости лечение беременных кортикостероидами стимулирует синтез сурфактанта в лёгких плода и уменьшает риск развития респираторного дистресс-синдрома.

Синтез фосфатидилинозитола и кардиолипина

Другой путь превращений диацилглицерола, при котором образуется активная форма — ЦДФ-диацилглицерол приводит к образованию фосфатидилинозитола и кардиолипина (см. схему ниже).

Фосфатидилинозитол далее может фосфорилироваться с образованием фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата, фосфолипида, располагающегося в наружной мембране клеток и участвующего в передаче гормональных сигналов внутрь клетки (см. раздел 5). Кардиолипин находится, главным образом, во внутренней мембране митохондрий и в небольшом количестве в сурфактанте лёгких.

Катаболизм глицерофосфолипидов

Различные типы фосфолипаз, локализованных в клеточных мембранах или в лизосомах, катализируют гидролиз глицерофосфолипидов (см. раздел 5). Гидролиз некоторых глицерофосфолипидов под действием фосфолипаз имеет значение не только как путь катаболизма, но и как путь образования вторичных посредников или предшественников в синтезе биологически активных веществ — эйкозаноидов. Кроме того, фосфолипазы A_1 и A_2 участвуют в изменении состава жирных кислот в глицерофосфолипидах, например при синтезе в эмбриональном периоде развития дипальмитоилфосфатидилхолина — компонента сурфактанта.

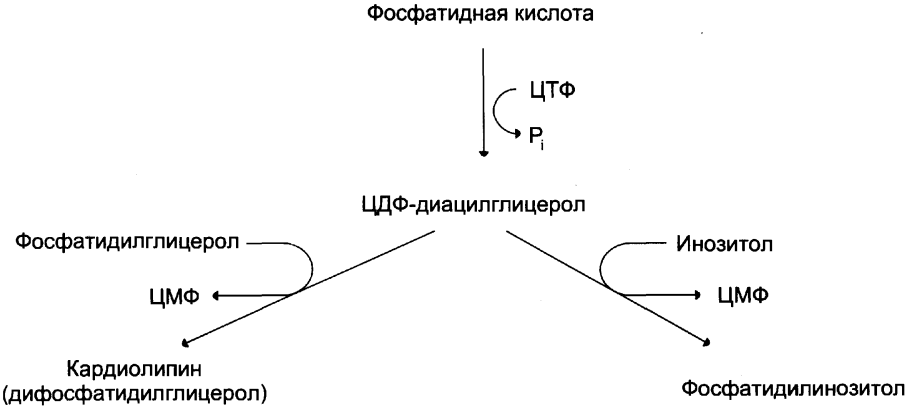
Б. Функции и обмен сфинголипидов

Сфинголипиды — производные церамида, образующегося в результате соединения аминоспирта сфингозина и жирной кислоты. В группу сфинголипидов входят сфингомиелины и гликосфинголипиды (см. табл. 8-4, рис. 8-61).

Сфингомиелины находятся в мембранах клеток различных тканей, но наибольшее их количество содержится в нервной ткани. Сфингомиелины миелиновых оболочек содержат в основном жирные кислоты с длинной цепью: лигноцериновую (24:0) и нервоновую (24:1) кислоты, а сфингомиелин серого вещества мозга содержит преимущественно стеариновую кислоту.

Гликосфинголипиды — гликолипиды, в состав которых входят церамид и один или несколько остатков углеводов, и сиаловая (N-ацетилнейраминовая) кислота (см. рис. 8-5, 8-8, 8-61).

Гликосфинголипиды локализованы в плазматических мембранах клеток таким образом, что углеводная часть молекулы располагается на поверхности клеток и часто обладает антигенными свойствами. Эта часть молекул обеспечивает вза-



Схема

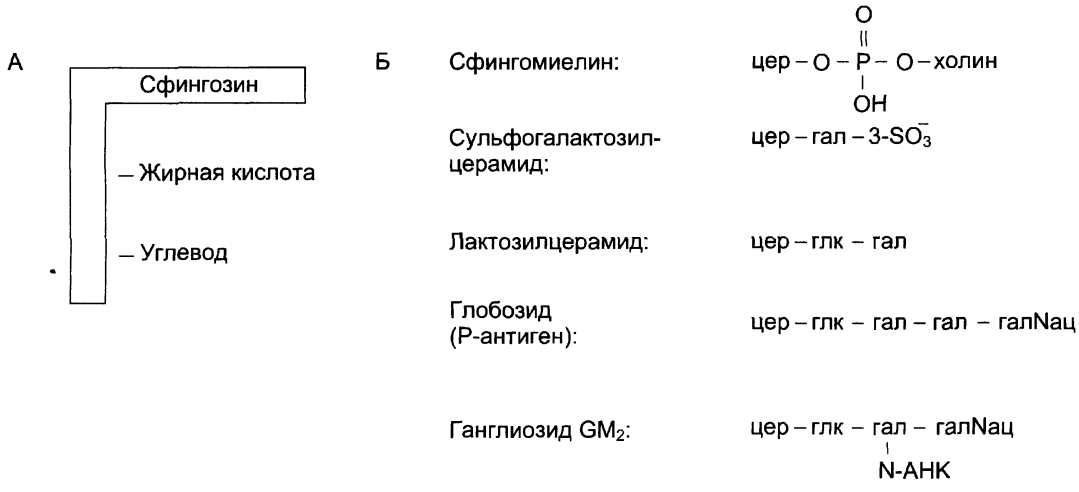


Рис. 8-61. Структуры гликосфинголипидов. А — общая схема строения гликосфинголипидов; Б — структура радикалов, связанных с церамидом, и названия отдельных гликосфинголипидов. Обозначения: цер — церамид; глк — глюкоза; гал — галактоза; гал-Nац — N-ацетилгалактозамин; N-АНК — N-ацетилнейраминовая кислота.

имное узнавание клеток и их взаимодействие. Интересно, что углеводная часть структуры антигенов на поверхности эритроцитов (по системе АВ0) может быть связана как с церамидом, так и с белками. В последнем случае структура антигена является не гликолипидом, а гликопротеином.

Некоторые ганглиозиды — рецепторы бактериальных токсинов. Например, G_{M1}, находящийся на поверхности клеток кишечного эпителия, является местом прикрепления холерного токсина — белка, секретируемого возбудителями холеры.

Функции гликосфинголипидов можно суммировать следующим образом:

Взаимодействие между:
- клетками;
- клетками и межклеточным матриксом;
- клетками и микробами.

Модуляция:
- активности протеинкиназ;
- активности рецептора фактора роста;
- антипролиферативного действия (апоптоза, клеточного цикла).

Обеспечение:
- структурной жёсткости мембран;
- конформации белков мембран.

Синтез церамида и его производных. Синтез сфинголипидов начинается с образования церамида. Серин конденсируется с пальмитоил-КоА. Продукт их взаимодействия сначала восстанавливается коферментом NADPH, затем к аминогруппе дигидросфингозина амидной связью присоединяется жирная кислота, содержащая, как правило, 24 атома углерода. После окисления FAD-зависимой дегидрогеназой образуется церамид. Церамид служит предшественником в синтезе большой группы сфинголипидов: сфингомиелинов, не содержащих углеводов, и гликосфинголипидов (рис. 8-62). Последующие реакции синтеза катализируются специфическими трансферазами, набор которых отличается в разных тканях. Соединение фосфорилхолина с церамидом сфингомиелинсинтазой приводит к образованию сфингомиелина. Присоединение углеводных компонентов катализируется специфическими гликозилтрансферазами. Донорами углеводных компонентов служат активированные сахара: УДФ-галактоза и УДФ-глюкоза. Галактоцереброзид — главный липид миелиновых оболочек; глюкоцереброзид входит в состав мембран многих клеток и служит предшественником в синтезе более сложных гликолипидов или продуктом на пути их катаболизма.

Катаболизм сфингомиелина и его нарушения. В лизосомах находятся ферменты, способные гидролизовать любые компоненты клеток. Эти ферменты называют кислыми гидролазами, так как они активны в кислой среде. Значение pH = 5,

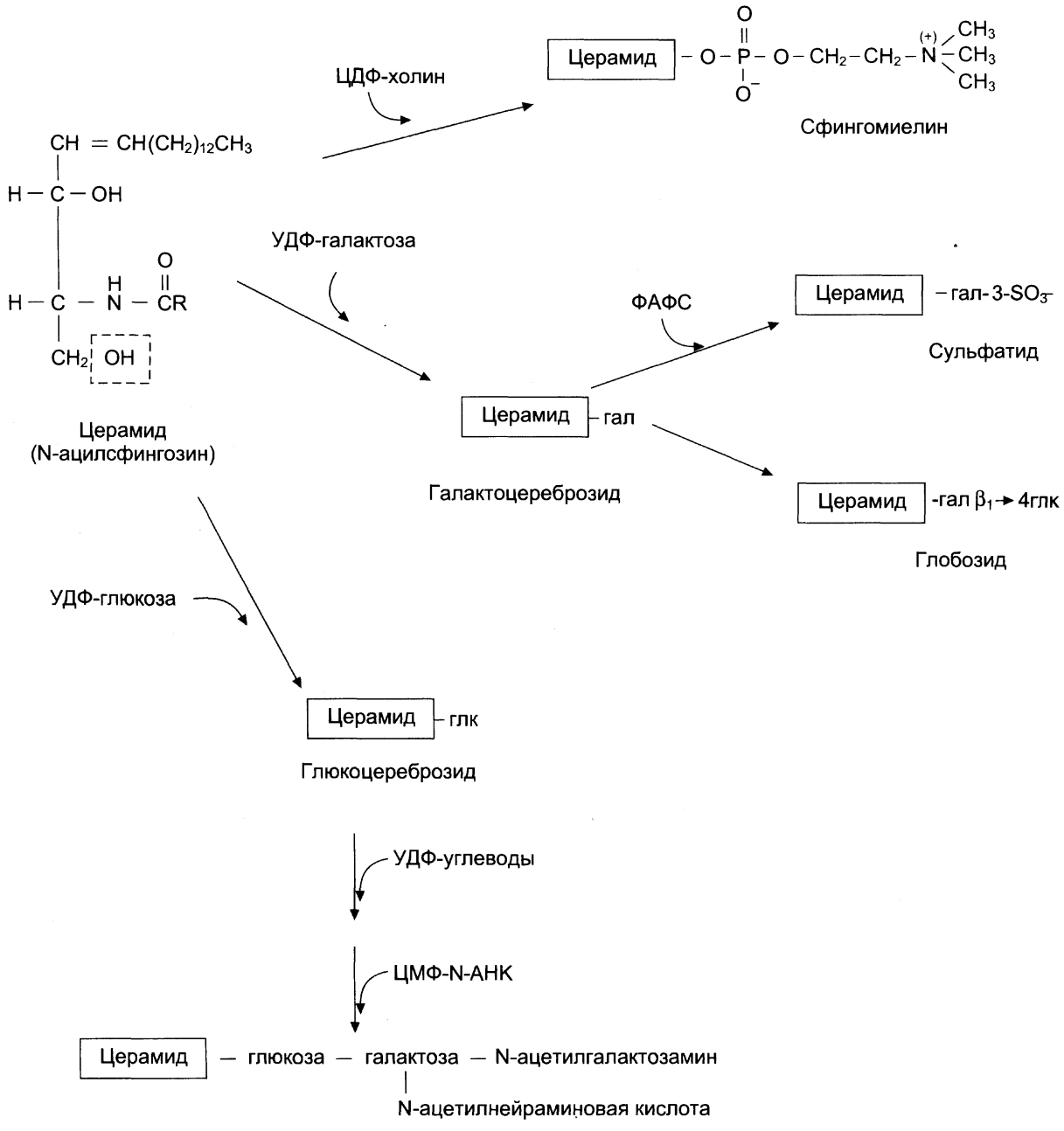


Рис. 8-62. Синтез сфинголипидов из церамида. Обозначения: гал — галактоза; глк — глюкоза; гал — Nац-N-ацетилгалактозамин; N-АНК — N-ацетилнейраминовая кислота; УДФ-галактоза, УДФ-глюкоза — активные формы углеводов, присоединяемые специфическими гликозилтрансферазами; ЦМФ-N-АНК — активная форма N-ацетилнейраминовой кислоты; ФАФС — фосфоаденозилфосфосульфат — активная форма серной кислоты. Фосфохолин или углеводы присоединяются по месту гидроксиметильной группы церамида (выделена пунктиром). Каждый остаток углевода присоединяется специфической гликозилтрансферазой в цистернах шероховатого ЭР и аппарате Гольджи.

оптимальное для работы ферментов, создаётся протонным насосом, который, используя энергию АТФ, накачивает ионы водорода в лизосомы. Катаболизм сфингомиелинов и гликолипидов происходит в лизосомах. В распаде сфингомиелинов участвуют 2 фермента — сфингомиелиназа, отщепляющая фосфорилхолин, и церамидаза, продуктами действия которой являются сфингозин и жирная кислота (рис. 8-63).

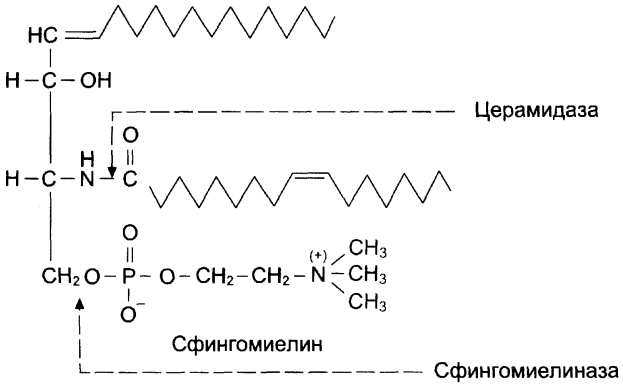


Рис. 8-63. Гидролиз сфингомиелина.

Генетический дефект сфингомиелиназы — причина болезни Ниманна–Пика. Дети с таким дефектом погибают в раннем возрасте. Симптомы заболевания: увеличение печени и селезёнки (гепатоспленомегалия), в лизосомах которых накапливается сфингомиелин; умственная отсталость. Генетический дефект другого фермента (церамидазы) приводит к развитию болезни Фарбера, симптомами которой также являются гепато- и спленомегалия, а также поражение суставов (болезненность, отёчность).

Катаболизм гликосфинголипидов. Катаболизм гликосфинголипидов начинается с перемещения их с поверхности клетки в цитоплазму по механизму эндоцитоза. В результате молекулы, расположенные на поверхности мембран, оказываются в эндоцитозных везикулах в цитоплазме и сливаются с лизосомами. В лизосомах находятся все ферменты, необходимые для гидролиза сложных молекул гликосфинголипидов: α- и β-галактозидазы, β-глюкозидазы, нейраминидаза (сиалидаза) и церамидаза. В результате последовательных реакций гидролиза сложные молекулы гликосфинголипидов распадаются до мономеров: глюкозы, галактозы, жирной кислоты, сфингозина и других метаболитов.

Генетические дефекты лизосомных ферментов катаболизма гликосфинголипидов. В норме синтез и катаболизм гликосфинголипидов сбалансированы таким образом, что количество этих компонентов в мембранах постоянно. Если имеется генетический дефект какого-либо лизосомного фермента, участвующего в катаболизме гликосфинголипида, то в лизосомах накапливается неполимеризованный субстрат, так называемые «остаточные тельца», размеры лизосом увеличиваются, их мембрана может разрушаться, ферменты выходят в цитозоль, и функции клеток нарушаются. Генетические заболевания вследствие дефекта какого-либо из ферментов катаболизма гликосфинголипидов называют сфинголипидозами, или лизосомными болезнями. Эти заболевания редки, но среди некоторых популяций людей их частота очень высока. Так, болезнь Гоше вследствие дефекта фермента β-глюкозидазы (рис. 8-64) у евреев встречается с частотой 166:100 000, болезнь Тея–Сакса (дефект фермента β-гексозаминидазы) — с частотой 33:100 000. Сфинголипидозы обычно приводят к смерти в раннем возрасте, так как происходит поражение клеток нервной ткани, где сконцентрированы гликосфинголипиды. Однако при болезнях Гоше и Фабри больные живут относительно долго.

IX. ХОЛЕСТЕРОЛ: ФУНКЦИИ, ОБМЕН

Холестерол — стероид, характерный только для животных организмов. Он синтезируется во многих тканях человека, но основное место синтеза — печень. В печени синтезируется более 50% холестерола, в тонком кишечнике — 15–20%, остальной холестерол синтезируется в коже, коре надпочечников, половых железах. В сутки в организме синтезируется около 1 г холестерола; с пищей поступает 300–500 мг (рис. 8-65). Холестерол выполняет много функций: входит в состав всех мембран клеток и влияет на их свойства, служит исходным субстратом в синтезе жёлчных кислот и стероидных гормонов. Предшественники в метаболическом пути синтеза холестерола превращаются также в убихинон — компонент дыхательной цепи и долихол, участвующий в синтезе гликопротеинов. Холестерол за

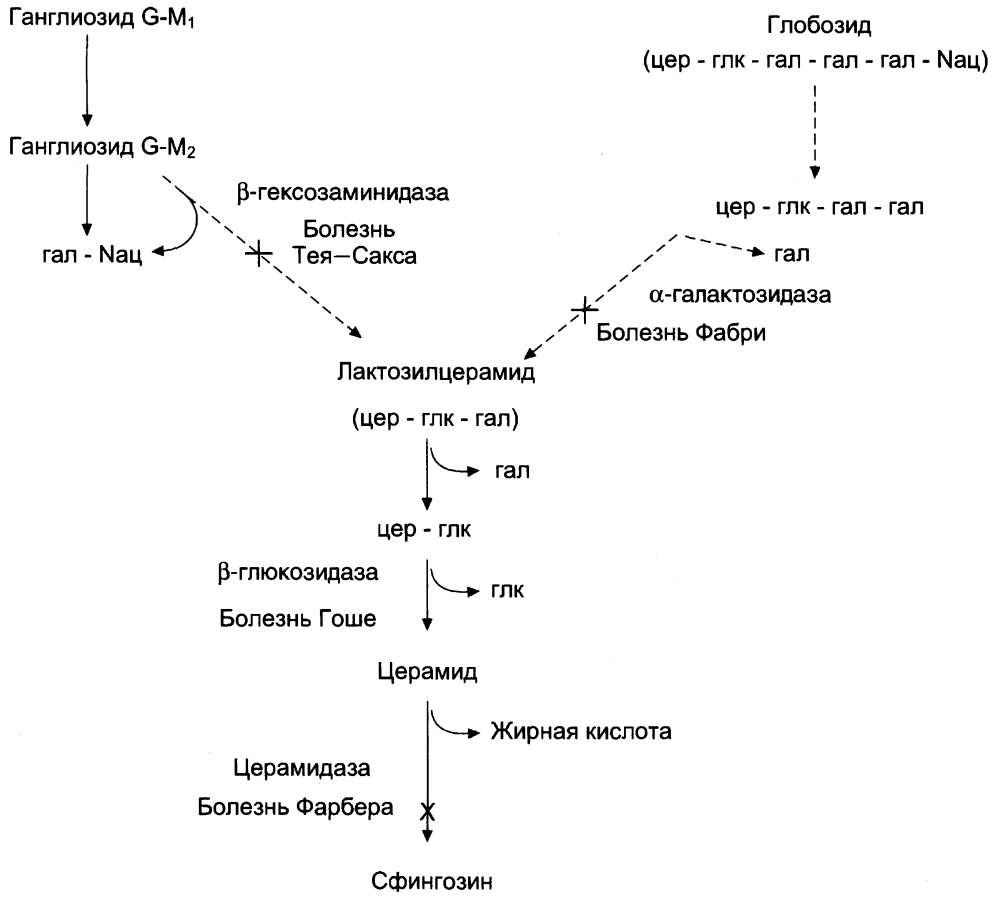


Рис. 8-64. Катаболизм гликосфинголипидов. На схеме указаны ферменты, генетические дефекты которых являются причиной наследственных заболеваний — сфинголипидозов.

счёт своей гидроксильной группы может образовывать эфиры с жирными кислотами. Этерифицированный холестерол преобладает в крови и запасается в небольших количествах в некоторых типах клеток, использующих его как субстрат для синтеза других веществ. Холестерол и его эфиры — гидрофобные молекулы, поэтому они транспортируются кровью только в составе разных типов ЛП. Обмен холестерола чрезвычайно сложен — только для его синтеза необходимо осуществление около 100 последовательных реакций. Всего в обмене холестерола участвует около 300 разных белков. Нарушения обмена холестерола приводят к одному из наиболее распространённых заболеваний — атеросклерозу. Смертность от последствий атеросклероза (инфаркт миокарда, инсульт) лидирует в общей структуре смертности населения. Атеросклероз — «полигенное заболевание», т.е. в его развитии участвуют многие факторы, важнейшие из которых наследственные. Накопление холестерола в организме приводит к развитию и другого распространённого заболевания — желчнокаменной болезни.

А. Синтез холестерола и его регуляция

Реакции синтеза холестерола происходят в цитозоле клеток. Это один из самых длинных метаболических путей в организме человека.

Образование мевалоната

Сложный путь синтеза холестерола можно разделить на 3 этапа (рис. 8-66). Первый этап заканчивается образованием мевалоната (мевалоновой кислоты). Две молекулы ацетил-КоА конденсируются ферментом тиолазой с образованием аце-

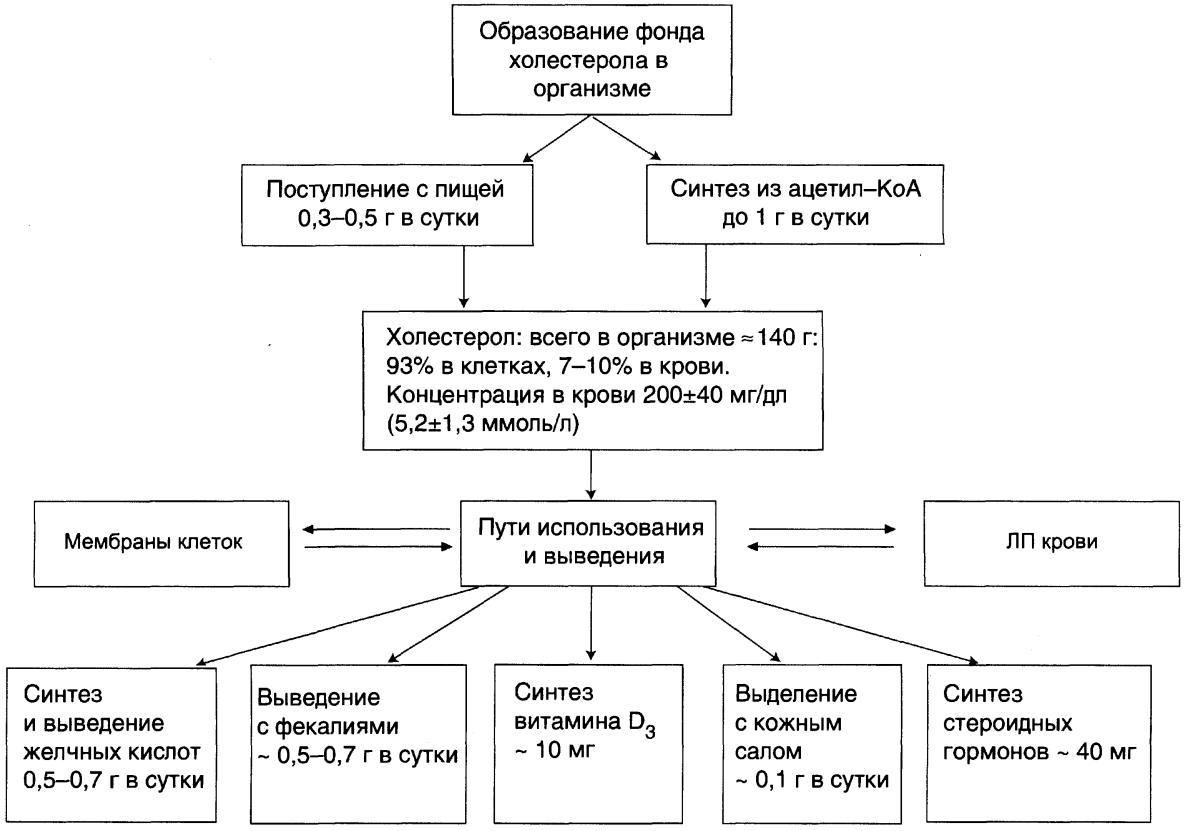


Рис. 8-65. Фонд холестерола в организме, пути его использования и выведения.

тоацетил-КоА. Фермент гидроксиметилглутарил-КоА-синтаза присоединяет третий ацетильный остаток с образованием ГМГ-КоА (3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА). Эта последовательность реакций сходна с начальными стадиями синтеза кетоновых тел (см. рис. 8-33). Однако реакции синтеза кетоновых тел происходят в митохондриях печени, а реакции синтеза холестерола — в цитозоле клеток.

Следующая реакция, катализируемая ГМГ-КоА-редуктазой, является регуляторной в метаболическом пути синтеза холестерола. В этой реакции происходит восстановление ГМГ-КоА до мевалоната с использованием 2 молекул NADPH. Фермент ГМГ-КоА-редуктаза — гликопротеин, пронизывающий мембрану ЭР, активный центр которого выступает в цитозоль.

Образование сквалена

На втором этапе синтеза мевалонат превращается в пятиуглеродную изопреноидную структуру, содержащую пирофосфат — изопентенилпирофосфат. Продукт конденсации 2 изопреновых единиц — геранилпирофосфат. Присоединение ещё 1 изопреновой единицы приводит к образованию фарнезилпирофосфата — соединения, состоящего из 15 углеродных атомов. Две молекулы фарнезилпирофосфата конденсируются с образованием сквалена — углеводорода линейной структуры, состоящего из 30 углеродных атомов.

Образование холестерола

На третьем этапе синтеза холестерола сквален через стадию образования эпоксида ферментом циклазой превращается в молекулу ланостерола, содержащую 4 конденсированных цикла и 30 атомов углерода. Далее происходит 20 последовательных реакций, превращающих ланостерол в холестерол. На последних этапах синтеза от ланостерола отделяется 3 атома углерода, поэтому холестерол содержит 27 углеродных атомов.

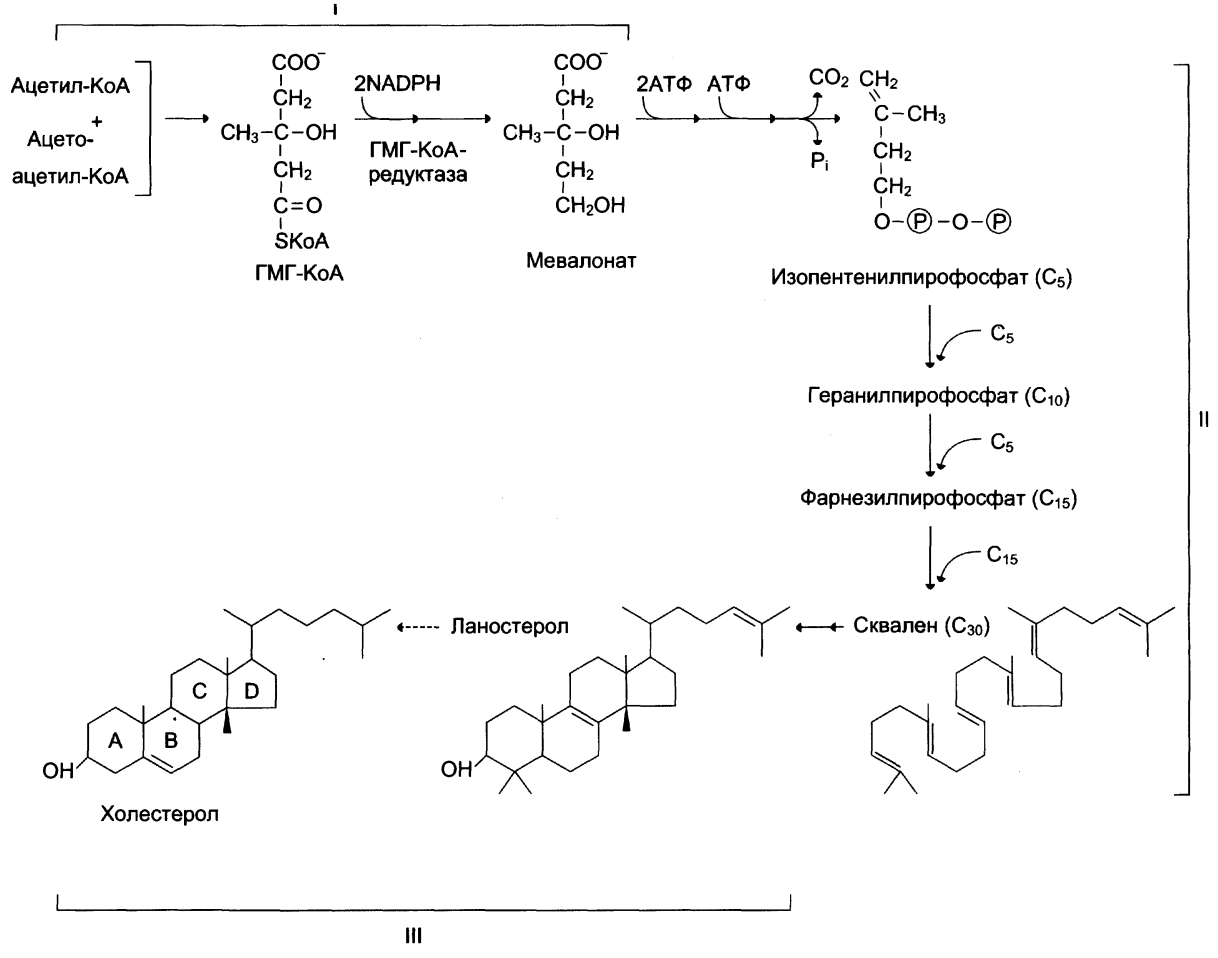


Рис. 8-66. Синтез холестерола. C_5 — *изопентенилпирофосфат*; C_{15} — *фарнезилпирофосфат. Все атомы углерода холестерола* происходят из ацетил-КоА. Сквален — углеводород линейной структуры — превращается ферментом циклазой в ланостерол, содержащий 4 конденсированных кольца и гидроксильную группу. Ланостерол через ряд последовательных реакций превращается в холестерол (I, II, III — этапы синтеза).

У холестерола имеется насыщенная разветвлённая боковая цепь из 8 углеродных атомов в положении 17, двойная связь в кольце В между атомами углерода в положениях 5 и 6, а также гидроксильная группа в положении 3.

В организме человека изопентенилпирофосфат также служит предшественником убихинона (KoQ) и долихола, участвующего в синтезе гликопротеинов.

Этерификация холестерола

В некоторых тканях гидроксильная группа холестерола этерифицируется с образованием более гидрофобных молекул — эфиров холестерола. Реакция катализируется внутриклеточным ферментом АХАТ (ацилКоА:холестеролацилтрансферазой).

Реакция этерификации происходит также в крови в ЛПВП, где находится фермент ЛХАТ (лецитин:холестеролацилтрансфераза). Эфиры холестерола — форма, в которой они депонируются в клетках или транспортируются кровью. В крови около 75% холестерола находится в виде эфиров.

Регуляция синтеза холестерола

Регуляция ключевого фермента синтеза холестерола (ГМГ-КоА-редуктазы) происходит разными способами.

Фосфорилирование/дефосфорилирование ГМГ-КоА-редуктазы (рис. 8-67). При увеличении соотношения инсулин/глюкагон этот фермент дефосфорилируется и переходит в активное состояние. Действие инсулина осуществляется через 2 фермента:

фосфатазу киназы ГМГ-КоА-редуктазы, которая превращает киназу в неактивное дефосфорилированное состояние;

фосфатазу ГМГ-КоА-редуктазы путём превращения её в дефосфорилированное активное состояние. Результатом этих реакций служит образование дефосфорилированной активной формы ГМГ-КоА-редуктазы.

Следовательно, в абсорбтивный период синтез холестерола увеличивается. В этот период увеличивается и доступность исходного субстрата для синтеза холестерола — ацетил-КоА (в результате приёма пищи, содержащей углеводы и жиры, так как ацетил-КоА образуется при распаде глюкозы и жирных кислот).

В постабсорбтивном состоянии глюкагон через протеинкиназу А стимулирует фосфорилирование ГМГ-КоА-редуктазы, переводя её в неактивное состояние. Это действие усиливается тем, что одновременно глюкагон стимулирует фосфорилирование и инактивацию фосфатазы ГМГ-КоА-редуктазы и фосфорилирование киназы ГМГ-КоА-редуктазы, удерживая, таким образом, ГМГ-КоА-редуктазу в фосфорилированном неактивном состоянии. В результате синтез холестерола в постабсорбтивном периоде и при голодании ингибируется.

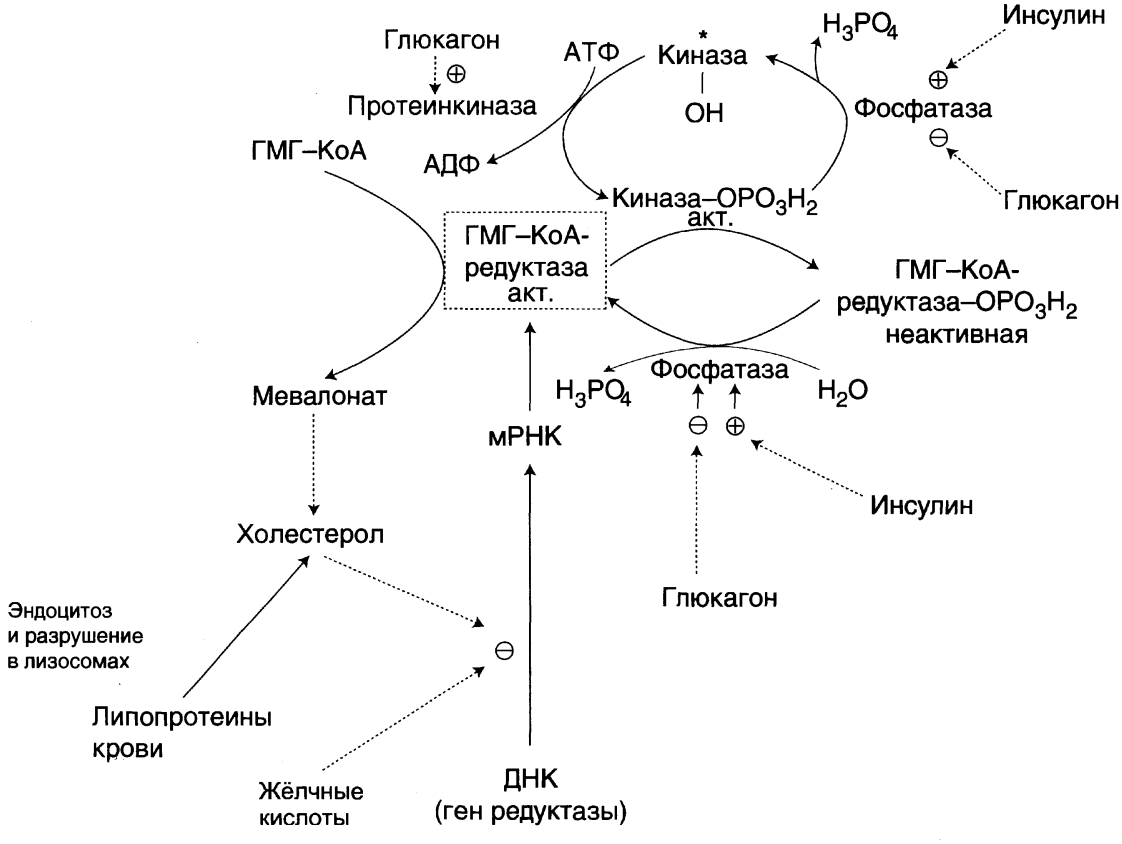


Рис. 8-67. Регуляция активности ГМГ-КоА-редуктазы в печени. Холестерол и жёлчные кислоты снижают скорость транскрипции и, таким образом, синтез фермента. Инсулин стимулирует дефосфорилирование, а глюкагон — фосфорилирование ГМГ-КоА-редуктазы. Инсулин активирует 2 фосфатазы: киназы ГМГ-КоА-редуктазы* и фосфатазу, дефосфорилирующую непосредственно ГМГ-КоА-редуктазу. Глюкагон стимулирует фосфорилирование и инактивацию 2 фосфатаз и фосфорилирование и активацию киназы ГМГ-КоА-редуктазы.

Ингибирование синтеза ГМГ-КоА-редуктазы. Конечный продукт метаболического пути (холестерол) снижает скорость транскрипции гена ГМГ-КоА-редуктазы, подавляя таким образом собственный синтез. В печени активно идёт синтез жёлчных кислот из холестерола, поэтому и жёлчные кислоты (как конечные продукты синтеза) подавляют активность гена ГМГ-КоА-редуктазы (рис. 8-67). Так как молекула ГМГ-КоА-редуктазы существует около 3 ч после синтеза, то ингибирование синтеза этого фермента конечным продуктом метаболического пути (холестеролом) является эффективной регуляцией.

Б. Транспорт холестерола липопротеинами крови

Холестерол транспортируется кровью только в составе ЛП. ЛП обеспечивают поступление в ткани экзогенного холестерола, определяют потоки холестерола между органами и выведение избытка холестерола из организма.

Транспорт экзогенного холестерола

Холестерол поступает с пищей в количестве 300–500 мг/сут, в основном в виде эфиров. После гидролиза, всасывания в составе мицелл, этерификации в клетках слизистой оболочки кишечника эфиры холестерола и небольшое количество свободного холестерола включаются в состав ХМ и поступают в кровь. После удаления жиров из ХМ под действием ЛП-липазы холестерол в составе остаточных ХМ доставляется в печень. Остаточные ХМ взаимодействуют с рецепторами клеток печени и захватываются по механизму эндоцитоза. Затем ферменты лизосом гидролизуют компоненты остаточных ХМ, и в результате образуется свободный холестерол. Экзогенный холестерол, поступающий таким образом в клетки печени, может ингибировать синтез эндогенного холестерола, замедляя скорость синтеза ГМГ-КоА-редуктазы.

Транспорт эндогенного холестерола в составе ЛПОНП (пре-β-липопротеинов)

Печень — основное место синтеза холестерола. Эндогенный холестерол, синтезированный из исходного субстрата ацетил-КоА, и экзогенный, поступивший в составе остаточных ХМ, образуют в печени общий фонд холестерола. В гепатоцитах триацилглицеролы и холестерол упаковываются в ЛПОНП. В их состав входят, кроме того, апопротеин В-100 и фосфолипиды. ЛПОНП секретируются в кровь, где получают от ЛПВП апопротеины Е и С-II. В крови на ЛПОНП действует ЛП-липаза, которая, как и в ХМ, активируется апоС-II и гидролизует жиры до глицерола и жирных кислот. По мере уменьшения количества ТАГ в составе ЛПОНП они превращаются в ЛППП. Когда количество жиров в ЛППП уменьшается, апопротеины С-II переносятся обратно на ЛПВП. Содержание холестерола и его эфиров в ЛППП достигает 45%; часть этих липопротеинов захватывается клетками печени через рецепторы ЛПНП, которые взаимодействуют и с апоЕ и с апоВ-100.

Транспорт холестерола в составе ЛПНП. Рецепторы ЛПНП

На ЛППП, оставшиеся в крови, продолжает действовать ЛП-липаза, и они превращаются в ЛПНП, содержащие до 55% холестерола и его эфиров. Апопротеины Е и С-II переносятся обратно в ЛПВП. Поэтому основным апопротеином в ЛПНП служит апоВ-100. Апопротеин В-100 взаимодействует с рецепторами ЛПНП и таким образом определяет дальнейший путь холестерола. ЛПНП — основная транспортная форма холестерола, в которой он доставляется в ткани. Около 70% холестерола и его эфиров в крови находится в составе ЛПНП. Из крови ЛПНП поступают в печень (до 75%) и другие ткани, которые имеют на своей поверхности рецепторы ЛПНП.

Рецептор ЛПНП — сложный белок, состоящий из 5 доменов и содержащий углеводную часть (рис. 8-68).

Рецепторы ЛПНП синтезируются в ЭР и аппарате Гольджи, а затем экспонируются на поверхности клетки, в специальных углублениях, выстланных белком клатрином. Эти углубления называют окаймлёнными ямками (рис. 8-69). Выступающий на поверхность N-концевой домен рецептора взаимодействует с белками апоВ-100 и апоЕ; поэтому он может связывать не только ЛПНП, но и ЛППП, ЛПОНП, остаточные ХМ, содержащие эти апопротеины. Клетки тканей содержат большое количество рецепторов ЛПНП на своей поверхности: например, на одной клетке фибробласта имеется от 20 000 до 50 000 ре-

цепторов. Из этого следует, что холестерол поступает в клетки из крови в основном в составе ЛПНП.

Если количество холестерола, поступающего в клетку, превышает её потребность, то синтез рецепторов ЛПНП подавляется, что уменьшает поток холестерола из крови в клетки. При снижении концентрации свободного холестерола в клетке, наоборот, активируется синтез ГМГ-КоА-редуктазы и рецепторов ЛПНП.

В регуляции синтеза рецепторов ЛПНП участвуют гормоны: инсулин и трийодтиронин (T_3), половые гормоны. Они увеличивают образование рецепторов ЛПНП, а глюкокортикоиды (в основном кортизол) уменьшают. Эффекты инсулина и T_3, вероятно, могут объяснить механизм гиперхолестеролемии и увеличение риска атеросклероза при сахарном диабете или гипотиреозе.

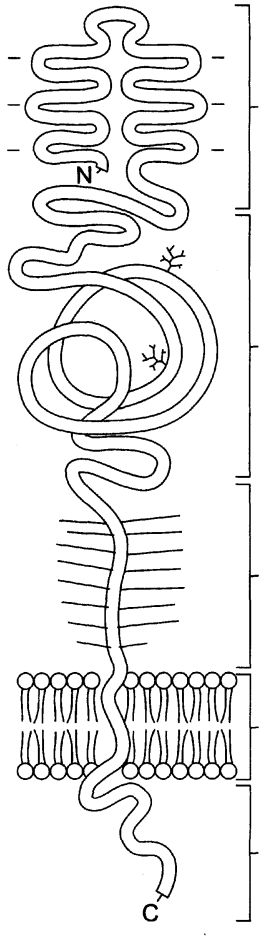


Рис. 8-68. Структура рецептора ЛПНП. Белок-рецептор состоит из 5 доменов. N — концевой домен, непосредственно связывает ЛПНП. Два других домена (связаны с олигосахаридами), выступающих на поверхности клетки, обеспечивают необходимую конформацию N-концевого домена ЛПНП.

Другие пути поступления холестерола в клетки

Кроме рецепторов ЛПНП, на поверхности клеток многих органов (печени, мозга, плаценты) имеется другой тип рецептора, называемый «белком, сходным с рецептором ЛПНП». Этот рецептор взаимодействует с апоЕ и захватывает ремнантные (остаточные) ХМ и ЛППП. Основной функцией этих рецепторов, вероятно, является «очистка» плазмы крови от ремнантных частиц. Так как ремнантные частицы содержат холестерол, этот тип рецепторов также обеспечивает поступление его в ткани.

Кроме поступления холестерола в ткани путём эндоцитоза ЛП, некоторое количество холестерола поступает в клетки путём диффузии из ЛПНП и других ЛП при их контакте с мембранами клеток.

Роль ЛПВП в обмене холестерола

ЛПВП выполняют 2 основные функции: они поставляют апопротеины другим ЛП в крови и участвуют в так называемом «обратном транспорте холестерола». ЛПВП синтезируются в печени и в небольшом количестве в тонком кишечнике в виде «незрелых липопротеинов» — предшественников ЛПВП. Они имеют дисковидную форму, небольшой размер и содержат высокий процент белков и фосфолипидов. В печени в ЛПВП включаются апопротеины А, Е, С-II, фермент ЛХАТ. В крови апоС-II и апоЕ переносятся с ЛПВП на ХМ и ЛПОНП. Предшественники ЛПВП практически не содержат холестерола и ТАГ и в крови обогащаются холестеролом, получая его из других ЛП и мембран клеток.

Для переноса холестерола в ЛПВП существует сложный механизм. На поверхности ЛПВП находится фермент ЛХАТ — лецитин:холестерол-ацилтрансфераза. Этот фермент превращает холестерол, имеющий гидроксильную группу, выступающую на поверхность липопротеинов или мембран клеток, в эфиры холестерола. Радикал жирной кислоты переносится от фосфатидилхо-

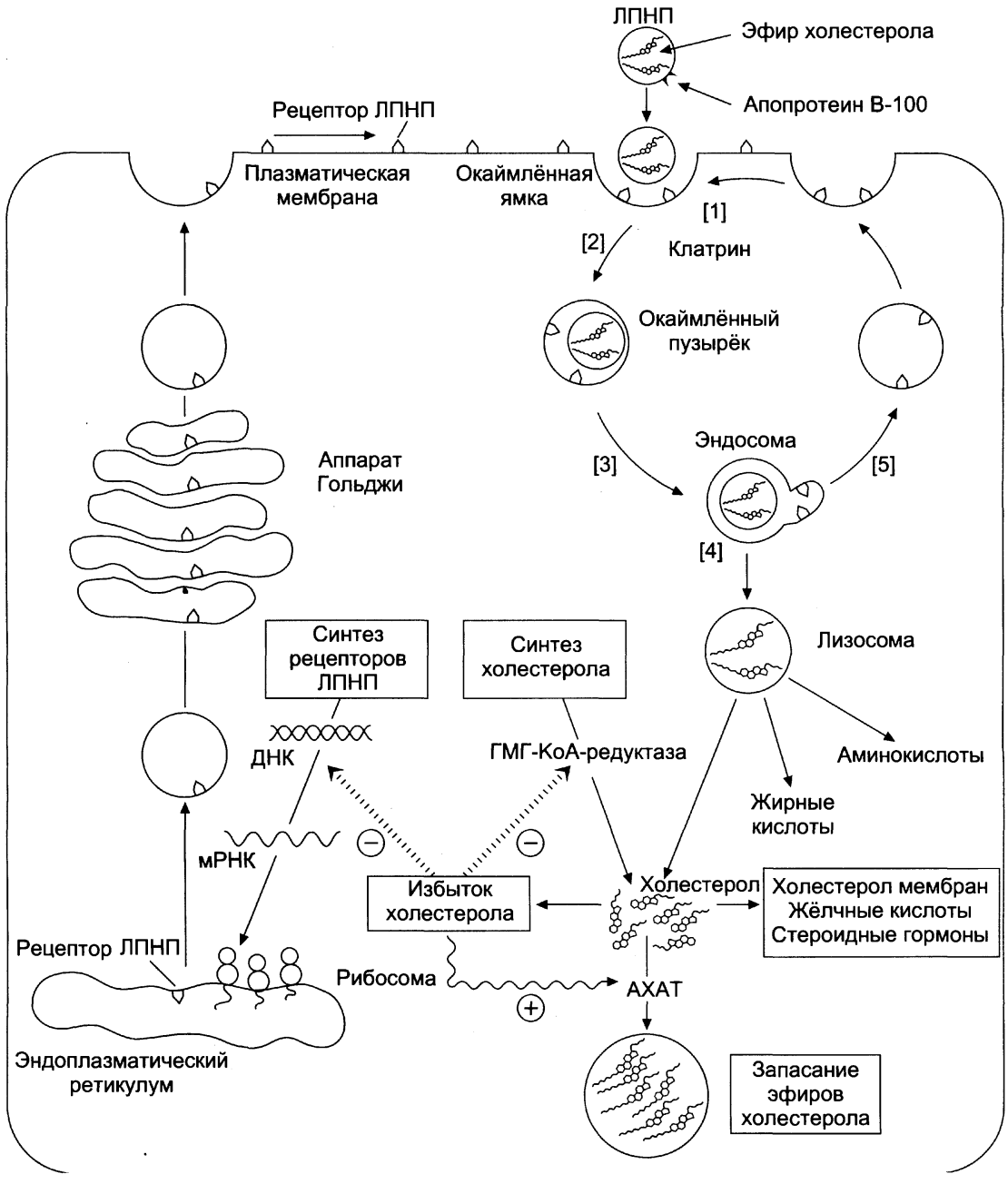


Рис. 8-69. Синтез рецепторов ЛПНП и их последующие превращения. После взаимодействия ЛПНП с рецептором (1) окаймлённые ямки вместе с рецептором и ЛПНП поглощаются по механизму эндоцитоза (2). В образовавшейся эндосоме снижается значение pH за счёт работы протонного насоса, использующего энергию АТФ. При снижении pH рецепторы ЛПНП отделяются от ЛПНП (3), и большая часть рецепторов возвращается в плазматическую мембрану (5). Таким образом, рецепторы ЛПНП могут многократно использоваться клеткой. После удаления рецептора ЛПНП эндосомы сливаются с лизосомами, и гидролитические ферменты лизосом расщепляют компоненты эндосом (4). В результате освобождается холестерол, который может быть использован для формирования структуры мембран, в клетках печени для синтеза жёлчных кислот, в клетках эндокринной системы для синтеза стероидных гормонов.

лина (лецитина) на гидроксильную группу холестерола. Реакция активируется апопротеином А-I, входящим в состав ЛПВП.

Гидрофобная молекула эфира холестерола перемещается внутрь ЛПВП. Таким образом, частицы ЛПВП обогащаются эфирами холестерола. ЛПВП увеличиваются в размерах, из дисковидных небольших частиц превращаются в частицы сферической формы, которые называют $ЛПВП_3$, или «зрелые ЛПВП». $ЛПВП_3$ частично обменивают эфиры холестерола на триацилглицеролы, содержащиеся в ЛПОНП, ЛППП и ХМ (рис. 8-70). В этом переносе участвует «**белок, переносящий эфиры холестерина**» (он также называется апоD). Таким образом, часть эфиров холестерола переносится на ЛПОНП, ЛППП, а $ЛПВП_3$ за счёт накопления триацилглицеролов увеличиваются в размерах и превращаются в $ЛПВП_2$. ЛПОНП под действием ЛП-липазы превращаются сначала в ЛППП, а затем в ЛПНП. ЛПНП и ЛППП захватываются клетками через рецепторы ЛПНП.

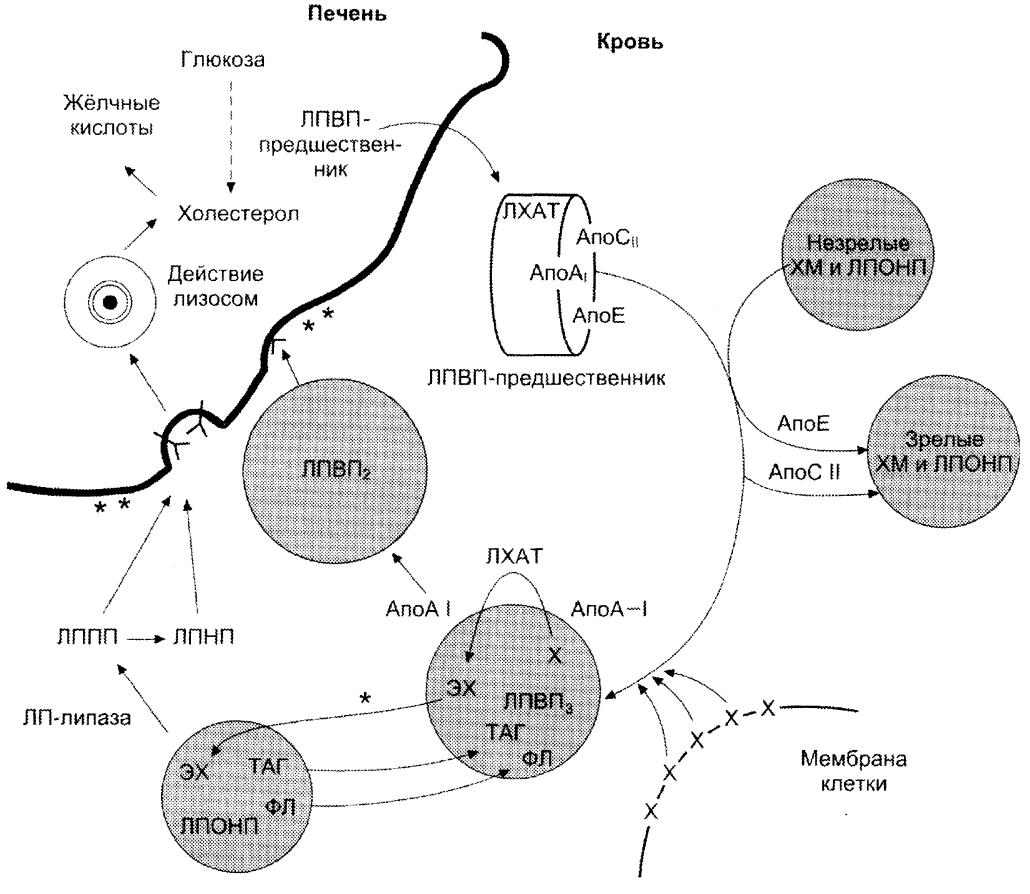


Рис. 8-70. Роль ЛПВП и ЛПНП в обратном транспорте холестерола в печень. Незрелые ЛПВП-предшественники обогащаются холестеролом, который поступает в ЛПВП при участии фермента ЛХАТ с поверхности клеток и других липопротеинов, содержащих холестерол. Незрелые ЛПВП, обогащаясь холестеролом, превращаются в $ЛПВП_3$ — частицы сферической формы и большего размера. $ЛПВП_3$ обменивают эфиры холестерола на триацилглицеролы, содержащиеся в ЛПОНП, ЛППП при участии «белка, переносящего эфиры холестерола»*. $ЛПВП_3$ превращается в $ЛПВП_2$, размер которых увеличивается за счёт накопления триацилглицеролов. ЛПОНП и ЛППП под действием ЛП-липазы превращаются в ЛПНП, которые доставляют холестерол в печень. Часть ЛПВП захватывается клетками печени, взаимодействуя со специфическими для ЛПВП рецепторами к апоА-I. На поверхности клеток печени фосфолипиды и триацилглицеролы ЛППП, $ЛПВП_2$ гидролизуются печёночной ЛП-липазой**, что дестабилизирует структуру поверхности ЛП и способствует диффузии холестерола в гепатоциты. $ЛПВП_2$ в результате этого опять превращаются в $ЛПВП_3$ и возвращаются в кровоток. X — холестерол, ЭХ — эфиры холестерола, ФЛ — фосфолипиды, ЛХАТ — лецитин-холестеролацилтрансфераза, А–I — апопротеин, активатор ЛХАТ.

Таким образом, холестерол из всех тканей возвращается в печень в основном в составе ЛПНП, но в этом участвуют также ЛППП и $ЛПВП_2$. Практически весь холестерол, который должен быть выведен из организма, поступает в печень и уже из этого органа выделяется в виде производных с фекалиями. Путь возвращения холестерола в печень называют «обратным транспортом» холестерола.

Выведение холестерола из организма

Структурная основа холестерола — кольца циклопентанпергидрофенантрена — не может быть расщеплена до CO_2 и воды, как другие органические компоненты, поступающие с пищей или синтезированные в организме. Поэтому основное количество холестерола выводится в виде жёлчных кислот.

Некоторое количество жёлчных кислот выделяется в неизменённом виде, а часть подвергается действию ферментов бактерий в кишечнике. Продукты их разрушения (в основном, вторичные жёлчные кислоты) выводятся из организма.

Часть молекул холестерола в кишечнике под действием ферментов бактерий восстанавливается по двойной связи в кольце В, в результате чего образуются 2 типа молекул — холестанол и копростанол, выводимые с фекалиями. В сутки из организма выводится от 1,0 г до 1,3 г холестерола, основная часть удаляется с фекалиями.

В. Синтез жёлчных кислот из холестерола и его регуляция

Жёлчные кислоты синтезируются в печени из холестерола. Часть жёлчных кислот в печени подвергается реакции конъюгации — соединения с гидрофильными молекулами (глицином и таурином). Жёлчные кислоты обеспечивают эмульгирование жиров, всасывание продуктов их переваривания и некоторых гидрофобных веществ, поступающих с пищей, например жирорастворимых витаминов и холестерола. Жёлчные кислоты также всасываются, через воротную вену попадают опять в печень и многократно используются для эмульгирования жиров. Этот путь называют энтерогепатической циркуляцией жёлчных кислот.

Синтез жёлчных кислот

В организме за сутки синтезируется 200–600 мг жёлчных кислот. Первая реакция синтеза — образование 7-α-гидроксихолестерола — является регуляторной. Фермент 7-α-гидроксилаза, катализирующий эту реакцию, ингибируется конечным продуктом — жёлчными кислотами. 7-α-Гидроксилаза представляет собой одну из форм цитохрома P_{450} и использует кислород как один из субстратов. Один атом кислорода из O_2 включается в гидроксильную группу в положении 7, а другой восстанавливается до воды. Последующие реакции синтеза приводят к формированию 2 видов жёлчных кислот: холевой и хенодезоксихолевой (рис. 8-71), которые называют «первичными жёлчными кислотами».

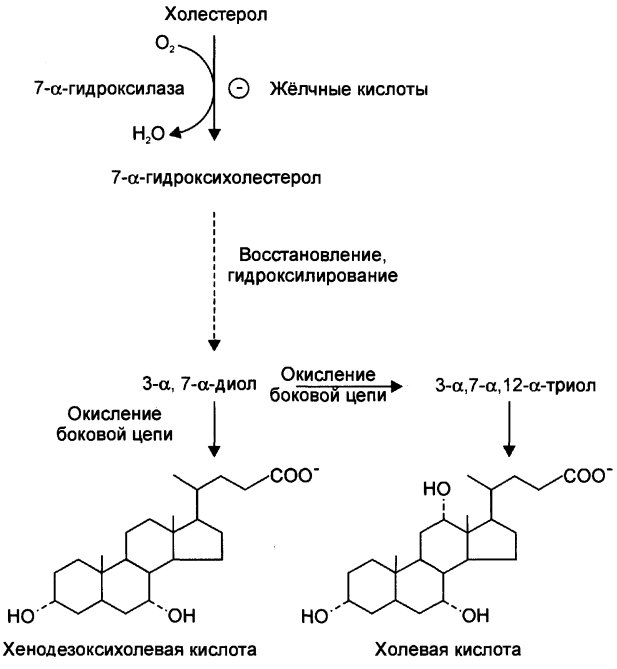


Рис. 8-71. Синтез первичных жёлчных кислот и его регуляция. В процессе синтеза жёлчных кислот холестерол подвергается гидроксилированию, восстановлению двойной связи в положениях 5 и 6 и окислению боковой цепи. Образуется 2 типа жёлчных кислот: одна с гидроксильными группами в положениях 3 и 7, другая — с гидроксильными группами в положениях 3, 7, 12.

Конъюгирование жёлчных кислот

Конъюгирование — присоединение ионизированных молекул глицина или таурина к карбоксильной группе жёлчных кислот; усиливает их детергентные свойства, так как увеличивает амфифильность молекул.

Конъюгация происходит в клетках печени и начинается с образования активной формы жёлчных кислот — производных КоА (рис. 8-72).

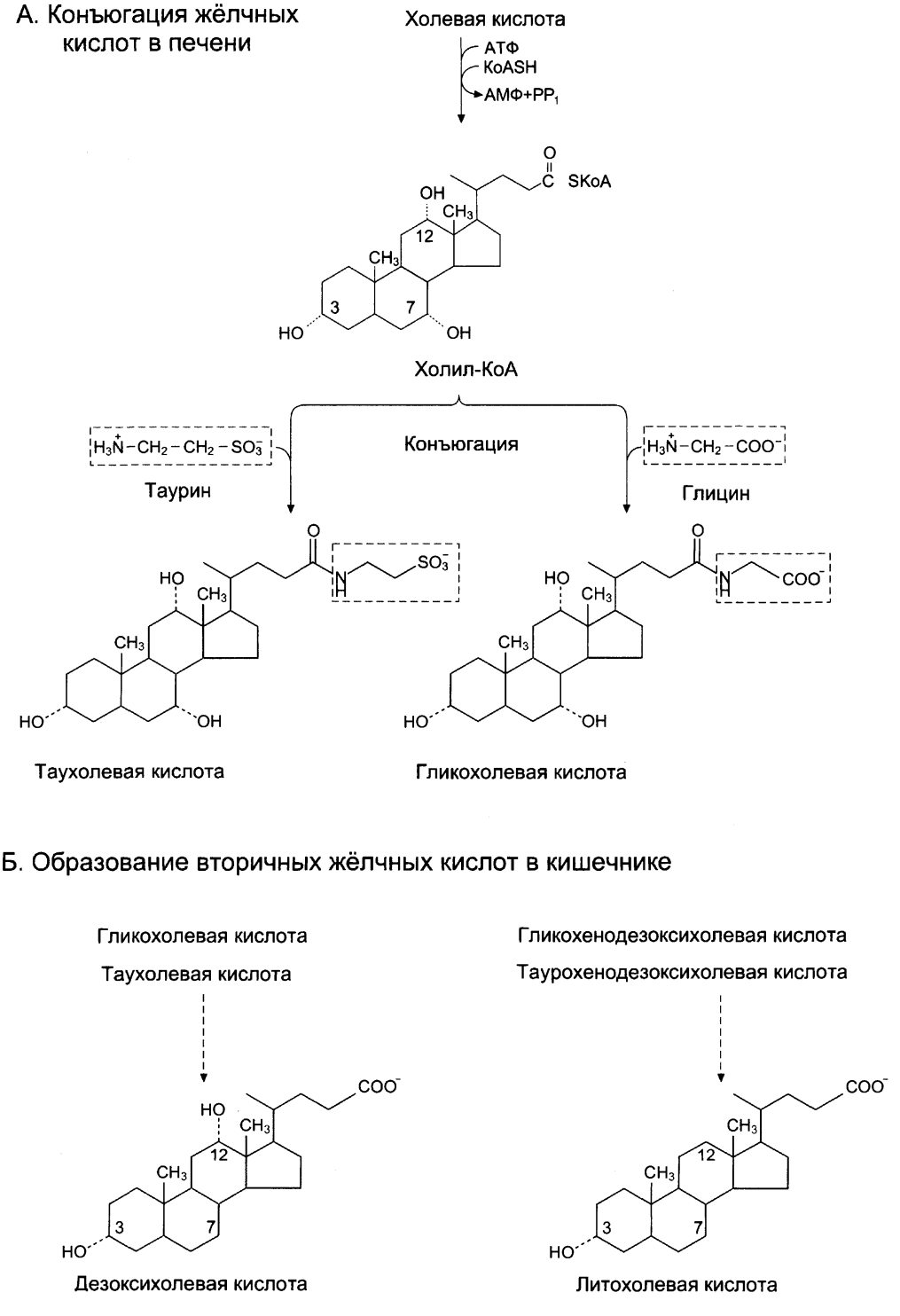


Рис. 8-72. Конъюгация жёлчных кислот в печени и разрушение в кишечнике. А — продукты конъюгации обладают лучшими детергентными свойствами, так как снижается константа диссоциации, и молекулы полностью диссоциированы при pH 6 в кишечнике. Конъюгации подвергаются холевая и хенодезоксихолевая кислоты; Б — в кишечнике небольшое количество жёлчных кислот под действием ферментов бактерий превращаются в литохолевую и дезоксихолевую кислоты.

Затем присоединяется таурин или глицин, и в результате образуется 4 варианта конъюгатов: таурохолевая и таурохенодезоксихолевая, гликохолевая или гликохенодезоксихолевая кислоты (они значительно более сильные эмульгаторы, чем исходные жёлчные кислоты).

Конъюгатов с глицином образуется в 3 раза больше, чем с таурином, так как количество таурина ограничено.

Энтерогепатическая циркуляция жёлчных кислот. Превращения жёлчных кислот в кишечнике

Продукты гидролиза жиров всасываются в основном в верхнем отделе тонкого кишечника, а соли жёлчных кислот — в подвздошной кишке. Около 95% жёлчных кислот, попавших в кишечник, возвращается в печень через воротную вену, затем опять секретируются в жёлчь и повторно используются в эмульгировании жиров (рис. 8-73). Этот путь жёлчных кислот называют энтерогепатической циркуляцией. В сутки всего реабсорбируется 12–32 г солей жёлчных кислот, так как в организме имеется 2–4 г жёлчных кислот, и каждая молекула жёлчной кислоты проходит этот круг 6–8 раз.

Часть жёлчных кислот в кишечнике подвергается действию ферментов бактерий, которые отщепляют глицин и таурин, а также гидроксильную группу в положении 7 жёлчных кислот. Жёлчные кислоты, лишённые этой гидроксильной группы, называют вторичными. Вторичные жёлчные кислоты: дезоксихолевая, образующаяся из холевой, и литохолевая, образующаяся из дезоксихолевой, хуже растворимы, медленнее всасываются в кишечнике, чем первичные жёлчные кислоты. Поэтому с фекалиями в основном удаляются вторичные жёлчные кислоты. Однако реабсорбированные вторичные жёлчные кислоты в печени опять превращаются в первичные и участвуют в эмульгировании жиров. За сутки из организма выводится 500–600 мг жёлчных кислот. Путь выведения жёлчных кислот одновременно служит и основным путём выведения холестерола из организма. Для восполнения потери жёлчных кислот с фекалиями в печени постоянно происходит синтез жёлчных кислот из холестерола в количестве, эквивалентном выведенным жёлчным кислотам. В результате пул жёлчных кислот (2–4 г) остаётся постоянным.

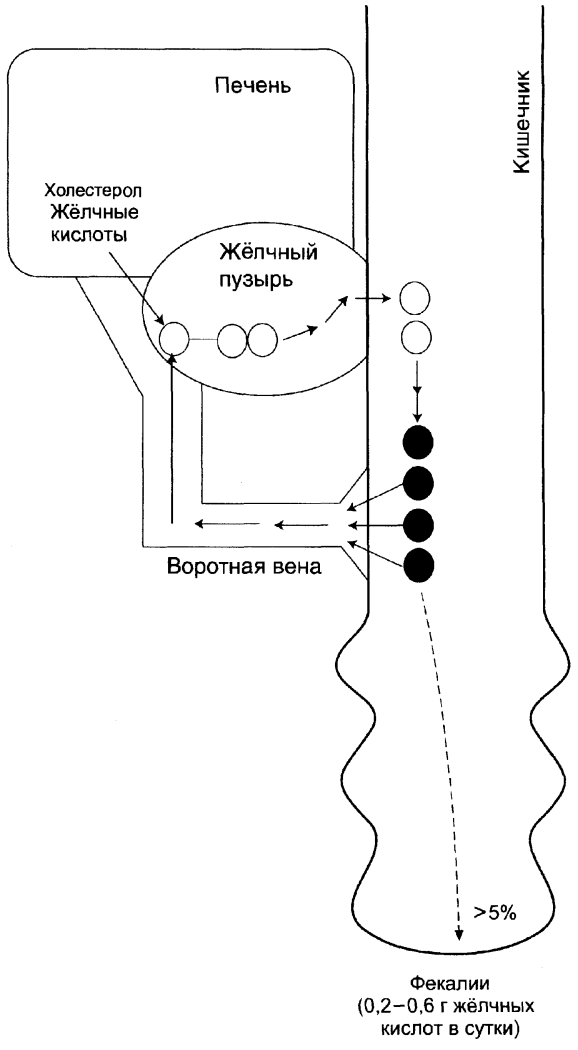


Рис. 8-73. Энтерогепатическая циркуляция жёлчных кислот. Светлые кружки — мицеллы жёлчи; тёмные кружки — смешанные мицеллы жёлчи и продуктов гидролиза триацилглицеролов.

Регуляция синтеза жёлчных кислот

Регуляторные ферменты синтеза жёлчных кислот (7-α-гидроксилаза) и холестерола (ГМГ-КоА-редуктаза) ингибируются жёлчными кислотами. В течение суток активность обоих ферментов меняется сходным образом, т.е. увеличение количества жёлчных кислот в печени приводит к снижению синтеза как жёлчных кислот, так и холестерола. Возвращение жёлчных кислот в печень в процессе энтерогепатической циркуляции ока-

зывает важное регуляторное действие; прерывание циркуляции приводит к активации 7-α-гидроксилазы и увеличению захвата холестерола из крови. Этот механизм лежит в основе одного из способов снижения концентрации холестерола в крови при лечении гиперхолестеролемии. В этом случае используют препараты, адсорбирующие в кишечнике холестерол и жёлчные кислоты и препятствующие их всасыванию.

Регуляция 7-α-гидроксилазы осуществляется и другими механизмами:

- **фосфорилированием/дефосфорилированием**, причём активна фосфорилированная форма, в отличие от ГМГ-КоА-редуктазы;
- **изменением количества фермента;** холестерол индуцирует транскрипцию гена, а жёлчные кислоты репрессируют.

На синтез 7-α-гидроксилазы влияют гормоны: тиреоидные гормоны индуцируют синтез, а эстрогены — репрессируют. Такое влияние эстрогенов на синтез жёлчных кислот объясняет, почему желчнокаменная болезнь встречается у женщин в 3—4 раза чаще, чем у мужчин.

Г. Желчнокаменная болезнь

Желчнокаменная болезнь — патологический процесс, при котором в жёлчном пузыре образуются камни, основу которых составляет холестерол.

Выделение холестерола в жёлчь должно сопровождаться пропорциональным выделением жёлчных кислот и фосфолипидов, удерживающих гидрофобные молекулы холестерола в жёлчи в мицеллярном состоянии (табл. 8-9).

У большинства больных желчнокаменной болезнью активность ГМГ-КоА-редуктазы повышена, следовательно увеличен синтез холестерола, а активность 7-α-гидроксилазы, участвующей в синтезе жёлчных кислот, снижена. В результате синтез холестерола увеличен, а синтез жёлчных кислот из него замедлен, что приводит к диспропорции количества холестерола и жёлчных кислот, секретируемых в жёлчь.

Таблица 8-9. Компоненты жёлчи

Компоненты жёлчи	Концентрация, ммоль/л
Жёлчные кислоты	310
Фосфатидилхолин	8
Холестерол	25
Жёлчные пигменты	3,2

Если эти пропорции нарушены, то холестерол начинает осаждаться в жёлчном пузыре, образуя вначале вязкий осадок, который постепенно становится более твёрдым. Иногда он пропитывается билирубином — продуктом распада гема, белками и солями кальция. Камни, образующиеся в жёлчном пузыре, могут состоять только из холестерола (холестериновые камни) или из смеси холестерола, билирубина, белков и кальция. Холестериновые камни обычно белого цвета, а смешанные камни — коричневого цвета разных оттенков. Причин, приводящих к изменению соотношения жёлчных кислот и холестерола, в жёлчи много: пища, богатая холестеролом, гиперкалорийное питание, застой жёлчи в жёлчном пузыре, нарушение энтерогепатической циркуляции, нарушения синтеза жёлчных кислот, инфекции жёлчного пузыря.

Если камни начинают перемещаться из жёлчного пузыря в жёлчные протоки, то они вызывают спазм жёлчного пузыря и протоков, что больной ощущает как приступ сильной боли. Если камень перекрывает проток некоторое время, то нарушается поступление жёлчи в кишечник, жёлчные пигменты проходят через мембраны гепатоцитов в сторону синусоидов и попадают в кровь, что приводит к развитию обтурационной (подпечёночной желтухи).

Лечение желчнокаменной болезни. В начальной стадии образования камней можно применять в качестве лекарства хенодезоксихолевую кислоту. Попадая в жёлчный пузырь, эта жёлчная кислота постепенно растворяет осадок холестерола (холестериновые камни), однако это медленный процесс, требующий нескольких месяцев.

Д. Дислипопротеинемии. Гиперхолестеролемия и развитие атеросклероза

Дислипопротеинемии — нарушения обмена ЛП крови и, соответственно, нарушения обмена липидов, транспортируемых ЛП. Дислипопротеинемии проявляются чаще всего повышением концентрации либо одного типа ЛП, либо сочетанным увеличением содержания нескольких типов ЛП.

В настоящее время имеется несколько классификаций дислипопротеинемий. Основная классификация представлена в табл. 8-10.

Наиболее распространены нарушения обмена холестерола и триацилглицеролов.

Нарушения обмена холестерола чаще всего приводят к гиперхолестеролемии и последующему развитию атеросклероза. При атеросклерозе происходит образование на стенках артерий так называемых атеросклеротических бляшек, представляющих собой в основном отложения холестерола. Атеросклеротические бляшки разрушают клетки эндотелия сосудов, и в таких местах часто образуются тромбы. Атеросклероз — полигенное заболевание. Одна из основных причин развития атеросклероза — нарушение баланса между поступлением холестерола с пищей, его синтезом и выведением из организма. Выведение холестерола ограничено, не превышает 1,2—1,5 г/сут, а поступление с пищей при неправильном питании может превысить этот барьер, поэтому с возрастом постепенно происходит накопление холестерола в организме. Важным фактором развития атеросклероза являются генетические дефекты белков и ферментов, участвующих в обмене холестерола.

Гиперхолестеролемия. Роль алиментарных факторов в развитии гиперхолестеролемии

Концентрация холестерола в крови взрослых людей составляет 200±50 мг/дл (5,2±1,2 ммоль/л) и, как правило, увеличивается с возрастом. Превышение нормальной концентрации холестерола в крови называют гиперхолестеролемией.

Гиперхолестеролемия часто развивается вследствие избыточного поступления холестерола с пищей, а также углеводов и жиров. Гиперкалорийное питание — один из распространённых факторов развития гиперхолестеролемии, так как для синтеза холестерола необходимы только ацетил-КоА, АТФ и NADPH. Все эти субстраты образуются при окислении глюкозы и жирных кислот, поэтому избыточное поступление этих компонентов пищи способствует развитию гиперхолестеролемии. В норме поступление холестерола с пищей снижает синтез собственного холестерола в печени, однако с возрастом эффективность регуляции у многих людей снижается.

Таблица 8-10. Дислипопротеинемии

Тип и название дислипопротеинемии	Генетический дефект	Изменения липидного обмена
Тип I (наследственная недостаточность ЛП-липазы)	Дефект структуры ЛП-липазы Дефект структуры апоС-II	↑ в крови ХМ и ЛПОНП, нет риска атеросклероза, гипертриглицеролемия
Тип II (семейная гиперхолестеролемия)	Дефект рецепторов ЛПНП или мутация гена апоВ-100	↑ концентрации ЛПНП, гиперхолестеролемия, ранний атеросклероз, ксантоматоз
Тип III (семейная комбинированная гиперлипидемия, нарушение удаления остаточных липопротеинов из крови)	Дефект в структуре апоЕ, синтез изоформы апоЕ$_2$, которая не взаимодействует с рецепторами	↑ концентрации остаточных ХМ, ЛПОНП, ЛППП, ЛПНП Гиперхолестеролемия, гипертриглицеролемия, ранний атеросклероз, ксантоматоз
Типы IV и V (семейная гипертриглицеролемия)	Генетически гетерогенная группа заболеваний. Избыточная продукция ЛПОНП как результат гиперинсулинемии	↑ концентрации ЛПОНП, ЛПНП, гипертриглицеролемия, умеренная гиперхолестеролемия Атеросклероз, снижение толерантности к глюкозе, ксантоматоз

Правильное питание в течение всей жизни — важнейший фактор профилактики гиперхолестеролемии. Доказана корреляция между увеличением концентрации холестерола в плазме крови и смертностью от заболеваний ССС — инфаркта миокарда и инсульта, развивающихся в результате атеросклероза (рис. 8-74).

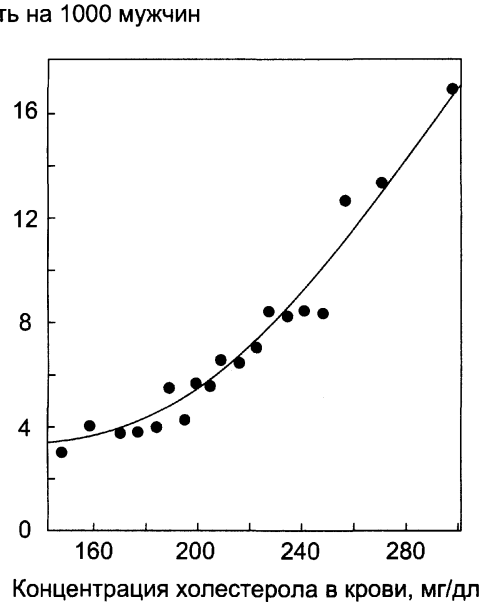


Рис. 8-74. Корреляция между концентрацией холестерола в крови и смертностью от заболеваний ССС на 1000 мужчин.

Ген рецептора ЛПНП: структура и типы мутаций

Наследственные факторы играют важную роль в предрасположенности к развитию атеросклероза. Наиболее часто встречаются мутации в структуре гена рецептора ЛПНП.

Ген рецептора ЛПНП находится в хромосоме 19 и состоит из 18 экзонов (рис. 8-75). Различные группы экзонов кодируют различные домены в составе этого белка. Мутации в этом гене подробно изучены и разделены на 4 класса.

Первый класс мутаций, наиболее распространённый, приводит к полному отсутствию рецептора; второй класс мутаций характеризуется тем, что рецептор синтезируется, но не может транспортироваться на поверхность клетки; третий класс мутаций соответствует ситуации, когда рецептор транспортируется на поверхность клеток, но не связывает ЛПНП; четвёртый класс мутаций — рецептор связывает ЛПНП, но не происходит эндоцитоз. Изменения структуры рецепторов ЛПНП в результате всех типов мутаций приводит к гиперхолестеролемии, так как ЛПНП не захватываются клетками, и холестерол в составе ЛПНП накапливается в крови.

Семейная гиперхолестеролемия

Любой дефект рецептора ЛПНП или белка апоВ-100, взаимодействующего с ним, приводит к развитию наиболее распространённого наследственного заболевания — семейной гиперхолестеролемии. Причиной этого аутосомно-доминантного заболевания выступают указанные выше мутации в гене рецептора ЛПНП. Гетерозиготы, имеющие один нормальный ген, а другой дефектный, встречаются с частотой 1:500 человек, у некоторых народностей Африки — даже 1:100 человек. Количество рецепторов ЛПНП на поверхности клеток у гетерозигот снижено вдвое, а концентрация холестерола в плазме, соответственно, вдвое повышается. У гетерозигот концентрация холестерола в крови в 35–40 лет достигает 400–500 мг/дл, что приводит к выраженному атеросклерозу и ранней смерти в результате инфаркта миокарда или инсульта. Гомозиготы встречаются редко — 1:1 000 000 человек. Концентрации холестерола и ЛПНП в крови таких больных уже в раннем детском возрасте увеличены в 5–6 раз. ЛПНП захватываются макрофагами путём фагоцитоза. Макрофаги, нагруженные избытком холестерола и других липидов, содержащихся в ЛПНП, откладываются в коже и даже сухожилиях, образуя так называемые ксантомы. Холестерол откладывается также и в стенках артерий, образуя атеросклеротические бляшки. Такие дети без экстренных мер лечения погибают в возрасте 5–6 лет. Лечение данной формы заболевания проводят путём удаления ЛПНП из крови с помощью плазмафереза, но наиболее радикальный метод лечения — трансплантация печени. Печень донора с нормальным количеством рецепторов ЛПНП существенно понижает концентрацию холестерола в крови и предотвращает раннюю смерть от атеросклероза.

Кроме генетических дефектов рецептора ЛПНП, причинами гиперхолестеролемии и, следовательно, атеросклероза являются наследственные дефекты в структуре апоВ-100, а так-

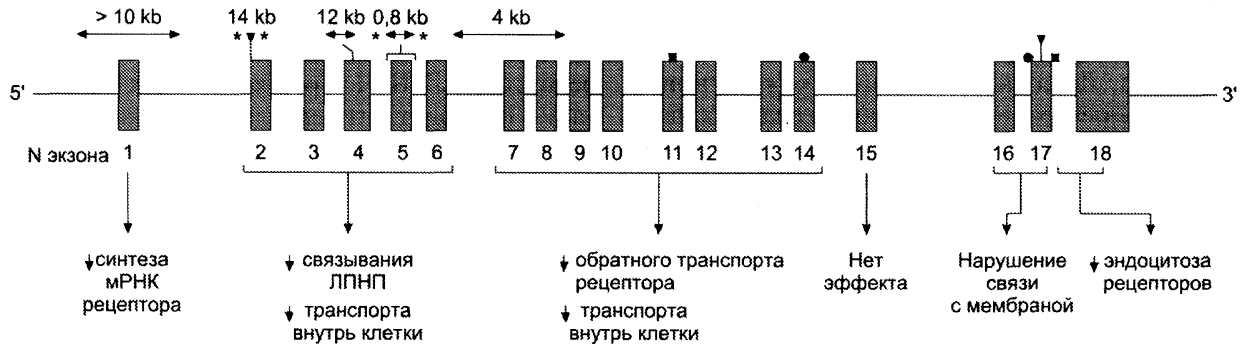


Рис. 8-75. Типы мутаций в гене белка-рецептора ЛПНП. Экзоны представлены тёмными прямоугольниками, интроны — линиями, соединяющими экзоны. На рисунке показаны типы мутаций: ↔ — делеция, • — нонсенс-мутация, ■ — миссенс-мутация; kb — тысячи оснований.

же повышенные синтез или секреция апоВ-100 в случае семейной комбинированной гиперлипидемии, при которой в крови повышены концентрации и холестерола и триацилглицеролов.

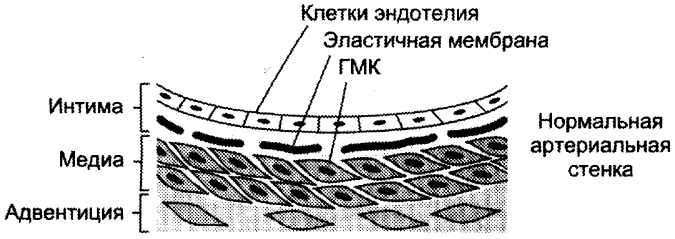
Химическая модификация липидов и белков ЛПНП и рецепторов ЛПНП

Изменение нормальной структуры липидов и белков в составе ЛПНП делает их чужеродными для организма и поэтому более доступными для захвата фагоцитами. Например, активация свободнорадикального окисления липидов приводит к изменению не только структуры липидов в липопротеинах, но и структуры апоВ-100. Другим фактором, изменяющим структуру как ЛПНП, так и рецептора ЛПНП, является неферментативное гликозилирование белков, происходящее при увеличении концентрации глюкозы в крови при сахарном диабете. Модифицированные ЛПНП поглощаются макрофагами с участием «скевенджер-рецепторов» (рецепторов-мусорщиков).

Молекулярные механизмы патогенеза атеросклероза

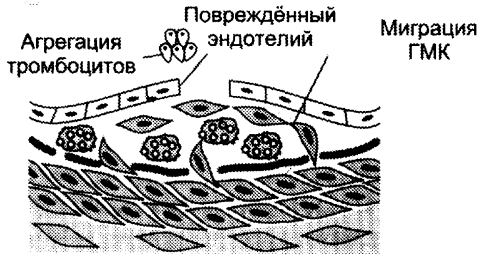
Развитие атеросклероза проходит несколько стадий (рис. 8-76).

Процесс начинается с повреждения эндотелия сосудов, причём повреждение может иметь различные механизмы. Важнейший механизм — повреждение эндотелия за счёт изменённой структуры ЛПНП, например в результате активации свободнорадикального ПОЛ в составе ЛПНП; повреждение провоцируется свободными радикалами, образующимися в процессе метаболизма или поступающими извне. В ходе ПОЛ в ЛПНП изменяется не только структура самих липидов, но и нарушается структура апопротеинов. Окисленные ЛПНП захватываются макрофагами через скевенджер-рецепторы. Этот процесс не регулируется количеством поглощённого холестерола, как в случае его поступления в клетки через специфические рецепторы, поэтому макрофаги перегружаются холестеролом и превращаются в «пенистые клетки», которые проникают в субэндотелиальное пространство. Это приводит к образованию жировых полосок в стенке кровеносных сосудов. На этой стадии эндотелий сосудов может сохранять свою структуру. При увеличении количества «пенистых клеток» происходит повреждение эндотелия сосудов. В норме клетки эндотелия секретируют простагландин I_2 (простациклин I_2), который ингибирует агрегацию тромбоцитов. При повреждении клеток эндотелия тромбоциты активируются. Во-первых, они секретируют тромбоксан A_2 (ТХ A_2), который стимулирует агрегацию тромбоцитов, что может привести к образованию тромба в области атеросклеротической бляшки; во-вторых, тромбоциты начинают продуцировать пептид — тромбоцитарный фактор роста, стимулирующий пролиферацию ГМК. ГМК мигрируют из медиального слоя во внутренний слой артериальной стенки и способствуют таким образом росту бляшки. Далее происходит прорастание бляшки фиброзной тканью (коллагеном,

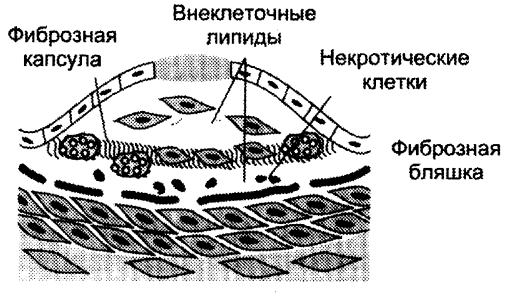


Нормальная стенка артерии

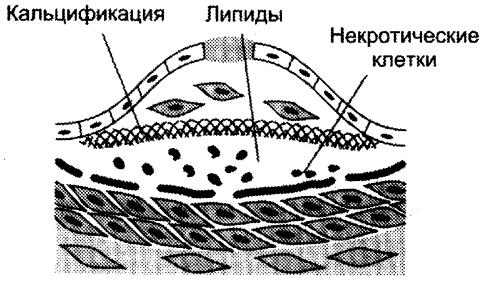
Формирование жировых полосок. "Пенистые клетки", содержащие большое количество холестерола, проходят под слой эндотелия. Повреждение эндотелия происходит не всегда.



Пролиферация и миграция клеток гладкой мускулатуры 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. 8-76. Развитие атеросклеротической бляшки в клетках эндотелия кровеносных сосудов.

эластином); клетки под фиброзной оболочкой некротизируются, а холестерол откладывается в межклеточном пространстве. На этой стадии в центре бляшки образуются даже холестериновые кристаллы. На последних стадиях развития бляшка пропитывается солями кальция и становится очень плотной. В области бляшки часто образуются тромбы, перекрывающие просвет сосуда, что приводит к острому нарушению кровообращения в соответствующем участке ткани и развитию инфаркта. Чаще всего атеросклеротические бляшки развиваются в артериях миокарда, поэтому наиболее распространённое заболевание, развивающееся в результате атеросклероза, — инфаркт миокарда.

Биохимические основы лечения атеросклероза и предупреждения развития инфаркта миокарда

Важным лечебным фактором, снижающим риск развития гиперхолестеролемии и атеросклероза, является гипокалорийная и гипохолестериновая диета. Поступление холестерола с пищей не должно превышать 300 мг/сут (табл. 8-11).

Холестерол — стероид животного происхождения, поэтому он поступает в организм при употреблении животных жиров и жирного мяса. Растительная пища не содержит холестерола, поэтому у людей среднего и старшего возраста она должна составлять основу рациона.

К лечебным и профилактическим факторам относят обогащение пищи полиеновыми жирными кислотами семейства ω-3, уменьшающими риск тромбообразования. Ненасыщенные жирные кислоты способствуют более быстрому выведению холестерола из организма, хотя механизм этого явления до конца не выяснен. В то же время доказано, что полиеновые кислоты подавляют синтез тромбоцитарного фактора роста и таким образом замедляют развитие атеросклеротической бляшки.

Витамины С, Е, А, обладающие антиоксидантными свойствами, ингибируют перекисное (свободнорадикальное) окисление липидов в ЛПНП и поддерживают нормальную структуру липидов ЛПНП и их метаболизм.

Однако меры по исправлению диеты недостаточны при лечении выраженной гиперхолестеролемии и атеросклерозе. Лечение гиперхолестеролемии, как правило, комплексное.

Один из принципов лечения — «размыкание» цикла энтерогепатической циркуляции жёлчных кислот. Для этого используют лекарства типа холестирамина — полимера, который в кишечнике адсорбирует жёлчные кислоты, выделяется с фекалиями и таким образом уменьшает возврат жёлчных кислот в печень. В печени увеличивается

Таблица 8-11. Основы диеты, снижающей количество холестерола и жиров в организме человека

Проводимое вмешательство	Количество холестерола и жиров	Источники питания
Снижение потребления общего количества жиров	<30% суточной энергии	Уменьшить потребление масла, маргарина, цельного молока, мороженого, жирных сыров, жирного мяса, шоколада
Снижение насыщенных жиров	<7–10%	
Использование пищи с высоким содержанием белка		Рыба, цыплята и индейка (без шкурки), телятина
Использование сложных углеводов, клетчатки, содержащейся во фруктах и овощах	~ 35–40 г/сут клетчатки и пектинов растений	Фрукты, овощи, бобы и соя, неочищенные зерновые продукты
Снижение холестерина в пище	<300 мг/день	Не более 2 яиц в неделю, печень 2 раза в месяц
Умеренное увеличение использования масел, содержащих полиеновые жирные кислоты	Мононенасыщенные (10–15% энергии) Полиненасыщенные (7–10% энергии)	Подсолнечное, кукурузное, оливковое масло

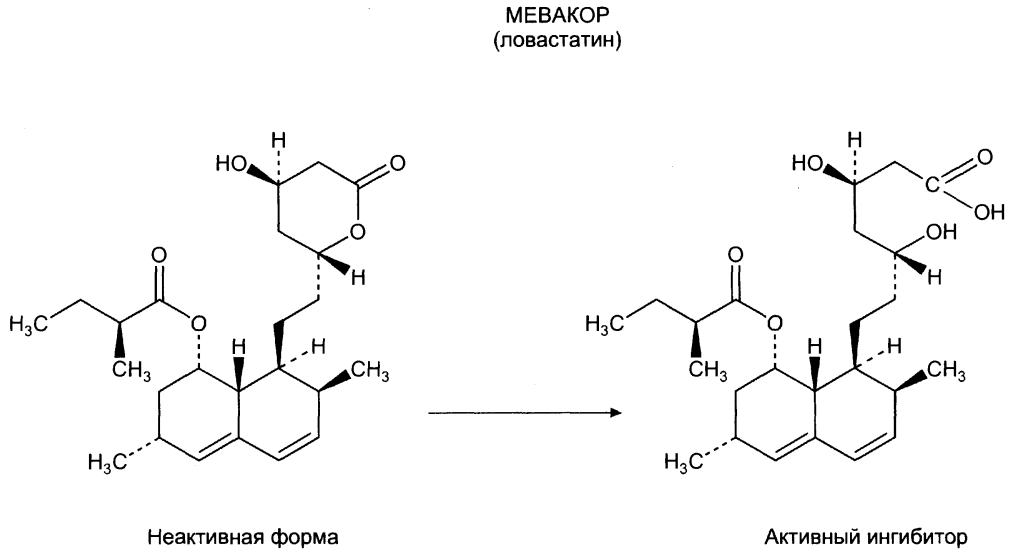


Рис. 8-77. Образование активной формы мевакора.

захват холестерола из крови для синтеза новых жёлчных кислот. Препараты типа холестирамина называют секвестрантами жёлчных кислот.

Наиболее эффективные препараты, применяемые при лечении атеросклероза, — ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы. Эти препараты — антибиотики, например мевакор, в печени трансформируются в активную форму (рис. 8-77) и эффективно ингибируют регуляторный фермент биосинтеза холестерола. Такие препараты могут практически полностью подавить синтез собственного холестерола в организме. В этих условиях печень увеличивает захват холестерола из крови. Для этого в клетках печени почти вдвое увеличивается синтез белков-рецепторов ЛПНП и, соответственно, увеличивается захват ЛПНП из крови. Таким образом концентрация холестерола в крови даже у больных с гетерозиготной формой семейной гиперхолестеролемии может быть доведена практически до нормы.

Лекарственные препараты — фибраты (клофибрат, фенофибрат) — ускоряют катаболизм ЛПОНП, активируя ЛП-липазу. Эти препараты также активируют окисление жирных кислот в печени, уменьшая тем самым синтез триацилглицеролов и эфиров холестерола и, как следствие, секрецию ЛПОНП печенью. Клофибрат индуцирует синтез ферментов пероксисом, способных окислять жирные кислоты. Фибраты обычно применяют при сочетании гипертриглицеролемии и гиперхолестеролемии. Для эффективного лечения атеросклероза применяют, как правило, комбинированное воздействие нескольких лекарственных препаратов.

РАЗДЕЛ 9

ОБМЕН И ФУНКЦИИ АМИНОКИСЛОТ

Значение аминокислот для организма в первую очередь определяется тем, что они используются для синтеза белков, метаболизм которых занимает особое место в процессах обмена веществ между организмом и внешней средой. Объясняется это тем, что белки входят во все основные структурные компоненты клеток, тканей и органов тела человека и животных, выполняют ферментативные функции, участвуют в переносе веществ через мембраны и т.д. Важную роль в координации работы всех систем клеток играют белковые гормоны.

Аминокислоты непосредственно участвуют в биосинтезе не только белков, но и большого количества других биологически активных соединений, регулирующих процессы обмена веществ в организме, таких как нейромедиаторы и гормоны — производные аминокислот. Аминокислоты служат донорами азота при синтезе всех азотсодержащих небелковых соединений, в том числе нуклеотидов, гема, креатина, холина и других веществ.

Катаболизм аминокислот может служить источником энергии для синтеза АТФ. Энергетическая функция аминокислот становится значимой при голодании, некоторых патологических состояниях (сахарный диабет и др.) и преимущественно белковом питании. Именно обмен аминокислот осуществляет взаимосвязь многообразных химических превращений в живом организме.

I. ИСТОЧНИКИ И ПУТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ В КЛЕТКАХ

Фонд свободных аминокислот организма составляет примерно 35 г. Содержание свободных аминокислот в крови в среднем равно 35–65 мг/дл. Большая часть аминокислот входит в состав белков, количество которых в организме взрослого человека нормального телосложения составляет примерно 15 кг.

Источники свободных аминокислот в клетках — белки пищи, собственные белки тканей и синтез аминокислот из углеводов. Многие клетки, за исключением высокоспециализированных (например, эритроцитов), используют аминокислоты для синтеза белков, а также большого количества других веществ: фосфолипидов мембран, гема, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, биогенных аминов (катехоламинов, гистамина) и других соединений (рис. 9-1).

Какой-либо специальной формы депонирования аминокислот, подобно глюкозе (в виде гликогена) или жирных кислот (в виде триацилглицеролов), не существует. Поэтому резервом аминокислот могут служить все функциональные и структурные белки тканей, но преимущественно белки мышц, поскольку их больше, чем всех остальных.

В организме человека в сутки распадается на аминокислоты около 400 г белков, примерно такое же количество синтезируется. Поэтому тканевые белки не могут восполнять затраты аминокислот при их катаболизме и использовании на синтез других веществ. Первичными источниками аминокислот не могут служить и углеводы, так как из них синтезируются только углеродная часть молекулы большинства аминокислот, а аминогруппа поступает от других аминокислот. Следовательно, основным источником аминокислот организма служат **белки пищи**.

II. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ БЕЛКОВ

A. Азотистый баланс

Аминокислоты (свободные и в составе белков) содержат почти 95% всего азота, поэтому именно они поддерживают азотистый баланс организма. **Азотистый баланс** — разница между количеством азота, поступающего с пищей, и количеством выделяемого азота (преимущественно в виде мочевины и аммонийных солей). Если количество поступающего азота равно количеству выделяемого, то наступает **азотистое равновесие**. Такое состояние бывает у здорового человека при нормальном питании. Азотистый баланс может быть положительным (азота поступает больше, чем выводится) у детей, а также у пациентов, выздоравливающих после тяжёлых болезней. Отрицательный азотистый баланс (выделе-

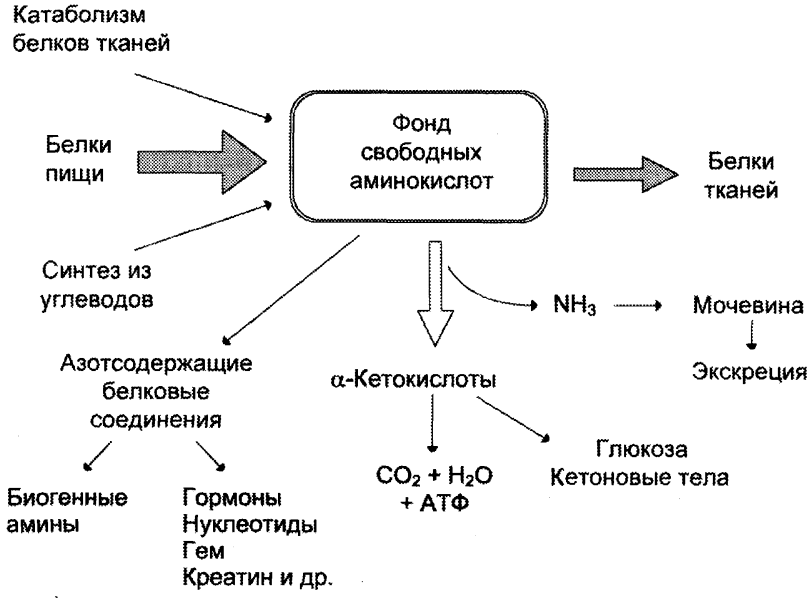


Рис. 9-1. Источники и пути использования аминокислот.

ние азота преобладает над его поступлением) наблюдают при старении, голодании и во время тяжёлых заболеваний.

При безбелковой диете азотистый баланс становится отрицательным. Соблюдение подобной диеты в течение недели приводит к тому, что количество выделяемого азота перестаёт увеличиваться и стабилизируется примерно на величине 4 г/сут. Такое количество азота содержится в 25 г белка. Значит, при белковом голодании в сутки в организме расходуется около 25 г собственных белков тканей. Минимальное количество белков в пище, необходимое для поддержания азотистого равновесия, соответствует 30–50 г/сут, оптимальное же количество при средней физической нагрузке составляет ~100–120 г/сут.

Б. Полноценность белкового питания

В ходе эволюции человек утратил способность синтезировать почти половину из двадцати аминокислот, входящих в состав белков. К их числу относят те аминокислоты, синтез которых включает много стадий и требует большого количества ферментов, кодируемых многими генами. Следовательно, те аминокислоты, синтез которых сложен и неэкономичен для организма, очевидно, выгоднее получать с пищей. Такие аминокислоты называют незаменимыми. К ним относят фенилаланин, метионин, треонин, триптофан, валин, лизин, лейцин, изолейцин.

Две аминокислоты — аргинин и гистидин — у взрослых образуются в достаточных количествах, однако детям для нормального роста организма необходимо дополнительное поступление этих аминокислот с пищей. Поэтому их называют частично заменимыми. Две другие аминокислоты — тирозин и цистеин — условно заменимые, так как для их синтеза необходимы незаменимые аминокислоты. Тирозин синтезируется из фенилаланина, а для образования цистеина необходим атом серы метионина.

Остальные аминокислоты легко синтезируются в клетках и называются заменимыми. К ним относят глицин, аспарагиновую кислоту, аспарагин, глутаминовую кислоту, глутамин, серин, пролин, аланин.

Как было показано выше, основным источником аминокислот для клеток организма являются белки пищи. В различных пищевых продуктах содержание белка колеблется в широких пределах (табл. 9-1).

Таблица 9-1. Количество белка в некоторых пищевых продуктах

Название продукта	Содержание белка, %
Мясо	18–22
Рыба	17–20
Сыр	20–36
Молоко	3,5
Рис	8,0
Горох	26
Соя	35
Картофель	1,5–2,0
Капуста	1,1–1,6
Морковь	0,8–1,0
Яблоки	0,3–0,4

Из таблицы видно, что распространённые продукты растительного происхождения содержат мало белка (кроме гороха и сои). Наиболее богаты белками продукты животного происхождения (мясо, рыба, сыр). Белки не являются незаменимыми пищевыми факторами, они являются источниками содержащихся в них незаменимых аминокислот, необходимых для нормального питания.

Питательная ценность белка зависит от его аминокислотного состава и способности усваиваться организмом. Белки значительно различаются по аминокислотному составу. Некоторые их них содержат полный набор незаменимых аминокислот в оптимальных соотношениях, другие не содержат одной или нескольких незаменимых аминокислот. Растительные белки, особенно пшеницы и других злаковых, полностью не перевариваются, так как защищены оболочкой, состоящей из целлюлозы и других полисахаридов, которые не гидролизуются пищеварительными ферментами. Некоторые белки по аминокислотному составу близки к белкам тела человека, но не используются в качестве пищевых, так как имеют фибриллярное строение, малорастворимы и не расщепляются протеазами ЖКТ. К ним относят белки волос, шерсти, перьев и другие. Если белок содержит все незаменимые аминокислоты в необходимых пропорциях и легко подвергается

действию протеаз, то **биологическая ценность** такого белка условно принимается за 100, и он считается полноценным. К таким относят белки яиц и молока. Белки мяса говядины имеют биологическую ценность 98. Растительные белки по биологической ценности уступают животным, так как труднее перевариваются и бедны лизином, метионином и триптофаном. Однако при определённой комбинации растительных белков организм можно обеспечить полной и сбалансированной смесью аминокислот. Так, белки кукурузы (биологическая ценность — 36) содержат мало лизина, но достаточное количество триптофана. А белки бобов богаты лизином, но содержат мало триптофана. Каждый из этих белков в отдельности является неполноценным. Однако смесь бобов и кукурузы содержит необходимое человеку количество незаменимых аминокислот.

В. Нормы белка в питании

Для поддержания азотистого равновесия достаточно употреблять 30—50 г белков в сутки. Однако такое количество не обеспечивает сохранения работоспособности и здоровья человека. Принятые нормы белкового питания для взрослых и детей учитывают климатические условия, профессию, условия труда и другие факторы. Взрослый человек при средней физической нагрузке должен получать 100—120 г белков в сутки. При тяжёлой физической работе эта норма увеличивается до 130—150 г. Детям до 12 лет достаточно 50—70 г белков в сутки. При этом подразумевается, что в пищу входят разнообразные белки животного и растительного происхождения.

Г. Белковая недостаточность

Известно, что даже длительное исключение из рациона человека жиров или углеводов не вызывает тяжёлых расстройств здоровья. Однако безбелковое питание (особенно продолжительное) вызывает серьёзные нарушения обмена и неизбежно заканчивается гибелью организма. Исключение даже одной незаменимой аминокислоты из пищевого рациона ведёт к неполному усвоению других аминокислот и сопровождается развитием отрицательного азотистого баланса, истощением, остановкой роста и нарушениями функций нервной системы.

Конкретные проявления недостаточности одной из аминокислот были выявлены у крыс, которым скармливали белки, лишённые определённой аминокислоты. Так, при отсутствии цистеина (или цистина) возникал острый некроз печени, гистидина — катаракта; отсутствие метионина приводило к анемии, ожирению и циррозу печени, облысению и геморрагии в почках. Исключение лизина из рациона молодых крыс сопровождалось анемией и внезапной гибелью (этот синдром отсутствовал у взрослых животных).

Недостаточность белкового питания приводит к заболеванию, получившему в Центральной Африке название «квашиоркор», что в переводе означает «золотой (или красный) мальчик». В настоящее время это название часто используют и в других частях света при сходных симптомах. Заболевание развивается у детей, которые лишены молока и других животных белков, а питаются исключительно растительной пищей, включающей бананы, таро, просо и, чаще всего, кукурузу. Квашиоркор характеризуется задержкой роста, анемией, гипопротеинемией (часто сопровождающейся отёками), жировым перерождением печени. У лиц негроидной расы волосы приобретают красно-коричневый оттенок. Часто это заболевание сопровождается атрофией клеток поджелудочной железы. В результате нарушается секреция панкреатических ферментов и не усваивается даже то небольшое количество белков, которое поступает с пищей. Происходит поражение почек, вследствие чего резко увеличивается экскреция свободных аминокислот с мочой. Без лечения смертность детей составляет 50—90%. Даже если дети выживают, длительная недостаточность белка приводит к необратимым нарушениям не только физиологических функций, но и умственных способностей. Заболевание исчезает при своевременном переводе больного на богатую белком диету, включающую большие количества мясных и молочных продуктов. Один из путей решения проблемы — добавление в пищу препаратов лизина.

III. ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКОВ

В пищевых продуктах содержание свободных аминокислот очень мало. Подавляющее их количество входит в состав белков, которые гидроли-

зуются в ЖКТ под действием ферментов протеаз (пептидгидролаз). Субстратная специфичность этих ферментов заключается в том, что каждый из них с наибольшей скоростью расщепляет пептидные связи, образованные определёнными аминокислотами. Протеазы, гидролизующие пептидные связи внутри белковой молекулы, относят к группе эндопептидаз. Ферменты, относящиеся к группе экзопептидаз, гидролизуют пептидную связь, образованную концевыми аминокислотами. Под действием всех протеаз ЖКТ белки пищи распадаются на отдельные аминокислоты, которые затем поступают в клетки тканей.

А. Переваривание белков в желудке

Желудочный сок — продукт нескольких типов клеток. Обкладочные (париетальные) клетки стенок желудка образуют соляную кислоту, главные клетки секретируют пепсиноген. Добавочные и другие клетки эпителия желудка выделяют муцинсодержащую слизь. Париетальные клетки секретируют в полость желудка также гликопротеин, который называют «внутренним фактором» (фактором Касла). Этот белок связывает «внешний фактор» — витамин B_{12}, предотвращает его разрушение и способствует всасыванию.

1. Образование и роль соляной кислоты

Основная пищеварительная функция желудка заключается в том, что в нём начинается переваривание белка. Существенную роль в этом процессе играет соляная кислота. Белки, поступающие в желудок, стимулируют выделение **гистамина** и группы белковых гормонов — **гастринов** (см. раздел 11), которые, в свою очередь, вызывают секрецию HCl и профермента — пепсиногена. HCl образуется в обкладочных клетках желудочных желёз в ходе реакций, представленных на рис. 9-2.

Источником H^+ является H_2CO_3, которая образуется в обкладочных клетках желудка из CO_2, диффундирующего из крови, и H_2O под действием фермента карбоангидразы (карбонатдегидратазы):

$$H_2O + CO_2 \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow HCO_3^- + H^+.$$

Диссоциация H_2CO_3 приводит к образованию бикарбоната, который с участием специальных белков выделяется в плазму в обмен на Cl^-, и ионов H^+, которые поступают в просвет желудка путём активного транспорта, катализируемого мембранной H^+/K^+-АТФ-азой. При этом концентрация протонов в просвете желудка увеличивается в 10^6 раз. Ионы Cl^- поступают в просвет желудка через хлоридный канал.

Концентрация HCl в желудочном соке может достигать 0,16 М, за счёт чего значение pH снижается до 1,0–2,0. Приём белковой пищи часто сопровождается выделением щелочной мочи за счёт секреции большого количества бикарбоната в процессе образования HCl.

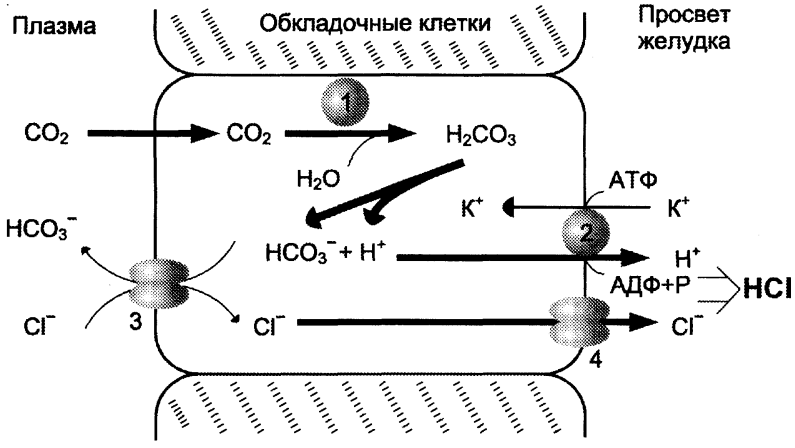


Рис. 9-2. Секреция соляной кислоты в желудке. 1 — карбоангидраза; 2 — H^+/K^+- АТФ-аза; 3 — белки-переносчики анионов; 4 — хлоридный канал.

Под действием HCl происходит денатурация белков пищи, не подвергшихся термической обработке, что увеличивает доступность пептидных связей для протеаз. HCl обладает бактерицидным действием и препятствует попаданию патогенных бактерий в кишечник. Кроме того, соляная кислота активирует пепсиноген и создаёт оптимум pH для действия пепсина.

2. Механизм активации пепсина

Под действием гастринов в главных клетках желудочных желёз стимулируются синтез и секреция пепсиногена — неактивной формы пепсина. Пепсиноген — белок, состоящий из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 40 кД. Под действием HCl он превращается в активный пепсин (молекулярная масса 32,7 кД) с оптимумом pH 1,0–2,5. В процессе активации в результате частичного протеолиза от N-конца молекулы пепсиногена отщепляются 42 аминокислотных остатка, которые содержат почти все положительно заряженные аминокислоты, имеющиеся в пепсиногене. Таким образом, в активном пепсине преобладающими оказываются отрицательно заряженные аминокислоты, которые участвуют в конформационных перестройках молекулы и формировании активного центра. Образовавшиеся под действием HCl активные молекулы пепсина быстро активируют остальные молекулы пепсиногена (аутокатализ). Пепсин в первую очередь гидролизует пептидные связи в белках, образованные ароматическими аминокислотами (фенилаланин, триптофан, тирозин) и несколько медленнее — образованные лейцином и дикарбоновыми аминокислотами. Пепсин — эндопептидаза, поэтому в результате его действия в желудке образуются более короткие пептиды, но не свободные аминокислоты.

3. Возрастные особенности переваривания белков в желудке

У детей грудного возраста в желудке находится фермент **реннин** (химозин) , вызывающий свёртывание молока. Основной белок молока — казеин, представляющий смесь нескольких белков, различающихся по аминокислотному составу и электрофоретической подвижности. Реннин катализирует отщепление от казеина гликопептида, в результате чего образуется параказеин. Параказеин присоединяет ионы Ca^{2+}, образуя нерастворимый сгусток, чем предотвращает быстрый выход молока из желудка. Белки успевают расщепиться под действием пепсина. В желудке взрослых людей реннина нет, молоко у них створаживается под действием HCl и пепсина.

В слизистой оболочке желудка человека найдена ещё одна протеаза — **гастриксин**. Все 3 фермента (пепсин, реннин и гастриксин) сходны по первичной структуре, что указывает на их происхождение от общего гена-предшественника.

4. Нарушения переваривания белков в желудке

При различных заболеваниях ЖКТ в желудке нарушается выделение HCl и пепсиногена, при этом переваривание белков заметно снижается. Наиболее часто встречаются патологические изменения кислотности желудочного сока. Нарушение образования пепсина отмечают реже и выявляют при более значительных поражениях желудка.

Определение кислотности желудочного сока используют для диагностики различных заболеваний желудка (табл. 9-2). **Повышенная кислотность** желудочного сока обычно сопровождается изжогой, диареей и может быть симптомом язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, а также гиперацидного гастрита. **Пониженная кислотность** бывает при некоторых видах гастритов. Полное отсутствие HCl и пепсина (желудочная ахилия) наблюдается при атрофических гастритах и часто сопровождается пернициозной анемией вследствие недостаточности выработки фактора Кастла и нарушения всасывания витамина B_{12} (см. раздел 3). **Анацидность** (pH желудочного сока >6,0) свидетельствует о значительной потере слизистой оболочкой желудка обкладочных клеток, секретирующих соляную кислоту, что часто вызывает рак желудка.

Кислотность желудочного сока выражается в титрационных единицах (ТЕ) — количество 0,1 М NaOH в 1 мл, затраченное на титрование 100 мл желудочного сока по определённому индикатору. При определении кислотности желудочного сока различают: общую кислотность, связанную HCl и свободную HCl.

Общая кислотность желудочного сока — совокупность всех кислотореагирующих веществ желудочного сока, представляет собой секрет желудка, собираемый в течение 1 ч. Зна-

Таблица 9-2. Компоненты желудочного сока в норме и при патологических состояниях

Состояние	pH	Кислотность (ТЕ)			Пепсин	Фактор Касла	Молочная кислота	Кровь
		общая	связанная HCl	свободная HCl				
Норма	1,5–2,0	40–60	20–30	20–40	+	+	–	–
Гиперацидный гастрит	1,0	80		40	+	±	–	–
Гипоацидный гастрит	2,5	40		20	±	±	±	–
Ахилия	7,0	20		–	–	–	+	–
Язва желудка	1,5	60		40	+	+	–	+
Рак желудка	6,0 и >	40–60		20	+	+	+	+

чения общей кислотности в норме составляют 40–60 ТЕ.

Связанная соляная кислота — HCl, связанная с белками и продуктами их переваривания. Значения связанной HCl у здоровых людей — 20–30 ТЕ.

Свободная HCl — соляная кислота, не связанная с компонентами желудочного сока. Значения свободной HCl в норме — 20–40 ТЕ.

pH желудочного сока в норме — 1,5–2,0.

Молочная кислота в норме в желудочном соке отсутствует. Она образуется при уменьшении содержания или отсутствии свободной соляной кислоты в результате размножения молочнокислых бактерий или при злокачественных опухолях желудка, в клетках которых глюкоза окисляется анаэробным путём.

При диагностике заболеваний желудка, кроме биохимических анализов, обязательно проводят рентгенологические и эндоскопические исследования, а также биопсию.

Б. Переваривание белков в кишечнике

Желудочное содержимое (химус) в процессе переваривания поступает в двенадцатиперстную кишку. Низкое значение pH химуса вызывает в кишечнике выделение белкового гормона секретина, поступающего в кровь. Этот гормон в свою очередь стимулирует выделение из поджелудочной железы в тонкий кишечник панкреатического сока, содержащего HCO_3^-, что приводит к нейтрализации HCl желудочного сока и ингибированию пепсина. В результате pH резко возрастает от 1,5–2,0 до ~7,0.

Поступление пептидов в тонкий кишечник вызывает секрецию другого белкового гормона — холецистокинина (см. раздел 11), который стимулирует выделение панкреатических ферментов с оптимумом pH 7,5–8,0. Под действием ферментов поджелудочной железы и клеток кишечника завершается переваривание белков.

1. Активация панкреатических ферментов

В поджелудочной железе синтезируются проферменты ряда протеаз: трипсиноген, химотрипсиноген, проэластаза, прокарбоксипептидазы А и В. В кишечнике они путём частичного протеолиза превращаются в активные ферменты трипсин, химотрипсин, эластазу и карбоксипептидазы А и В.

Активация трипсиногена происходит под действием фермента эпителия кишечника энтеро-

пептидазы. Этот фермент отщепляет с N-конца молекулы трипсиногена гексапептид Вал-$(Асп)_4$-Лиз. Изменение конформации оставшейся части полипептидной цепи приводит к формированию активного центра, и образуется активный трипсин. Последовательность Вал-$(Асп)_4$-Лиз присуща большинству известных трипсиногенов разных организмов — от рыб до человека.

Образовавшийся трипсин **активирует химотрипсиноген**, из которого получается несколько активных ферментов (рис. 9-3). Химотрипсиноген состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 245 аминокислотных остатков и пяти дисульфидных мостиков. Под действием трипсина расщепляется пептидная связь между 15-й и 16-й аминокислотами, в результате чего образуется активный π-химотрипсин. Затем под действием π-химотрипсина отщепляется дипептид сер(14)-арг(15), что приводит к образованию δ-химотрипсина. Отщепление дипептида тре(147)-арг(148) завершает образование стабильной формы активного фермента — α-химотрипсина, который состоит из трёх полипептидных цепей, соединённых дисульфидными мостиками.

Остальные проферменты панкреатических протеаз (проэластаза и прокарбоксипептидазы А и В) также активируются трипсином путём частичного протеолиза. В результате образуются активные ферменты — эластаза и карбоксипептидазы А и В.

2. Специфичность действия протеаз

Трипсин преимущественно гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами аргинина и лизина. Химотрипсины наиболее активны в отношении пептидных связей, образованных карбоксильными группами ароматических аминокислот (Фен, Тир, Три).

Карбоксипептидазы А и В — цинксодержащие ферменты, отщепляют С-концевые остатки аминокислот. Причём карбоксипептидаза А

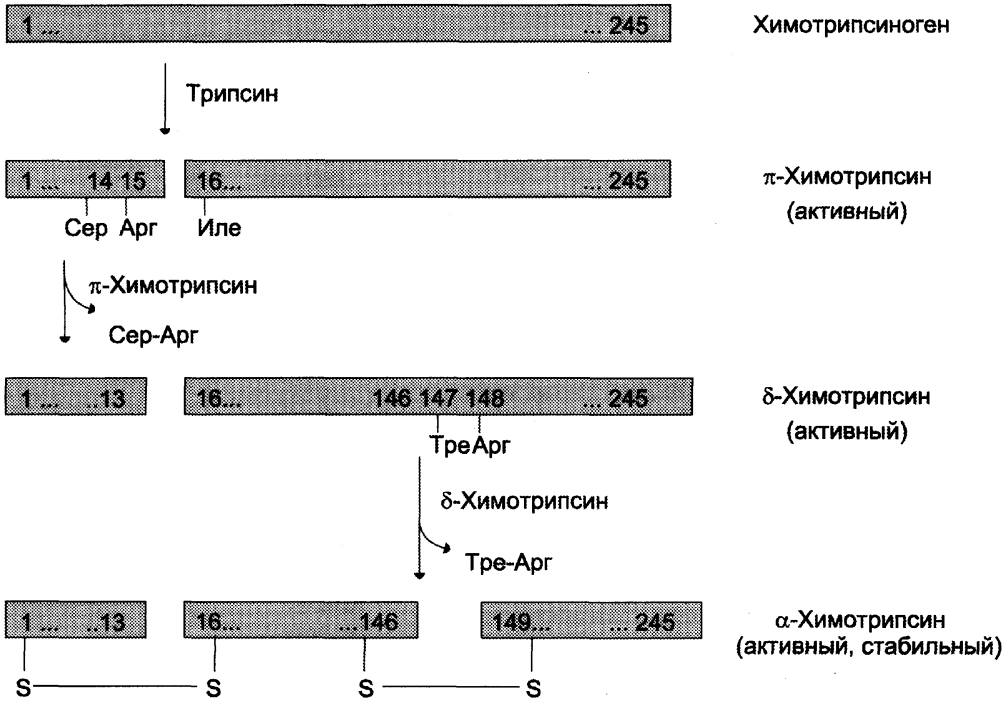


Рис. 9-3. Активация химотрипсиногена. Молекула химотрипсиногена состоит из 245 аминокислотных остатков и имеет пять дисульфидных мостиков. На схеме показаны участки фермента, подвергающиеся протеолизу. а-Химотрипсин — активная стабильная форма фермента — состоит из трёх полипептидных цепей, ковалентно связанных между собой двумя дисульфидными мостиками и нековалентно — за счёт водородных связей и гидрофобных взаимодействий.

отщепляет преимущественно аминокислоты, содержащие ароматические или гидрофобные радикалы, а карбоксипептидаза В — остатки аргинина и лизина.

Последний этап переваривания — гидролиз небольших пептидов, происходит под действием ферментов аминопептидаз и дипептидаз, которые синтезируются клетками тонкого кишечника в активной форме.

Аминопептидазы последовательно отщепляют N-концевые аминокислоты пептидной цепи. Наиболее известна лейцинаминопептидаза — Zn^{2+}- или Mn^{2+}-содержащий фермент, несмотря на название, обладающий широкой специфичностью по отношению к N-концевым аминокислотам.

Дипептидазы расщепляют дипептиды на аминокислоты, но не действуют на трипептиды.

В результате последовательного действия всех пищеварительных протеаз большинство пищевых белков расщепляется до свободных аминокислот.

В. Защита клеток от действия протеаз

Клетки поджелудочной железы защищены от действия пищеварительных ферментов тем, что:

- эти ферменты **образуются в виде неактивных предшественников** в клетках поджелудочной железы и активируются только после секреции в просвет кишечника. Таким образом, место синтеза и место действия этих ферментов пространственно разделены.
- в клетках поджелудочной железы присутствует **белок-ингибитор трипсина**, образующий с активной формой фермента (в случае преждевременной активации) прочный комплекс.

В полости желудка и кишечника протеазы не контактируют с белками клеток, поскольку слизистая оболочка покрыта слоем слизи, а каждая клетка содержит на наружной поверхности плазматической мембраны полисахариды, которые не расщепляются протеазами и тем самым защищают клетку от их действия.

Разрушение клеточных белков протеазами происходит при язвенной болезни желудка или двенадцатиперстной кишки. Однако начальные механизмы возникновения язвы ещё мало изучены.

Г. Транспорт аминокислот в клетки

Аминокислоты, образовавшиеся при переваривании белков, быстро всасываются в кишечнике. Транспорт их осуществляется двумя путями: через воротную систему печени, ведущую прямо в печень, и по лимфатическим сосудам, сообщающимся с кровью через грудной лимфатический проток. Максимальная концентрация аминокислот в крови достигается через 30–50 мин после приёма белковой пищи (углеводы и жиры замедляют всасывание аминокислот). Всасывание L-аминокислот (но не D-изомеров) — активный процесс, требующий затраты энергии. Аминокислоты переносятся через кишечную стенку от слизистой её поверхности в кровь (рис. 9-4). Перенос через щёточную кайму осуществляется целым рядом переносчиков, многие из которых действуют при участии Na^+-зависимых механизмов симпорта, подобно переносу глюкозы (см. раздел 7).

Различная скорость проникновения аминокислот через мембраны клеток указывает на наличие транспортных систем, обеспечивающих перенос аминокислот как через внешнюю плазматическую мембрану, так и через внутриклеточные мембраны. В настоящее время известно по крайней мере пять специфических транспортных систем, каждая из которых функциониру-

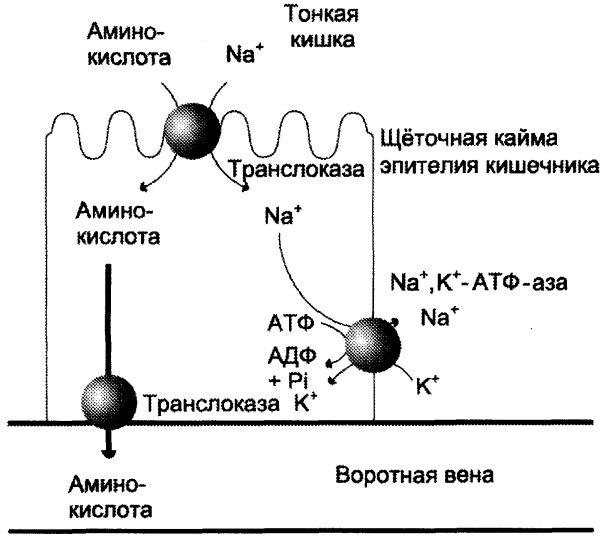


Рис. 9-4. Механизм всасывания аминокислот в кишечнике. L-аминокислота поступает в энтероцит путём симпорта с ионом Na^+. Далее специфическая транслоказа переносит аминокислоту через мембрану в кровь. Обмен ионов натрия между клетками осуществляется путём первично-активного транспорта с помощью Na^+,K^+-АТФ-азы.

ет для переноса определённой группы близких по строению аминокислот:

- нейтральных, с короткой боковой цепью (аланин, серин, треонин);
- нейтральных, с длинной или разветвлённой боковой цепью (валин, лейцин, изолейцин);
- с катионными радикалами (лизин, аргинин);
- с анионными радикалами (глутаминовая и аспарагиновая кислоты);
- иминокислот (пролин, оксипролин).

Причём к числу Na^+-зависимых относятся переносчики аминокислот, входящих в первую и пятую группы, а также переносчик метионина. Независимые от Na^+ переносчики специфичны для некоторых нейтральных аминокислот (фенилаланин, лейцин) и аминокислот с катионными радикалами (лизин).

Аминокислоты конкурируют друг с другом за специфические участки связывания. Например, всасывание лейцина (если концентрация его достаточно высока) уменьшает всасывание изолейцина и валина.

Одна из специфических транспортных систем для некоторых нейтральных аминокислот функционирует в кишечнике, почках и, по-видимому, мозге. Она получила название γ-глутамильного цикла (рис. 9-5).

В этой системе участвуют 6 ферментов, один из которых находится в клеточной мембране, а остальные — в цитозоле. Ключевую роль в транспорте аминокислоты играет мембранно-связанный фермент **γ-глутамилтрансфераза**. Этот фермент является гликопротеином и катализирует перенос γ-глутамильной группы от глутатиона (иногда другого γ-глутамильного пептида) на транспортируемую аминокислоту и последующий перенос комплекса в клетку. Глутатион представляет собой трипептид — γ-глутамилцистеинилглицин, который находится во всех тканях животных. Реакция протекает следующим образом (см. схему А на с. 468).

Аминокислота, связанная с γ-глутамильным остатком, оказывается внутри клетки. В следующей реакции происходит отщепление γ-глута-

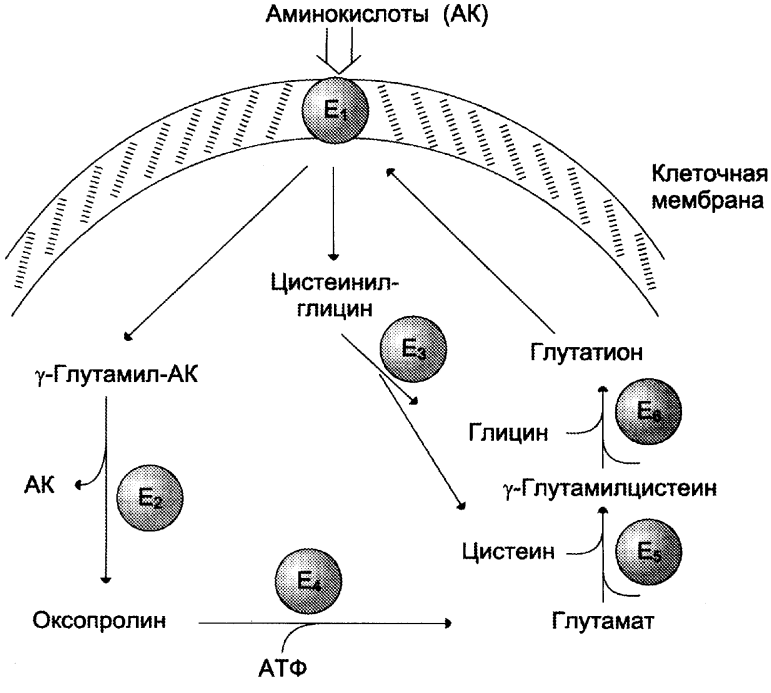


Рис. 9-5. γ-Глутамильный цикл. Система состоит из одного мембранного и пяти цитоплазматических ферментов. Перенос аминокислоты внутрь клетки осуществляется в комплексе с глутамильным остатком глутатиона под действием γ-глутамилтрансферазы. Затем аминокислота освобождается, а γ-глутамильный остаток в несколько стадий превращается в глутатион, который способен присоединять следующую молекулу аминокислоты. E_1 — γ-глутамилтрансфераза; E_2 — γ-глутамилциклотрансфераза; E_3 — пептидаза; E_4 — оксопролиназа; E_5 — γ-глутамилцистеинсинтетаза; E_6 — глутатионсинтетаза.

мильного остатка под действием фермента γ-глутамилциклотрансферазы (см. схему Б).

Дипептид цистеинилглицин расщепляется под действием пептидазы на 2 аминокислоты — цистеин и глицин. В результате этих 3 реакций происходит перенос одной молекулы аминокислоты в клетку (или внутриклеточную структуру). Следующие 3 реакции обеспечивают регенерацию глутатиона, благодаря чему цикл повторяется многократно. Для транспорта в клетку одной молекулы аминокислоты с участием γ-глутамильного цикла затрачиваются 3 молекулы АТФ.

Д. Нарушение переваривания белков и транспорта аминокислот

Небольшую долю продуктов переваривания белка составляют негидролизованные короткие пептиды. У некоторых людей возникает иммунная реакция на приём белка, что, очевидно, связано со способностью к всасыванию таких пептидов. Продукты полностью переваренного белка (аминокислоты) лишены антигенных свойств и иммунных реакций не вызывают.

У новорождённых проницаемость слизистой оболочки кишечника выше, чем у взрослых, поэтому в кровь могут поступать антитела молозива (секрет молочных желёз, выделяющийся в первые дни после родов, обогащённый антителами и антитоксинами). Это усугубляется наличием в молозиве белка — ингибитора трипсина. Протеолитические ферменты в пищеварительных секретах новорождённых обладают низкой активностью. Всё это способствует всасыванию в кишечнике небольшого количества нативных белков, достаточного для обеспечения иммунной реакции. Очевидно, подобное усиление всасывающей способности кишечника является причиной наблюдаемой иногда непереносимости белков пищи (например, молока и яиц) у взрослых людей.

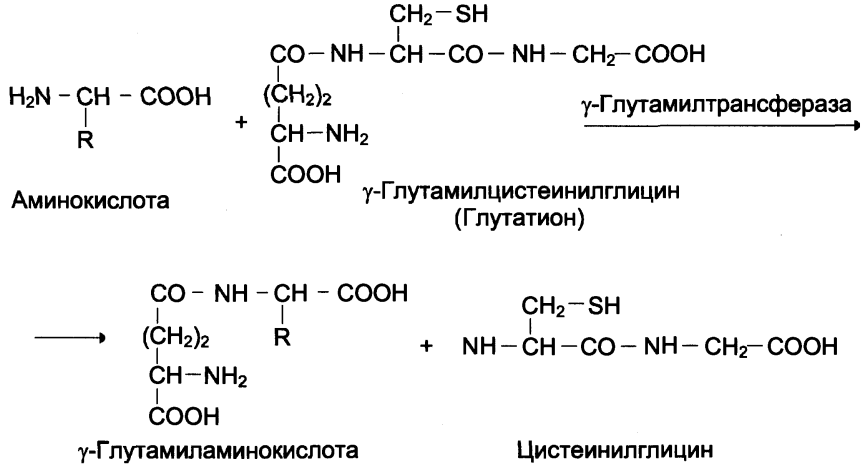


Схема А

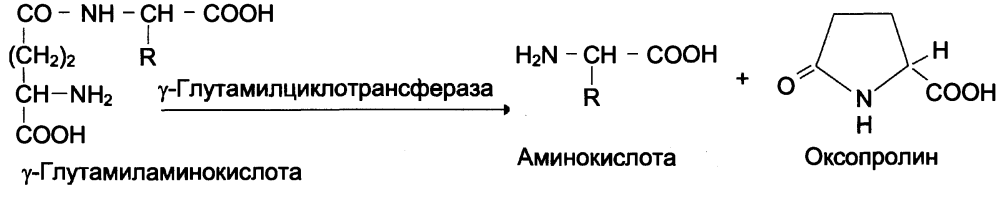


Схема Б

Всё больше подтверждений получает гипотеза, согласно которой при заболевании целиакии (**нетропической спру**) происходит нарушение клеток слизистой оболочки кишечника, где всасываются небольшие негидролизованные пептиды. Целиакия характеризуется повышенной чувствительностью к глютену — белку клейковины зёрен злаков, употребляемых с пищей человеком. Этот белок оказывает токсическое действие на слизистую оболочку тонкой кишки, что приводит к её патологическим изменениям и нарушению всасывания. Патогенез заболевания недостаточно ясен.

Такие заболевания, как **цистинурия**, болезнь **Хартнапа** и некоторые другие, возникают вследствие дефекта переносчиков нейтральных аминокислот в кишечнике и почках. Описана врождённая патология, связанная с дефектом фермента 5-оксопролиназы (рис. 9-5, реакция 4). При этом с мочой выделяется оксопролин. У этих больных нарушены транспорт аминокислот в ткани и их метаболизм в клетках.

IV. КАТАБОЛИЗМ АМИНОКИСЛОТ

Аминокислоты, образующиеся при переваривании белков и поступающие в клетки тканей, подвергаются катаболизму и анаболизму, а также специфическим реакциям, в результате которых синтезируются биологически активные соединения.

Катаболизм большинства аминокислот начинается с отщепления α-аминогруппы. Аминокислота теряет аминогруппу в результате двух типов реакций: трансаминирования и дезаминирования.

А. Трансаминирование

Трансаминирование — реакция переноса α-аминогруппы с аминокислоты на α-кетокислоту, в результате чего образуются новая кетокислота и новая аминокислота. Константа равновесия для большинства таких реакций близка к единице (K_p~1,0), поэтому процесс трансаминирования легко обратим (см. схему А).

Реакции катализируют ферменты аминотрансферазы, коферментом которых служит пиридоксальфосфат (ПФ) — производное витамина B_6 (пиридоксина, см. раздел 3) (см. схему Б).

Аминотрансферазы обнаружены как в цитоплазме, так и в митохондриях клеток эукариот. Причём митохондриальные и цитоплазматические формы ферментов различаются по физико-химическим свойствам. В клетках человека найдено более 10 аминотрансфераз, отличающихся по субстратной специфичности. Вступать в реакции трансаминирования могут почти все аминокислоты, **за исключением лизина, треонина и пролина**.

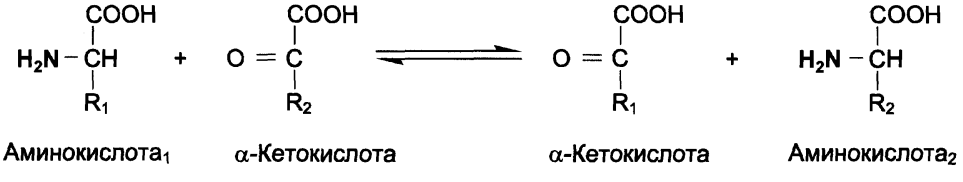
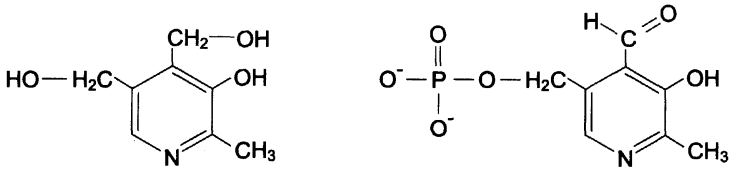


Схема А



Пиридоксин Пиридоксальфосфат

Схема Б

1. Механизм реакции

Аминотрансферазы — классический пример ферментов, катализирующих реакции, протекающие по механизму типа «пинг-понг» (см. раздел 2). В таких реакциях первый продукт должен уйти из активного центра фермента до того, как второй субстрат сможет к нему присоединиться.

Активная форма аминотрансфераз образуется в результате присоединения пиридоксальфосфата к аминогруппе лизина прочной альдиминной связью (рис. 9-6). Лизин в положении 258 входит в состав активного центра фермента. Кроме того, между ферментом и пиридоксальфосфатом образуются ионные связи с участием заряженных атомов фосфатного остатка и азота в пиридиновом кольце кофермента.

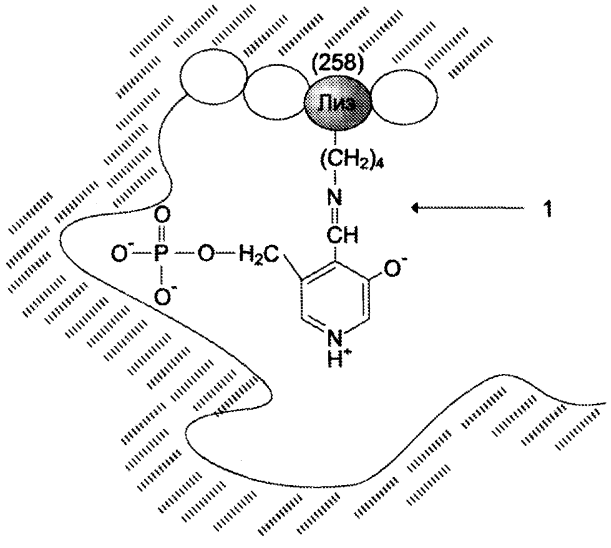


Рис. 9-6. Присоединение пиридоксальфосфата к активному центру аминотрансферазы. Цифрой «1» обозначена альдиминная связь.

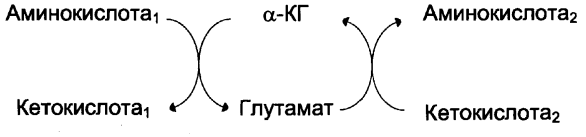
Пиридоксальфосфат в данном случае служит переносчиком аминогрупп. При этом наиболее важную роль играет его альдегидная группа, которая может обратимо присоединять различные амины с образованием шиффовых оснований. Реакции трансаминирования проходят в 2 стадии, во время которых пиридоксальфосфат претерпевает обратимые превращения между свободной альдегидной формой (ПФ) и аминированной формой (пиридоксаминфосфат). Последовательность реакций трансаминирования представлена ниже.

- На первой стадии к пиридоксальфосфату в активном центре фермента с помощью альдиминной связи присоединяется аминогруппа от первого субстрата — аминокислоты. Образуются комплекс фермент-пиридоксаминфосфат и кетокислота — первый продукт реакции. Этот процесс включает промежуточное образование 2 шиффовых оснований.
- На второй стадии комплекс фермент-пиридоксаминфосфат соединяется с кетокислотой (вторым субстратом) и снова через промежуточное образование 2 шиффовых оснований передаёт аминогруппу на кетокислоту. В результате фермент возвращается в свою нативную форму, и образуется новая аминокислота — второй продукт реакции. Если альдегидная группа пиридоксальфосфата не занята аминогруппой субстрата, то она образует шиффово основание (альдимин) с ε-аминогруппой радикала лизина в активном центре фермента (см. схему на с. 471).

2. Органоспецифичные аминотрансферазы АЛТ и АСТ

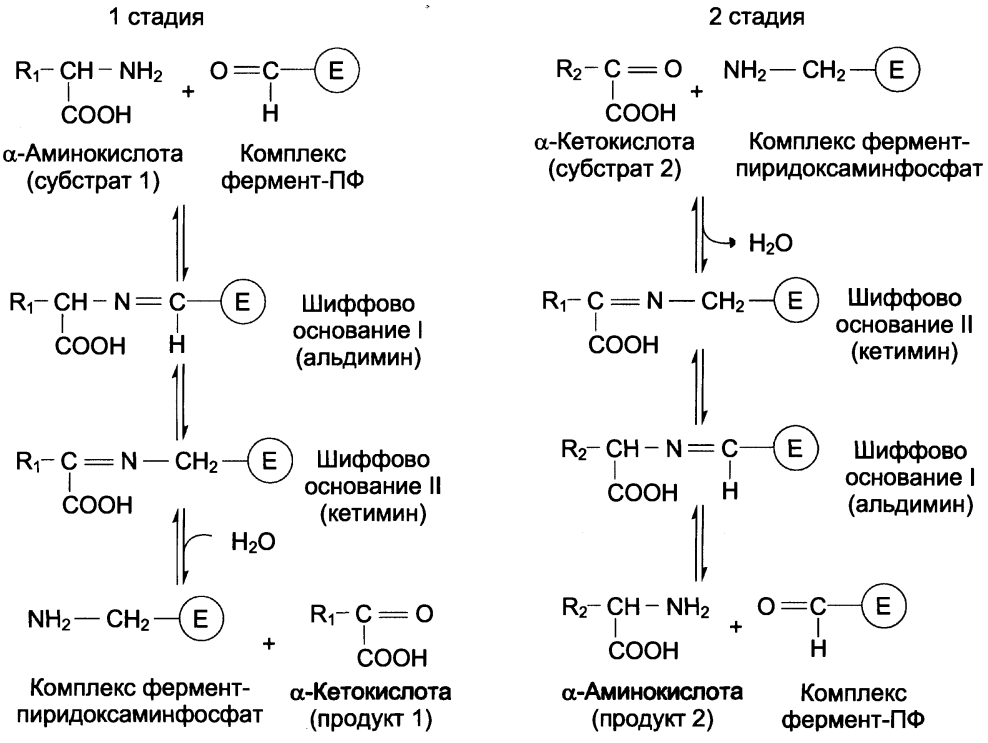
Чаще всего в реакциях трансаминирования участвуют аминокислоты, содержание которых в тканях значительно выше остальных — **глутамат, аланин, аспартат** и соответствующие им кетокислоты — **α-кетоглутарат, пируват и оксалоацетат**. Основным донором аминогруппы служит глутамат.

Суммарно эти реакции можно представить в виде схемы:



Акцептором аминогруппы любой аминокислоты, подвергающейся трансаминированию (аминокислота 1), служит α-кетоглутарат. Принимая аминогруппу, он превращается в глутамат, который способен передавать эту группу любой α-кетокислоте с образованием другой аминокислоты (аминокислота 2).

Аминотрансферазы обладают субстратной специфичностью к разным аминокислотам. В тканях человека обнаружено более 10 разных ами-



Схема

нотрансфераз. Наиболее распространёнными ферментами в большинстве тканей млекопитающих являются **аланинаминотрансфераза** (АЛТ), по обратной реакции — **глутамат-пируватаминотрансфераза** (ГПТ) и **аспартатаминотрансфераза** (АСТ), по обратной реакции — **глутамат-оксалоацетатаминотрансфераза** (ГОТ).

АЛТ (АлАТ) катализирует реакцию трансаминирования между аланином и α-кетоглутаратом (см. схему А на с. 472).

Локализован этот фермент в цитозоле клеток многих органов, но наибольшее его количество обнаружено в клетках печени и сердечной мышцы.

АСТ (АсАТ) катализирует реакцию трансаминирования между аспартатом и α-кетоглутаратом аналогично предыдущей (см. схему Б на с. 472).

В результате образуются оксалоацетат и глутамат. АСТ имеет как цитоплазматическую, так и митохондриальную формы. Наибольшее его количество обнаружено в клетках сердечной мышцы и печени.

Так как наибольшее количество АЛТ и АСТ сосредоточено в печени и миокарде, а содержание в крови очень низкое, можно говорить об органоспецифичности этих ферментов.

В результате работы аминотрансфераз аминный азот многих аминокислот переходит в состав глутамата. Есть основания считать, что накопление аминогрупп в форме глутаминовой кислоты происходит в цитозоле. Затем глутамат с помощью транслоказ попадает в митохондрии, где активна специфическая АСТ. В результате действия этого фермента глутамат снова превращается в α-кетоглутарат. Последний используется для непрямого дезаминирования аминокислот, содержащихся в митохондриях. Это очень важно, так как только глутамат в тканях млекопитающих наиболее быстро может подвергаться окислительному дезаминированию (см. ниже).

3. Биологическое значение трансаминирования

Реакции трансаминирования играют большую роль в обмене аминокислот. Поскольку этот процесс обратим, ферменты аминотрансферазы функционируют как в процессах катаболизма, так и биосинтеза аминокислот. Трансаминирование —

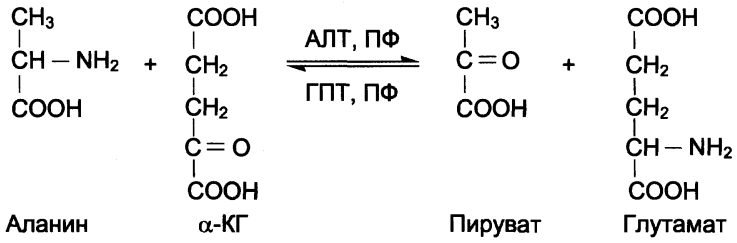


Схема А

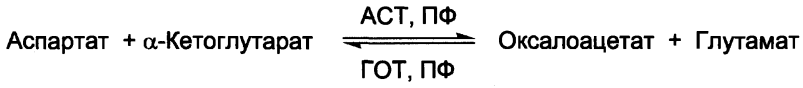


Схема Б

заключительный этап синтеза заменимых аминокислот из соответствующих α-кетокислот, если они в данный момент необходимы клеткам. В результате происходит перераспределение аминного азота в тканях организма. Трансаминирование — первая стадия дезаминирования большинства аминокислот, т.е. **начальный этап их катаболизма**. Образующиеся при этом кетокислоты окисляются в ЦТК или используются для синтеза глюкозы и кетоновых тел. При трансаминировании общее количество аминокислот в клетке не меняется.

4. Диагностическое значение определения аминотрансфераз в клинической практике

В клинической практике широко используют определение активности АСТ и АЛТ в сыворотке крови для диагностики некоторых заболеваний.

В норме в крови активность этих ферментов очень мала и составляет 5–40 Е/л. При повреждении клеток соответствующего органа ферменты выходят в кровь, где активность их резко повышается. Поскольку АСТ и АЛТ наиболее активны в клетках печени, сердца и, в меньшей степени, скелетных мышц, их используют для диагностики болезней этих органов (см. раздел 2). В клетках сердечной мышцы количество АСТ значительно превышает количество АЛТ, а в печени — наоборот. Поэтому особенно информативно одновременное измерение активности обоих ферментов в сыворотке крови. Соотношение активностей АСТ/АЛТ называют «**коэффициент де Ритиса**». В норме этот коэффициент равен 1,33±0,42. При инфаркте миокарда активность АСТ в крови увеличивается в 8–10 раз, а АЛТ — в 1,5–2,0 раза. Наиболее резко активность АСТ увеличивается при некрозе ткани, так как выходит в кровь и цитоплазматическая и митохондриальная формы фермента. При инфаркте миокарда значение коэффициента де Ритиса резко возрастает.

При гепатитах активность АЛТ в сыворотке крови увеличивается в ~8–10 раз по сравнению с нормой, а АСТ — в 2–4 раза. Коэффициент де Ритиса снижается до 0,6. Однако при циррозе печени этот коэффициент увеличивается, что свидетельствует о некрозе клеток, при котором в кровь выходят обе формы АСТ.

Б. Дезаминирование аминокислот

Дезаминирование аминокислот — реакция отщепления α-аминогруппы от аминокислоты, в результате чего образуется соответствующая α-кетокислота (безазотистый остаток) и выделяется молекула аммиака. Дальнейшие превращения продуктов дезаминирования аминокислот представлены на рис. 9-7.

Аммиак токсичен для ЦНС, поэтому в организме человека и млекопитающих он превращается в нетоксичное хорошо растворимое соединение — мочевину. В виде мочевины, а также в виде солей аммония аммиак выводится из организма. Безазотистый остаток используется для образования аминокислот в реакциях трансами-

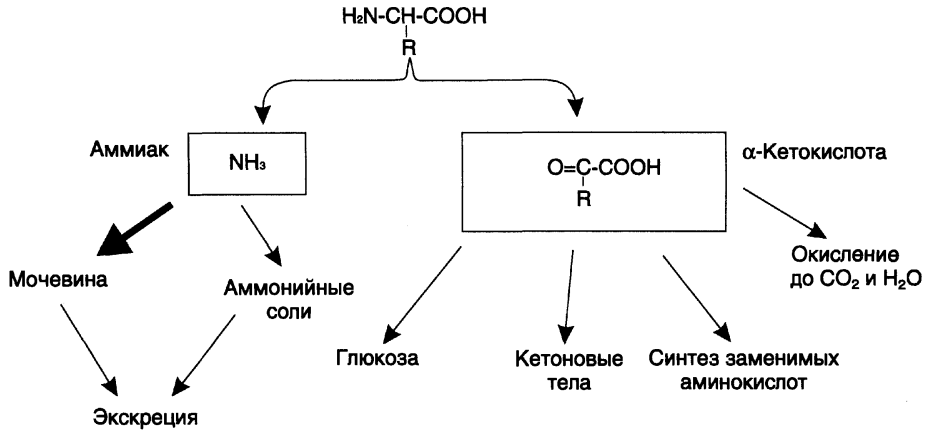


Рис. 9-7. Судьба продуктов дезаминирования аминокислот.

нирования, в процессах глюконеогенеза, кетогенеза, в анаплеротических реакциях для восполнения убыли метаболитов ОПК, в реакциях окисления до CO_2 и H_2O.

Существует несколько способов дезаминирования аминокислот:

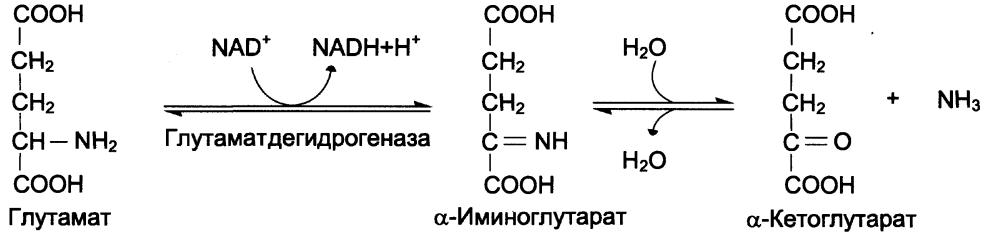
- окислительное;
- непрямое (трансдезаминирование);
- неокислительное;
- внутримолекулярное.

1. Окислительное дезаминирование

Наиболее активно в тканях происходит дезаминирование глутаминовой кислоты. Реакцию катализирует фермент **глутаматдегидрогеназа**, коферментом глутаматдегидрогеназы является NAD^+. Реакция идёт в 2 этапа. Вначале происходит ферментативное дегидрирование глутамата и образование α-иминоглутарата, затем — неферментативное гидролитическое отщепление иминогруппы в виде аммиака, в результате чего образуется α-кетоглутарат (см. схему ниже).

Окислительное дезаминирование глутамата — обратимая реакция и при повышении концентрации аммиака в клетке может протекать в обратном направлении, как **восстановительное аминирование α-кетоглутарата**.

Глутаматдегидрогеназа очень активна в митохондриях клеток практически всех органов, кроме мышц. Этот фермент — олигомер, состоящий из 6 субъединиц (молекулярная масса 312 кД). Глутаматдегидрогеназа играет важную роль, так как является регуляторным ферментом аминокислотного обмена. Аллостерические ингибиторы глутаматдегидрогеназы (АТФ, ГТФ, NADH) вызывают диссоциацию фермента и потерю глутаматдегидрогеназной активности. Высокие концентрации АДФ активируют фермент. Таким образом, низкий энергетический уровень в клетках стимулирует разрушение аминокислот и образование α-кетоглутарата, поступающего в ЦТК как энергетический субстрат. Глутаматдегидрогеназа может индуцироваться стероидными гормонами (кортизолом).



Схема

Оксидаза L-аминокислот

В печени и почках обнаружен фермент **оксидаза L-аминокислот**, способный дезаминировать некоторые L-аминокислоты (см. схему в конце стр.).

Коферментом в данной реакции выступает FMN. Однако вклад оксидазы L-аминокислот в дезаминирование, очевидно, незначителен, так как оптимум её действия лежит в щелочной среде (pH 10,0). В клетках, где pH среды близок к нейтральному, активность фермента очень низка.

Оксидаза D-аминокислот также обнаружена в почках и печени. Это FAD-зависимый фермент. Оптимум pH этой оксидазы лежит в нейтральной среде, поэтому фермент более активен, чем оксидаза L-аминокислот. Роль оксидазы D-аминокислот невелика, так как количество D-изомеров в организме крайне мало, потому что в белки пищи и белки тканей человека и животных входят только природные L-аминокислоты. Вероятно, оксидаза D-аминокислот способствует их превращению в соответствующие L-изомеры (рис. 9-8).

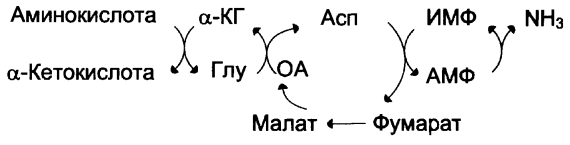
2. Непрямое дезаминирование (трансдезаминирование)

Большинство аминокислот не способно дезаминироваться в одну стадию, подобно Глу. Аминогруппы таких аминокислот в результате трансаминирования переносятся на α-кетоглутарат с образованием глутаминовой кислоты, которая затем подвергается прямому окислительному дезаминированию. Такой механизм дезаминирования аминокислот в 2 стадии получил название трансдезаминирования, или непрямого дезаминирования:

Непрямое дезаминирование аминокислот происходит при участии 2 ферментов: аминотрансферазы (кофермент ПФ) и глутаматдегидрогеназы (кофермент NAD^+).

Значение этих реакций в обмене аминокислот очень велико, так как **непрямое дезаминирование — основной способ дезаминирования большинства аминокислот**. Обе стадии непрямого дезаминирования обратимы (рис. 9-9), что обеспечивает как катаболизм аминокислот (рис. 9-9, А), так и возможность образования практически любой аминокислоты из соответствующей α-кетокислоты (рис. 9-9, Б).

В мышечной ткани активность глутаматдегидрогеназы низка, поэтому в этих клетках при интенсивной физической нагрузке функционирует ещё один путь непрямого дезаминирования с участием цикла ИМФ-АМФ. Вначале происходит перенос аминогруппы аминокислот на аспартат, затем на инозиновую кислоту (ИМФ) и в завершение — дезаминирование АМФ. Представленная схема отражает последовательность реакций непрямого неокислительного дезаминирования:

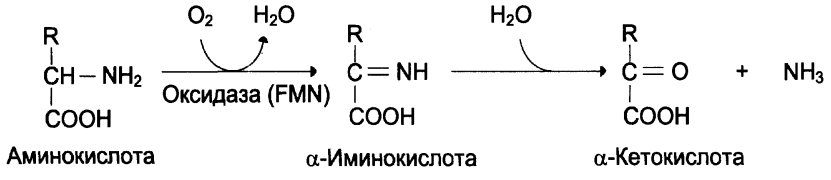


Можно выделить 4 стадии процесса:

- трансаминирование с α-кетоглутаратом, образование глутамата;
- трансаминирование глутамата с оксалоацетатом (фермент АСТ), образование аспартата;
- реакция переноса аминогруппы от аспартата на ИМФ (инозинмонофосфат), образование АМФ и фумарата;
- гидролитическое дезаминирование АМФ.

Перенос аминогруппы от аспартата и синтез АМФ происходят следующим образом (см. схему А на с. 476).

Реакция дезаминирования адениловой кислоты происходит под действием фермента АМФ дезаминазы (см. схему Б на с. 476).



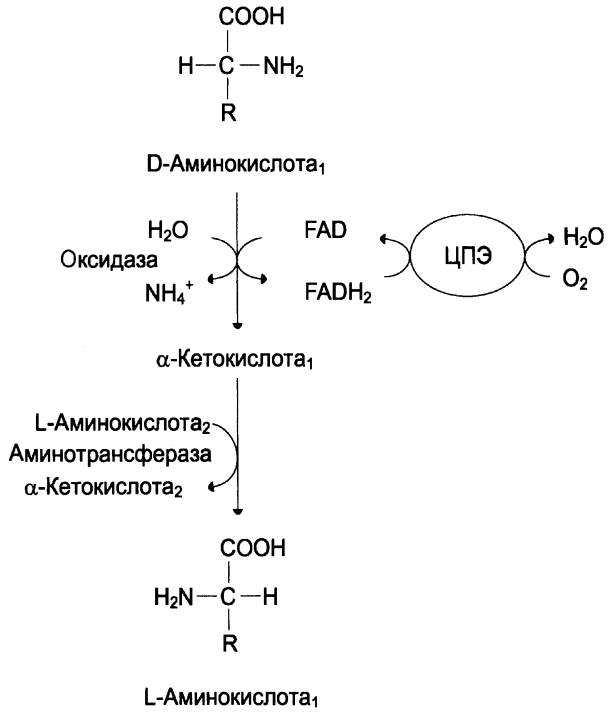


Рис. 9-8. Биологическая роль оксидазы D-аминокислот.

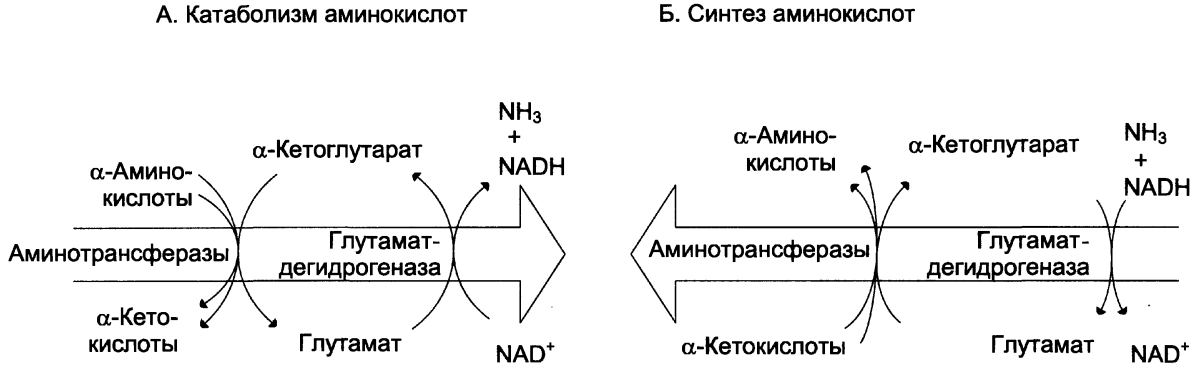


Рис. 9-9. Биологическая роль непрямого дезаминирования. А — при катаболизме почти все природные аминокислоты сначала передают аминогруппу на а-кетоглутарат в реакции трансаминирования с образованием глутамата и соответствующей кетокислоты. Затем глутамат подвергается прямому окислительному дезаминированию под действием глутаматдегидрогеназы, в результате чего получаются а-кетоглутарат и аммиак; Б — при необходимости синтеза аминокислот и наличии необходимых а-кетокислот обе стадии непрямого дезаминирования протекают в обратном направлении. В результате восстановительного аминирования а-кетоглутарата образуется глутамат, который вступает в трансаминирование с соответствующей а-кетокислотой, что приводит к синтезу новой аминокислоты.

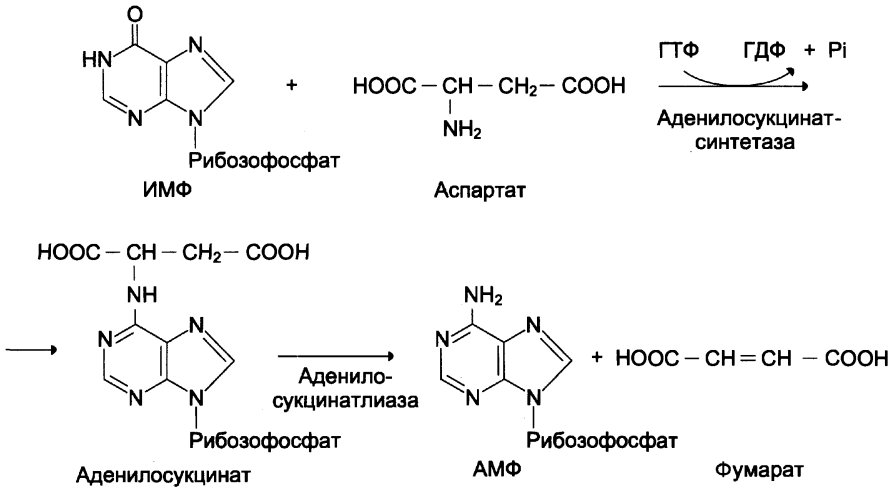


Схема А

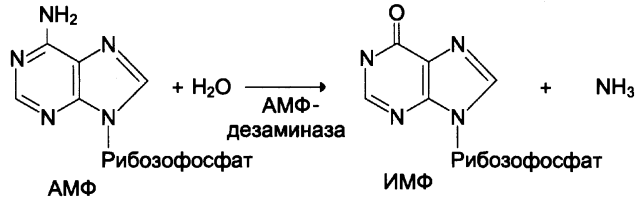


Схема Б.

Этот путь дезаминирования преобладает в мышцах при интенсивной работе, в результате которой накапливается молочная кислота. Выделяющийся аммиак предотвращает закисление среды в клетках, вызванное образованием лактата.

3. Неокислительное дезаминирование

В печени человека присутствуют специфические ферменты, катализирующие реакции дезаминирования аминокислот серина, треонина и гистидина неокислительным путём.

Неокислительное дезаминирование серина катализирует сериндегидратаза (см. схему А на с. 477).

Реакция начинается с отщепления молекулы воды и образования метиленовой группы, затем происходит неферментативная перестройка молекулы, в результате которой образуется иминогруппа, слабо связанная с а-углеродным атомом. Далее в результате неферментативного гидролиза отщепляется молекула аммиака и образуется пируват.

Неокислительное дезаминирование треонина катализирует фермент треониндегидратаза. Механизм реакции аналогичен дезаминированию серина (см. схему Б на с. 477).

Эти ферменты пиридоксальфосфатзависимые.

Неокислительное дезаминирование гистидина под действием фермента гистидазы (гистидин-аммиаклиазы) является внутримолекулярным, так как образование молекулы аммиака происходит из атомов самой аминокислоты без участия молекулы воды. Эта реакция происходит только в печени и коже (см. схему В на с. 477).

V. ОБМЕН АММИАКА

А. Источники аммиака в клетках

Катаболизм аминокислот в тканях происходит постоянно со скоростью ~100 г/сут. При этом в результате дезаминирования аминокислот освобождается большое количество аммиа-

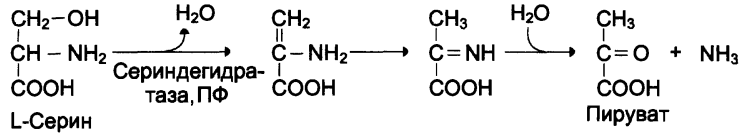


Схема А

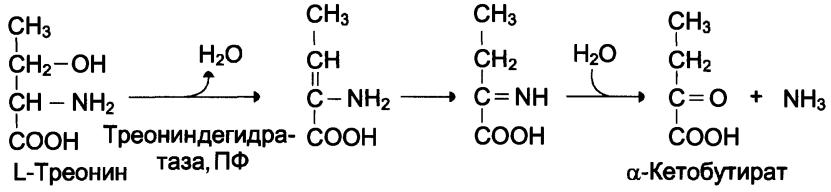


Схема Б

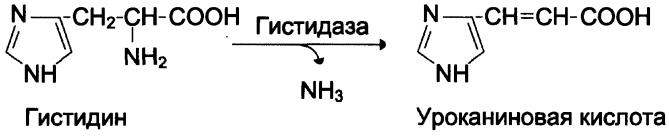
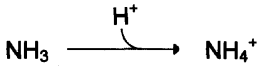


Схема В

ка. Значительно меньшие количества его образуются при дезаминировании биогенных аминов и нуклеотидов. Основные источники аммиака в клетках представлены в табл. 9-3.

Часть аммиака образуется в кишечнике в результате действия бактерий на пищевые белки (**гниение белков** в кишечнике) и поступает в кровь воротной вены. Концентрация аммиака в крови воротной вены существенно больше, чем в общем кровотоке. В печени задерживается большое количество аммиака, что поддерживает низкое содержание его в крови. Концентрация аммиака в крови в норме редко превышает 0,4–0,7 мг/л (или 25–40 мкмоль/л). В крови и цитозоле клеток при физиологических значениях pH аммиак переходит в ион аммония — NH_4^+, количество неионизированного NH_3 невелико (~ 1%).



Аммиак — токсичное соединение. Даже небольшое повышение его концентрации оказывает неблагоприятное действие на организм, и прежде всего на ЦНС. Так, повышение концентрации аммиака в мозге до 0,6 ммоль вызывает судороги. К симптомам гипераммониемии относят тремор, нечленораздельную речь, тошноту, рвоту, головокружение, судорожные припадки, потерю сознания. В тяжёлых случаях развивается кома с летальным исходом.

Механизм токсического действия аммиака на мозг и организм в целом, очевидно, связан с действием его на несколько функциональных систем.

- Аммиак легко проникает через мембраны в клетки и в митохондриях сдвигает реакцию, катализируемую глутаматдегидрогеназой, в сторону образования глутамата:

$$\alpha\text{-Кетоглутарат} + NADH + H^+ + NH_3 \rightarrow \text{Глутамат} + NAD^+.$$

Уменьшение концентрации α-кетоглутарата вызывает:

угнетение обмена аминокислот (реакции трансаминирования) и, следовательно, синтеза из них нейромедиаторов (ацетилхолина, дофамина и др.);

гипоэнергетическое состояние в результате снижения скорости ЦТК.

Таблица 9-3. Основные источники аммиака

Источник	Процесс	Ферменты	Локализация процесса
Аминокислоты	Непрямое дезаминирование (основной путь дезаминирования аминокислот)	Аминотрансферазы, ПФ Глутаматдегидрогеназа, NAD^+	Все ткани
	Окислительное дезаминирование глутамата	Глутаматдегидрогеназа, NAD^+	Все ткани
	Неокислительное дезаминирование Гис, Сер, Тре	Гистидаза-Серин, треониндегидратазы, ПФ	Преимущественно печень
	Окислительное дезаминирование аминокислот (малозначимый путь дезаминирования)	Оксидаза L-аминокислот, FMN	Печень и почки
Биогенные амины	Окислительное дезаминирование (путь инактивации биогенных аминов)	Аминооксидазы, FAD	Все ткани
АМФ	Гидролитическое дезаминирование	АМФ-дезаминаза	Интенсивно работающая мышца

Недостаточность α-кетоглутарата приводит к снижению концентрации метаболитов ЦТК, что вызывает ускорение реакции синтеза оксалоацетата из пирувата, сопровождающейся интенсивным потреблением CO_2. Усиленное образование и потребление диоксида углерода при гипераммониемии особенно характерны для клеток головного мозга.

- Повышение концентрации аммиака в крови сдвигает pH в щелочную сторону (вызывает **алкалоз**). Это, в свою очередь, увеличивает сродство гемоглобина к кислороду, что приводит к гипоксии тканей, накоплению CO_2 и гипоэнергетическому состоянию, от которого главным образом страдает головной мозг.
- Высокие концентрации аммиака **стимулируют синтез глутамина** из глутамата в нервной ткани (при участии глутаминсинтетазы):

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

Накопление глутамина в клетках нейроглии приводит к повышению осмотического давления в них, набуханию астроцитов и в больших концентрациях может вызвать отёк мозга. **Снижение концентрации глутамата** нарушает обмен аминокислот и нейромедиаторов, в частности **синтез γ-аминомасляной кислоты** (ГАМК), основного тормозного медиатора. При недостатке ГАМК и других медиаторов нарушается проведение нервного импульса, возникают судороги.

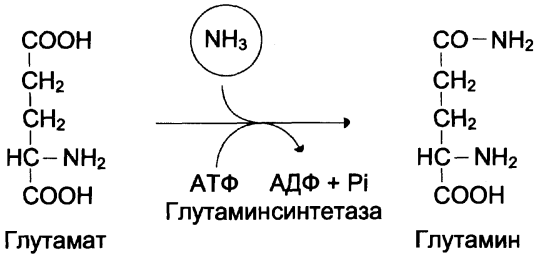
- Ион NH_4^+ практически не проникает через цитоплазматические и митохондриальные мембраны. Избыток иона аммония в крови способен нарушать трансмембранный перенос одновалентных катионов Na^+ и K^+, конкурируя с ними за ионные каналы, что также влияет на проведение нервных импульсов.

Б. Связывание (обезвреживание) аммиака

Высокая интенсивность процессов дезаминирования аминокислот в тканях и очень низкий уровень аммиака в крови свидетельствуют о том, что в клетках активно происходит связывание аммиака с образованием нетоксичных соединений, которые выводятся из организма с мочой. Эти реакции можно считать реакциями обезвреживания аммиака. В разных тканях и органах обнаружено несколько типов таких реакций.

Основной реакцией связывания аммиака, протекающей во всех тканях организма, явля-

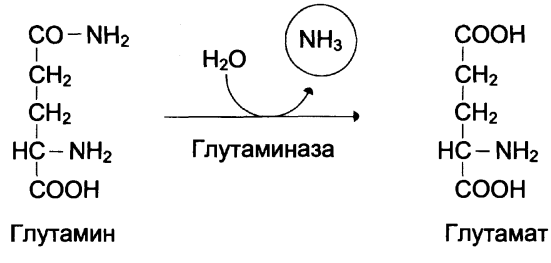
ется синтез глутамина под действием глутаминсинтетазы:



Глутаминсинтетаза локализована в митохондриях клеток, для работы фермента необходим кофактор — ионы Mg^{2+}. Глутаминсинтетаза — один из основных регуляторных ферментов обмена аминокислот и аллостерически ингибируется АМФ, глюкозо-6-фосфатом, а также Гли, Ала и Гис.

Глутамин легко транспортируется через клеточные мембраны путём облегчённой диффузии (для глутамата возможен только активный транспорт) и поступает из тканей в кровь. Основными тканями-поставщиками глутамина служат мышцы, мозг и печень. С током крови глутамин транспортируется в кишечник и почки.

В клетках кишечника под действием фермента глутаминазы происходит гидролитическое освобождение амидного азота в виде аммиака:



Образовавшийся в реакции глутамат подвергается трансаминированию с пируватом. α-Аминогруппа глутаминовой кислоты переносится в состав аланина (рис. 9-10). Большие количества аланина поступают из кишечника в кровь воротной вены и поглощаются печенью. Около 5% образовавшегося аммиака удаляется в составе фекалий, небольшая часть через воротную вену попадает в печень, остальные ~90% выводятся почками.

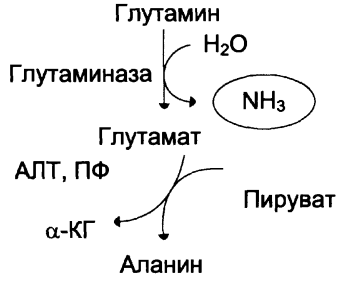


Рис. 9-10. Метаболизм азота глутамина в кишечнике.

В почках также происходит гидролиз глутамина под действием глутаминазы с образованием аммиака. Этот процесс является одним из механизмов регуляции кислотно-щелочного равновесия в организме и сохранения важнейших катионов для поддержания осмотического давления. Глутаминаза почек значительно индуцируется при ацидозе, образующийся аммиак нейтрализует кислые продукты обмена и в виде аммонийных солей экскретируется с мочой (рис. 9-11). Эта реакция защищает организм от излишней потери ионов Na^+ и K^+, которые также могут использоваться для выведения анионов и утрачиваться. При алкалозе количество глутаминазы в почках снижается.

В почках образуется и выводится около 0,5 г солей аммония в сутки.

Высокий уровень глутамина в крови и лёгкость его поступления в клетки обусловливают использование глутамина во многих анаболических процессах. **Глутамин — основной донор азота в организме**. Амидный азот глутамина используется для синтеза пуриновых и пиримиди-

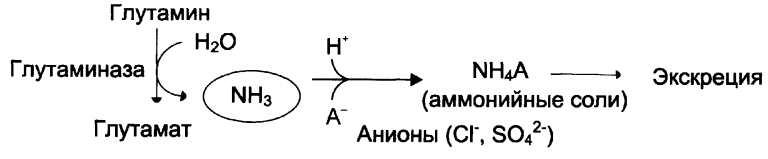


Рис. 9-11. Метаболизм амидного азота глутамина в почках.

диновых нуклеотидов, аспарагина, аминосахаров и других соединений (рис. 9-12).

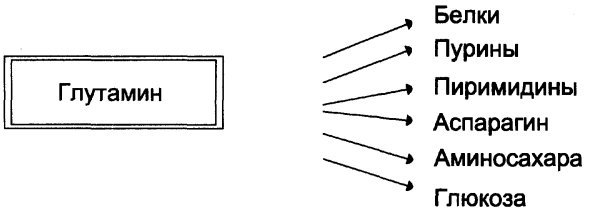
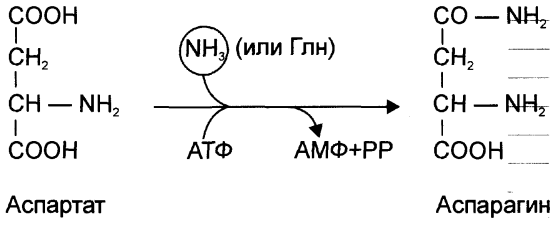


Рис. 9-12. Пути использования глутамина в организме.

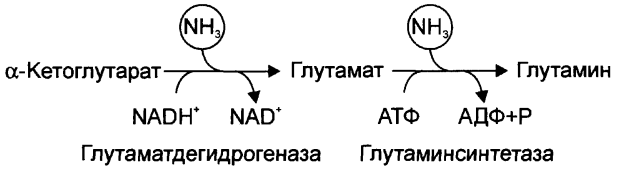
Ещё одной реакцией обезвреживания аммиака в тканях можно считать **синтез аспарагина** под действием аспарагинсинтетазы.



Существуют 2 изоформы этого фермента — глутаминзависимая и аммиакзависимая, которые используют разные доноры амидных групп. Первая функционирует в животных клетках, вторая преобладает в бактериальных клетках, но присутствует и у животных. Однако такой путь обезвреживания аммиака в клетках человека используется редко и к тому же требует больших энергетических затрат (энергию двух макроэргических связей), чем синтез глутамина.

Наиболее значительные количества аммиака обезвреживаются в печени путём **синтеза мочевины**. В первой реакции процесса аммиак связывается с диоксидом углерода с образованием карбамоилфосфата, при этом затрачиваются 2 молекулы АТФ. Реакция происходит в митохондриях гепатоцитов под действием фермента карбамоилфосфатсинтетазы I. Карбамоилфосфатсинтетаза II локализована в цитозоле клеток всех тканей и участвует в синтезе пиримидиновых нуклеотидов (см. раздел 10). Карбамоилфосфат затем включается в орнитиновый цикл и используется для синтеза мочевины.

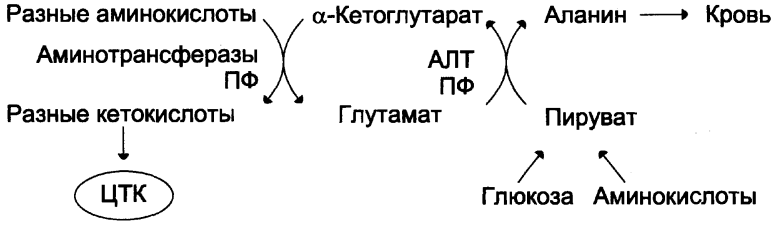
В мозге и некоторых других органах может протекать **восстановительное аминирование α-кетоглутарата** под действием глутаматдегидрогеназы, катализирующей обратимую реакцию. Однако этот путь обезвреживания аммиака в тканях используется слабо, так как глутаматдегидрогеназа катализирует преимущественно реакцию дезаминирования глутамата. Хотя, если учитывать последующее образование глутамина, реакция выгодна для клеток, так как способствует связыванию сразу 2 молекул NH_3.



Из мышц и кишечника избыток аммиака выводится преимущественно в виде аланина. Этот механизм необходим, так как активность глутаматдегидрогеназы в мышцах невелика и непрямое дезаминирование аминокислот малоэффективно. Поэтому в мышцах существует ещё один путь выведения азота. Образование аланина в этих органах можно представить следующей схемой (см. схему ниже).

Аминогруппы разных аминокислот посредством реакций трансаминирования переносятся на пируват, основным источником которого служит процесс окисления глюкозы.

Мышцы выделяют особенно много аланина в силу их большой массы, активного потребления



Схема

глюкозы при физической работе, а также потому, что часть энергии они получают за счёт распада аминокислот. Образовавшийся аланин поступает в печень, где подвергается непрямому дезаминированию. Выделившийся аммиак обезвреживается, а пируват включается в глюконеогенез. Глюкоза из печени поступает в ткани и там, в процессе гликолиза, опять окисляется до пирувата (рис. 9-13).

Образование аланина в мышцах, его перенос в печень и перенос глюкозы, синтезированной в печени, обратно в мышцы составляют **глюкозо-аланиновый цикл**, работа которого сопряжена с работой глюкозо-лактатного цикла (см. раздел 7).

Совокупность основных процессов обмена аммиака в организме представлена на рис. 9-14. Доминирующими ферментами в обмене аммиака служат глутаматдегидрогеназа и глутаминсинтетаза.

В. Орнитиновый цикл

Мочевина — основной конечный продукт азотистого обмена, в составе которого из организма выделяется до 90% всего выводимого азота (рис. 9-15). Экскреция мочевины в норме составляет ~25 г/сут.

При повышении количества потребляемых с пищей белков экскреция мочевины увеличивается. Мочевина синтезируется только в печени, что было установлено ещё в опытах И.П. Павлова. Поражение печени и нарушение синтеза мочевины приводят к повышению содержания в крови и тканях аммиака и аминокислот (в первую очередь, глутамина и аланина).

В 40-х годах XX века немецкие биохимики Г. Кребс и К. Гензелейт установили, что синтез мочевины представляет собой циклический процесс, состоящий из нескольких стадий, ключевым соединением которого, замыкающим цикл, является орнитин. Поэтому процесс синтеза мочевины получил название **«орнитиновый цикл»**, или **«цикл Кребса—Гензелейта»**.

1. Реакции синтеза мочевины

Мочевина (карбамид) — полный амид угольной кислоты — содержит 2 атома азота. **Источником одного** из них является **аммиак**, который в печени связывается с диоксидом углерода с об-

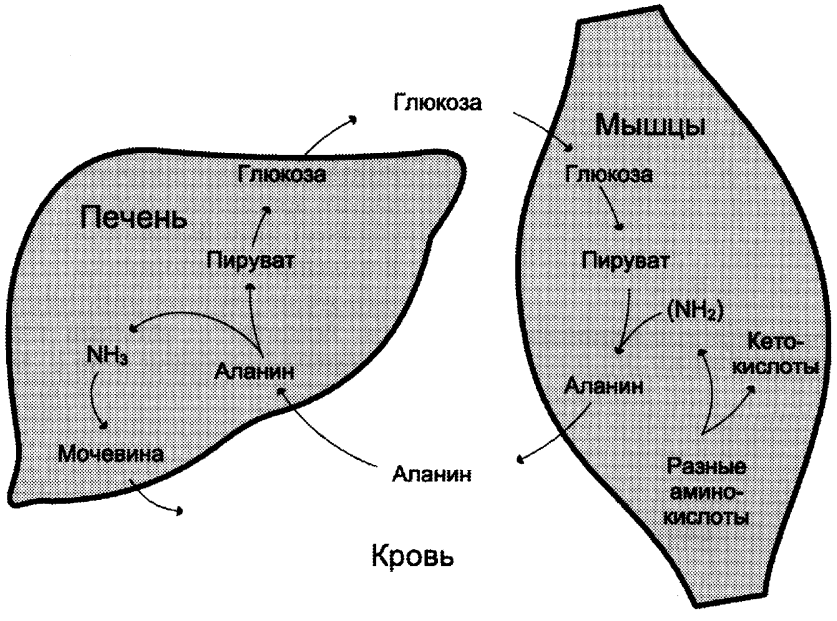


Рис. 9-13. Глюкозо-аланиновый цикл.

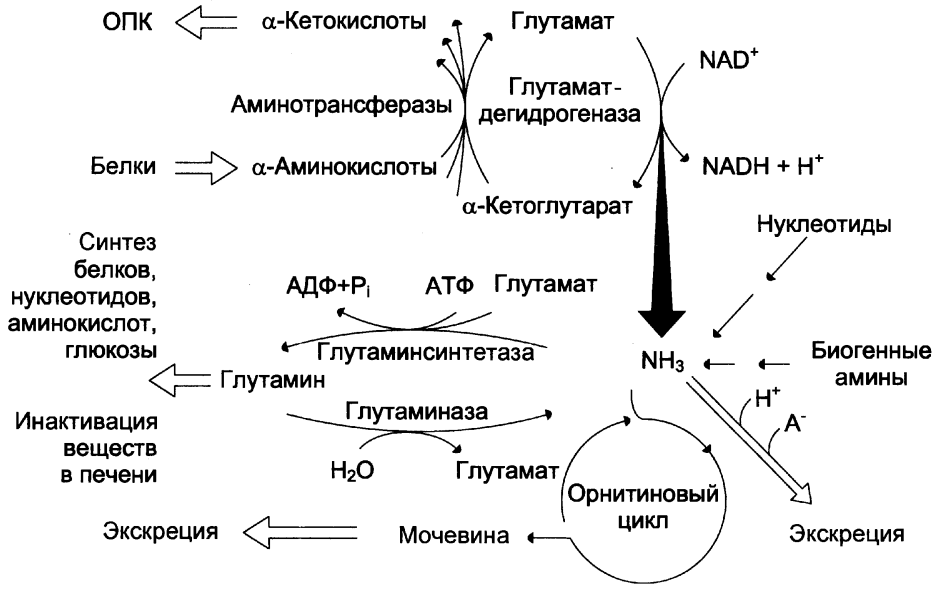


Рис. 9-14. Обмен аммиака. Основной источник аммиака — аминокислоты. Большая часть образовавшегося аммиака обезвреживается в орнитиновом цикле в печени и выделяется в виде мочевины. Основной реакцией обезвреживания аммиака в тканях является синтез глутамина, который затем используется в анаболических процессах и для обезвреживания веществ в печени. Ферменты глутаматдегидрогеназа и глутаминсинтетаза являются регуляторными и обусловливают скорость процессов образования и обезвреживания аммиака.

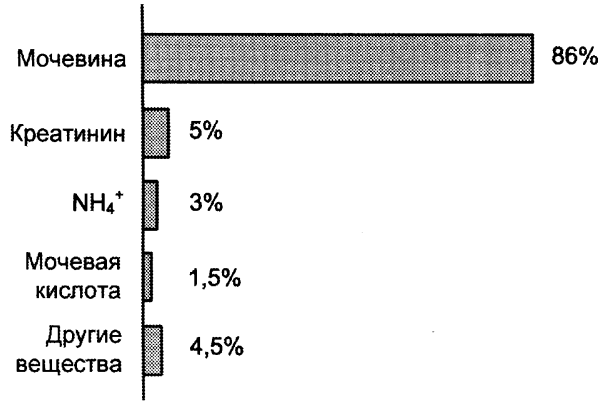


Рис. 9-15. Количество азотсодержащих веществ в моче (%) при нормальном белковом питании.

разованием карбамоилфосфата под действием карбамоилфосфатсинтетазы I (см. схему А ниже).

Далее под действием орнитин-карбамоилтрансферазы карбамоильная группа карбамоилфосфата переносится на α-аминокислоту орнитин, и образуется другая α-аминокислота — цитруллин (см. схему Б на с. 483).

В следующей реакции аргининосукцинатсинтетаза связывает цитруллин с аспартатом и образует аргининосукцинат (аргининоянтарную кислоту). Этот фермент нуждается в ионах Mg^{2+}. В реакции затрачивается 1 моль АТФ, но используется энергия двух макроэргических связей. **Аспартат — источник второго атома азота мочевины** (см. схему А на с. 483).

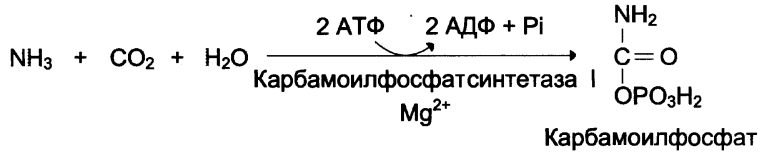


Схема А

Схема Б

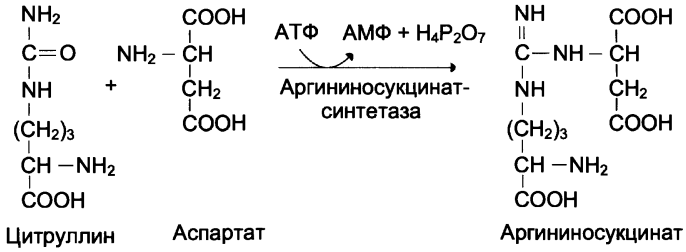
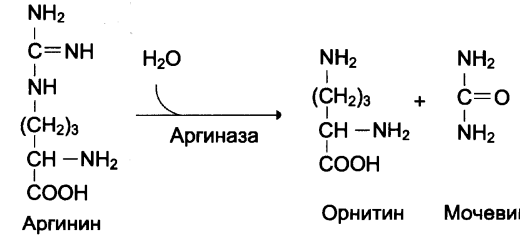


Схема А

Далее фермент аргининосукцинатлиаза (аргининосукциназа) расщепляет аргининосукцинат на аргинин и фумарат, при этом аминогруппа аспартата оказывается в молекуле аргинина (см. схему Б ниже).

Аргинин подвергается гидролизу под действием аргиназы, при этом образуются орнитин и мочевина. Кофакторами аргиназы являются ионы Ca^{2+} или Mn^{2+}. Высокие концентрации орнитина и лизина, являющихся структурными аналогами аргинина, подавляют активность этого фермента:



Образующийся орнитин взаимодействует с новой молекулой карбамоилфосфата, и цикл замыкается.

Первые две реакции процесса происходят в митохондриях гепатоцитов. Затем цитруллин, являющийся продуктом этих реакций, транспортируется в цитозоль, где и осуществляются дальнейшие превращения (рис. 9-16).

Суммарное уравнение синтеза мочевины:

$$CO_2 + NH_3 + \text{Аспартат} + 3\ \text{АТФ} + 2\ H_2O \rightarrow \text{Мочевина} + \text{Фумарат} + 2\ (\text{АДФ} + H_3PO_4) + \text{АМФ} + H_4P_2O_7.$$

Аммиак, используемый карбамоилфосфатсинтетазой I, поставляется в печень с кровью воротной вены. Роль других источников, в том числе окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты в печени, существенно меньше.

Аспартат, необходимый для синтеза аргининосукцината, образуется в печени путём транс-

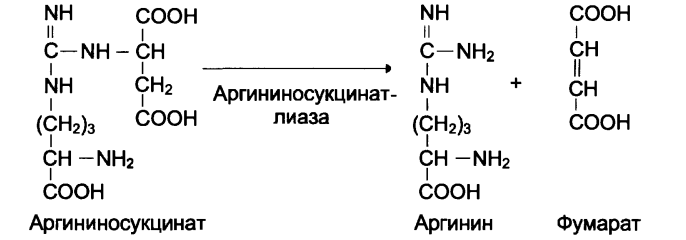


Схема Б

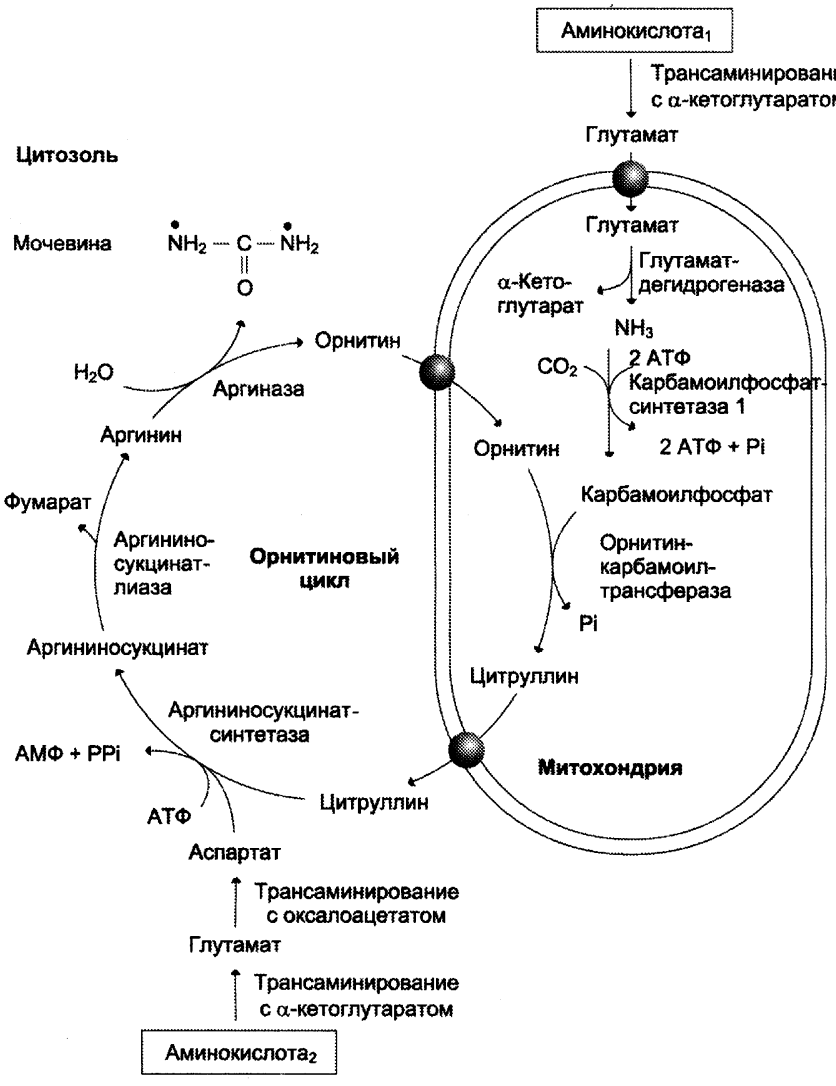


Рис. 9-16. Орнитиновый цикл Кребса–Гензелейта. Окислительное дезаминирование глутамата происходит в митохондриях. Ферменты орнитинового цикла распределены между митохондриями и цитозолем. Поэтому необходим трансмембранный перенос глутамата, цитруллина и орнитина с помощью специфических транслоказ. На схеме показаны пути включения азота двух разных аминокислот (аминокислота 1 и аминокислота 2) в молекулу мочевины: • одна аминогруппа — в виде аммиака в матриксе митохондрии; • вторую аминогруппу поставляет аспартат цитозоля.

аминирования аланина с оксалоацетатом. Аланин поступает главным образом из мышц и клеток кишечника. Источником оксалоацетата, необходимого для этой реакции, можно считать превращение фумарата, образующегося в реакциях орнитинового цикла. Фумарат в результате двух реакций цитратного цикла превращается в оксалоацетат, из которого путём трансаминирования образуется аспартат (рис. 9-17). Таким образом, с орнитиновым циклом сопряжён **цикл регенерации аспартата из фумарата**. Пируват, образующийся в этом цикле из аланина, используется для глюконеогенеза.

Ещё одним источником аспартата для орнитинового цикла является трансаминирование глутамата с оксалоацетатом.

2. Энергетический баланс процесса

В реакциях орнитинового цикла расходуются четыре макроэргических связи трёх молекул

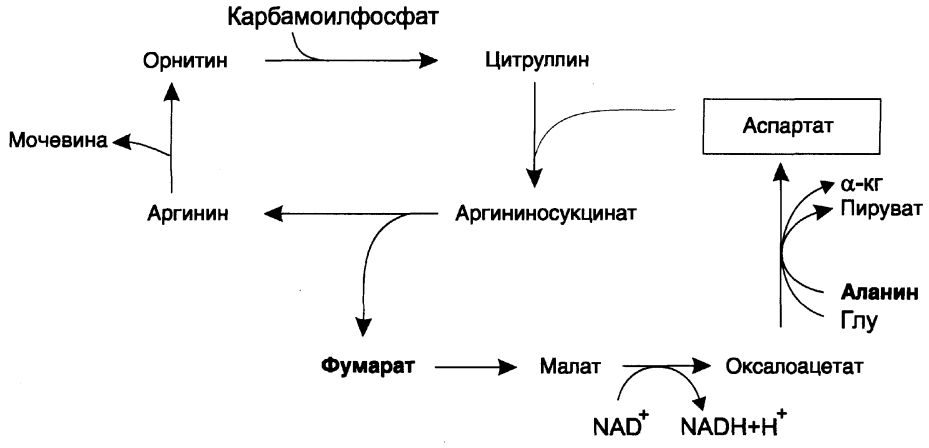


Рис. 9-17. Цикл регенерации аспартата, сопряжённый с орнитиновым циклом.

АТФ на каждый оборот цикла. Однако процесс превращения аминокислот в безазотистые остатки и мочевину имеет пути компенсации энергозатрат:

- при включении фумарата в ЦТК на стадии дегидрирования малата образуется NADH, который обеспечивает синтез 3 молекул АТФ (рис. 9-18);
- при окислительном дезаминировании глутамата в разных органах также образуется NADH, соответственно — ещё 3 молекулы АТФ.

Затраты энергии происходят также и при трансмембранном переносе веществ, связанном с синтезом и экскрецией мочевины (рис. 9-18). Первые две реакции орнитинового цикла происходят в митохондриях, а последующие три — в цитозоле. Цитруллин, образующийся в митохондрии, должен быть перенесён в цитозоль, а орнитин, образующийся в цитозоле, необходимо транспортировать в митохондрию. Кроме того, в почках перенос мочевины из крови в мочу происходит путём активного транспорта за счёт градиента ионов натрия, создаваемого K^+,Na^+-АТФ-азой, что тоже сопряжено с энергозатратами.

Полный набор ферментов орнитинового цикла есть только в гепатоцитах. Отдельные же ферменты орнитинового цикла обнаруживаются не только в печени, но и в других клетках. В энтероцитах, например, имеется карбамоилфосфатсинтетаза I и орнитинкарбамоилтрансфераза, следовательно, может синтезироваться цитруллин. В почках обнаружены аргининосукцинатсинтетаза и аргининосукцинатлиаза. Цитруллин, образовавшийся в энтероцитах, может поступать в почки и превращаться там в аргинин, который переносится в печень и гидролизуется аргиназой. Активность этих рассеянных по разным органам ферментов значительно ниже, чем в печени.

3. Биологическая роль орнитинового цикла Кребса—Гензелейта

Орнитиновый цикл в печени выполняет 2 функции:

- превращение азота аминокислот в мочевину, которая экскретируется и предотвращает накопление токсичных продуктов, главным образом аммиака;
- синтез аргинина и пополнение его фонда в организме.

Регуляторные стадии процесса — синтез карбамоилфосфата, синтез цитруллина и заключительная стадия, катализируемая аргиназой. Эффективность работы орнитинового цикла при нормальном питании человека и умеренных физических нагрузках составляет примерно 60% его мощности. Запас мощности необходим для избежания гипераммониемии при изменениях количества белка в пище. Увеличение скорости синтеза мочевины происходит при длительной физической работе или длительном голодании, которое сопровождается распадом тканевых белков. Некоторые патологические состояния, характеризующиеся интенсивным распадом бел-

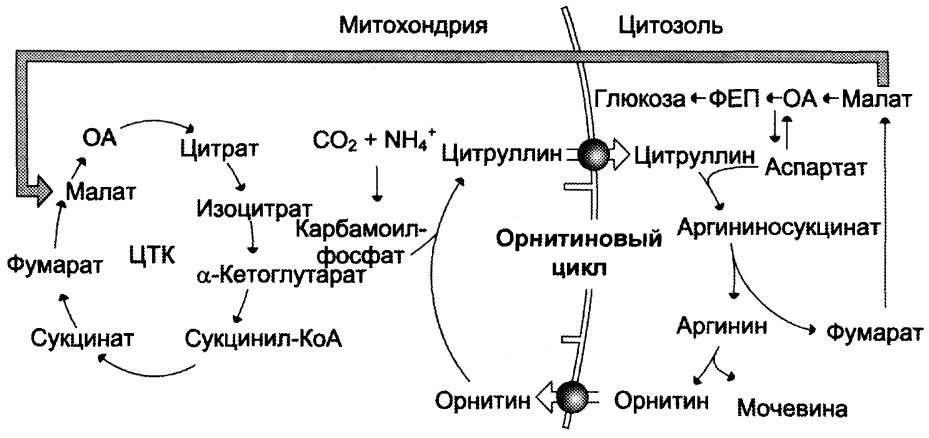


Рис. 9-18. Взаимосвязь орнитинового цикла и общего пути катаболизма. Фумарат, образующийся в результате расщепления аргининосукцината, превращается в малат, который затем переносится в митохондрии, включается в ЦТК и дегидрируется с образованием оксалоацетата. Эта реакция сопровождается выделением 3 молекул АТФ, которые и компенсируют затраты энергии на синтез одной молекулы мочевины.

ков тканей (сахарный диабет и др.), также сопровождаются активацией орнитинового цикла.

При избыточном белковом питании количество ферментов орнитинового цикла в печени увеличивается, что приводит к интенсификации синтеза мочевины.

4. Гипераммониемия

Нарушение реакций обезвреживания аммиака может вызвать **повышение содержания аммиака в крови** — гипераммониемию, что оказывает токсическое действие на организм. Причинами гипераммониемии могут выступать как генетический дефект ферментов орнитинового цикла в печени, так и вторичное поражение печени в результате цирроза, гепатита и других заболеваний. Известны пять наследственных заболеваний, обусловленных дефектом пяти ферментов орнитинового цикла (табл. 9-4).

В литературе описаны случаи всех этих довольно редких энзимопатий, среди которых отмечено больше всего случаев гипераммониемии II типа.

Нарушение орнитинового цикла наблюдается при гепатитах различной этиологии и некоторых других вирусных заболеваниях. Например, установлено, что вирусы гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций снижают активность карбамоилфосфатсинтетазы I. При циррозе и других заболеваниях печени также часто наблюдают гипераммониемию.

Снижение активности какого-либо фермента синтеза мочевины приводит к накоплению в крови субстрата данного фермента и его предшественников. Так, при дефекте аргининосукцинатсинтетазы повышается содержание цитруллина (цитруллинемия); при дефекте аргиназы — концентрация аргинина, аргининосукцината, цитруллина и т.д. При гипераммониемиях I и II типа вследствие дефекта орнитинкарбамоилтрансферазы происходит накопление карбамоилфосфата в митохондриях и выход его в цитозоль. Это вызывает увеличение скорости синтеза пиримидиновых нуклеотидов (вследствие активации карбамоилфосфатсинтетазы II), что приводит к накоплению оротата, уридина и урацила и выведению их с мочой. Содержание всех метаболитов повышается, и состояние больных ухудшается при увеличении количества белков в пище. Тяжесть течения заболевания зависит также от степени снижения активности ферментов.

Все нарушения орнитинового цикла приводят к значительному повышению в крови концентрации аммиака, глутамина и аланина.

Гипераммониемия сопровождается появлением следующих симптомов:

- тошнота, повторяющаяся рвота;
- головокружение, судороги;
- потеря сознания, отёк мозга (в тяжёлых случаях);
- отставание умственного развития (при хронической врождённой форме).

Таблица 9-4. Наследственные нарушения орнитинового цикла и основные их проявления

Заболевание	Дефект фермента	Тип наследования	Клинические проявления	Метаболиты	
				кровь	моча
Гипераммониемия, тип I	Карбамоилфосфатсинтетаза I	Аутосомно-рецессивный	В течение 24–48 ч после рождения кома, смерть	Глн Ала NH_3	Оротат
Гипераммониемия, тип II	Орнитинкарбамоилтрансфераза	Сцепленный с Х-хромосомой	Гипотония, снижение толерантности к белкам	Глн Ала NH_3	Оротат
Цитруллинемия	Аргининосукцинатсинтетаза	Аутосомно-рецессивный	Гипераммониемия тяжёлая у новорождённых. У взрослых — после белковой нагрузки	Цитруллин NH_3	Цитруллин
Аргининосукцинатурия	Аргининосукцинатлиаза	Аутосомно-рецессивный	Гипераммониемия, атаксия, судороги, выпадение волос	Аргининосукцинат NH_3	Аргининосукцинат, Глн, Ала, Лиз
Гипераргининемия	Аргиназа	Аутосомно-рецессивный	Гипераргининемия	Арг NH_3	Арг Лиз Орнитин

Все симптомы гипераммониемии — проявление действия аммиака на ЦНС (см. выше подраздел IV, Б).

Для диагностики различных типов гипераммониемии производят определение содержания аммиака в крови, метаболитов орнитинового цикла в крови и моче, активности фермента в биоптатах печени.

Основной диагностический признак — повышение концентрации аммиака в крови. Содержание аммиака в крови может достигать 6000 мкмоль/л (в норме — 60 мкмоль/л). Однако в большинстве хронических случаев уровень аммиака может повышаться только после белковой нагрузки или в течение острых осложнённых заболеваний.

Лечение больных с различными дефектами орнитинового цикла в основном направлено на снижение концентрации аммиака в крови за счёт малобелковой диеты, введения кетоаналогов аминокислот в рацион и стимуляцию выведения аммиака в обход нарушенных реакций:

- путём связывания и выведения NH_3 в составе фенилацетилглутамина и гиппуровой кислоты;
- повышением концентрации промежуточных метаболитов цикла (аргинина, цитруллина, глутамата), образующихся вне блокируемых реакций (рис. 9-19).

Вводимый больным с дефектом карбамоилфосфатсинтетазы I в качестве пищевой добавки фенилацетат в результате его конъюгации с глутамином образует фенилацетилглутамин, который экскретируется почками. Состояние больных при этом улучшается, так как происходит активация синтеза глутамина и снижение концентрации аммиака в крови (рис. 9-19, А).

Аналогичное действие оказывает введение бензоата, который связывает молекулу глицина. Образующаяся гиппуровая кислота выводится с мочой (рис. 9-19, Б). В составе гиппурата происходит выделение азота из организма. Недостаток глицина компенсируется либо путём синтеза его из серина, либо за счёт образования из NH_3 и CO_2 в реакции, катализируемой глицинсинтетазой. При этом образование глицина сопровождается связыванием одной молекулы аммиака.

При гипераммониемии II типа (дефект орнитинкарбамоилтрансферазы) введение больших

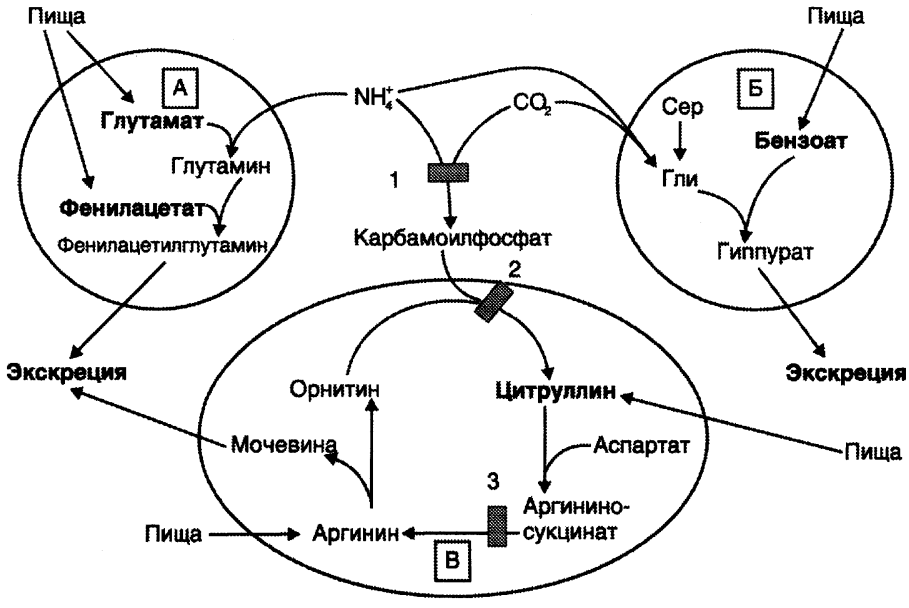


Рис. 9-19. Пути выведения аммиака при включении в диету глутамата и фенилацетата (А), бензоата (Б), цитруллина и аргинина (В). На рисунке обозначены ферментные блоки: 1 — дефект карбамоилфосфатсинтетазы I; 2 — дефект орнитинкарбамоилтрансферазы; 3 — дефект аргининосукцинатлиазы.

доз цитруллина стимулирует синтез мочевины из аспартата (рис. 9-19, В), что также приводит к выведению азота из организма. Введение больших доз аргинина при аргининосукцинатурии (дефект аргининосукцинатлиазы) стимулирует регенерацию орнитина и выведение азота в составе цитруллина и аргининосукцината.

Г. Обмен аммиака и аминокислот между органами и тканями

В катаболизме аминокислот и образовании аммиака участвуют многие ткани. В клетках происходит связывание аммиака. Из организма азот выводится почками в виде двух конечных продуктов азотистого обмена — аммонийных солей (~ 0,5 г/сут), которые образуются в почках, и мочевины (~25 г/сут), которая содержит до 90% выводимого азота. Синтез мочевины происходит в печени в орнитиновом цикле, причём на образование 1 моля мочевины используется 1 моль аммиака и 1 моль аспарагиновой кислоты. Таким образом, для синтеза 25 г мочевины в сутки затрачивается 6,3 г аммиака и 50 г аспартата. Для доставки азота в печень должны интенсивно функционировать специальные механизмы.

Транспорт азота из тканей в печень происходит, в основном, в составе 3 соединений: глутамина, аланина, аммиака (небольшое количество в несвязанном виде).

Кроме глутамина и аланина, в крови присутствуют и другие свободные аминокислоты, причём содержание их и направление транспорта зависят от приёма пищи и использования эндогенных белков. Наибольшее количество свободных аминокислот поступает из мышц и кишечника, причём до 50% составляют аланин и глутамин. Существует направленный поток аминокислот из этих тканей в печень, который усиливается в абсорбтивный период при белковом питании.

Основное количество глутамина поставляют в кровь **мышцы и мозг**. Из кровеносного русла его поглощают печень и почки, где он подвергается действию глутаминазы. **Почки** — основной источник серина и частично аланина, которые сорбируются из плазмы печенью. **Головной мозг**, в отличие от всех других тканей, способен поглощать и окислять большие количества аминокислот с разветвлённой боковой цепью (валин, лейцин, изолейцин).

После приёма пищи из кишечника в плазму крови поступает много аминокислот, причём

преобладают аминокислоты с разветвлённой боковой цепью (до 20% от общего количества), которые затем поглощаются, в основном, печенью, мышцами и мозгом (рис. 9-20). В мышцах происходит усиленный катаболизм этих аминокислот, причём они выступают основными донорами аминогруппы в синтезе аланина из пирувата (см. выше «глюкозо-аланиновый цикл»).

В постабсорбтивном периоде основными источниками свободных аминокислот служат мышцы. Они поставляют в основном аланин и глутамин (рис. 9-21). Аланин поглощается печенью, глутамин — кишечником и почками. В кишечнике азот глутамина переносится в аланин или серин и в их составе транспортируется в печень, где активируется процесс глюконеогенеза. Интенсивность глюконеогенеза из этих аминокислот намного выше, чем из всех других. Таким образом, аланин и серин — основные гликогенные аминокислоты. Аминокислоты с разветвлённой боковой цепью (валин, лейцин, изолейцин и др.), которые освобождаются из мышц, направляются в мозг, где окисляются и служат важным источником энергии.

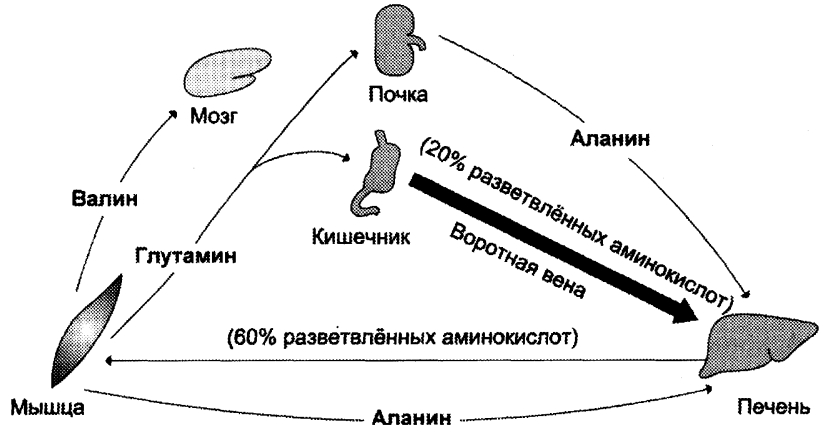


Рис. 9-20. Обмен аминокислот между тканями и органами в абсорбтивном периоде. В абсорбтивный период основным источником свободных аминокислот служит кишечник. Большую часть поступивших аминокислот составляют гидрофобные аминокислоты с разветвлённой цепью. Экзогенные полярные аминокислоты из воротной вены сорбируются и используются в основном печенью. Разветвлённые аминокислоты поглощаются из кровотока клетками мозга или мышц.

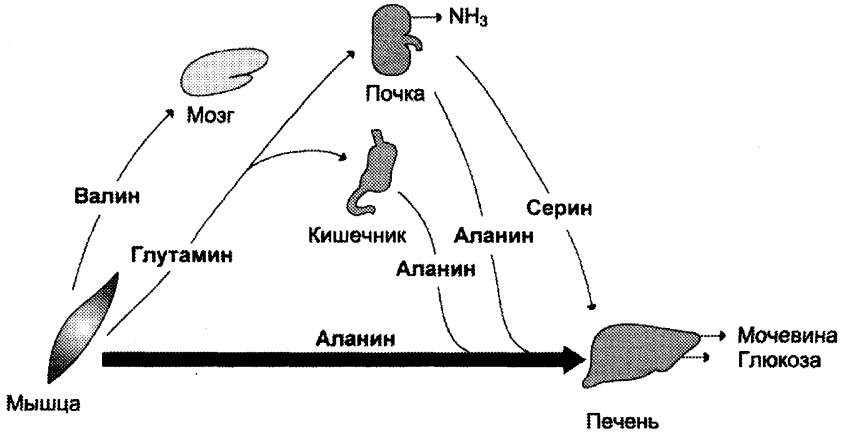


Рис. 9-21. Обмен аминокислот между тканями и органами в постабсорбтивном периоде. В постабсорбтивный период свободные аминокислоты поступают преимущественно из мышц, в которых усиливается катаболизм белков. Аминокислоты используются в глюконеогенезе в печени. В крови повышен уровень аланина, серина и глутамина.

VI. ПУТИ ОБМЕНА БЕЗАЗОТИСТОГО ОСТАТКА АМИНОКИСЛОТ

В ходе катаболизма аминокислот происходит отщепление аминогруппы и выделение аммиака. Другим продуктом дезаминирования аминокислот служит их безазотистый остаток в виде α-кетокислот. Катаболизм аминокислот происходит практически постоянно. За сутки в норме в организме человека распадается примерно 100 г аминокислот, и такое же количество должно поступать в составе белков пищи.

Большая часть безазотистых остатков аминокислот превращается в пируват либо непосредственно (Ала, Сер), либо в результате более сложного пути, превращаясь вначале в один из метаболитов ЦТК. Затем в реакциях цитратного цикла происходит образование оксалоацетата, который превращается в фосфоенолпируват. Из фосфоенолпирувата под действием пируваткиназы образуется пируват. Пируват подвергается окислительному декарбоксилированию и превращается в ацетил-КоА, который окисляется в ЦТК до CO_2 и H_2O с выделением энергии. Такой путь проходят преимущественно аминокислоты пищи.

При недостатке глюкозы в организме фосфоенолпируват включается в глюконеогенез (см. раздел 7). Это происходит при голодании, длительной физической работе, при сахарном диабете и других тяжёлых хронических заболеваниях, сопровождающихся распадом собственных белков организма. Скорость глюконеогенеза из аминокислот регулируется гормонами. Так, под действием глюкагона увеличивается активность регуляторных ферментов процесса, а кортизол индуцирует синтез ферментов глюконеогенеза в печени. Активация глюконеогенеза из аминокислот происходит и при преимущественно белковом питании.

А. Гликогенные и кетогенные аминокислоты

Катаболизм всех аминокислот сводится к образованию шести веществ, вступающих в общий путь катаболизма: **пируват, ацетил-КоА, α-кетоглутарат, сукцинил-КоА, фумарат, оксалоацетат** (рис. 9-22).

Аминокислоты, которые превращаются в пируват и промежуточные продукты ЦТК (α-КГ, сукцинил-КоА, фумарат) и образуют в конечном итоге оксалоацетат, могут использоваться в

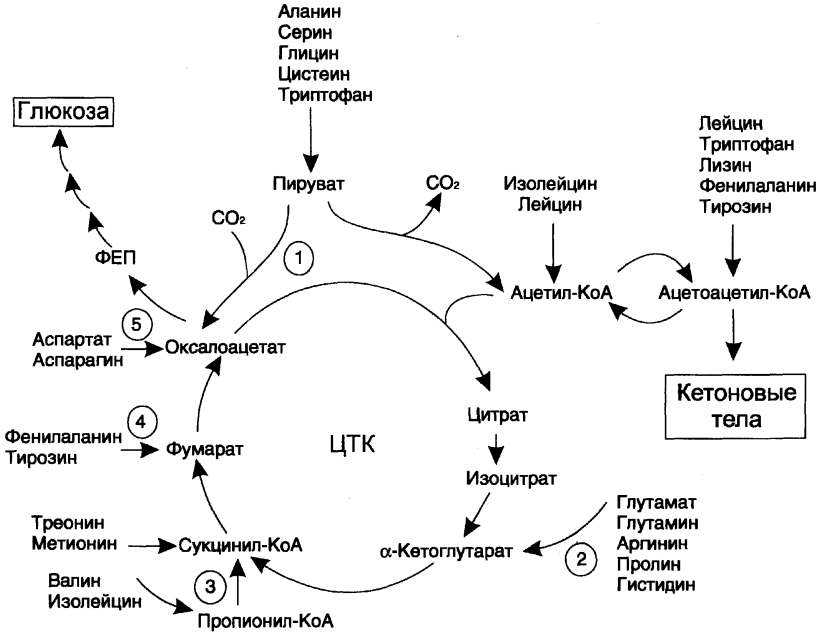


Рис. 9-22. Включение безазотистого остатка аминокислот в общий путь катаболизма.

процессе глюконеогенеза. Такие аминокислоты относят к группе **гликогенных аминокислот**.

Некоторые аминокислоты в процессе катаболизма превращаются в ацетоацетат (Лиз, Лей) или ацетил-КоА (Лей) и могут использоваться в синтезе кетоновых тел. Такие аминокислоты называют **кетогенными**.

Ряд аминокислот используется и для синтеза глюкозы, и для синтеза кетоновых тел, так как в процессе их катаболизма образуются 2 продукта — определённый метаболит цитратного цикла и ацетоацетат (Три, Фен, Тир) или ацетил-КоА (Иле). Такие аминокислоты называют смешанными, или **глико-кетогенными** (рис. 9-22, табл. 9-5).

Таблица 9-5. Классификация аминокислот по судьбе безазотистого остатка

Гликогенные аминокислоты	Глико-кетогенные аминокислоты	Кетогенные аминокислоты
Аланин	Тирозин	Лейцин
Аспарагин	Изолейцин	Лизин
Аспартат	Фенилаланин	
Глицин	Триптофан	
Глутамат		
Глутамин		
Пролин		
Серин		
Цистеин		
Аргинин		
Гистидин		
Валин		
Метионин		
Треонин		

Б. Анаплеротические реакции

Безазотистые остатки аминокислот используются для восполнения того количества метаболитов общего пути катаболизма, которое затрачивается на синтез биологически активных веществ. Такие реакции называют анаплеротическими. На рисунке 9-22 выделены пять анаплеротических реакций:

1. Аминокислоты → Пируват (CO_2) → Оксалоацетат

Фермент пируваткарбоксилаза (кофермент — биотин), катализирующий эту реакцию, обнаружен в печени и мышцах.

2. Аминокислоты → Глутамат → α-Кетоглутарат

Превращение происходит во многих тканях под действием глутаматдегидрогеназы или аминотрансфераз.

3. Валин, Изолейцин → Пропионил-КоА → Сукцинил-КоА

Пропионил-КоА, а затем и сукцинил-КоА могут образоваться также при распаде высших жирных кислот с нечётным числом атомов углерода (см. раздел 8).

4. Аминокислоты → Фумарат
5. Аминокислоты → Оксалоацетат

Реакции 2, 3 происходят во всех тканях (кроме печени и мышц), где отсутствует пируваткарбоксилаза, а реакции 4 и 5 — в основном в печени. Реакции 1 и 3 (рис. 9-22) — **основные анаплеротические реакции**.

VII. БИОСИНТЕЗ ЗАМЕНИМЫХ АМИНОКИСЛОТ

В организме человека возможен синтез восьми заменимых аминокислот: Ала, Асп, Асн, Сер, Гли, Глу, Глн, Про (рис. 9-23). Углеродный скелет этих аминокислот образуется из глюкозы. α-Аминогруппа вводится в соответствующие α-кетокислоты в результате реакций трансаминирования. **Универсальным донором α-аминогруппы служит глутамат**.

Путём трансаминирования α-кетокислот, образующихся из глюкозы, синтезируются аминокислоты (см. схему А на с. 492).

Глутамат также образуется при восстановительном аминировании α-кетоглутарата глутаматдегидрогеназой.

Эти реакции обратимы и играют большую роль как в процессе синтеза аминокислот, так и при их катаболизме. Такие реакции, выполняющие двойную функцию, называют амфиболическими.

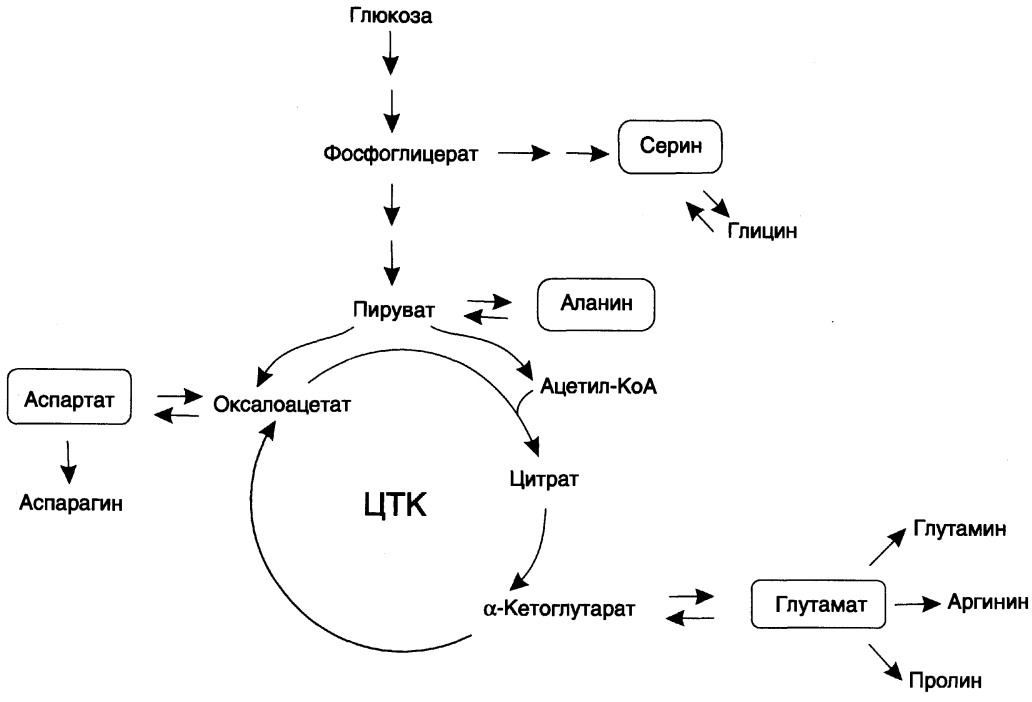


Рис. 9-23. Пути биосинтеза заменимых аминокислот.

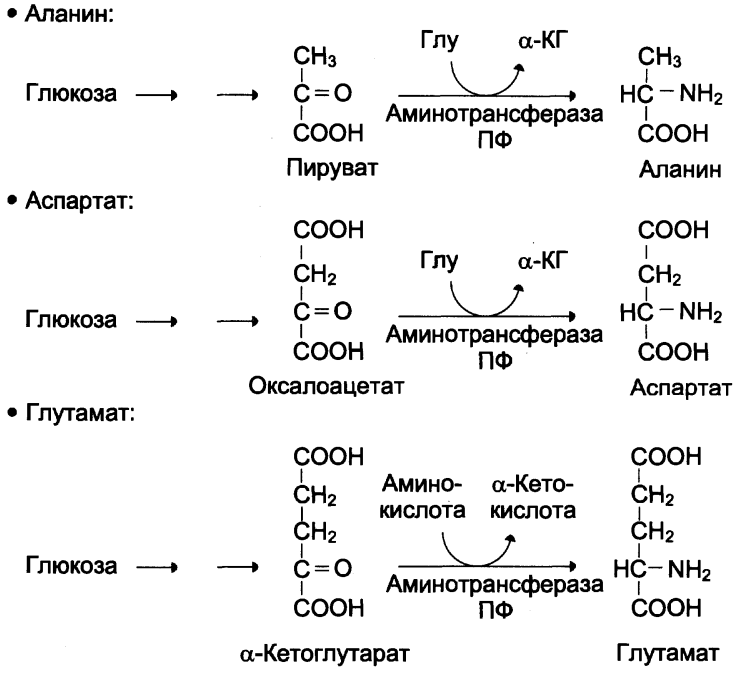
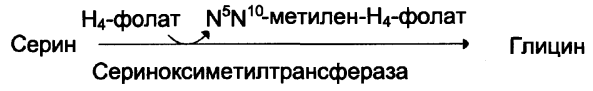


Схема А

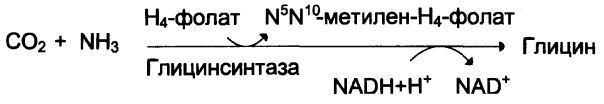
Амиды глутамин и аспарагин синтезируются из соответствующих дикарбоновых аминокислот Глу и Асп (см. схему А).

- **Серин** образуется из 3-фосфоглицерата — промежуточного продукта гликолиза, который окисляется до 3-фосфопирувата и затем трансаминируется с образованием серина (см. схему Б).
- Существует **2 пути синтеза глицина**:

1) из серина с участием производного фолиевой кислоты в результате действия сериноксиметилтрансферазы:



2) в результате действия фермента глицинсинтазы в реакции:

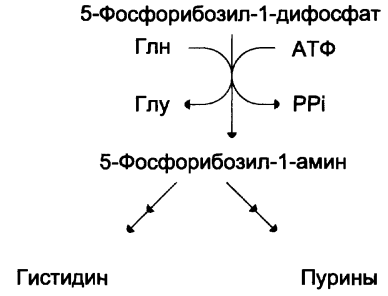


- **Пролин** синтезируется из глутамата в цепи обратимых реакций. Эти же реакции используются и при катаболизме пролина (см. схему В на с. 494).

Кроме восьми перечисленных заменимых аминокислот, в организме человека могут синтезироваться ещё четыре аминокислоты.

Частично заменимые аминокислоты Арг и Гис синтезируются сложным путём в небольших количествах. Большая их часть должна поступать с пищей.

- Синтез аргинина происходит в реакциях орнитинового цикла (см. выше подраздел IV);
- Гистидин синтезируется из АТФ и рибозы. Часть имидазольного цикла гистидина — N=CH—NH— образуется из пуринового ядра аденина, источником которого служит АТФ, остальная часть молекулы — из атомов рибозы. При этом образуется 5-фосфорибозиламин, который кроме синтеза гистидина необходим для синтеза пуринов.



Для синтеза условно заменимых аминокислот тирозина и цистеина требуются незаменимые аминокислоты фенилаланин и метионин соответственно (см. подразделы VIII и IX).

Образование других аминокислот также возможно при наличии соответствующих α-кетокис-

Схема А

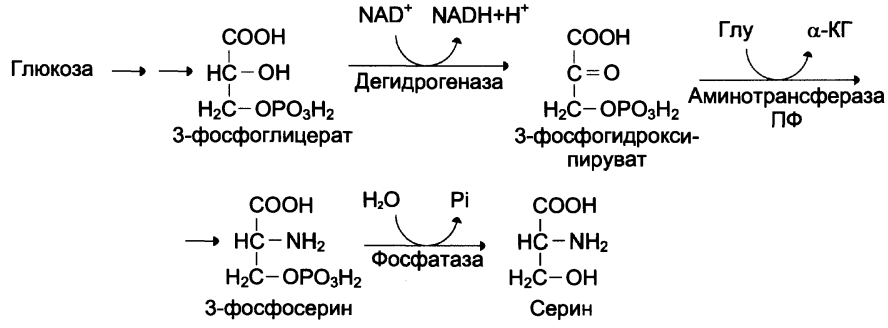


Схема Б

Схема В

лот, которые могут трансаминироваться с глутаматом. Таким образом, незаменимой частью молекулы аминокислот является их углеродный скелет. Источником таких незаменимых α-кетокислот служат только белки пищи. Исключение составляют **лизин и треонин**, которые не подвергаются трансаминированию, их α-кетоаналоги с пищей практически не поступают и в организме не синтезируются. Единственный источник этих аминокислот — пищевые белки.

VIII. ОБМЕН ОТДЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Кроме общих путей обмена, характерных для большинства аминокислот, существуют и специфические пути превращения почти всех аминокислот, входящих в состав белков. Рассмотрим обмен некоторых аминокислот, пути превращения которых приводят к синтезу биологически активных продуктов и во многом определяют физиологические состояния в организме человека.

А. Обмен серина и глицина

Серин — заменимая аминокислота, синтезируется из промежуточного продукта гликолиза — 3-фосфоглицерата, а аминогруппу получает от глутаминовой кислоты.

Глицин — также заменимая аминокислота, основным источником которой служит серин. Реакцию синтеза глицина из серина катализирует фермент серин-оксиметилтрансфераза, коферментом которой является H_4-фолат (см. схему А).

Реакция превращения серина в глицин легко обратима. **Основной путь катаболизма глицина** у человека и других позвоночных также связан с использованием H_4-фолата (см. схему Б).

Эта реакция обратима и катализируется глицинсинтазой — ферментным комплексом, похожим на пируватдегидрогеназный комплекс, и локализованным в митохондриях клеток печени. По последним данным глицинрасщепляющая ферментная система несколько отличается от глицинсинтазы и содержит 4 белка: Р-белок, включающий кофермент ПФ, Н-белок, содержащий липоевую кислоту, Т-белок с коферментом H_4-фолат, L-белок, являющийся дигидролипоилдегидрогеназой с коферментом NAD^+.

1. Пути метаболизма серина и глицина

Аминокислоты серин и глицин выполняют в организме человека разнообразные и очень важные функции. Роль серина и глицина в синтезе многих биологически важных соединений представлена на рис. 9-24.

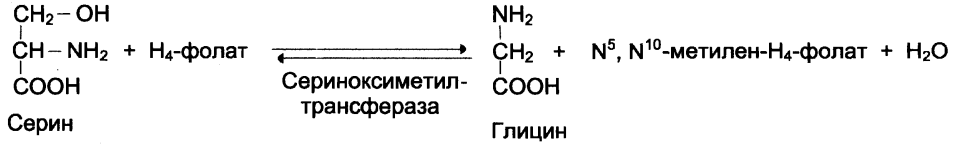


Схема А

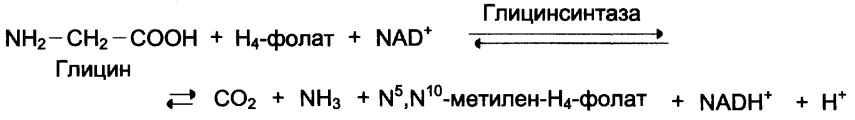


Схема Б

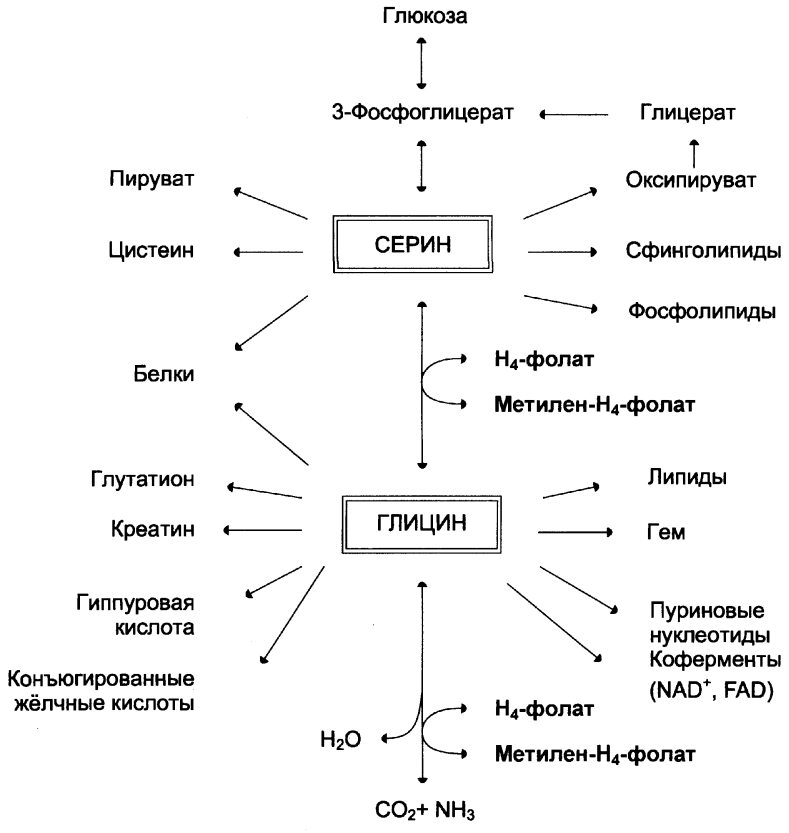


Рис. 9-24. Биологическая роль серина и глицина.

На рисунке видно, что обе аминокислоты необходимы не только для синтеза белков и глюкозы (при её недостатке в клетках), но и нуклеотидов, коферментов, гема, сложных липидов, креатина и других соединений. Многие из этих реакций представлены в соответствующих разделах учебника.

2. Роль фолиевой кислоты в обмене аминокислот

В превращениях серина и глицина главную роль играют ферменты, коферментами которых служат производные фолиевой кислоты. Этот витамин широко распространён в животных и растительных пищевых продуктах (см. раздел 3). Молекула фолиевой кислоты (фолата) состоит из 3 частей: птеринового производного, парааминобензойной и глутаминовой кислот (см. схему А на с. 496).

Фолиевую кислоту (фолат) называют также птероилглутаминовой кислотой. Птерины широко распространены в природе. Некоторые из них, например ксантоптерин, являются пигментами глаз и крыльев насекомых (бабочек).

Коферментную функцию выполняет восстановленная форма фолата — тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК или H_4-фолат) (см. схему Б на с. 496).

Фолиевая кислота в печени превращается в H_4-фолат в несколько стадий с участием ферментов фолатредуктазы и дигидрофолатредуктазы, коферментом которых служит NADPH.

H_4-фолат — акцептор β-углеродного атома серина. При этом образуется метиленовый мостик между атомами азота в молекуле H_4-фолата в положениях 5 и 10, образуя метилен-H_4-фолат (см. схему В на с. 496).

3. Образование и использование одноуглеродных фрагментов

Особое значение реакций катаболизма серина и глицина заключается в том, что они сопровождаются образованием одноуглеродного

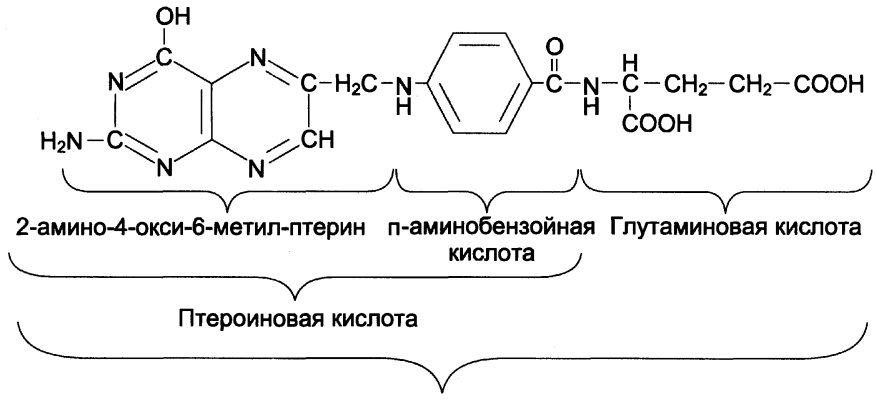


Схема А

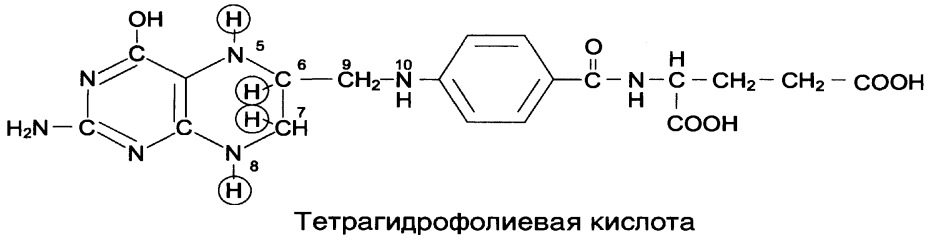


Схема Б

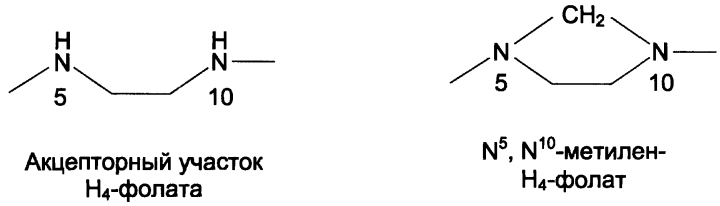


Схема В

метиленового фрагмента (-CH_2-). Метиленовая группа в молекуле метилен-H_4-фолата может превращаться в другие одноуглеродные группы (фрагменты): метенильную (-CH=), формильную (-HC=O), метильную (-CH_3) и формиминогруппу (-CH=NH) (рис. 9-25).

Ещё один источник формильного и формимино-фрагментов — гистидин. Катаболизм гистидина происходит только в печени (очень небольшой процент в коже) в результате следующих реакций (см. схему на с. 498).

Конечными продуктами катаболизма гистидина являются глутамат, NH_3 и одноуглеродные фрагменты — формимино-H_4-фолат и формил-H_4-фолат.

Все образующиеся производные H_4-фолата играют роль промежуточных переносчиков и служат донорами одноуглеродных фрагментов при синтезе некоторых соединений: пуриновых оснований и тимидиловой кислоты (необходимых для синтеза ДНК и РНК), регенерации метионина, синтезе различных фор-

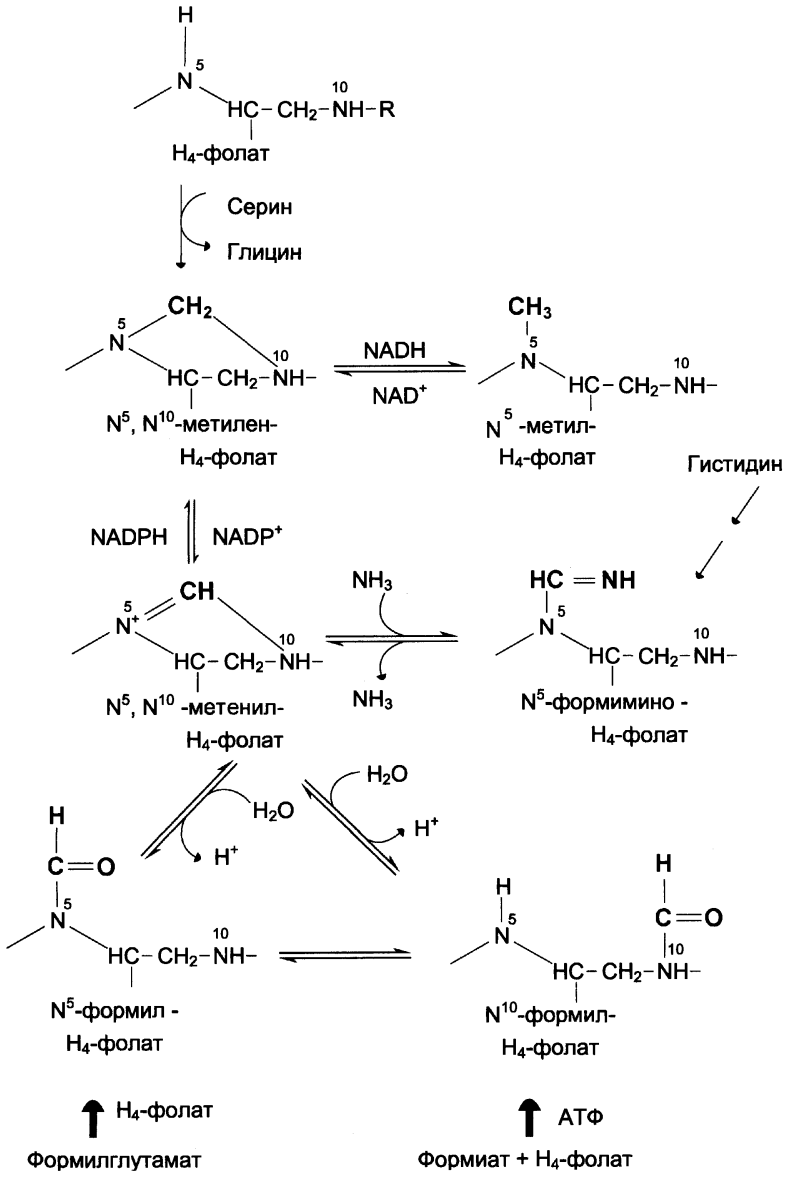


Рис. 9-25. Образование производных H_4-фолата.

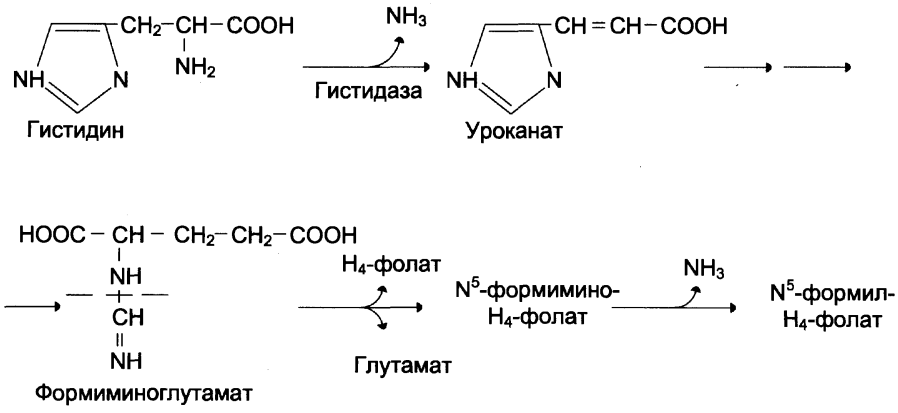
миминопроизводных (формиминоглицина и т.д.) (рис. 9-26).

Перенос одноуглеродных фрагментов к акцептору необходим не только для синтеза ряда соединений, но и для регенерации свободного H_4-фолата в печени.

4. Недостаточность фолиевой кислоты

Недостаточность фолиевой кислоты у человека возникает редко (см. раздел 3). Гиповитаминоз фолиевой кислоты приводит к нарушению обмена одноуглеродных фрагментов. Такое же нарушение наблюдается и при недостаточности витамина B_{12}, использование которого связано с обменом фолиевой кислоты (см. подраздел IX).

Первое проявление дефицита фолиевой кислоты — мегалобластная (макроцитарная) анемия. Она характеризуется уменьшением количества эритроцитов, снижением содержания в



Схема

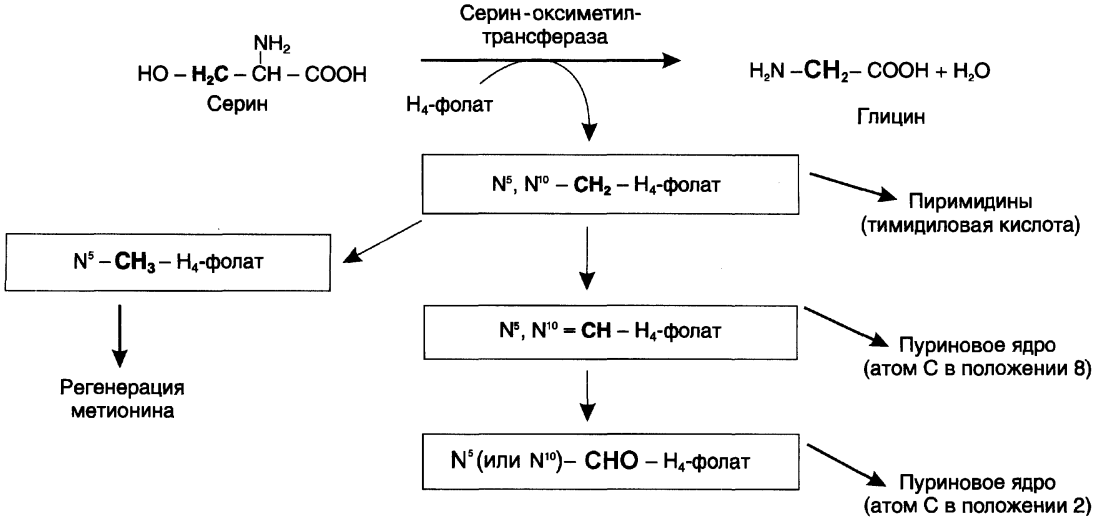


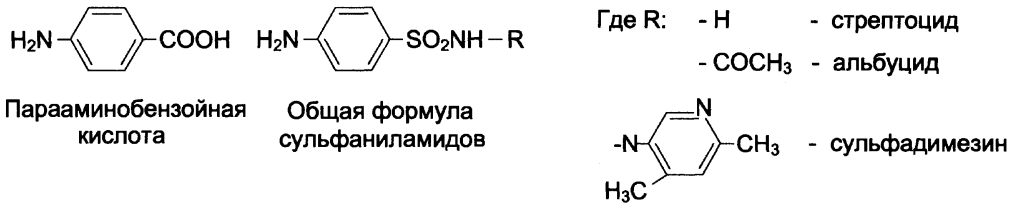
Рис. 9-26. Образование и использование производных H_4-фолата.

них гемоглобина, что вызывает увеличение размера эритроцитов. Причина этих симптомов — нарушение синтеза ДНК и РНК из-за недостатка их предшественников — тимидиловой кислоты и пуриновых нуклеотидов вследствие дефицита производных H_4-фолата. Клетки кроветворной ткани быстро делятся, поэтому они в первую очередь реагируют на нарушение синтеза нуклеиновых кислот снижением скорости эритропоэза.

Мегалобластная анемия возникает чаще всего в результате недостаточности фолиевой кислоты и/или витамина B_{12}.

5. Механизм антибактериального действия сульфаниламидных препаратов

Фолиевая кислота является витамином для человека и животных. Однако многие патогенные бактерии способны синтезировать это соединение, используя парааминобензойную кислоту (ПАБК) — одну из составных частей фолата. ПАБК поступает в бактериальные клетки из внешней среды. Сульфаниламидные лекарственные препараты — производные сульфаниламида (белого стрептоцида), похожи по строению на парааминобензойную кислоту. Отличаются они только радикалами (см. схему на с. 499).



Парааминобензойная кислота

Общая формула сульфаниламидов

Схема

Эти препараты подавляют синтез фолиевой кислоты у бактерий, потому что:

- конкурентно ингибируют бактериальные ферменты синтеза фолата, так как являются структурными аналогами парааминобензойной кислоты — одного из субстратов процесса;
- могут использоваться как псевдосубстраты из-за относительной субстратной специфичности ферментов, в результате чего синтезируется соединение, похожее на фолиевую кислоту, но не выполняющее её функции.

В обоих случаях в клетках бактерий нарушается обмен одноуглеродных фрагментов и, следовательно, синтез нуклеиновых кислот, что вызывает прекращение размножения бактерий.

В клетках больного сульфаниламидные лекарственные вещества не вызывают подобных изменений, поскольку человек получает с пищей готовую фолиевую кислоту.

6. Наследственные нарушения обмена глицина

В настоящее время известно несколько заболеваний, связанных с нарушениями обмена глицина. В их основе лежит недостаточность какого-либо фермента или дефект системы транспорта этой аминокислоты. Некоторые из этих нарушений представлены ниже.

Гиперглицинемия характеризуется повышенной концентрацией глицина в крови вследствие дефекта глицинрасщепляющей ферментной системы. Наиболее тяжёлое проявление гиперглицинемии — резкое повреждение мозга, судороги, гипотония, нарушение дыхания.

Глицинурия характеризуется повышенным выделением глицина с мочой (до 1 г/сут) при нормальном содержании его в крови. Один из симптомов этого заболевания — образование оксалатных камней в почках, причём содержание оксалата в моче находится в пределах нормы. Избыток оксалата имеет эндогенное происхождение. Скорее всего, он получается из глицина, при дезаминировании которого образуется глиоксилат — предшественник оксалата. Метаболический дефект, очевидно, состоит в нарушении метаболизма глиоксилата — невозможности его превращения снова в глицин из-за дефекта глицинаминотрансферазы. Причиной глицинурии является, очевидно, нарушение реабсорбции глицина в почках. Наследуется как доминантный признак, сцепленный, вероятно, с Х-хромосомой.

Первичная гипероксалатурия характеризуется постоянно высоким выделением оксалата с мочой, независимо от поступления его с пищей. В дальнейшем прогрессирует двустороннее образование оксалатных камней в мочевыводящих путях, развиваются нефрокальциноз и инфекция мочевыводящих путей. Больные погибают в детском возрасте от почечной недостаточности или гипертонии.

Б. Обмен серосодержащих аминокислот

В состав белков человека входят 2 аминокислоты, содержащие серу, — метионин и цистеин. Эти аминокислоты метаболически тесно связаны между собой.

1. Особенности обмена метионина

Метионин — незаменимая аминокислота. Она необходима для синтеза белков организма, участвует в реакциях дезаминирования, является источником атома серы для синтеза цистеина. Метионил-тРНК участвует в инициации процесса трансляции.

Метильная группа метионина — мобильный одноуглеродный фрагмент, используемый для синтеза ряда соединений. Перенос метильной группы метионина на соответствующий акцептор называют реакцией трансметилирования, имеющей важное метаболическое значение.

Метильная группа в молекуле метионина прочно связана с атомом серы, поэтому непосредственным донором этого одноуглеродного фрагмента служит активная форма аминокислоты.

Реакция активации метионина

Активной формой метионина является S-аденозилметионин (SAM) — сульфониевая форма аминокислоты, образующаяся в результате присоединения метионина к молекуле аденозина. Аденозин образуется при гидролизе АТФ (см. схему А).

Эту реакцию катализирует фермент метионин аденозилтрансфераза, присутствующий во всех типах клеток. Структура ($-S^+-CH_3$) в SAM — нестабильная группировка, определяющая высокую активность метильной группы (отсюда термин «активный метионин»). Эта реакция уникальна для биологических систем, так как, по-видимому, является единственной известной реакцией, в результате которой освобождаются все три фосфатных остатка АТФ.

Отщепление метильной группы от SAM и перенос её на соединение-акцептор катализируют ферменты метилтрансферазы. SAM в ходе реакции превращается в S-аденозилгомоцистеин (SAГ).

Примеры реакций трансметилирования

Синтез фосфатидилхолина из фосфатидилэтаноламина

Фосфатидилхолины (лецитины) — наиболее распространённая группа глицерофосфолипидов, участвующих в образовании мембран клеток и липопротеинов, в составе которых осуществляется транспорт липидов (см. раздел 8) (см. схему Б).

Синтез карнитина

Карнитин — переносчик жирных кислот через мембрану митохондрий (см. раздел 8) (см. схему А на с. 501).

Синтез креатина

Креатин необходим для образования в мышцах высокоэнергетического соединения — креатинфосфата. Синтез креатина идёт в 2 стадии с участием 3 аминокислот: аргинина, глицина и метионина. **В почках** образуется гуанидинацетат при действии глицинамидинотрансферазы (см. схему Б на с. 501).

Затем гуанидинацетат транспортируется **в печень**, где происходит реакция его метилирования (см. схему В на с. 501).

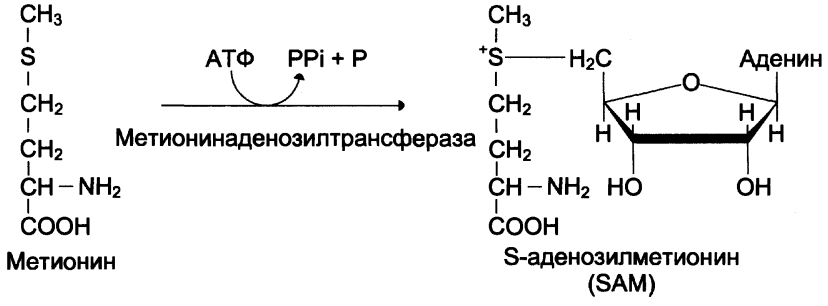


Схема А

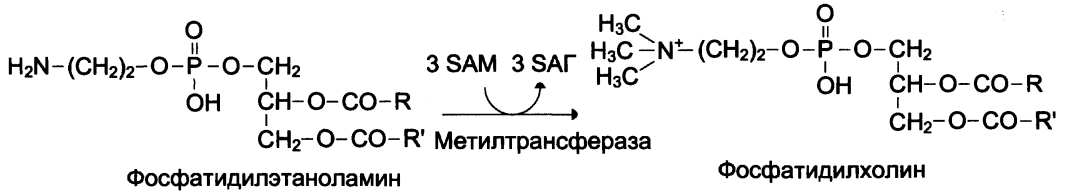


Схема Б

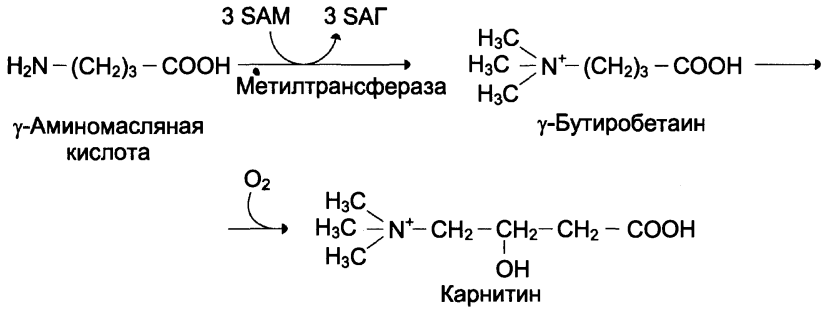


Схема А

Схема Б

Схема В

Креатин с кровотоком переносится **в мышцы и клетки мозга**, где из него образуется высокоэнергетическое соединение — креатинфосфат. (см. схему А на с. 502).

Эта реакция легко обратима и катализируется ферментом креатинкиназой. Фермент локализован в цитозоле и митохондриях клеток, обладает органоспецифичностью. В норме активность его в крови очень мала. Обнаружено три изоферментные формы креатинкиназы (см. раздел 2).

Креатинфосфат играет важную роль в обеспечении энергией работающей мышцы в начальный период. В результате неферментативного дефосфорилирования, главным образом в мышцах, креатинфосфат превращается в креатинин, выводимый с мочой. Суточное выделение креатинина у каждого индивидуума постоянно и пропорционально общей мышечной массе (см. схему Б на с. 502).

Определение содержания креатина и креатинина в крови и моче используется для характеристики интенсивности работы мышц в спортивной медицине и при некоторых патологических состояниях. Определение активности фермента креатинкиназы и его изоферментных форм в

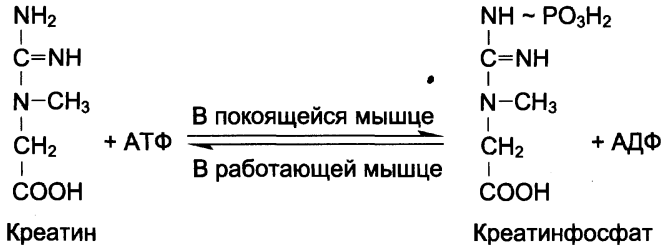


Схема А

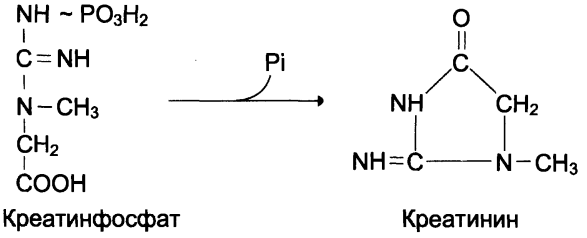


Схема Б

крови используется в медицине для диагностики таких заболеваний, как инфаркт миокарда, миопатии, мышечные дистрофии и др.

Реакции трансметилирования используются также для:

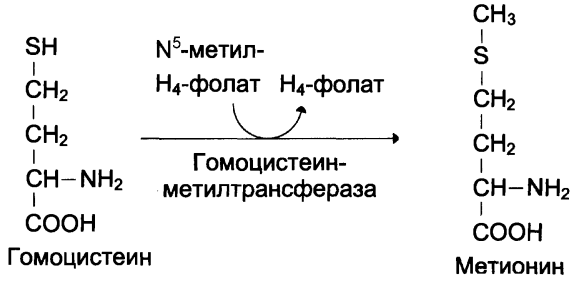
- синтеза адреналина из норадреналина;
- синтеза анзерина из карнозина;
- метилирования азотистых оснований в нуклеотидах и др. (см. раздел 10);
- инактивации метаболитов (гормонов, медиаторов и др.) и обезвреживания чужеродных соединений, включая и лекарственные препараты (см. подразд. IX, раздел 12).

Регенерация метионина

Реакции метилирования играют важную роль в организме и протекают очень интенсивно. Это вызывает большой расход метионина, так как он является незаменимой аминокислотой (в клетках метионин синтезироваться не может). В связи с этим большое значение приобретает возможность регенерации метионина с участием заменимых аминокислот (Сер, Гли). В результате отщепления метильной группы SAM превращается в S-аденозилгомоцистеин (SAГ), который при действии гидролазы расщепляется на аденозин и гомоцистеин.

S-аденозилгомоцистеин + H_2O → Аденозин + Гомоцистеин

Гомоцистеин может снова превращаться в метионин под действием гомоцистеинметилтрансферазы. Донором метильной группы в этом случае служит N^5-метил-H_4-фолат:



Промежуточным переносчиком метильной группы в этой реакции служит производное витамина B_{12} — метилкобаламин, выполняющий роль кофермента.

Метионин — незаменимая аминокислота, однако может регенерироваться из гомоцистеина. Следовательно, незаменим именно гомоцистеин, но единственным его источником в организме служит метионин. В пище гомоцистеина крайне мало, поэтому потребности человека в метионине и гомоцистеине обеспечиваются только метионином пищи. Общая схема метаболизма метионина, связанная с обменом одноуглеродных фрагментов, представлена на рис. 9-27.

Первичным донором одноуглеродных фрагментов является серин. Образовавшийся N^5,N^{10}-метилен-H_4-фолат восстанавливается до N^5-метил-H_4-фолата, передающего метильную группу на кобаламин (витамин B_{12}). Метилкобаламин непосредственно участвует в регенерации метионина. Гомоцистеин может использоваться также для синтеза цистеина.

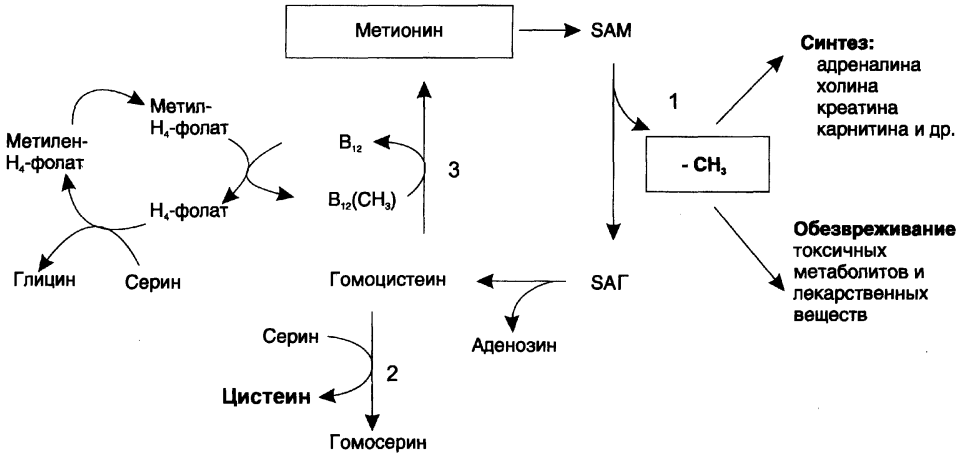


Рис. 9-27. Метаболизм метионина. 1 — реакции трансметилирования; 2 — синтез цистеина; 3 — регенерация метионина.

2. Обмен цистеина

Вторая серосодержащая аминокислота — цистеин. Она условно заменима, так как для её синтеза необходим атом серы, источником которого служит незаменимая аминокислота метионин.

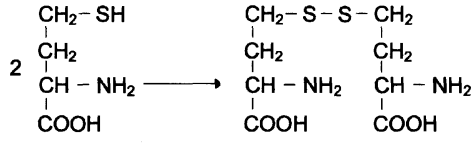
Для синтеза цистеина необходимы 2 аминокислоты:

Серин — источник углеродного скелета;

Метионин — первичный источник атома S (см. схему А).

Синтез цистеина из гомоцистеина происходит в 2 стадии под действием пиридоксальзависимых ферментов цистатионинсинтазы и цистатионинлиазы (см. схему Б на с. 504).

При нарушении использования гомоцистеина в организме из него образуется гомоцистин:



Гомоцистин может накапливаться в крови и тканях, выделяться с мочой, вызывая **гомоцистинурию**. Возможной причиной является наследственное нарушение обмена гомоцистеина либо гиповитаминоз фолиевой кислоты, а также витаминов B_{12} и B_6. Из других биохимических нарушений можно отметить **цистатионинурию**, также часто возникающую при недостаточности витаминов группы В.

Биологические функции цистеина разнообразны и очень важны для организма. Так, цистеин, входящий в состав белков, играет необычайно важную роль в их фолдинге, поскольку тиогруппы цис способны образовывать прочную дисульфидную связь. При этом 2 остатка цистеина формируют молекулу цистина (см. схему В на с. 504).

Окислительная реакция протекает либо с участием кофермента NAD^+ под действием фермента цистеинредуктазы, либо неферментативно. Дисульфидные связи стабилизируют пространственную структуру полипептидной цепи или связывают между собой 2 цепи (например, А- и В-цепи гормона инсулина). Очень многие белки и ферменты в активном центре содержат SH-группы, участвующие в катализе. При их окислении ферментативная активность падает (см. разделы 1, 2). Восстановление SH-групп часто

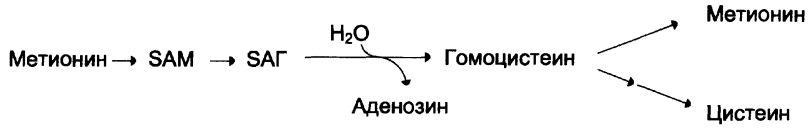


Схема А

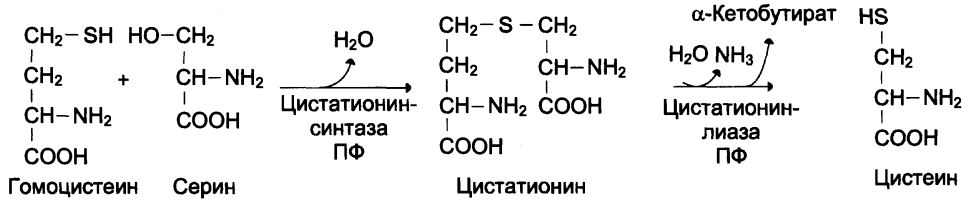


Схема Б

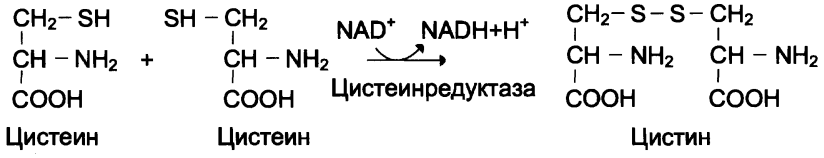
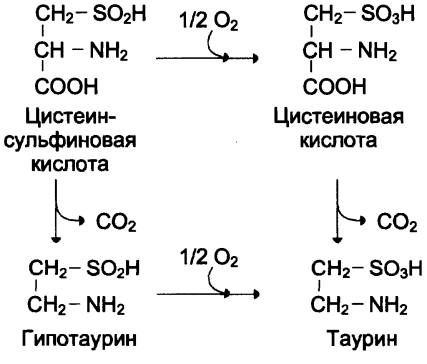


Схема В

происходит с использованием глутатиона — атипичного трипептида, содержащего γ-глутаминовую кислоту, цистеин и глицин (см. схему Г).

Глутатион способен существовать в 2 формах — восстановленной (Г-SH) и окисленной (Г-S-S-Г) и служит активным антиоксидантом в организме человека.

Ещё одним важным путём использования цистеина можно считать **синтез таурина** в животных тканях, который происходит путём декарбоксилирования производных цистеина — цистеиновой и цистеинсульфиновой кислот:



Таурин необходим для синтеза парных жёлчных кислот в печени. Кроме того, он очень важен в клетках как антиоксидант и используется для снижения ПОЛ и связывания гипохлорит-аниона (в форме хлораминового комплекса).

Цистеин также служит предшественником тиоэтаноламинового фрагмента HS-KoA (кофермента А).

Катаболизм цистеина происходит окислительным путём (см. схему А на с. 505).

Сульфит, который получается в реакции, превращается в сульфат и выводится с мочой, либо превращается в эфиро-серные кислоты, которые также экскретируются почками. Цистеин — практически единственный источник сульфатов мочи.

Пути использования цистеина представлены на схеме (см. схему Б на с. 505).

В. Метаболизм фенилаланина и тирозина

Фенилаланин — незаменимая аминокислота, так как в клетках животных не синтезируется её бензольное кольцо. Тирозин — условно заменимая аминокислота, поскольку образуется из фенилаланина. Содержание этих аминокислот в пищевых белках (в том числе и растительных) достаточно велико. Фенилаланин и тирозин используются для синтеза многих био-

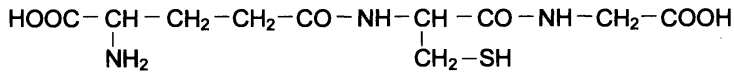


Схема Г **Глутатион**

Схема А

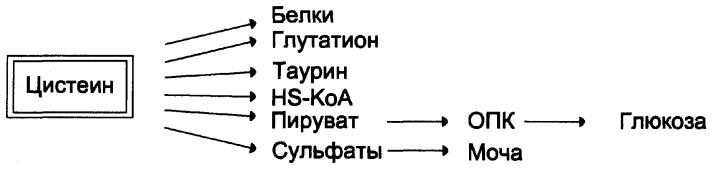


Схема Б

логически активных соединений. В разных тканях метаболизм этих аминокислот происходит по-разному (рис. 9-28).

1. Метаболизм фенилаланина

Основное количество фенилаланина расходуется по 2 путям:

- включается в белки;
- превращается в тирозин.

Превращение фенилаланина в тирозин прежде всего необходимо для удаления избытка фенилаланина, так как высокие концентрации его токсичны для клеток. Образование тирозина не имеет большого значения, так как недостатка этой аминокислоты в клетках практически не бывает.

Основной путь метаболизма фенилаланина начинается с его гидроксилирования (рис. 9-29), в результате чего образуется тирозин. Эта реакция катализируется специфической монооксигеназой — фенилаланингидроксилазой, коферментом которой служит тетрагидробиоптерин (H_4БП). Активность фермента зависит также от наличия Fe^{2+}. Реакция необратима. H_4БП в результате реакции окисляется в дигидробиоптерин (H_2БП). Регенерация последнего происходит при участии дигидроптеридинредуктазы с использованием NADPH + H^+.

2. Особенности обмена тирозина в разных тканях

Обмен тирозина значительно сложнее, чем обмен фенилаланина. Кроме использования в синтезе белков, тирозин в разных тканях выступает предшественником таких соединений, как катехоламины, тироксин, меланины, и катаболизируется до CO_2 и H_2O.

Катаболизм тирозина в печени

В печени происходит катаболизм тирозина до конечных продуктов. Специфический путь катаболизма включает несколько ферментативных реакций, завершающихся образованием фумарата и ацетоацетата (см. схему А на с. 507):

1. Трансаминирование тирозина с α-кетоглутаратом катализирует **тирозинаминотрансфераза** (кофермент ПФ) — индуцируемый фермент печени млекопитающих. В результате образуется п-гидроксифенилпируват.
2. В реакции окисления п-гидроксифенилпирувата в гомогентизиновую кислоту происходит декарбоксилирование, гидроксилирование ароматического кольца и миграция боковой цепи. Реакцию катализирует фермент **п-гидроксифенилпируватдиоксигеназа**, кофакторами которого выступают витамин С и Fe^{2+}.
3. Превращение гомогентизиновой кислоты в фумарилацетоацетат сопровождается расщеплением ароматического кольца. Эта реакция катализируется **диоксигеназой гомогентизиновой кислоты**, в качестве кофермента содержащей Fe^{2+}.

Обмен фенилаланина и тирозина связан со значительным количеством реакций гидроксилирования, которые катализируют оксигеназы. Ферменты оксигеназы (гидроксилазы) используют молекулу O_2 и кофермент-донор водорода (чаще — H_4БП). Для катализа оксигеназам не-

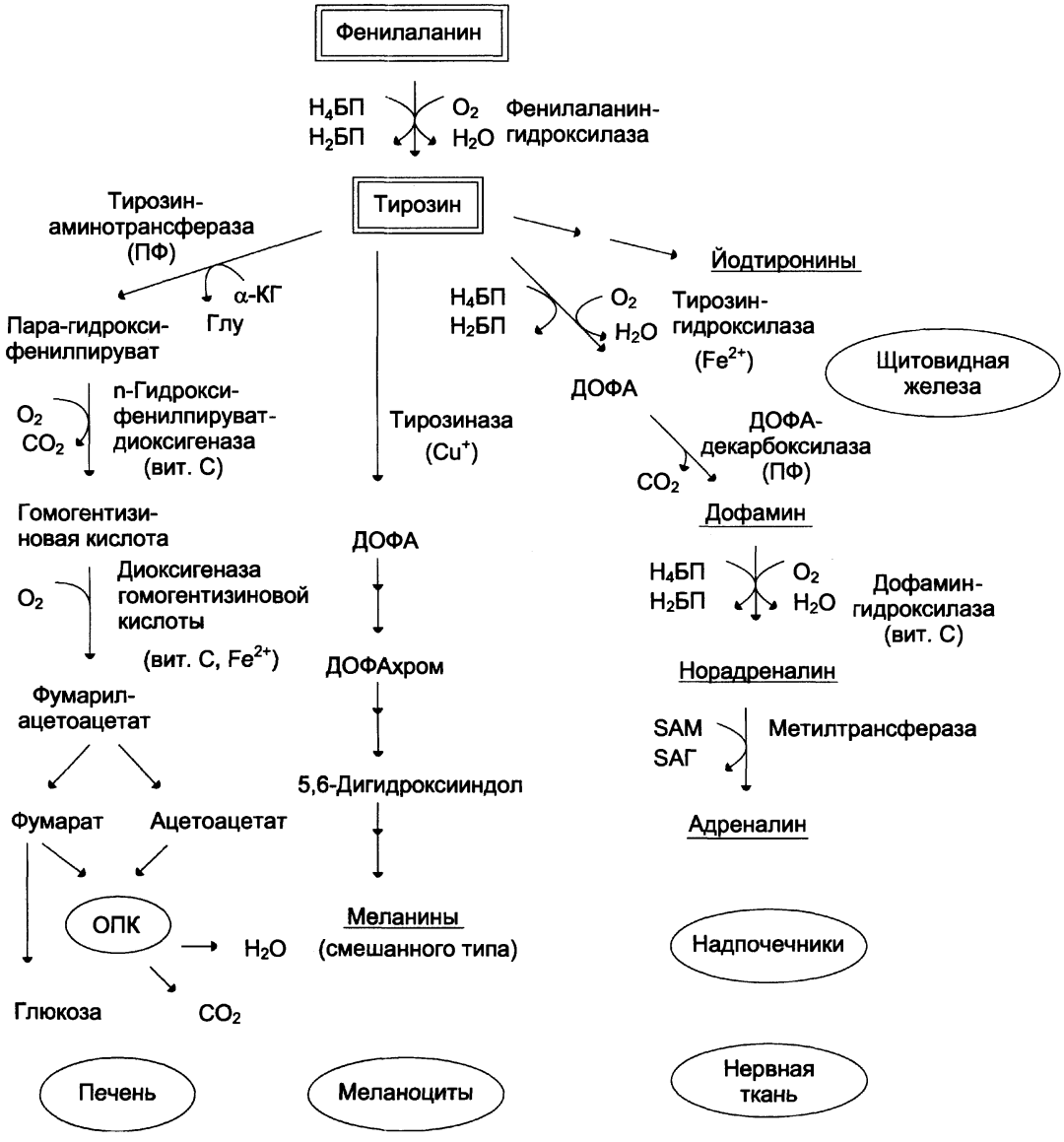


Рис. 9-28. Пути превращения фенилаланина и тирозина в разных тканях. $H_4БП$ — тетрагидробиоптерин; $H_2БП$ — дигидробиоптерин; ПФ — пиридоксальфосфат; SAM — S-аденозилметионин.

обходимы кофакторы — Fe^{2+} или гем (для некоторых — Cu^+), а для многих ещё и витамин С. Оксигеназы делят на 2 группы:

Монооксигеназы — один атом O_2 присоединяют к продукту реакции, другой используют для образования H_2O;

Диоксигеназы — оба атома O_2 используют для образования продукта реакции.

Почти все процессы расщепления ароматических колец в биологических системах катализируются диоксигеназами, подклассом ферментов, открытым японским биохимиком Осами Хайяши.

В результате разрыва бензольного кольца образуется малеилацетоацетат, который в процессе цис- и транс-изомеризации превращается в фумарилацетоацетат.

4. Гидролиз фумарилацетоацетата при действии **фумарилацетоацетатгидролазы** приводит к образованию фумарата и ацетоацетата.

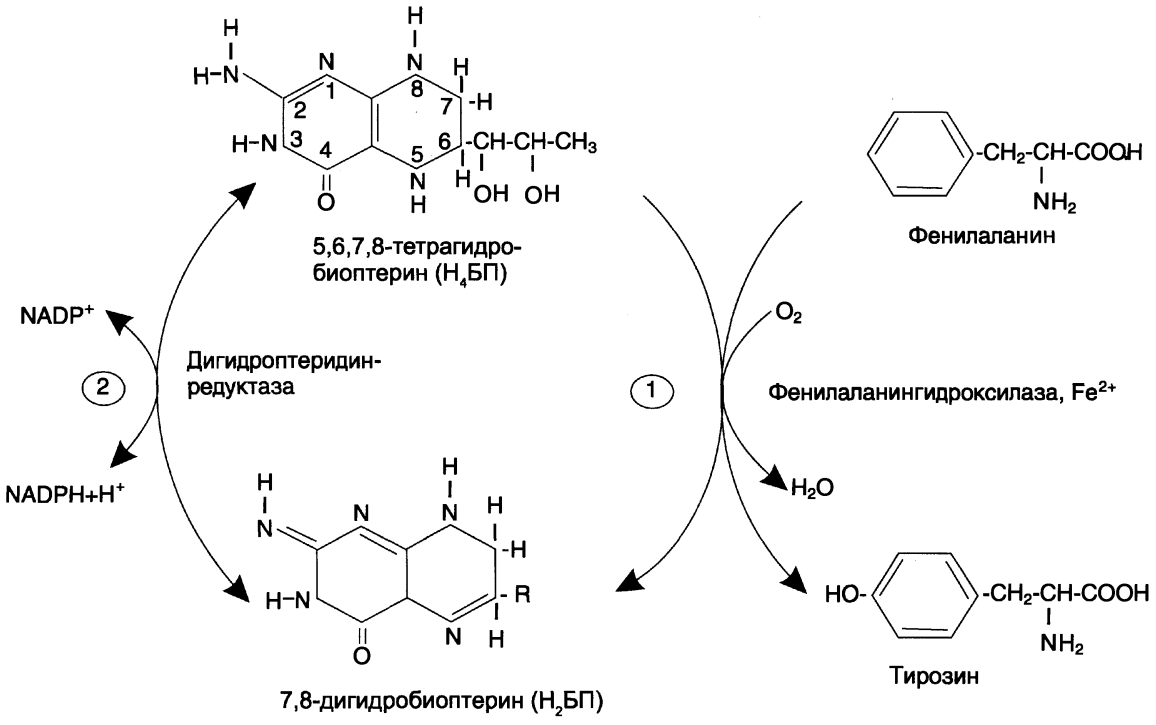


Рис. 9-29. Реакции гидроксилирования фенилаланина (1) и регенерации $H_4БП$ (2).

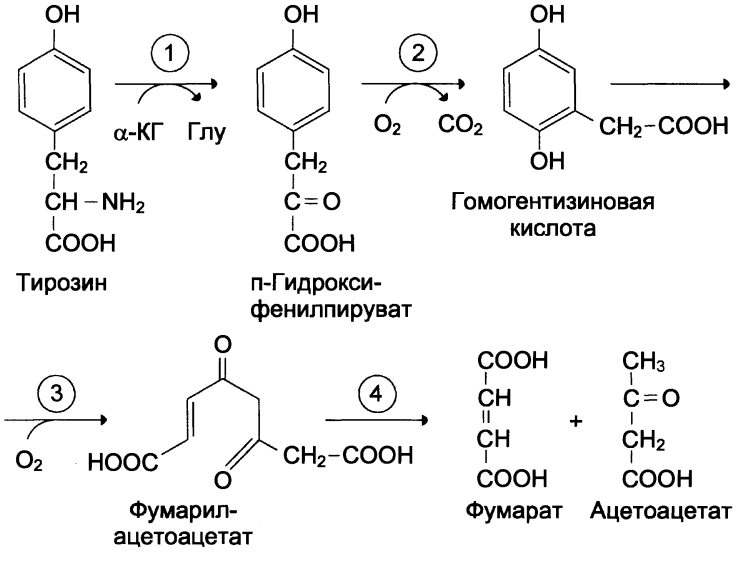


Схема А

Фумарат может окисляться до CO_2 и H_2O или использоваться для глюконеогенеза. Ацетоацетат — кетоновое тело, окисляемое до конечных продуктов с выделением энергии.

Превращение тирозина в меланоцитах

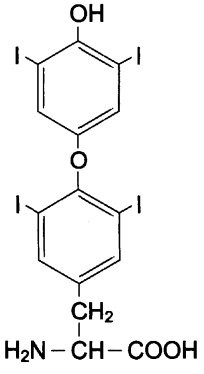
В пигментных клетках (меланоцитах) тирозин выступает предшественником тёмных пигментов — меланинов. Среди них преобладают 2 типа: эумеланины и феомеланины. Эумеланины (чёрного и коричневого цвета) — нерастворимые высокомолекулярные гетерополимеры 5,6-дигидроксииндола и некоторых его предшественников. Феомеланины — жёлтые или красновато-коричневые полимеры, растворимые в разбавленных щелочах. Находятся они, в основном, в составе волос. Меланины присутствуют в сетчатке глаз. Цвет кожи зависит от распределения меланоцитов и количества в них разных типов меланинов.

Синтез меланинов — сложный, многоступенчатый, разветвлённый процесс. Краткая схема синтеза представлена на рис. 9-28.

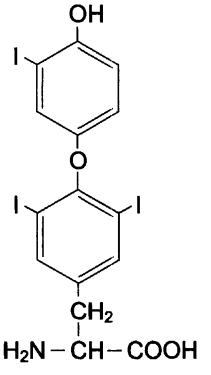
Первую реакцию — превращение тирозина в ДОФА — катализирует **тирозиназа**, использующая в качестве кофактора ионы Cu^+ (см. схему А на с. 509).

Превращение тирозина в щитовидной железе

В щитовидной железе синтезируются и выделяются гормоны йодтиронины: тироксин (тетрайодтиронин) и трийодтиронин. Эти гормоны представляют собой йодированные остатки тирозина, которые попадают в клетки щитовидной железы через базальную мембрану (см. раздел 11).



Тироксин



Трийодтиронин

Превращения тирозина в надпочечниках и нервной ткани (синтез катехоламинов)

В мозговом веществе надпочечников и нервной ткани тирозин является предшественником катехоламинов (дофамина, норадреналина и адреналина) (см. схему Б на с. 509).

При образовании катехоламинов, которое происходит в нервной ткани и надпочечниках, и меланина в меланоцитах промежуточным продуктом служит диоксифенилаланин (ДОФА) . Однако гидроксилирование тирозина в клетках различных типов катализируется различными ферментами:

Тирозиназа в меланоцитах является Cu^+-зависимым ферментом (см. выше).

Тирозингидроксилаза (1) в надпочечниках и катехоламинергических нейронах не нуждается в ионах меди. Это — Fe^{2+}-зависимый фермент, аналогично фенилаланингидроксилазе в качестве кофермента использующий H_4БП.

Физиологическая роль тирозингидроксилазы чрезвычайно велика, так как этот фермент является регуляторным и определяет скорость синтеза катехоламинов.

Активность тирозингидроксилазы значительно изменяется в результате:

Аллостерической регуляции (ингибитор — норадреналин);

Фосфорилирования/дефосфорилирования: в результате фосфорилирования с участием протеинкиназы А снижаются K_m для кофермента H_4БП и сродство фермента к норадреналину, в результате чего происходит активация тирозингидроксилазы.

Количество фермента регулируется на уровне транскрипции.

ДОФА-декарбоксилаза (2) (кофермент — ПФ) катализирует образование дофамина, который при участии **дофамингидроксилазы** (3) (монооксигеназы) превращается в норадреналин. Для функционирования фермента необходимы ионы Cu^+, витамин С и тетрагидробиоптерин.

В мозговом веществе надпочечников **фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза** (4) катализирует метилирование норадреналина, в результате чего образуется адреналин. Источником метильной группы служит SAM.

Дофамин и норадреналин служат медиаторами в синаптической передаче нервных им-

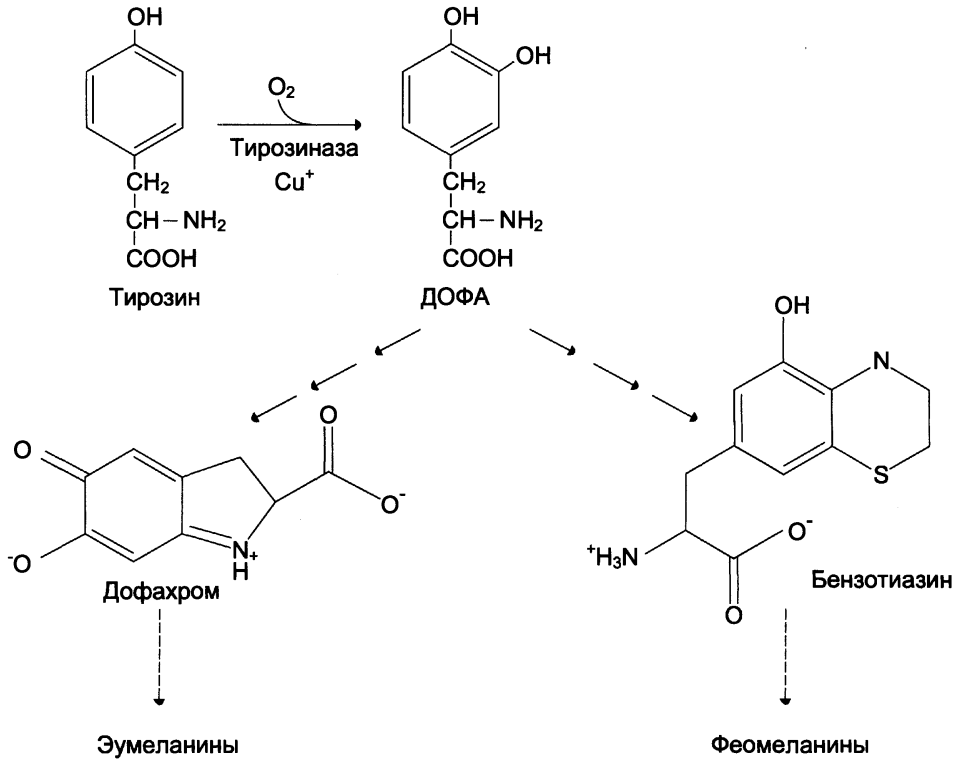


Схема А

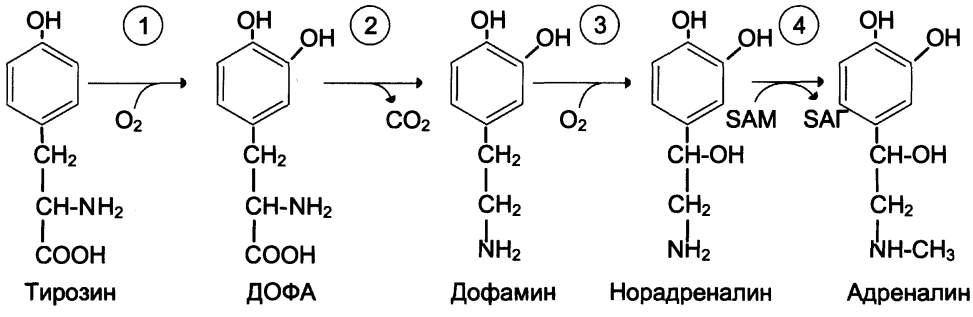


Схема Б

пульсов, а адреналин — гормон широкого спектра действия, регулирующий энергетический обмен. Одна из функций катехоламинов — регуляция деятельности ССС (см. раздел 11).

3. Заболевания, связанные с нарушением обмена фенилаланина и тирозина

Известно несколько наследственных заболеваний, связанных с дефектом ферментов обмена фенилаланина и тирозина в разных тканях.

Фенилкетонурия

В печени здоровых людей небольшая часть фенилаланина (~10%) превращается в фенилактат и фенилацетилглутамин (рис. 9-30).

Этот путь катаболизма фенилаланина становится главным при нарушении основного пути — превращения в тирозин, катализируемого фенил-аланингидроксилазой. Такое нарушение сопровождается гиперфенилаланинемией и повышением в крови и моче содержания метабо-

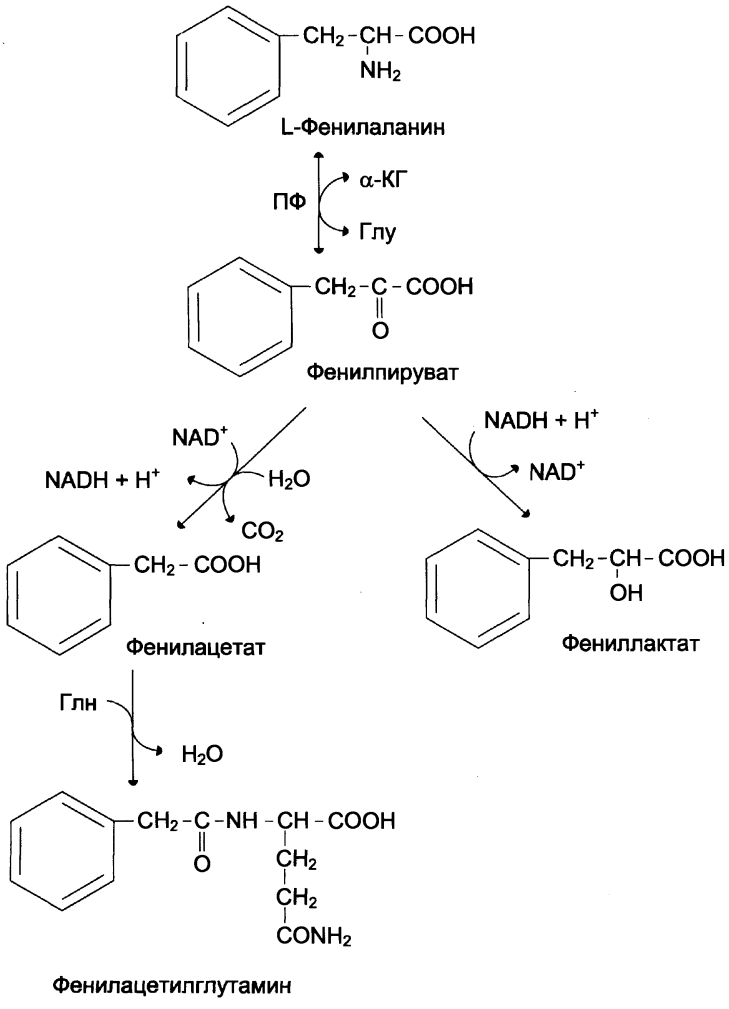


Рис. 9-30. Альтернативные пути катаболизма фенилаланина. При дефекте фенилаланингидроксилазы накопившийся фенилаланин подвергается трансаминированию с а-кетоглутаратом. Образовавшийся фенилпируват превращается либо в фениллактат, либо в фенилацетилглутамин, которые накапливаются в крови и выделяются с мочой. Эти соединения токсичны для клеток мозга.

литов альтернативного пути: фенилпирувата, фенилацетата, фениллактата и фенилацетилглутамина. Дефект фенилаланингидроксилазы приводит к заболеванию фенилкетонурия (ФКУ). Выделяют 2 формы ФКУ:

Классическая ФКУ — наследственное заболевание, связанное с мутациями в гене фенилаланингидроксилазы, которые приводят к снижению активности фермента или полной его инактивации. При этом концентрация фенилаланина повышается в крови в 20—30 раз (в норме — 1,0—2,0 мг/дл), в моче — в 100—300 раз по сравнению с нормой (30 мг/дл). Концентрация фенилпирувата и фениллактата в моче достигает 300—600 мг/дл при полном отсутствии в норме.

Наиболее тяжёлые проявления ФКУ — нарушение умственного и физического развития, судорожный синдром, нарушение пигментации. При отсутствии лечения больные не доживают до 30 лет. Частота заболевания — 1:10 000 новорождённых. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

Тяжёлые проявления ФКУ связаны с токсическим действием на клетки мозга высоких концентраций фенилаланина, фенилпирувата, фениллактата. Большие концентрации фенилаланина ограничивают транспорт ти-

розина и триптофана через гематоэнцефалический барьер и тормозят синтез нейромедиаторов (дофамина, норадреналина, серотонина).

Вариантная ФКУ (коферментзависимая гиперфенилаланинемия) — следствие мутаций в генах, контролирующих метаболизм H_4БП. Клинические проявления — близкие, но не точно совпадающие с проявлениями классической ФКУ. Частота заболевания — 1—2 случая на 1 млн новорождённых.

H_4БП необходим для реакций гидроксилирования не только фенилаланина, но также тирозина и триптофана, поэтому при недостатке этого кофермента нарушается метаболизм всех 3 аминокислот, в том числе и синтез нейромедиаторов. Заболевание характеризуется тяжёлыми неврологическими нарушениями и ранней смертью («злокачественная» ФКУ).

Прогрессирующее нарушение умственного и физического развития у детей, больных ФКУ, можно предотвратить диетой с очень низким содержанием или полным исключением фенилаланина. Если такое лечение начато сразу после рождения ребёнка, то повреждение мозга предотвращается. Считается, что ограничения в питании могут быть ослаблены после 10-летнего возраста (окончание процессов миелинизации мозга), однако в настоящее время многие педиатры склоняются в сторону «пожизненной диеты».

Для диагностики ФКУ используют качественные и количественные методы обнаружения патологических метаболитов в моче, определение концентрации фенилаланина в крови и моче. Дефектный ген, ответственный за фенилкетонурию, можно обнаружить у фенотипически нормальных гетерозиготных носителей с помощью теста толерантности к фенилаланину. Для этого обследуемому дают натощак ~10 г фенилаланина в виде раствора, затем через часовые интервалы берут пробы крови, в которых определяют содержание тирозина. В норме концентрация тирозина в крови после фенилаланиновой нагрузки значительно выше, чем у гетерозиготных носителей гена фенилкетонурии. Этот тест используется в генетической консультации для определения риска рождения больного ребёнка. Разработана схема скрининга для выявления новорождённых детей с ФКУ. Чувствительность теста практически достигает 100%.

В настоящее время диагностику мутантного гена, ответственного за ФКУ, можно проводить с помощью методов ДНК-диагностики (рестрикционного анализа и ПЦР).

Тирозинемии

Некоторые нарушения катаболизма тирозина в печени приводят к тирозинемии и тирозинурии. Различают 3 типа тирозинемии.

Тирозинемия типа 1 (тирозиноз). Причиной заболевания является, вероятно, дефект фермента фумарилацетоацетатгидролазы, катализирующего расщепление фумарилацетоацетата на фумарат и ацетоацетат (рис. 9-28). Накапливающиеся метаболиты снижают активность некоторых ферментов и транспортных систем аминокислот. Патофизиология этого нарушения достаточно сложна. **Острая форма** тирозиноза характерна для новорождённых. Клинические проявления — диарея, рвота, задержка в развитии. Без лечения дети погибают в возрасте 6—8 мес из-за развивающейся недостаточности печени. **Хроническая форма** характеризуется сходными, но менее выраженными симптомами. Гибель наступает в возрасте 10 лет. Содержание тирозина в крови у больных в несколько раз превышает норму. Для лечения используют диету с пониженным содержанием тирозина и фенилаланина.

Тирозинемия типа II (синдром Рихнера—Ханхорта). Причина — дефект фермента тирозинаминотрансферазы. Концентрация тирозина в крови больных повышена. Для заболевания характерны поражения глаз и кожи, умеренная умственная отсталость, нарушение координации движений.

Тирозинемия новорождённых (кратковременная). Заболевание возникает в результате снижения активности фермента п-гидроксифенилпируватдиоксигеназы, превращающего п-гидроксифенилпируват в гомогентизиновую кислоту (рис. 9-28). В результате в крови больных повышается концентрация п-гидроксифенилацетата, тирозина и фенил-аланина. При лечении назначают бедную белком диету и витамин С.

Алкаптонурия («чёрная моча»)

Причина заболевания — дефект диоксигеназы гомогентизиновой кислоты (рис. 9-28). Для

этой болезни характерно выделение с мочой большого количества гомогентизиновой кислоты, которая, окисляясь кислородом воздуха, образует тёмные пигменты алкаптоны. Это метаболическое нарушение было описано ещё в XVI веке, а само заболевание охарактеризовано в 1859 г. Клиническими проявлениями болезни, кроме потемнения мочи на воздухе, являются пигментация соединительной ткани (охроноз) и артрит. Частота — 2–5 случаев на 1 млн новорождённых. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Диагностических методов выявления гетерозиготных носителей дефектного гена к настоящему времени не найдено.

Альбинизм

Причина метаболического нарушения — врождённый дефект тирозиназы. Этот фермент катализирует превращение тирозина в ДОФА в меланоцитах. В результате дефекта тирозиназы нарушается синтез пигментов меланинов.

Клиническое проявление альбинизма (от лат. *albus* — белый) — отсутствие пигментации кожи и волос. У больных часто снижена острота зрения, возникает светобоязнь. Длительное пребывание таких больных под открытым солнцем приводит к раку кожи. Частота заболевания 1:20 000.

Нарушение синтеза катехоламинов (рис. 9-28) может вызывать различные нервно-психические заболевания, причём патологические отклонения наблюдаются как при снижении, так и при увеличении их количества.

Болезнь Паркинсона

Заболевание развивается при недостаточности дофамина в чёрной субстанции мозга. Это одно из самых распространённых неврологических заболеваний (частота 1:200 среди людей старше 60 лет). При этой патологии снижена активность тирозингидроксилазы, ДОФА-декарбоксилазы. Заболевание сопровождается тремя основными симптомами: акинезия (скованность движений), ригидность (напряжение мышц), тремор (непроизвольное дрожание). Дофамин не проникает через гематоэнцефалический барьер и как лекарственный препарат не используется. Для лечения паркинсонизма предлагаются следующие принципы:

- **заместительная терапия** препаратами-предшественниками дофамина (производными ДОФА) — леводопа, мадопар, наком и др.
- **подавление инактивации дофамина** ингибиторами МАО (депренил, ниаламид, пиразидол и др.).

Депрессивные состояния часто связаны со снижением в нервных клетках содержания дофамина и норадреналина.

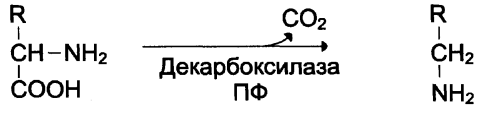
Гиперсекреция дофамина в височной доле мозга наблюдается при шизофрении.

IX. АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ — ПРОИЗВОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТ

Большую роль в организме человека играют непептидные азотсодержащие соединения — производные аминокислот. К ним можно отнести гормоны надпочечников (норадреналин, адреналин), щитовидной железы (тироксин, трийодтиронин), а также медиаторы ЦНС (ацетилхолин, ГАМК и др.), медиатор воспаления (гистамин) и другие соединения.

А. Декарбоксилирование аминокислот и их производных

Некоторые аминокислоты и их производные могут подвергаться декарбоксилированию — отщеплению α-карбоксильной группы. В тканях млекопитающих декарбоксилированию может подвергаться целый ряд аминокислот или их производных: Три, Тир, Вал, Гис, Глу, Цис, Арг, Орнитин, SAM, ДОФА, 5-окситриптофан и др. Продуктами реакции являются CO_2 и амины, которые оказывают выраженное биологическое действие на организм (биогенные амины):



Аминокислота — Биогенный амин

Реакции декарбоксилирования необратимы и катализируются ферментами декарбоксилазами. Простетическая группа декарбоксилаз в клетках животных — пиридоксальфосфат. Некоторые декарбоксилазы микроорганизмов могут содержать вместо ПФ остаток пирувата — гистидиндекарбоксилаза *Micrococcus* и *Lactobacilus*, SAM-декарбоксилаза *E. coli* и др. Механизм реакции напо-

минает реакцию трансаминирования с участием пиридоксальфосфата и также осуществляется путём формирования шиффова основания ПФ и аминокислоты на первой стадии.

Амины, образовавшиеся при декарбоксилировании аминокислот, часто являются биологически активными веществами. Они выполняют функцию нейромедиаторов (серотонин, дофамин, ГАМК и др.), гормонов (норадреналин, адреналин), регуляторных факторов местного действия (гистамин, карнозин, спермин и др.).

1. Синтез и биологическая роль серотонина

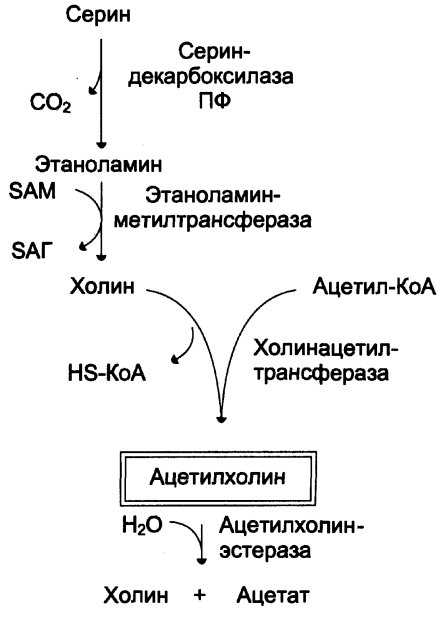
Серотонин — нейромедиатор проводящих путей. Образуется в надпочечниках и ЦНС из аминокислоты 5-гидрокситриптофана в результате действия декарбоксилазы ароматических аминокислот. Этот фермент обладает широкой специфичностью и способен также декарбоксилировать триптофан и ДОФА, образующийся из тирозина. 5-Гидрокситриптофан синтезируется из триптофана под действием фенилаланингидроксилазы с коферментом $H_4БП$ (этот фермент обладает специфичностью к ароматическим аминокислотам и гидроксилирует также фенилаланин) (см. схему ниже).

Серотонин может превращаться в гормон мелатонин, регулирующий суточные и сезонные изменения метаболизма организма и участвующий в регуляции репродуктивной функции.

Серотонин — биологически активное вещество широкого спектра действия. Он стимулирует сокращение гладкой мускулатуры, оказывает сосудосуживающий эффект, регулирует АД, температуру тела, дыхание, обладает антидепрессантным действием. По некоторым данным он может принимать участие в аллергических реакциях, поскольку в небольших количествах синтезируется в тучных клетках.

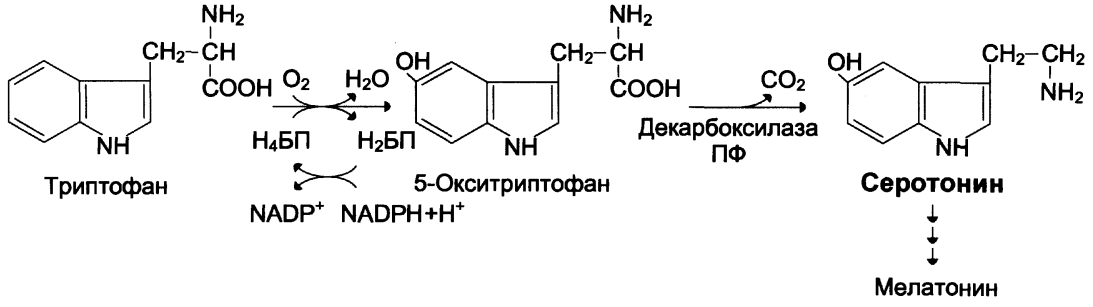
2. Синтез и биологическая роль ацетилхолина

Ацетилхолин синтезируется в нервной ткани и служит одним из важнейших возбуждающих нейромедиаторов вегетативной нервной системы. Его предшественник — аминокислота серин:

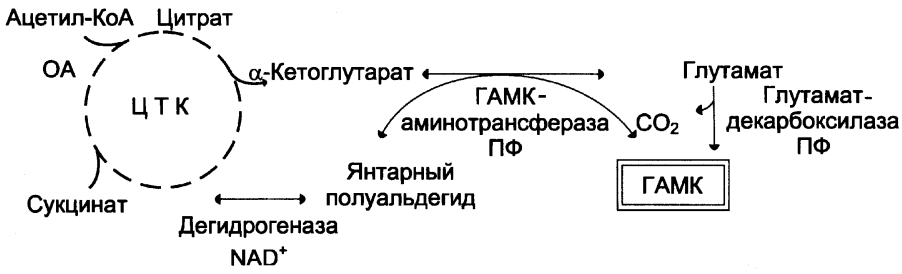


3. Синтез и биологическая роль γ-аминомасляной кислоты

В нервных клетках декарбоксилирование глутамата (отщепление α-карбоксильной группы) приводит к образованию γ-аминомасляной кислоты (ГАМК), которая служит основным тормозным медиатором высших отделов мозга (см. схему на с. 514).



Схема



Схема

Цикл превращений ГАМК в мозге включает три сопряжённые реакции, получившие название ГАМК-шунта. Первую катализирует глутаматдекарбоксилаза, которая является пиридоксальзависимым ферментом. Эта реакция является регуляторной и обусловливает скорость образования ГАМК в клетках мозга. Продукт реакции — ГАМК. Последующие 2 реакции можно считать реакциями катаболизма ГАМК. ГАМК-аминотрансфераза, также пиридоксальзависимая, образует янтарный полуальдегид, который затем подвергается дегидрированию и превращается в янтарную кислоту. Сукцинат используется в цитратном цикле. Инактивация ГАМК возможна и окислительным путём под действием МАО.

Содержание ГАМК в головном мозге в десятки раз выше других нейромедиаторов. Она увеличивает проницаемость постсинаптических мембран для ионов K^+, что вызывает торможение нервного импульса; повышает дыхательную активность нервной ткани; улучшает кровоснабжение головного мозга.

ГАМК в виде препаратов гаммалон или аминалон применяют при сосудистых заболеваниях головного мозга (атеросклероз, гипертония), нарушениях мозгового кровообращения, умственной отсталости, эндогенных депрессиях и травмах головного мозга, а также заболеваниях ЦНС, связанных с резким возбуждением коры мозга (например, эпилепсии).

4. Другие медиаторы ЦНС: глицин, глутамат

Свободные аминокислоты играют исключительно важную роль в головном мозге как предшественники белков и таких биологически активных веществ, как нейропептиды, гормоны, биогенные амины и др. Некоторые аминокислоты могут участвовать в синаптической передаче, выполняя функцию нейромедиаторов. Очень важна для головного мозга и энергетическая роль аминокислот. Содержание свободных аминокислот в головном мозге достигает ~35 мкмоль/г ткани, что значительно выше, чем в плазме крови (~3,5 мкмоль/л) и в спинномозговой жидкости. Преобладают глутаминовая кислота, глутамин, аспарагиновая кислота, глицин, ГАМК, N-ацетиласпартат и др. **Аминокислоты глицин и глутамат — важнейшие нейромедиаторы.**

Глутамат содержится в головном мозге в очень больших количествах (до ~10 мкмоль/г ткани) и выполняет разнообразные функции:

- один из основных возбуждающих медиаторов в коре, гиппокампе, полосатом теле и гипоталамусе;
- участвует в регуляции процессов памяти;
- составная часть ряда малых и средних регуляторных пептидов мозга, таких как глутатион. В виде пироглутамата (циклическая форма) входит в целый ряд нейропептидов — люлиберин, тиролиберин, нейротензин, бомбезин и др.
- велика его энергетическая роль, так как глутамат служит поставщиком α-кетоглутарата — компонента цитратного цикла;
- участвует в обезвреживании аммиака с образованием глутамина, который в больших количествах поступает через мембраны в нейроны, где присутствует фермент глутаминаза. Под действием этого фермента вновь образуется глутамат, который используется для синтеза ГАМК. Учитывая, что биомембраны менее проницаемы для глутамата, чем для глутамина, его можно расценивать как глиально-нейрональный переносчик глутамата (а значит, и ГАМК).

Нарушение глутаматергической системы происходит при целом ряде патологических нарушений ЦНС: эпилепсии, расстройствах вести-

булярной системы, ишемии и др. Глутамат и его аналоги используют как лекарственные средства при хронической недостаточности аминокислотного обмена, вегетососудистой дистонии, эпилепсии (в качестве предшественника ГАМК — тормозного медиатора).

Другая аминокислота-нейромедиатор — **глицин**. Концентрация глицина в плазме крови невысока, поэтому в мозг поступают недостаточные количества этой аминокислоты. Значительная часть глицина синтезируется из глюкозы, которая поступает из крови (реакции синтеза рассмотрены выше).

Глицин — важнейший (после ГАМК) тормозной нейромедиатор в спинном мозге, промежуточном мозге и некоторых отделах головного мозга. Высокий уровень глицина в плазме крови и моче обычно свидетельствует о нарушении функций мозга.

Разрушение глицина может происходить тремя путями:

- превращением глицина в серин под действием сериноксиметилтрансферазы;
- расщеплением глицина на аммиак, оксид углерода и метилен-H_4-фолат;
- окислением под действием оксидазы аминокислот (см. выше подраздел IV).

Гиперглицинемия развивается в раннем возрасте и сопровождается эпизодической рвотой, подавлением двигательной активности, нарушением электроэнцефалограммы и часто завершается летальным исходом. Гиперглицинемия может быть следствием нарушения обычных путей разрушения глицина в нервных клетках.

Б. Азотсодержащие соединения — производные гистидина

Аминокислота гистидин в разных тканях подвергается действию различных ферментов и включается в два разных метаболических пути:

- катаболизм до конечных продуктов;
- синтез гистамина (рис. 9-31).

В печени и коже гистидин подвергается дезаминированию под действием фермента гистидазы с образованием уроканиновой кислоты. Конечным продуктом катаболизма гистидина служит глутамат, NH_3 и производные H_4-фолата (N^5-формимино-H_4-фолат и N^5-формил-H_4-фолат). Наследственный дефект гистидазы вызывает накопление гистидина и **развитие гистидинемии**, которая

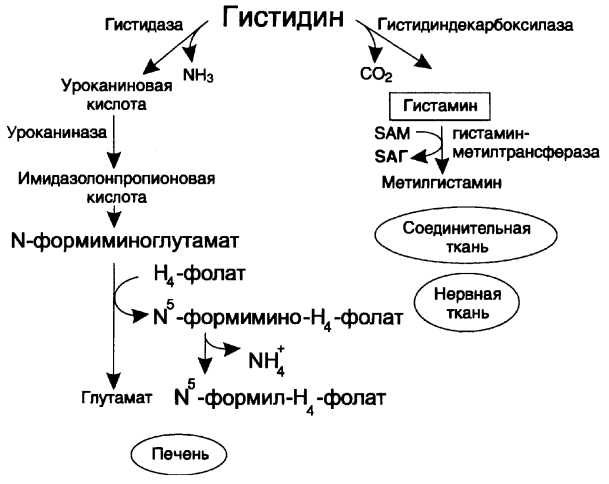


Рис. 9-31. Схема обмена гистидина в разных тканях.

проявляется задержкой в умственном и физическом развитии детей. Наследственный дефект уроканиназы в печени может вызвать уроканинемию, при которой в крови повышается уровень уроканата. Симптомы этого патологического состояния во многом аналогичны симптомам других энзимопатий и проявляются отставанием умственного и физического развития.

Ферменты гистидаза и уроканиназа гепатоспецифичны, поэтому их определение используют в клинике для диагностики поражений печени.

1. Синтез и биологическая роль гистамина

Гистамин образуется путём декарбоксилирования гистидина в тучных клетках соединительной ткани (см. схему А на с. 516).

Гистамин образует комплекс с белками и сохраняется в секреторных гранулах тучных клеток. Секретируется в кровь при повреждении ткани (удар, ожог, воздействие эндо- и экзогенных веществ), развитии иммунных и аллергических реакций. Гистамин выполняет в организме человека следующие функции:

- стимулирует секрецию желудочного сока, слюны (т.е. играет роль пищеварительного гормона);
- повышает проницаемость капилляров, вызывает отёки, снижает АД (но увеличивает внутричерепное давление, вызывает головную боль);
- сокращает гладкую мускулатуру лёгких, вызывает удушье;

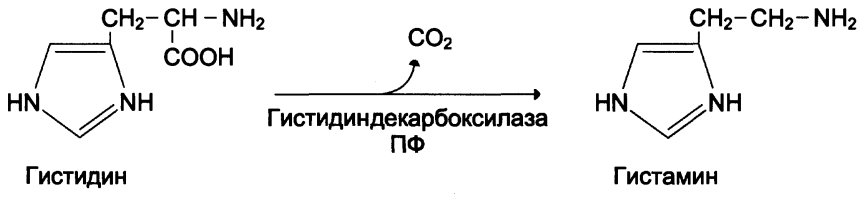


Схема А

- участвует в формировании воспалительной реакции — вызывает расширение сосудов, покраснение кожи, отёчность ткани;
- вызывает аллергическую реакцию;
- выполняет роль нейромедиатора;
- является медиатором боли.

2. Синтез и биологическая роль карнозина и анзерина

В мышцах и головном мозге синтезируются гистидиновые дипептиды карнозин и анзерин, причём в скелетных мышцах их содержание особенно велико и достигает величин порядка 100–200 мг/100 г ткани. Карнозин был обнаружен в 1900 г. российским биохимиком В.С. Гулевичем, анзерин — несколько позже.

Карнозин образуется из β-аланина и гистидина под действием карнозинсинтетазы (см. схему Б).

Далее в присутствии SAM идёт реакция метилирования карнозина под действием фермента N-метилтрансферазы и образуется анзерин. β-Аланин, необходимый для синтеза, получается при катаболизме пиримидиновых нуклеотидов.

Карнозин может поступать из мышц в кровь и поглощаться почками и энтероцитами. В крови и почках человека присутствует Zn-зависимый фермент карнозиназа, способный гидролизовать карнозин на β-аланин и гистидин.

Физиологическое действие гистидиновых дипептидов изучалось российским биохимиком С.Е. Севериным в 60-х годах и исследуется до настоящего времени многими учёными. Карнозин увеличивает амплитуду сокращения скелетных мышц и активирует работу ионных насосов мышечных клеток, стимулирует АТФ-азную активность миозина. Содержание гистидиновых пептидов в гладкой и сердечной мускулатуре во много раз ниже, чем в скелетной. Они создают до 40% буферной ёмкости быстрых мышц и позволяют накапливать много лактата. Избыток лактата в отсутствие гистидиновых пептидов приводит к ацидозу и контрактуре. Карнозин и анзерин обладают антиоксидантной активностью, ингибируют NO-зависимую гуанилатциклазу, замедляют процессы старения человека, влияя на скорость апоптоза.

В. Роль аргинина и орнитина в синтезе биологически активных молекул

Обмен аминокислоты аргинина связан с реакциями орнитинового цикла, которые можно рассматривать как путь синтеза аргинина. Под

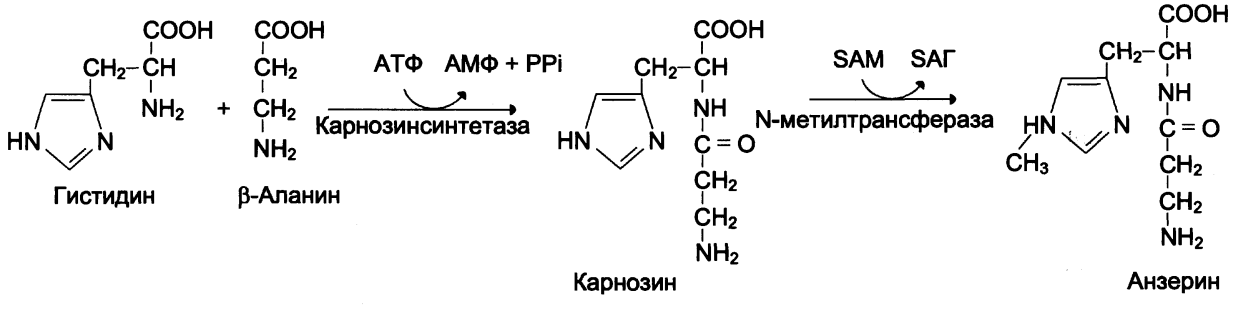


Схема Б

действием аргиназы в цикле происходит и распад аргинина на орнитин и мочевину.

Аргинин выполняет в организме важные функции:

- используется в синтезе креатина, который в виде креатинфосфата способен служить источником энергии для работы мышц человека и млекопитающих. В мышцах беспозвоночных аналогичную энергетическую функцию способен выполнять аргининфосфат.
- служит источником NO в организме;
- служит предшественником орнитина, из которого синтезируются полиамины.

1. Аргинин — источник NO в организме

Аминокислота аргинин служит в организме источником оксида азота (NO). Образование NO в клетках катализирует сложный Ca^{2+}-зависимый фермент NO-синтаза. В состав фермента входит гем, необходимы два флавиновых кофермента FAD и FMN, H_4БП, а также ионы Zn^{2+}.

Образование NO происходит во всех клетках и тканях. В настоящее время в разных клетках обнаружены три изоферментные формы NO-синтазы: нейрональная и эпителиальная — конститутивные, и индуцибельная, которая преобладает в печени, мышцах, миокарде.

Оксид азота — важная сигнальная молекула, активирующая гуанилатциклазу и стимулирующая быстрое образование цГМФ. Это вызывает снижение силы сердечных сокращений, регулирует тонус сосудов. Кроме этого, NO-радикал участвует в регуляции скорости апоптоза, предотвращает агрегацию тромбоцитов и тромбоз, регулирует секрецию медиаторов и гормонов, обладает антиканцерогенной активностьют (рис. 9-32).

2. Образование спермидина и спермина, их биологическая роль

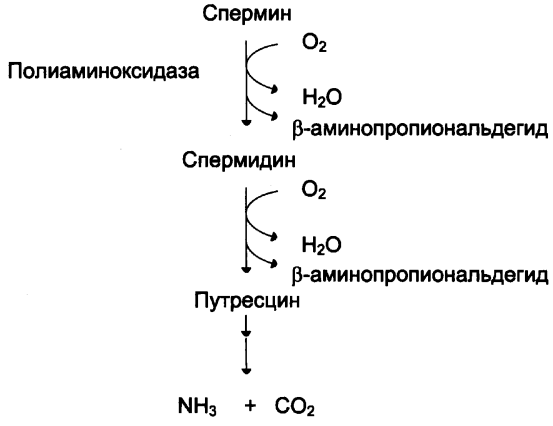
Аргинин под действием аргиназы превращается в аминокислоту орнитин, которая не входит в состав белков организма. Из орнитина синтезируются полиамины **спермидин и спермин** (см. схему А на с. 518).

Реакция проходит под действием орнитиндекарбоксилазы в присутствии пиридоксальфосфата. Далее под действием спермидинсинтазы и сперминсинтазы происходит включение остатков аминопропана. Донором этих групп служит производное SAM — S-аденозилметилтиопропиламин (см. схему Б на с. 518).

Спермидин, спермин и путресцин обнаружены в ядрах клеток всех органов человека. Они имеют большой положительный заряд, легко связываются с отрицательно заряженными молекулами ДНК и РНК, входят в состав хроматина и участвуют в репликации ДНК, стимулируют транскрипцию и трансляцию. Их концентрация сильно возрастает при интенсивной пролиферации тканей.

Фермент орнитиндекарбоксилаза — регулируемый. Он отличается очень коротким $T_{1/2}$ — всего 10 мин. Гормон роста, кортикостероиды, тестостерон быстро увеличивают его количество в 10–200 раз.

Катаболизм полиаминов до CO_2 и H_2O происходит под действием полиаминоксидазы в печени. Часть их в ацетилированном виде экскретируется почками.



Основные биогенные амины и их аминокислоты-предшественники представлены в табл. 9-6.

К биогенным аминам относят и **катехоламины** (дофамин, норадреналин и адреналин). **Дофамин**, в частности, является медиатором среднего отдела мозга. **Норадреналин** — возбуждающий медиатор в гипоталамусе, а также медиатор синаптической нервной системы и разных отделов головного мозга. **Адреналин** — гормон, активно синтезирующийся при стрессе и регулирующий основной обмен, а также усиливающий сокращение сердечной мышцы.

Г. Инактивация биогенных аминов

Для осуществления биологической функции в нервных клетках требуется определённая кон-

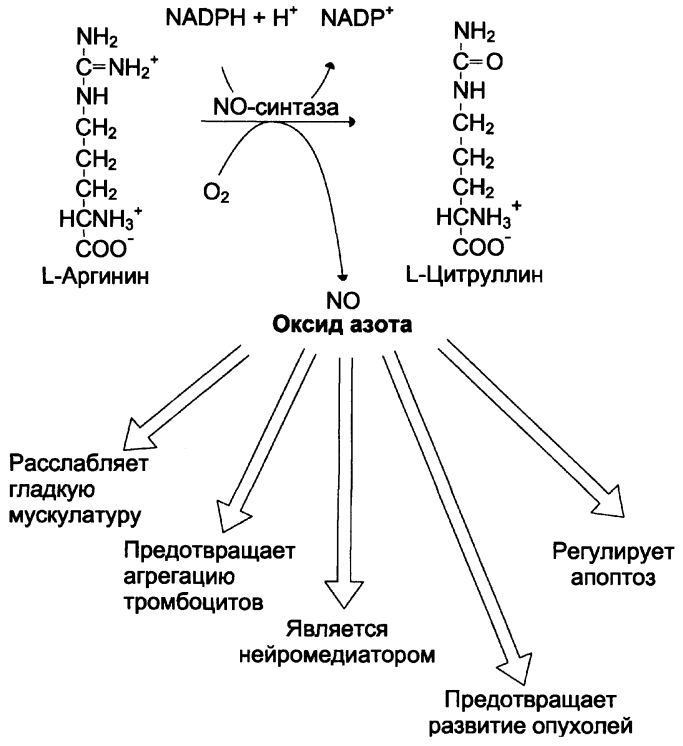


Рис. 9-32. Биосинтез и биологическая роль оксида азота.

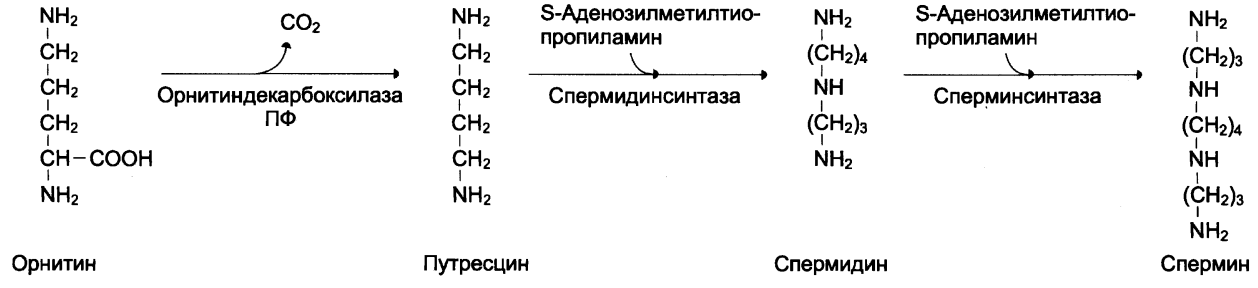


Схема А

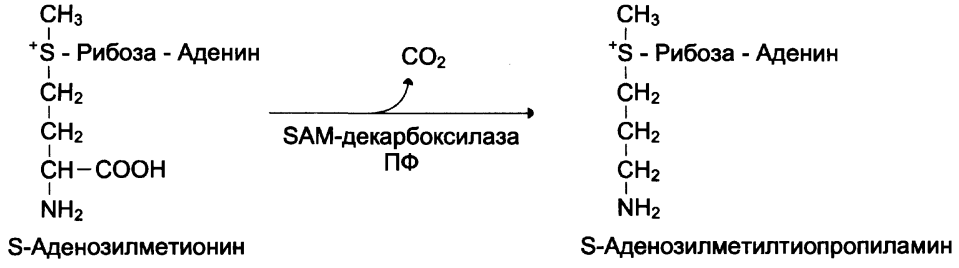
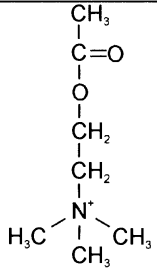
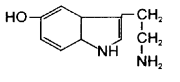
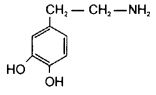
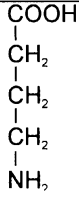
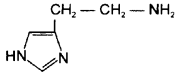
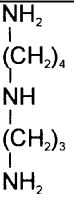


Схема Б

Таблица 9-6. Предшественники и биологическая роль некоторых биогенных аминов

Аминокислоты	Серин	Триптофан	Тирозин	Глутаминовая кислота	Гистидин	Орнитин Лизин
Продукты декарбоксилирования	Этаноламин	Триптамин		γ-аминомасляная кислота	Гистамин	Путресцин Кадаверин
Биологически активные вещества	**Ацетилхолин**	**Серотонин**	**Дофамин**	**ГАМК**	**Гистамин**	**Спермидин (и спермин)**
Формулы						
Физиологическая роль	Возбуждающий медиатор вегетативной нервной системы	Возбуждающий медиатор средних отделов мозга	Медиатор среднего отдела мозга	Тормозной медиатор высших отделов мозга	Медиатор воспаления, аллергических реакций, пищеварительный гормон	Изменяют степень агрегации полисом. Регулируют синтез РНК и белка

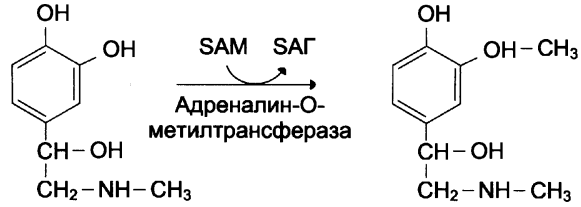
центрация биогенных аминов. Избыточное накопление их может вызывать различные патологические отклонения. В связи с этим большое значение приобретают механизмы инактивации биогенных аминов.

Инактивация биогенных аминов происходит двумя путями:

1) метилированием с участием SAM под действием метилтрансфераз. Таким образом могут инактивироваться различные биогенные амины, но чаще всего происходит инактивация гистамина и адреналина. Так, инактивация адреналина происходит путём метилирования гидроксильной группы в орто-положении (см. схему ниже).

Реакция инактивации гистамина также преимущественно происходит путём метилирования (см. схему А на с. 520).

2) окислением ферментами моноаминооксидазами (МАО) с коферментом FAD — таким пу-



Адреналин — Метиладреналин

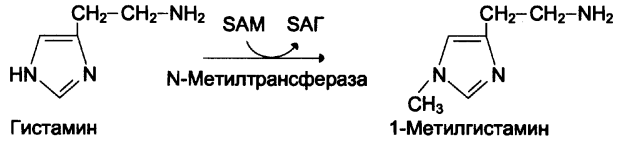


Схема А

тём чаще происходит инактивация дофамина, норадреналина, серотонина, ГАМК. При этом происходит окислительное дезаминирование биогенных аминов с образованием альдегидов, а затем соответствующих кислот, которые выводятся почками (см. схему Б).

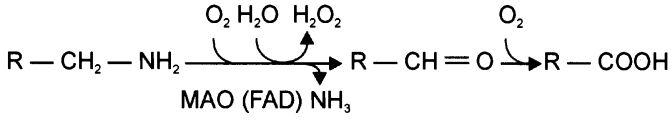


Схема Б

РАЗДЕЛ 10

ОБМЕН НУКЛЕОТИДОВ

Рибонуклеозид- и дезоксирибонуклеозидфосфаты — существеннейшие компоненты клеток.

- Нуклеозидтрифосфаты (НТФ) используются в качестве субстратов синтеза ДНК и РНК, без которых невозможны образование белков и клеточная пролиферация.
- Природа выбрала цикл АДФ-АТФ в качестве универсального механизма трансформации энергии окисления в энергию биосинтетических процессов. В некоторых биологических процессах и другие НТФ используются в качестве источника энергии.
- Производные нуклеотидов служат донорами активных субстратов в синтезе гомо- и гетерополисахаридов, липидов и белков. Например: УДФ-глюкоза, УДФ-галактоза, ГДФ-манноза, УДФ-N-ацетилглюкозамин или ЦМФ-ацетилнейраминовая кислота принимают участие в синтезе гликогена и гликозаминогликанов; ЦДФ-холин — в синтезе фосфолипидов.
- УДФ-глюкуроновая кислота, ФАФС, S-аденозилметионин — наиболее частые участники универсальной системы детоксикации, обеспечивающей последующее выведение ксенобиотиков (чужеродных веществ) и некоторых собственных метаболитов из организма.
- АМФ входит в состав коферментов дегидрогеназ (NAD^+, $NADP^+$, FAD, FMN) и ацилирования (КоА).
- С помощью циклических форм нуклеотидов (цАМФ, цГМФ) осуществляется передача в клетку сигналов гормонов, факторов роста, нейромедиаторов и некоторых других регуляторных молекул.

Практически все клетки организма способны к синтезу нуклеотидов (исключение составляют некоторые клетки крови). Другим источником этих молекул могут быть нуклеиновые кислоты собственных тканей и пищи, однако эти источники имеют лишь второстепенное, вспомогательное значение.

Со строением нуклеотидов и номенклатурой мы знакомились в разделе 4, в данном разделе предстоит рассмотреть метаболизм этих молекул в организме.

I. ПЕРЕВАРИВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПИЩИ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ

Пищевые нуклеопротеины, попадая в организм человека, в желудке отщепляют белковый компонент и денатурируют под действием HCl желудочного сока (рис. 10-1). Далее полинуклеотидная часть этих молекул гидролизуется в кишечнике до мононуклеотидов.

В расщеплении нуклеиновых кислот принимают участие ДНК-азы и РНК-азы панкреатического сока, которые, будучи эндонуклеазами, гидролизуют макромолекулы до олигонуклеотидов. Последние под действием фосфодиэстераз панкреатической железы расщепляются до смеси 3′- и 5′-мононуклеотидов. Нуклеотидазы и неспецифические фосфатазы гидролитически отщепляют фосфатный остаток нуклеотидов и превращают их в нуклеозиды, которые либо всасываются клетками тонкого кишечника, либо расщепляются нуклеозидфосфорилазами кишечника с образованием рибозо- или дезоксирибозо-1-фосфата, пуриновых и пиримидиновых оснований.

Пищевые пурины и пиримидины не являются незаменимыми пищевыми факторами и очень мало используются для синтеза нуклеиновых кислот тканей. В энтероцитах обнаружена высокая активность ксантиноксидазы — фермента, который большую часть пуринов, поступающих в клетки, превращает в мочевую кислоту, удаляющуюся с мочой. Пиримидиновые основания, не успевшие поступить в энтероциты, под действием микрофлоры кишечника расщепляются до NH_3, CO_2, β-аланина и β-аминоизобутирата.

В различных клетках организма синтезируется до 90% пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов из простых предшественников *de novo*. Введённые в кровь азотистые основания и нуклеозиды, а также основания и нуклеозиды, образующиеся в результате внутриклеточного разрушения нуклеиновых кислот, в небольшом количестве могут использоваться для повторного синтеза нуклеотидов по так называемым «запасным» путям.

II. СИНТЕЗ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

В 40-50-х годах XX столетия опытами с мечеными изотопами удалось выяснить происхождение атомов пуринового ядра при синтезе пуринов *de novo*. Было установлено, что в формировании кольца принимают участие аминокислоты Асп, Гли, Глн, CO_2 и два одноуглеродных производных тетрагидрофолата: метенил-H_4-фолат и формил-H_4-фолат. Этим способом образуется основное количество пуриновых нуклеотидов, тогда как нуклеотиды, синтезирующиеся за счёт повторного использования азотистых оснований или нуклеозидов, составляют не более 10—20% общего фонда этих соединений.

А. Образование 5-фосфорибозил-1-дифосфата

Фосфорибозилдифосфат (ФРДФ), или фосфорибозилпирофосфат (ФРПФ) занимает центральное место в синтезе как пуриновых, так и пиримидиновых нуклеотидов (рис. 10-2).

Он образуется за счёт переноса β,γ-пирофосфатного остатка АТФ на рибозо-5-фосфат в реакции, катализируемой ФРДФ-синтетазой.

Источниками рибозо-5-фосфата могут быть: пентозофосфатный путь превращения глюкозы или катаболизм нуклеозидов, в ходе которого под действием нуклеозидфосфорилазы первоначально образуется рибозо-1-фосфат, а затем с помощью соответствующей мутазы фосфатный остаток переносится в 5-положение.

ФРДФ участвует не только в синтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов из простых предшественников (т.е. *de novo*), но используется на образование пуриновых нуклеотидов по «запасному» пути и в синтезе нуклеотидных коферментов.

Б. Биосинтез пуриновых нуклеотидов *de novo*

Сборка пуринового гетероцикла осуществляется на остатке рибозо-5-фосфата при участии различных доноров углерода и азота (рис. 10-3).

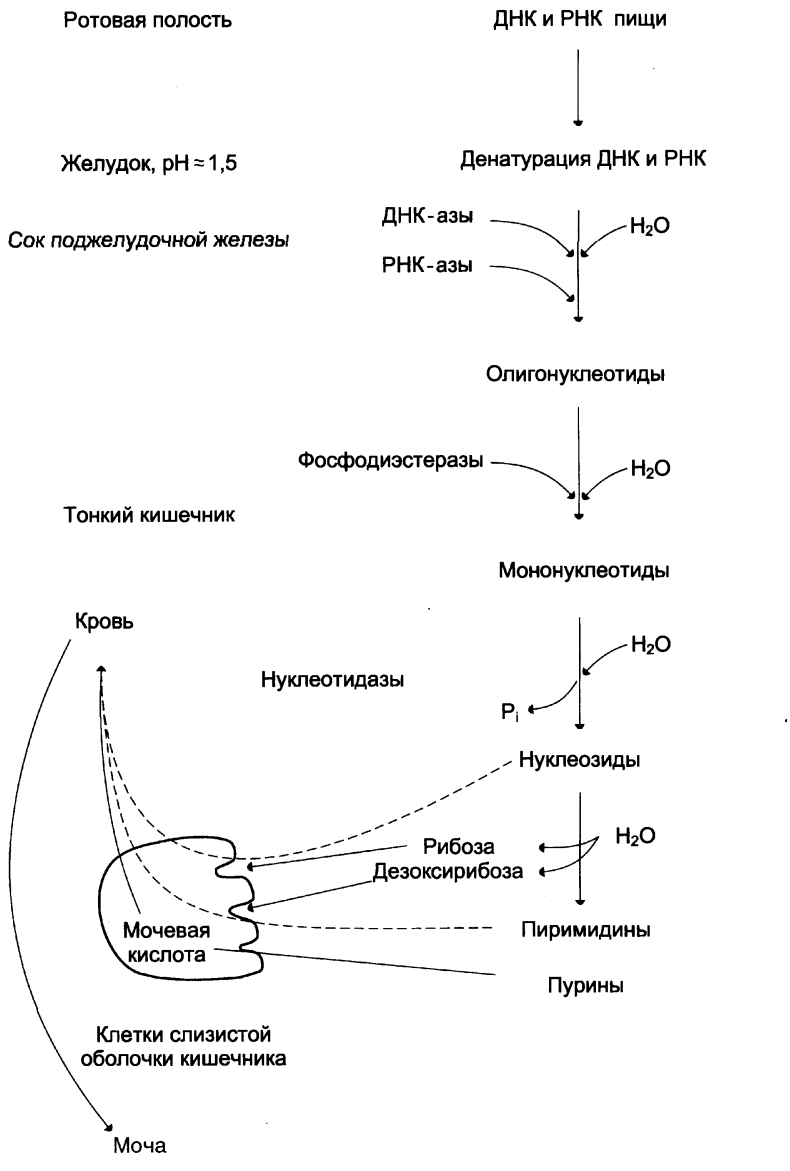


Рис. 10-1. Переваривание нуклеиновых кислот пищи.

Включение простых предшественников в пуриновое кольцо с образованием ИМФ

Первая специфическая реакция образования пуриновых нуклеотидов — перенос амидной группы Глн на ФРДФ с образованием 5-фосфорибозил-1-амина (рис. 10-4). Эту реакцию катализирует фермент амидофосфорибозилтрансфераза. При этом формируется β-N-гликозидная связь.

Затем к аминогруппе 5-фосфорибозил-1-амина присоединяются остаток глицина, N^5,N^{10}-метенил-H_4-фолата ещё одна амидная группа глутамина, диоксид углерода, аминогруппа аспартата и формильный остаток N^{10}-формил H_4-фолата.

Результатом этой десятистадийной серии реакций является образование первого пуринового нуклеотида — инозин-5′-монофосфата (ИМФ), на синтез которого затрачивается не менее шести молекул АТФ. В отличие от прокариотов, у которых каждую стадию этого процесса катализирует отдельный фермент, у эукариотов за

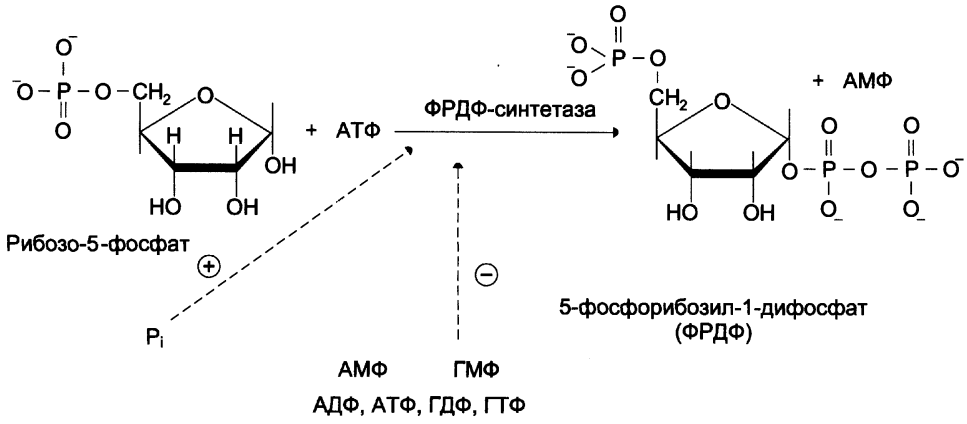


Рис. 10-2. Образование 5-фосфорибозил-1-дифосфата.

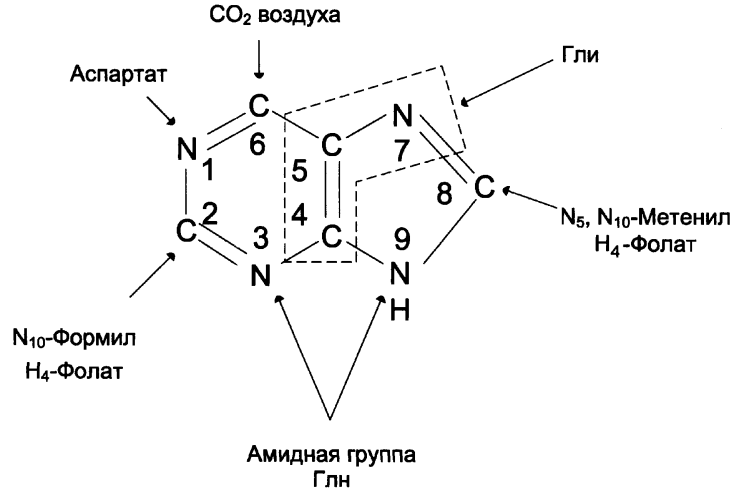


Рис. 10-3. Происхождение атомов C и N в пуриновом кольце.

счёт слияния генов возникли полифункциональные ферменты, каждый из которых катализирует несколько реакций. В синтезе пуриновых нуклеотидов *de novo* это реакции 3, 4 и 6, 7–8 и 10–11 соответственно.

ИМФ в основном используется на синтез АМФ или ГМФ. Небольшое количество этого продукта обнаруживается также в тРНК в качестве одного из минорных нуклеотидов.

Превращение ИМФ в АМФ и ГМФ в обоих случаях включает 2 стадии и идёт с затратой энергии (рис. 10-5).

Аденилосукцинатсинтетаза, используя энергию ГТФ, присоединяет аспартат к ИМФ с образованием аденилосукцината, который в реакции, катализируемой аденилосукциназой, отщепляет фумарат и превращается в АМФ.

Второй пуриновый нуклеотид (ГМФ) образуется также в 2 стадии. Сначала ИМФ окисляется NAD^+-зависимой ИМФ-дегидрогеназой с образованием ксантозин-5′-монофосфата (КМФ). Последующее трансамидирование гидроксильной группы при C_2-пуринового кольца КМФ катализирует ГМФ-синтетаза с использованием амидной группы Глн и энергии АТФ.

При образовании пуриновых нуклеотидов ГТФ расходуется на синтез АМФ, а АТФ — на синтез ГМФ. Перекрёстное использование пу-

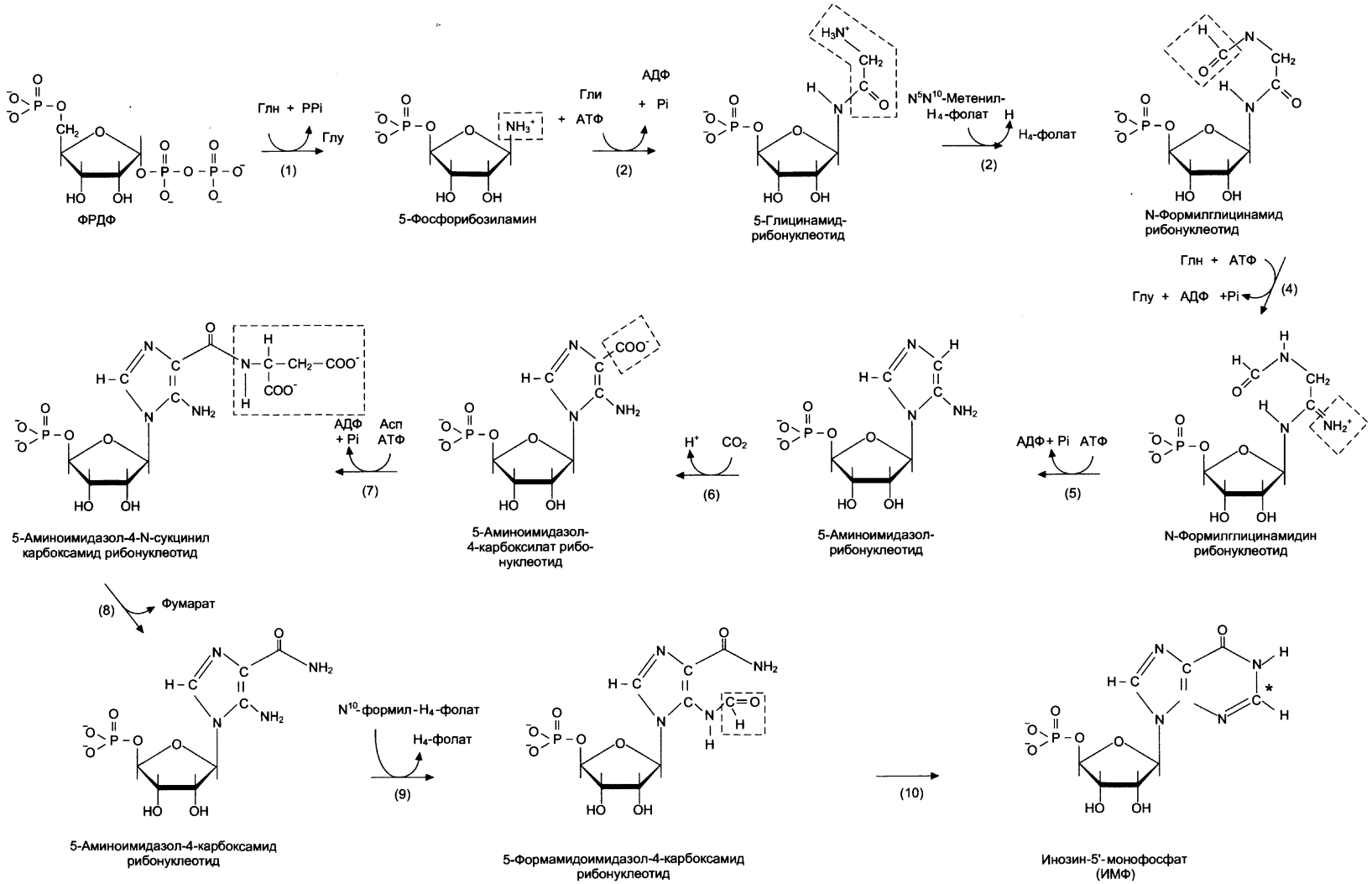


Рис. 10-4. Синтез пуриновых нуклеотидов *de novo*.

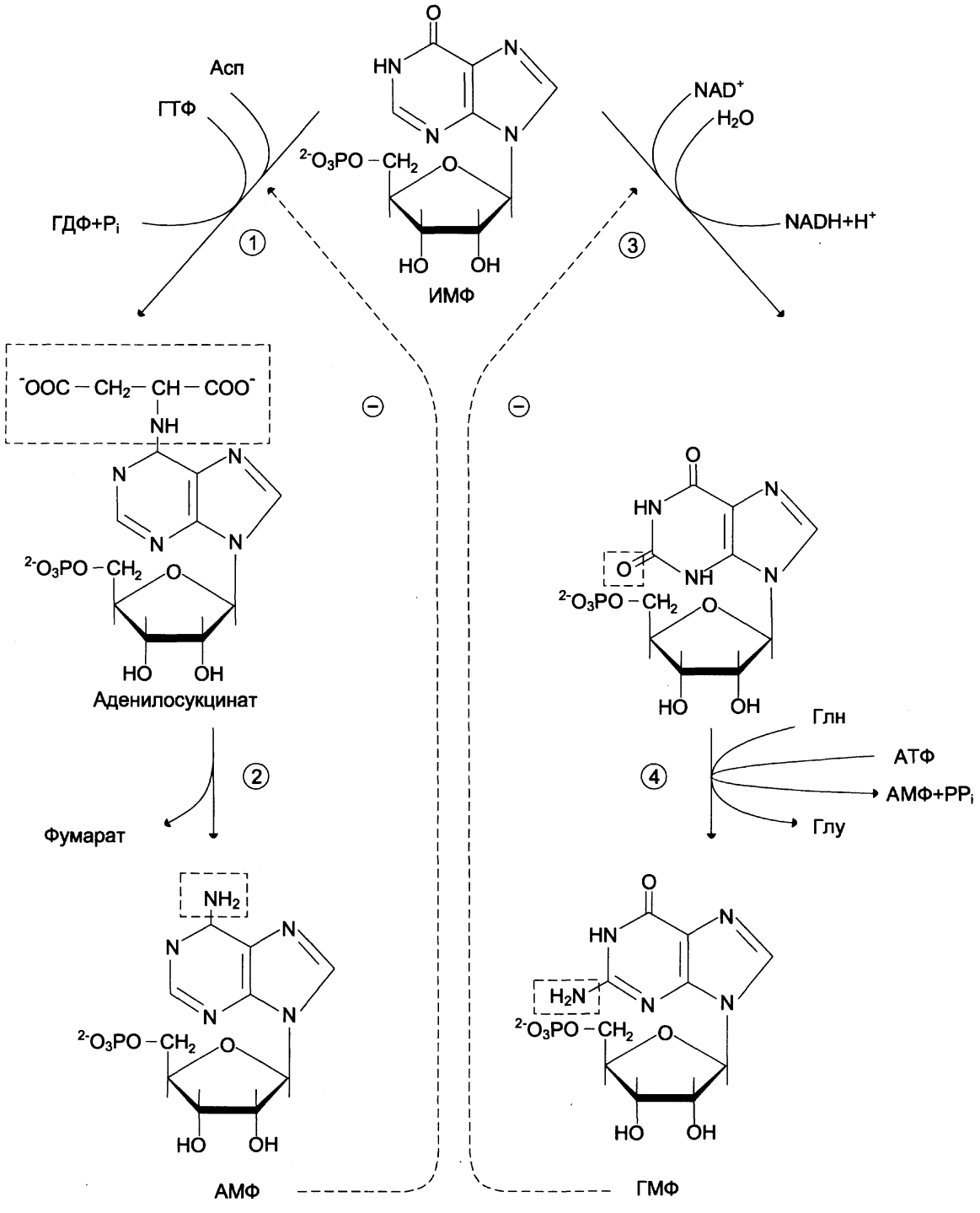


Рис. 10-5. Синтез АМФ и ГМФ из ИМФ. 1 — аденилосукцинатсинтетаза; 2 — аденилосукциназа; 3 — ИМФ-дегидрогеназа; 4 — ГМФ-синтетаза.

риновых нуклеозидтрифосфатов на образование конечных продуктов синтеза помогает поддерживать в клетках баланс адениловых и гуаниловых нуклеотидов.

Печень — основное место образования пуриновых нуклеотидов, откуда они могут поступать в ткани, не способные к их синтезу: эритроциты, ПЯЛ и частично мозг.

Образование нуклеозид- ди- и трифосфатов

В образовании нуклеиновых кислот, некоторых коферментов и во многих синтетических процессах нуклеотиды используются в виде ди- и трифосфатов, синтез которых катализируют ферменты класса трансфераз. АМФ и ГМФ превращаются в нуклеозиддифосфаты (НДФ) с помощью специфичных к азотистому основанию нуклеозидмонофосфаткиназ (НМФ-киназ) и АТФ. Так, аденилаткиназа катализирует реакцию:

$$\text{АМФ} + \text{АТФ} \rightarrow 2\ \text{АДФ},$$

а гуанилаткиназа:

$$\text{ГМФ} + \text{АТФ} \rightarrow \text{ГДФ} + \text{АДФ}.$$

Аденилаткиназа особенно активна в печени и мышцах, где высок уровень энергоёмких процессов. Функция этого фермента заключается в том, чтобы поддерживать в тканях равновесие фонда адениловых нуклеотидов: АМФ, АДФ и АТФ.

Взаимопревращения нуклеозиддифосфатов и нуклеозидтрифосфатов осуществляет нуклеозиддифосфаткиназа. Этот фермент в отличие от НМФ-киназ обладает широкой субстратной специфичностью и, в частности, может катализировать реакцию:

$$\text{ГДФ} + \text{АТФ} \rightarrow \text{ГТФ} + \text{АДФ}.$$

Превращение АДФ в АТФ происходит, в основном, за счёт окислительного фосфорилирования или в реакциях субстратного фосфорилирования гликолиза или цитратного цикла.

В. «Запасные» пути синтеза пуриновых нуклеотидов (реутилизация азотистых оснований и нуклеозидов)

Огромные затраты энергии для синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo* не способны полностью обеспечить субстратами синтез нуклеиновых кислот в период гаструляции и раннего роста ребёнка. Потребность в большом количестве нуклеотидов привела к развитию «запасных» путей синтеза этих «дорогих» молекул. Наибольшее значение в этом процессе имеют ферменты, осуществляющие превращение пуринов в мононуклеотиды с использованием ФРДФ как донора остатка фосфорибозы.

Синтез АМФ и ГМФ из аденина и гуанина

ФРДФ-зависимое фосфорибозилирование пуринов катализируют 2 фермента.

Аденинфосфорибозилтрансфераза, ответственная за образование АМФ (рис. 10-6).

Гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза, катализирующая образование ИМФ и ГМФ из гипоксантина и гуанина соответственно (рис. 10-7).

Однако в организме при любых ситуациях этот путь синтеза пуриновых нуклеотидов, получивший название «путь спасения», имеет вспомогательное значение.

Нуклеозидкиназы

Нуклеозиды, получающиеся при катаболизме нуклеиновых кислот из нуклеотидов под действием нуклеотидаз, могут повторно фосфорилироваться, образуя нуклеозид-5′-монофосфаты за счёт переноса γ-фосфатного остатка АТФ на соответствующий субстрат. У млекопитающих такой путь пополнения запасов пуриновых нуклеотидов в клетке не имеет существенного значения. Основным ферментом этой группы является аденозинкиназа, которая ускоряет реакцию:

$$\text{Аденозин} + \text{АТФ} \rightarrow \text{АМФ} + \text{АДФ}.$$

Из всех способов реутилизации пуринов наиболее активна гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазная реакция, поскольку ИМФ, образующийся в этой реакции, вовлекается в синтез АМФ и ГМФ. Использование гипоксантина и гуанина по запасному пути становится жизненно важным событием в клетках, не способных к синтезу пуриновых нуклеотидов *de novo*. Значение аденинфосфорибозилтрансферазы в повторном использовании аденина менее существенно. По сравнению с аденозином количество аденина в клетках мало, а первый возвращается в фонд нуклеотидов с помощью аденозинкиназы.

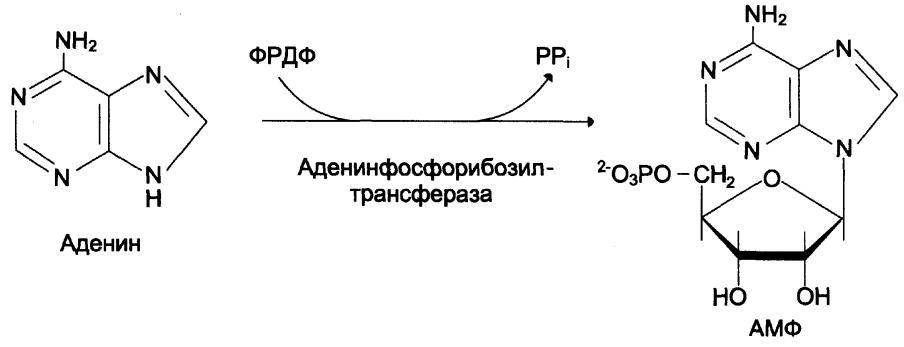


Рис. 10-6. Фосфорибозилирование аденина в АМФ.

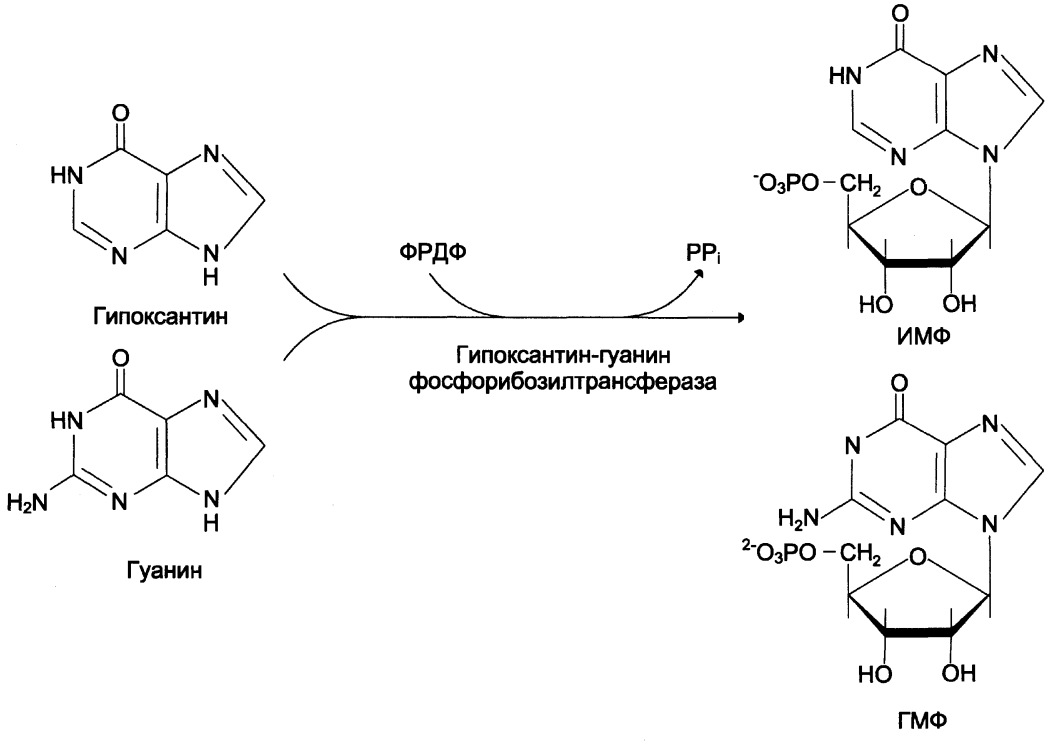


Рис. 10-7. Фосфорибозилирование гипоксантина и гуанина с образованием ИМФ и ГМФ.

Г. Регуляция синтеза пуриновых нуклеотидов

Основным показателем, от которого зависит синтез пуриновых нуклеотидов, служит концентрация ФРДФ, которая, в свою очередь, зависит от скорости его синтеза, утилизации и разрушения. Количество ФРДФ определяется доступностью рибозо-5-фосфата и активностью ФРДФ синтетазы — фермента, чувствительного к концентрации фосфата и пуриновых нуклеотидов.

Внутриклеточная концентрация ФРДФ строго регулируется и обычно низкая. ФРДФ синтетаза — аллостерический фермент. Он активируется неорганическим фосфатом (P_i) и ингибируется пуриновыми нуклеозид- моно-, ди- и трифосфатами, которые по эффективности ингибирования распределяются в следующем по-

рядке: НМФ > НДФ > НТФ (рис. 10-8). ФРДФ служит не только субстратом, но и аллостерическим активатором второй реакции синтеза пуринонуклеотидов *de novo*, которую катализирует амидофосфорибозилтрансфераза.

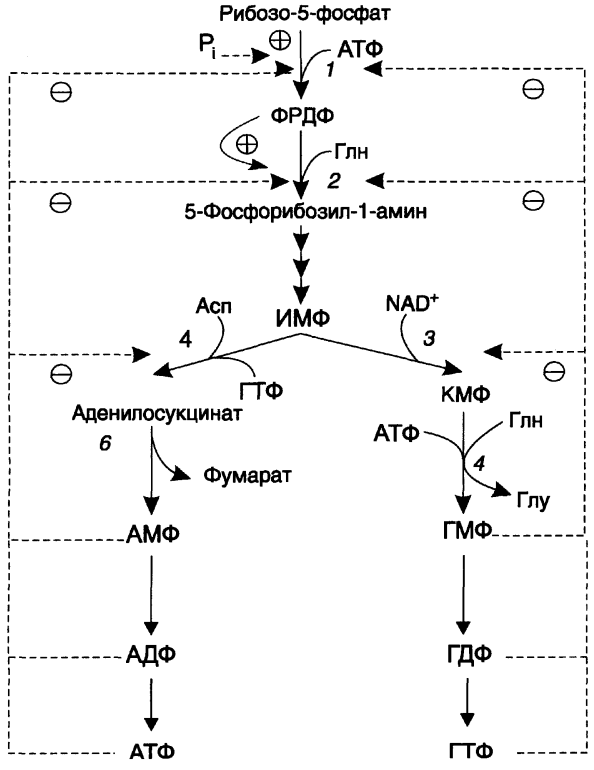


Рис. 10-8. Регуляция синтеза пуриновых нуклеотидов. 1 — ФРДФ синтетаза; 2 — амидофосфорибозилтрансфераза; 3 — ИМФ дегидрогеназа; 4 — аденилосукцинатсинтетаза.

Пуриновые нуклеотиды, особенно АМФ и ГМФ по механизму отрицательной обратной связи ингибируют амидофосфорибозилтрансферазу, которая катализирует первую специфическую реакцию синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*.

Метаболическая цепь образования АМФ и ГМФ *de novo* регулируется также в месте её разветвления: АМФ ингибирует аденилосукцинатсинтетазу, а ГМФ — реакцию образования ксантиловой кислоты, которую катализирует ИМФ дегидрогеназа. Перекрёстная регуляция путей использования ИМФ служит для того, чтобы снизить синтез одного пуринового нуклеотида при дефиците другого.

Помимо ферментов основного пути синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*, регулируется также активность ферментов «запасных» путей: аденинфосфорибозилтрансфераза ингибируется АМФ, а гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза — ИМФ и ГМФ.

III. КАТАБОЛИЗМ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

У человека основной продукт катаболизма пуриновых нуклеотидов — мочевая кислота. Её образование идёт путём гидролитического отщепления фосфатного остатка от нуклеотидов с помощью нуклеотидаз или фосфатаз, фосфоролиза N-гликозидной связи нуклеозидов пуриннуклеозидфосфорилазой, последующего дезаминирования и окисления азотистых оснований (рис. 10-9).

От АМФ и аденозина аминогруппа удаляется гидролитически аденозиндезаминазой с образованием ИМФ или инозина. ИМФ и ГМФ превращаются в соответствующие нуклеозиды: инозин и гуанозин под действием 5′-нуклеотидазы. Пуриннуклеозидфосфорилаза катализирует расщепление N-гликозидной связи в инозине и гуанозине с образованием рибозо-1-фосфата и азотистых оснований: гуанина и гипоксантина. Гуанин дезаминируется и превращается в ксантин, а гипоксантин окисляется в ксантин с помощью ксантиноксидазы, которая катализирует и дальнейшее окисление ксантина в мочевую кислоту.

Ксантиноксидаза — аэробная оксидоредуктаза, простетическая группа которой включает ион молибдена, железа (Fe^{3+}) и FAD. Подобно другим оксидазам, она окисляет пурины молекулярным кислородом с образованием пероксида водорода. В значительных количествах фермент обнаруживается только в печени и кишечнике.

Мочевая кислота удаляется из организма главным образом с мочой и немного через кишечник с фекалиями. У всех млекопитающих, кроме приматов и человека, имеется фермент уриказа, расщепляющий мочевую кислоту с образованием аллантоина, хорошо растворимого в воде (рис. 10-10).

Амфибии, птицы и рептилии, подобно человеку, лишены уриказы и экскретируют моче-

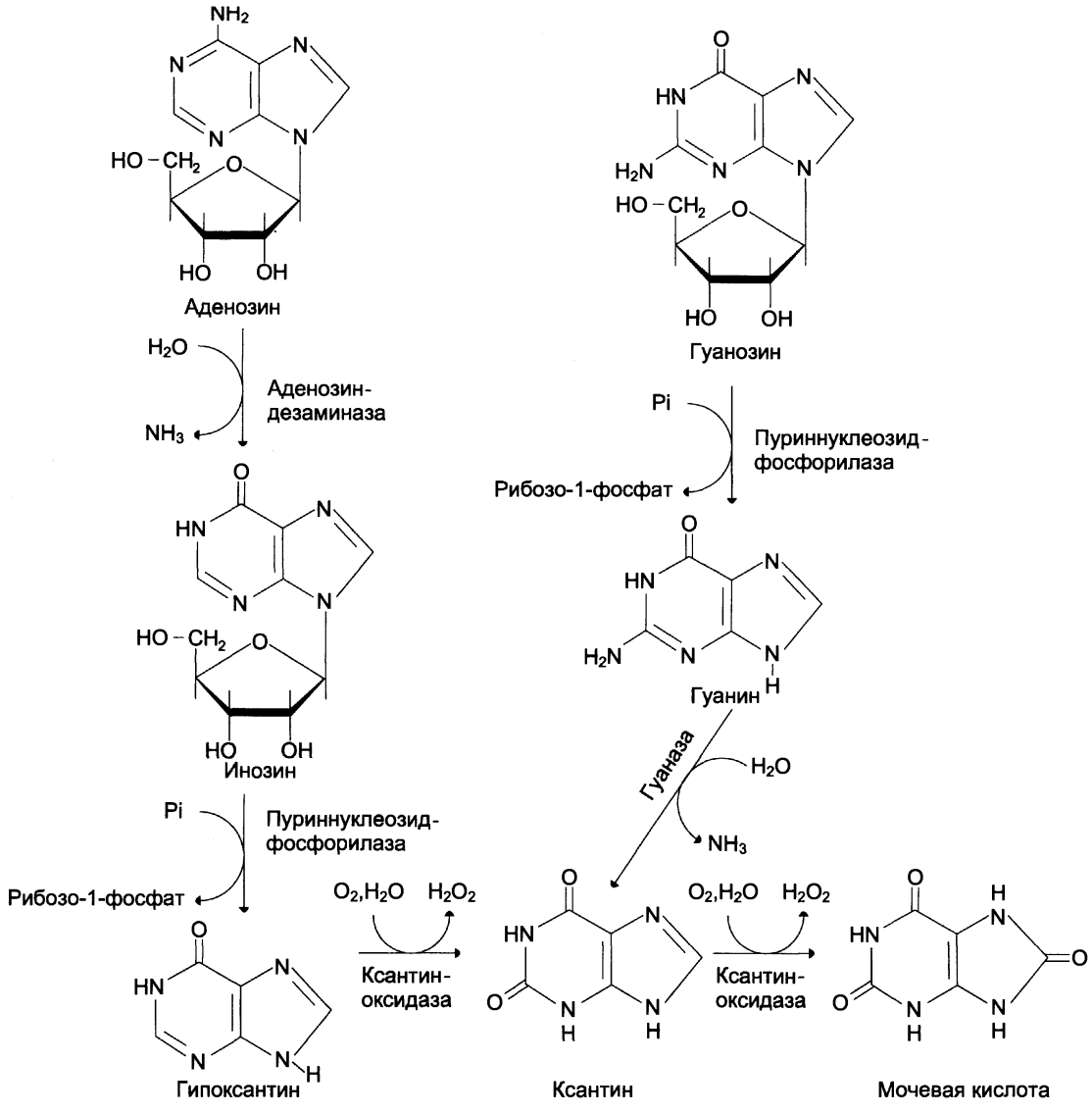


Рис. 10-9. Катаболизм пуриновых нуклеотидов до мочевой кислоты.

вую кислоту и гуанин в качестве конечных продуктов обмена.

Мочевая кислота является слабой кислотой. Содержание недиссоциированной формы и солей (уратов) зависит от pH раствора. При физиологических значениях pH у мочевой кислоты может диссоциировать только один протон из трёх (pK = 5,8), поэтому в биологических жидкостях присутствует как недиссоциированная кислота в комплексе с белками, так и её натриевая соль.

В сыворотке крови в норме содержание мочевой кислоты составляет 0,15–0,47 ммоль/л или 3–7 мг/дл. Ежесуточно из организма выводится от 0,4 до 0,6 г мочевой кислоты и уратов.

IV. НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Ураты значительно более растворимы, чем мочевая кислота: так, в моче с pH 5,0, когда

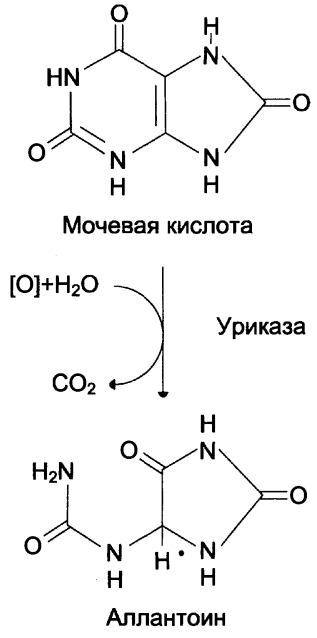


Рис. 10-10. Превращение мочевой кислоты в аллантоин.

мочевая кислота не диссоциирована, её растворимость в 10 раз меньше, чем в моче с pH 7,0, при котором основная часть мочевой кислоты представлена солями. Реакция мочи зависит от состава пищи, но, как правило, она слабокислая, поэтому большинство камней в мочевыводящей системе — кристаллы мочевой кислоты.

А. Гиперурикемия и подагра

Когда в плазме крови концентрация мочевой кислоты превышает норму, то возникает гиперурикемия. Вследствие гиперурикемии может развиться подагра — заболевание, при котором кристаллы мочевой кислоты и уратов откладываются в суставных хрящах, синовиальной оболочке, подкожной клетчатке с образованием подагрических узлов, или тофусов. К характерным признакам подагры относят повторяющиеся приступы острого воспаления суставов (чаще всего мелких) — так называемого острого подагрического артрита. Заболевание может прогрессировать в хронический подагрический артрит.

Поскольку лейкоциты фагоцитируют кристаллы уратов, то причиной воспаления является разрушение лизосомальных мембран лейкоцитов кристаллами мочевой кислоты. Освободившиеся лизосомальные ферменты выходят в цитозоль и разрушают клетки, а продукты клеточного катаболизма вызывают воспаление.

Общий фонд сывороточных уратов в норме составляет ~ 1,2 г у мужчин и 0,6 г у женщин. При подагре без образования тофусов (т.е. подагрических узлов, в которых накапливаются ураты натрия и мочевая кислота) количество уратов возрастает до 2–4 г, а у пациентов с тяжёлой формой болезни, сопровождающейся ростом тофусов, может достигать 30 г.

Подагра — распространённое заболевание, в разных странах ею страдают от 0,3 до 1,7% населения. А поскольку сывороточный фонд уратов у мужчин в 2 раза больше, чем у женщин, то они и болеют в 20 раз чаще, чем женщины.

Как правило, подагра генетически детерминирована и носит семейный характер. Она вызвана нарушениями в работе ФРДФ синтетазы или ферментов «запасного» пути: гипоксантин-гуанин- или аденинфосфорибозилтрансфераз.

К другим характерным проявлениям подагры относят нефропатию, при которой наблюдают образование уратных камней в мочевыводящих путях.

Полиморфные варианты ФРДФ синтетазы

Активность ФРДФ синтетазы, катализирующей образование ФРДФ, строго контролируется пуриновыми нуклеотидами. Мутации в гене ФРДФ синтетазы привели к появлению полиморфных вариантов фермента, которые характеризуются аномальным ответом на обычные регуляторные факторы: концентрацию рибозо-5-фосфата и пуриннуклеотидов. Как правило, наблюдается **суперактивация фермента**. Пуриновые нуклеотиды синтезируются со скоростью, почти независимой от нужд клетки. Это вызывает ингибирование запасных «путей спасения», усиление катаболизма избыточного количества нуклеотидов, повышение продукции мочевой кислоты, гиперурикемию и подагру (табл. 10-1).

Примерно у 40% больных одной из форм гликогеноза — болезнью Гирке (недостаточностью глюкозо-6-фосфатазы) сопутствующей патологией является подагра. Снижение способности печени секретировать глюкозу в кровь увеличивает использование глюкозо-6-фосфата в пентозофосфатном пути. Образуются большие количества рибозо-5-фосфата, которые могут стимулировать избыточный синтез, а следовательно, и катаболизм пуриновых нуклеотидов.

Б. Недостаточность ферментов «запасных путей» синтеза пуриновых нуклеотидов. Синдром Лёша–Нихена

В ряде случаев причиной гиперурикемии, избыточной экскреции пуринов с мочой и подагры являются нарушения в работе ферментов «пути спасения» пуриновых оснований (табл. 10-1). Гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза катализирует реакцию превращения гуанина и гипоксантина в соответствующие нуклеотиды (рис. 10-7). Обнаружены полиморфные варианты гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы со сниженной ферментативной активностью, что:

- уменьшает повторное использование пуриновых оснований, и они превращаются в мочевую кислоту;
- увеличивает синтез пуриновых нуклеотидов *de novo* из-за слабого использования ФРДФ в реакциях реутилизации и увеличения его концентрации в клетке. Адениловые и гуаниловые нуклеотиды образуются в количествах, превышающих потребности клеток, а это способствует усилению их катаболизма.

Синдром Лёша–Нихена — тяжёлая форма гиперурикемии, которая наследуется как рецессивный признак, сцепленный с Х-хромосомой, и проявляется только у мальчиков.

Болезнь вызвана полным отсутствием активности гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы и сопровождается гиперурикемией с содержанием мочевой кислоты от 9 до 12 мг/дл, что превышает растворимость уратов при нормальном pH плазмы. Экскреция мочевой кислоты у больных с синдромом Лёша–Нихена превышает 600 мг/сут и требует для выведения этого количества продукта не менее 2700 мл мочи.

У детей с данной патологией в раннем возрасте появляются тофусы, уратные камни в мочевыводящих путях и серьёзные неврологические отклонения, сопровождающиеся нарушением речи, церебральными параличами, снижением интеллекта, склонностью к нанесению себе увечий (укусы губ, языка, пальцев).

В первые месяцы жизни неврологические расстройства не обнаруживаются, но на пелёнках отмечают розовые и оранжевые пятна, вызванные присутствием в моче кристаллов мочевой кислоты. При отсутствии лечения больные погибают в возрасте до 10 лет из-за нарушения функции почек.

Полная потеря активности аденинфосфорибозилтрансферазы не столь драматична, как отсут-

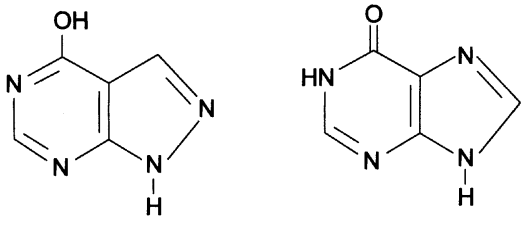
Таблица 10-1. Гиперурикемия, вызванная дефектами в работе ферментов обмена пуриннуклеотидов

Дефектный фермент	Характер дефекта	Клинические проявления	Заболевание
ФРДФ синтетаза	Суперактивация и $\uparrow V_{max}$ Устойчивость к ретроингибированию Снижение K_m для рибозо-5-фосфата	Гиперурикемия, повышенная экскреция уратов с мочой, подагрический артрит	Подагра
Гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза	Частичная потеря активности	Те же	Подагра
	Полная потеря активности	Гиперурикемия, нефропатия, артрит, неврологические и психические отклонения	Синдром Лёша–Нихена
Аденинфосфорибозилтрансфераза	Полная потеря активности	Образование камней 2,8-дигидроксиаденина	Почечно-каменная болезнь

ствие гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы, однако и в этом случае нарушение повторного использования аденина вызывает гиперурикемию и почечнокаменную болезнь, при которой наблюдается образование кристаллов 2,8-дигидроксиаденина.

B. Лечение гиперурикемии

Основным препаратом, используемым для лечения гиперурикемии, является **аллопуринол** — структурный аналог гипоксантина (рис. 10-11).



Аллопуринол Гипоксантин

Рис. 10-11. Строение аллопуринола и гипоксантина.

Аллопуринол оказывает двоякое действие на обмен пуриновых нуклеотидов:

- ингибирует ксантиноксидазу и останавливает катаболизм пуринов на стадии образования гипоксантина, растворимость которого почти в 10 раз выше, чем мочевой кислоты. Действие препарата на фермент объясняется тем, что сначала он, подобно гипоксантину, окисляется в гидроксипуринол, но при этом остаётся прочно связанным с активным центром фермента, вызывая его инактивацию;
- с другой стороны, будучи псевдосубстратом, аллопуринол может превращаться в нуклеотид по «запасному» пути и ингибировать ФРДФ синтетазу и амидофосфорибозилтрансферазу, вызывая торможение синтеза пуринов *de novo*.

При лечении аллопуринолом детей с синдромом Лёша–Нихена удаётся предотвратить развитие патологических изменений в суставах и почках, вызванных гиперпродукцией мочевой кислоты, но препарат не излечивает аномалии в поведении, неврологические и психические расстройства.

Г. Гипоурикемия

Гипоурикемия и возросшая экскреция гипоксантина и ксантина может быть следствием недостаточности ксантиноксидазы, вызванной нарушениями в структуре гена этого фермента, либо результатом повреждения печени.

V. БИОСИНТЕЗ ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Фонд пиримидиновых нуклеотидов, подобно пуриновым нуклеотидам, в основном синтезируется из простых предшественников *de novo*, и только 10–20% от общего количества образуется по «запасным» путям из азотистых оснований или нуклеозидов.

A. Образование пиримидиновых нуклеотидов *de novo*

В отличие от синтеза пуринов, где формирование гетероциклического основания осуществляется на остатке рибозо-5-фосфата, пиримидиновое кольцо синтезируется из простых предшественников: глутамина, CO_2 и аспарагиновой кислоты и затем связывается с рибозо-5-фосфатом, полученным от ФРДФ.

Процесс протекает в цитозоле клеток. Синтез ключевого пиримидинового нуклеотида — УМФ идёт с участием 3 ферментов, 2 из которых полифункциональны.

Образование дигидрооротата

У млекопитающих ключевой, регуляторной реакцией в синтезе пиримидиновых нуклеотидов является синтез карбамоилфосфата из глутамина, CO_2 и АТФ, в реакции катализируемой карбамоилфосфатсинтетазой II (КФС II), которая протекает в цитозоле клеток (рис. 10-12). В реакции NH_2-группа карбамоилфосфата образуется за счёт амидной группы глутамина, что отличает эту реакцию от реакции синтеза карбамоилфосфата в митохондриях в процессе синтеза мочевины из CO_2, NH_3 и АТФ с участием КФС I.

Карбамоилфосфат, использующийся на образование пиримидиновых нуклеотидов, является продуктом полифункционального фермента, который наряду с активностью КФС II содержит

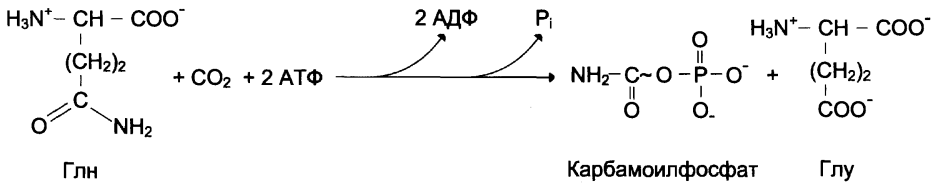


Рис. 10-12. Синтез карбамоилфосфата.

каталитические центры аспартаттранскарбамоилазы и дигидрооротазы. Этот фермент назвали «**КАД-фермент**» — по начальным буквам ферментативных активностей, которыми обладают отдельные каталитические домены этого белка. Объединение первых трёх ферментов метаболического пути в единый полифункциональный комплекс позволяет использовать почти весь синтезированный в первой реакции карбамоилфосфат на взаимодействие с аспартатом и образование карбамоиласпартата, от которого отщепляется вода и образуется циклический продукт — дигидрооротат (рис. 10-13).

Отщепляясь от КАД-фермента, дигидрооротат подвергается дегидрированию NAD-зависимой дигидрооротатдегидрогеназой и превращается в свободное пиримидиновое основание — оротовую кислоту, или оротат.

Образование УМФ

В цитозоле оротат становится субстратом бифункционального фермента — УМФ-синтазы, которая обнаруживает оротатфосфорибозилтрансферазную и ОМФ-декарбоксилазную активности. Первоначально фосфорибозильный остаток от ФРДФ переносится на оротат и образуется нуклеотид — оротидин-5′-монофосфат (ОМФ), декарбоксилирование которого даёт уридин-5-монофосфат (УМФ).

Таким образом, шесть последовательных реакций синтеза пиримидиновых нуклеотидов осуществляются тремя ферментами, которые кодируются в геноме человека тремя различными структурными генами.

Биосинтез УДФ, УТФ и цитидиловых нуклеотидов

УМФ под действием специфических нуклеозидмонофосфат (НМФ) и нуклеозиддифосфат (НДФ) киназ превращается в УДФ и УТФ в результате переноса γ-фосфатного остатка АТФ на соответствующий субстрат.

НМФ-киназа катализирует следующую реакцию:

$$\text{УМФ} + \text{АТФ} \rightarrow \text{УДФ} + \text{АДФ},$$

а НДФ-киназа:

$$\text{УДФ} + \text{АТФ} \rightarrow \text{УТФ} + \text{АДФ}.$$

ЦТФ синтетаза катализирует амидирование УТФ (рис. 10-14), осуществляя АТФ-зависимое замещение кетогруппы урацила на амидную группу глутамина с образованием цитидин-5′-трифосфата (ЦТФ).

Б. «Запасные» пути синтеза пиримидиновых нуклеотидов

Использование пиримидиновых оснований и нуклеозидов в реакциях реутилизации препятствует катаболизму этих соединений до конечных продуктов с расщеплением пиримидинового кольца. В ресинтезе пиримидинов участвуют некоторые ферменты катаболизма нуклеотидов. Так, уридинфосфорилаза в обратимой реакции может рибозилировать урацил с образованием уридина.

$$\text{Урацил} + \text{Рибозо-1-фосфат} \rightarrow \text{Уридин} + H_3PO_4.$$

Превращение нуклеозидов в нуклеотиды катализирует уридин-цитидинкиназа.

Часть ЦМФ может превращаться в УМФ под действием цитидиндезаминазы и пополнять запасы уридиловых нуклеотидов.

$$\text{ЦМФ} + H_2O \rightarrow \text{УМФ} + NH_3.$$

В. Регуляция синтеза пиримидиновых нуклеотидов

Регуляторным ферментом в синтезе пиримидиновых нуклеотидов является полифункцио-

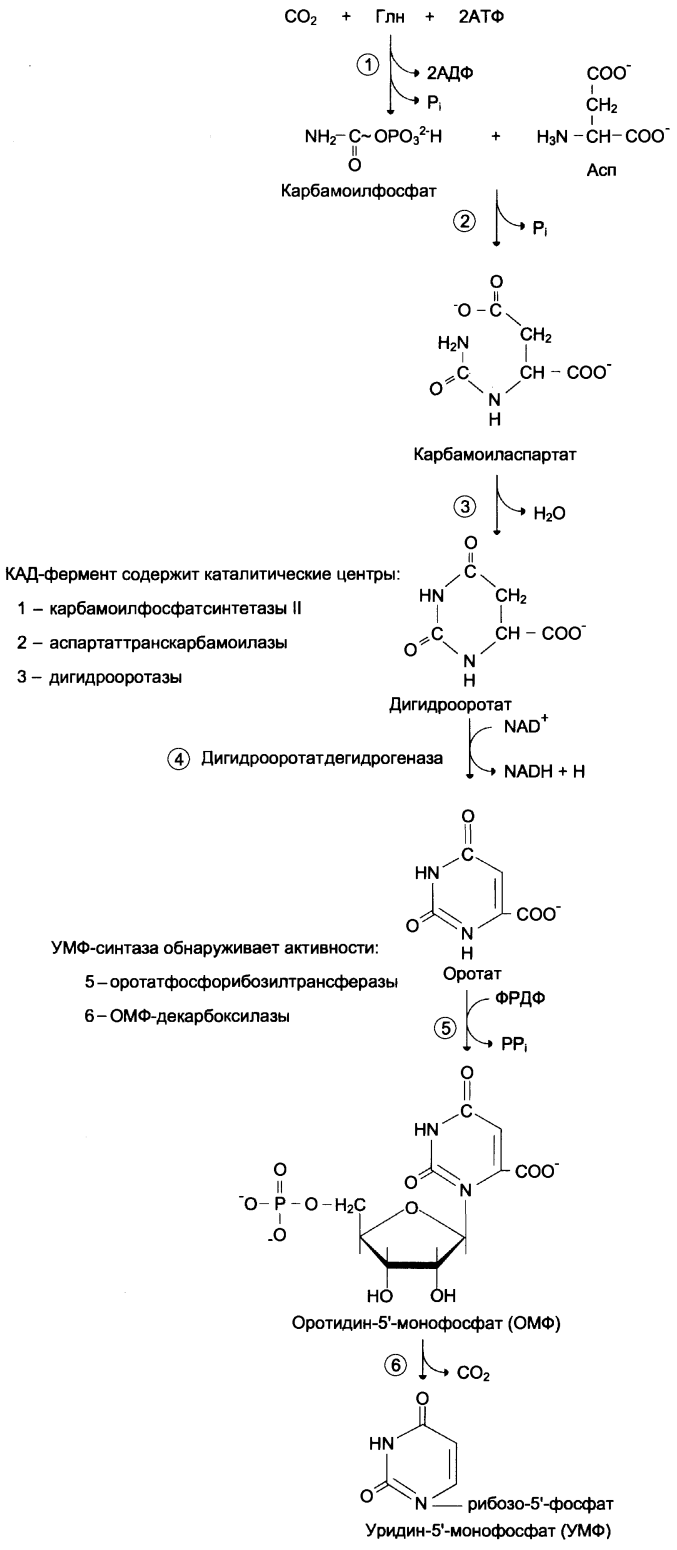


Рис. 10-13. Биосинтез УМФ *de novo*.

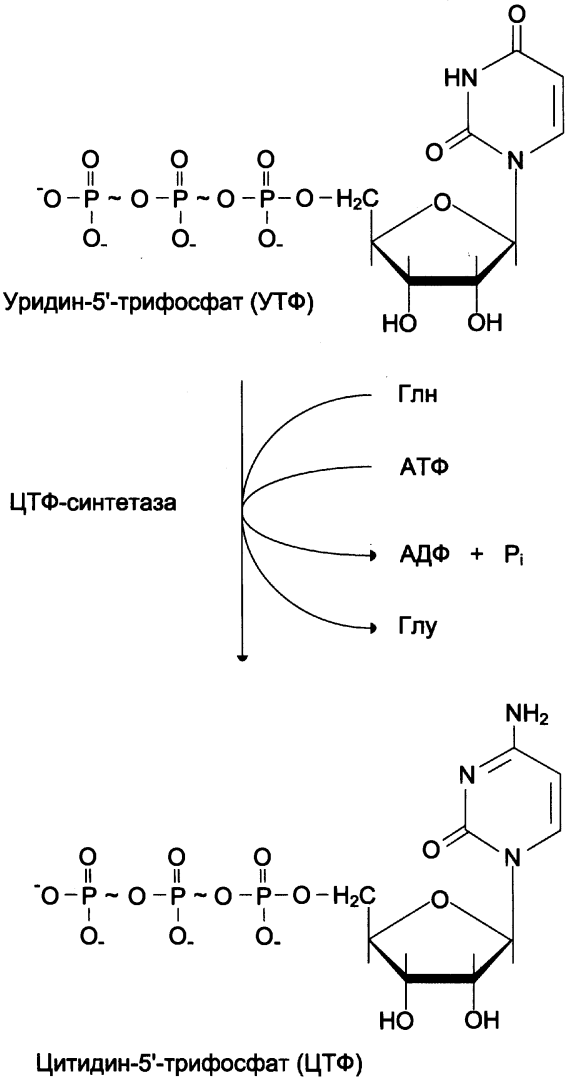


Рис. 10-14. Синтез ЦТФ из УТФ.

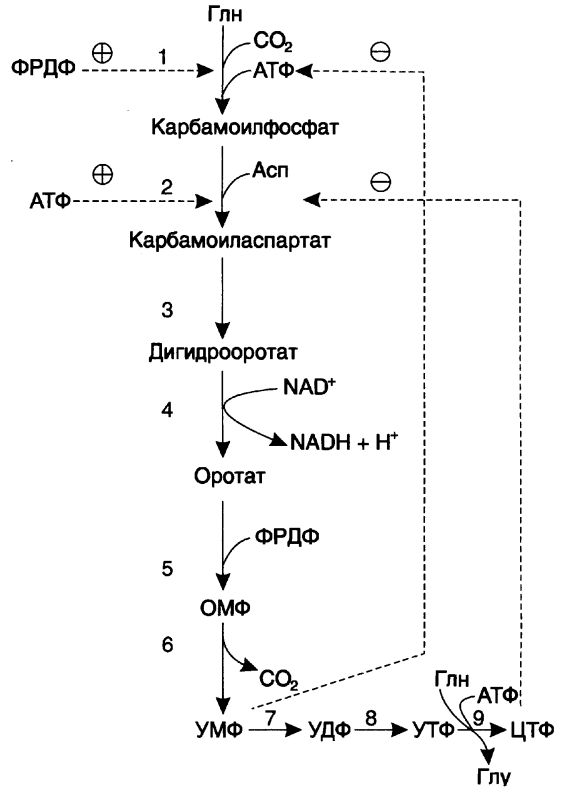


Рис. 10-15. Регуляция синтеза пиримидиновых нуклеотидов. КАД-фермент катализирует реакции 1, 2, 3; дигидрооротатдегидрогеназа — реакцию 4; УМФ синтетаза — реакции 5 и 6; НМФ киназа — реакцию 7; НДФ киназа — реакцию 8; ЦТФ синтетаза — реацию 9.

нальный КАД-фермент. УМФ и пуриновые нуклеотиды аллостерически ингибируют, а ФРДФ активирует его карбамоилсинтетазную активность, тогда как активность аспартаттранскарбамоилазного домена ингибирует ЦТФ, но активирует АТФ (рис. 10-15).

Этот способ регуляции позволяет предотвратить избыточный синтез не только УМФ, но и всех других пиримидиновых нуклеотидов и обеспечить сбалансированное образование всех четырёх основных пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, необходимых для синтеза РНК.

VI. КАТАБОЛИЗМ ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Уже говорилось о том, что цитидиловые нуклеотиды могут гидролитически терять аминогруппу и превращаться в УМФ. Когда от УМФ при участии нуклеотидазы (или фосфатазы) и уридинфосфорилазы отщепляются неорганический фосфат и рибоза, то остаётся азотистое основание — урацил. Аналогично расщепляются дезоксирибонуклеотиды, и из dЦМФ образуется урацил, а из dТМФ — тимин (рис. 10-16).

Пиримидиновые основания при участии дигидропиримидиндегидрогеназы присоединяют 2 атома водорода по двойной связи кольца с образованием дигидроурацила или дигидротимина. Оба гетероцикла могут взаимодействовать с

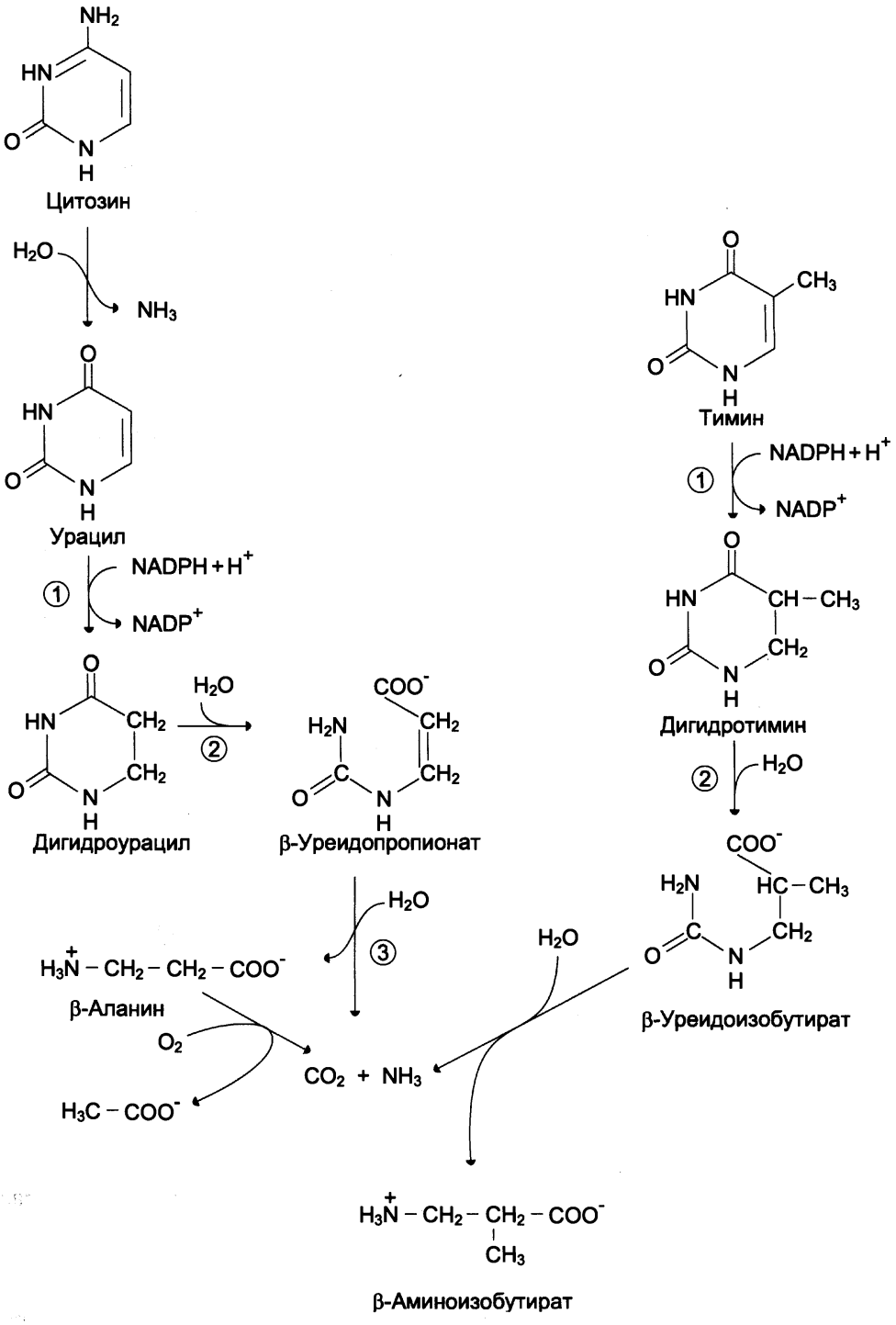


Рис. 10-16. Катаболизм пиримидиновых оснований. 1 — дигидропиримидиндегидрогеназа; 2 — дигидропиримидинциклогидролаза; 3 — уреидопропионаза.

водой в реакции, катализируемой дигидропиримидинциклогидролазой, и дигидроурацил превращается в β-уреидопропионовую кислоту, а дигидротимин — в β-уреидоизомасляную кислоту. Оба β-уреидопроизводных под действием общего для них фермента уреидопропионазы расщепляются с образованием CO_2, NH_4^+ и β-аланина или β-аминоизомасляной кислоты соответственно.

β-Аланин обнаруживают в плазме крови и многих тканях. Он используется в мышцах на образование дипептидов: карнозина и анзерина. Под действием бактериальной микрофлоры кишечника β-аланин включается в пантотеновую кислоту, которая всасывается и используется на образование КоА.

Часть β-аланина и β-аминбутирата трансаминируется с α-кетоглутаратом и даёт малонил полуальдегид или метилмалонил полуальдегид соответственно, которые превращаются в малонил-КоА и сукцинил-КоА и используются в соответствующих метаболических путях, либо окисляются до CO_2 и H_2O. Частично β-аминобутират экскретируется с мочой.

VII. НАРУШЕНИЯ ОБМЕНА ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Описано несколько нарушений, связанных со снижением активности ферментов обмена пиримидиновых нуклеотидов. Одно из них — оротацидурия — вызвано дефектом в работе второго бифункционального фермента синтеза нуклеотидов *de novo* — УМФ-синтазы, два других обнаружены в процессе катаболизма пиримидинов.

А. Оротацидурия

Это единственное нарушение синтеза пиримидинов *de novo*. Оно вызвано снижением активности УМФ-синтазы, которая катализирует образование и декарбоксилирование ОМФ. Поскольку в эмбриогенезе от образования пиримидинов *de novo* зависит обеспечение синтеза ДНК субстратами, то жизнь плода невозможна при полном отсутствии активности этого фермента. Действительно, у всех пациентов с оротацидурией отмечают заметную, хотя и очень низкую активность УМФ-синтазы. Установлено, что содержание оротовой кислоты в моче пациентов (1 г/сут и более) значительно превосходит количество оротата, которое ежедневно синтезируется в норме (около 600 мг/сут). Снижение синтеза пиримидиновых нуклеотидов, наблюдающееся при этой патологии, нарушает регуляцию КАД-фермента по механизму ретроингибирования, из-за чего возникает гиперпродукция оротата.

Клинически наиболее характерное следствие оротацидурии — мегалобластная анемия, вызванная неспособностью организма обеспечить нормальную скорость деления клеток эритроцитарного ряда. Её диагностируют у детей на том основании, что она не поддаётся лечению препаратами фолиевой кислоты.

Недостаточность синтеза пиримидиновых нуклеотидов сказывается на интеллектуальном развитии, двигательной способности и сопровождается нарушениями работы сердца и ЖКТ. Нарушается формирование иммунной системы, и наблюдается повышенная чувствительность к различным инфекциям.

Гиперэкскреция оротовой кислоты сопровождается нарушениями со стороны мочевыводящей системы и образованием камней. При отсутствии лечения больные обычно погибают в первые годы жизни. При этом оротовая кислота не оказывает токсического эффекта. Многочисленные нарушения в работе разных систем организма вызваны «пиримидиновым голодом».

Для лечения этой болезни применяют уридин (от 0,5 до 1 г/сут), который по «запасному» пути превращается в УМФ.

$$\text{Уридин} + \text{АТФ} \rightarrow \text{УМФ} + \text{АДФ}.$$

Нагрузка уридином устраняет «пиримидиновый голод», а поскольку из УМФ могут синтезироваться все остальные нуклеотиды пиримидинового ряда, то снижается выделение оротовой кислоты из-за восстановления механизма ретроингибирования КАД-фермента. Для больных оротацидурией лечение уридином продолжается в течение всей жизни, и этот нуклеозид становится для них незаменимым пищевым фактором.

Кроме генетически обусловленных причин, оротацидурия может наблюдаться:

- при гипераммониемии, вызванной дефектом любого из ферментов орнитинового цикла,

за исключением карбамоилфосфат- синтетазы I. В этом случае карбамоилфосфат, синтезированный в митохондриях, выходит в цитозоль клеток и начинает использоваться на образование пиримидиновых нуклеотидов. Концентрация всех метаболитов, в том числе и оротовой кислоты, повышается. Наиболее значительная экскреция оротата отмечается при недостаточности орнитинкарбамоилтрансферазы (второго фермента орнитинового цикла);

- в процессе лечения подагры аллопуринолом, который превращается в оксипуринолмононуклеотид и становится сильным ингибитором УМФ-синтазы. Это приводит к накоплению оротовой кислоты в тканях и крови.

Б. Нарушения катаболизма пиримидинов

Известны нарушения в работе 2 ферментов этого метаболического пути.

При недостаточности пиримидин-5′-нуклеотидазы нарушаются отщепление неорганического фосфата от пиримидиновых мононуклеотидов и образование нуклеозидов.

Неактивная изоформа пиримидин-5′-нуклеотидазы обнаружена в эритроцитах. В результате наблюдается накопление пиримидиновых НТФ, которые ингибируют пентозофосфатный путь превращения глюкозы и тем самым создают предпосылки к гемолизу эритроцитов (см. раздел 14).

Дигидропиримидиндегидрогеназа — скорость-лимитирующий фермент катаболизма пиримидинов. Нарушение работы этого фермента сопровождается отклонениями в функционировании нервной системы и диагностируется на основании повышения уровня свободных пиримидинов: урацила и тимина в плазме крови.

VIII. БИОСИНТЕЗ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

Синтез дезоксирибонуклеотидов идёт с заметной скоростью только в тех клетках, которые вступают в S-фазу клеточного цикла и готовятся к синтезу ДНК и делению. В покоящихся клетках дезоксинуклеотиды практически отсутствуют. Все дезоксинуклеотиды, кроме тимидиловых, образуются из рибонуклеотидов путём прямого восстановления ОН-группы у второго углеродного атома рибозы в составе рибонуклеозиддифосфатов до дезоксирибозы. Тимидиловые нуклеотиды синтезируются из дУМФ особым путём с участием N^5,N^{10}-метилен-H_4-фолата.

А. Рибонуклеотидредуктазный комплекс

Реакцию восстановления НДФ в дезоксипроизводные катализирует рибонуклеотидредуктазный комплекс, в состав которого входят: собственно рибонуклеотидредуктаза (РНР), белок тиоредоксин и фермент тиоредоксинредуктаза, обеспечивающий регенерацию восстановленной формы тиоредоксина (рис. 10-17).

Рибонуклеотидредуктаза — олигомерный белок, состоящий из двух B_1- и двух B_2-субъединиц, и содержит негеминовое железо в качестве кофактора.

Непосредственным донором водорода в реакции восстановления рибозы служит низкомолекулярный белок тиоредоксин. В рабочую часть этого белка входят 2 SH-группы, которые, отдавая водород, окисляются с образованием дисульфидного мостика. Второй фермент комплекса — тиоредоксинредуктаза — катализирует гидрирование окисленного тиоредоксина с использованием NADPH.

При участии комплекса РНР образуются: дАДФ, дГДФ, дУДФ и дЦДФ, которые с помощью НДФ-киназ превращаются в дНТФ, 3 из которых (кроме дУДФ) непосредственно используются в синтезе ДНК.

$$\text{дНДФ} + \text{АТФ} \rightarrow \text{дНТФ} + \text{АДФ}.$$

Б. Биосинтез тимидиловых нуклеотидов

Тимидин-5′-монофосфат (дТМФ) образуется из дУМФ в реакции, катализируемой тимидилатсинтазой (рис. 10-18). Донором метильной группы, появляющейся в 5-положении пиримидинового кольца в молекуле дТМФ, служит кофермент тимидилатсинтазы — N^5,N^{10}-метилен-H_4-фолат. С помощью этого кофермента в молекулу дУМФ включается метиленовая группа и восстанавливается в метильную, используя 2 атома водорода от H_4-фолата.

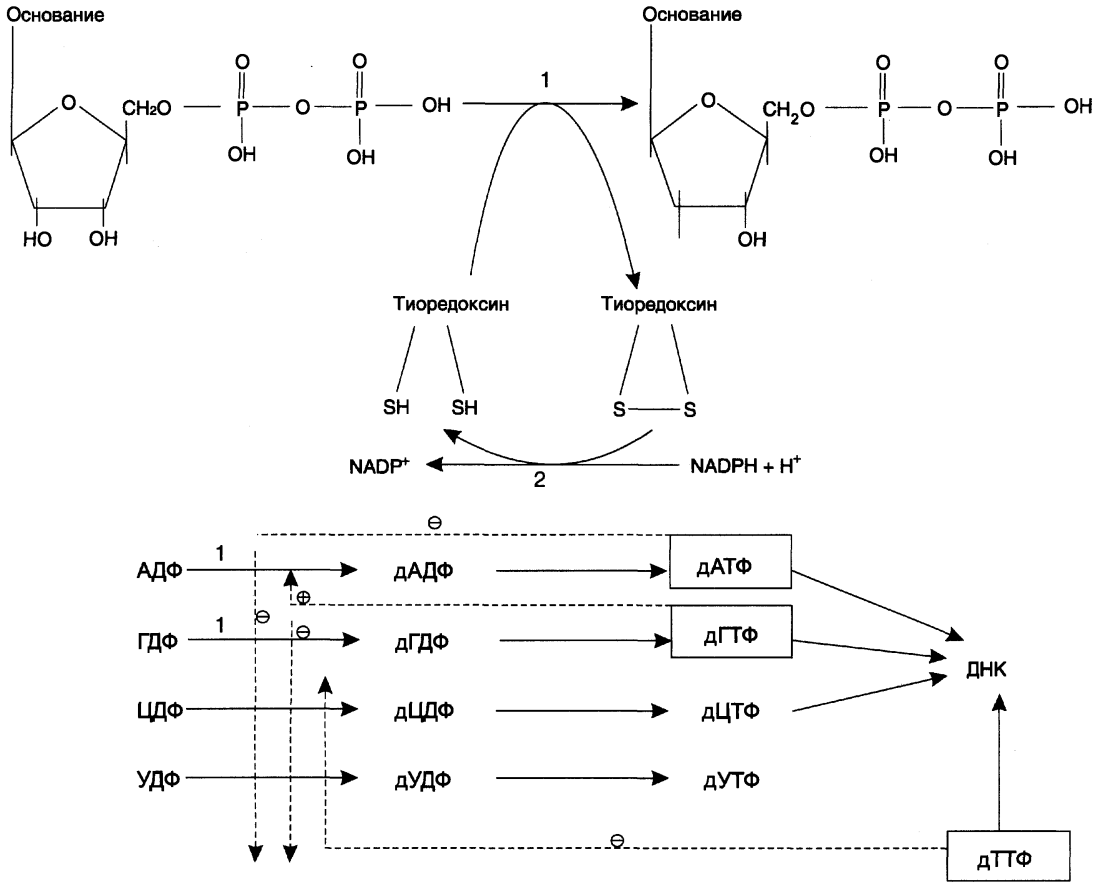


Рис. 10-17. Восстановление рибонуклеозиддифосфатов в 2'-дезоксирибонуклеозиддифосфаты. 1 — рибонуклеотидредуктаза (РНР); 2 — тиоредоксинредуктаза.

Образование субстрата тимидилатсинтазной реакции — дУМФ осуществляется двумя путями (рис. 10-19):

- дефосфорилированием дУДФ;
- гидролитическим дезаминированием дЦМФ с помощью дЦМФ дезаминазы. дЦМФ получается при дефосфорилировании дЦДФ — одного из продуктов рибонуклеотидредуктазной реакции. В организме человека это — основной путь образования дУМФ.

Скорость синтеза дТМФ зависит также от количества второго субстрата тимидилатсинтазной реакции — N^5,N^{10}-метилен-H_4-фолата, пополнение запасов которого осуществляется при участии 2 ферментов: дигидрофолатредуктазы, которая с участием NADPH восстанавливает H_2-фолат в H_4-фолат, и серин гидроксиметилтрансферазы, осуществляющей перенос β-гидроксиметиленовой группы серина на H_4-фолат (см. раздел 9). У человека дТМФ образуется, главным образом, из дЦДФ.

В. «Запасные» пути синтеза дезоксирибонуклеотидов

В быстроделящихся клетках наряду с синтезом дезоксинуклеотидов с помощью рибонуклеотидредуктазного комплекса и тимидилатсинтазы активируются реакции, обеспечивающие повторное использование тимина и дезоксицитидина в реакциях, катализируемых ферментами «запасных» путей и обратимых реакций катаболизма. Под влиянием тимидинфосфорилазы протекает следующая реакция:

Тимин + Дезоксирибоза-1-фосфат → Тимидин + H_3PO_4.

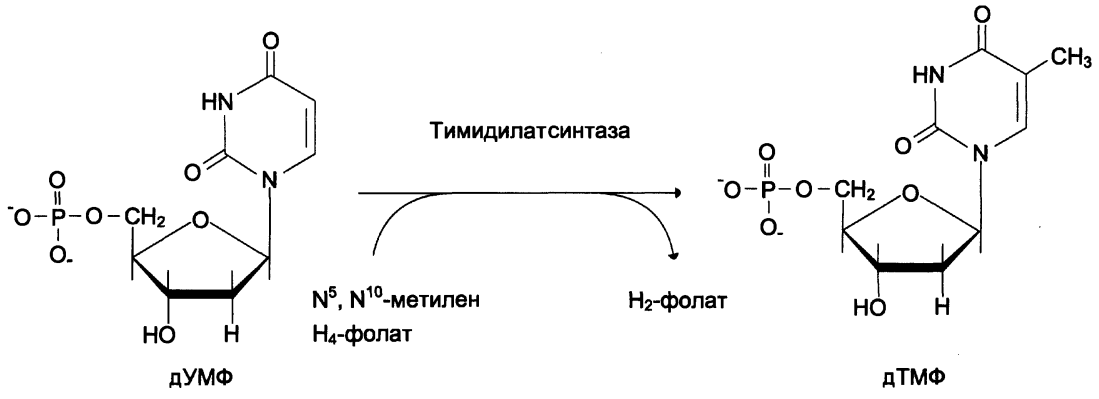


Рис. 10-18. Синтез дТМФ из дУМФ.

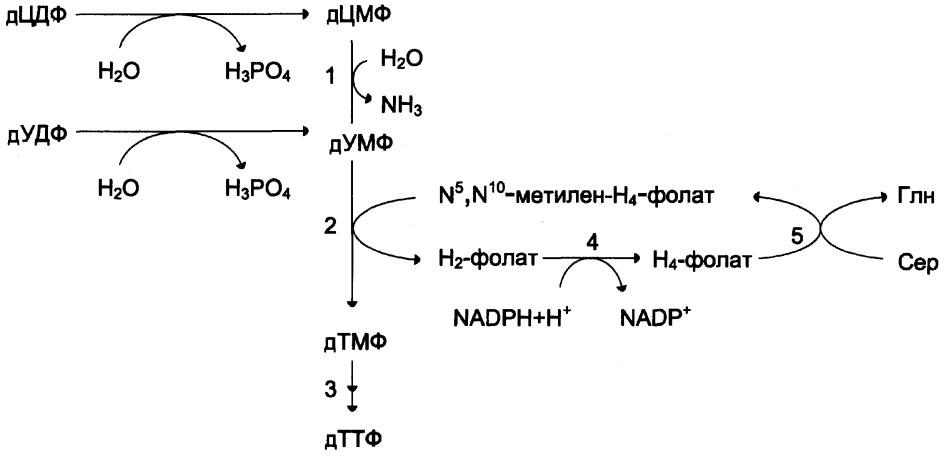


Рис. 10-19. Образование ТТФ из дЦДФ и дУДФ. 1 — дЦМФ дезаминаза; 2 —тимидилатсинтаза; 3 — дНМФ- и дНДФ киназы; 4 — дигидрофолатредуктаза; 5 — серингидроксиметилтрансфераза.

Тимидинкиназа катализирует следующую реакцию:

Тимидин + АТФ → дТМФ + АДФ.

Дезоксицитидинкиназа катализирует следующую реакцию:

Дезоксицитидин + АТФ → дЦМФ + АДФ.

Г. Регуляция синтеза дезоксирибонуклеотидов

Рибонуклеотидредуктаза, тимидилатсинтаза и тимидинкиназа — индуцируемые ферменты, их количество в клетке регулируется на генетическом уровне по механизму индукции и репрессии. Синтез этих белков начинает нарастать в G_1-периоде, достигает максимума во время активного синтеза ДНК, снижаясь практически до нуля в G_2- и М-периоды клеточного цикла.

В то же время активность РНР подвержена сложной аллостерической регуляции, с помощью которой достигается сбалансированное образование всех дНДФ.

РНР осуществляет последовательное восстановление всех рибонуклеозиддифосфатов. Первыми восстанавливаются пиримидиновые нуклеотиды, а последним — дАДФ. дАДФ фосфорилируется в дАТФ, накопление которого полностью прекращает восстановление всех остальных рибонуклеозиддифосфатов.

Д. Нарушения в работе РНР, вызванные недостаточностью ферментов катаболизма пуриннуклеозидов

Аденозиндезаминаза (АДА) и пуриннуклеозидфосфорилаза (ПНФ) участвуют в превращении пуриновых нуклеозидов в азотистые основания. Их недостаточность сопровождается развитием тяжёлых форм иммунодефицита.

Недостаточность аденозиндезаминазы. АДА катализирует гидролитическое дезаминирование аденозина и дезоксиаденозина:

$$\text{Аденозин} + H_2O \rightarrow \text{Инозин} + NH_3,$$

$$\text{Дезоксиаденозин} + H_2O \rightarrow \text{Дезоксиинозин} + NH_3.$$

Фермент АДА обнаружен во многих органах и тканях, однако его недостаточность имеет наиболее тяжёлые последствия для клеток лимфоцитарного ряда. Низкая активность этого фермента нарушает пролиферацию и созревание Т- и В-лимфоцитов и сопровождается тяжёлыми формами клеточного и гуморального иммунодефицита. Дети, страдающие этой патологией, как правило, погибают в раннем возрасте от бактериальных, вирусных или грибковых инфекций.

Столь тяжёлые последствия недостаточности АДА для клеток лимфоцитарного ряда объясняют тем, что при снижении скорости дезаминирования адениловых и дезоксиадениловых нуклеотидов в клетках увеличивается концентрация дАТФ, который ингибирует РНР. Это нарушает синтез всех дНТФ и лишает клетки субстратов для синтеза ДНК. Для нелимфоцитарных клеток недостаточность АДА не сопровождается нарушениями метаболизма в связи с тем, что в них активно работает фосфатаза дАТФ, которая предотвращает накопление основного ингибитора РНР — дАТФ.

Фермент обладает групповой субстратной специфичностью и использует в качестве субстратов некоторые производные аденозина, которые применяются в терапии онкологических и противовирусных заболеваний (аденозинарабинозид, формицин).

Недостаточность пуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФ). ПНФ катализирует фосфоролиз пуриновых рибо- и дезоксирибонуклеозидов с освобождением азотистых оснований и рибозо- или дезоксирибозо-1-фосфата. Субстратами служат гуанозин, дезоксигуанозин и инозин.

$$\text{Нуклеозид} + H_3PO_4 \rightarrow \text{Азотистое основание} + \text{Рибозо-1-фосфат}.$$

Фермент обнаружен во многих органах и тканях, но особенно активен в клетках-предшественниках Т-лимфоцитов в процессе их созревания в тимусе. При наследственной недостаточности пуриннуклеозидфосфорилазы, вызванной генными мутациями, в крови снижается образование и количество зрелых Т-лимфоцитов. Нарушение созревания Т-лимфоцитов вызвано тем, что в этих клетках высокой активностью обладает дезоксигуанозинкиназа, а это приводит к накоплению дГТФ в концентрациях, которые, подобно дАТФ, ингибируют РНР.

У детей снижен клеточный иммунитет, хотя гуморальный иммунитет не страдает, так как в В-лимфоцитах дезоксигуанозинкиназа малоактивна и накопления дГТФ в токсических концентрациях не отмечают.

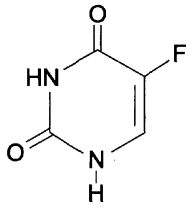
Болезнь, вызванная недостаточностью ПНФ, характеризуется более лёгким течением, чем болезнь, обусловленная дефицитом АДА.

IX. ФЕРМЕНТЫ СИНТЕЗА РИБО- И ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ КАК МИШЕНИ ДЛЯ ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

В терапии инфекционных и онкологических болезней, научных исследованиях в области медицины и биологии часто используют синтетические аналоги пуринов и пиримидинов. Введение в организм животного или человека аналога, имеющего изменения в структуре гетероциклического кольца или углеводной компоненты, угнетает активность ферментов, участвующих в метаболизме нуклеотидов, скорость синтеза РНК или ДНК из-за нарушения комплементарных взаимодействий азотистых оснований и роста полинуклеотидных цепей. Аналоги пуринов, пиримидинов и их нуклеозиды нашли применение в качестве антибактериальных, противовирусных и химиотерапевтических средств.

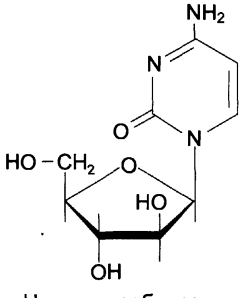
А. Противоопухолевые препараты

Синтезировано очень много аналогов дНТФ, которые включаются ДНК полимеразами в ДНК и ингибируют репликацию. К числу мощных противоопухолевых препаратов принадлежит 5-фторурацил (5-FU) — аналог урацила.



5-Фторурацил

В организме по «запасным» путям 5-FU превращается в 5-F-УМФ либо в реакции, катализируемой оротатфосфорибозилтрансферазой, либо через промежуточное образование нуклеозида и последующее фосфорилирование. Превращаясь в нуклеозиддифосфат, 5-FU может участвовать в реакции, катализируемой РНР, и восстанавливаться в соответствующее дезоксипроизводное. Под действием фосфатазы 5-F-дУДФ снова теряет фосфат, и образующийся 5-F-дУМФ связывается с тимидилатсинтазой и N^5, N^{10}-метилен-H_4-фолатом, образуя комплекс, напоминающий промежуточное соединение в реакции превращения дУМФ в дТМФ. Тимидилатсинтаза оказывается полностью блокированной, и синтез дТМФ прекращается:



Цитозинарабинозид

Цитозинарабинозид (или цитарабин) представляет собой соединение, в котором остаток рибозы замещён на стериоизомер — арабинозу. Оно используется в химиотерапии рака, в частности, при острой миелоцитарной лейкемии.

В организме препарат может превращаться в дНТФ, ингибировать ДНК полимеразы и снижать скорость репликации.

Аналоги фолиевой кислоты. В обмене нуклеотидов производные H_4-фолата как доноры одноуглеродных групп участвуют в формировании пуринового гетероциклического кольца и в ключевой реакции синтеза дТМФ из дУМФ, катализируемой тимидилатсинтазой.

В последнем случае N^5,N^{10}-метилен-H_4-фолат служит донором метильной группы и в ходе реакции превращается в H_2-фолат. Для активного синтеза тимидиловых нуклеотидов H_2-фолат должен повторно использоваться, проходя стадию восстановления в H_4-фолат (см. формулу ниже).

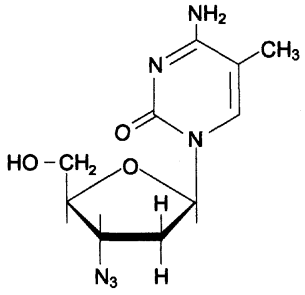
Метотрексат и аминоптерин — структурные аналоги фолиевой кислоты — ингибируют дигидрофолатредуктазу и таким образом нарушают синтез пуриновых нуклеотидов и превращение дУМФ в дТМФ, снижая внутриклеточную концентрацию субстратов синтеза ДНК и РНК. Препараты широко используют в химиотерапии опухолей.

Б. Антивирусные и антибактериальные препараты

Азидотимидин (AZT, или зидовидин) представляет собой мощный противовирусный препарат, применяющийся в лечении инфекций, которые сопровождают приобретённые формы иммунодефицита. Будучи структурным аналогом тимидина, препарат имеет в 3′-положении дезоксирибозы азидогруппу (см. схему на с. 544).

AZT может фосфорилироваться и с помощью ДНК-полимераз включаться в растущую молекулу ДНК. Однако присутствие в 3′-положении дезоксирибозы азидогруппы делает синтезирующиеся молекулы ДНК не способными к пос-

Метотрексат

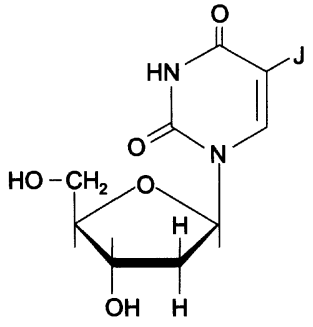


Азидотимидин

ледующему удлинению. В результате образование новых молекул ДНК прекращается.

Важно, что фосфорилированные производные AZT утилизируются более эффективно вирусной ДНК-полимеразой или так называемой обратной транскриптазой, чем ДНК-полимеразами эукариотов, поэтому препарат наиболее эффективно влияет на размножение вирусов и, в частности, ретровируса, вызывающего ВИЧ-инфекцию.

5-йоддезоксиуридин используют в терапии кератитов и поражений роговицы глаза вирусом герпеса.



5-йод-2'-дезоксиуридин

Азатиоприн в организме превращается в 6-меркаптопурин, который оказывает мощное иммуносупрессорное действие. Препарат широко используют в трансплантологии для предотвращения развития иммунологических реакций, вызывающих отторжение трансплантата.

РАЗДЕЛ 11

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ И ФУНКЦИЙ ОРГАНИЗМА

I. ОСНОВНЫЕ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА И МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ

Для нормального функционирования многоклеточного организма необходима взаимосвязь между отдельными клетками, тканями и органами. Эту взаимосвязь осуществляют 4 основные системы регуляции (рис. 11-1).

- Центральная и периферическая нервные системы через нервные импульсы и нейромедиаторы;
- Эндокринная система через эндокринные железы и гормоны, которые секретируются в кровь и влияют на метаболизм различных клеток-мишеней;
- Паракринная и аутокринная системы посредством различных соединений, которые секретируются в межклеточное пространство и взаимодействуют с рецепторами либо близлежащих клеток, либо той же клетки (простагландины, гормоны ЖКТ, гистамин и др.);
- Иммунная система через специфические белки (цитокины, антитела).

A. Иерархия регуляторных систем

Системы регуляции обмена веществ и функций организма образуют 3 иерархических уровня.

Первый уровень — ЦНС. Нервные клетки получают сигналы, поступающие из внешней и внутренней среды, преобразуют их в форму нервного импульса и передают через синапсы, используя химические сигналы — медиаторы. Медиаторы вызывают изменения метаболизма в эффекторных клетках.

Второй уровень — эндокринная система. Включает гипоталамус, гипофиз, периферические эндокринные железы (а также отдельные клетки), синтезирующие гормоны и высвобождающие их в кровь при действии соответствующего стимула.

Третий уровень — внутриклеточный. Его составляют изменения метаболизма в пределах клетки или отдельного метаболического пути, происходящие в результате:

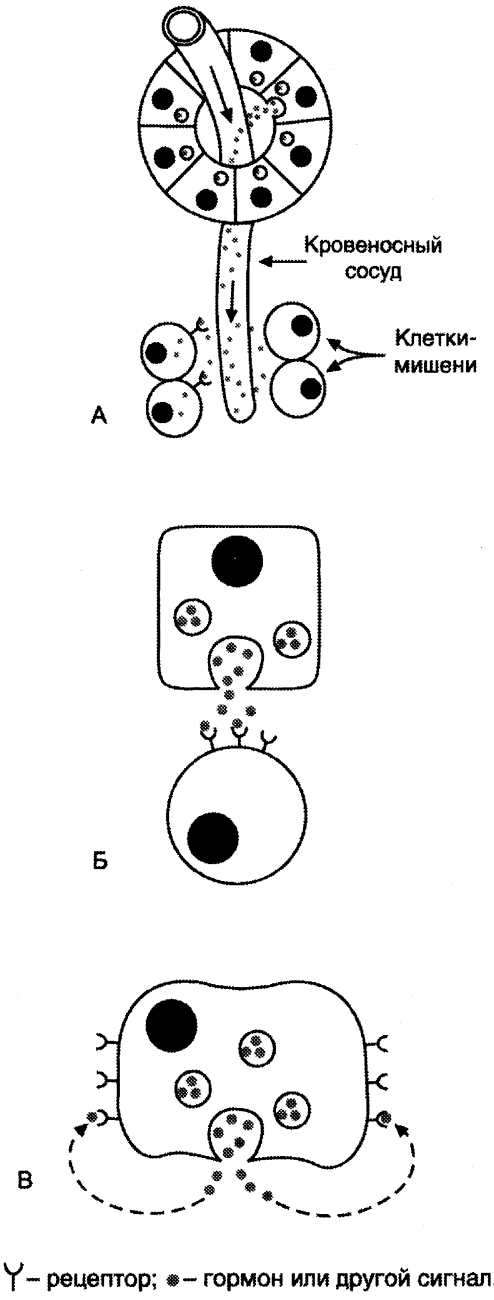


Рис. 11-1. Системы регуляции метаболизма. А — эндокринная — гормоны секретируются железами в кровь, транспортируются по кровеносному руслу и связываются с рецепторами клеток-мишеней; Б — паракринная — гормоны секретируются во внеклеточное пространство и связываются с мембранными рецепторами соседних клеток; В — аутокринная — гормоны секретируются во внеклеточное пространство и связываются с мембранными рецепторами клетки, секретирующей гормон.

- **изменения активности ферментов** путём активации или ингибирования;
- **изменения количества ферментов** по механизму индукции или репрессии синтеза белков или изменения скорости их разрушения;
- **изменения скорости транспорта** веществ через мембраны клеток.

Б. Роль гормонов в регуляции обмена веществ и функций

Интегрирующими регуляторами, связывающими различные регуляторные механизмы и метаболизм в разных органах, являются гормоны. Они функционируют как химические посредники, переносящие сигналы, возникающие в различных органах и ЦНС. Ответная реакция клетки на действие гормона очень разнообразна и определяется как химическим строением гормона, так и типом клетки, на которую направлено действие гормона.

В крови гормоны присутствуют в очень низкой концентрации. Для того чтобы передавать сигналы в клетки, гормоны должны распознаваться и связываться особыми белками клетки — рецепторами, обладающими высокой специфичностью.

Физиологический эффект гормона определяется разными факторами, например концентрацией гормона (которая определяется скоростью инактивации в результате распада гормонов, протекающего в основном в печени, и скоростью выведения гормонов и его метаболитов из организма), его сродством к белкам-переносчикам (стероидные и тиреоидные гормоны транспортируются по кровеносному руслу в комплексе с белками), количеством и типом рецепторов на поверхности клеток-мишеней.

Синтез и секреция гормонов стимулируются внешними и внутренними сигналами, поступающими в ЦНС (рис. 11-2).

Эти сигналы по нейронам поступают в гипоталамус, где стимулируют синтез пептидных рилизинг-гормонов (от англ. *release* — освобождать) — либеринов и статинов, которые, соответственно, стимулируют или ингибируют синтез и секрецию гормонов передней доли гипофиза. Гормоны передней доли гипофиза, называемые тропными гормонами, стимулируют образование и секрецию гормонов периферических эндокринных желёз, которые поступа-

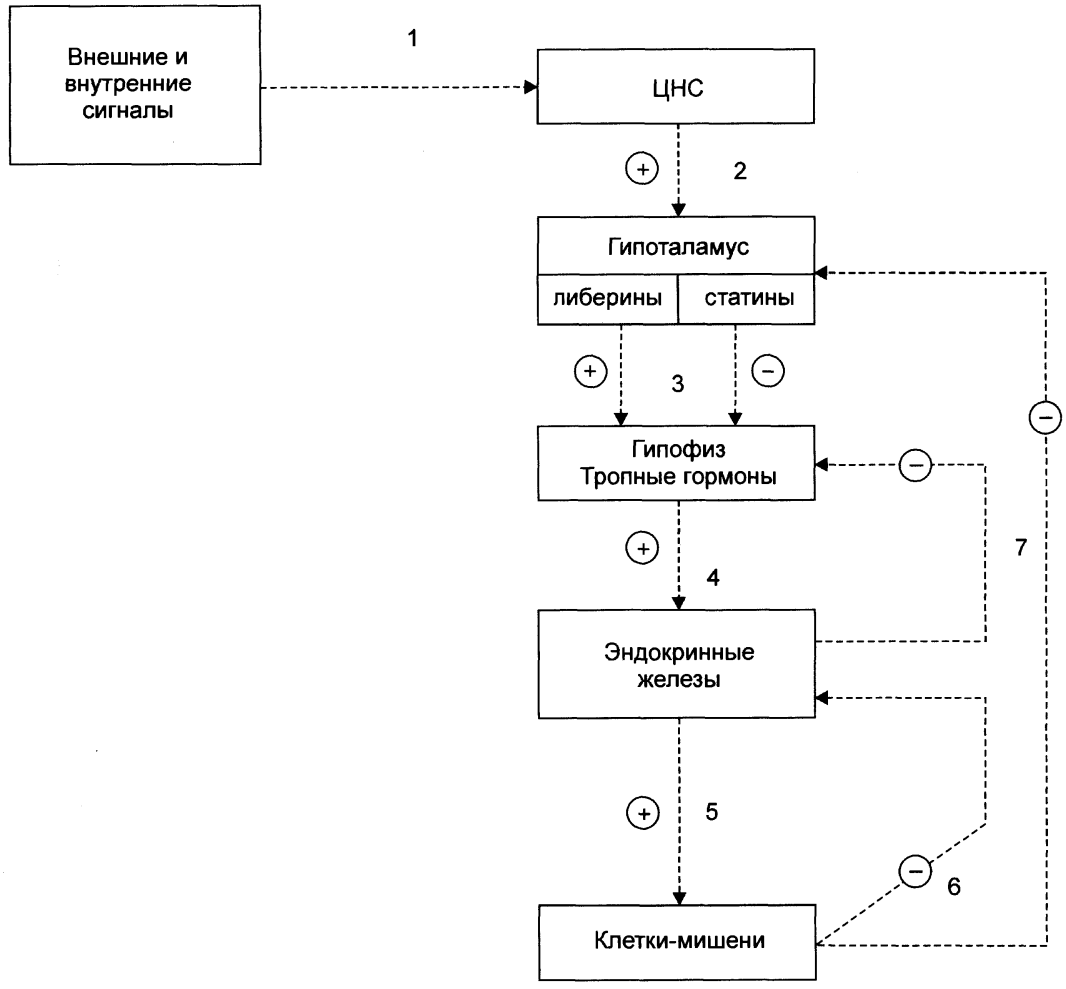


Рис. 11-2. Схема взаимосвязи регуляторных систем организма. 1 — синтез и секреция гормонов стимулируется внешними и внутренними сигналами; 2 — сигналы по нейронам поступают в гипоталамус, где стимулируют синтез и секрецию рилизинг-гормонов; 3 — рилизинг-гормоны стимулируют (либерины) или ингибируют (статины) синтез и секрецию тропных гормонов гипофиза; 4 — тропные гормоны стимулируют синтез и секрецию гормонов периферических эндокринных желез; 5 — гормоны эндокринных желез поступают в кровоток и взаимодействуют с клетками-мишенями; 6 — изменение концентрации метаболитов в клетках-мишенях по механизму отрицательной обратной связи подавляет синтез гормонов эндокринных желез и гипоталамуса; 7 — синтез и секреция тропных гормонов подавляется гормонами эндокринных желез; ⊕ — стимуляция синтеза и секреции гормонов; ⊖ — подавление синтеза и секреции гормонов (отрицательная обратная связь).

ют в общий кровоток и взаимодействуют с клетками-мишенями.

Поддержание уровня гормонов в организме обеспечивает **механизм отрицательной обратной связи**. Изменение концентрации метаболитов в клетках-мишенях по механизму отрицательной обратной связи подавляет синтез гормонов, действуя либо на эндокринные железы, либо на гипоталамус. Синтез и секреция тропных гормонов подавляется гормонами эндокринных периферических желёз. Такие петли обратной связи действуют в системах регуляции гормонов надпочечников, щитовидной железы, половых желёз.

Не все эндокринные железы регулируются подобным образом. Гормоны задней доли гипофиза (вазопрессин и окситоцин) синтезируются в гипоталамусе в виде предшественников и хранятся в гранулах терминальных аксонов нейрогипофиза. Секреция гормонов поджелудочной железы (инсулина и глюкагона) напрямую зависит от концентрации глюкозы в крови.

В регуляции межклеточных взаимодействий участвуют также низкомолекулярные белковые соединения — цитокины. Влияние цитокинов на различные функции клеток обусловлено их взаимодействием с мембранными рецепторами. Через образование внутриклеточных посредников сигналы передаются в ядро, где происходят активация определённых генов и индукция синтеза белков. Все цитокины объединяются следующими общими свойствами:

- синтезируются в процессе иммунного ответа организма, служат медиаторами иммунной и воспалительной реакций и обладают в основном аутокринной, в некоторых случаях паракринной и эндокринной активностью;
- действуют как факторы роста и факторы дифференцировки клеток (при этом вызывают преимущественно медленные клеточные реакции, требующие синтеза новых белков);
- обладают плейотропной (полифункциональной) активностью.

В. Классификация и номенклатура гормонов

Все гормоны классифицируют по химическому строению, биологическим функциям и механизму действия.

1. Классификация гормонов по химическому строению

По химическому строению гормоны делят на 3 группы: пептидные (или белковые), стероидные и непептидные производные аминокислот (табл. 11-1).

2. Классификация гормонов по биологическим функциям

По биологическим функциям гормоны можно разделить на несколько групп (табл. 11-2). Эта классификация условна, поскольку одни и те же гормоны могут выполнять разные функции. Например, адреналин участвует в регуляции обме-

Таблица 11-1. Классификация гормонов по химическому строению

Пептидные гормоны	Стероиды	Производные аминокислот
Адренокортикотропный гормон (кортикотропин, АКТГ)	Альдостерон	Адреналин
Гормон роста (соматотропин, ГР, СТГ)	Кортизол	Норадреналин
Тиреотропный гормон (тиреотропин, ТТГ)	Кальцитриол	Трийодтиронин (T_3)
Лактогенный гормон (пролактин, ЛТГ)	Тестостерон	Тироксин (T_4)
Лютеинизирующий гормон (лютропин, ЛГ)	Эстрадиол	
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)	Прогестерон	
Меланоцитстимулирующий гормон (МСГ)		
Хорионический гонадотропин (ХГ)		
Антидиуретический гормон (вазопрессин, АДГ)		
Окситоцин		
Паратиреоидный гормон (паратгормон, ПТГ)		
Кальцитонин		
Инсулин		
Глюкагон		

Таблица 11-2. Классификация гормонов по биологическим функциям

Регулируемые процессы	Гормоны
Обмен углеводов, липидов, аминокислот	Инсулин, глюкагон, адреналин, кортизол, тироксин, соматотропин
Водно-солевой обмен	Альдостерон, антидиуретический гормон
Обмен кальция и фосфатов	Паратгормон, кальцитонин, кальцитриол
Репродуктивная функция	Эстрадиол, тестостерон, прогестерон, гонадотропные гормоны
Синтез и секреция гормонов эндокринных желёз	Тропные гормоны гипофиза, либерины и статины гипоталамуса
Изменение метаболизма в клетках, синтезирующих гормон	Эйкозаноиды, гистамин, секретин, гастрин, соматостатин, вазоактивный интестинальный пептид (ВИП), цитокины

на жиров и углеводов и, кроме этого, регулирует частоту сердечных сокращений, АД, сокращение гладких мышц. Кортизол не только стимулирует глюконеогенез, но и вызывает задержку NaCl.

II. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ С РЕЦЕПТОРАМИ И МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ ГОРМОНАЛЬНЫХ СИГНАЛОВ В КЛЕТКИ

Биологическое действие гормонов проявляется через их взаимодействие с рецепторами клеток-мишеней. Для проявления биологической активности связывание гормона с рецептором должно приводить к образованию химического сигнала внутри клетки, который вызывает специфический биологический ответ, например изменение скорости синтеза ферментов и других белков или изменение их активности (см. раздел 5). Мишенью для гормона могут служить клетки одной или нескольких тканей. Воздействуя на клетку-мишень, гормон вызывает специфическую ответную реакцию. Например, щитовидная железа — специфическая мишень для тиреотропина, под действием которого увеличивается количество ацинарных клеток щитовидной железы, повышается скорость биосинтеза тиреоидных гормонов. Глюкагон, воздействуя на адипоциты, активирует липолиз, в печени стимулирует мобилизацию гликогена и глюконеогенез. Характерный признак клетки-мишени — способность воспринимать информацию, закодированную в химической структуре гормона.

A. Рецепторы гормонов

Начальный этап в действии гормона на клетку-мишень — взаимодействие гормона с рецептором клетки. Концентрация гормонов во внеклеточной жидкости очень низка и обычно колеблется в пределах 10^{-6}–10^{-11} ммоль/л. Клетки-мишени отличают соответствующий гормон от множества других молекул и гормонов благодаря наличию на клетке-мишени соответствующего рецептора со специфическим центром связывания с гормоном.

1. Общая характеристика рецепторов

Рецепторы пептидных гормонов и адреналина располагаются на поверхности клеточной мембраны. Рецепторы стероидных и тиреоидных гормонов находятся внутри клетки. Причём внутриклеточные рецепторы для одних гормонов, например глюкокортикоидов, локализованы в цитозоле, для других, таких как андрогены, эстрогены, тиреоидные гормоны, расположены в ядре клетки (см. раздел 5).

Рецепторы по своей химической природе являются белками и, как правило, состоят из нескольких доменов.

В структуре мембранных рецепторов можно выделить 3 функционально разных участка. Первый домен (домен узнавания) расположен в N-концевой части полипептидной цепи на внешней стороне клеточной мембраны; он содержит гликозилированные участки и обеспечивает узнавание и связывание гормона. Второй домен — трансмембранный. У рецепторов одного типа, сопряжённых с G-белками, он состоит из 7 плотно упакованных α-спираль-

ных полипептидных последовательностей. У рецепторов другого типа трансмембранный домен включает только одну α-спирализованную полипептидную цепь (например, обе β-субъединицы гетеротетрамерного рецептора инсулина $\alpha_2\beta_2$). Третий (цитоплазматический) домен создаёт химический сигнал в клетке, который сопрягает узнавание и связывание гормона с определённым внутриклеточным ответом. Цитоплазматический участок рецептора таких гормонов, как инсулин, фактор роста эпидермиса и инсулиноподобный фактор роста-1 на внутренней стороне мембраны обладает тирозинкиназной активностью, а цитоплазматические участки рецепторов гормона роста, пролактина и цитокинов сами не проявляют тирозинкиназную активность, а ассоциируются с другими цитоплазматическими протеинкиназами, которые их фосфорилируют и активируют.

Рецепторы стероидных и тиреоидных гормонов содержат 3 функциональные области. На С-концевом участке полипептидной цепи рецептора находится домен узнавания и связывания гормона. Центральная часть рецептора включает домен связывания ДНК. На N-концевом участке полипептидной цепи располагается домен, называемый вариабельной областью рецептора, отвечающий за связывание с другими белками, вместе с которыми участвует в регуляции транскрипции.

2. Регуляция количества и активности рецепторов

Концентрация рецепторов внутри клетки или на её поверхности и их сродство к данному гормону в норме регулируются различными способами, а также могут меняться при заболеваниях или при использовании гормонов или их агонистов в качестве лекарственных средств. Например, при воздействии β-адренергических агонистов на клетки в течение нескольких минут в ответ на новое добавление агониста прекращается активация аденилатциклазы, и биологический ответ исчезает. Такое снижение чувствительности рецептора к гормону (десенситизация) может происходить в результате изменения количества рецепторов по механизму понижающей регуляции. Гормон связывается с рецептором, комплекс гормон-рецептор путём эндоцитоза проникает в клетку (интернализуется), где часть рецепторов подвергается протеолитическому расщеплению под действием ферментов лизосом, а часть инактивируется, отделяясь от других мембранных компонентов. Это приводит к уменьшению количества рецепторов на плазматической мембране. Например, в случае инсулина, глюкагона, катехоламинов это происходит в течение нескольких минут или часов. При снижении концентрации гормона рецепторы возвращаются на поверхность клетки, и чувствительность к гормону восстанавливается. Активность рецептора, т.е. его сродство к гормону, может изменяться также в результате ковалентной модификации, главным образом путём фосфорилирования. Концентрация внутриклеточных рецепторов может также регулироваться по механизму индукции и репрессии.

Б. Механизмы передачи гормональных сигналов в клетки

По механизму действия гормоны можно разделить на 2 группы. К первой группе относят гормоны, взаимодействующие с мембранными рецепторами (пептидные гормоны, адреналин, а также гормоны местного действия — цитокины, эйкозаноиды). Вторая группа включает гормоны, взаимодействующие с внутриклеточными рецепторами.

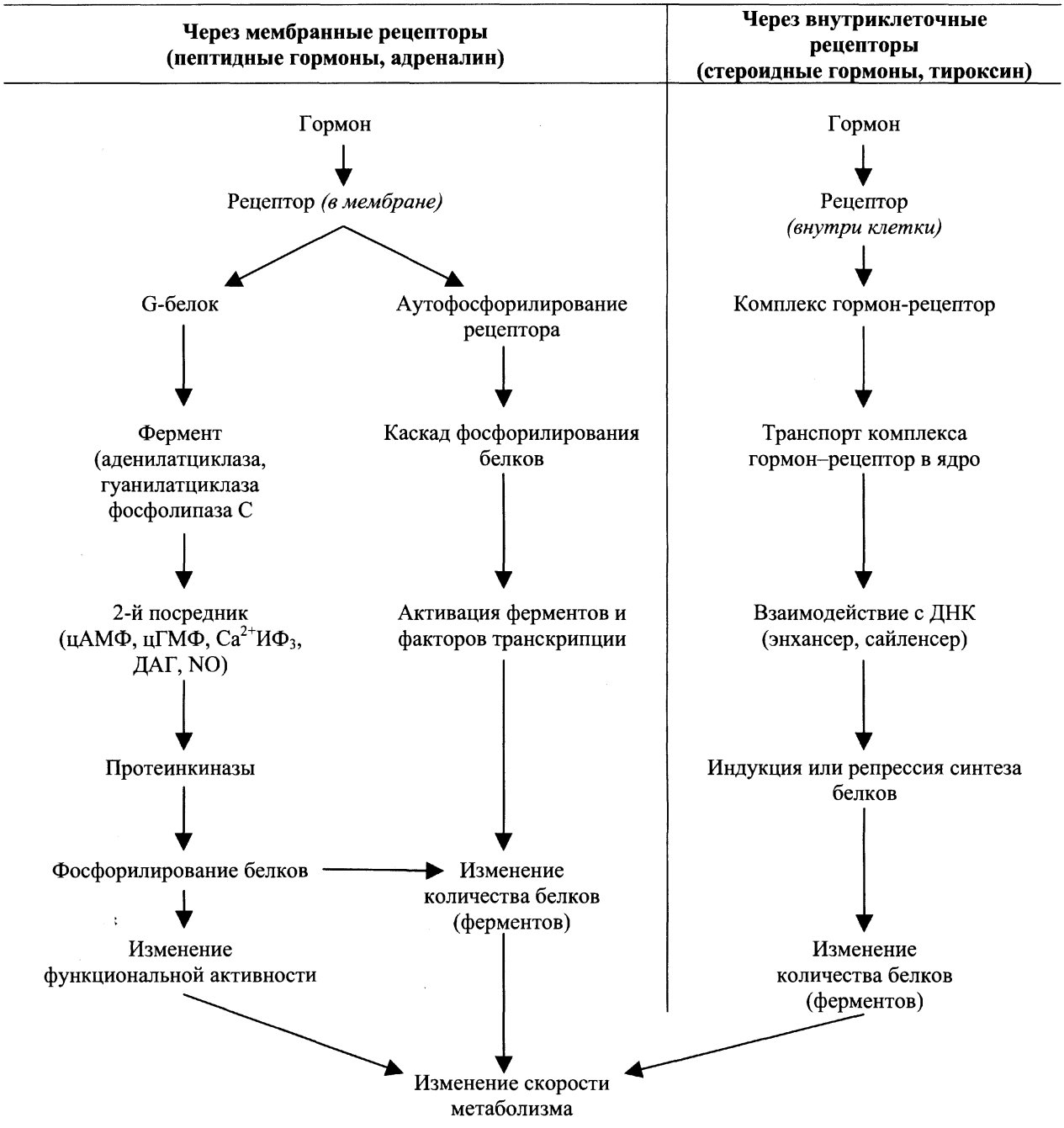
Связывание гормона (первичного посредника) с рецептором приводит к изменению конформации рецептора. Это изменение улавливается другими макромолекулами, т.е. связывание гормона с рецептором приводит к сопряжению одних молекул с другими (трансдукция сигнала). Таким образом, генерируется сигнал, который регулирует клеточный ответ путём изменения активности или количества ферментов и других белков. В зависимости от способа передачи гормонального сигнала в клетках меняется скорость реакций метаболизма:

- в результате изменения активности ферментов;
- в результате изменения количества ферментов (табл. 11-3).

1. Передача гормональных сигналов через мембранные рецепторы

Гормоны (первичные посредники), связываясь с рецепторами на поверхности клеточной мембраны, образуют комплекс гормон-рецептор, который трансформирует сигнал первичного посредника в изменение концентрации

Таблица 11-3. Основные этапы передачи гормональных сигналов



особых молекул внутри клетки — вторичных посредников. Вторичными посредниками могут быть следующие молекулы: цАМФ, цГМФ, $ИФ_3$, ДАГ, Ca^{2+}, NO.

Гормоны, взаимодействие которых с рецептором клетки-мишени приводит к образованию цАМФ, действуют через трёхкомпонентную систему, которая включает белок-рецептор, G-белок и фермент аденилатциклазу. Образующийся под действием аденилатциклазы цАМФ активирует протеинкиназу А, фосфорилирующую ферменты и другие белки (см. раздел 5). Известно более 200 различных G-белков, в структуре которых обнаружены 3 субъединицы α, β и γ (см. раздел 5). В отсутствие гормона α-субъединица G-белка связана с ГДФ. Образование комплекса гормон-рецептора приводит к конформационным изменениям α-субъединицы, замене ГДФ на ГТФ и отщеплению димера βγ от α-ГТФ. В случае рецепторов, сопряжённых с G_s-белком, субъединица α_s-ГТФ активирует аденилатциклазу (рис. 11-3).

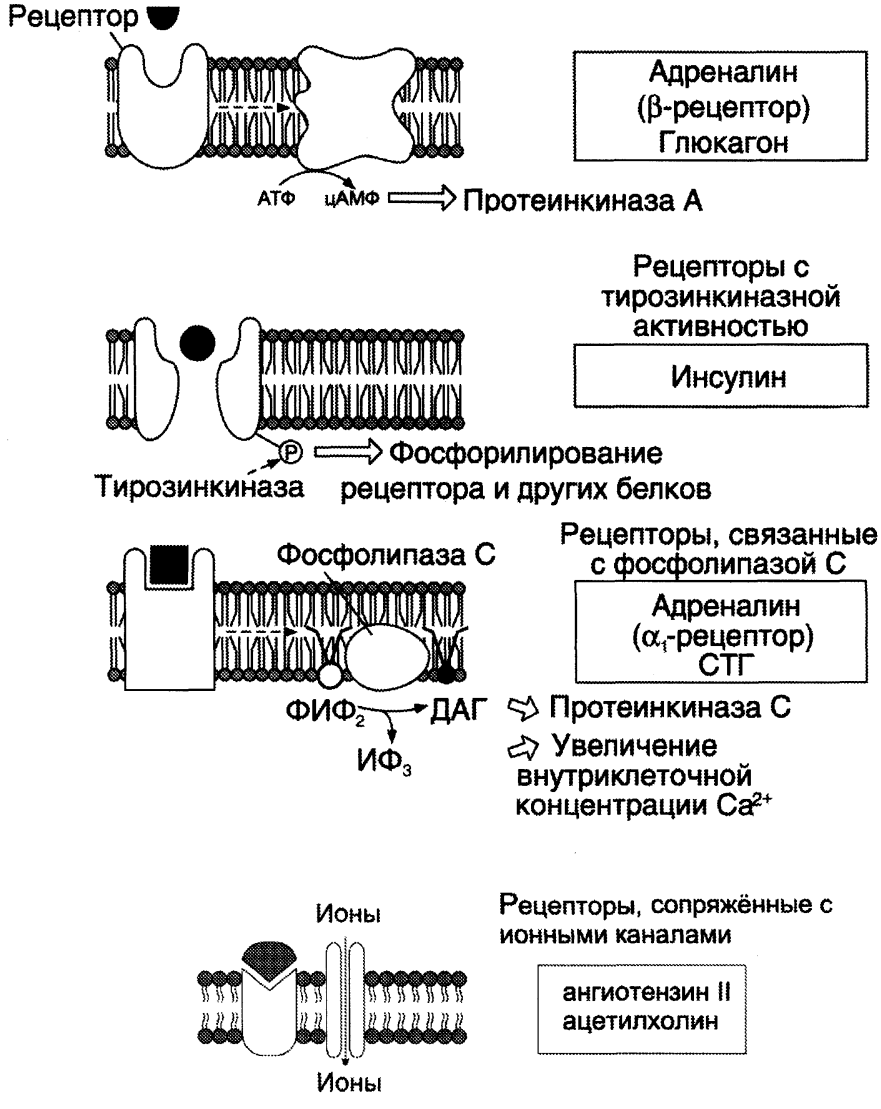


Рис. 11-3. Передача гормональных сигналов через мембранные рецепторы. $ИФ_3$ — инозитол-3-фосфат; ДАГ — диацилглицерол; $ФИФ_2$ — фосфоинозитолбисфосфат; СТГ — соматотропный гормон.

В случае рецепторов, сопряжённых с G_i-белком, субъединица α_i-ГТФ ингибирует аденилатциклазу. В таблице 11-4 приведены примеры гормонов, взаимодействие которых с соответствующим рецептором активирует или ингибирует аденилатциклазу.

Другая система, генерирующая цГМФ как вторичный посредник, сопряжена с гуанилатциклазой. Цитоплазматический домен такого типа рецепторов обладает активностью гуанилатциклазы, которая катализирует реакцию образования цГМФ из ГТФ (подобно аденилатциклазе). Молекулы цГМФ могут активировать ионные каналы либо активировать цГМФ-зависимую протеинкиназу G, участвующую в фосфорилировании других белков в клетке. Например, фосфодиэстераза, которая гидролизует цАМФ до АМФ, активируется в результате фосфорилирования цГМФ-зависимой протеинкиназой.

Некоторые гормоны (например, вазопрессин или адреналин), образуя комплекс с соответствующими рецепторами (рецептор V_1 для вазопрессина и α_1-рецептор для адреналина), через активацию соответствующих G-белков активируют фосфолипазу С, в результате чего в клетке появляются вторичные посредники $ИФ_3$, ДАГ. Молекула $ИФ_3$ стимулирует высвобождение Ca^{2+} из ЭР. Кальций связывается с белком кальмодулином. Этот комплекс активирует Ca^{2+}-кальмодулинзависимую протеинкиназу. Ионы кальция и ДАГ участвуют в активации протеинкиназы С (см. раздел 5).

Таблица 11-4. Активация и ингибирование аденилатциклазы гормонами

Активируют аденилатциклазу	Ингибируют аденилатциклазу
Кортикотропин	Ангиотензин II
Кальцитонин	Катехоламины (через α_2-рецепторы)
Катехоламины (через β_1- и β_2-рецепторы)	
Глюкагон	
Паратгормон	
Тиреотропин	
Вазопрессин (через V_2-рецепторы)*	

* V_1- и V_2-рецепторы рассмотены ниже (IV, А).

Многие гормоны передают сигнал в клетку через рецепторы, которые либо обладают тирозинкиназной активностью, либо связываются с цитоплазматическими белками, проявляющими активность тирозинкиназы. Связывание инсулина с мембранным рецептором, который является тирозинкиназой и имеет центр фосфорилирования, инициирует аутофосфорилирование и последующее фосфорилирование субстратов рецептора инсулина и других белков (см. разделы 5 и ниже подраздел III, Ж).

В случае взаимодействия, например, эпидермального фактора роста или инсулиноподобного фактора роста -1 с мембранным рецептором сначала происходят димеризация рецептора и его активация. Активированный таким образом гомодимер рецептора, участок которого на внутренней стороне мембраны обладает активностью тирозинкиназы, фосфорилируется сам (аутофосфорилирование) и вызывает фосфорилирование других белков и ферментов, которые участвуют в активации факторов транскрипции генов.

Некоторые гормоны (например, гормон роста, пролактин, интерферон, цитокины) взаимодействуют с мембранными рецепторами, ассоциированными с цитоплазматическими протеинкиназами (так называемыми «Янус-киназами», или киназами семейства JAK). Присоединение гормона вызывает димеризацию рецептора, присоединение Янус-киназ, их аутофосфорилирование и активацию. Янус-киназы, в свою очередь, фосфорилируют рецептор по остаткам тирозина, в результате чего рецептор связывается с другими белками, например, особыми белками — переносчиками сигнала и активаторами транскрипции (ПСАТ, или STAT — от англ. *signal transducer and activator of transcription* — переносчик сигнала и активатор транскрипции). Далее следует инициируемый тирозинкиназой каскад реакций фосфорилирования. Белки STAT фосфорилируются, образуют димеры, транспортируются в ядро, где, связываясь со специфическими участками ДНК, участвуют в регуляции транскрипции (рис. 11-4).

Сигнальной молекулой в клетке может служить также оксид азота NO, образующийся в организме из аргинина при участии фермента NO-синтазы, присутствующего в нервной ткани, эндотелии сосудов, тромбоцитах и других тканях (см. раздел 9). Молекула NO может быстро диффундировать через мембрану эндоте-

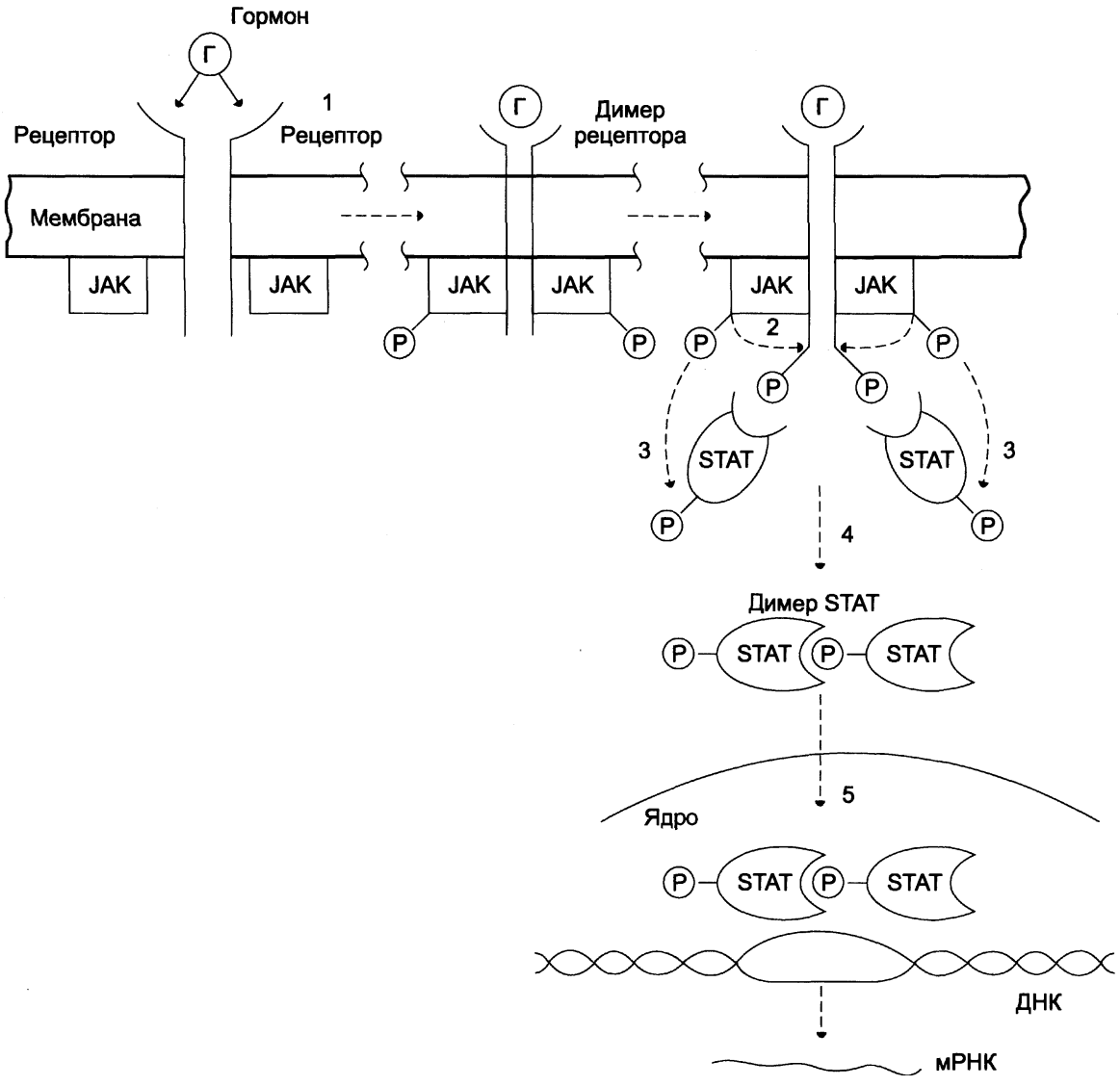


Рис. 11-4. Механизм передачи сигнала через мембранные рецепторы, ассоциированные с Янус-киназами (JAK). 1 — гормон взаимодействует с мембранным рецептором и вызывает димеризацию рецептора. Янус-киназы (цитоплазматические тирозинкиназы, имеющие два активных центра) связываются с димером мембранного рецептора, что приводит к их активации и аутофосфорилированию; 2 — янус-киназы (JAK) фосфорилируют димер рецептора по остаткам тирозина; 3 — комплекс фосфорилированного димера рецептора с Янус-киназами связывает особые цитоплазматические белки (STAT), которые фосфорилируются Янус-киназами; 4 — фосфорилированные белки STAT активируются, образуя димер; 5 — димер STAT перемещается из цитозоля в ядро, связывается с промоторным участком ДНК и индуцирует транскрипцию генов.

лиальных клеток, где она синтезируется, в соседние клетки. Действие оксида азота кратковременно, так как $T_{1/2}$ NO колеблется в пределах 5–10 с. В крови молекула существует примерно 100 мс, поскольку быстро взаимодействует с молекулярным кислородом, образуя нитрит, который далее превращается в нитрат и экскретируется с мочой. В клетках-мишенях, например, эндотелиальных клетках NO взаимодействует с входящим в активный центр гуанилатциклазы ионом железа (см. раздел 5), способствуя тем самым быстрому образованию цГМФ. Увеличение концентрации цГМФ в клетках гладких мышц вызывает активацию

киназ, что в конечном итоге приводит к расслаблению ГМК сосудов и последующему их расширению. Механизм действия оксида азота объясняет использование нитроглицерина в качестве лекарственного препарата для снятия острых болей в сердце, поскольку нитроглицерин — источник образующихся молекул NO, которые и вызывают расслабление кровеносных сосудов и увеличение притока крови в миокард.

2. Передача сигналов через внутриклеточные рецепторы

Стероидные и тиреоидные гормоны связываются с рецепторами внутри клетки и регулируют скорость транскрипции специфических генов (рис. 11-5).

В отсутствие гормона внутриклеточные рецепторы связаны обычно с другими белками в цитозоле или ядре. Например, рецепторы глюкокортикоидов образуют в цитозоле комплекс с шапероном, что препятствует связыванию рецептора с молекулой ДНК (рис. 11-6).

Взаимодействие гормона с центром связывания на С-концевом участке полипептидной цепи рецептора вызывает конформационные изменения и освобождение рецептора от шаперона. Происходит объединение 2 молекул рецептора с образованием гомодимера. Димер рецептора узнаёт специфическую последовательность нуклеотидов, которая расположена в промоторной области гена. Взаимодействие со специфическим участком ДНК HRE (от англ. *hormone response element*, элемент, реагирующий на воздействие гормона) обеспечивает центральный домен рецептора. Этот домен содержит аминокислотную последовательность, образующую 2 «цинковых пальца». В каждом «цинковом пальце» атом цинка связан с 4 остатками цистеина (рис. 11-7).

В структуре одного «цинкового пальца» имеется последовательность аминокислот, отвечающая за связывание с ДНК, а второй «цинковый

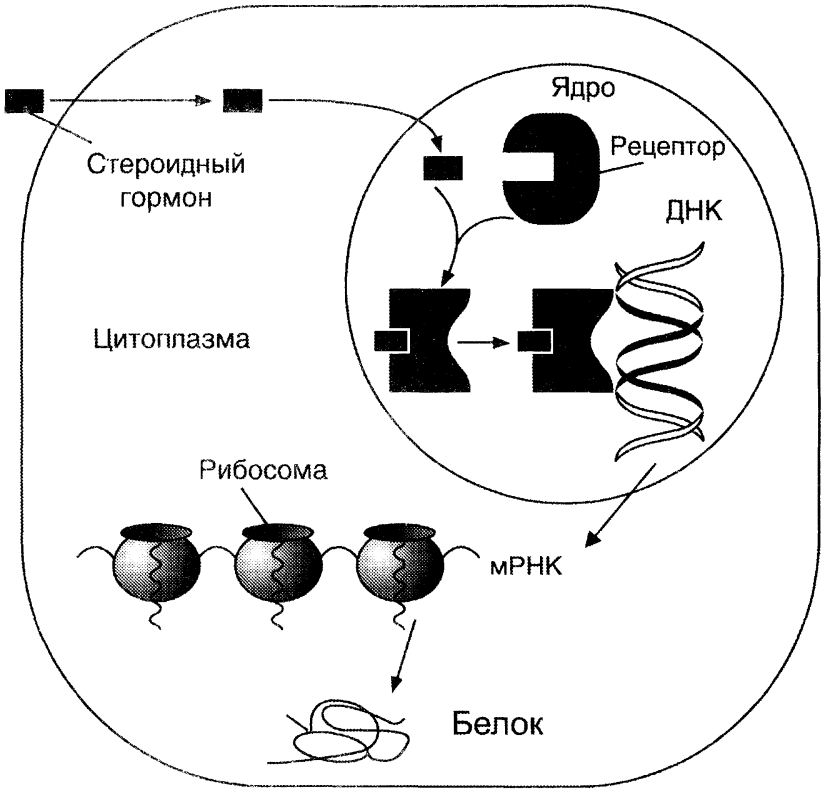


Рис. 11-5. Передача гормональных сигналов через внутриклеточные рецепторы (рецепторы стероидных гормонов могут находиться в цитоплазме и ядре).

палец» содержит последовательность аминокислот, участвующую в димеризации рецепторов. Взаимодействие комплекса гормон-рецептор с определённой последовательностью нуклеотидов в промоторной части ДНК приводит к активации транскрипции.

Рецепторы тиреоидных гормонов всегда связаны с ДНК. В отсутствие гормонов соответствующие рецепторы ингибируют экспрессию генов. Напротив, взаимодействие с гормоном превращает их в активаторы транскрипции.

3. Передача сигналов через рецепторы, сопряжённые с ионными каналами

Рецепторы, сопряжённые с ионными каналами, являются интегральными мембранными белками, состоящими из нескольких субъединиц. Они действуют одновременно как ионные каналы и как рецепторы, которые способны специфически связывать с внешней стороны эффектор, изменяющий их ионную проводимость. Эффекторами такого типа могут быть гормоны и нейромедиаторы (см. рис. 11-3).

Известны рецепторы для ряда гормонов, ассоциированных с ионными каналами, и большинства медиаторов, среди которых наиболее изучен рецептор ацетилхолина. Рецептор ацетилхолина состоит из пяти цилиндрообразных субъединиц, расположенных в мембране параллельно друг другу: α_2, β, γ, δ. Между ними вдоль оси цилиндров находится заполненный молекулами воды канал. Каждая субъединица рецептора состоит из большого количества гидрофоб-

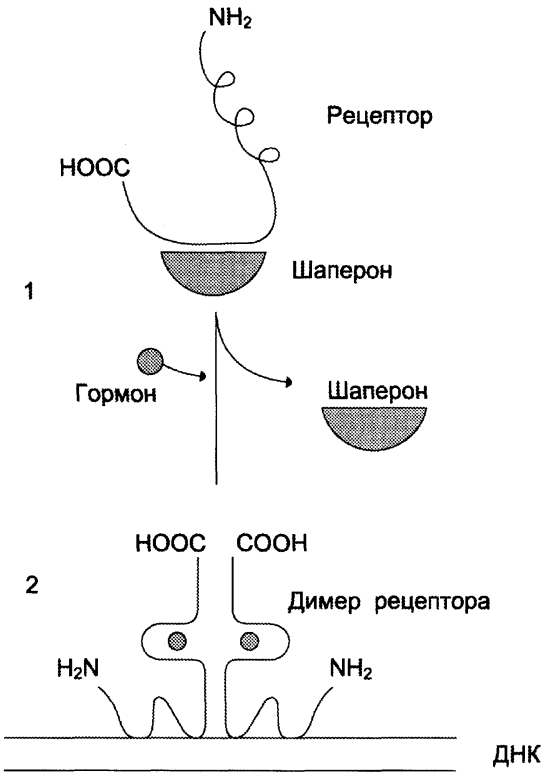


Рис. 11-6. Регуляция активности рецептора стероидных гормонов. 1 — в отсутствие гормона рецептор через гормонсвязывающий домен образует комплекс с шапероном, что препятствует связыванию рецептора с молекулой ДНК; 2 — в присутствии гормона рецептор освобождается от шаперона, образуется димер рецептора, который присоединяется к молекуле ДНК и вызывает активацию транскрипции.

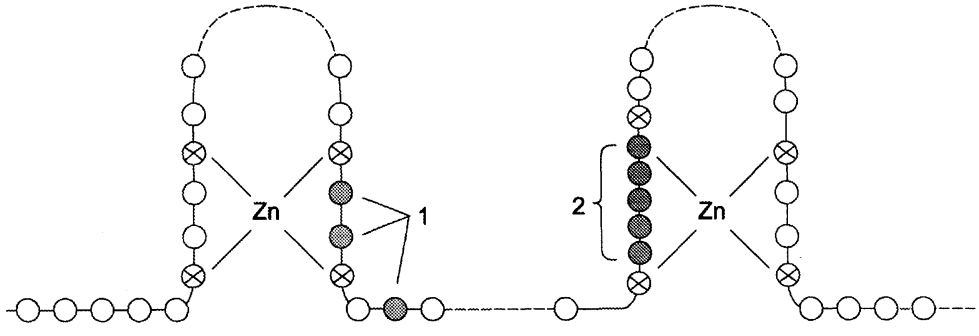


Рис. 11-7. Структура центрального домена стероидного гормона. 1 — аминокислотные остатки, участвующие в связывании ДНК; 2 — область димеризации. Центральный ДНК-связывающий домен содержит 2 «цинковых пальца». Атомы цинка связаны с аминокислотной последовательностью через остатки цистеина. Функциональные области 1 и 2 отвечают соответственно за связывание ДНК и димеризацию рецептора.

ных аминокислотных остатков. Кроме этого, все субъединицы содержат один спирализованный трансмембранный фрагмент, аминокислотные радикалы которого (полярные незаряженные аминокислотные остатки, в основном серин и треонин) выстилают центральный канал рецептора изнутри. В средней части субъединиц, обращённой к каналу, локализованы остатки лейцина. В присутствии ацетилхолина боковые взаимодействия между субъединицами поддерживают канал в открытом состоянии и создают возможность для транспорта ионов. В отсутствие ацетилхолина в результате изменения ориентации субъединиц относительно друг друга канал закрывается, так как выступающие внутрь канала остатки лейцина образуют плотное гидрофобное кольцо, блокируя движение гидратированных ионов в этой области (рис. 11-8).

III. СТРОЕНИЕ, БИОСИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ

Гормоны образуются специализированными клетками, многие из них собраны в железы и секретируют гормоны непосредственно в кровоток (гипоталамус, гипофиз, островковые клетки поджелудочной железы, щитовидная и паращитовидные железы, надпочечники, половые железы). Многие эндокринные железы вырабатывают несколько гормонов, имеющих различное строение и осуществляющих различные функции.

Избыточная продукция или дефицит гормона могут быть причиной эндокринных заболеваний. Среди причин гиперсекреции гормонов первое место занимают гормонально-активные опухоли. Причинами гипосекреции часто являются генетические нарушения структуры и функции участвующих в синтезе гормонов ферментов, повреждение клеток, продуцирующих гормон, в результате инфекции, опухоли или аутоиммунных реакций. Клиническую картину гипер- и гипосекреции гормонов может вызывать и применение гормонов с лечебной целью. В некоторых случаях введение гормона приводит к подавлению его секреции железами, поэтому резкая отмена гормонотерапии вызывает гипофункцию эндокринных желёз.

Причинами эндокринных заболеваний могут также быть дефекты структуры самих гормонов

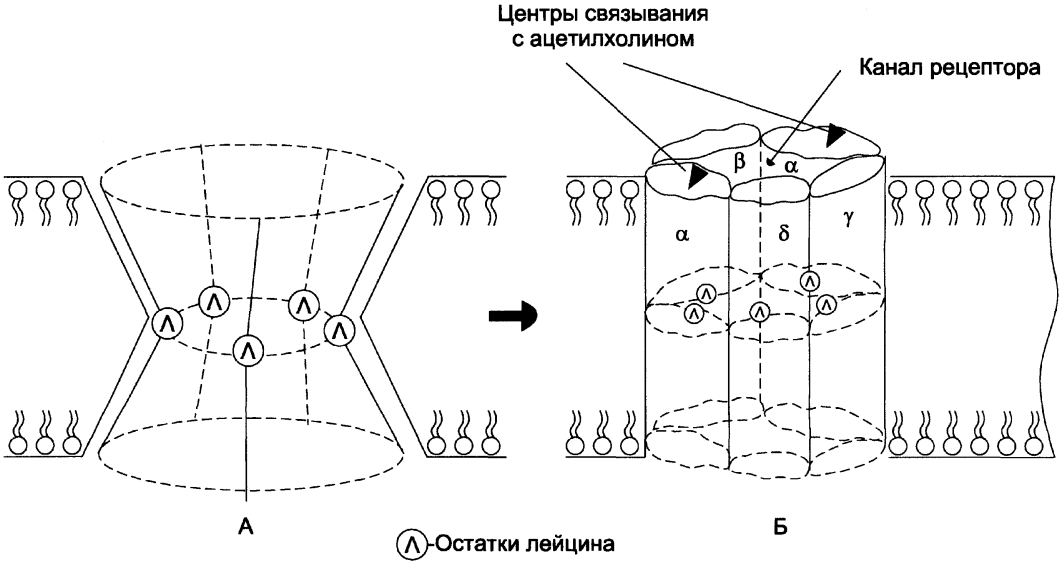


Рис. 11-8. Схема строения рецептора ацетилхолина. А — закрытый канал рецептора в отсутствие ацетилхолина; Б — открытый канал рецептора в присутствии ацетилхолина. Трансмембранные спирализованные участки всех 5 субъединиц содержат полярные незаряженные радикалы аминокислот; гидрофобные остатки лейцина (Л), локализованные в середине каждого спирализованного гидрофильного участка, выступают в центральную часть канала и препятствуют движению ионов.

или их рецепторов, нарушения метаболизма гормонов и механизмов передачи гормональных сигналов в клетки-мишени.

А. Гормоны гипоталамуса

Гипоталамус занимает важнейшее место в иерархической системе, объединяя высшие отделы ЦНС и эндокринные железы. В клетках нейронов гипоталамуса синтезируются пептидные гормоны 2 типов. Одни через систему гипоталамо-гипофизарных сосудов поступают в переднюю долю гипофиза, где стимулируют или ингибируют синтез тропных гормонов; другие, как окситоцин и вазопрессин, поступают через аксоны нервных клеток в заднюю долю гипофиза, где они хранятся в везикулах и секретируются в кровь в ответ на соответствующие сигналы.

В настоящее время известно несколько гипоталамических гормонов, регулирующих синтез и секрецию гормонов гипофиза (табл. 11-5).

1. Тиреолиберин — трипептид, состоящий из пироглутаминовой кислоты, гистидина и пролинамида (рис. 11-9).

Синтез тиреолиберина происходит в различных участках гипоталамуса, но в большей степени в паравентрикулярном ядре, а также в других областях ЦНС, где он выполняет функцию нейромедиатора, повышающего двигательную активность и АД. Предшественник тиреолиберина препротиреолиберин человека включает 242 аминокислотных остатка. Образование активного гормона происходит по механизму частичного протеолиза. В передней доле гипофиза тиреолиберин стимулирует синтез и секрецию тиреотропина, а также оказывает стимулирующее влияние на синтез многих других гормонов. В результате взаимодействия тиреолиберина с рецепторами плазматической мембраны клеток гипофиза происходит повышение концентрации внутриклеточного цАМФ и Ca^{2+}. Трансдукция сигнала происходит как через аденилатциклазную, так и через инозитолфосфатную системы.

Тиреолиберин разрушается в клетках-мишенях и в крови под действием специфических протеаз. $T_{1/2}$ в крови составляет 3–4 мин.

2. Кортиколиберин

Кортиколиберин — полипептид, содержащий 41 аминокислотный остаток. Как и другие пептидные гормоны, кортиколиберин синтезиру-

Таблица 11-5. Строение и функции гормонов гипоталамуса

Гипоталамический гормон	Структура	Функция
Тиреотропин-рилизинг-гормон (тиреолиберин, ТРФ)	Пептид, 3 а.к.[1]	Стимулирует секрецию тиреотропина и пролактина
Кортикотропин-рилизинг-гормон (кортиколиберин, КРФ)	Полипептид, 41 а.к.	Стимулирует секрецию кортикотропина
Гонадотропин-рилизинг-гормон (гонадолиберин, ГРФ)	Полипептид, 10 а.к.	Стимулирует секрецию ЛГ и ФСГ
Соматотропин-рилизинг-гормон (соматолиберин, СРФ)	Полипептид, 40 или 44 а.к.	Стимулирует секрецию соматотропина
Соматостатин (соматотропин-ингибирующий гормон)	Полипептид, 14 или 28 а.к.	Ингибирует секрецию соматотропина
Пролактолиберин[2]		Стимулирует секрецию пролактина
Пролактостатин (дофамин)[3]	Полипептид, 56 а.к.	Ингибирует секрецию пролактина

[1] а.к. — аминокислотный остаток.

[2] Структура пролактолиберина в настоящее время неизвестна; подобными эффектами обладают также тиреолиберин, серотонин, окситоцин, ацетилхолин.

[3] Другим гипоталамическим фактором, подавляющим синтез пролактина, является дофамин, который тормозит транскрипцию гена пролактина. Один из нейропептидов гипоталамуса, состоящий из 56 аминокислотных остатков, обладает как активностью гонадолиберина, так и пролактостатина. Его называют гонадолиберинассоциированным пептидом (ГАП, GAP).

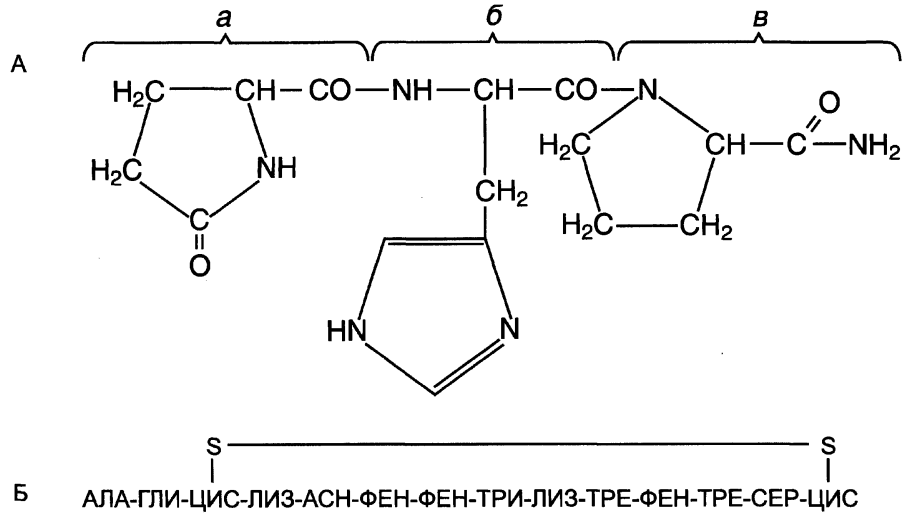


Рис. 11-9. Структура некоторых гормонов гипоталамуса. А. Структура тиреолиберина: а — пироглутаминовая кислота; б — гистидин; в — пролинамид. Б. Структура соматостатина.

ется в виде прогормона. $T_{1/2}$ кортиколиберина в плазме крови составляет 60 мин. Основное количество кортиколиберина образуется в гипоталамусе, однако он обнаруживается и в других отделах ЦНС, где выполняет роль медиатора, участвуя в ответной реакции на различные стрессовые ситуации.

В передней доле гипофиза кортиколиберин увеличивает синтез и секрецию проопиомеланокортина и образование кортикотропина. Рецепторы кортиколиберина находятся в плазматической мембране клеток в составе аденилатциклазного комплекса. Стимуляция секреции АКТГ требует присутствия ионов Ca^{2+}. Увеличение уровня внутриклеточного кальция, вероятно, является результатом фосфорилирования белков кальциевых каналов.

3. Гонадолиберин

Гонадолиберин — декапептид. Предшественник гонадолиберина человека состоит из 92 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу около 10 кД. Гонадолиберин стимулирует синтез и секрецию 2 гормонов гипофиза — ЛГ и ФСГ. Помимо гипоталамуса, нейроны, содержащие гонадолиберин, находятся и в других областях ЦНС, контролирующих эмоциональное и половое поведение. Рецептор гонадолиберина в плазматической мембране входит в состав инозитолфосфатного комплекса, активация которого стимулирует фосфорилирование белков и мобилизацию Ca^{2+}, что приводит к освобождению гормонов. $T_{1/2}$ гонадолиберина в плазме крови составляет 5—7 мин. Инактивация гонадолиберина происходит при участии специфических протеаз.

4. Соматолиберин

Соматолиберин — полипептид, состоящий из 44 аминокислотных остатков. В передней доле гипофиза соматолиберин стимулирует синтез и секрецию соматотропина. Трансдукция сигнала сопровождается повышением концентрации как цАМФ, так и ионов кальция. $T_{1/2}$ соматолиберина в крови составляет около 7 мин. Соматолиберин применяют в клинической практике для диагностики нарушений функции гипофиза.

5. Соматостатин

Соматостатин первично был выделен из гипоталамуса, но впоследствии оказалось, что он синтезируется во многих клетках, расположенных вне гипоталамуса: в желудке, кишечнике, поджелудочной железе, в области периферических нервных окончаний, в плаценте, надпочечниках и в сетчатке глаза. Соматостатин выполняет функции гормона и медиатора, вызывая торможение секреторных процессов, снижение активности гладкой мускулатуры и нейронов. Соматостатин состоит из 14 аминокислотных

остатков и имеет циклическую структуру, образованную дисульфидной связью между двумя остатками цистеина (рис. 11-10).

Биологической активностью обладает и ациклическая восстановленная форма пептида. В тканях соматостатин присутствует в форме пептида, содержащего 28 аминокислотных остатков и может служить предшественником пептида, состоящего из 14 аминокислотных остатков. Обе формы проявляют биологическую активность, но в разной степени. Соматостатин-14 находится в основном в ЦНС, а соматостатин-28 преимущественно в кишечнике.

Подобно другим пептидным гормонам, соматостатин взаимодействует с рецепторами плазматической мембраны клеток. Различают 5 типов рецепторов соматостатина, ассоциированных с G-белками. Все типы рецепторов экспрессируются в передней доле гипофиза и гипоталамусе и обладают различной степенью сродства к разным структурным формам соматостатина. Рецепторы к соматостатину присутствуют во многих опухолевых клетках, секретирующих гормоны. Это обстоятельство используется для разработки методов ранней диагностики опухолей поджелудочной железы, феохромоцитомы, рака щитовидной железы, рака почек и молочной железы.

Результат трансдукции сигнала соматостатина — снижение уровня внутриклеточной концентрации цАМФ и Ca^{2+} в цитозоле клеток. Соматостатин тормозит секрецию гормона роста, глюкагона, инсулина, гастрина, секретина, вазоактивного интестинального пептида (ВИП, VIP), холецистокинина, кальцитонина, паратгормона, иммуноглобулинов, ренина; он также ингибирует секрецию бикарбонатов и ферментов поджелудочной железы, уменьшает кровоток на всём протяжении ЖКТ, снижает секрецию жёлчи.

Б. Гормоны гипофиза

Гипофиз секретирует большое количество гормонов, участвующих в регуляции различных биохимических процессов и физиологических функций. В передней доле гипофиза (аденогипофизе) синтезируются так называемые тропные гормоны, стимулирующие синтез и секрецию гормонов других эндокринных желёз или оказывающие влияние на метаболические реакции в других тканях-мишенях (табл. 11-6).

Задняя доля гипофиза, или нейрогипофиз, секретирует гормоны, регулирующие в основном водный баланс и лактацию.

Секреция гормонов гипофиза обусловлена сочетанием нервных и гуморальных сигналов. При этом один и тот же агонист (например, норадреналин) может вызывать противоположные изменения в секреции гипофизарных гормонов. С другой стороны, секреция каждого гормона может контролироваться многочисленными факторами.

Синтез и секреция гормонов передней доли гипофиза регулируются гормонами гипоталамуса, которые поступают в гипофиз через портальную систему кровеносных сосудов, связывающих гипоталамус и переднюю долю гипофиза. Кроме того, секреция гормонов гипоталамуса и гипофиза регулируется по механизму обратной связи гормонами, продукцию которых они стимулируют в органах-мишенях.

В передней доле гипофиза синтезируются гормоны, которые по химическому строению являются пептидами и гликопротеинами.

По механизму их синтеза и биологическим функциям эти гормоны объединяют в 3 группы.

1. Гормон роста, пролактин

Гормон роста синтезируется в соматотрофных клетках, наиболее многочисленных в передней доле гипофиза. Содержание гормона роста составляет 5–16 мг в 1 г ткани железы, в то время как количество других гормонов гипофиза исчисляется в мкг/г. $T_{1/2}$ гормона в плазме крови составляет около 50 мин.

Гормон роста у всех видов млекопитающих представляет собой одноцепочечный пептид с молекулярной массой 22 кД, состоящий из 191 аминокислотного остатка и имеющий 2 внутримолекулярные дисульфидные связи (рис. 11-10).

Гормон роста образуется из прогормона с молекулярной массой 28 кД, не обладающего гормональной активностью. Уровень гормона роста в плазме крови не превышает 3 нг/мл. Секреция гормона роста носит пульсирующий характер с интервалами в 20–30 мин. Один из самых больших пиков отмечается вскоре после засыпания.

Под влиянием различных стимулов (стресс, физические упражнения, гипогликемия, голодание, белковая пища, аминокислота аргинин)

Таблица 11-6. Строение и биологические функции гормонов передней доли гипофиза

Гормон	Строение	Биологическая функция
Гормон роста (ГР), соматотропный гормон (СТГ)	Полипептид, 191 а.к	Стимулирует постнатальный рост скелета и мягких тканей. Участвует в регуляции энергетического и минерального обмена.
Тиреотропин, Тиреотропный гормон (ТТГ)	Димер (αβ) α-полипептид, 96 а.к. β-Полипептид, 112 а.к.	Стимулирует синтез йодтиронинов
Пролактин (ПРЛ)	Полипептид, 197 а.к.	Стимулирует лактацию
Лютеинизирующий гормон (ЛГ)	α-Полипептид, 96 а.к. β-Полипептид, 121 а.к.	У женщин индуцирует овуляцию У мужчин индуцирует синтез андрогенов в клетках Лейдига
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)	α-Полипептид, 96 а.к. β-Полипептид, 120 а.к.	У женщин стимулирует рост фолликулов У мужчин стимулирует сперматогенез
Кортикотропин, адренокортикотропный гормон (АКТГ)	Полипептид, 39 а.к.	Стимулирует рост надпочечников и синтез кортикостероидов
β-Липотропин (β-ЛТГ)	Полипептид, 93 а.к.	Стимулирует липолиз

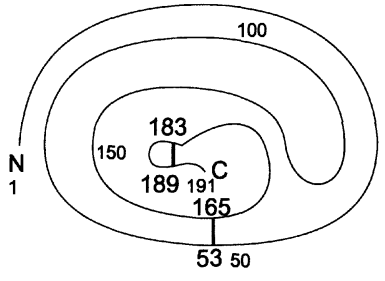


Рис. 11-10. Гормон роста человека. Полипептидная цепь включает 191 аминокислотный остаток. Две дисульфидные связи образованы между остатками цистеина в положениях 183–189 и 53–165.

даже у нерастущих взрослых людей уровень гормона роста в крови может возрастать до 30–100 нг/мл.

Регуляция синтеза и секреции гормона роста осуществляется множеством факторов. Основной стимулирующий эффект оказывает соматолиберин, основной тормозящий — гипоталамический соматостатин.

Рецепторы гормона роста находятся в плазматической мембране клеток печени, жировой ткани, яичках, жёлтом теле, скелетных мышцах, хрящевой ткани, мозге, лёгких, поджелудочной железе, кишечнике, сердце, почках, лимфоцитах. Рецептор гормона роста — белок с одним внутримембранным доменом и молекулярной массой 70 кД. Связывание рецептора с гормоном роста вызывает димеризацию 2 рецепторов, что приводит к активации связанных с рецептором Янус-киназ и фосфорилированию Янус-киназ и рецептора по остаткам тирозина. Активация рецептора гормона роста сопровождается повышением активности тирозинкиназ и фосфолипазы С с последующим повышением уровня ДАГ и $ИФ_3$ и активацией протеинкиназы С (см. раздел 5).

Первичные эффекты гормона роста кратковременны и инсулиноподобны. Они проявляют-

ся в основном в отношении обмена жиров и углеводов. В жировой ткани усиливается потребление глюкозы и липогенез, вследствие чего происходит снижение концентрации глюкозы в крови. Однако в дальнейшем проявляются более медленные (в основном, противоположные инсулину) эффекты: усиливается липолиз в жировой ткани, увеличивается концентрация жирных кислот в крови, а в случае недостаточности инсулина увеличивается содержание кетоновых тел в крови. Энергия, образующаяся при повышенном распаде жиров, используется на анаболические процессы. В то же время использование глюкозы жировыми и мышечными клетками снижается, а в печени ускоряется глюконеогенез, следствием чего может быть гипергликемия, особенно при недостатке инсулина (рис. 11-11).

Основное действие гормона роста направлено на регуляцию обмена белков и процессов, связанных с ростом и развитием организма. Под влиянием гормона роста усиливаются транспорт аминокислот в клетки мышц, синтез белка в костях, хрящах, мышцах, печени и других внутренних органах, увеличивается общее количество РНК, ДНК и общее число клеток.

Влияние гормона роста на рост скелета и мягких тканей требует участия веществ, которые синтезируются в ответ на взаимодействие гормона роста с рецепторами плазматической мембраны клеток различных тканей, в основном печени, и носят название соматомединов. Поскольку эти молекулы отличаются высокой гомологичностью друг к другу, а также к проинсулину и обладают инсулиноподобной активностью и мощным ростстимулирующим действием, они называются инсулиноподобными факторами роста (ИФР-1, или соматомедин С; ИФР-2, или соматомедин А). ИФР-1 — одноцепочечный полипептид основного характера, содержащий 70 аминокислотных остатков, а полипептид ИФР-2 носит кислотный характер и состоит из 67 аминокислотных остатков. В крови примерно 95% соматомединов циркулирует в комплексе с белками. Синтез ИФР-1 в большей степени зависит от концентрации гормона роста в крови, чем синтез ИФР-2. В то же время ИФР-1, образующийся в печени, ингибирует синтез и секрецию гормона роста по механизму ретроингибирования, действуя на уровне гипофиза и гипоталамуса (рис. 11-12).

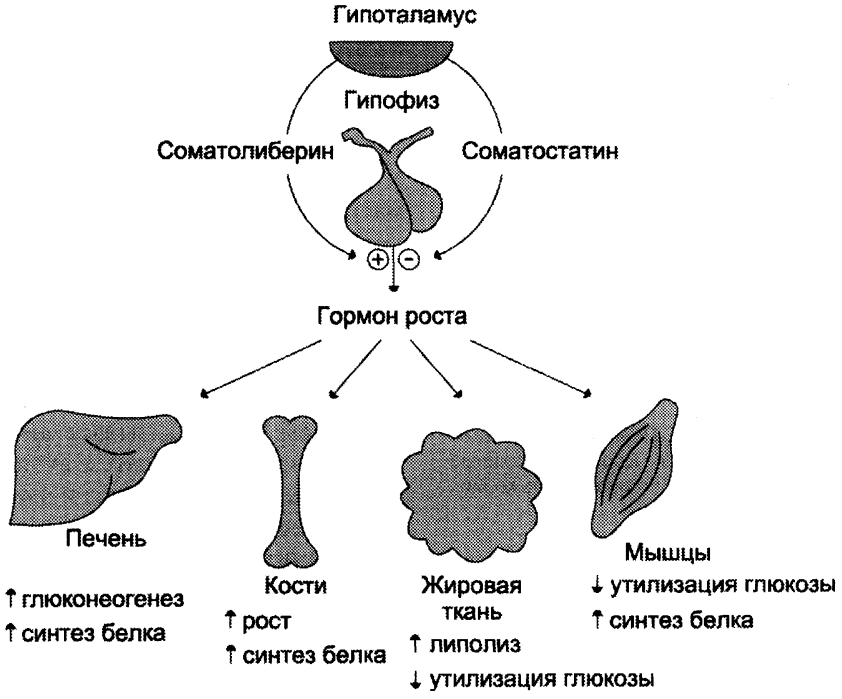


Рис. 11-11. Биологическое действие гормона роста.

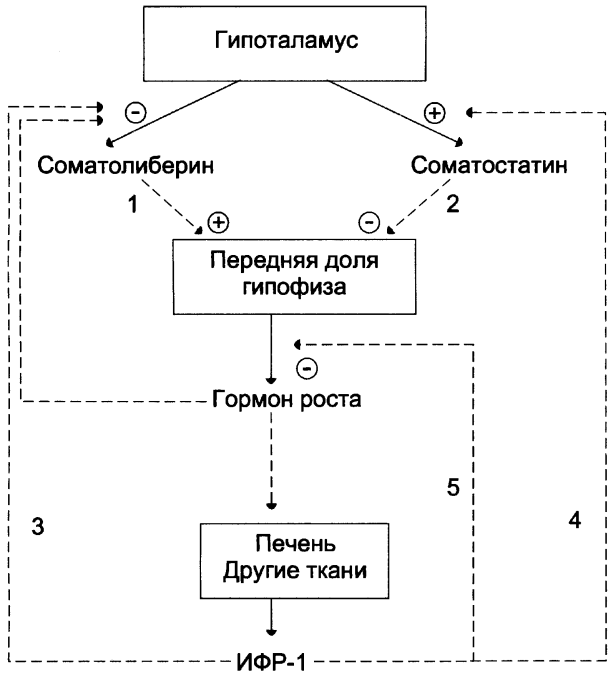


Рис. 11-12. Регуляция секреции гормона роста. Соматолиберин стимулирует (1), а соматостатин ингибирует (2) освобождение гормона роста (ГР) из передней доли гипофиза. ИФР-1 ингибирует секрецию соматолиберина (3) и стимулирует секрецию соматостатина (4). ИФР-1 ингибирует секрецию гормона роста также на уровне гипофиза (5).

Инсулиноподобные факторы роста оказывают своё действие различными путями: эндокринным, паракринным и аутокринным (рис. 11-13).

Подобно рецептору инсулина, рецептор ИФР-1 обладает тирозинкиназной активностью и инициирует каскад реакций фосфорилирования других белков, участвующих в различных внутриклеточных процессах, включая активацию транскрипции генов. В большинстве случаев ИФР-1, как и инсулин, инициирует клеточное развитие, однако при значительно меньших, почти физиологических концентрациях. Это указывает на то, что инсулиноподобные факторы роста более активны в отношении их действия на рост и развитие клеток.

Под влиянием гормона роста увеличивается ширина и толщина костей, и одновременно с этим ускоряется рост других тканей, включая соединительную ткань, мышцы и внутренние органы.

Пролактин синтезируется лактотрофными клетками передней доли гипофиза в виде прогормона с молекулярной массой 40 кД. Число этих клеток резко возрастает при беременности под влиянием эстрогенов. Пролактин близок по химическому строению гормону роста. Он состоит из 199 аминокислотных остатков, образующих одну полипептидную цепь с тремя дисульфидными связями. 35% аминокислотной последовательности пролактина идентично последовательностям гормона роста. Оба гормона имеют общие антигенные детерминанты, сходное строение рецепторов и пути трансдукции сигналов в клетки.

Рецепторы пролактина присутствуют в клетках многих тканей: в печени, почках, надпочечниках, яичках, яичниках, матке и других тканях.

Основная физиологическая функция пролактина — стимуляция лактации. Пролактин индуцирует синтез α-лактальбумина и казеина, активирует синтез фосфолипидов и ТАГ.

На процессы роста пролактин влияет в значительно меньшей степени, чем гормон роста.

У мужчин пролактин повышает чувствительность клеток Лейдига к лютеинизирующему гормону, поддерживая таким образом необходимый уровень синтеза тестостерона; в почках пролактин снижает экскрецию воды, влияет на реабсорбцию ионов Na^+ и K^+; пролактин также повышает гуморальный и клеточный иммунитет.

Синтез и секрецию пролактина стимулируют тиреолиберин, серотонин, окситоцин, ацетилхолин, ингибирующий эффект оказывает дофамин.

Подобно большинству гормонов, пролактин секретируется в кровь эпизодически с интервалами 30—90 мин. Максимум секреции отмечается через 6—8 ч после начала сна. Концентрация пролактина в плазме крови женщин составляет 8—10 нг/мл, а мужчин — 5—8 нг/мл. $T_{1/2}$ пролактина составляет 15—20 мин.

Плацента продуцирует гормон (плацентарный лактоген) , гомологичный по аминокислотному составу гормону роста и пролактину. Все 3 гормона имеют общие антигенные детерминанты и обладают рост-стимулирующей и лактогенной активностью. Существует гипотеза, согласно которой гены этих гормонов возникли в результате дупликации одного гена-предшественника.

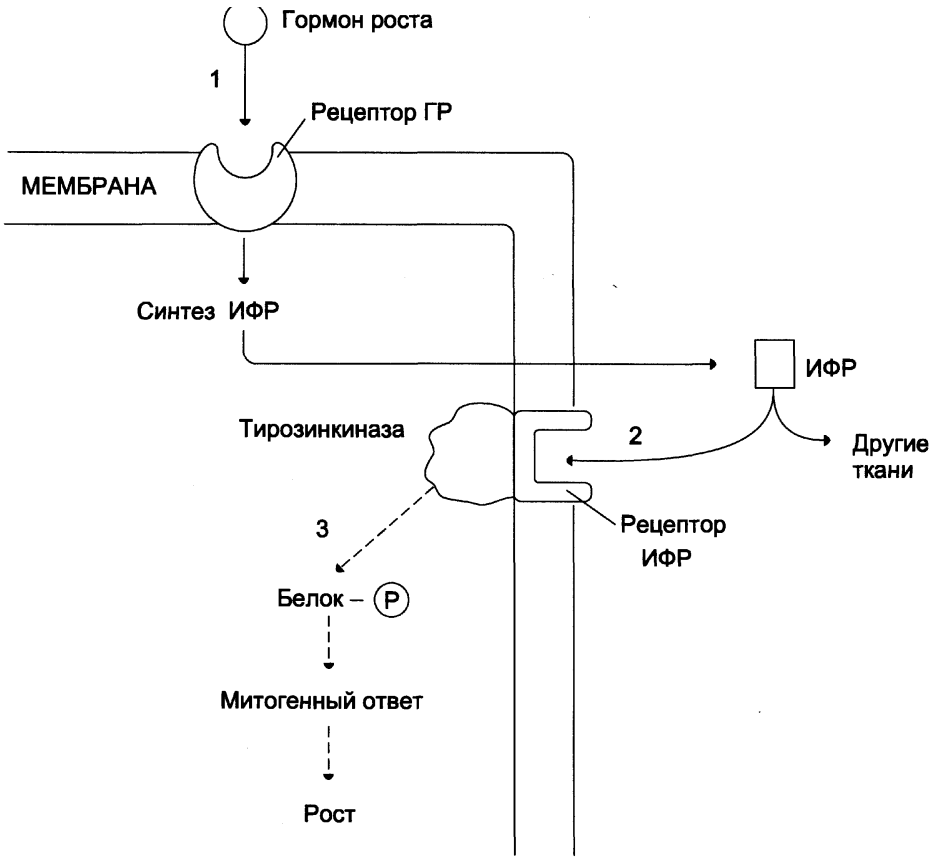


Рис. 11-13. Действие гормона роста через ИФР. Гормон роста взаимодействует с рецептором *плазматической* мембраны клеток, стимулируя синтез ИФР (1). ИФР, в свою очередь, взаимодействуют со специфическими рецепторами клеток той же или других тканей (2) и стимулируют фосфорилирование белков, участвующих в митозе и росте (3).

2. Тиреотропин, лютеинизирующий гормон и фолликулостимулирующий гормон

Тиреотропин, ЛГ и ФСГ — гликопротеины. Тиреотропин (ТТГ) с молекулярной массой около 30 кД синтезируется в тиреотрофных клетках передней доли гипофиза.

Стимуляция секреции тиреотропина происходит под влиянием тиреолиберина, а основное ингибирующее действие оказывает повышение уровня тиреоидных гормонов. Пик секреции ТТГ отмечается в часы, непосредственно предшествующие сну, с последующим снижением в течение ночи.

Основная биологическая функция тиреотропина — стимуляция синтеза и секреции йодтиронинов (T_3 и T_4) в щитовидной железе. Трансдукция сигнала тиреотропина в клетки щитовидной железы происходит через рецепторы плазматической мембраны и активацию аденилатциклазы.

Рецептор тиреотропина состоит из 2 доменов, один из которых представляет собой гликопротеин, а второй — ганглиозид (гликолипид, содержащий сиаловую кислоту). Для проявления биологического действия необходимо связывание тиреотропина с обоими доменами рецептора.

Тиреотропин оказывает на щитовидную железу 2 типа эффектов. Одни проявляются быстро (в течение нескольких минут) и включают стимуляцию всех стадий синтеза и секреции йодтиронинов (см. ниже подраздел III, В). Проявление других требует нескольких дней. К ним относят стимуляцию синтеза белков, фосфолипидов, нуклеиновых кислот, увеличение размеров и количества тиреоидных клеток.

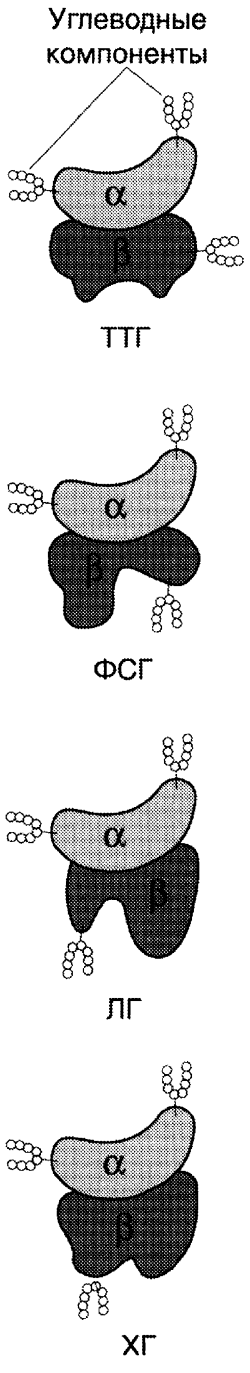


Рис. 11-14. Строение гормонов передней доли гипофиза и хорионического гонадотропина. ТТГ, ФСГ, ЛГ и ХГ — гликопротеины, состоящие из 2 субъединиц; α-субъединицы всех 4 гормонов идентичны; β-субъединицы различаются первичной структурой, строением олигосахаридных фрагментов и участков гликозилирования и определяют биологическую активность; α- и β-субъединицы содержат олигосахаридные фрагменты.

Некоторые иммуноглобулины класса G, взаимодействуя с рецепторами тиреотропина, имитируют эффекты гормона. Подобные иммуноглобулины обнаруживаются у большинства больных гипертиреозом (см. ниже подраздел III, В). Помимо стимулирующих, обнаруживаются и антитела, вызывающие разрушение клеток щитовидной железы. Образование антител, имитирующих эффекты тиреотропина, — одна из частых причин нарушений функций щитовидной железы.

В группу гормонов, относящихся к гликопротеинам, входят также гонадотропные гормоны гипофиза ЛГ и ФСГ и хорионический гонадотропин (ХГ) (рис. 11-14).

3. Группа гормонов, образующихся из проопиомеланокортина

Проопиомеланокортин (ПОМК) с молекулярной массой 28,5 кД синтезируется в передней и промежуточной долях гипофиза и в некоторых других тканях (кишечнике, плаценте). Полипептидная цепь ПОМК состоит из 265 аминокислотных остатков (рис. 11-15).

После отщепления сигнального пептида происходит частичный протеолиз оставшейся полипептидной цепи с образованием АКТГ и β-липотропина (β-ЛП). В разных клетках в результате избирательного протеолиза образуется разный набор пептидов: α- и β-меланоцитстимулирующих гормонов (α- и β-МСГ) и эндорфинов. β-МСГ и кортикотропиноподобный гормон промежуточной доли у человека практически не образуются, так как у взрослых людей промежуточная доля не развита. В гипофизе человека найдены β-липотропин, γ-липотропин и β-эндорфин. Функции всех продуктов разрушения ПОМК недостаточно изучены.

Кортикотропин (АКТГ) — пептидный гормон; состоит из 39 аминокислотных остатков; синтезируется в клетках передней доли гипофиза под влиянием кортиколиберина.

Кортикотропин секретируется в импульсивном режиме. Скорость секреции составляет 5—25 мкг/сут. При стрессе (травма, ожог, хирургическое вмешательство, интоксикация химическими веществами, кровотечение, боль, психическая травма) концентрация АКТГ в крови возрастает во много раз. У здоровых людей наименьший уровень АКТГ в крови отмечается в конце дня и непосредственно перед сном, наи-

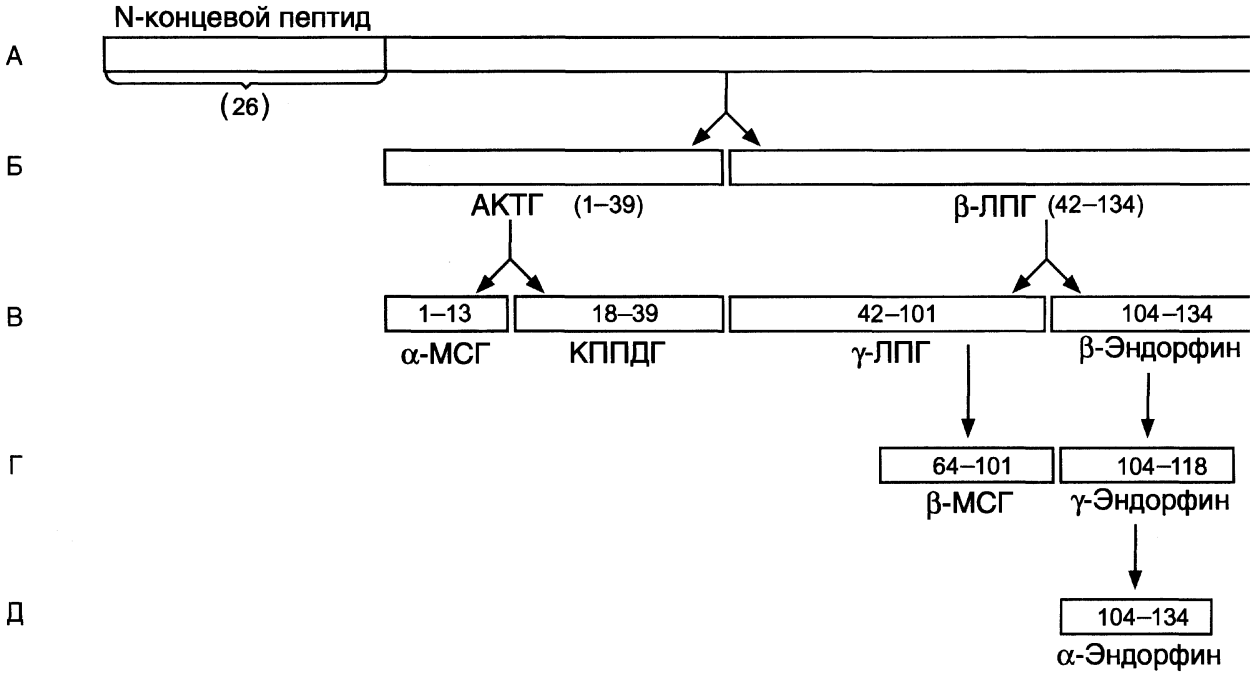


Рис. 11-15. Пептидные гормоны, образующиеся из ПОМК. А — ПОМК состоит из 265 аминокислотных остатков (а.к.), вклю чая N-концевой сигнальный пептид из 26 аминокислот; Б — после отщепления сигнального пептида полипептидная цепь рас щепляется на 2 фрагмента: АКТГ (39 а.к.) и β-липотропин (42–134 а.к); В, Г, Д — при дальнейшем протеолизе происходит обра зование α- и β-МСГ и эндорфинов. КППДГ — кортикотропиноподобный гормон промежуточной доли гипофиза.

больший — в 6–8 ч утра, в момент пробуждения. $T_{1/2}$ в крови составляет 15–25 мин.

Механизм действия АКТГ включает взаимодействие с рецептором плазматической мембраны клеток, активацию аденилатциклазы и фосфорилирование белков, участвующих в синтезе кортикостероидов (см. ниже подраздел III, Д). Эти эффекты усиливаются в присутствии ионов Ca^{2+}. В клетках коры надпочечников АКТГ стимулирует гидролиз эфиров холестерола, увеличивает поступление в клетки холестерола в составе ЛПНП; стимулирует превращение холестерола в прегненолон; индуцирует синтез митохондриальных и микросомальных ферментов, участвующих в синтезе кортикостероидов. Подробнее этапы синтеза кортикостероидов рассматриваются в подразделе III, Д.

4. Гормоны задней доли гипофиза

Задняя доля гипофиза, или нейрогипофиз, секретирует 2 активных гормона — вазопрессин, или антидиуретический гормон (АДГ), и окситоцин. Окситоцин и вазопрессин — нонапептиды со сходной первичной структурой (рис. 11-16).

Оба гормона образуются в гипоталамусе в нейронах разных гипоталамических ядер в форме прогормонов, из которых в результате посттрансляционной модификации образуются гормон и транспортный пептид нейрофизин (окситоцин+нейрофизин I и вазопрессин+нейрофизин II). В процессе транспорта в клетки задней доли гипофиза гормоны остаются нековалентно связанными со своими транспортными пептидами. В крови гормоны не связаны с нейрофизином. $T_{1/2}$ составляет 2–4 мин.

Основные биологические эффекты вазопрессина проявляются через взаимодействие с 2 типами рецепторов. V_1-рецепторы расположены в клетках гладкой мускулатуры сосудов в комплексе с фосфолипазой С. Результат трансдукции сигнала в эти клетки — сокращение сосудов. V_2-рецепторы расположены в клетках почечных канальцев. Взаимодействие вазопрессина с V_2-рецепторами активирует аденилатциклазную систему, увеличивая в клетках концентрацию

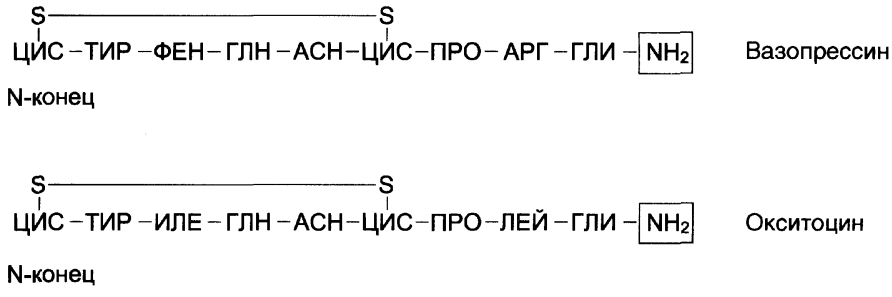


Рис. 11-16. Структура вазопрессина и окситоцина. Каждый нонапептид содержит остатки цистеина в положениях 1 и 6, связанные дисульфидными связями. У большинства животных и человека в положении 8 вазопрессина находится аргинин вместо лизина, в связи с чем он обозначается как аргинин вазопрессин.

цАМФ и активность протеинкиназы А. В результате этой активации происходит фосфорилирование белков, стимулирующих экспрессию генов белков, которые образуют каналы, обеспечивающие реабсорбцию воды (см. ниже подраздел VI, А).

Окситоцин стимулирует сокращение гладкой мускулатуры матки, а также играет важную роль в стимуляции лактации. Он вызывает сокращение миоэпителиальных клеток молочных желёз, в результате чего происходит перераспределение молока из альвеолярных протоков в область соска.

Акт сосания материнской груди стимулирует секрецию пролактина, обеспечивая образование и секрецию молока.

В. Нарушения функций гипоталамо-гипофизарной системы

Нарушения функций гипоталамо-гипофизарной системы характеризуются разнообразными клиническими проявлениями.

Гипофункция может быть следствием уменьшения или полного подавления продукции тропных гормонов (пангипопитуитаризм) или частичного, при котором происходит нарушение синтеза и секреции одного или нескольких гормонов. Недостаток тропных гормонов гипофиза ведёт к резкому снижению функции периферических эндокринных желёз.

Выпадение гонадотропной функции гипофиза приводит к недостаточности яичников, аменорее, атрофии матки, молочных желёз. Вследствие снижения продукции кортикотропина развивается хроническая недостаточность коры надпочечников.

Дефицит гормона роста особенно опасен у детей. Известно несколько типов нарушений способности к нормальному росту вследствие абсолютного или относительного дефицита СТГ.

Гипофизарный нанизм, или карликовость (от греч. *nanos* — карлик). Причина нарушения роста и физического развития — дефицит гормона роста. Большинство форм гипофизарного нанизма развивается вследствие мутаций гена гормона роста. У большинства больных гипофизарным нанизмом нарушение роста сочетается с другими эндокринными нарушениями. В некоторых случаях гипосекреция гормона роста может быть результатом аутоиммунного повреждения соматотрофных клеток гипофиза, черепно-мозговой травмы или радиации.

Нанизм Ларона возникает вследствие дефекта рецепторов гормона роста гепатоцитов и снижения синтеза ИФР-1 и ИФР-2. Концентрация СТГ в крови при этом повышена.

Карликовость африканских пигмеев — результат нарушения пострецепторной передачи гормонального сигнала СТГ. При этой форме карликовости концентрация гормона роста в плазме нормальная, а концентрация ИФР-1 значительно снижена.

Гиперфункция гормона роста обычно возникает в результате образования гормон-продуцирующей опухоли соматотрофных клеток гипофиза, что приводит к повышению ростовой активности. Если гиперсекреция гормона роста возникает у детей и подростков с незакончившимся процессом окостенения эпифизарных хрящей, но продолжающимся ростом длинных костей, развивается гигантизм (от греч. *gigantos* — великан). При гигантизме увеличение костей, мягких тканей и органов про-

исходит сравнительно пропорционально. Гиперсекреция гормона роста у взрослых людей приводит к развитию акромегалии (от греч. *akros* — крайний, *megas* — большой), при которой рост тела ускоряется, но не в длину, а в ширину с диспропорциональным увеличением размеров лица, кистей рук, стоп, черепа, увеличением размеров внутренних органов.

У многих (~40%) больных акромегалией обнаруживается мутация в α_s-субъединице G-белка плазматической мембраны соматотрофных клеток, в результате которой α_s-субъединица теряет ГТФ-азную активность. Вследствие этого развиваются продолжительная активация аденилатциклазы, избыточное образование цАМФ и избыточная секреция соматотропного гормона.

Г. Гормоны щитовидной железы

В щитовидной железе синтезируются гормоны — йодированные производные тирозина. Они объединены общим названием йодтиронины. К ним относят 3,5,3′-трийодтиронин (трийодтиронин, T_3) и 3,5,3′,5′-тетрайодтиронин (T_4), или тироксин (рис. 11-17).

Йодтиронины участвуют в регуляции многих процессов метаболизма, развития, клеточной дифференцировки, в регуляции экспрессии генов.

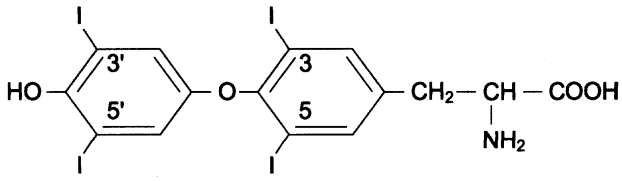
Заболевания, возникающие в результате нарушений синтеза, секреции и функций йодтиронинов, — наиболее распространённые заболевания эндокринной системы.

1. Биосинтез йодтиронинов

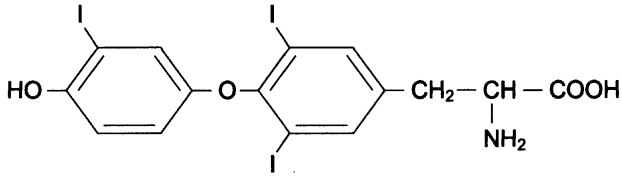
Йодтиронины синтезируются в составе белка тиреоглобулина (Тг) (рис. 11-18) в фолликулах, которые представляют собой морфологическую и функциональную единицу щитовидной железы.

Тиреоглобулин — гликопротеин с молекулярной массой 660 кД, содержащий 115 остатков тирозина. 8–10% массы тиреоглобулина представлено углеводами. Содержание йодида в организме составляет 0,2–1%.

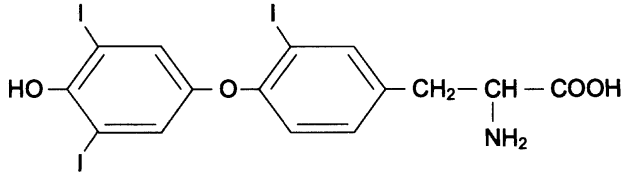
Тиреоглобулин синтезируется на рибосомах шероховатого ЭР в виде претиреоглобулина, затем переносится в цистерны ЭР, где происходит формирование вторичной и третичной структуры, включая процессы гликозилирования. Из цистерн ЭР тиреоглобулин поступает в аппарат Гольджи, включается в состав секреторных гранул и секретируется во внеклеточ-



3, 5, 3', 5'-Тетрайодтиронин (T_4)



3, 5, 3'-Трийодтиронин (T_3)



3, 3', 5'-Трийодтиронин (реверсивный)

Рис. 11-17. Структура гормонов щитовидной железы.

ный коллоид, где происходит йодирование остатков тирозина и образование йодтиронинов.

Йодирование тиреоглобулина и образование йодтиронинов осуществляется в несколько этапов (рис. 11-18).

Транспорт йода в клетки щитовидной железы. Йод в виде органических и неорганических соединений поступает в ЖКТ с пищей и питьевой водой. Суточная потребность в йоде составляет 150–200 мкг. 25–30% этого количества йодидов захватывается щитовидной железой. Транспорт йодида в клетки щитовидной железы — энергозависимый процесс и происходит при участии специального транспортного белка против электрохимического градиента (соотношение концентраций I^- в железе к концентрации I^- в сыворотке крови в норме составляет 25:1). Работа этого йодид-переносящего белка сопряжена с Na^+,K^+-АТФ-азой.

Окисление йода. Окисление I^- в I^+ происходит при участии гемсодержащей тиропероксидазы и H_2O_2 в качестве окислителя.

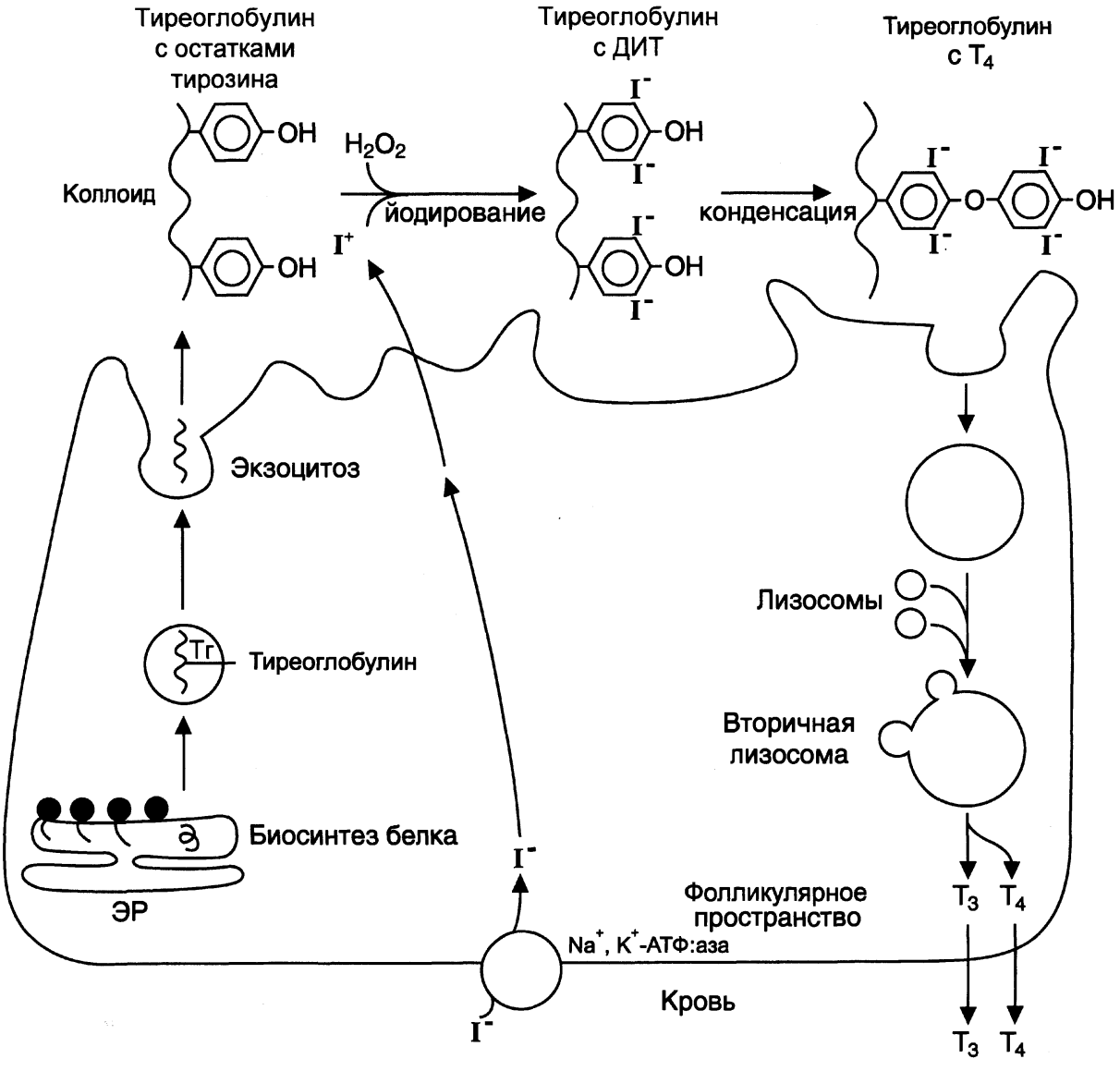


Рис. 11-18. Схема синтеза йодтиронинов. Тиреоглобулин синтезируется на рибосомах, далее поступает в аппарат Гольджи, а затем во внеклеточный коллоид, где он хранится и где происходит йодирование остатков тирозина. Образование йодтиронинов происходит в несколько этапов: транспорт йода в клетки щитовидной железы; окисление йода; йодирование остатков тирозина; образование йодтиронинов; транспорт йодтиронинов в кровь. ЭР — эндоплазматический ретикулум; ДИТ — дийодтиронин; Тг — тиреоглобулин; T_3 — трийодтиронин, T_4 — тироксин.

Йодирование тирозина. Окисленный йод взаимодействует с остатками тирозина в молекуле тиреоглобулина. Эта реакция также катализируется тиреопероксидазой.

Образование йодтиронинов. Под действием тиреопероксидазы окисленный йод реагирует с остатками тирозина с образованием монойодтирозинов (МИТ) и дийодтирозинов (ДИТ). Две молекулы ДИТ конденсируются с образованием йодтиронина T_4, а МИТ и ДИТ — с образованием йодтиронина T_3. Йодтиреоглобулин транспортируется из коллоида в фолликулярную клетку путём эндоцитоза и гидролизуется ферментами лизосом с освобождением T_3 и T_4. В нормальных условиях щитовидная железа секретирует 80–100 мкг T_4 и 5 мкг T_3 в сутки. Ещё

22–25 мкг T_3 образуется в результате дейодирования T_4 в периферических тканях по 5′-углеродному атому.

Транспорт и метаболизм йодтиронинов. От половины до двух третей T_3 и T_4 находятся в организме вне щитовидной железы. Большая часть их циркулирует в крови в связанной форме в комплексе с белками: тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ) и тироксинсвязывающим преальбумином (ТСПА). ТСГ служит основным транспортным белком йодтиронинов, а также формой их депонирования. Он обладает более высоким сродством к T_3 и T_4 и в нормальных условиях связывает почти всё количество этих гормонов. Только 0,03% T_4 и 0,3% T_3 находятся в крови в свободной форме.

$T_{1/2}$ T_4 в плазме в 4–5 раз больше, чем T_3. Для T_4 этот период составляет около 7 дней, а для T_3 — 1–1,5 дня. Биологическая активность йодтиронинов обусловлена несвязанной фракцией. T_3 — основная биологически активная форма йодтиронинов; его сродство к рецептору клеток-мишеней в 10 раз выше, чем у T_4. В периферических тканях в результате дейодирования части T_4 по пятому углеродному атому образуется так называемая «реверсивная» форма T_3, которая почти полностью лишена биологической активности.

Другие пути метаболизма йодтиронинов включают полное дейодирование, дезаминирование или декарбоксилирование. Йодированные продукты катаболизма йодтиронинов конъюгируются в печени с глюкуроновой или серной кислотами (см. раздел 12), секретируются с жёлчью, в кишечнике вновь всасываются, дейодируются в почках и выделяются с мочой.

2. Регуляция синтеза и секреции йодтиронинов

Скорость синтеза и секреции йодтиронинов регулируются гипоталамо-гипофизарной системой по механизму обратной связи (рис. 11-19).

Стимулом для повышения секреции тиреолиберина и тиреотропина служит снижение концентрации йодтиронинов в крови.

3. Механизм действия и биологические функции йодтиронинов

Клетки-мишени йодтиронинов имеют 2 типа рецепторов к этим гормонам. Основные эффекты йодтиронинов — результат их взаимодействия с высокоспецифичными рецепторами, которые в комплексе с гормонами постоянно находятся в ядре и взаимодействуют с определёнными последовательностями ДНК, участвуя в регуляции экспрессии генов.

Другие рецепторы расположены в плазматической мембране клеток, но это не те же самые белки, что в ядре. Они обладают более низким сродством к йодтиронинам и, вероятно, обеспечивают связывание гормонов для удержания их в непосредственной близости к клетке.

При физиологической концентрации йодтиронинов их действие проявляется в ускорении белкового синтеза, стимуляции процессов роста и клеточной дифференцировки. В этом отношении йодтиронины — синергисты гормона роста. Кроме того, T_3 ускоряет транскрипцию гена гормона роста. У животных при дефиците T_3 клетки гипофиза теряют способность к синтезу гормона роста.

Очень высокие концентрации T_3 тормозят синтез белков и стимулируют катаболические

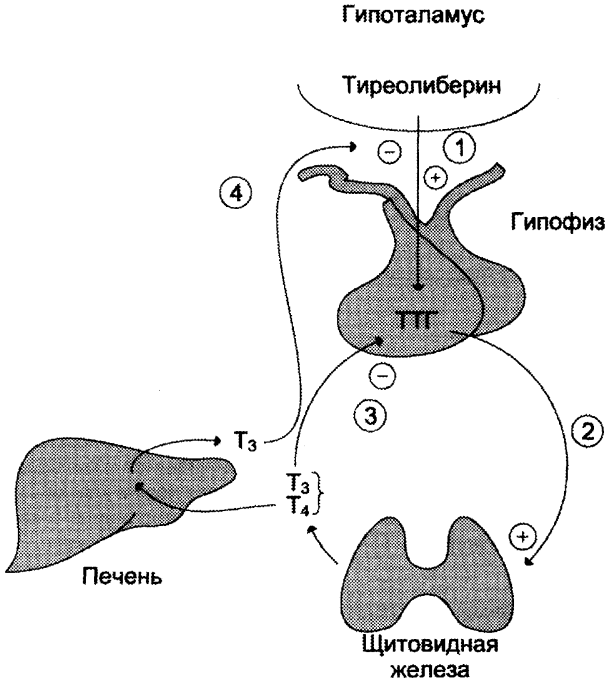


Рис. 11-19. Регуляция синтеза и секреции йодтиронинов. 1 — тиреолиберин стимулирует освобождение ТТГ; 2 — ТТГ стимулирует синтез и секрецию йодтиронинов; 3, 4 — йодтиронины тормозят синтез и секрецию ТТГ и тиреолиберина.

процессы, показателем чего служит отрицательный азотистый баланс.

Метаболические эффекты йодтиронинов относят в основном к энергетическому метаболизму, что проявляется в повышении поглощения клетками кислорода. Этот эффект проявляется во всех органах, кроме мозга, РЭС и гонад.

В разных клетках T_3 стимулирует работу Na^+,K^+-АТФ-азы, на что затрачивается значительная часть энергии, утилизируемой клеткой.

В печени йодтиронины ускоряют гликолиз, синтез холестерола и синтез жёлчных кислот. В печени и жировой ткани T_3 повышает чувствительность клеток к действию адреналина и косвенно стимулирует липолиз в жировой ткани и мобилизацию гликогена в печени. В физиологических концентрациях T_3 увеличивает в мышцах потребление глюкозы, стимулирует синтез белков и увеличение мышечной массы, повышает чувствительность мышечных клеток к действию адреналина.

Йодтиронины также участвуют в формировании ответной реакции на охлаждение увеличением теплопродукции, повышая чувствительность симпатической нервной системы к норадреналину и стимулируя секрецию норадреналина (см. раздел 6).

4. Заболевания щитовидной железы

Гормоны щитовидной железы необходимы для нормального развития человека.

Гипотиреоз у новорождённых приводит к развитию кретинизма, который проявляется множественными врождёнными нарушениями и тяжёлой необратимой задержкой умственного развития.

Гипотиреоз развивается вследствие недостаточности йодтиронинов. Обычно гипотиреоз связан с недостаточностью функции щитовидной железы, но может возникать и при заболеваниях гипофиза и гипоталамуса.

Наиболее тяжёлые формы гипотиреоза, сопровождающиеся слизистым отёком кожи и подкожной клетчатки, обозначают термином «**микседема**» (от греч. *муха* — слизь, *oedema* — отёк). Отёчность обусловлена избыточным накоплением гликозаминогликанов и воды. В подкожной клетчатке накапливается глюкуроновая и в меньшей степени хондроитинсерная кислоты. Избыток гликозаминогликанов вызывает изменения коллоидной структуры межклеточного матрикса, усиливает его гидрофильность и связывает ионы натрия, что приводит к задержке воды.

Характерные проявления заболевания: снижение частоты сердечных сокращений, вялость, сонливость, непереносимость холода, сухость кожи. Эти симптомы развиваются вследствие снижения основного обмена, скорости гликолиза, мобилизации гликогена и жиров, потребления глюкозы мышцами, уменьшения мышечной массы и снижения теплопродукции. При возникновении гипотиреоза у детей старшего возраста наблюдают отставание в росте без задержки умственного развития.

В настоящее время у взрослых людей частой причиной гипотиреоза является хронический аутоиммунный тиреоидит, приводящий к нарушению синтеза йодтиронинов (**зоб Хашимото**).

Гипотиреоз может быть также результатом недостаточного поступления йода в организм — **эндемический зоб**. Эндемический зоб (нетоксический зоб) часто встречается у людей, живущих в районах, где содержание йода в воде и почве недостаточно. Если поступление йода в организм снижается (ниже 100 мкг/сут), то уменьшается продукция йодтиронинов, что приводит к усилению секреции ТТГ (из-за ослабления действия йодтиронинов на гипофиз по механизму отрицательной обратной связи), под влиянием которого происходит компенсаторное увеличение размеров щитовидной железы (гиперплазия), но продукция йодтиронинов при этом не увеличивается.

Гипертиреоз возникает вследствие повышенной продукции йодтиронинов. **Диффузный токсический зоб** (базедова болезнь, болезнь Грейвса) — наиболее распространённое заболевание щитовидной железы. При этом заболевании отмечают увеличение размеров щитовидной железы (зоб), повышение концентрации йодтиронинов в 2—5 раз и развитие тиреотоксикоза.

Характерные признаки тиреотоксикоза: увеличение основного обмена, учащение сердцебиений, мышечная слабость, снижение массы тела (несмотря на повышенный аппетит), потливость, повышение температуры тела, тремор и экзофтальм (пучеглазие). Эти симптомы отражают одновременную стимуляцию йодтиронинами как анаболических (рост и дифференцировка тканей), так и катаболических (катаболизм углеводов, липидов и белков) процессов. В большей мере уси-

ливаются процессы катаболизма, о чём свидетельствует отрицательный азотистый баланс.

Гипертиреоз может возникать в результате различных причин: развитие опухоли, тиреоидит, избыточное поступление йода и йодсодержащих препаратов, аутоиммунные реакции.

Болезнь Грейвса возникает в результате образования антител к тиреоидным антигенам. Один из них, иммуноглобулин (IgG), имитирует действие тиреотропина, взаимодействуя с рецепторами тиреотропина на мембране клеток щитовидной железы. Это приводит к диффузному разрастанию щитовидной железы и избыточной неконтролируемой продукции T_3 и T_4, поскольку образование IgG не регулируется по механизму обратной связи. Уровень ТТГ при этом заболевании снижен вследствие подавления функции гипофиза высокими концентрациями йодтиронинов.

Д. Гормоны коры надпочечников (кортикостероиды)

В коре надпочечников синтезируется более 40 различных стероидов, различающихся по структуре и биологической активности. Биологически активные кортикостероиды объединяют в 3 основные класса в зависимости от их преобладающего действия.

Глюкокортикоиды, C_{21}-стероиды, играют важную роль в адаптации к стрессу. Они оказывают разнообразные эффекты, но наиболее важный — стимуляция глюконеогенеза (см. раздел 7). Основной глюкокортикоид человека — кортизол.

Минералокортикоиды, C_{21}-стероиды, необходимы для поддержания уровня Na^+ и K^+. Самый активный гормон этого класса — альдостерон (см. ниже подраздел VI).

Андрогены — C_{19}-стероиды. В коре надпочечников образуются предшественники андрогенов, из которых наиболее активный — дегидроэпиандростерон (ДЭА) и слабый — андростендион. Самый мощный андроген надпочечников тестостерон синтезируется в надпочечниках в небольшом количестве. Эти стероиды превращаются в более активные андрогены вне надпочечников. Тестостерон в незначительных количествах может превращаться в надпочечниках в эстрадиол. Но в норме продукция этих гормонов надпочечниками не играет существенной роли.

1. Биосинтез и метаболизм кортикостероидов

Общим предшественником кортикостероидов служит холестерол (рис. 11-20).

В митохондриях холестерол превращается в прегненолон при участии гидроксилазы, относящейся к группе цитохромов P_{450}. Цитохром P_{450}, отщепляющий боковую цепь, локализован во внутренней мембране митохондрий. Отщепление боковой цепи холестерола включает 2 реакции гидроксилирования: одна — по атому C_{22}, другая — по C_{20}. Последующее отщепление шестиуглеродного фрагмента приводит к образованию C_{21}-стероида — прегненолона. Дальнейшее превращение прегненолона происходит под действием различных гидроксилаз с участием молекулярного кислорода и NADPH, а также дегидрогеназ, изомераз и лиаз. Эти ферменты имеют различную внутри- и межклеточную локализацию. В коре надпочечников различают 3 типа клеток, образующих 3 слоя, или зоны: клубочковую, пучковую и сетчатую. Каким именно стероидом окажется конечный продукт, зависит от набора ферментов в клетке и последовательности реакций гидроксилирования. Например, ферменты, необходимые для синтеза альдостерона, присутствуют только в клетках клубочковой зоны, а ферменты синтеза глюкокортикоидов и андрогенов локализованы в пучковой и сетчатой зонах.

Путь биосинтеза кортизола. Кортизол синтезируется из холестерола, который в основном поступает из крови в составе ЛПНП или синтезируется в клетках из ацетил-КоА. Значительная часть эфиров холестерола накапливается в цитозоле клеток в липидных каплях. Под влиянием АКТГ происходит активация специфической эстеразы, и свободный холестерол транспортируется в митохондрии (рис. 11-21).

Синтез кортизола начинается с превращения прегненолона в прогестерон. Эта реакция протекает в цитозоле клеток пучковой зоны коры надпочечников, куда прегненолон транспортируется из митохондрий. Реакцию катализирует 3-β-гидроксистероиддегидрогеназа.

В мембранах ЭР при участии 17-α-гидроксилазы происходит гидроксилирование прогестерона по C_{17} с образованием 17-гидроксипрогестерона. Этот же фермент катализирует превращение прегненолона в 17-гидроксипрегненолон, от которого далее при участии 17,20-

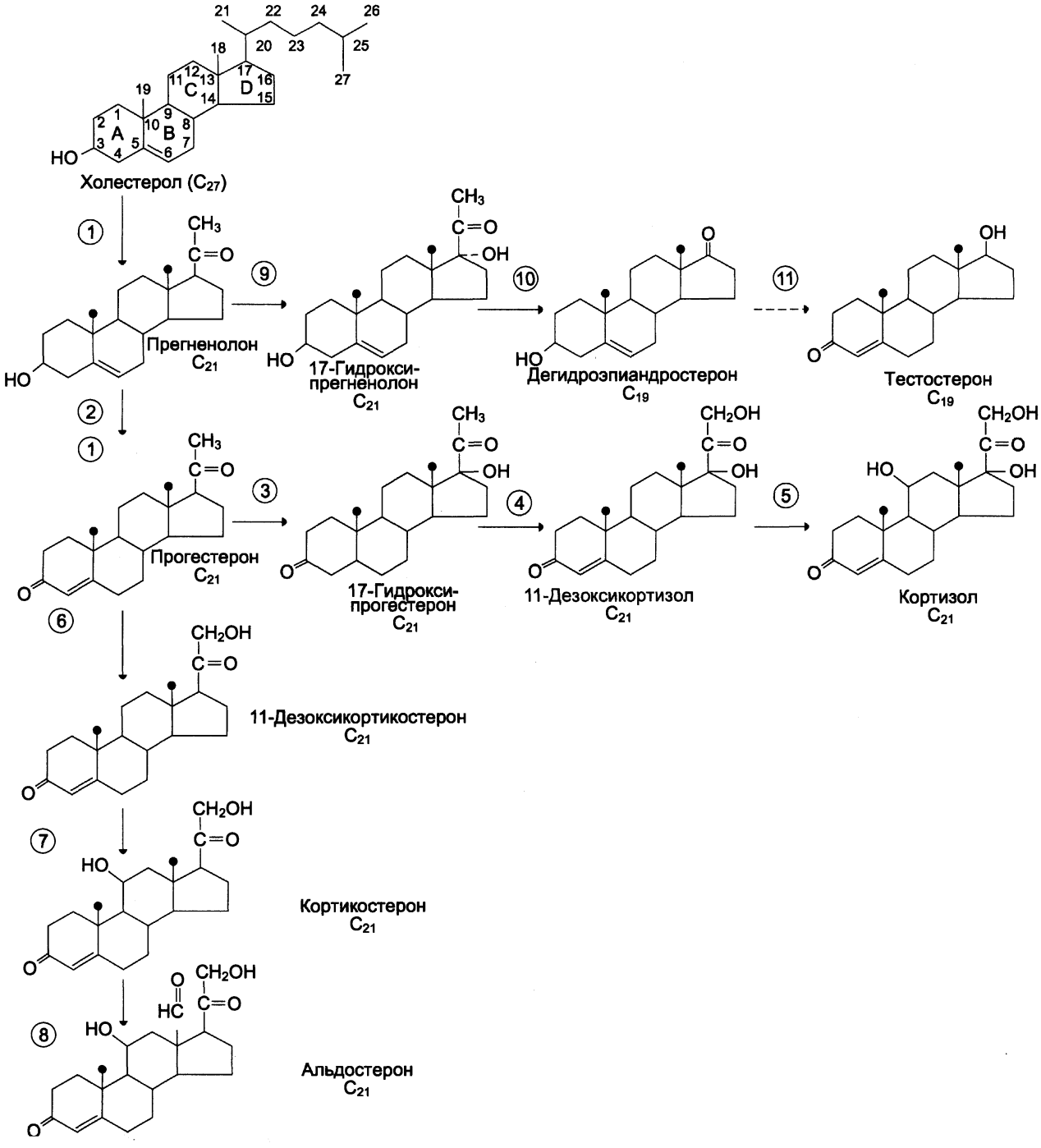


Рис. 11-20. Строение и основные этапы синтеза кортикостероидов. 1 — превращение холестерола в прегненолон (гидроксилаза, отщепляющая боковую цепь); 2 — образование прогестерона (3-β-гидроксистероиддегидрогеназа); 3, 4, 5 — реакции синтеза кортизола (3 — 17-гидроксилаза, 4 — 21-гидроксилаза, 5 — 11-гидроксилаза); 6, 7, 8 — путь синтеза альдостерона (6 — 21-гидроксилаза, 7 — 11-гидроксилаза, 8 — 18-гидроксилаза, 18-гидроксидегидрогеназа); 9, 10, 11 — путь синтеза тестостерона (9 — 17-гидроксилаза, 10 — 17,20-лиаза, 11 — дегидрогеназа).

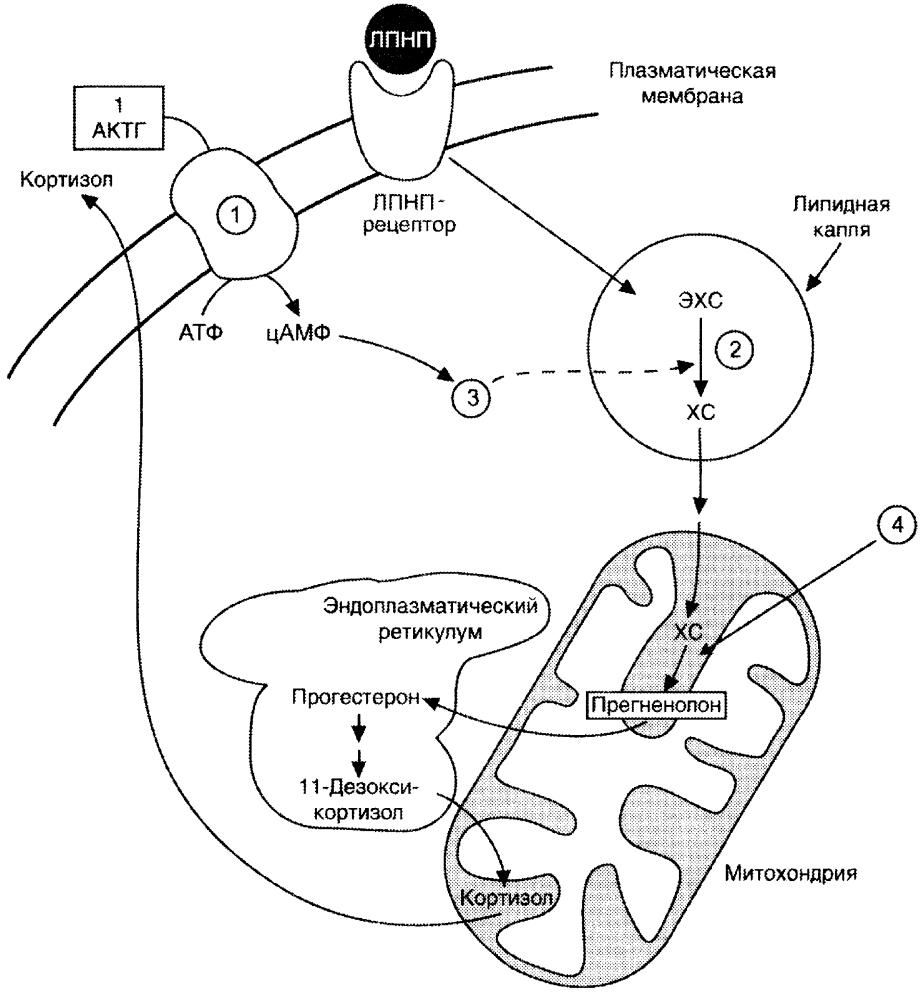


Рис. 11-21. Внутриклеточная локализация синтеза кортизола. 1 — аденилатциклазный комплекс; 2 — холестеролэстераза; 3 — протеинкиназа А; 4 — холестеролдесмолаза отщепляет боковую цепь холестерола. ХС — холестерол; ЭХС — эфиры холестерола.

лиазы может отщепляться двухуглеродная боковая цепь с образованием C_{19}-стероида — дегидроэпиандростерона. 17-гидроксипрогестерон служит предшественником кортизола, а дегидроэпиандростерон — предшественником андрогенов. Далее 17-ОН-прогестерон гидроксилируется 21-гидроксилазой ($P_{450\text{-}C21}$), локализованной в мембране ЭР, и превращается в 11-дезоксикортизол, который переносится во внутреннюю мембрану митохондрий, где гидроксилируется при участии цитохрома $P_{450\text{-}C11}$ с образованием кортизола.

Скорость синтеза и секреции кортизола стимулируются в ответ на стресс, травму, инфекцию, понижение концентрации глюкозы в крови. Повышение концентрации кортизола подавляет синтез кортиколиберина и АКТГ по механизму отрицательной обратной связи.

Синтез минералокортикоидов в клетках клубочковой зоны коры надпочечников также начинается с превращения холестерола в прегненолон, а затем в прогестерон. Прогестерон гидроксилируется вначале по C_{21} с образованием 11-дезоксикортикостерона. Следующее гидроксилирование происходит по C_{11}, что приводит к образованию кортикостерона, обладающего слабовыраженной глюкокортикоидной и минералокортикоидной активностью.

В клетках клубочковой зоны 17-α-гидроксилаза отсутствует, но есть митохондриальная 18-гидроксилаза, при участии которой кортикостерон гидроксилируется, а затем дегидрируется с образованием альдегидной группы у C_{18}.

Главным стимулом для синтеза альдостерона служит ангиотензин II (см. ниже подраздел V).

Транспорт кортикостероидов. Кортизол в плазме крови находится в комплексе с α-глобулином транскортином и в небольшом количестве в свободной форме. Синтез транскортина протекает в печени и стимулируется эстрогенами.

$T_{1/2}$ кортизола составляет 1,5–2 ч. Несвязанный, или свободный кортизол, составляет около 8% от общего количества гормона в плазме и является биологически активной фракцией.

Альдостерон не имеет специфического транспортного белка, но образует слабые связи с альбумином.

Катаболизм гормонов коры надпочечников происходит прежде всего в печени. Здесь протекают реакции гидроксилирования, окисления и восстановления гормонов. Продукты катаболизма кортикостероидов (кроме кортикостерона и альдостерона) выводятся с мочой в форме 17-кетостероидов, образующихся в результате отщепления боковой цепи. Эти продукты метаболизма выделяются преимущественно в виде конъюгатов с глюкуроновой и серной кислотами. 17-Окси- и 17-кетостероиды образуются также при катаболизме половых гормонов, которые имеют у C_{17} гидрокси- или кетогруппы. У мужчин 2/3 кетостероидов образуется за счёт кортикостероидов и 1/3 за счёт тестостерона (всего 12–17 мг/сут). У женщин 17-кетостероиды образуются преимущественно за счёт кортикостероидов (7–12 мг/сут). Определение 17-кетостероидов в моче позволяет оценить как количество глюкокортикоидов, секретируемых корой надпочечников, так и функцию надпочечников.

2. Биологические функции кортикостероидов отличаются широким спектром влияний на процессы метаболизма и подробно рассматриваются в соответствующих разделах.

Важнейший фактор в механизме действия кортикостероидов — взаимодействие их со специфическими рецепторами, расположенными в цитозоле клетки или в ядре. Регуляция внутриклеточных процессов под влиянием кортикостероидных гормонов проявляется в изменении количества белков, обычно ключевых ферментов метаболизма, путём регуляции транскрипции генов в клетках-мишенях.

Влияние глюкокортикоидов на промежуточный метаболизм связано с их способностью координированно воздействовать на разные ткани и разные процессы, как анаболические, так и катаболические.

Кортизол стимулирует образование глюкозы в печени, усиливая глюконеогенез и одновременно увеличивая скорость освобождения аминокислот — субстратов глюконеогенеза из периферических тканей. В печени кортизол индуцирует синтез ферментов катаболизма аминокислот (аланинаминотрансферазы, триптофанпирролазы и тирозинаминотрансферазы и ключевого фермента глюконеогенеза — фосфоенолпируваткарбоксикиназы). Кроме того, кортизол стимулирует синтез гликогена в печени и тормозит потребление глюкозы периферическими тканями. Это действие кортизола проявляется в основном при голодании и недостаточности инсулина (см. ниже подраздел V). У здоровых людей эти эффекты кортизола уравновешиваются инсулином.

Избыточное количество кортизола стимулирует липолиз в конечностях и липогенез в других частях тела (лицо и туловище). Кроме того, глюкокортикоиды усиливают липолитическое действие катехоламинов и гормона роста.

Влияние глюкокортикоидов на обмен белков и нуклеиновых кислот проявляется двояко: в печени кортизол в основном оказывает анаболический эффект (стимулирует синтез белков и нуклеиновых кислот). В мышцах, лимфоидной и жировой ткани, коже и костях кортизол тормозит синтез белков, РНК и ДНК и стимулирует распад РНК и белков.

При высокой концентрации глюкокорти-коиды подавляют иммунные реакции, вызывая гибель лимфоцитов и инволюцию лимфоидной ткани; подавляют воспалительную реакцию, снижая число циркулирующих лейкоцитов, а также индуцируя синтез липокортинов, которые ингибируют фосфолипазу A_2, снижая таким образом синтез медиаторов воспаления — простагландинов и лейкотриенов (см. раздел 8).

Высокая концентрация глюкокортикоидов вызывает торможение роста и деления фибробластов, а также синтез коллагена и фибронектина (см. раздел 15). Для гиперсекреции глю-

кокортикоидов типичны истончение кожи, плохое заживление ран, мышечная слабость и атрофия мышц.

Глюкокортикоиды участвуют в физиологическом ответе на стресс, связанный с травмой, инфекцией или хирургическим вмешательством. В этом ответе в первую очередь участвуют катехоламины, но во многих случаях для проявления их максимальной активности необходимо участие глюкокортикоидов.

Минералокортикоиды стимулируют реабсорбцию Na^+ в дистальных извитых канальцах и собирательных трубочках почек. Кроме того, они способствуют секреции K^+, NH_4^+ в почках, а также в других эпителиальных тканях: потовых железах, слизистой оболочке кишечника и слюнных железах. В организме человека альдостерон — наиболее активный минералокортикоид.

Механизм действия и биологические эффекты альдостерона подробно рассмотрены в подразделе VI этого раздела.

3. Изменения метаболизма при гипо- и гиперфункции коры надпочечников

Заболевания коры надпочечников могут проявиться симптомами как гипо-, так и гиперпродукции гормонов.

Большинство клинических проявлений надпочечниковой недостаточности обусловлено дефицитом глюкокортикоидов и минералокортикоидов.

Острая надпочечниковая недостаточность представляет большую угрозу для жизни, так как сопровождается декомпенсацией всех видов обмена и процессов адаптации. Она проявляется сосудистым коллапсом, резкой адинамией, потерей сознания. Такое состояние возникает вследствие нарушения обмена электролитов, которое приводит к потере ионов Na^+ и Cl^- с мочой, обезвоживанию за счёт потери внеклеточной жидкости, повышению уровня K^+ в сыворотке крови, в межклеточной жидкости и клетках, в результате чего может нарушаться сократительная способность миокарда. Изменение углеводного обмена проявляется в снижении уровня сахара в крови, уменьшении запаса гликогена в печени и скелетных мышцах.

Острая недостаточность функции коры надпочечников может быть следствием декомпенсации хронических заболеваний, а также развивается у больных, лечившихся длительное время глюкокортикоидными препаратами по поводу неэндокринных заболеваний, например инфекционно-аллергических заболеваний.

В результате длительного приёма глюкокортикоидов подавляется функция гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и развивается атрофия клеток коры надпочечников. Резкая отмена гормональных препаратов может сопровождаться острой надпочечниковой недостаточностью (так называемый синдром «отмены»).

Первичная недостаточность надпочечников (болезнь Аддисона) развивается в результате поражения коры надпочечников туберкулёзным или аутоиммунным процессом. Основные клинические проявления выражаются в снижении массы тела, общей слабости, снижении аппетита, тошноте, рвоте, снижении АД и типичной для первичной надпочечниковой недостаточности гиперпигментации кожи («бронзовая болезнь») . Причина гиперпигментации — повышение продукции ПОМК — предшественника АКТГ и меланоцитстимулирующего гормона.

Вторичная недостаточность надпочечников может развиться при дефиците АКТГ, что, в свою очередь, может быть следствием опухоли или инфекционного поражения гипофиза. При вторичной недостаточности надпочечников, в отличие от болезни Аддисона, отсутствует гиперпигментация.

При врождённой гиперплазии надпочечников нарушается синтез кортизола. В 95% случаев при этой патологии обнаруживается дефект 21-гидроксилазы (реже 11-гидроксилазы). Снижение продукции кортизола сопровождается увеличением секреции АКТГ, накоплением промежуточных продуктов синтеза кортикостероидов, в частности, предшественников андрогенов.

Избыток андрогенов ведёт к усилению роста тела, раннему половому созреванию у мальчиков и развитию мужских половых признаков у девочек (адреногенитальный синдром).

При частичной недостаточности 21-гидроксилазы у женщин может нарушаться менструальный цикл.

Гиперпродукция глюкокортикоидов (гиперкортицизм) может быть следствием повышения уровня АКТГ при опухолях гипофиза (**болезнь Иценко–Кушинга**) и опухолях других клеток (бронхов, тимуса, поджелудочной железы), вырабатывающих кортикотропинподобные веще-

ства, или избыточного синтеза кортизола при гормонально-активных опухолях коры надпочечников (**синдром Иценко–Кушинга**).

При гиперкортицизме наблюдаются гипергликемия и снижение толерантности к глюкозе, обусловленные стимуляцией глюконеогенеза (**«стероидный диабет»**), усиление катаболизма белков, уменьшение мышечной массы, истончение кожи, остеопороз, инволюция лимфоидной ткани. Характерно своеобразное перераспределение отложений жира («лунообразное лицо», выступающий живот). Гипернатриемия, гипертензия, гипокалиемия обусловлены некоторой минералокортикоидной активностью кортизола, которая проявляется при его избытке.

Для выявления первичной причины гиперкортицизма, помимо определения концентрации АКТГ в плазме крови, используют тесты с применением высоких доз синтетического глюкокортикоида дексаметазона (структурного аналога кортизола). Дексаметазон подавляет секрецию АКТГ по механизму отрицательной обратной связи.

Для болезни Иценко–Кушинга характерно снижение концентрации кортизола после применения дексаметазона более чем на 50%. Отсутствие реакции на введение дексаметазона может указывать на наличие опухоли надпочечников или внегипофизарной секреции АКТГ.

Е. Гормоны мозгового слоя надпочечников

Подобно задней доле гипофиза, мозговой слой надпочечников — производное нервной ткани. Его можно рассматривать как продолжение симпатической нервной системы, так как преганглионарные волокна чревного нерва оканчиваются на хромаффинных клетках мозгового слоя надпочечников.

Своё название эти клетки получили потому, что они содержат гранулы, окрашивающиеся бихроматом калия в красный цвет. Такие клетки находятся также в сердце, печени, почках, половых железах, постганглионарных нейронах симпатической нервной системы и в ЦНС.

При стимуляции преганглионарного нейрона хромаффинные клетки продуцируют катехоламины — дофамин, адреналин и норадреналин.

У большинства видов животных хромаффинные клетки секретируют в основном адреналин (~ 80%) и в меньшей степени норадреналин.

По химическому строению катехоламины — 3,4-дигидроксипроизводные фенилэтиламина. Непосредственным предшественником гормонов служит тирозин (см. раздел 9).

1. Синтез и секреция катехоламинов

Синтез катехоламинов происходит в цитоплазме и гранулах клеток мозгового слоя надпочечников (рис. 11-22). В гранулах происходит также запасание катехоламинов.

Катехоламины поступают в гранулы путём АТФ-зависимого транспорта и хранятся в них в комплексе с АТФ в соотношении 4:1 (гормон-АТФ). Разные гранулы содержат разные катехоламины: некоторые только адреналин, другие — норадреналин, третьи — оба гормона.

Секреция гормонов из гранул происходит путём экзоцитоза. Катехоламины и АТФ освобождаются из гранул в том же соотношении, в каком они сохраняются в гранулах. В отличие от симпатических нервов, клетки мозгового слоя надпочечников лишены механизма обратного захвата выделившихся катехоламинов.

В плазме крови катехоламины образуют непрочный комплекс с альбумином. Адреналин транспортируется в основном к печени и скелетным мышцам. Норадреналин образуется в основном в органах, иннервируемых симпатическими нервами (80% от общего количества). Норадреналин лишь в незначительных количествах достигает периферических тканей. $T_{1/2}$ катехоламинов — 10–30 с. Основная часть катехоламинов быстро метаболизируется в различных тканях при участии специфических ферментов (см. раздел 9). Лишь небольшая часть адреналина (~ 5%) выделяется с мочой.

2. Механизм действия и биологические функции катехоламинов

Катехоламины действуют на клетки-мишени через рецепторы, локализованные в плазматической мембране. Выделяют 2 главных класса таких рецепторов: α-адренергические и β-адренергические. Все рецепторы катехоламинов — гликопротеины, которые являются продуктами разных генов, различаются сродством к агонистам и антагонистам и передают сигналы в клетки с помощью разных вторичных посредников. Это определяет характер их влияния на метаболизм клеток-мишеней.

19–2128

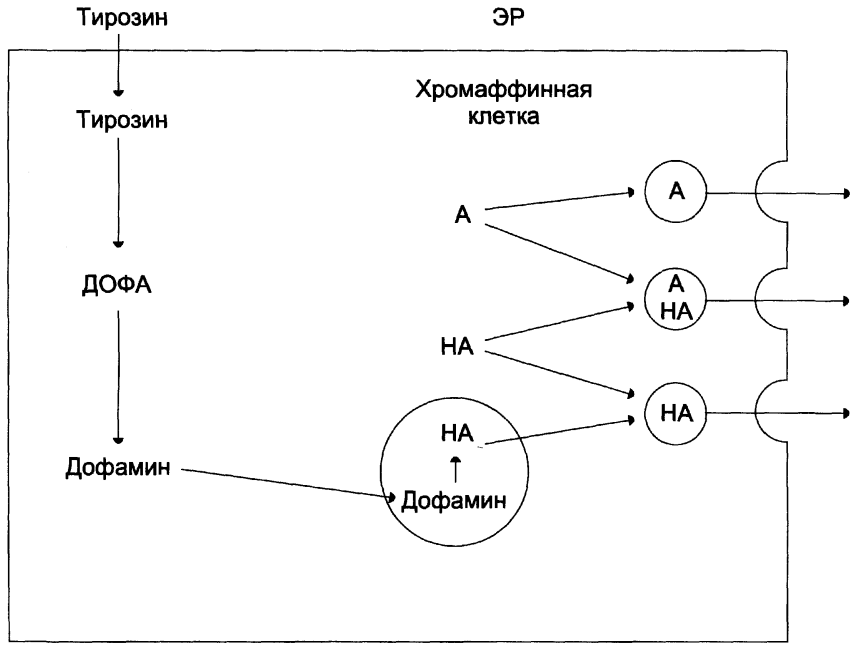


Рис. 11-22. Синтез и секреция катехоламинов. Биосинтез катехоламинов происходит в цитоплазме и гранулах клеток мозгового слоя надпочечников. В одних гранулах содержится адреналин, в других норадреналин, а в некоторых — оба гормона. При стимуляции содержимое гранул высвобождается во внеклеточную жидкость. А — адреналин; НА — норадреналин.

Адреналин взаимодействует как с α-, так и с β-рецепторами; норадреналин в физиологических концентрациях главным образом взаимодействует с α-рецепторами.

Взаимодействие гормона с β-рецепторами активирует аденилатциклазу, тогда как связывание с α_2-рецептором её ингибирует. При взаимодействии гормона с α_1-рецептором происходит активация фосфолипазы С и стимулируется инозитолфосфатный путь передачи сигнала (см. раздел 5).

Биологические эффекты адреналина и норадреналина затрагивают практически все функции организма и рассматриваются в соответствующих разделах. Общее во всех этих эффектах заключается в стимуляции процессов, необходимых для противостояния организма чрезвычайным ситуациям.

3. Патология мозгового вещества надпочечников

Основная патология мозгового вещества надпочечников — **феохромоцитома**, опухоль, образованная хромаффинными клетками и продуцирующая катехоламины. Клинически феохромоцитома проявляется повторяющимися приступами головной боли, сердцебиения, потливости, повышением АД и сопровождается характерными изменениями метаболизма (см. разделы 7, 8).

Ж. Гормоны поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта

Поджелудочная железа выполняет в организме две важнейшие функции: экзокринную и эндокринную. Экзокринная функция обеспечивает синтез и секрецию ферментов и ионов, необходимых для процессов пищеварения. Эндокринную функцию выполняют клетки островкового аппарата поджелудочной железы, которые секретируют гормоны, участвующие в регуляции многих процессов в организме.

В островковой части поджелудочной железы (островки Лангерханса) выделяют 4 типа клеток, секретирующих разные гормоны: A- (или α-) клетки секретируют глюкагон, B- (или β-) — инсулин, D- (или δ-) — соматостатин, F-клетки секретируют панкреатический полипептид.

1. Инсулин. Строение, синтез и секреция

Инсулин — полипептид, состоящий из двух полипептидных цепей. Цепь А содержит 21 аминокислотный остаток, цепь В — 30 аминокислотных остатков. Обе цепи соединены между собой двумя дисульфидными мостиками (рис. 11-23). Инсулин может существовать в нескольких формах: мономера, димера и гексамера. Гексамерная структура инсулина стабилизируется ионами цинка, который связывается остатками Гис в положении 10 В-цепи всех 6 субъединиц.

Молекула инсулина содержит также внутримолекулярный дисульфидный мостик, соединяющий шестой и одиннадцатый остатки в А-цепи. Инсулины некоторых животных имеют значительное сходство по первичной структуре с инсулином человека.

Бычий инсулин отличается от инсулина человека по трём аминокислотным остаткам, а инсулин свиньи отличается только на одну аминокислоту, которая представлена аланином вместо треонина на карбоксильном конце В-цепи.

В обеих цепях во многих положениях встречаются замены, не оказывающие влияния на биологическую активность гормона. Наиболее часто эти замены обнаруживаются в положениях 8, 9 и 10 цепи А.

В то же время в положениях дисульфидных связей, остатков гидрофобных аминокислот в С-концевых участках В-цепи и С- и N-концевых остатков А-цепи замены встречаются очень редко, что свидетельствует о важности этих участков для проявления биологической активности инсулина. Использование химических модификаций и замен аминокислот в этих участках позволили установить структуру активного цен-

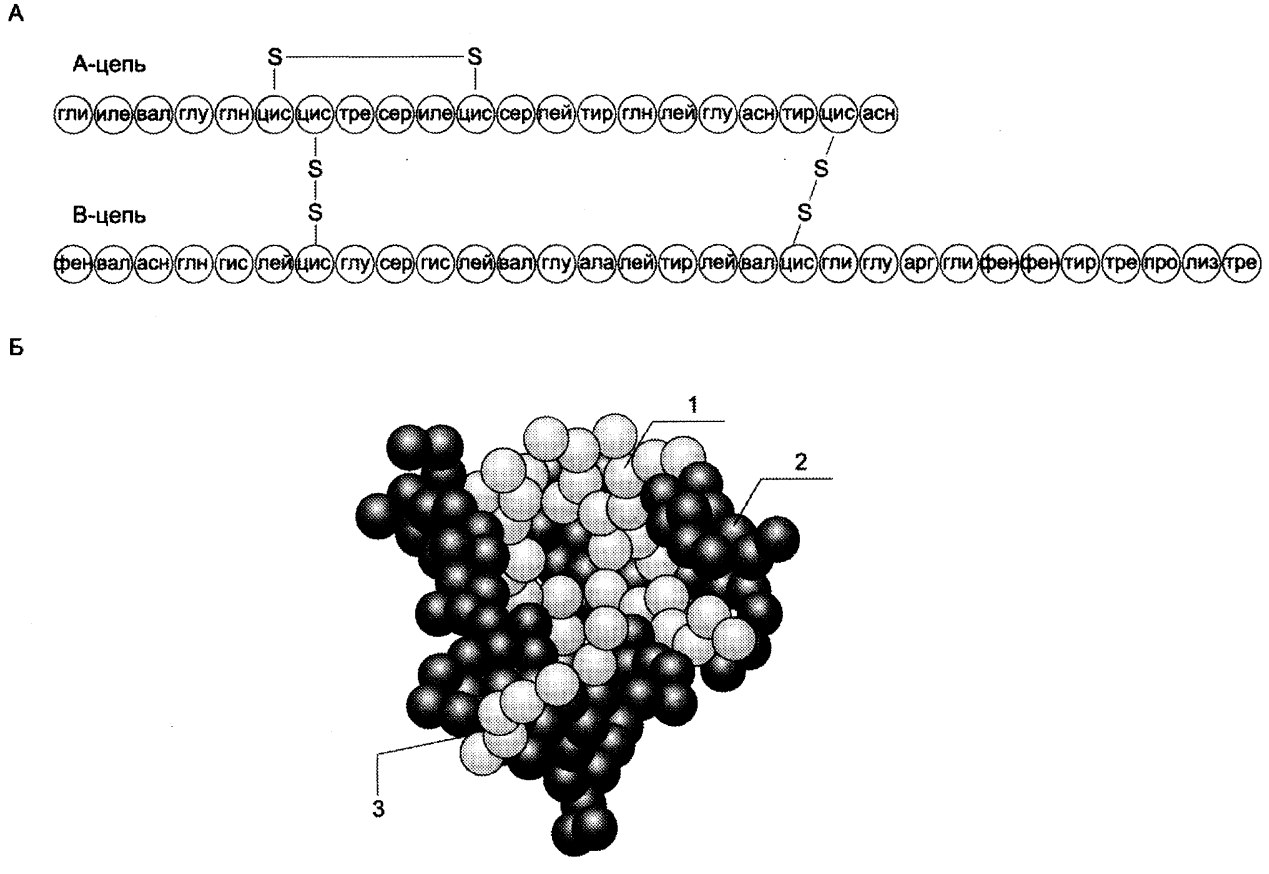


Рис. 11-23. Структура инсулина человека. А. Первичная структура инсулина. Б. Модель третичной структуры инсулина (мономер): 1 — А-цепь; 2 — В-цепь; 3 — участок связывания с рецептором.

тра инсулина, в формировании которого принимают участие остатки фенилаланина В-цепи в положениях 24 и 25 и N- и С-концевые остатки цепи А.

Биосинтез инсулина включает образование двух неактивных предшественников, препроинсулина и проинсулина, которые в результате последовательного протеолиза превращаются в активный гормон. Биосинтез препроинсулина начинается с образования сигнального пептида на полирибосомах, связанных с ЭР. Сигнальный пептид проникает в просвет ЭР и направляет поступление в просвет ЭР растущей полипептидной цепи. После окончания синтеза препроинсулина сигнальный пептид, включающий 24 аминокислотных остатка, отщепляется (рис. 11-24).

Проинсулин (86 аминокислотных остатков) поступает в аппарат Гольджи, где под действием специфических протеаз расщепляется в нескольких участках с образованием инсулина (51 аминокислотный остаток) и С-пептида, состоящего из 31 аминокислотного остатка.

Инсулин и С-пептид в эквимолярных количествах включаются в секреторные гранулы. В гранулах инсулин соединяется с цинком, образуя димеры и гексамеры. Зрелые гранулы сливаются с плазматической мембраной, и инсулин и С-пептид секретируются во внеклеточную жидкость в результате экзоцитоза. После секреции в кровь олигомеры инсулина распадаются. $T_{1/2}$ инсулина в плазме крови составляет 3–10 мин, С-пептида — около 30 мин.

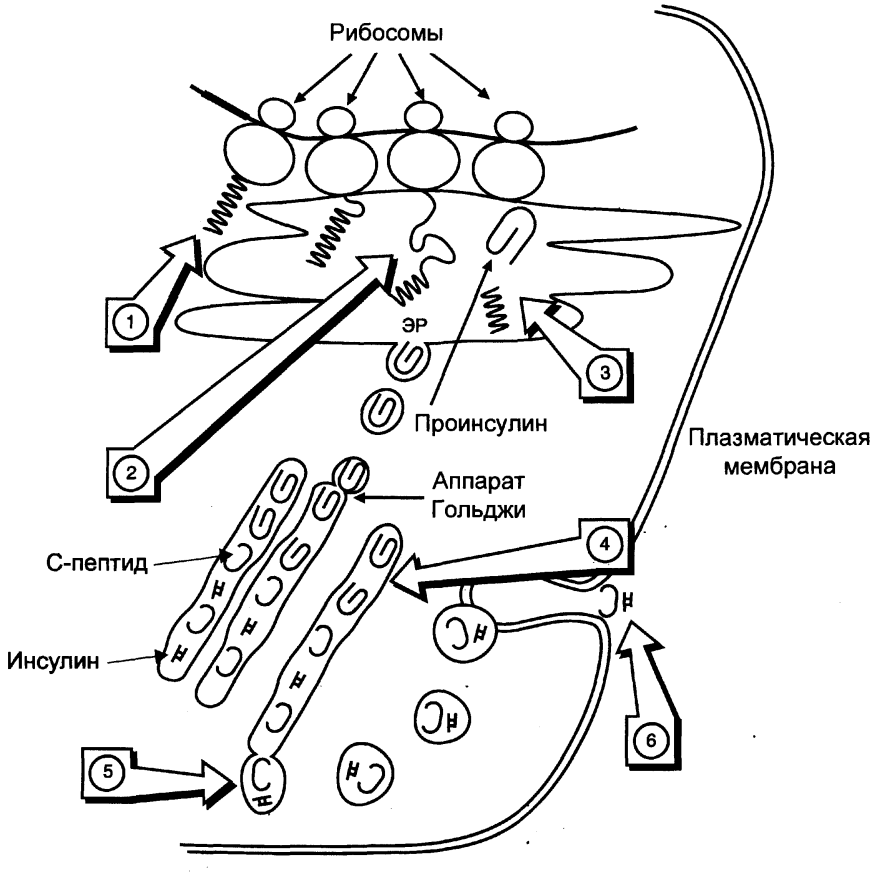


Рис. 11-24. Схема биосинтеза инсулина в β-клетках островков Лангерханса. ЭР — эндоплазматический ретикулум. 1 — образование сигнального пептида; 2 — синтез препроинсулина; 3 — отщепление сигнального пептида; 4 — транспорт проинсулина в аппарат Гольджи; 5 — превращение проинсулина в инсулин и С-пептид и включение инсулина и С-пептида в секреторные гранулы; 6 — секреция инсулина и С-пептида.

Разрушение инсулина происходит под действием фермента инсулиназы в основном в печени и в меньшей степени в почках.

Регуляция синтеза и секреции инсулина. Глюкоза — главный регулятор секреции инсулина, а β-клетки — наиболее важные глюкозо-чувствительные клетки в организме. Глюкоза регулирует экспрессию гена инсулина, а также генов других белков, участвующих в обмене основных энергоносителей. Действие глюкозы на скорость экспрессии генов может быть прямым, когда глюкоза непосредственно взаимодействует с транскрипционными факторами, или вторичным, через влияние на секрецию инсулина и глюкагона. При стимуляции глюкозой инсулин быстро освобождается из секреторных гранул, что сопровождается активацией транскрипции мРНК инсулина.

Синтез и секреция инсулина не являются строго сопряжёнными процессами. Синтез гормона стимулируется глюкозой, а секреция его является Ca^{2+}-зависимым процессом и при дефиците Ca^{2+} снижается даже в условиях высокой концентрации глюкозы, которая стимулирует синтез инсулина.

Потребление глюкозы β-клетками происходит в основном при участии ГЛЮТ-1 и ГЛЮТ-2, и концентрация глюкозы в клетках быстро уравнивается с концентрацией глюкозы в крови. В β-клетках глюкоза превращается в глюкозо-6-фосфат глюкокиназой, имеющей высокую K_m, вследствие чего скорость её фосфорилирования почти линейно зависит от концентрации глюкозы в крови. Фермент глюкокиназа — один из важнейших компонентов глюкозо-чувствительного аппарата β-клеток, в который, помимо глюкозы, вероятно, входят промежуточные продукты метаболизма глюкозы, цитратного цикла и, возможно, АТФ. Мутации глюкокиназы приводят к развитию одной из форм сахарного диабета.

На секрецию инсулина влияют другие гормоны. Адреналин через α_2-рецепторы тормозит секрецию инсулина даже на фоне стимуляции глюкозой, β-адренергические агонисты её стимулируют, вероятно, в результате повышения концентрации цАМФ. Этот механизм, полагают, лежит в основе действия гормонов ЖКТ, таких как секретин, холецистокинин и желудочный ингибирующий пептид (GIP), которые повышают секрецию инсулина. Высокие концентрации гормона роста, кортизола, эстрогенов также стимулируют секрецию инсулина.

2. Биологические функции инсулина

Инсулин — главный анаболический гормон. Он участвует в регуляции метаболизма, транспорта глюкозы, аминокислот, ионов, в синтезе белков. Инсулин влияет также на процессы репликации и транскрипции, участвуя таким образом в регуляции клеточной дифференцировки, пролиферации и трансформации клеток. Участие инсулина в регуляции метаболизма рассмотрено в соответствующих разделах (см. разделы 7, 8, 9). Влияние инсулина на ключевые ферменты метаболизма представлено в табл. 11-7.

Транспорт глюкозы в клетки происходит при участии специальных белков-переносчиков (см. раздел 7). Переносчик, регулируемый инсулином (ГЛЮТ-4), содержится только в мышцах и жировой ткани (инсулинзависимые ткани). В отсутствие инсулина ГЛЮТ-4 находятся в цитозольных везикулах. Под влиянием инсулина происходит транслокация везикул в плазматическую мембрану; при снижении концентрации гормона глюкотранспортёры возвращаются в цитозоль, и транспорт глюкозы прекращается.

В клетках печени инсулин индуцирует синтез глюкокиназы. В результате фосфорилирования концентрация свободной глюкозы в клетках поддерживается на низком уровне, что способствует её транспорту из крови по градиенту концентрации.

Влияние инсулина на метаболизм глюкозы. Инсулин стимулирует утилизацию глюкозы в клетках разными путями. Около 50% глюкозы используется в процессе гликолиза, 30–40% превращается в жиры и около 10% накапливается в форме гликогена. Общий результат стимуляции этих процессов — снижение концентрации глюкозы в крови.

Влияние инсулина на метаболизм глюкозы осуществляется путём повышения активности и количества ключевых ферментов гликолиза: глюкокиназы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы (см. раздел 7). В мышцах инсулин активирует гексокиназу II. В печени и мышцах под влиянием инсулина снижается концентрация цАМФ в результате активации фосфодиэстеразы. Кроме того, инсулин активирует фосфатазы, дефосфорилирующие гликогенсинтазу,

Таблица 11-7. Влияние инсулина на ключевые ферменты метаболизма

Печень	Мышцы	Жировая ткань
	Активация	
1. Фосфодиэстераза	1. Фосфодиэстераза	1. ЛП-липаза
2. Фосфофруктокиназа	2. Фосфофруктокиназа	2. Фосфофруктокиназа
3. Пируваткиназа	3. Пируваткиназа	3. Пируваткиназа
4. Пируватдегидрогеназный комплекс	4. Пируватдегидрогеназный комплекс	4. Ацетил-КоА-карбоксилаза
5. Фосфатаза гликогенсинтазы и гликогенфосфорилазы	5. Фосфатаза гликогенсинтазы	
6.Ацетил-КоА-карбоксилаза		
	Индукция	
1. Глюкокиназа		1. Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа
2. Цитратлиаза		2. Пальмитатсинтаза
3. Пальмитатсинтаза		
4. Пируваткиназа		
5. Ацетил-КоА-карбоксилаза		
6. Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа		
	Репрессия	
Фосфоенолпируваткарбоксикиназа		

в результате чего происходит активация синтеза гликогена и тормозится его распад.

Эффекты инсулина, обусловленные фосфорилированием и дефосфорилированием ферментов, проявляются очень быстро, в течение нескольких секунд и минут. Параллельно с активацией ферментов гликолиза инсулин тормозит глюконеогенез, репрессируя синтез ключевого фермента глюконеогенеза — фосфоенолпируваткарбоксикиназы (ФЕП карбоксикиназы).

Влияние инсулина на метаболизм жиров. В печени и жировой ткани инсулин стимулирует синтез жиров, обеспечивая получение для этого процесса необходимых субстратов (ацетил-КоА, α-глицерофосфат и NADPH) из глюкозы. В адипоцитах инсулин активирует ацетил КоА-карбоксилазу и ЛП-липазу и индуцирует синтез синтазы жирных кислот, ацетил-КоА-карбоксилазы и ЛП-липазы (см. раздел 8 и табл. 11-7). Инсулин в жировой ткани тормозит мобилизацию жиров. Он активирует фосфатазу, которая дефосфорилирует и тем самым инактивирует гормончувствительную ТАГ-липазу. Таким образом, под влиянием инсулина снижается концентрация жирных кислот, циркулирующих в крови (см. раздел 8). Инсулин стимулирует потребление нейтральных аминокислот в мышцах и синтез белков в печени, мышцах и сердце.

Инсулин стимулирует пролиферацию большого количества клеток в культуре тканей, а также, вероятно, может участвовать в регуляции роста *in vivo*. Для изучения регуляции роста чаще всего используют культуры фибробластов. В таких клетках инсулин усиливает способность фактора роста фибробластов (FGF), тромбоцитарного фактора роста (PDGF), фактора роста эпидермиса (EGF), простагландина ($PGF_2\alpha$), вазопрессина и аналогов цАМФ активировать размножение клеток, остановленных в фазе G.

3. Механизм действия инсулина

Действие инсулина начинается с его связывания со специфическим гликопротеиновым рецептором на поверхности клетки-мишени (см. раздел 5). Рецепторы инсулина обнаружены почти во всех типах клеток, но больше всего их в гепатоцитах и клетках жировой ткани. Так как концентрация инсулина в крови составляет ~10^{-10} М, количество рецепторов, связанных с инсулином, зависит от их количества на мембране клетки. Клетки с разным содержанием рецепторов реагируют по разному на одну и ту же концентрацию гормона.

Инсулиновый рецептор (IR) постоянно синтезируется и разрушается. $T_{1/2}$ рецептора состав-

ляет 7–12 ч. При высокой концентрации инсулина в плазме крови, например, при ожирении, число инсулиновых рецепторов может уменьшаться, и клетки-мишени становятся менее чувствительными к инсулину, что может быть одной из причин сахарного диабета II типа (см. ниже подраздел V).

Снижение чувствительности клеток к гормону (десенситизация) опосредуется 2 механизмами. Первый включает утрату рецепторов путём их интернализации. Комплекс инсулин-рецептор захватывается внутрь клетки эндоцитозом. В результате интернализации часть рецепторов подвергается разрушению в лизосомах, а часть возвращается в плазматическую мембрану. Второй механизм десенситизации — ковалентная модификация рецептора в результате фосфорилирования. Так, фосфорилирование IR по остаткам серина и треонина снижает его сродство к инсулину.

Рецептор инсулина относят к типу рецепторов, обладающих тирозинкиназной активностью (см. раздел 5). Стимулированное инсулином аутофосфорилирование β-субъединицы IR по остаткам тирозина приводит к фосфорилированию других внутриклеточных белков — субстратов инсулинового рецептора (IRS). Известно несколько таких субстратов: IRS-1, IRS-2, а также некоторые белки семейства STAT.

Главную роль в формировании ответной реакции клетки на инсулиновый сигнал играет IRS-1. IRS-1 — фосфопротеин, состоящий из более чем 1200 аминокислотных остатков. Часть остатков серина, тирозина и треонина фосфорилирована. При стимуляции инсулином степень фосфорилирования IRS-1 увеличивается и придаёт ему способность соединяться с другими цитозольными белками. Это приводит к активации нескольких сигнальных путей, представляющих каскад реакций активации специфических протеинкиназ. В результате активации протеинкиназ происходит фосфорилирование ферментов и факторов транскрипции, что составляет основу многочисленных эффектов инсулина.

Активация инсулином сигнального пути Ras. Белок, известный как Ras-белок, относят к семейству малых ГТФ-связывающих белков. В неактивном состоянии Ras-белок прикреплён к внутренней поверхности плазматической мембраны и связан с ГДФ. Стимуляция инсулином приводит к образованию активной ГТФ-связанной формы Ras (рис. 11-25).

Превращение Ras-белка в активную форму происходит при участии семейства белков, являющихся активаторами протеинкиназ и протеинкиназами и, так же, как Ras-белок, получившие свои названия от онкогенов (см. раздел 16). Один из субстратов инсулинового рецептора Shc участвует в образовании комплекса с небольшим цитозольным белком Grb. Образовавшийся комплекс взаимодействует с Ras-белком. В этот комплекс включаются другие белки: GAP (от англ. *GTP-ase activating factor* — фактор, активирующий ГТФ:азу), GEF (от англ. *GTP exchange factor* — фактор обмена ГТФ) и SOS (от англ. *son of sevenless*, названный по мутации гена у мушки дрозофилы). Два последних белка способствуют отделению ГДФ от Ras-белка и присоединению ГТФ. Активированный Ras соединяется с протеинкиназой Raf-1. Raf-1 в неактивном состоянии находится в цитозоле в соединении с шаперонами. Активация Raf-1 происходит в результате многоэтапного процесса, включающего присоединение белка к плазматической мембране, фосфорилирование и взаимодействие с рецептором инсулина. Активированная Raf-киназа стимулирует каскад реакций фосфорилирования и активации других протеинкиназ, в частности, митогенактивируемых протеинкиназ (МАПК). При участии Raf-1 сначала фосфорилируется и активируется киназа МАПК, которая, в свою очередь, фосфорилирует МАПК.

МАПК фосфорилирует многие цитоплазматические белки: протеинкиназу pp90S6, белки рибосом, фосфолипазу A_2, активаторы транскрипции (ПСАТ). Путь Ras активируется не только инсулином, но и многими другими гормонами и факторами роста. Многие компоненты этого пути являются продуктами протоонкогенов, мутации которых приводят к злокачественной трансформации клеток (см. раздел 16).

Эффекты инсулина могут проявляться в течение секунд и минут (транспорт веществ, фосфорилирование и дефосфорилирование белков, активация и ингибирование ферментов, синтез РНК) или через несколько часов (синтез ДНК, белков, рост клеток).

Активация фосфоинозитол-3-киназы (ФИ-3-киназы). Этот фермент катализирует фосфорили-

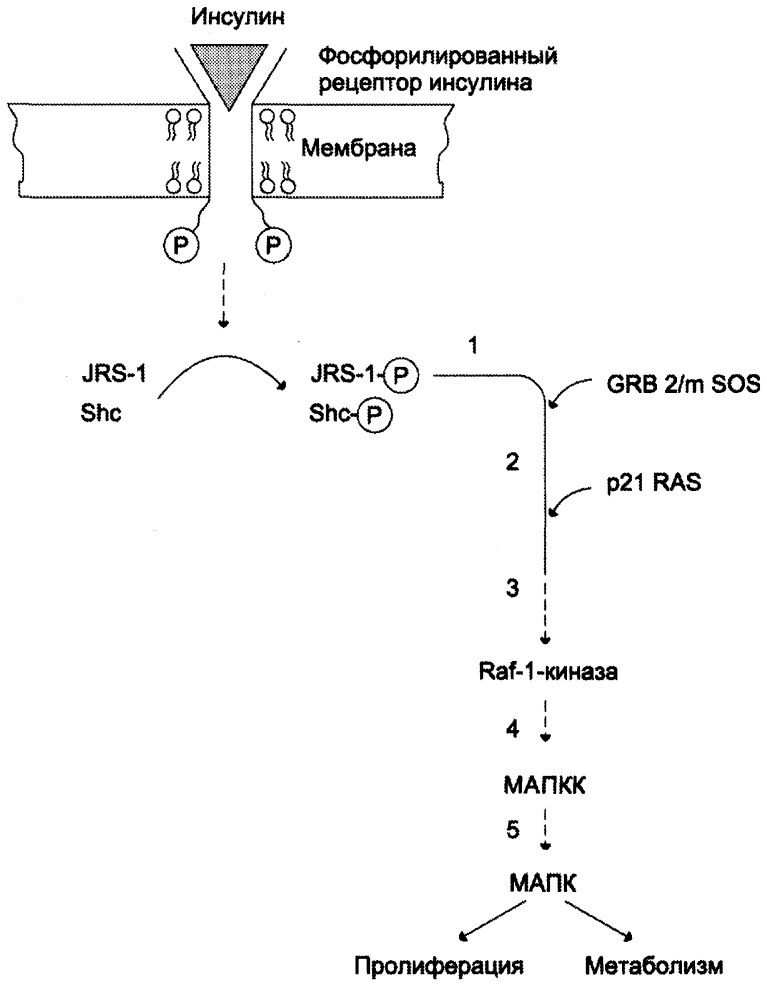


Рис. 11-25. Активация Ras-пути инсулином. 1 — GRB-2/mSOS — цитозольный белок нековалентно присоединяется к фосфорилированному рецептору инсулина при участии одного из субстратов инсулиновово рецептора — Shc; 2 — образовавшийся комплекс взаимодействует с белком Ras; в этот комплекс включаются также белки, которые обеспечивают отделение от Ras ГДФ и присоединение ГТФ; 3 — активированный Ras соединяется с протеинкиназой Raf-1, вследствие чего происходит активация Raf-1-киназы; 4, 5 — активированная Raf-1-киназа стимулирует каскад реакций фосфорилирования и активации других протеинкиназ, в частности, МАПКК и МАПК. МАПК фосфорилируют многие цитоплазматические белки и факторы транскрипции. МАПК — митогенактивируемые протеинкиназы.

рование ФИ, ФИ-4-фосфата и ФИ-4,5-бисфосфата в положении 3, образуя полифосфоинозитиды: ФИ-3-фосфат, ФИ-3,4-бисфосфат, ФИ-3,4,5-трифосфат, которые в разных клетках стимулируют мобилизацию Ca^{2+} и активацию специфических протеинкиназ (см. раздел 5). Активация ФИ-3-киназы стимулирует транслокацию ГЛЮТ-4 в плазматическую мембрану и таким образом ускоряет трансмембранный перенос глюкозы в клетки жировой и мышечной ткани. В жировой ткани активация ФИ-3-киназы приводит к торможению липолиза. Снижение скорости липолиза происходит в результате активации фосфодиэстеразы и уменьшения внутриклеточной концентрации цАМФ (рис. 11-26).

Активация гликогенсинтазы инсулином. Одной из протеинкиназ, активируемых через путь Ras, является протеинкиназа pp90S6. Этот фермент фосфорилирует протеинфосфатазу, связанную с гранулами гликогена. При фосфорилировании протеинфосфатаза активируется и дефосфорилирует киназу гликогенфосфорилазы, гликоген-

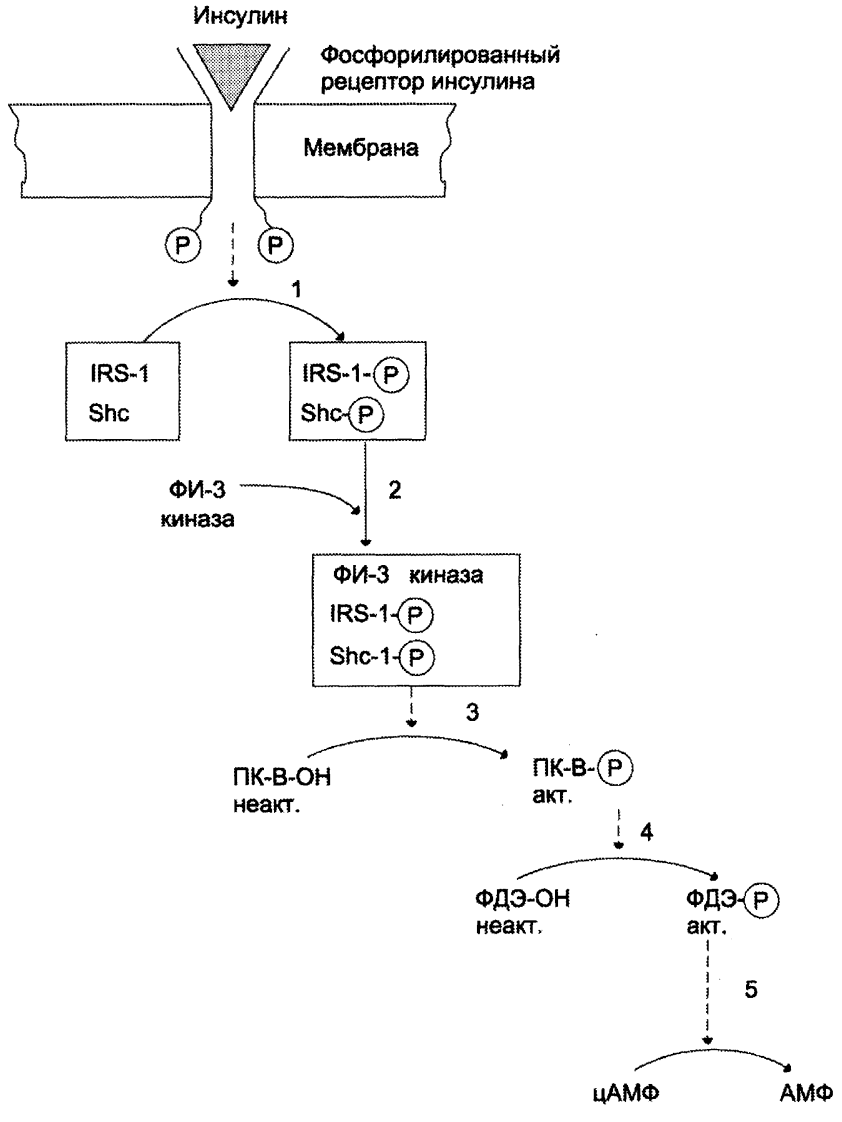


Рис. 11-26. Активация фосфодиэстеразы адипоцитов инсулином. 1 — фосфорилированный рецептор инсулина фосфорилирует субстраты инсулинового рецептора; 2 — образование комплекса фосфоинозитол-3-киназы (ФИ-3-киназы) с активированными субстратами инсулинового рецептора; 3 — активация протеинкиназы В (ПК-В); 4 — протеинкиназа В активирует фосфодиэстеразу (ФДЭ) путём фосфорилирования; 5 — ФДЭ катализирует реакцию превращения цАМФ в АМФ.

фосфорилазу и гликогенсинтазу. Дефосфорилированные формы киназыфосфорилазы и гликогенфосфорилазы неактивны, вследствие чего мобилизация гликогена замедляется. Гликогенсинтаза, напротив, активируется, и синтез гликогена ускоряется (рис. 11-27).

Инсулин влияет на скорость транскрипции более, чем 100 специфических мРНК в печени, жировой ткани, скелетных мышцах и сердце. Впервые влияние инсулина на транскрипцию генов было показано на примере фосфоенолпируваткарбоксикиназы — ключевого фермента глюконеогенеза, скорость синтеза которого в культуре клеток гепатомы снижалась в течение нескольких минут.

4. Глюкагон

Глюкагон — одноцепочечный полипептид, состоящий из 29 аминокислотных остатков. Биосинтез глюкагона происходит в α-клетках

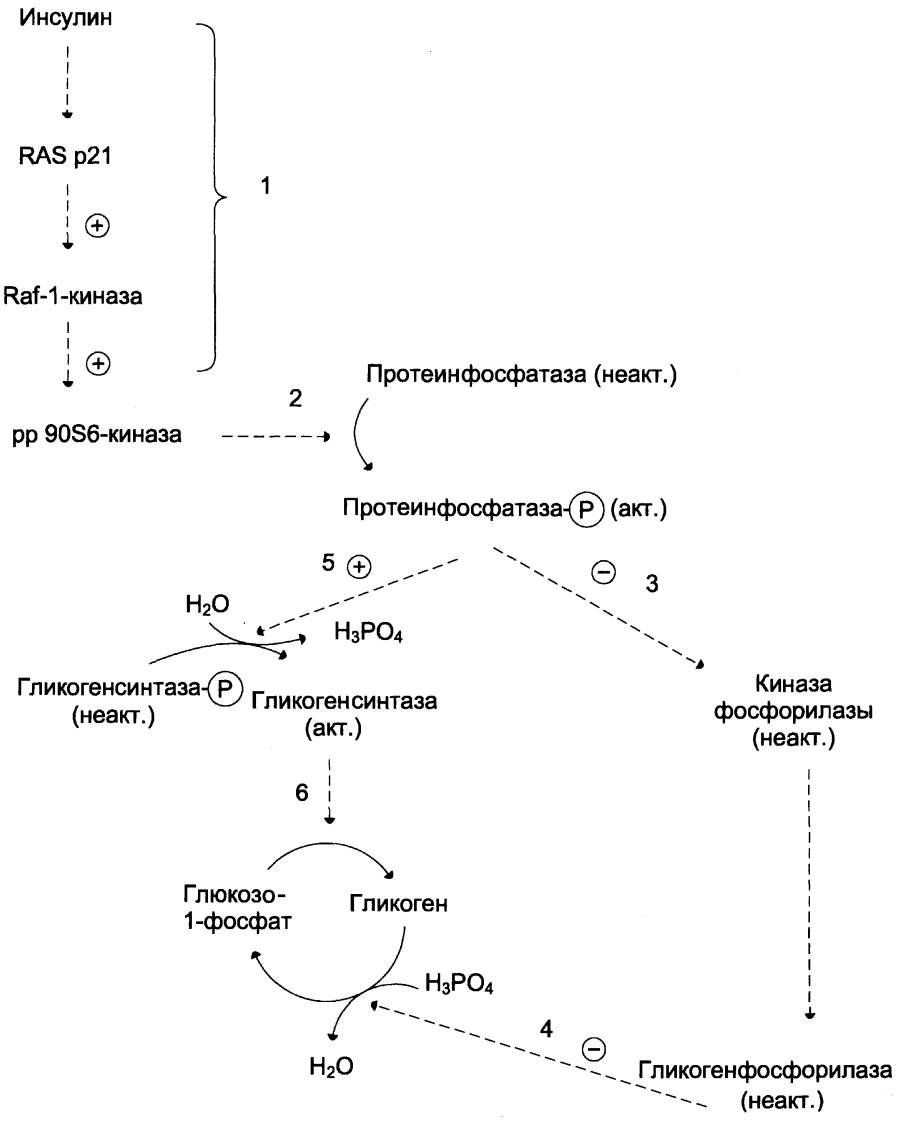


Рис. 11-27. Активация гликогенсинтазы инсулином. 1 — активация пути RAS; 2 — протеинкиназа pp90S6, активируемая инсулином через путь RAS (рис. 11-25), фосфорилирует протеинфосфатазу гранул гликогена, которая включает каскад реакций дефосфорилирования; 3 — инактивация киназыфосфорилазы и гликогенфосфорилазы; 4 — торможение мобилизации гликогена; 5 — активация гликогенсинтазы; 6 — стимуляция синтеза гликогена.

островков Лангерханса, в нейроэндокринных клетках кишечника и в некоторых отделах ЦНС. Неактивный предшественник проглюкагон в результате частичного протеолиза превращается в несколько пептидов. В клетках поджелудочной железы главный пептид — глюкагон; в клетках кишечника образуются глюкагоноподобные пептиды (от англ. *GLP — glucagon like peptide*): GLP-1, GLP-2, глицентин и другие. GLP-1 ингибирует секрецию глюкагона и стимулирует синтез и секрецию инсулина. Стимулятором секреции GLP-1 служит другой гормон — желудочный ингибирующий полипептид (от англ. *GIP — gastrial inhibitor peptide*), который синтезируется в клетках слизистой оболочки верхних отделов тонкого кишечника. Секреция GIP стимулируется при приёме пищи; наиболее сильным стимулятором служит глюкоза. На

секрецию глюкагона влияют и многие другие соединения, включая аминокислоты, жирные кислоты, кетоновые тела и нейромедиаторы. При приёме пищи, богатой углеводами, секреция глюкагона снижается. Белковая пища стимулирует секрецию инсулина и глюкагона; однако некоторые аминокислоты в большей степени влияют на секрецию одного из них. Например, аланин стимулирует секрецию глюкагона, но не инсулина.

В плазме крови глюкагон не связан с каким-либо транспортным белком. $T_{1/2}$ гормона составляет ~5 мин. В печени глюкагон быстро разрушается под действием специфических протеаз.

Эффекты глюкагона в основном противоположны эффектам инсулина. Основные клетки-мишени глюкагона — печень и жировая ткань. Связываясь с рецепторами на плазматической мембране клеток-мишеней, глюкагон повышает содержание цАМФ (см. раздел 5). В гепатоцитах это приводит к активации фосфорилазы гликогена и к снижению активности гликогенсинтазы. В результате ускоряется мобилизация гликогена. Фосфорилирование пируваткиназы и БИФ вызывает торможение гликолиза и ускорение глюконеогенеза. Кроме того, глюкагон стимулирует глюконеогенез, индуцируя синтез ферментов: глюкозо-6-фосфатазы, фосфоенолпируваткарбоксикиназы, фруктозо-1,6-бисфосфатазы (см. раздел 7). В клетках жировой ткани глюкагон через аденилатциклазный каскад активирует гормончувствительную ТАГ-липазу и стимулирует липолиз (см. раздел 8). Таким образом, в противоположность инсулину глюкагон стимулирует мобилизацию основных энергоносителей — углеводов и жиров.

5. Другие гормоны желудочно-кишечного тракта

Из тканей ЖКТ выделено более 10 биологически активных пептидов. Многие из них по механизму действия могут быть причислены к истинным гормонам, проявляющим эндокринный эффект. К ним относят гастрин, секретин, GIP, холецистокинин, мотилин, панкреатический полипептид и энтероглюкагон. Другие желудочно-кишечные пептиды обладают паракринным или нейроэндокринным действием: вазоактивный интестинальный пептид (VIP), соматостатин.

К особенностям эндокринной системы ЖКТ относят то, что её клетки рассеяны по разным отделам, а не собраны в отдельном органе. Многие желудочно-кишечные пептиды найдены в нервах ЖКТ, а также в клетках ЦНС. Кроме того, для пептидов ЖКТ характерно наличие множественных форм, имеющих структурное и функциональное сходство, что ограничивает возможности изучения их структуры и функции. Из главных желудочно-кишечных гормонов только секретин существует в единственной форме. Многие гормоны ЖКТ по сходству первичной структуры и функции могут быть отнесены к одному из 2 семейств.

Семейство гастрина объединяет гастрин и холецистокинин.

Семейство секретина объединяет секретин, глюкагон, GIP, VIP и глицентин.

Сравнительно мало известно о механизмах действия гормонов ЖКТ. На ацинарных клетках поджелудочной железы идентифицировано шесть разных классов рецепторов. Один из них для семейства гастрина функционирует при участии инозитолфосфатной системы; рецепторы секретина и VIP — компоненты аденилатциклазной системы. Биологическая роль основных гормонов ЖКТ рассматривается в курсе физиологии и в разделе 9.

IV. РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ОСНОВНЫХ ЭНЕРГОНОСИТЕЛЕЙ

Основные пищевые вещества (углеводы, жиры, белки) окисляются в организме с освобождением свободной энергии, которая используется в анаболических процессах и при осуществлении физиологических функций. Энергетическая ценность основных пищевых веществ выражается в килокалориях и составляет: для углеводов — 4 ккал/г, для жиров — 9 ккал/г, для белков — 4 ккал/г. Взрослому здоровому человеку в сутки требуется 2000–3000 ккал (8000–12 000 кДж) энергии.

При обычном ритме питания промежутки между приёмами пищи составляют 4–5 ч с 8–12-часовым ночным перерывом. Во время пищеварения и абсорбтивного периода (2–4 ч) основные энергоносители, используемые тканями (глюкоза, жирные кислоты, аминокислоты),

могут поступать непосредственно из пищеварительного тракта. В постабсорбтивном периоде и при голодании энергетические субстраты образуются в процессе катаболизма депонированных энергоносителей.

Изменения в потреблении энергоносителей и энергетических затратах координируются путём чёткой регуляции метаболических процессов в разных органах и системах организма, обеспечивающей энергетический гомеостаз.

Основную роль в поддержании энергетического гомеостаза играют гормоны **инсулин** и **глюкагон**, а также другие **контринсулярные гормоны** — адреналин, кортизол, йодтиронины и соматотропин. Инсулин и глюкагон играют главную роль в регуляции метаболизма при смене абсорбтивного и постабсорбтивного периодов и при голодании.

А. Абсорбтивный период

Абсорбтивный период характеризуется временным повышением концентрации глюкозы, аминокислот и жиров в плазме крови. Клетки поджелудочной железы отвечают на это повышение усилением секреции инсулина и снижением секреции глюкагона. Увеличение отношения инсулин/глюкагон вызывает ускорение использования метаболитов для запасания энергоносителей: происходит синтез гликогена, жиров и белков. Режим запасания включается после приёма пищи и сменяется режимом мобилизации запасов после завершения пищеварения. Тип метаболитов, которые потребляются, депонируются и экспортируются, зависит от типа ткани. Главные органы, связанные с изменениями потока метаболитов при смене режимов мобилизации и запасания энергоносителей, — печень, жировая ткань и мышцы (рис. 11-28).

1. Изменения метаболизма в печени в абсорбтивном периоде

После приёма пищи печень становится главным потребителем глюкозы, поступающей из пищеварительного тракта. Почти 60 из каждых 100 г глюкозы, транспортируемой портальной системой, задерживается в печени. Увеличение потребления печенью глюкозы — не результат ускорения её транспорта в клетки (транспорт глюкозы в клетки печени не стимулируется инсулином), а следствие ускорения метаболических путей, в которых глюкоза превращается в депонируемые формы энергоносителей: гликоген и жиры.

При повышении концентрации глюкозы в гепатоцитах происходит активация глюкокиназы, превращающей глюкозу в глюкозо-6-фосфат. Глюкокиназа имеет высокое значение K_m для глюкозы, что обеспечивает высокую скорость фосфорилирования при высоких концентрациях глюкозы. Кроме того, глюкокиназа не ингибируется глюкозо-6-фосфатом (см. раздел 7). Инсулин индуцирует синтез мРНК глюкокиназы. Повышение концентрации глюкозо-6-фосфата в гепатоцитах обусловливает ускорение синтеза гликогена. Этому способствуют одновременная инактивация гликогенфосфорилазы и активация гликогенсинтазы. Под влиянием инсулина в гепатоцитах ускоряется гликолиз в результате повышения активности и количества ключевых ферментов: глюкокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы. В то же время происходит торможение глюконеогенеза в результате инактивации фруктозо-1,6-бисфосфатазы и снижения количества фосфоенолпируваткарбоксикиназы — ключевых ферментов глюконеогенеза. Повышение концентрации глюкозо-6-фосфата в гепатоцитах в абсорбтивном периоде сочетается с активным использованием NADPH для синтеза жирных кислот, что способствует стимуляции пентозофосфатного пути.

Ускорение синтеза жирных кислот обеспечивается доступностью субстратов (ацетил-КоА и NADPH), образующихся при метаболизме глюкозы, а также активацией и индукцией ключевых ферментов синтеза жирных кислот (см. раздел 8 и табл. 11-7).

В абсорбтивном периоде в печени ускоряется синтез белков. Однако количество аминокислот, поступающих в печень из пищеварительного тракта, превышает возможности их использования для синтеза белков и других азотсодержащих соединений. Излишек аминокислот либо поступает в кровь и транспортируется в другие ткани, либо дезаминируется с последующим включением безазотистых остатков в общий путь катаболизма (см. раздел 9).

2. Изменения метаболизма в адипоцитах

Основная функция жировой ткани — запасание энергоносителей в форме триацилглицеролов. Под влиянием инсулина ускоряется транспорт глюкозы в адипоциты. Повышение

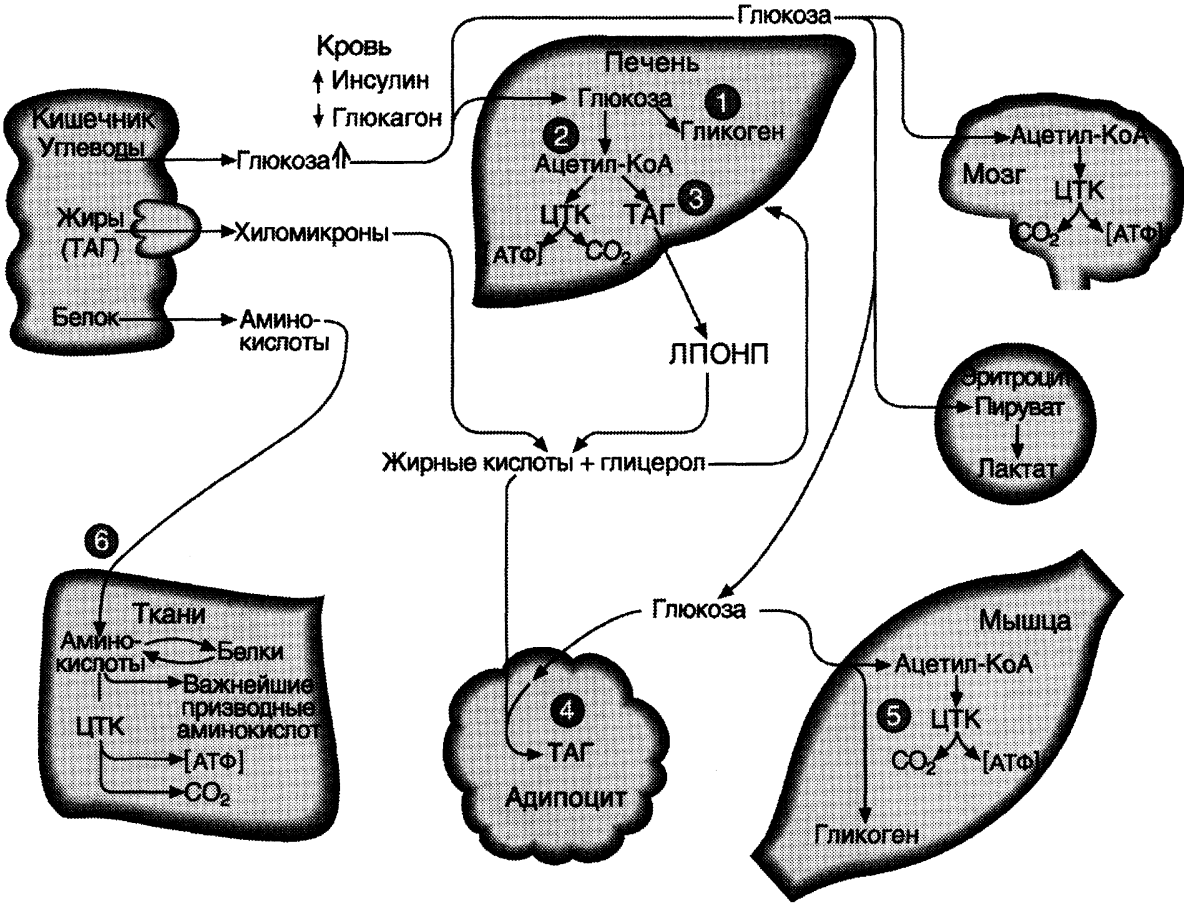


Рис. 11-28. Пути использования основных энергоносителей в абсорбтивном периоде. 1 — биосинтез гликогена в печени; 2 — гликолиз; 3 — биосинтез ТАГ в печени; 4 — биосинтез ТАГ в жировой ткани; 5 — биосинтез гликогена в мышцах; 6 — биосинтез белков в разных тканях, в том числе в печени.

внутриклеточной концентрации глюкозы и активация ключевых ферментов гликолиза обеспечивают образование ацетил-КоА и глицерол-3-фосфата, необходимых для синтеза ТАГ. Стимуляция пентозофосфатного пути обеспечивает образование NADPH, необходимого для синтеза жирных кислот. Однако биосинтез жирных кислот *de novo* в жировой ткани человека протекает с высокой скоростью только после предшествующего голодания. При нормальном ритме питания для синтеза ТАГ используются в основном жирные кислоты, поступающие из ХМ и ЛПОНП под действием ЛП-липазы (см. раздел 8). Вместе с тем при увеличении отношения инсулин/глюкагон гормончувствительная ТАГ-липаза находится в дефосфорилированной неактивной форме, и процесс липолиза тормозится.

3. Изменение метаболизма в мышцах в абсорбтивном периоде

В абсорбтивном периоде под влиянием инсулина ускоряется транспорт глюкозы в клетки мышечной ткани. Глюкоза фосфорилируется и окисляется для обеспечения клетки энергией, а также используется для синтеза гликогена. Жирные кислоты, поступающие из ХМ и ЛПОНП, в этот период играют незначительную роль в энергетическом обмене мышц. Поток аминокислот в мышцы и биосинтез белков также увеличиваются под влиянием инсулина, особенно после приёма белковой пищи.

Б. Постабсорбтивный период

Постабсорбтивным состоянием называют период после завершения пищеварения до следующего приёма пищи. Если пища не принимается в течение суток и более, то это состояние определяют как голодание. Типичным постабсорбтивным периодом считают состояние после 12-часового ночного перерыва в приёме пищи. В начале постабсорбтивного периода концентрация глюкозы в крови снижается, вследствие чего снижается секреция инсулина и повышается концентрация глюкагона. При снижении индекса инсулин/глюкагон ускоряются процессы мобилизации депонированных энергоносителей (рис. 11-29).

В постабсорбтивном периоде изменения метаболизма направлены, главным образом, на поддержание концентрации в крови глюкозы, которая служит основным энергетическим субстратом для мозга и единственным источником энергии для эритроцитов. Основные изменения метаболизма в этот период происходят в печени и жировой ткани.

1. Изменения метаболизма в печени

В печени прежде всего ускоряется мобилизация гликогена (см. раздел 7). Однако запасы гликогена в печени истощаются в течение 18–24 ч голодания. Главным источником глюкозы по мере исчерпания запасов гликогена становится глюконеогенез, который начинает ускоряться через

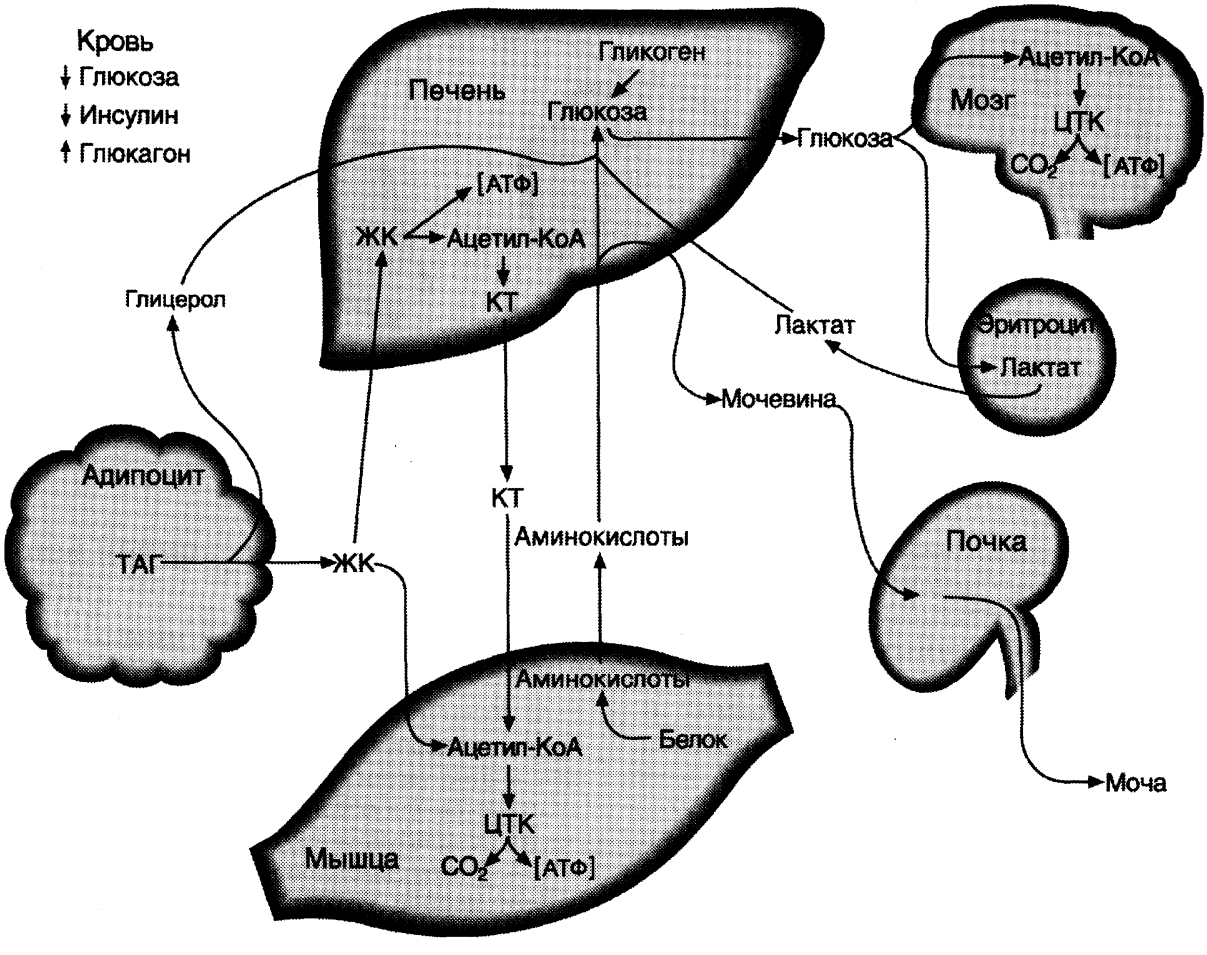


Рис. 11-29. Изменения метаболизма основных энергоносителей при смене абсорбтивного состояния на постабсорбтивное. КТ — кетоновые тела; ЖК — жирные кислоты.

4–6 ч после последнего приёма пищи. Субстратами для синтеза глюкозы служат глицерол, аминокислоты и лактат. При высокой концентрации глюкагона скорость синтеза жирных кислот снижается вследствие фосфорилирования и инактивации ацетил-КоА-карбоксилазы, а скорость β-окисления возрастает. Вместе с тем увеличивается снабжение печени жирными кислотами, которые транспортируются из жировых депо. Ацетил-КоА, образующийся при окислении жирных кислот, используется в печени для синтеза кетоновых тел.

2. Изменения метаболизма в жировой ткани

В жировой ткани при повышении концентрации глюкагона снижается скорость синтеза ТАГ и стимулируется липолиз. Стимуляция липолиза — результат активации гормончувствительной ТАГ-липазы адипоцитов под влиянием глюкагона. Жирные кислоты становятся важными источниками энергии в печени, мышцах и жировой ткани.

Таким образом, в постабсорбтивном периоде концентрация глюкозы в крови поддерживается на уровне 80–100 мг/дл, а уровень жирных кислот и кетоновых тел возрастает.

В. Изменение гормонального статуса и метаболизма при голодании

Голодание может быть кратковременным, в течение суток (I фаза), продолжаться в течение недели (II фаза) или нескольких недель (III фаза).

В отсутствие пищи в крови снижается уровень глюкозы, аминокислот и триацилглицеролов. Инсулин-глюкагоновый индекс снижается, и повышается концентрация контринсулярных гормонов, в первую очередь кортизола. В этих условиях возникает состояние, для которого характерно преобладание процессов катаболизма жиров, гликогена и белков на фоне общего снижения скорости метаболизма. Под влиянием контринсулярных гормонов в этот период происходит обмен субстратами между печенью, жировой тканью, мышцами и мозгом. Этот обмен служит двум целям: 1) поддержанию концентрации глюкозы в крови для обеспечения глюкозозависимых тканей (мозга, эритроцитов); 2) мобилизации других источников энергии, в первую очередь жиров, для обеспечения энергией всех других тканей. Вследствие переключения метаболизма на режим мобилизации энергоносителей даже после 5–6 нед голодания концентрация глюкозы в крови составляет не менее 60 мг/дл.

1. Обмен углеводов

Так как за счёт мобилизации гликогена обеспечивается только кратковременное голодание, основным источником глюкозы при длительном голодании служит глюконеогенез, а основными субстратами глюконеогенеза — аминокислоты, лактат и глицерол. При низкой концентрации инсулина глюкоза используется только инсулиннезависимыми тканями, в основном мозгом, эритроцитами. Обеспечение энергетических потребностей других тканей происходит за счёт жирных кислот и кетоновых тел.

2. Обмен жиров

Жирные кислоты, образующиеся в процессе мобилизации жиров в жировых депо, становятся основными источниками энергии для большинства органов в первый период голодания. Во II фазе мобилизация жиров продолжается, и концентрация жирных кислот в крови увеличивается в 3–4 раза по сравнению с постабсорбтивным состоянием. Синтез кетоновых тел начинается в первые дни голодания. Во II фазе голодания скорость синтеза кетоновых тел значительно возрастает. Концентрация кетоновых тел в крови в этот период может достигать 20–30 мг/дл (в норме 1–3 мг/дл). Используются кетоновые тела, в основном, в мышцах. В этот период голодания часть энергетических потребностей мозга обеспечивается кетоновыми телами, а скорость окисления кетоновых тел в мышцах снижается.

3. Обмен белков

В течение нескольких первых дней голодания быстро распадаются мышечные белки — основной источник субстратов для глюконеогенеза. При голодании более 3 нед скорость катаболизма белков стабилизируется и составляет примерно 20 г в сутки. В этот период увеличивается потребление мозгом кетоновых тел, а скорость глюконеогенеза снижается. Снижение скорости глюконеогенеза способствует сбережению белков. В этот период и для мозга кетоновые тела становятся значительным источником энергии. Однако для окисления кетоновых тел необходимы оксалоацетат и другие компоненты ЦТК. В норме они образуются из глюкозы и аминокислот, а при

голодании — только из аминокислот. При продолжительности голодания более 4 недель развиваются атрофические процессы, в результате которых происходит потеря значительного количества белков. В теле человека массой 70 кг масса белков составляет 15 кг. При потере 1/3—1/2 белков наступает смерть.

V. ИЗМЕНЕНИЯ ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА И МЕТАБОЛИЗМА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Сахарный диабет — заболевание, возникающее вследствие абсолютного или относительного дефицита инсулина.

А. Основные клинические формы сахарного диабета

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, сахарный диабет классифицируют с учётом различия генетических факторов и клинического течения на две основные формы: диабет I типа — инсулинзависимый (ИЗСД), и диабет II типа — инсулиннезависимый (ИНСД).

1. Инсулинзависимый сахарный диабет

Инсулинзависимый сахарный диабет — заболевание, вызываемое разрушением β-клеток островков Лангерханса поджелудочной железы.

Деструкция β-клеток — результат аутоиммунных реакций. В аутоиммунной реакции принимают участие лимфоциты и макрофаги (моноциты). Эти клетки продуцируют цитокины, которые либо непосредственно повреждают β-клетки, либо опосредуют клеточные реакции против β-клеток.

Провоцировать возникновение диабета I типа может вирусная инфекция, вызывающая деструкцию b-клеток. К таким вирусам, называемым β-цитотропными, относят вирусы оспы, краснухи, кори, цитомегаловирус, эпидемического паротита, Коксаки, аденовирус. Некоторые β-цитотропные вирусы вызывают лизис β-клеток.

Известны некоторые токсические вещества, например, такие как производные нитрозомочевины и другие нитро- или аминосодержащие соединения, избирательно поражающие β-клетки и индуцирующие аутоиммунную реакцию. Кроме того, ИЗСД может быть результатом частичного генетически обусловленного дефекта системы иммунологического надзора и сочетаться с другими аутоиммунными заболеваниями.

На долю ИЗСД приходится примерно 25—30% всех случаев сахарного диабета. Как правило, разрушение β-клеток происходит медленно, и начало заболевания не сопровождается нарушениями метаболизма. Когда погибает 80—95% клеток, возникает абсолютный дефицит инсулина, и развиваются тяжёлые метаболические нарушения. ИЗСД поражает в большинстве случаев детей, подростков и молодых людей, но может проявиться в любом возрасте (начиная с годовалого).

2. Инсулинонезависимый сахарный диабет

Инсулинонезависимый сахарный диабет — общее название нескольких заболеваний, развивающихся в результате относительного дефицита инсулина, возникающего вследствие нарушения секреции инсулина, нарушения превращения проинсулина в инсулин, повышения скорости катаболизма инсулина, а также повреждения механизмов передачи инсулинового сигнала в клетки-мишени (например, дефекта рецептора инсулина, повреждения внутриклеточных посредников инсулинового сигнала и др.). ИНСД поражает людей, как правило, старше 40 лет. Сахарный диабет II типа характеризуется высокой частотой семейных форм. Риск ИНСД у ближайших родственников больного достигает 50%, тогда как при ИЗСД он не превышает 10%. Заболевание поражает преимущественно жителей развитых стран, особенно горожан.

Возможными причинами ИНСД могут быть: образование антител к рецепторам инсулина; генетический дефект пострецепторного аппарата инсулинзависимых тканей; нарушения регуляции секреции инсулина. К факторам, определяющим развитие и клиническое течение болезни, относят ожирение, неправильный режим питания, малоподвижный образ жизни, стресс.

Мутации генов, контролирующих секрецию инсулина, энергетический обмен в β-клетках и обмен глюкозы в клетках-мишенях инсулина, приводят к возникновению нескольких форм ИНСД с аутосомно-доминантным наследованием.

Основным провоцирующим фактором инсулинонезависимого диабета служит ожирение.

Этот тип диабета часто сочетается с гиперинсулинемией, что способствует ожирению. Таким образом, ожирение, с одной стороны, важнейший фактор риска, а с другой — одно из ранних проявлений сахарного диабета.

Б. Изменения метаболизма при сахарном диабете

При сахарном диабете, как правило, соотношение инсулин/глюкагон снижено. При этом ослабевает стимуляция процессов депонирования гликогена и жиров, и усиливается мобилизация запасов энергоносителей. Печень, мышцы и жировая ткань даже после приёма пищи функционируют в режиме постабсорбтивного состояния.

1. Симптомы сахарного диабета

Для всех форм диабета характерно повышение концентрации глюкозы в крови — **гипергликемия**. После приёма пищи концентрация глюкозы может достигать 300–500 мг/дл и сохраняется на высоком уровне в постабсорбтивном периоде, т.е. снижается толерантность к глюкозе. Снижение толерантности к глюкозе наблюдают в случаях скрытой (латентной) формы сахарного диабета. В этих случаях у людей отсутствуют жалобы и клинические симптомы, характерные для сахарного диабета, а концентрация глюкозы в крови натощак соответствует норме. Однако использование провокационных проб (например, сахарной нагрузки) выявляет снижение толерантности к глюкозе (рис. 11-30).

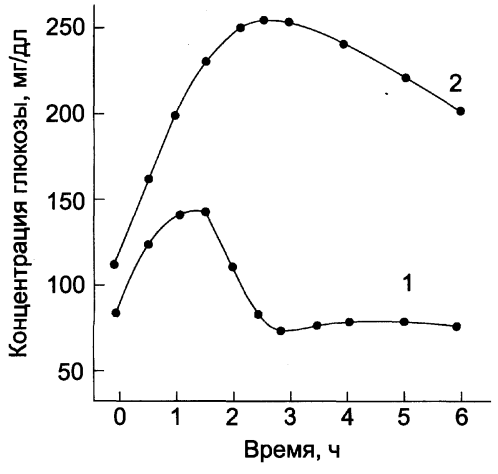


Рис. 11-30. Изменение толерантности к глюкозе у больных скрытой формой сахарного диабета. Определение толерантности к глюкозе используют для диагностики сахарного диабета. Обследуемый принимает раствор глюкозы из расчёта 1 г на 1 кг массы тела (сахарная нагрузка). Концентрацию глюкозы в крови измеряют в течение 2–3 ч с интервалами в 30 мин. 1 — у здорового человека; 2 — у больного сахарным диабетом.

Повышение концентрации глюкозы в плазме крови обусловлено снижением скорости использования глюкозы тканями вследствие недостатка инсулина или снижения биологического действия инсулина в тканях-мишенях.

При дефиците инсулина уменьшается количество белков-переносчиков глюкозы (ГЛЮТ-4) на мембранах инсулинзависимых клеток (жировой ткани и мышц). В мышцах и печени глюкоза не депонируется в виде гликогена, в жировой ткани уменьшается скорость синтеза и депонирования жиров. Кроме того, при снижении инсулин-глюкагонового индекса активируется глюконеогенез из аминокислот, глицерола и лактата. Повышение концентрации глюкозы в крови при сахарном диабете превышает концентрационный почечный порог, что становится причиной выделения глюкозы с мочой (**глюкозурия**). В норме проксимальные канальцы почек реабсорбируют всю фильтрующуюся в клубочках глюкозу, если её уровень не превышает 8,9 ммоль/л (160 мг/дл).

К характерным признакам сахарного диабета относят также повышение концентрации в крови кетоновых тел — **кетонемия**. При низком соотношении инсулин/глюкагон жиры не депонируются, а ускоряется их катаболизм, так как гормончувствительная липаза в жировой ткани находится в фосфорилированной активной форме. Концентрация неэтерифицированных жирных кислот в крови повышается. Печень захватывает жирные кислоты, окисляет их до ацетил-КоА, который, в свою очередь, превращается в β-гидроксимасляную и ацетоуксусную кислоты. В тканях ацетоацетат частично декарбоксилируется до ацетона, запах которого исходит от больных сахарным диабетом и ощущается даже на расстоянии. Увеличение концентрации кетоновых тел в крови (выше 20 мг/дл, иногда до 100 мг/дл) приводит к кетонурии. Накопление кетоновых тел снижает буферную ёмкость крови и вызывает **ацидоз**.

Ещё один характерный признак сахарного диабета — повышенный уровень в крови липопротеинов (в основном, ЛПОНП) — гиперлипопротеинемия. Пищевые жиры не депонируются в жировой ткани вследствие ослабления процессов запасания, а поступают в печень, где частично превращаются в триацилглицеролы, которые транспортируются из печени в составе ЛПОНП.

При сахарном диабете дефицит инсулина приводит к снижению скорости синтеза белков в организме и усилению распада белков. Это вызывает повышение концентрации аминокислот в крови. Аминокислоты поступают в печень и дезаминируются. Безазотистые остатки гликогенных аминокислот включаются в глюконеогенез, что ещё более усиливает гипергликемию. Образующийся при этом аммиак вступает в орнитиновый цикл, что приводит к увеличению концентрации мочевины в крови и, соответственно, в моче — **азотемия** и **азотурия**.

Высокие концентрации глюкозы, кетоновых тел, мочевины требуют усиленной экскреции их из организма. Поскольку концентрационная способность почек ограничена, резко увеличивается выделение большого количества воды, в результате чего может наступить обезвоживание организма. Выделение мочи у больных возрастает в несколько раз и в некоторых случаях достигает 8–9 л в сутки, но чаще не превышает 3–4 л — **полиурия**. Потеря воды вызывает постоянную жажду — **полидипсия**.

2. Острые осложнения сахарного диабета. Механизмы развития диабетической комы

Нарушения обмена углеводов, жиров и белков при сахарном диабете могут приводить к развитию коматозных состояний (острые осложнения). Диабетическая кома проявляется в резком нарушении всех функций организма с потерей сознания. Основные предшественники диабетической комы — ацидоз и дегидратация тканей (рис. 11-31).

Параллельно кетоацидозу при декомпенсации диабета развивается нарушение водно-электролитного обмена. В его основе лежит гипергликемия, сопровождающаяся повышением осмотического давления в сосудистом русле. Для сохранения осмолярности начинается компенсаторное перемещение жидкости из клеток и внеклеточного пространства в сосудистое русло. Это ведёт к потере тканями воды и электролитов, прежде всего ионов Na^+, K^+, Cl^-, HCO_3. В результате развиваются тяжёлая клеточная дегидратация и дефицит внутриклеточных ионов (прежде всего K^+), затем возникает общая дегидратация. Это приводит к снижению периферического кровообращения, уменьшению мозгового и почечного кровотока и гипоксии. Диабетическая кома развивается медленно, в течение нескольких дней, но иногда может возникнуть и в течение нескольких часов. Первыми признаками могут быть тошнота, рвота, заторможенность. АД у больных снижено.

Коматозные состояния при сахарном диабете могут проявляться в трёх основных формах: кетоацидотической, гиперосмолярной и лактоацидотической. Для кетоацидотической комы характерны выраженный дефицит инсулина, кетоацидоз, полиурия, полидипсия. Гипергликемия (20–30 ммоль/л), обусловленная инсулиновой недостаточностью, сопровождается большими потерями жидкости и электролитов, дегидратацией и гиперосмоляльностью плазмы. Общая концентрация кетоновых тел достигает 100 мг/дл и выше.

При гиперосмолярной коме наблюдают чрезвычайно высокие уровни глюкозы в плазме крови, полиурию, полидипсию, всегда проявляется тяжёлая дегидратация. Предполагают, что у большинства больных гипергликемия обусловлена сопутствующим нарушением функции почек. Кетоновые тела в сыворотке крови обычно не определяются.

При лактоацидотической коме преобладают гипотония, снижение периферического кровообращения, гипоксия тканей, приводящая к смещению метаболизма в сторону анаэробного гликолиза, что обусловливает повышение концентрации молочной кислоты в крови (лактоацидоз).

Разные варианты диабетической комы в чистом виде практически не встречаются. Их возникновение может быть обусловлено разными факторами, например инфекционными заболеваниями, травмами, хирургическими вмешательствами, токсическими соединениями и др.

3. Поздние осложнения сахарного диабета

Главная причина поздних осложнений сахарного диабета — гипергликемия. Гипергликемия приводит к повреждению кровеносных сосудов

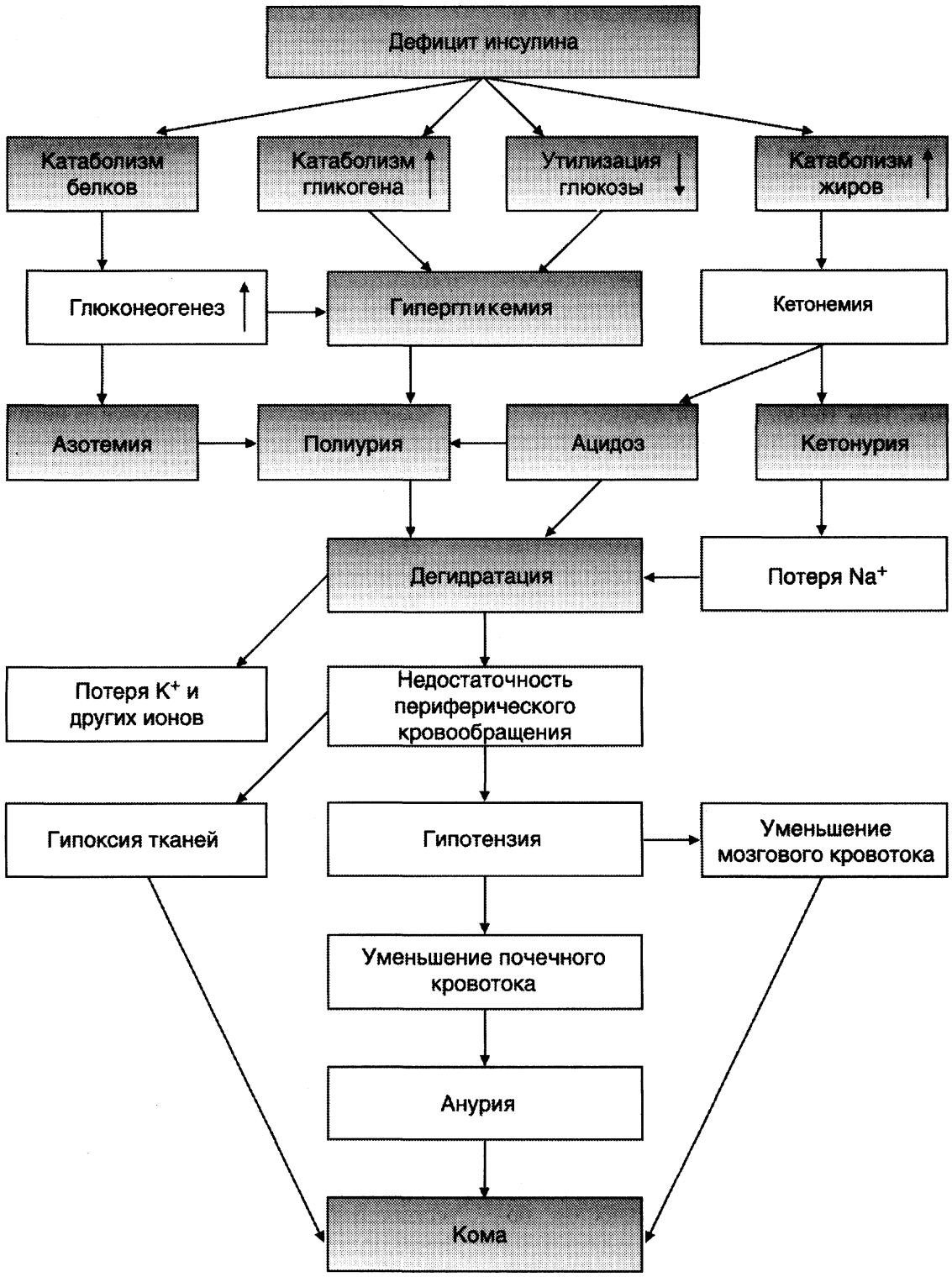


Рис. 11-31. Изменение метаболизма при сахарном диабете и причины диабетической комы.

и нарушению функций различных тканей и органов.

Одним из основных механизмов повреждения тканей при сахарном диабете является **гликозилирование белков**, приводящее к изменению их конформации и функций. Некоторые белки в норме содержат углеводные компоненты, причём образование таких гликопротеинов протекает ферментативно (например, образование гликопротеиновых гормонов аденогипофиза). Однако в организме человека может происходить и неферментативное взаимодействие глюкозы со свободными аминогруппами белков — неферментативное гликозилирование белков. В тканях здоровых людей эта реакция протекает медленно. При гипергликемии процесс гликозилирования ускоряется. Степень гликозилирования белков зависит от скорости их обновления. В медленно обменивающихся белках накапливается больше изменений. К одним из первых признаков сахарного диабета относят увеличение в 2–3 раза количества гликозилированного гемоглобина (норма H_bA_{1C} 5,8–7,2%). Другим примером медленно обменивающихся белков служат кристаллины — белки хрусталика. При гликозилировании кристаллины образуют многомолекулярные агрегаты, увеличивающие преломляющую способность хрусталика. Прозрачность хрусталика уменьшается, возникает его помутнение, или **катаракта**.

К медленно обменивающимся белкам относятся белки межклеточного матрикса, базальных мембран. Утолщение базальных мембран, одно из характерных осложнений сахарного диабета, приводит к развитию диабетических ангиопатий.

Причиной многих поздних осложнений сахарного диабета также служит **повышение скорости превращения глюкозы в сорбитол** (см. раздел 7).

- Реакция превращения глюкозы в шестиатомный спирт (сорбитол) катализируется ферментом альдозоредуктазой. Сорбитол не используется в других метаболических путях, а скорость его диффузии из клеток невелика. У больных сахарным диабетом сорбитол накапливается в сетчатке и хрусталике глаза, клетках клубочков почек, шванновских клетках, в эндотелии.
- Сорбитол в высоких концентрациях токсичен для клеток. Его накопление в нейронах приводит к увеличению осмотического давления, набуханию клеток и отёку тканей. Так, например, помутнение хрусталика может развиться вследствие вызванного накоплением сорбитола набухания хрусталика и нарушения упорядоченной структуры кристаллинов.

Диабетические ангиопатии. Диабетические ангиопатии обусловлены прежде всего поражением базальных мембран сосудов. При высокой концентрации глюкозы в плазме крови протеогликаны, коллагены, гликопротеины гликозилируются, нарушается обмен и соотношение между компонентами базальных мембран, нарушается их структурная организация.

Макроангиопатии проявляются в поражениях крупных и средних сосудов сердца, мозга, нижних конечностей. Патологические изменения во внутренней оболочке артерий и повреждения артериальной стенки в средних и наружных слоях — следствие гликозилирования базальных мембран и белков межклеточного матрикса (коллагена и эластина), что приводит к снижению эластичности артерий. В сочетании с гиперлипидемией это может быть причиной развития атеросклероза. При сахарном диабете атеросклероз встречается чаще, развивается в более раннем возрасте и прогрессирует значительно быстрее, чем в отсутствие диабета.

Микроангиопатии — результат повреждения капилляров и мелких сосудов. Проявляются в форме нефро-, нейро- и ретинопатии.

Нефропатия развивается примерно у трети больных сахарным диабетом. Электронно-микроскопические изменения базальной мембраны в почечных клубочках можно обнаружить уже на первом году после установления диагноза. Однако у большинства больных клинические признаки диабетической нефропатии проявляются через 10–15 лет существования диабета. Признаком ранних стадий нефропатии служит микроальбуминурия (в пределах 30–300 мг/сут), которая в дальнейшем развивается до классического нефротического синдрома, характеризующегося высокой протеинурией, гипоальбуминемией и отёками.

Ретинопатия, самое серьёзное осложнение сахарного диабета и наиболее частая причина слепоты, развивается у 60–80% больных сахарным

диабетом. На ранних стадиях развивается базальная ретинопатия, которая проявляется в кровоизлияниях в сетчатку, расширении сосудов сетчатки, отёках. Если изменения не затрагивают жёлтого пятна, потеря зрения обычно не происходит. В дальнейшем может развиться пролиферативная ретинопатия, проявляющаяся в новообразовании сосудов сетчатки и стекловидного тела. Ломкость и высокая проницаемость новообразованных сосудов определяют частые кровоизлияния в сетчатку или стекловидное тело. На месте тромбов развивается фиброз, приводящий к отслойке сетчатки и потере зрения.

В. Диагностика сахарного диабета

Обычно диагноз сахарного диабета можно поставить на основе классических симптомов сахарного диабета — гипергликемии, полиурии, полидипсии, полифагии, ощущения сухости во рту. Важнейшие биохимические признаки ИЗСД выявляют на основе:

- теста толерантности к глюкозе (см. рис. 11-30). Уровень глюкозы в плазме крови выше 10 ммоль/л через 2 ч после сахарной нагрузки свидетельствует о сахарном диабете;
- определения гликозилированного гемоглобина. При сахарном диабете уровень H_bA_{1c}, в норме составляющий около 5% от всего содержания гемоглобина, увеличивается в 2–3 раза;
- отсутствия или низкого уровня инсулина и С-пептида в крови и моче. В норме инсулин и С-пептид секретируются в эквимолярных концентрациях. Поскольку печенью задерживается примерно 2/3 инсулина, соотношение инсулин/С-пептид в воротной вене и периферических сосудах в норме составляет 1/3. Величина уровня С-пептида в сыворотке или моче позволяет достаточно точно оценить функциональное состояние β-клеток;
- альбуминурии. При сахарном диабете суточное выведение альбумина составляет примерно 30–300 мг — микроальбуминурия (в норме около 8 мг).

Поскольку ИНСД развивается значительно медленнее, классические клинические симптомы, гипергликемию и дефицит инсулина диагностируют позднее, часто в сочетании с симптомами поздних осложнений сахарного диабета.

Г. Подходы к лечению сахарного диабета

Лечение сахарного диабета зависит от его типа (I или II), является комплексным и включает диету, применение сахаропонижающих средств, инсулинотерапию, а также профилактику и лечение осложнений.

Современные сахаропонижающие препараты делят на две основные группы: производные сульфонилмочевины и бигуаниды. К препаратам, действие которых направлено на стимуляцию секреции инсулина, относят производные сульфонилмочевины (например, манинил). Механизм действия препаратов сульфонилмочевины объясняют их влиянием на функцию АТФ-чувствительных K^+-каналов. Повышение внутриклеточной концентрации K^+ приводит к деполяризации мембраны и ускорению транспорта ионов кальция в клетку, вследствие чего стимулируется секреция инсулина.

Другую основную группу сахаропонижающих препаратов составляют бигуаниды. По данным некоторых исследований, бигуаниды увеличивают количество переносчиков глюкозы ГЛЮТ-4 на поверхности мембран клеток жировой ткани и мышц.

К перспективным методам лечения сахарного диабета относят следующие: трансплантация островков поджелудочной железы или изолированных β-клеток, трансплантация генетически реконструированных клеток, а также стимуляция регенерации панкреатических островков.

При сахарном диабете обоих типов важнейшее значение имеет диетотерапия. Рекомендуют хорошо сбалансированную диету: на долю углеводов должно приходиться 50–60% общей калорийности пищи (исключение должны составлять легкоусвояемые углеводы, пиво, спиртные напитки, сиропы, пирожные и др.); на долю белков — 15–20%; на долю всех жиров — не более 25–30%. Пищу следует принимать 5–6 раз в течение суток.

VI. РЕГУЛЯЦИЯ ВОДНО-СОЛЕВОГО ОБМЕНА

Важнейшие параметры водно-солевого гомеостаза — осмотическое давление, pH и объём внутриклеточной и внеклеточной жидкости. Изменение этих параметров может привести к из-

менению АД, ацидозу или алкалозу, дегидратации и отёкам тканей. Основные гормоны, участвующие в тонкой регуляции водно-солевого баланса и действующие на дистальные извитые канальцы и собирательные трубочки почек: антидиуретический гормон (АДГ), альдостерон и предсердный натриуретический фактор (ПНФ).

А. Антидиуретический гормон

Антидиуретический гормон (АДГ), или вазопрессин — пептид с молекулярной массой около 1100 Д, содержащий 9 аминокислот, соединённых одним дисульфидным мостиком.

1. Синтез и секреция антидиуретического гормона

АДГ синтезируется в нейронах гипоталамуса в виде предшественника препрогормона, который поступает в аппарат Гольджи и превращается в прогормон. В составе нейросекреторных гранул прогормон переносится в нервные окончания задней доли гипофиза (нейрогипофиз). Во время транспорта гранул происходит процессинг прогормона, в результате чего он расщепляется на зрелый гормон и транспортный белок — нейрофизин. Гранулы, содержащие зрелый антидиуретический гормон и нейрофизин, хранятся в терминальных расширениях аксонов в задней доле гипофиза, из которых секретируются в кровоток при соответствующей стимуляции.

Стимулом, вызывающим секрецию АДГ, служит повышение концентрации ионов натрия и увеличение осмотического давления внеклеточной жидкости. При недостаточном потреблении воды, сильном потоотделении или после приёма большого количества соли осморецепторы гипоталамуса, чувствительные к колебаниям осмолярности, регистрируют повышение осмотического давления крови. Возникают нервные импульсы, которые передаются в заднюю долю гипофиза и вызывают высвобождение АДГ. Секреция АДГ происходит также в ответ на сигналы от барорецепторов предсердий. Изменение осмолярности всего на 1% приводит к заметным изменениям секреции АДГ.

2. Механизм действия

Для АДГ существуют 2 типа рецепторов: V_1 и V_2. Рецепторы V_2, опосредующие главный физиологический эффект гормона, обнаружены на базолатеральной мембране клеток собирательных трубочек и дистальных канальцев — наиболее важных клеток-мишеней для АДГ, которые относительно непроницаемы для молекул воды. В отсутствие АДГ моча не концентрируется и может выделяться в количествах, превышающих 20 л в сутки (норма 1,0—1,5 л в сутки). Связывание АДГ с V_2 (рис. 11-32) стимулирует аденилатциклазную систему и активацию протеинкиназы А. В свою очередь, протеинкиназа А фосфорилирует белки, стимулирующие экспрессию гена мембранного белка — аквапорина-2. Аквапорин-2 перемещается к апикальной мембране собирательных канальцев и встраивается в неё, образуя водные каналы. Это обеспечивает избирательную проницаемость мембраны клеток для воды, которые свободно диффундируют в клетки почечных канальцев и затем поступают в интерстициальное пространство. Поскольку в результате происходит реабсорбция воды из почечных канальцев и экскреция малого объёма высококонцентрированной мочи (антидиурез), гормон называют антидиуретическим гормоном.

Рецепторы типа V_1 локализованы в мембранах ГМК сосудов. Взаимодействие АДГ с рецептором V_1 приводит к активации фосфолипазы С, которая гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат с образованием инозитолтрифосфата и диацилглицерола. Инозитолтрифосфат вызывает высвобождение Ca^{2+} из ЭР. Результатом действия гормона через рецепторы V_1 является сокращение гладкомышечного слоя сосудов. Сосудосуживающий эффект АДГ проявляется при высоких концентрациях гормона. Поскольку сродство АДГ к рецептору V_2 выше, чем к рецептору V_1, при физиологической концентрации гормона в основном проявляется его антидиуретическое действие.

3. Несахарный диабет

Дефицит АДГ, вызванный дисфункцией задней доли гипофиза, а также нарушениями в системе передачи гормонального сигнала, приводит к развитию несахарного диабета. При этом происходит нерегулируемая экскреция воды, а наиболее опасным последствием является дегидратация организма.

Под названием «несахарный диабет» объединяют заболевания с разной этиологией. Так,

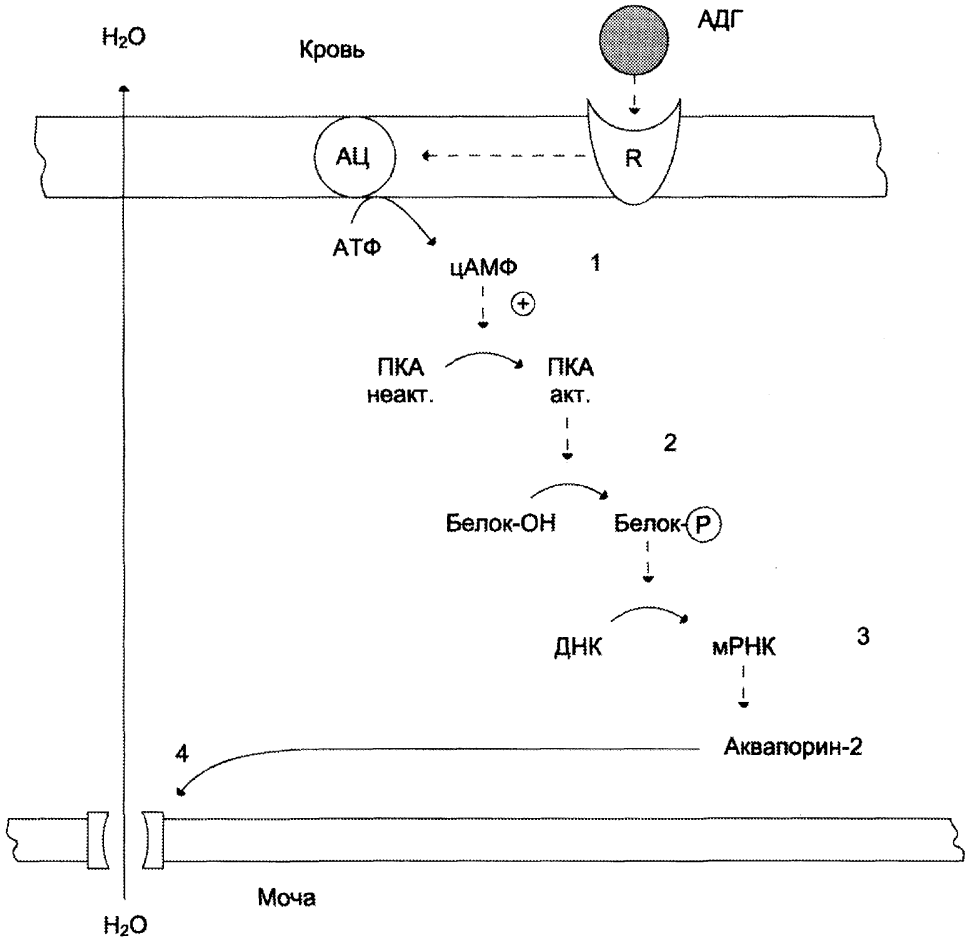


Рис. 11-32. Биологическое действие АДГ в клетках почечных канальцев. 1 — АДГ связывается с мембранным рецептором V_2, вызывая активацию аденилатциклазы (АЦ) и образование цАМФ; 2 — цАМФ активирует протеинкиназу, фосфорилирующую белки; 3 — фосфорилированные белки индуцируют транскрипцию гена белка аквапорина; 4 — аквапорин встраивается в мембрану клетки почечного канальца.

основными причинами центрального несахарного диабета могут быть генетические дефекты синтеза препро-АДГ в гипоталамусе, дефекты процессинга и транспорта проАДГ (наследственная форма), а также повреждения гипоталамуса или нейрогипофиза (например, в результате черепно-мозговой травмы, опухоли, ишемии). Нефрогенный несахарный диабет возникает вследствие мутации гена рецептора АДГ типа V_2 (наследственная форма), следствием которого является неспособность почек реагировать на гормон. Основное проявление несахарного диабета — гипотоническая полиурия, т.е. выделение большого количества мочи низкой плотности. Снижение секреции АДГ приводит также к усиленному потреблению воды. Диагностические критерии несахарного диабета: выраженная полиурия (до 20 л в сутки, плотность мочи <1,010, в норме — 1,020).

Б. Альдостерон

Альдостерон — наиболее активный минералокортикостероид, синтезирующийся в коре надпочечников из холестерола.

Синтез и секреция альдостерона клетками клубочковой зоны непосредственно стимулируются низкой концентрацией Na^+ и высокой концентрацией K^+ в плазме крови. На секрецию альдостерона влияют также простагландины,

АКТГ. Однако наиболее важное влияние на секрецию альдостерона оказывает ренин-ангиотензиновая система.

Альдостерон не имеет специфических транспортных белков, но за счёт слабых взаимодействий может образовывать комплексы с альбумином. Гормон очень быстро захватывается печенью, где превращается в тетрагидроальдостерон-3-глюкуронид и экскретируется с мочой.

1. Механизм действия альдостерона

В клетках-мишенях гормон взаимодействует с рецепторами, которые могут быть локализованы как в ядре, так и в цитозоле клетки. Образовавшийся комплекс гормон-рецептор взаимодействует с определённым участком ДНК и изменяет скорость транскрипции специфических генов. Результат действия альдостерона — индукция синтеза: а) белков-транспортёров Na^+ из просвета канальца в эпителиальную клетку почечного канальца; б) Na^+,K^+-АТФ-азы, обеспечивающей удаление ионов натрия из клетки почечного канальца в межклеточное пространство и переносящей ионы калия из межклеточного пространства в клетку почечного канальца; в) белков-транспортёров ионов калия из клеток почечного канальца в первичную мочу; г) митохондриальных ферментов ЦТК, в частности цитратсинтазы, стимулирующих образование молекул АТФ, необходимых для активного транспорта ионов (рис. 11-33).

Суммарным биологическим эффектом индуцируемых альдостероном белков является увеличение реабсорбции ионов натрия в канальцах нефронов, что вызывает задержку NaCl в организме, и возрастание экскреции калия.

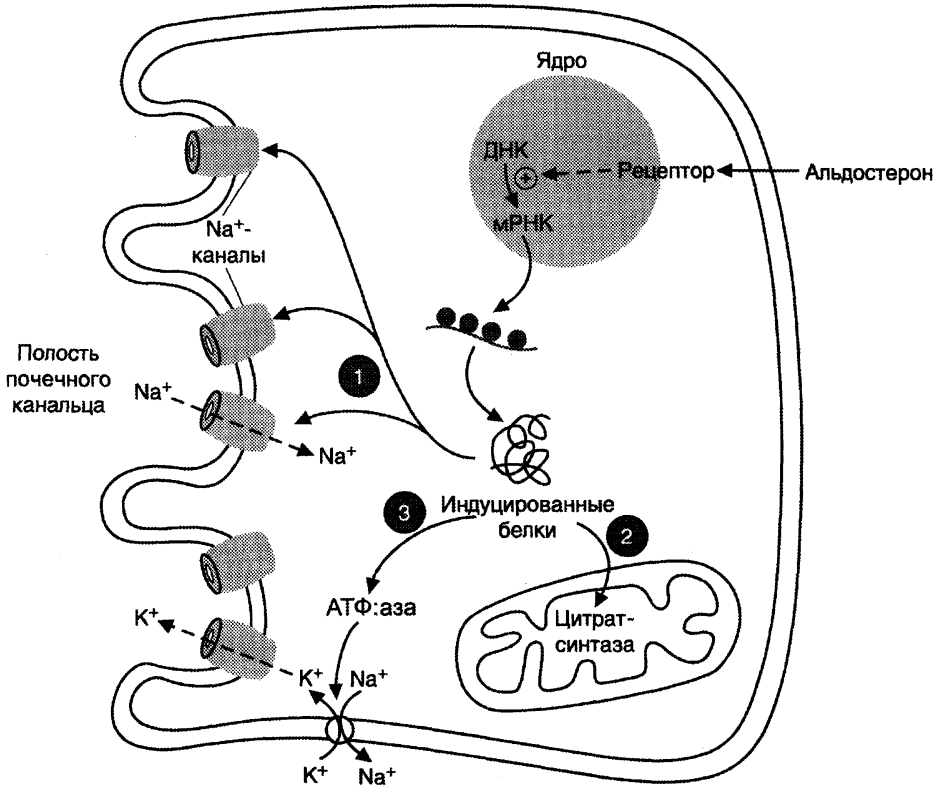


Рис. 11-33. Механизм действия альдостерона. Альдостерон, взаимодействуя с внутриклеточными рецепторами и стимулируя синтез белков: 1 — увеличивает реабсорбцию Na^+ из мочи; 2 — индуцирует синтез ферментов ЦТК, активность которых обеспечивает продукцию АТФ; 3 — активирует Na^+,K^+-АТФ-азу, которая поддерживает низкую внутриклеточную концентрацию ионов натрия и высокую концентрацию ионов калия.

2. Роль системы ренин-ангиотензин-альдостерон в регуляции водно-солевого обмена

Главным механизмом регуляции синтеза и секреции альдостерона служит система ренин-ангиотензин.

Ренин — протеолитический фермент, продуцируемый юкстагломерулярными клетками, расположенными вдоль конечной части афферентных (приносящих) артериол, входящих в почечные клубочки (рис. 11-34).

Юкстагломерулярные клетки особенно чувствительны к снижению перфузионного давления в почках. Уменьшение АД (кровотечение, потеря жидкости, снижение концентрации NaCl) сопровождается падением перфузионного давления в приносящих артериолах клубочка и соответствующей стимуляцией высвобождения ренина.

Субстратом для ренина служит ангиотензиноген. Ангиотензиноген — α_2-глобулин, содержащий более чем 400 аминокислотных остатков. Образование ангиотензиногена происходит в печени и стимулируется глюкокортикоидами и эстрогенами. Ренин гидролизует пептидную связь в молекуле ангиотензиногена и отщепляет N-концевой декапептид (ангиотензин I), не имеющий биологической активности.

Под действием карбоксидипептидилпептидазы, или антиотензин-превращающего фермента (АПФ), выявленного в эндотелиальных клетках, лёгких и плазме крови, с С-конца ангиотензина I удаляются 2 аминокислоты и образуется октапептид — ангиотензин II.

Ангиотензин II, связываясь со специфическими рецепторами, локализованными на поверхности клеток клубочковой зоны коры над-

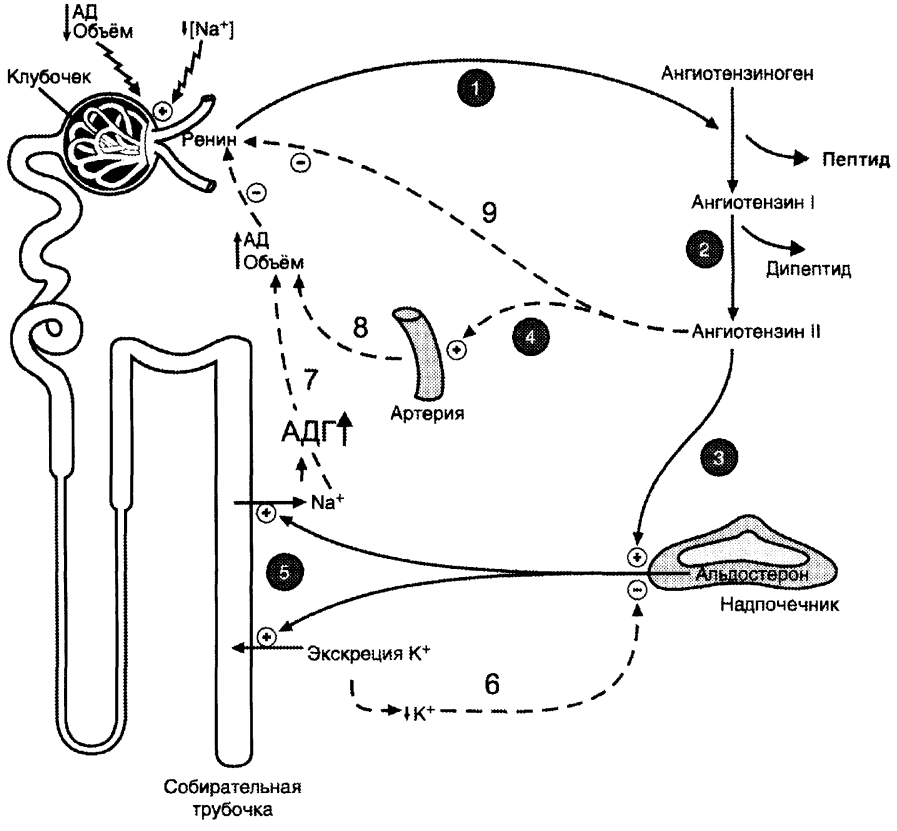


Рис. 11-34. Система ренин-ангиотензин-альдостерон. Ренин, протеолитический фермент, катализирует превращение ангиотензиногена (гликопротеина) в ангиотензин I (декапептид). 1 — ренин, протеолитический фермент, катализирует превращение ангиотензиногена (гликопротеина) в ангиотензин I; 2 — ангиотензин I превращается в ангиотензин II под действием АПФ, отщепляющего два аминокислотных остатка от декапептида; 3 — ангиотензин II стимулирует синтез и секрецию альдостерона; 4 — ангиотензин II вызывает сужение сосудов периферических артерий; 5 — альдостерон стимулирует реабсорбцию Na^+ и экскрецию K^+; 6, 7, 8, 9 — торможение секреции ренина и альдостерона по механизму отрицательной обратной связи. Пунктирные линии — регуляция по принципу обратной связи.

почечников и ГМК, вызывает изменение внутриклеточной концентрации диацилглицерола и инозитолтрифосфата. Инозитолтрифосфат стимулирует высвобождение из ЭР ионов кальция, совместно с которым активирует протеинкиназу С, опосредуя тем самым специфический биологический ответ клетки на действие ангиотензина II.

При участии аминопептидаз ангиотензин II превращается в ангиотензин III — гептапептид, проявляющий активность ангиотензина II. Однако концентрация гептапептида в плазме крови в 4 раза меньше концентрации октапептида, и поэтому большинство эффектов являются результатом действия ангиотензина II. Дальнейшее расщепление ангиотензина II и ангиотензина III протекает при участии специфических протеаз (ангиотензиназ).

Ангиотензин II оказывает стимулирующее действие на продукцию и секрецию альдостерона клетками клубочковой зоны коры надпочечников, который, в свою очередь, вызывает задержку ионов натрия и воды, в результате чего объём жидкости в организме восстанавливается. Кроме этого, ангиотензин II, присутствуя в крови в высоких концентрациях, оказывает мощное сосудосуживающее действие и тем самым повышает АД.

3. Восстановление объёма крови при обезвоживании организма

Уменьшение общего объёма жидкости, например в результате кровопотери, при обильной рвоте, диарее вызывает высвобождение ренина. Этому способствует также снижение импульсации от барорецепторов предсердий и артерий в результате уменьшения внутрисосудистого объёма жидкости. В результате увеличивается продукция ангиотензина II, наиболее мощного стимулятора секреции альдостерона. Повышение концентрации альдостерона в крови вызывает задержку ионов натрия, что является сигналом для осморецепторов гипоталамуса и секреции из нервных окончаний передней доли гипофиза АДГ, стимулирующего реабсорбцию воды из собирательных трубочек. Ангиотензин II, оказывая сильное сосудосуживающее действие, повышает АД и, кроме этого, усиливает жажду. Поступающая с питьём вода в большей мере, чем это происходит в норме, задерживается в организме. Увеличение объёма жидкости а, также повышение АД приводят к устранению стимула, который вызвал активацию ренин-ангиотензиновой системы, секрецию альдостерона и восстановление объёма крови (рис. 11-35).

4. Гиперальдостеронизм

Гиперальдостеронизм — заболевание, вызванное гиперсекрецией альдостерона надпочечниками. Причиной первичного гиперальдостеронизма (**синдром Конна**) примерно у 80% больных является аденома надпочечников, в остальных случаях — диффузная гипертрофия клеток клубочковой зоны, вырабатывающих альдостерон. При первичном гиперальдостеронизме избыток альдостерона усиливает реабсорбцию натрия в почечных канальцах. Увеличение концентрации Na^+ в плазме служит стимулом к секреции АДГ и задержке воды почками. Кроме того, усиливается выведение ионов калия, магния и протонов. В результате развиваются гипернатриемия, вызывающая, в частности, гипертонию, гиперволемию и отёки, а также гипокалиемия, ведущая к мышечной слабости, возникают дефицит магния и лёгкий метаболический алкалоз.

Вторичный гиперальдостеронизм встречается гораздо чаще, чем первичный, и может быть связан с рядом состояний (например, сердечная недостаточность, хронические заболевания почек, а также сопровождающиеся нарушением кровоснабжения опухоли, секретирующие ренин). При вторичном гиперальдостеронизме у больных наблюдают повышенный уровень ренина и ангиотензина II, что стимулирует кору надпочечников продуцировать и секретировать избыточное количество альдостерона. Клинические симптомы менее выражены, чем при первичном альдостеронизе. Одновременное определение концентрации альдостерона и активности ренина в плазме позволяет окончательно дифференцировать первичный (активность ренина в плазме снижена) и вторичный (активность ренина в плазме повышена) гиперальдостеронизм.

В. Предсердный натриуретический фактор (ПНФ)

Это пептид, содержащий 28 аминокислот с единственным дисульфидным мостиком. ПНФ синтезируется, главным образом, в кардиомиоцитах предсердий, и хранится в виде препрогормона, состоящего из 126 аминокислотных остатков.

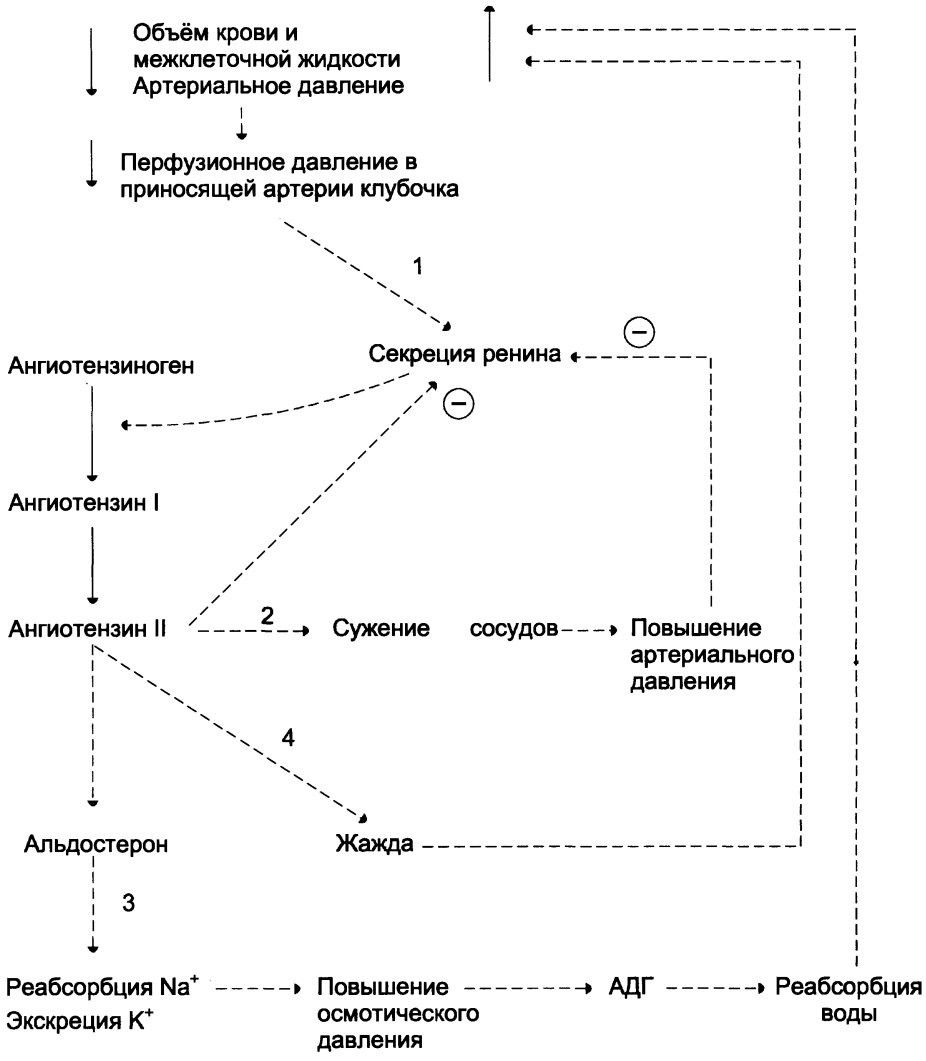


Рис. 11-35. Схема восстановления объёма крови при кровопотере и обезвоживании организма. 1 — уменьшение объёма жидкости и снижение АД активируют систему ренин-ангиотензин-альдостерон; 2 — ангиотензин II вызывает сужение сосудов, что является экстренной мерой для поддержания АД; 3 — альдостерон стимулирует задержку натрия, вследствие чего происходит высвобождение вазопрессина и усиливается реабсорбция воды; 4 — ангиотензин II вызывает также чувство жажды, что способствует увеличению жидкости в организме.

Основным фактором, регулирующим секрецию предсердного натрийуретического фактора, является увеличение АД. Другие стимулы секреции — увеличение осмолярности плазмы, повышение частоты сердцебиений, повышенный уровень катехоламинов и глюкокортикоидов в крови.

Основные клетки-мишени ПНФ — почки, периферические артерии. В почках ПНФ стимулирует расширение приносящих артериол, усиление почечного кровотока, увеличение скорости фильтрации и экскреции ионов натрия. В периферических артериях ПНФ снижает тонус гладких мышц и соответственно расширяет артериолы (рис. 11-36). Таким образом, суммарным действием ПНФ является увеличение экскреции Na^+ и понижение АД.

Механизм передачи сигнала ПНФ не включает активацию G-белка. Рецептор ПНФ имеет доменное строение: домен связывания с ли-

гандом, локализованный во внеклеточном пространстве, и один домен, пронизывающий мембрану и обладающий активностью гуанилатциклазы. В отсутствие ПНФ его рецептор находится в фосфорилированном состоянии и неактивен. Связывание ПНФ с рецептором вызывает конформационные изменения и возрастание гуанилатциклазной активности рецептора. В результате ГТФ превращается в циклический ГМФ (цГМФ), который активирует протеинкиназу G (см. раздел 5).

ПНФ обычно рассматривают как физиологический антагонист ангиотензина II, поскольку под его влиянием возникают не сужение просвета сосудов и задержка натрия, а, наоборот, расширение сосудов и увеличение почечной экскреции соли.

VII. РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И ФОСФАТОВ

В организме взрослого человека содержится в среднем 1000 г кальция. Основным депо кальция в организме (99% всего кальция от общей массы) являются кости. В костях около 99% кальция присутствует в малорастворимой форме кристаллов гидроксиапатита $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2H_2O]$. В виде фосфатных солей в костях находится лишь 1% кальция, который может легко обмениваться и играть роль буфера при изменениях концентрации кальция в плазме крови. Другой фонд кальция (1% от общей массы кальция) — кальций плазмы крови. В плазму крови кальций поступает из кишечника (с водой и пищей) и из костной ткани (в процессе резорбции).

Кальций — не только структурный компонент костной ткани. Ионы кальция играют ключевую роль в мышечном сокращении, увеличивают проницаемость мембраны клеток для ионов калия, влияют на натриевую проводимость клеток, на работу ионных насосов, способствуют секреции гормонов, участвуют в каскадном механизме свёртывания крови. Кроме этого, они служат важнейшими посредниками во внутриклеточной передаче сигналов.

Концентрация кальция внутри клеток зависит от его концентрации во внеклеточной жидкости. Пределы колебаний общей концентрации Ca^{2+} в плазме крови здоровых людей составляют

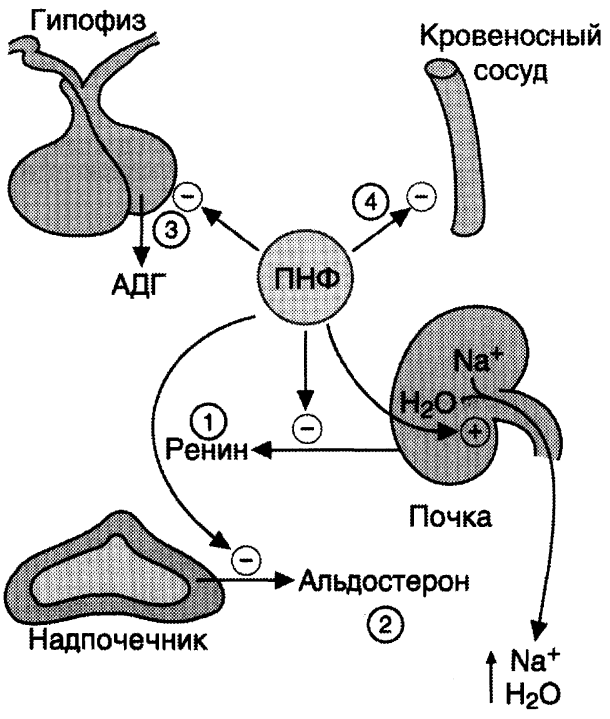


Рис. 11-36. Биологическое действие ПНФ. 1 — ингибирует выделение ренина; 2 — ингибирует секрецию альдостерона; 3 — ингибирует секрецию АДГ; 4 — вызывает релаксацию сосудов.

2,12–2,6 ммоль/л, или 9–11 мг/дл. Кальций плазмы крови представлен в виде:

- несвязанного, ионизированного кальция (около 50%);
- ионов кальция, соединённых с белками, главным образом, с альбумином (45%);
- недиссоциирующих комплексов с цитратом, сульфатом, фосфатом и карбонатом (5%).

Биологически активной фракцией является ионизированный кальций, концентрация которого поддерживается в пределах 1,1–1,3 ммоль/л.

Изменение уровня кальция может привести к нарушению многих процессов: изменению порога возбудимости нервных и мышечных клеток, нарушению функционирования кальциевого насоса, снижению активности ферментов и нарушению гормональной регуляции метаболизма. Концентрация Ca^{2+} в плазме регулируется с высокой точностью: изменение её всего на 1% приводит в действие гомеостатические механизмы, восстанавливающие равновесие.

Основными регуляторами обмена Ca^{2+} в крови являются паратгормон, кальцитриол и кальцитонин.

А. Паратгормон

Паратгормон (ПТГ) — одноцепочечный полипептид, состоящий из 84 аминокислотных остатков (около 9,5 кД), действие которого направлено на повышение концентрации ионов кальция и снижение концентрации фосфатов в плазме крови.

1. Синтез и секреция ПТГ

ПТГ синтезируется в паращитовидных железах в виде предшественника — препрогормона, содержащего 115 аминокислотных остатков. Во время переноса в ЭР от препрогормона отщепляется сигнальный пептид, содержащий 25 аминокислотных остатков. Образующийся прогормон транспортируется в аппарат Гольджи, где происходит превращение предшественника в зрелый гормон, включающий 84 аминокислотных остатка ($ПТГ_{1-84}$). Паратгормон упаковывается и хранится в секреторных гранулах (везикулах). Интактный паратгормон может расщепляться на короткие пептиды: N-концевые, С-концевые и срединные фрагменты. N-концевые пептиды, содержащие 34 аминокислотных остатка, обладают полной биологической активностью и секретируются железами наряду со зрелым паратгормоном. Именно N-концевой пептид отвечает за связывание с рецепторами на клетках-мишенях. Роль С-концевого фрагмента точно не установлена. Скорость распада гормона уменьшается при низкой концентрации ионов кальция и увеличивается, если концентрация ионов кальция высока.

Секреция ПТГ регулируется уровнем ионов кальция в плазме: гормон секретируется в ответ на снижение концентрации кальция в крови.

2. Роль паратгормона в регуляции обмена кальция и фосфатов

Органы-мишени для ПТГ — кости и почки. В клетках почек и костной ткани локализованы специфические рецепторы, которые взаимодействуют с паратгормоном, в результате чего инициируется каскад событий, приводящий к активации аденилатциклазы. Внутри клетки возрастает концентрация молекул цАМФ, действие которых стимулирует мобилизацию ионов кальция из внутриклеточных запасов. Ионы кальция активируют киназы, которые фосфорилируют особые белки, индуцирующие транскрипцию специфических генов.

В костной ткани рецепторы ПТГ локализованы на остеобластах и остеоцитах, но не обнаружены на остеокластах. При связывании паратгормона с рецепторами клеток-мишеней остеобласты начинают усиленно секретировать инсулиноподобный фактор роста 1 и цитокины. Эти вещества стимулируют метаболическую активность остеокластов. В частности, ускоряется образование ферментов, таких как щелочная фосфатаза и коллагеназа, которые воздействуют на компоненты костного матрикса, вызывают его распад, в результате чего происходит мобилизация Ca^{2+} и фосфатов из кости во внеклеточную жидкость (рис. 11-37).

В почках ПТГ стимулирует реабсорбцию кальция в дистальных извитых канальцах и тем самым снижает экскрецию кальция с мочой, уменьшает реабсорбцию фосфатов.

Кроме того, паратгормон индуцирует синтез кальцитриола ($1,25(OH)_2D_3$), который усиливает всасывание кальция в кишечнике.

Таким образом, паратгормон восстанавливает нормальный уровень ионов кальция во внеклеточной жидкости как путём прямого воздействия на кости и почки, так и действуя опосредованно (через стимуляцию синтеза кальцитриола) на слизистую оболочку кишечника, увеличивая в этом случае эффективность всасывания Ca^{2+} в кишечнике. Снижая реабсорбцию фосфатов из почек, паратгормон способствует уменьшению концентрации фосфатов во внеклеточной жидкости.

3. Гиперпаратиреоз

При первичном гиперпаратиреозе нарушается механизм подавления секреции паратгормона в ответ на гиперкальциемию. Это заболевание встречается с частотой 1:1000. Причинами могут быть опухоль околощитовидной железы (80%) или диффузная гиперплазия желёз, в некоторых случаях рак паращитовидной железы (менее 2%). Избыточная секреция паратгормона приводит к повышению мобилизации кальция и фосфатов из костной ткани, усилению реабсорбции кальция и выведению фосфатов в почках. Вследствие этого возникает гиперкальциемия,

которая может приводить к снижению нервно-мышечной возбудимости и мышечной гипотонии. У больных появляются общая и мышечная слабость, быстрая утомляемость и боли в отдельных группах мышц, увеличивается риск переломов позвоночника, бедренных костей и костей предплечья. Увеличение концентрации фосфата и ионов кальция в почечных канальцах может служить причиной образования в почках камней и приводит к гиперфосфатурии и гипофосфатемии.

Вторичный гиперпаратиреоз встречается при хронической почечной недостаточности и дефиците витамина D_3 и сопровождается гипокальциемией, связанной в основном с нарушением всасывания кальция в кишечнике из-за угнетения образования кальцитриола поражёнными почками. В этом случае секреция паратгормона увеличивается. Однако повышенный уровень паратгормона не может нормализовать концентрацию ионов кальция в плазме крови вследствие нарушения синтеза кальцитриола и снижения всасывания кальция в кишечнике. Наряду с гипокальциемией, нередко наблюдают гиперфостатемию. У больных развивается повреждение скелета (остеопороз) вследствие повышения мобилизации кальция из костной ткани. В некоторых случаях (при развитии аденомы или гиперплазии околощитовидных желёз) автономная гиперсекреция паратгормона компенсирует гипокальциемию и приводит к гиперкальциемии (**третичный гиперпаратиреоз**).

4. Гипопаратиреоз

Основной симптом гипопаратиреоза, обусловленный недостаточностью паращитовидных желёз, — гипокальциемия. Понижение концентрации ионов кальция в крови может вызвать неврологические, офтальмологические нарушения и нарушения ССС, а также поражения соединительной ткани. У больного гипопаратиреозом отмечают повышение нервно-мышечной проводимости, приступы тонических судорог, судороги дыхательных мышц и диафрагмы, ларингоспазм.

Б. Кальцитриол

Как и другие стероидные гормоны, кальцитриол синтезируется из холестерола.

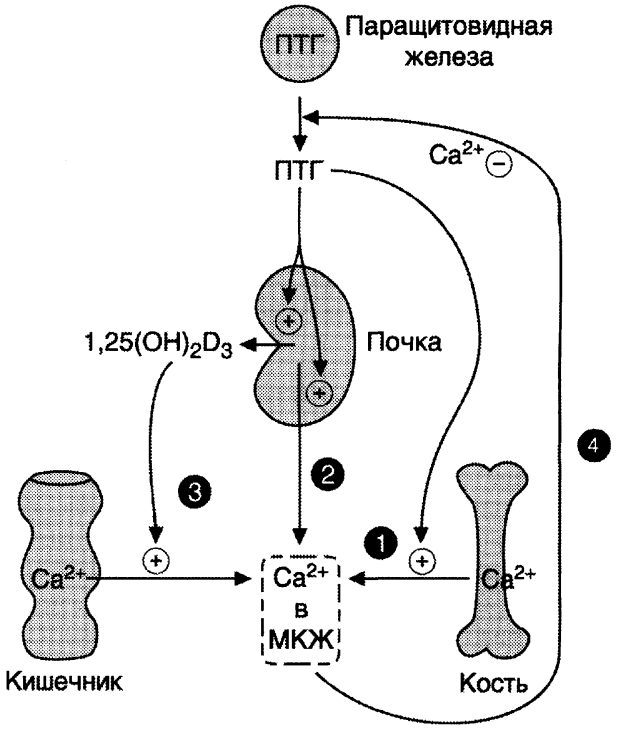


Рис. 11-37. Биологическое действие паратгормона. 1 — стимулирует мобилизацию кальция из кости; 2 — стимулирует реабсорбцию ионов кальция в дистальных канальцах почек; 3 — активирует образование кальцитриола, $1,25(OH)_2D_3$ в почках, что приводит к стимуляции всасывания Ca^{2+} в кишечнике; 4 — повышает концентрацию кальция в межклеточной жидкости, тормозит секрецию ПТГ. МКЖ — межклеточная жидкость.

Действие гормона направлено на повышение концентрации кальция в плазме крови.

1. Строение и синтез кальцитриола

В коже 7-дегидрохолестерол (провитамин D_3) превращается в непосредственного предшественника кальцитриола — холекальциферол (витамин D_3). В ходе этой неферментативной реакции под влиянием УФ-излучения связь между девятым и десятым атомами углерода в молекуле холестерола разрывается, раскрывается кольцо В, и образуется холекальциферол (рис. 11-38). Так образуется в организме человека большая часть витамина D_3, однако небольшое его количество поступает с пищей и всасывается в тонком кишечнике вместе с другими жирорастворимыми витаминами.

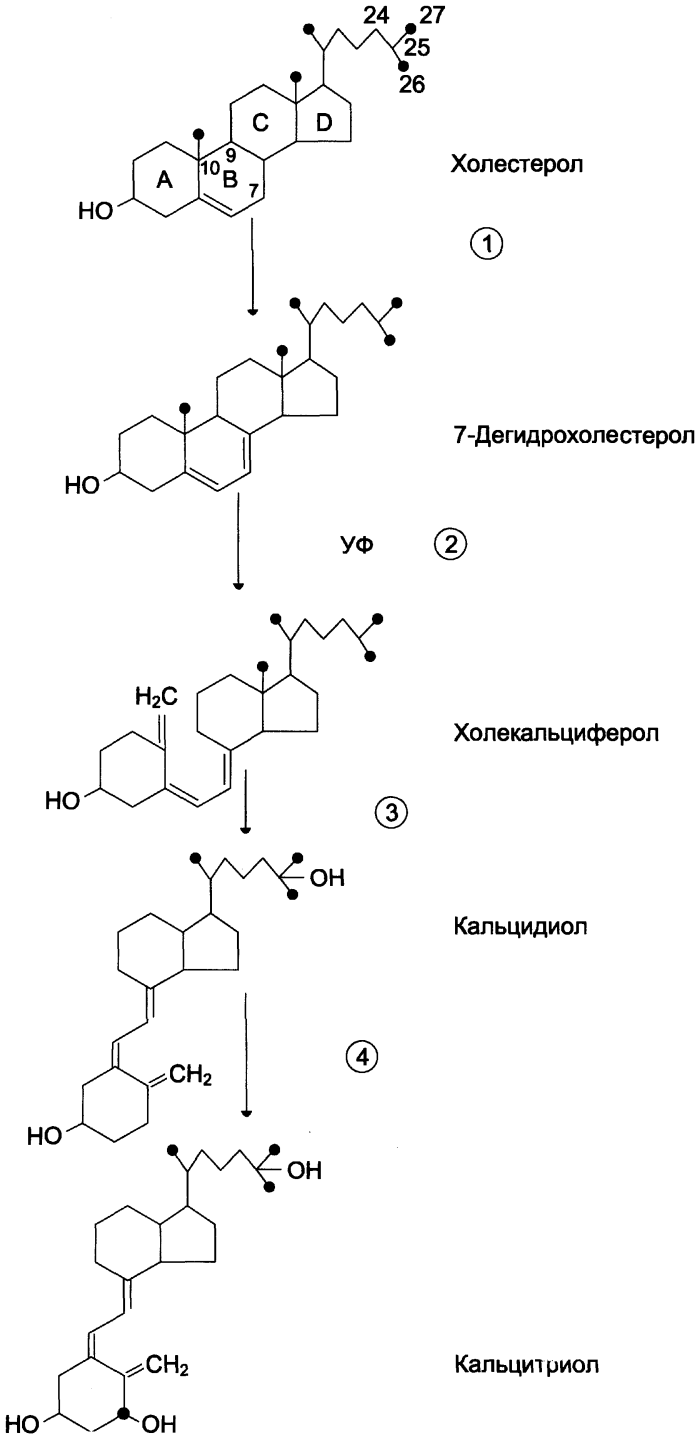


Рис. 11-38. Схема синтеза кальцитриола. 1 — холестерол является предшественником кальцитриола; 2 — в коже 7-дегидрохолестерол неферментативно превращается в холекальциферол; 3 — в печени 25-гидроксилаза превращает холекальциферол в кальцидиол; 4 — в почках образование кальцитриола катализируется 1α-гидроксилазой.

В эпидермисе холекальциферол связывается со специфическим витамин D-связывающим белком (транскальциферином), поступает в кровь и переносится в печень, где происходит гидроксилирование по 25-му атому углерода с образованием кальцидиола [25-гидроксихолекальциферол, $25(OH)D_3$]. В комплексе с витамин D-связывающим белком кальцидиол транспортируется в почки и гидроксилируется по первому углеродному атому с образованием кальцитриола [$1,25(OH)_2D_3$]. Именно $1,25(OH)_2D_3$ представляет собой активную форму витамина D_3.

Гидроксилирование, протекающее в почках, является скорость-лимитирующей стадией. Эта реакция катализируется митохондриальным ферментом 1α-гидроксилазой. Паратгормон индуцирует 1α-гидроксилазу, тем самым стимулируя синтез $1,25(OH)_2D_3$. Низкая концентрация фосфатов и ионов Ca^{2+} в крови также ускоряет синтез кальцитриола, причём ионы кальция действуют опосредованно через паратгормон.

При гиперкальциемии активность 1α-гидроксилазы снижается, но повышается активность 24α-гидроксилазы. В этом случае увеличивается продукция метаболита $24,25(OH)_2D_3$, который, возможно, и обладает биологической активностью, но роль его окончательно не выяснена.

2. Механизм действия кальцитриола

Кальцитриол оказывает воздействие на тонкий кишечник, почки и кости. Подобно другим стероидным гормонам, кальцитриол связывается с внутриклеточным рецептором клетки-мишени. Образуется комплекс гормон-рецептор, который взаимодействует с хроматином и индуцирует транскрипцию структурных генов, в результате чего синтезируются белки, опосредующие действие кальцитриола. Так, например, в клетках кишечника кальцитриол индуцирует синтез Ca^{2+}-переносящих белков, которые обеспечивают всасывание ионов кальция и фосфатов из полости кишечника в эпителиальную клетку кишечника и далее транспорт из клетки в кровь, благодаря чему концентрация ионов кальция во внеклеточной жидкости поддерживается на уровне, необходимом для минерализации органического матрикса костной ткани. В почках кальцитриол стимулирует реабсорбцию ионов кальция и фосфатов. При недостатке кальцитриола нарушается образование аморфного фосфата кальция и кристаллов гидроксиапатитов в органическом матриксе костной ткани, что приводит к развитию рахита и остеомаляции. Обнаружено также, что при низкой концентрации ионов кальция кальцитриол способствует мобилизации кальция из костной ткани.

3. Рахит

Рахит — заболевание детского возраста, связанное с недостаточной минерализацией костной ткани. Нарушение минерализации кости — следствие дефицита кальция. Рахит может быть обусловлен следующими причинами: недостатком витамина D_3 в пищевом рационе, нарушением всасывания витамина D_3 в тонком кишечнике, снижением синтеза предшественников кальцитриола из-за недостаточного времени пребывания на солнце, дефектом 1α-гидроксилазы, дефектом рецепторов кальцитриола в клетках-мишенях. Всё это вызывает снижение всасывания кальция в кишечнике и снижение его концентрации в крови, стимуляцию секреции паратгормона и вследствие этого мобилизацию ионов кальция из кости. При рахите поражаются кости черепа; грудная клетка вместе с грудиной выступает вперёд; деформируются трубчатые кости и суставы рук и ног; увеличивается и выпячивается живот; задерживается моторное развитие. Основные способы предупреждения рахита — правильное питание и достаточная инсоляция.

В. Роль кальцитонина в регуляции обмена кальция

Кальцитонин — полипептид, состоящий из 32 аминокислотных остатков с одной дисульфидной связью. Гормон секретируется парафолликулярными К-клетками щитовидной железы или С-клетками паращитовидных желёз в виде высокомолекулярного белка-предшественника. Секреция кальцитонина возрастает при увеличении концентрации Ca^{2+} и уменьшается при понижении концентрации Ca^{2+} в крови. Кальцитонин — антагонист паратгормона. Он ингибирует высвобождение Ca^{2+} из кости, снижая активность остеокластов. Кроме того, кальцитонин подавляет канальцевую реабсорбцию

ионов кальция в почках, тем самым стимулируя их экскрецию почками с мочой. Скорость секреции кальцитонина у женщин сильно зависит от уровня эстрогенов. При недостатке эстрогенов секреция кальцитонина снижается. Это вызывает ускорение мобилизации кальция из костной ткани, что приводит к развитию остеопороза.

VIII. РОЛЬ ГОРМОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ОРГАНИЗМА

Репродуктивные функции организма регулируются половыми гормонами: у мужчин — тестостероном, у женщин — эстрогенами и прогестинами. Синтез и секреция половых гормонов, в свою очередь, находятся под контролем фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов.

А. Гонадотропные гормоны гипофиза, стимулирующие синтез и секрецию половых гормонов

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ) — гонадотропные гормоны гипофиза. Представляют собой гликопротеины с молекулярной массой около 30 кД, состоящие из α- и β-субъединиц. α-Субъединицы содержат 92 аминокислоты и две боковые углеводные цепи и идентичны α-субъединице тиреотропина. β-Субъединицы индивидуальны для каждого гормона.

1. Регуляция секреции ФСГ и ЛГ

Образование и освобождение обоих гормонов стимулируется гипоталамическим декапептидом — гонадотропин-рилизинг-гормоном, секреция которого происходит эпизодически, что в основном и определяет импульсный характер секреции ЛГ и ФСГ.

У женщин эстрогены и прогестерон по механизму обратной связи влияют на секрецию ЛГ и ФСГ как на гипоталамическом, так и на гипофизарном уровне.

У мужчин тестостерон и эстроген, образованный в клетках Лейдига и в процессе метаболизма тестостерона, блокируют по механизму обратной связи синтез и секрецию гонадолиберина и гонадотропных гормонов гипофиза. Кроме этого, клетками гранулёзы фолликулов и клетками Сертоли вырабатывается белок ингибин, который тормозит гипофизарную секрецию ФСГ.

$T_{1/2}$ ФСГ составляет примерно 150 мин, а $T_{1/2}$ ЛГ — 30 мин.

2. Механизм действия и эффекты ФСГ и ЛГ

Гонадотропные гормоны ЛГ и ФСГ связываются с рецепторами на мембранах своих клеток-мишеней в яичниках и яичках, в результате чего происходит активация аденилатциклазной системы. Образующийся цАМФ активирует протеинкиназу, которая фосфорилирует белки, опосредующие эффекты ЛГ и ФСГ.

У женщин лютеинизирующий гормон стимулирует образование прогестерона клетками жёлтого тела, у мужчин — синтез тестостерона интерстициальными клетками Лейдига. ФСГ ускоряет развитие фолликулов в яичниках и образование эстрогенов, а действуя на клетки Сертоли, запускает процесс сперматогенеза.

Б. Мужские половые гормоны

Мужские половые гормоны (рис. 11-39) вырабатываются в основном в мужских половых железах — в интерстициальных клетках Лейдига семенников (95%). Небольшое количество андрогенов образуется в коре надпочечников.

1. Синтез андрогенов

Путь биосинтеза андрогенов в яичках и коре надпочечников одинаков. Предшественником андрогенов, как и других стероидных гормонов, служит холестерол (рис. 11-40), который либо поступает из плазмы в составе ЛПНП, либо синтезируется в самих железах из ацетил-КоА.

Отщепление боковой цепи холестерола и образование прегненолона —скорость-лимитирующая реакция. Однако, в отличие от аналогичной реакции, протекающей в надпочечниках, эта стадия стимулируется ЛГ (а не АКТГ). ЛГ, связываясь с рецептором плазматической мембраны клеток Лейдига, активирует аденилатциклазу, увеличивая тем самым внутриклеточную концентрацию цАМФ, что в конечном итоге вызывает активацию фермента, который расщепляет боковую цепь холестерола между С-20 и С-22.

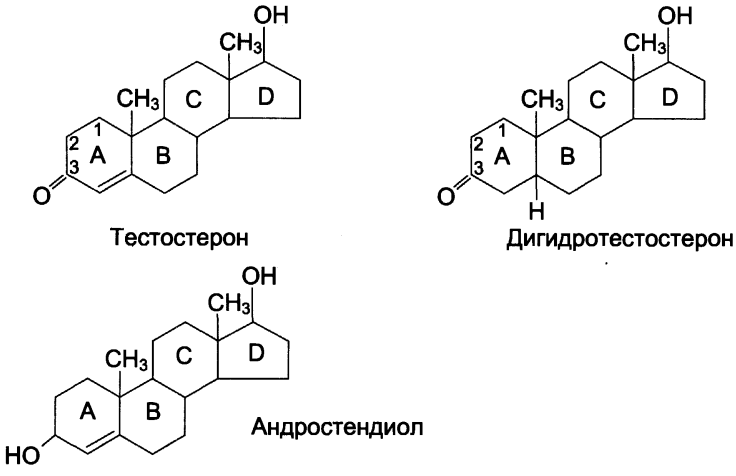


Рис. 11-39. Мужские половые гормоны.

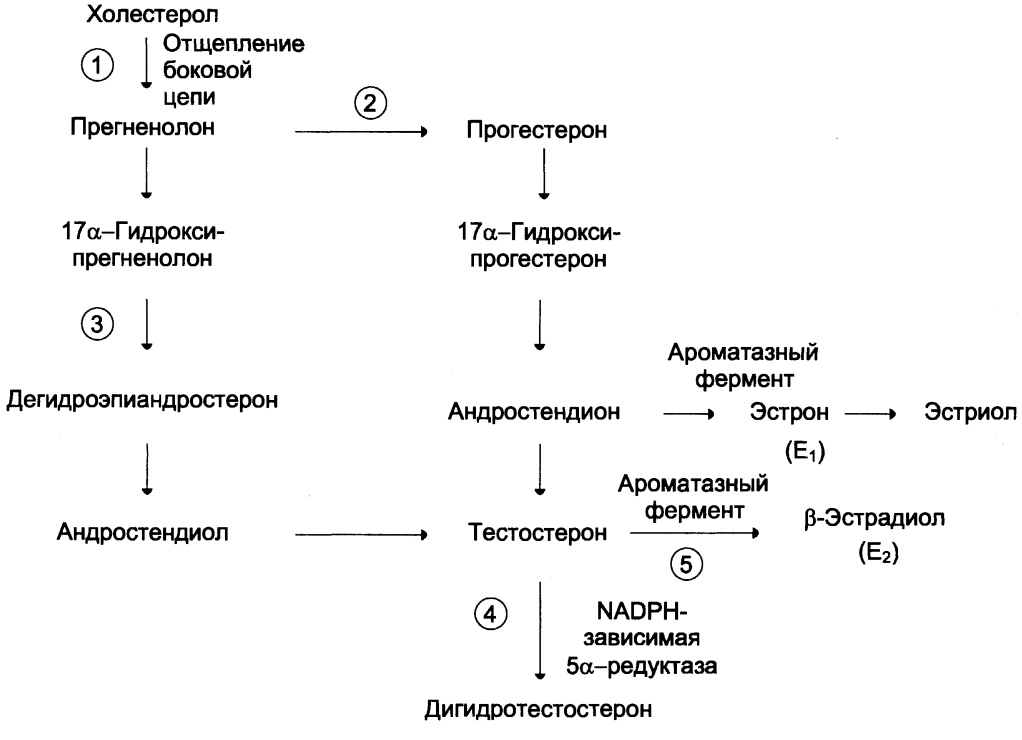


Рис. 11-40. Схема синтеза половых гормонов. Предшественником половых гормонов служит холестерол. Образование прегненолона происходит в результате отщепления боковой цепи холестерола (1). Превращение прегненолона в тестостерон может протекать двумя путями: через образование прогестерона (2) или дегидроэпиандростерона (3). Тестостерон служит предшественником дигидротестостерона (4). В некоторых периферических тканях небольшое количество тестостерона превращается в эстрадиол (5). В яичниках синтезируются женские половые гормоны, эстрогены и прогестины, среди которых наиболее активными являются 17β-эстрадиол и прогестерон. Ароматизация андрогенов протекает под действием ароматазного комплекса, содержащего цитохром P_{450}-оксидазу, и включает 3 реакции гидроксилирования с участием O_2 и NADPH.

Тестостерон. Превращение прегненолона в тестостерон катализируется пятью микросомальными ферментами и может протекать двумя путями: через образование дегидроэпиандростерона или через образование прогестерона (что, по-видимому, преобладает в семенниках человека).

Суточная секреция тестостерона у мужчин составляет в норме примерно 5 мг и сохраняется на протяжении всей жизни организма. Гормон циркулирует в крови в связанном с белками плазмы состоянии: альбумином (40%) и специфически связывающим половые гормоны β-глобулином (называемым секс-гормонсвязывающим глобулином, СГСГ). Лишь 2% от общего количества гормона в крови транспортируется в свободном виде, и именно такие молекулы проявляют биологическую активность.

Дигидротестостерон. В семенных канальцах, предстательной железе, коже, наружных половых органах тестостерон служит предшественником более активного андрогена — дигидротестостерона (рис. 11-41, 11-42). Это превращение, в котором участвует примерно 4% тестостерона, происходит в результате восстановления двойной связи кольца А и 3-кетогруппы при участии цитоплазматического фермента — NADPH-зависимой 5α-редуктазы. Семенники человека секретируют в сутки до 50—100 мкг дигидротестостерона. Однако большее количество гормона — следствие периферических превращений, и суммарная суточная секреция дигидротестостерона составляет 400 мкг, что почти в 10 раз меньше уровня секреции тестостерона.

В некоторых периферических тканях небольшое количество тестостерона превращается в эстрадиол. В качестве побочных продуктов клетки Лейдига также постоянно секретируют эстрадиол и прогестерон, хотя роль этих гормонов в развитии и поддержании функций размножения и формирования полового поведения у мужчин до настоящего времени не выяснена.

2. Регуляция синтеза и секреции андрогенов

В препубертатный период секреция андрогенов подавляет по механизму отрицательной обратной связи секрецию гонадотропина до начала пубертатного периода, когда гипофизарные клетки становятся менее чувствительными к ингибирующему действию циркулирующих в крови андрогенов. Эта потеря чувствительности приводит к циклически импульсному освобождению ЛГ и ФСГ. ЛГ, связываясь с рецепторами клеток Лейдига, стимулирует образование тестостерона интерстициальными клетками Лейдига, а ФСГ, связываясь с рецепторами клеток Сертоли в семенниках, стимулирует сперматогенез (рис. 11-41).

Тестостерон замыкает отрицательную обратную связь на уровне гипофиза и гипоталамуса, уменьшая частоту секреторных импульсов ЛГ. Торможение секреции ФСГ аденогипофизом происходит под действием белка ингибина, вырабатываемого клетками Сертоли. ФСГ стимулирует синтез этого белка, который по механизму отрицательной обратной связи тормозит дальнейшую секрецию ФСГ.

3. Мишени для андрогенов

К мишеням тестостерона относят эмбриональные вольфовы структуры, сперматогонии, мышцы, кости, почки, мозг. Подобно другим стероидным гормонам, андрогены образуют внутри клетки комплекс с рецептором, который связывается с определённым участком хроматина, активируя специфические гены, белковые продукты которых опосредуют биологические эффекты андрогенов.

4. Эффекты андрогенов

Физиологическое действие андрогенов различно в разные периоды жизни организма. У эмбриона под действием андрогенов из вольфова протока образуются придаток яичка (эпидидимис), семявыносящий проток и семенной пузырёк. У плода мужского пола происходит маскулинизация мозга. Поскольку андрогены в организме обладают мощным анаболическим действием и стимулируют клеточное деление, повышенный уровень андрогенов в препубертатный период приводит к скачкообразному увеличению линейных размеров тела, увеличению скелетных мышц, росту костей, но одновременно способствуют и остановке роста, так как стимулируют сращение эпифизов длинных костей с их стволами. Андрогены вызывают изменение структуры кожи и волос, снижение тембра голоса вследствие утолщения голосовых связок и увеличения объёма гортани, стимулируют секрецию сальных желёз.

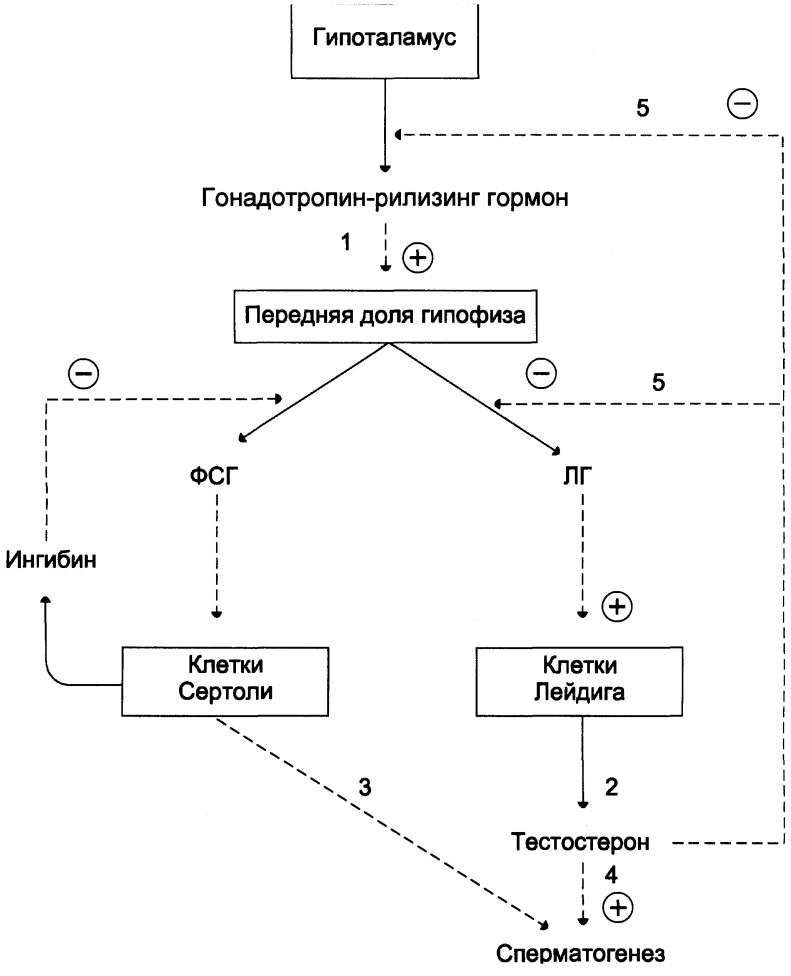


Рис. 11-41. Регуляция синтеза и секреции мужских половых гормонов. Синтез и секреция мужских половых гормонов регулируется гипоталамо-гипофизарной системой по механизму отрицательной обратной связи. Секреция ЛГ и ФСГ стимулируется гонадотропин-рилизинг гормоном. ЛГ ускоряет синтез и секрецию тестостерона клетками Лейдига, ФСГ стимулирует сперматогенез. Тестостерон стимулирует сперматогенез, ингибирует синтез и секрецию гонадотропин-рилизинг гормона и ЛГ.

В. Женские половые гормоны

В яичниках синтезируются женские половые гормоны — эстрогены и прогестины, среди которых наиболее активны 17β-эстрадиол и прогестерон (рис. 11-42).

1. Образование эстрогенов

Согласно современным представлениям, образование эстрогенов яичников предполагает выработку андрогенов (андростендиона) в клетках теки фолликулов с последующей ароматизацией андрогенов в клетках гранулёзы. В клетках теки синтезируются рецепторы ЛГ. Рецепторы ФСГ образуются в клетках гранулёзы. ЛГ, связываясь с рецепторами клеток теки и активируя фермент, который катализирует отщепление боковой цепи холестерола и превращение его в прегненолон, тем самым стимулирует образование основного андрогена яичников — андростендиона. ФСГ, взаимодействуя с рецепторами клеток гранулёзы, активирует содержащийся в этих клетках ароматазный ферментативный комплекс и стимулирует превращение андрогенов, вырабатываемых клетками теки, в эстрогены. Ароматизация андрогенов под действием ароматазного комплекса, содержащего цитохром P_{450}-оксидазу, включает 3 реакции гидроксили-

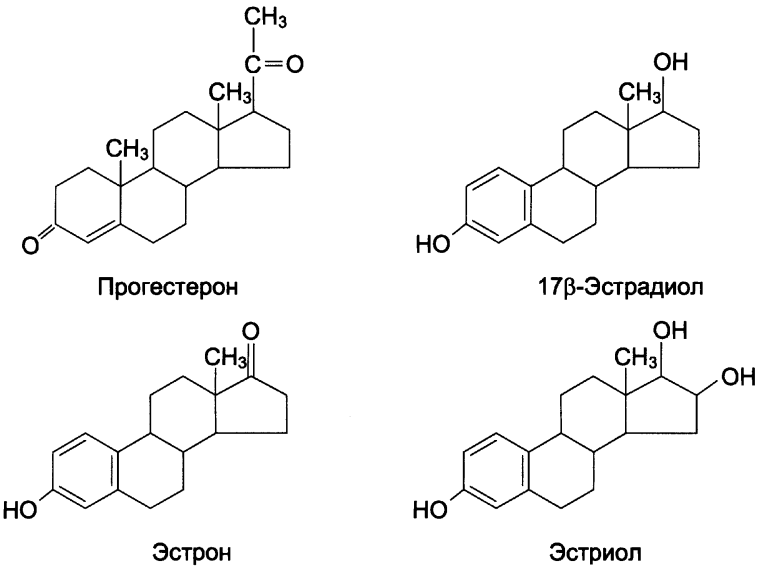


Рис. 11-42. Женские половые гормоны.

рования, которые протекают с участием O_2 и NADPH.

Непосредственно в клетках теки синтезируется очень небольшое количество эстрогенов. Значительная часть эстрогенов продуцируется путём периферической ароматизации андрогенов в жёлтом теле, фетоплацентарном комплексе (во время беременности), корой надпочечников, в жировых клетках, печени, коже и других тканях, где обнаружена повышенная ароматазная активность.

В клетках гранулёзы может синтезироваться менее активный эстроген — эстрон, а ещё менее активный эстриол образуется из эстрона в крови. В печени β-эстрадиол инактивируется в результате гидроксилирования ароматического кольца по атому углерода C_2 и образования конъюгатов с серной или глюкуроновой кислотами, которые и выводятся из организма с жёлчью или мочой.

Примерно 95% циркулирующих в крови эстрогенов связано с транспортными белками — СГСБ (секс-гормонсвязывающий белок) и альбумином. Биологической активностью обладает только свободная форма эстрогенов.

2. Регуляция секреции эстрогенов

В детском возрасте незрелые яичники вырабатывают небольшое количество гормонов, поэтому концентрация эстрогенов в крови низкая. В пубертатный период чувствительность гипоталамо-гипофизарной системы к действию ЛГ и ФСГ снижается. Импульсная секреция гонадотропин-рилизинг-гормона устанавливает суточный ритм секреции ЛГ и ФСГ. В начале каждого менструального цикла секреция ФСГ и ЛГ вызывает развитие первичных фолликулов. Созревающий фолликул в результате совместного действия ЛГ, стимулирующего продукцию андрогенов клетками теки, и ФСГ, стимулирующего ароматизацию андрогенов, секретирует эстрогены, которые по механизму отрицательной обратной связи угнетают секрецию ФСГ. Концентрация ФСГ в крови остаётся низкой ещё и в результате торможения секреции этого гормона белком ингибином, выделяемым яичниками (рис. 11-43).

По мере созревания фолликула (фолликулярная фаза) концентрация эстрадиола повышается, чувствительность гипофизарных клеток к гонадолиберину возрастает, и эстрадиол по механизму положительной обратной связи повышает секрецию ЛГ и ФСГ.

Повышение секреции ЛГ приводит к овуляции — освобождению яйцеклетки из лопнувшего фолликула. После овуляции клетки гранулёзы превращаются в жёлтое тело, которое, помимо эстрадиола, начинает вырабаты-

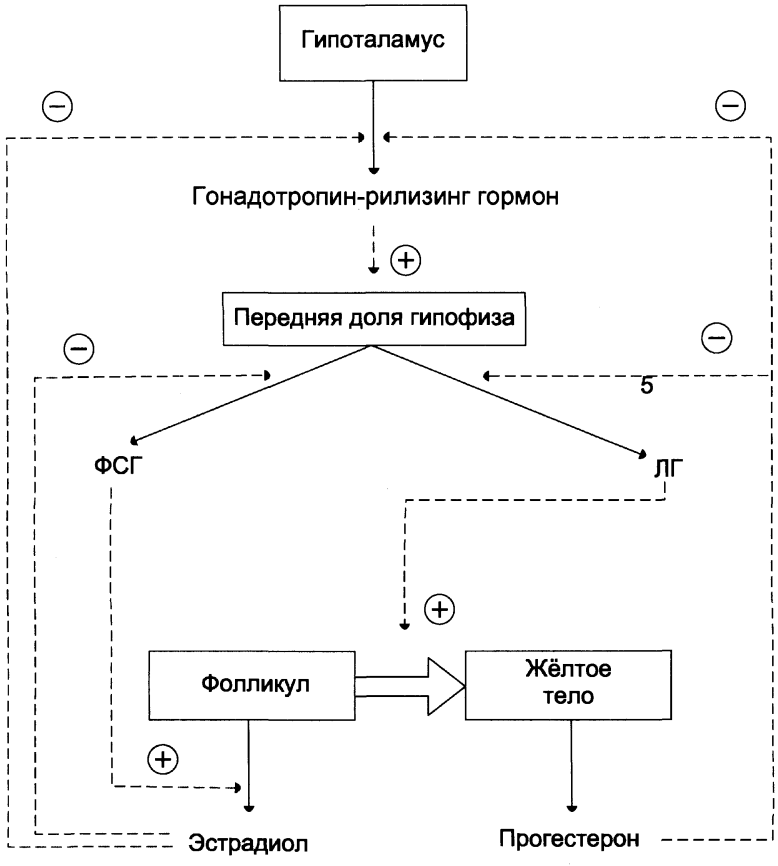


Рис. 11-43. Регуляция секреции женских половых гормонов. Гонадотропин-рилизинг гормон стимулирует секрецию ЛГ и ФСГ, которые совместно с эстрогеном и прогестероном регулируют половой цикл у женщин. Эстрадиол и прогестерон по механизму отрицательной обратной связи регулируют синтез и секрецию ЛГ и ФСГ.

вать всё большее количество основного гормона лютеиновой фазы — прогестерона (прогестина). Если возникает беременность, жёлтое тело продолжает функционировать и секретировать прогестерон, однако на более поздних этапах беременности прогестерон в основном продуцируется плацентой. Если оплодотворение не происходит, высокая концентрация прогестерона в плазме крови по механизму отрицательной обратной связи угнетает активность гипоталамо-гипофизарной системы, тормозится секреция ЛГ и ФСГ, жёлтое тело разрушается, и снижается продукция стероидов яичниками. Наступает менструация, которая длится примерно 5 дней, после чего начинает формироваться новый поверхностный слой эндометрия, и возникает новый цикл.

3. Механизм действия и биологические эффекты эстрогенов

Эстрогены связываются с внутриклеточными рецепторами и, подобно другим стероидным гормонам, регулируют транскрипцию структурных генов. Предполагается, что эстрогены индуцируют синтез свыше 50 различных белков, участвующих в проявлении физиологических эффектов эстрогенов.

Эстрогены стимулируют развитие тканей, участвующих в размножении, определяют развитие многих женских вторичных половых признаков, регулируют транскрипцию гена рецептора прогестина. В лютеиновой фазе под действием эстрогенов вместе с прогестинами пролиферативный эндометрий (эпителий матки) превращается в секреторный, подготавливая его к имплантации оплодотворённой яйце-

клетки. Совместно с простагландином $F_2\alpha$ эстрогены увеличивают чувствительность миометрия к действию окситоцина во время родов. Эстрогены оказывают анаболическое действие на кости и хрящи. Другие метаболические эффекты эстрогенов включают поддержание нормальной структуры кожи и кровеносных сосудов у женщин, способствуют образованию оксида азота в сосудах гладких мышц, что вызывает их расширение и усиливает теплоотдачу. Эстрогены стимулируют синтез транспортных белков тиреоидных и половых гормонов. Эстрогены могут индуцировать синтез факторов свёртывания крови II, VII, IX и X, уменьшать концентрацию антитромбина III.

Эстрогены оказывают влияние на обмен липидов. Так, увеличение скорости синтеза ЛПВП и торможение образования ЛПНП, вызываемое эстрогенами, приводит к снижению содержания холестерола в крови.

4. Образование прогестерона

Прогестерон, образующийся главным образом жёлтым телом во время менструации в лютеиновую фазу, секретируется также фетоплацентарным комплексом во время беременности. В небольших количествах он вырабатывается у женщин и мужчин корой надпочечников. В фолликулярной фазе менструального цикла концентрация прогестерона в плазме обычно не превышает 5 нмоль/л, а в лютеиновой фазе увеличивается до 40–50 нмоль/л. В крови прогестерон связывается с транспортным глобулином транскортином и альбумином, и только 2% гормона находится в свободной биологически активной форме. Диффундируя в клетки-мишени, прогестерон связывается со специфическим ядерным рецептором. Образующийся комплекс гормон—рецептор взаимодействует с промоторным участком ДНК и активирует транскрипцию генов. $T_{1/2}$ прогестерона в крови составляет 5 мин. В печени гормон конъюгируется с глюкуроновой кислотой и выводится с мочой.

5. Биологические эффекты прогестерона

Действие прогестерона в основном направлено на репродуктивную функцию организма. Образование прогестерона отвечает за увеличение базальной температуры тела на 0,2–0,5 °С, которое происходит сразу после овуляции и сохраняется на протяжении лютеиновой фазы менструального цикла. При высоких концентрациях прогестерон взаимодействует с рецепторами, локализованными в клетках почечных канальцев, конкурируя таким образом с альдостероном. В результате конкурентного игибирования альдостерон теряет возможность стимулировать реабсорбцию натрия.

Прогестерон может также оказывать действие и на ЦНС, в частности вызывать некоторые особенности поведения в предменструальный период.

РАЗДЕЛ 12

ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ОРГАНИЗМЕ

Печень — самая крупная железа пищеварительного тракта. Она выполняет в организме функцию биохимической лаборатории и играет важную роль в белковом, углеводном и липидном обменах (см. ниже). В печени синтезируются важнейшие белки плазмы крови: альбумин, фибриноген, протромбин, церулоплазмин, трансферрин, ангиотензиноген и др. Через эти белки опосредуется участие печени в таких важных процессах, как поддержание онкотического давления, регуляция АД и объёма циркулирующей крови, свёртывание крови, метаболизм железа и др.

Важнейшая функция печени — детоксикационная (или барьерная). Она имеет существенное значение для сохранения жизни организма. В печени происходит обезвреживание таких веществ, как билирубин и продукты катаболизма аминокислот в кишечнике, а также инактивируются лекарственные препараты и токсические вещества экзогенного происхождения, NH_3 — продукт азотистого обмена, который в результате ферментативных реакций превращается в нетоксичную мочевину, гормоны и биогенные амины.

Вещества, поступающие в организм из окружающей среды и не используемые им для построения тканей организма или как источники энергии, называют чужеродными веществами, или ксенобиотиками. Эти вещества могут попадать в организм с пищей, через кожу или с вдыхаемым воздухом.

Чужеродные вещества, или ксенобиотики, делят на 2 группы:

- продукты хозяйственной деятельности человека (промышленность, сельское хозяйство, транспорт);
- вещества бытовой химии — моющие средства, вещества для борьбы с насекомыми, парфюмерия.

Гидрофильные ксенобиотики выводятся из организма в неизменённом виде с мочой, гидрофобные могут задерживаться в тканях, связываясь с белками или образуя комплексы с липидами клеточных мембран. Со временем накопление в клетках тканей чужеродного вещества приведёт к нарушению их функций. Для удаления таких ненужных для организма веществ в процессе эволюции выработались механизмы их детоксикации (обезвреживания) и выведения из организма.

Основные функции печени

Обмен углеводов

Глюконеогенез
Синтез и распад гликогена

Обмен липидов и их производных

Синтез жирных кислот и жиров из углеводов
Синтез и выведение холестерина
Формирование липопротеинов
Кетогенез
Синтез жёлчных кислот
25-гидроксилирование витамина D_3

Обмен белков

Синтез белков плазмы крови (включая некоторые факторы свёртывания крови)
Синтез мочевины (обезвреживание аммиака)

Обмен гормонов

Метаболизм и выделение стероидных гормонов
Метаболизм полипептидных гормонов

Метаболизм и экскреция билирубина

Депонирование

гликогена
витамина А
витамина B_{12}
железа

Лекарства и чужеродные вещества

Метаболизм и экскреция

I. МЕХАНИЗМЫ ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ КСЕНОБИОТИКОВ

Обезвреживание большинства ксенобиотиков происходит путём химической модификации и протекает в 2 фазы (рис. 12-1). В результате этой серии реакций ксенобиотики становятся более гидрофильными и выделяются с мочой. Вещества, более гидрофобные или обладающие большой молекулярной массой (>300 кД), чаще выводятся с жёлчью в кишечник и затем удаляются с фекалиями.

Система обезвреживания включает множество разнообразных ферментов, под действием которых практически любой ксенобиотик может быть модифицирован.

Микросомальные ферменты катализируют реакции С-гидроксилирования, N-гидроксилирования, О-, N-, S-дезалкилирования, окислительного дезаминирования, сульфоокисления и эпоксидирования (табл. 12-1).

В мембранах ЭР практически всех тканей локализована система микросомального окисления (монооксигеназного окисления). В эксперименте при выделении ЭР из клеток мембрана распадается на части, каждая из которых образует замкнутый пузырёк — микросому, отсюда и название — микросомальное окисление. Эта система обеспечивает первую фазу обезвреживания большинства гидрофобных веществ.

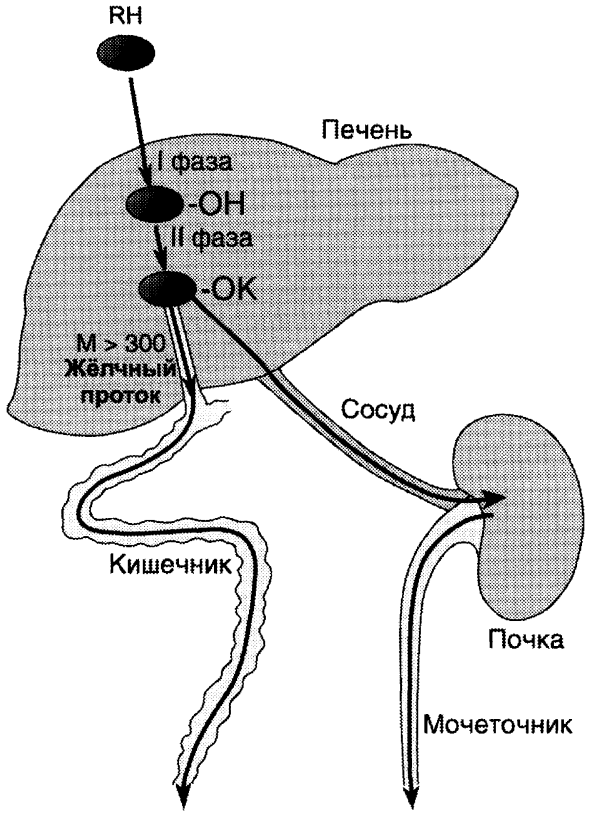


Рис. 12-1. Метаболизм и выведение ксенобиотиков из организма. RH — ксенобиотик; K — группа, используемая при конъюгации (глутатион, глюкуронил и др.); M — молекулярная масса. Из множества цитохром P_{450}-зависимых реакций на рисунке приведена только одна — схема гидроксилирования ксенобиотика. В ходе первой фазы в структуру вещества RH вводится полярная группа OH^-. Далее происходит реакция конъюгации; конъюгат в зависимости от растворимости и молекулярной массы удаляется либо почками, либо с фекалиями.

Таблица 12-1. Возможные модификации ксенобиотиков в первой фазе обезвреживания

Превращения ксенобиотиков (первая фаза)	Схема реакции
Гидроксилирование	$RH \rightarrow ROH$
Окисление по атому серы (сульфоокисление)	$R\text{-}S\text{-}R' \rightarrow R\text{-}\underset{\underset{O}{\|}}{S}\text{-}R'$
Окислительное дезаминирование	$RNH_2 \rightarrow R{=}O + NH_3$
Дезалкилирование по азоту, кислороду, сере	$RNHCH_3 \rightarrow RNH_2 + H_2C{=}O$ $ROCH_3 \rightarrow ROH + H_2C{=}O$ $RSCH_3 \rightarrow RSH + H_2C{=}O$
Эпоксидирование	$R\text{-}CH{=}CH\text{-}R' \rightarrow R\text{-}\underset{\diagdown\,O\,\diagup}{CH\text{-}CH}\text{-}R'$

В метаболизме ксенобиотиков могут принимать участие ферменты почек, лёгких, кожи и ЖКТ, но наиболее активны они в печени. К группе микросомальных ферментов относят специфические оксидазы, различные гидролазы и ферменты конъюгации.

Вторая фаза — реакции конъюгации, в результате которых чужеродное вещество, модифицированное ферментными системами ЭР, связывается с эндогенными субстратами — глюкуроновой кислотой, серной кислотой, глицином, глутатионом. Образовавшийся конъюгат удаляется из организма.

А. Микросомальное окисление

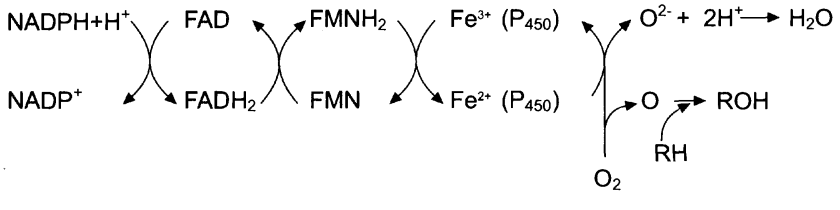
Микросомальные оксидазы — ферменты, локализованные в мембранах гладкого ЭР, функционирующие в комплексе с двумя внемитохондриальными ЦПЭ. Ферменты, катализирующие восстановление одного атома молекулы O_2 с образованием воды и включение другого атома кислорода в окисляемое вещество, получили название микросомальных оксидаз со смешанной функцией или микросомальных монооксигеназ. Окисление с участием монооксигеназ обычно изучают, используя препараты микросом.

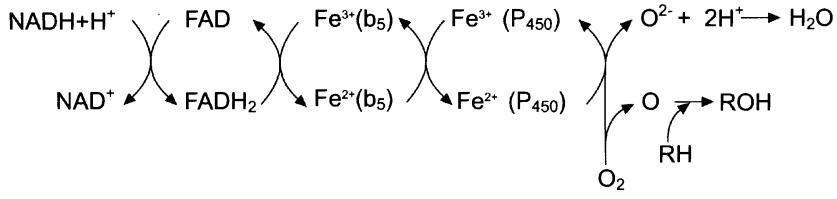
1. Основные ферменты микросомальных электронтранспортных цепей

Микросомальная система не содержит растворимых в цитозоле белковых компонентов, все ферменты — мембранные белки, активные центры которых локализованы на цитоплазматической поверхности ЭР. Система включает несколько белков, составляющих электронтранспортные цепи (ЦПЭ). В ЭР существуют две такие цепи, первая состоит из двух ферментов — NADPH-P_{450} редуктазы и цитохрома P_{450}, вторая включает фермент NADH-цитохром-b_5 редуктазу, цитохром b_5 и ещё один фермент — стеароил-КоА-десатуразу.

Электронтранспортная цепь — NADPH-P_{450} редуктаза — цитохром P_{450}. В большинстве случаев донором электронов ($\bar{e}$) для этой цепи служит NADPH, окисляемый NADPH-P_{450} редуктазой. Фермент в качестве простетической группы содержит 2 кофермента — флавинадениндинуклеотид (FAD) и флавинмононуклеотид (FMN). Протоны и электроны с NADPH переходят последовательно на коферменты NADPH-P_{450} редуктазы. Восстановленный FMN ($FMNH_2$) окисляется цитохромом P_{450} (см. схему ниже).

Цитохром P_{450} — гемопротеин, содержит простетическую группу гем и имеет участки связы-





вания для кислорода и субстрата (ксенобиотика). Название цитохром P_{450} указывает на то, что максимум поглощения комплекса цитохрома P_{450} лежит в области 450 нм.

Окисляемый субстрат (донор электронов) для NADH-цитохром b_5-редуктазы — NADH (см. схему выше). Протоны и электроны с NADH переходят на кофермент редуктазы FAD, следующим акцептором электронов служит Fe^{3+} цитохрома b_5. Цитохром b_5 в некоторых случаях может быть донором электронов ($\bar{e}$) для цитохрома P_{450} или для стеароил-КоА-десатуразы, которая катализирует образование двойных связей в жирных кислотах, перенося электроны на кислород с образованием воды (рис. 12-2).

NADH-цитохром b_5 редуктаза — двухдоменный белок. Глобулярный цитозольный домен связывает простетическую группу — кофермент FAD, а единственный гидрофобный «хвост» закрепляет белок в мембране.

Цитохром b_5 — гемсодержащий белок, который имеет домен, локализованный на поверхности мембраны ЭР, и короткий «заякоренный» в липидном бислое спирализованный домен.

NADH-цитохром b_5-редуктаза и цитохром b_5, являясь «заякоренными» белками, не фиксированы строго на определённых участках мембраны ЭР и поэтому могут менять свою локализацию.

2. Функционирование цитохрома P_{450}

Известно, что молекулярный кислород в триплетном состоянии инертен и не способен взаимодействовать с органическими соединениями. Чтобы сделать кислород реакционно-способным, необходимо его превратить в синглетный, используя ферментные системы его восстановления. К числу таковых принадлежит монооксигеназная система, содержащая цитохром P_{450}. Связывание в активном центре цитохрома P_{450} липофильного вещества RH и молекулы кислорода повышает окислительную активность фер-

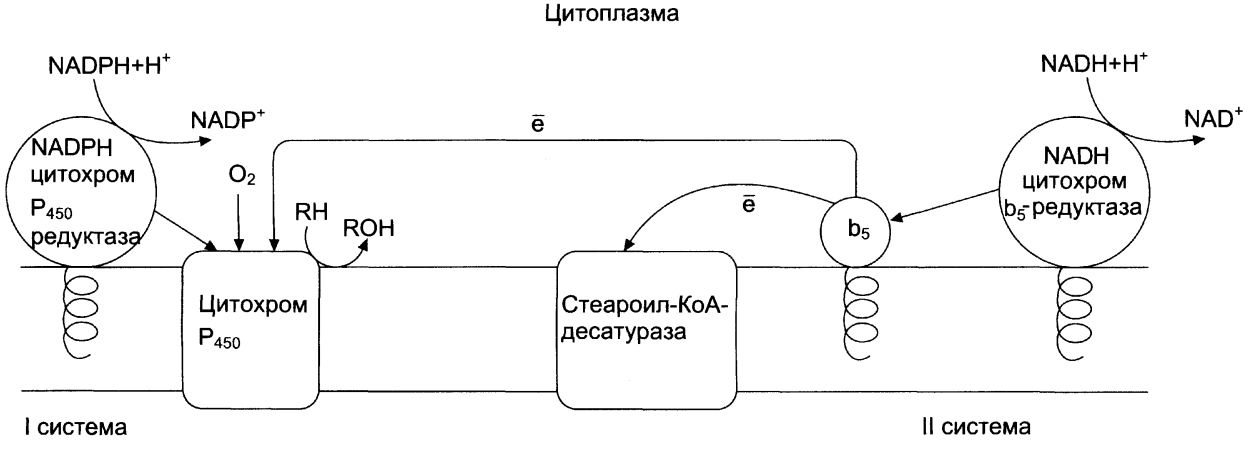


Рис. 12-2. Электронтранспортные цепи ЭР. RH — субстрат цитохрома P_{450}; стрелками показаны реакции переноса электронов. В одной системе NADPH окисляется NADPH цитохром P_{450}-редуктазой, которая затем передаёт электроны на целое семейство цитохромов P_{450}. Вторая система включает в себя окисление NADH цитохром b_5-редуктазой, электроны переходят на цитохром b_5; восстановленную форму цитохрома b_5 окисляет стеароил-КоА-десатураза, которая переносит электроны на O_2.

мента. Один атом кислорода принимает 2 $\bar{e}$ и переходит в форму O^{2-}. Донором электронов служит NADPH, который окисляется NADPH-цитохром P_{450} редуктазой. O^{2-} взаимодействует с протонами: $O^{2-} + 2H^+ \rightarrow H_2O$, и образуется вода. Второй атом молекулы кислорода включается в субстрат RH, образуя гидроксильную группу вещества R-OH (рис. 12-3).

Суммарное уравнение реакции гидроксилирования вещества RH ферментами микросомального окисления:

$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NADP^+.$$

Субстратами P_{450} могут быть многие гидрофобные вещества как экзогенного (лекарственные препараты, ксенобиотики), так и эндогенного (стероиды, жирные кислоты и др.) происхождения.

Таким образом, в результате первой фазы обезвреживания с участием цитохрома P_{450} происходит модификация веществ с образованием функциональных групп, повышающих растворимость гидрофобного соединения. В результате модификации возможна потеря молекулой её биологической активности или даже формирование более активного соединения, чем вещество, из которого оно образовалось.

3. Свойства системы микросомального окисления

Важнейшие свойства ферментов микросомального окисления: широкая субстратная специфичность, которая позволяет обезвреживать самые разнообразные по строению вещества, и регуляция активности по механизму индукции.

Широкая субстратная специфичность. Изоформы P_{450}

К настоящему времени описано около 150 генов цитохрома P_{450}, кодирующих различные изоформы фермента. Каждая из изоформ P_{450} имеет много субстратов. Этими субстратами могут быть как эндогенные липофильные вещества, модификация которых входит в путь нормального метаболизма этих соединений, так и гидрофобные ксенобиотики, в том числе лекарства. Определённые изоформы цитохрома

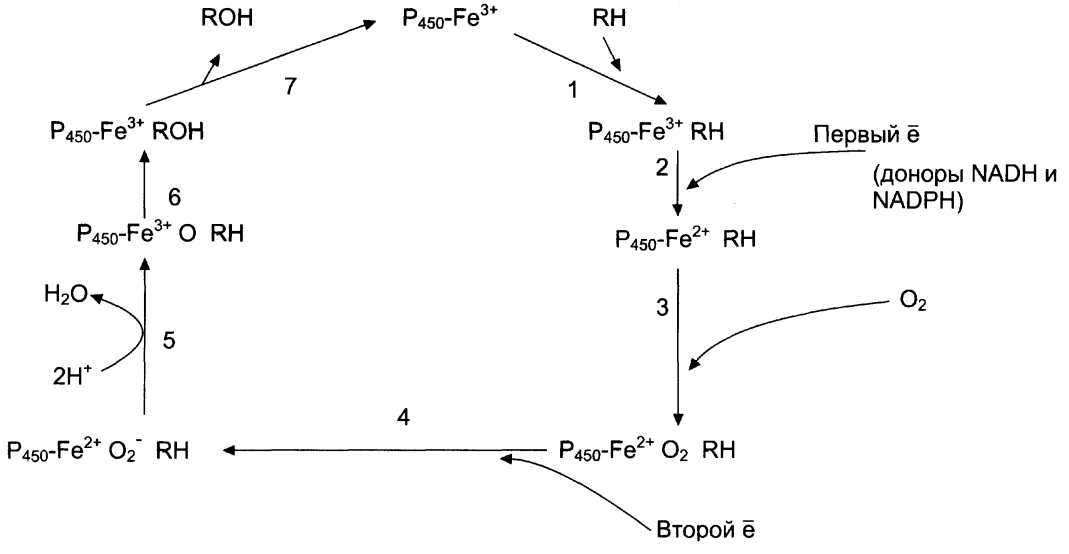


Рис. 12-3. Транспорт электронов при монооксигеназном окислении с участием P_{450}. Связывание (1) в активном центре цитохрома P_{450} вещества RH активирует восстановление железа в геме — присоединяется первый электрон (2). Изменение валентности железа увеличивает сродство комплекса P_{450}-Fe^{2+}·RH к молекуле кислорода (3). Появление в центре связывания цитохрома P_{450} молекулы O_2 ускоряет присоединение второго электрона и образование комплекса P_{450}-$Fe^{2+}O_2^-$-RH (4). На следующем этапе (5) Fe^{2+} окисляется, второй электрон присоединяется к молекуле кислорода P_{450}-$Fe^{3+}O_2^{2-}$. Восстановленный атом кислорода (O^{2-}) связывает 2 протона, и образуется 1 молекула воды. Второй атом кислорода идёт на построение OH-группы (6). Модифицированное вещество R-OH отделяется от фермента (7).

P_{450} участвуют в метаболизме низкомолекулярных соединений, таких как этанол и ацетон.

Регуляция активности микросомальной системы окисления

Регуляция активности микросомальной системы осуществляется на уровне транскрипции или посттранскрипционных изменений. Индукция синтеза позволяет увеличить количество ферментов в ответ на поступление или образование в организме веществ, выведение которых невозможно без участия системы микросомального окисления.

В настоящее время описано более 250 химических соединений, вызывающих индукцию микросомальных ферментов. К числу этих индукторов относят барбитураты, полициклические ароматические углеводороды, спирты, кетоны и некоторые стероиды. Несмотря на разнообразие химического строения, все индукторы имеют ряд общих признаков; их относят к числу липофильных соединений, и они служат субстратами для цитохрома P_{450}.

Б. Конъюгация — вторая фаза обезвреживания веществ

Вторая фаза обезвреживания веществ — реакции конъюгации, в ходе которых происходит присоединение к функциональным группам, образующимся на первом этапе, других молекул или групп эндогенного происхождения, увеличивающих гидрофильность и уменьшающих токсичность ксенобиотиков (табл. 12-2).

1. Участие трансфераз в реакциях конъюгации

Все ферменты, функционирующие во второй фазе обезвреживания ксенобиотиков, относят к классу трансфераз. Они характеризуются широкой субстратной специфичностью.

УДФ-глюкуронилтрансферазы

Локализированные в основном в ЭР уридиндифосфат (УДФ)-глюкуронилтрансферазы присоединяют остаток глюкуроновой кислоты к молекуле вещества, образованного в ходе микросомального окисления (рис. 12-4).

В общем виде реакция с участием УДФ-глюкуронилтрансферазы записывается так:

$$ROH + УДФ\text{-}C_6H_9O_6 = RO\text{-}C_6H_9O_6 + УДФ.$$

Сульфотрансферазы

Цитоплазматические сульфотрансферазы катализируют реакцию конъюгации, в ходе которой остаток серной кислоты ($-SO_3H$) от 3′-фосфоаденозин-5′-фосфосульфата (ФАФС) присоединяется к фенолам, спиртам или аминокислотам (рис. 12-5).

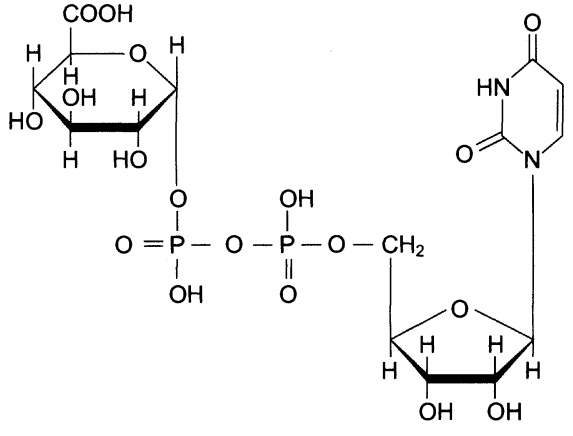


Рис. 12-4. Уридиндифосфоглюкуроновая кислота (УДФ-$C_6H_9O_6$).

Таблица 12-2. Основные ферменты и метаболиты, участвующие в конъюгации

Фермент	Метаболит, используемый для конъюгации	Активная форма метаболитов
Глутатионтрансфераза	Глутатион (GSH)	Глутатион (GSH)
УДФ-глюкуронилтрансфераза	Глюкуронат	УДФ-глюкуронат
Сульфотрансфераза	Сульфат	ФАФС
Ацетилтрансфераза	Ацетат	Ацетил КоА
Метилтрансфераза	Метил	SAM

Реакция с участием сульфотрансферазы в общем виде записывается так:

$$ROH + ФАФ\text{-}SO_3H = RO\text{-}SO_3H + ФАФ.$$

Ферменты сульфотрансферазы и УДФ-глюкуронилтрансферазы участвуют в обезвреживании ксенобиотиков, инактивации лекарств и эндогенных биологически активных соединений.

Глутатионтрансферазы

Особое место среди ферментов, участвующих в обезвреживании ксенобиотиков, инактивации нормальных метаболитов, лекарств, занимают глутатионтрансферазы (ГТ). Глутатионтрансферазы функционируют во всех тканях и играют важную роль в инактивации собственных метаболитов: некоторых стероидных гормонов, простагландинов, билирубина, жёлчных кислот, продуктов ПОЛ.

Известно множество изоформ ГТ с различной субстратной специфичностью. В клетке ГТ в основном локализованы в цитозоле, но имеются варианты ферментов в ядре и митохондриях. Для работы ГТ требуется глутатион (GSH) (рис. 12-6).

Глутатион — трипептид Глу-Цис-Гли (остаток глутаминовой кислоты присоединён к цистеину карбоксильной группой радикала).

ГТ обладают широкой специфичностью к субстратам, общее количество которых превышает 3000. ГТ связывают очень многие гидрофобные вещества и инактивируют их, но химической модификации с участием глутатиона подвергаются только те, которые имеют полярную группу. То есть субстратами служат вещества, которые, с одной стороны, имеют электрофильный центр (например, ОН-группу), а с другой стороны — гидрофобные зоны. Обезвреживание, т.е. химическая модификация ксенобиотиков с участием ГТ, может осуществляться тремя различными способами:

- путём конъюгации субстрата R с глутатионом (GSH):

$$\mathbf{R + GSH \rightarrow GSRH,}$$

- в результате нуклеофильного замещения:

$$\mathbf{RX + GSH \rightarrow GSR + HX,}$$

- восстановления органических пероксидов до спиртов:

$$\mathbf{R\text{-}HC\text{-}O\text{-}OH + 2\ GSH \rightarrow R\text{-}HC\text{-}OH + GSSG + H_2O.}$$

В реакции: ООН — гидропероксидная группа, GSSG — окисленный глутатион.

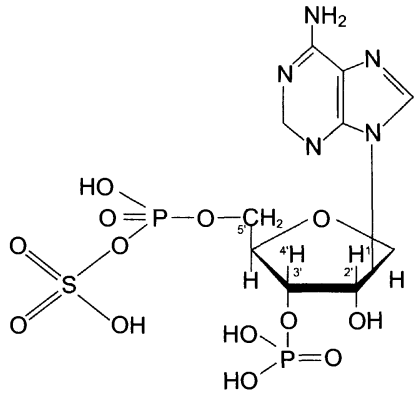


Рис. 12-5. 3′-Фосфоаденозин-5′-фосфосульфат (ФАФ-SO_3H).

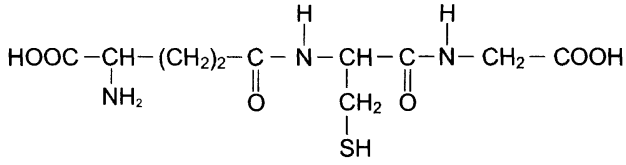


Рис. 12-6. Глутатион (GSH).

Система обезвреживания с участием ГТ и глутатиона играет уникальную роль в формировании резистентности организма к самым различным воздействиям и является наиболее важным защитным механизмом клетки. В ходе биотрансформации некоторых ксенобиотиков под действием ГТ образуются тиоэфиры (конъюгаты RSG), которые затем превращаются в меркаптаны, среди которых обнаружены токсические продукты. Но конъюгаты GSH с большинством ксенобиотиков менее реакционно-способны и более гидрофильны, чем исходные вещества, а поэтому менее токсичны и легче выводятся из организма (рис. 12-7).

ГТ своими гидрофобными центрами могут нековалентно связывать огромное количество липофильных соединений (физическое обезвреживание), предотвращая их внедрение в липидный слой мембран и нарушение функций клетки. Поэтому ГТ иногда называют внутриклеточным альбумином.

ГТ могут ковалентно связывать ксенобиотики, являющиеся сильными электролитами. Присоединение таких веществ — «самоубийство» для ГТ, но дополнительный защитный механизм для клетки.

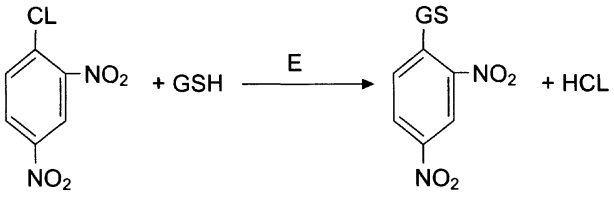


Рис. 12-7. Обезвреживание 1-хлор, 2,4-динитробензола с участием глутатиона.

Ацетилтрансферазы, метилтрансферазы

Ацетилтрансферазы катализируют реакции конъюгации — переноса ацетильного остатка от ацетил-КоА на азот группы $-SO_2NH_2$, например в составе сульфаниламидов. Мембранные и цитоплазматические метилтрансферазы с участием SAM метилируют группы -P=O, $-NH_2$ и SH-группы ксенобиотиков.

2. Роль эпоксидгидролаз в образовании диолов

Во второй фазе обезвреживания (реакции конъюгации) принимают участие и некоторые другие ферменты. Эпоксидгидролаза (эпоксидгидратаза) присоединяет воду к эпоксидам бензола, бензпирена и другим полициклическим углеводородам, образованным в ходе первой фазы обезвреживания, и превращает их в диолы (рис. 12-8). Эпоксиды, образовавшиеся при микросомальном окислении, являются канцерогенами. Они обладают высокой химической активностью и могут участвовать в реакциях неферментативного алкилирования ДНК, РНК, белков (см. раздел 16). Химические модификации этих молекул могут привести к перерождению нормальной клетки в опухолевую.

В. Гниение аминокислот в кишечнике. Обезвреживание и выведение продуктов гниения из организма

Аминокислоты, невсосавшиеся в клетки кишечника, используются микрофлорой толстой кишки в качестве питательных веществ. Ферменты бактерий расщепляют аминокислоты и превращают их в амины, фенолы, индол, скатол, сероводород и другие ядовитые для организма соединения. Этот процесс иногда называют гниением белков в кишечнике. В основе гниения лежат реакции декарбоксилирования и дезаминирования аминокислот.

Образование и обезвреживание п-крезола и фенола

Под действием ферментов бактерий из аминокислоты тирозина могут образовываться фенол и крезол путём разрушения боковых цепей аминокислот микробами (рис. 12-9).

Всосавшиеся продукты по воротной вене поступают в печень, где обезвреживание фенола и крезола может происходить путём конъюгации с сернокислотным остатком (ФАФС) или с глюкуроновой кислотой в составе УДФ-глюкуроната. Реакции конъюгации фенола и крезола с ФАФС катализирует фермент сульфотрансфераза (рис. 12-10).

Конъюгация глюкуроновых кислот с фенолом и крезолом происходит при участии фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы (рис. 12-11). Продукты конъюгации хорошо растворимы в воде и выводятся с мочой через почки. Повышение количества конъюгатов глюкуроновой кислоты с фенолом и крезолом обнаруживают в моче при

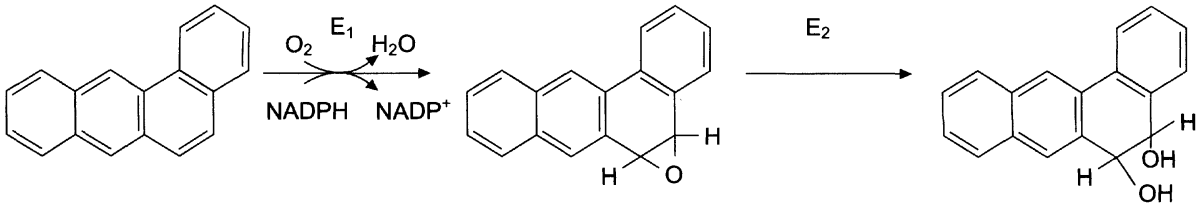


Рис. 12-8. Обезвреживание бензантрацена. E_1 — фермент микросомальной системы; E_2 — эпоксидгидратаза.

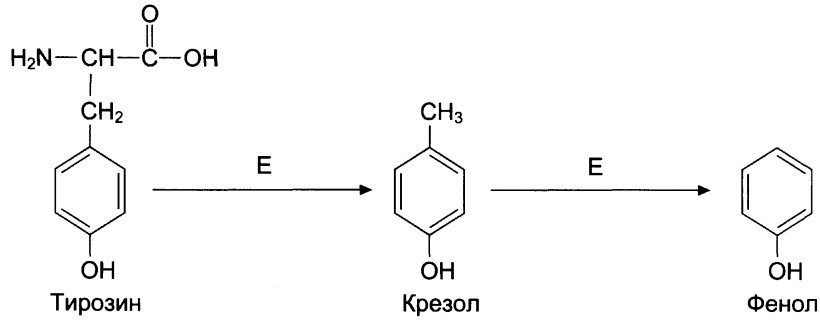


Рис. 12-9. Катаболизм тирозина под действием бактерий. E — бактериальные ферменты.

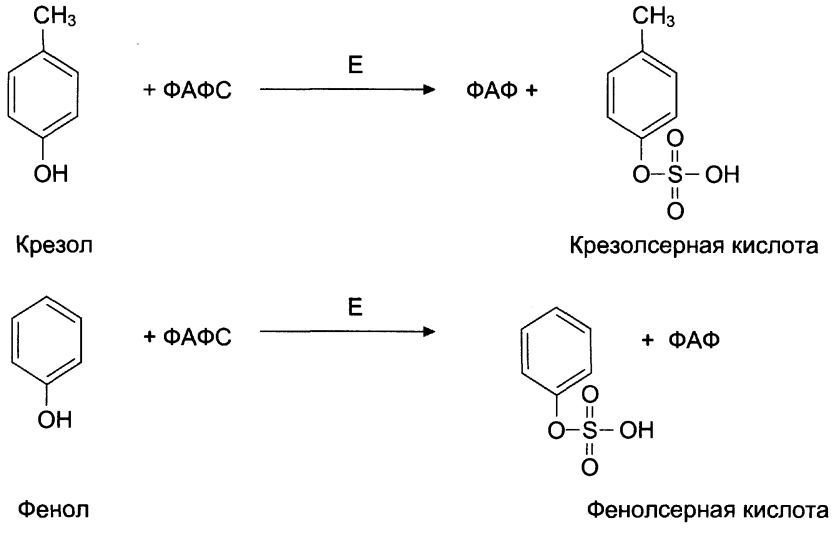


Рис. 12-10. Конъюгация фенола и крезола с ФАФС. E — сульфотрансфераза.

увеличении продуктов гниения белков в кишечнике.

Образование и обезвреживание индола и скатола

В кишечнике из аминокислоты триптофана микроорганизмы образуют индол и скатол. Бактерии разрушают боковую цепь триптофана, оставляя нетронутой кольцевую структуру.

Индол образуется в результате отщепления бактериями боковой цепи, возможно, в виде серина или аланина (рис. 12-12).

Скатол и индол обезвреживаются в печени в 2 этапа. Сначала в результате микросомального окисления они приобретают гидроксильную группу. Так, индол переходит в индоксил, а затем вступает в реакцию конъюгации с ФАФС, образуя индоксилсерную кислоту, калиевая соль которой получила название животного индикана (рис. 12-13).

Обезвреживание бензойной кислоты

Синтез гиппуровой кислоты из бензойной кислоты и глицина протекает у человека и большинства животных преимущественно в печени (рис. 12-14). Скорость этой реакции отражает функциональное состояние печени.

В клинической практике используют определение скорости образования и выведения гиппуровой кислоты после введения в организм ксенобиотика бензойной кислоты (бензойнокислого натрия) — проба Квика.

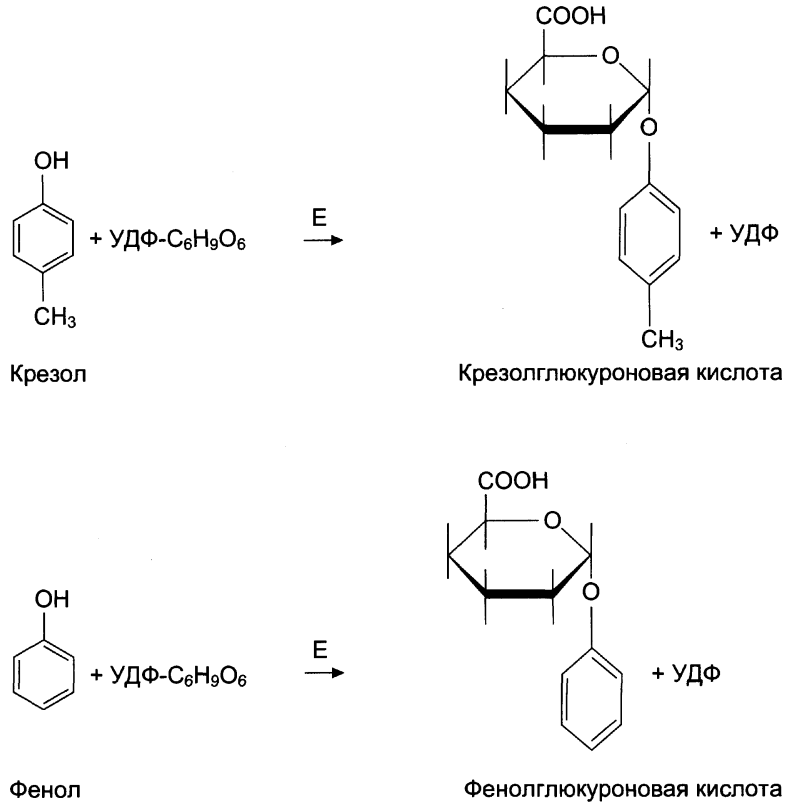


Рис. 12-11. Участие УДФ-глюкуронилтрансферазы в обезвреживании крезола и фенола. E — УДФ-глюкуронилтрансфераза.

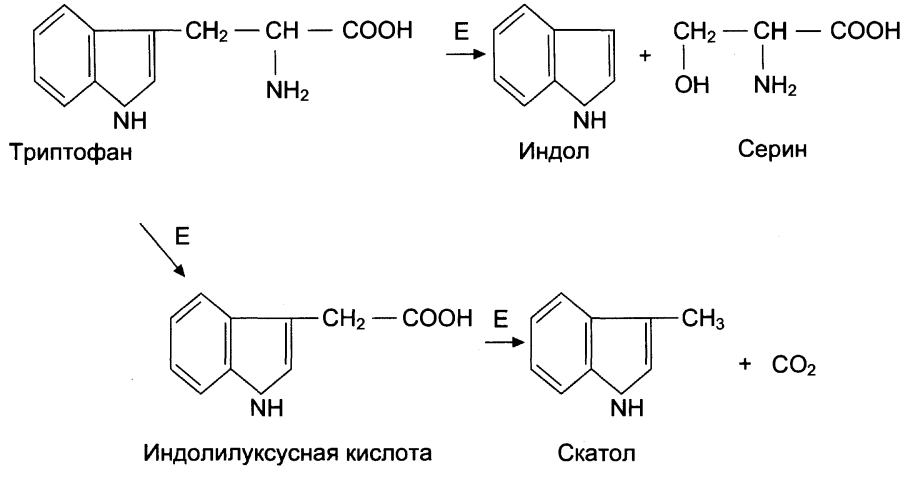


Рис. 12-12. Катаболизм триптофана под действием бактерий. E — бактериальные ферменты.

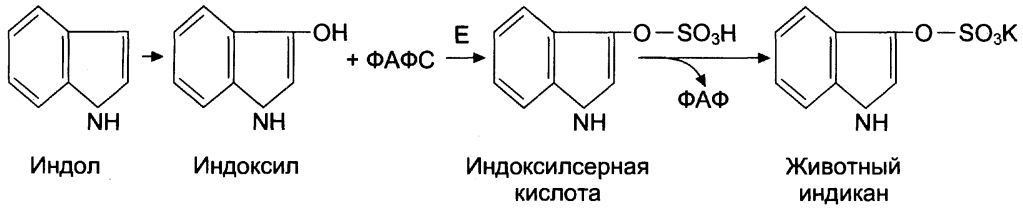


Рис. 12-13. Участие сульфотрансферазы в обезвреживании индола. E — сульфотрансфераза.

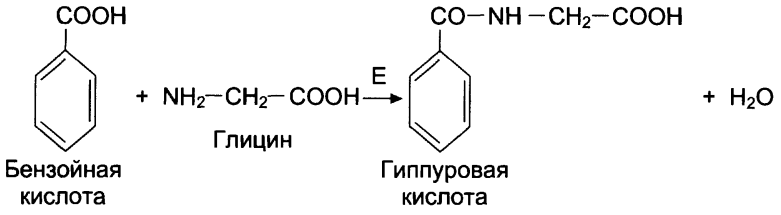


Рис. 12-14. Образование гиппуровой кислоты из бензойной кислоты и глицина. E — глицинтрансфераза.

Г. Связывание, транспорт и выведение ксенобиотиков

В плазме крови множество как эндогенных, так и экзогенных липофильных веществ транспортируются альбумином и другими белками.

Альбумин — основной белок плазмы крови, связывающий различные гидрофобные вещества. Он может функционировать в качестве белка-переносчика билирубина, ксенобиотиков, лекарственных веществ.

Помимо альбуминов, ксенобиотики могут транспортироваться по крови в составе липопротеинов, а также в комплексе с кислым α_1-гликопротеином. Особенность этого гликопротеина состоит в том, что он является индуцируемым белком, участвующим в ответной реакции организма на изменения, происходящие в состоянии стресса, например, при инфаркте миокарда, воспалительных процессах; его количество в плазме увеличивается наряду с другими протеинами. Связывая ксенобиотики, кислый α_1-гликопротеин инактивирует их и переносит в печень, где комплекс с белком распадается, и чужеродные вещества обезвреживаются и выводятся из организма.

Участие Р-гликопротеина в выведении ксенобиотиков

Очень важный механизм выведения из клетки гидрофобных ксенобиотиков — функционирование Р-гликопротеина (транспортная АТФ-аза). Р-гликопротеин — фосфогликопротеин с молекулярной массой 170 кД, присутствующий в плазматической мембране клеток многих тканей, в частности почек и кишечника. Полипептидная цепь этого белка содержит 1280 аминокислотных остатков, образуя 12 трансмембранных доменов и два АТФ-связывающих центра (рис. 12-15). В норме его функция состоит в экскреции ионов хлора и гидрофобных токсичных соединений из клеток.

Когда гидрофобное вещество (например, противоопухолевое лекарство) проникает в клетку, то оно удаляется из неё Р-гликопротеином с затратой энергии (рис. 12-16). Уменьшение количества лекарства в клетке снижает эффективность его применения при химиотерапии онкологических заболеваний.

Д. Индукция защитных систем

Многие ферменты, участвующие в первой и второй фазе обезвреживания, — индуцируемые белки. Ещё в древности царь Митридат знал, что если систематически принимать небольшие дозы яда, можно избежать острого отравления. «Эффект Митридата» основан на индукции определённых защитных систем (табл. 12-3).

В мембранах ЭР печени цитохрома P_{450} содержится больше (20%), чем других мембрано-

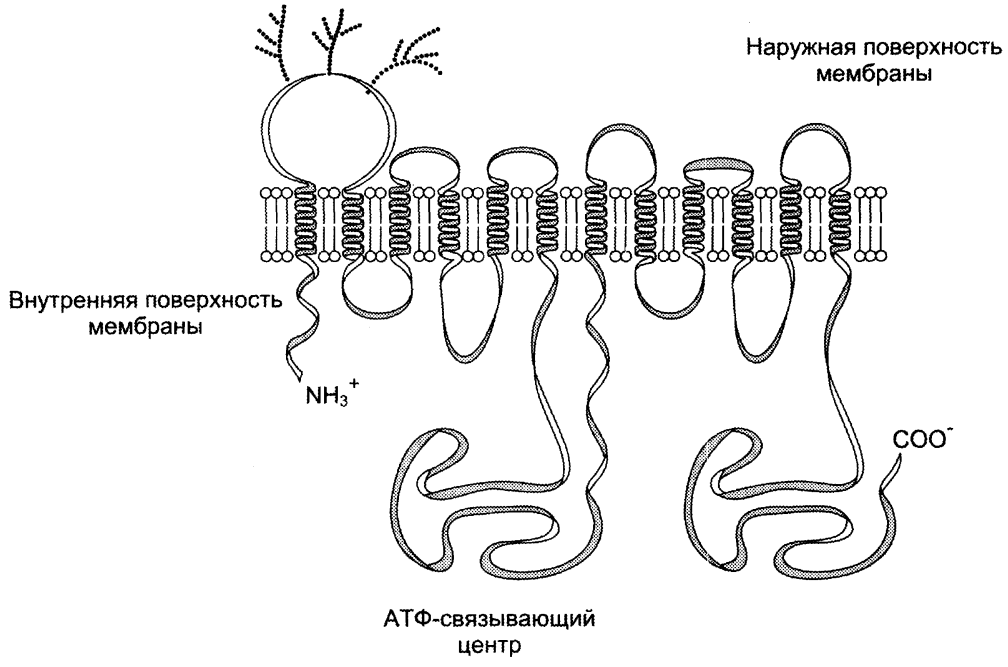


Рис. 12-15. Строение Р-гликопротеина. Р-гликопротеин — интегральный белок, имеющий 12 трансмембранных доменов, пронизывающих бислой цитоплазматической мембраны. N- и С-концы белка обращены в цитозоль. Участки Р-гликопротеина на наружной поверхности мембраны гликозилированы. Область между шестым и седьмым доменами имеет центры для присоединения АТФ и аутофосфорилирования.

связанных ферментов. Лекарственное вещество фенобарбитал активирует синтез цитохрома P_{450}, УДФ-глюкуронилтрансферазы и эпоксид гидролазы. Например, у животных, которым вводили индуктор фенобарбитал, увеличивается площадь мембран ЭР, которая достигает 90% всех мембранных структур клетки, и, как следствие, — увеличение количества ферментов, участвующих в обезвреживании ксенобиотиков или токсических веществ эндогенного происхождения.

При химиотерапии злокачественных процессов начальная эффективность лекарства часто постепенно падает. Более того, развивается множественная лекарственная устойчивость, т.е. устойчивость не только к этому лечебному препарату, но и целому ряду других лекарств. Это происходит потому, что противоопухолевые лекарства индуцируют синтез Р-гликопротеина, глутатионтрансферазы и глутатиона. Использование веществ, ингибирующих или активирующих синтез Р-гликопротеина, а также ферменты синтеза глутатиона, повышает эффективность химиотерапии.

Металлы являются индукторами синтеза глутатиона и низкомолекулярного белка металлотионеина, имеющих SH-группы, способные связывать их. В результате возрастает устойчивость клеток организма к ядам и лекарствам.

Повышение количества глутатионтрансфераз увеличивает способность организма приспосаб-

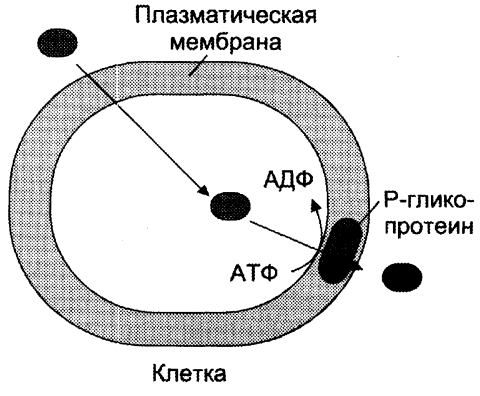


Рис. 12-16. Функционирование Р-гликопротеина. Заштрихованный овал — противоопухолевое лекарство (гидрофобное вещество).

Таблица 12-3. Индукция систем, обеспечивающих защиту от ксенобиотиков

Ферменты защитной системы	Фенобарбитал	Тяжёлые металлы	Противоопухолевые лекарства и другие гидрофобные вещества
Система цитохрома P_{450}	↑		
Эпоксидгидролазы	↑		
Глутатион и УДФ-глюкуронилтрансферазы	↑		
Синтез GSH		↑	↑
Металлотионеины		↑	
Р-гликопротеин			↑

ливаться к возрастающему загрязнению внешней среды. Индукцией фермента объясняют отсутствие антиканцерогенного эффекта при применении ряда лекарственных веществ. Кроме того, индукторы синтеза глутатионтрансферазы — нормальные метаболиты — половые гормоны, йодтиронины и кортизол. Катехоламины через аденилатциклазную систему фосфорилируют глутатионтрансферазу и повышают её активность.

Ряд веществ, в том числе и лекарств (например, тяжёлые металлы, полифенолы, S-алкилы глутатиона, некоторые гербициды), ингибируют глутатионтрансферазу.

II. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Лекарства, поступившие в организм, проходят следующие превращения:

- всасывание;
- связывание с белками и транспорт кровью;
- взаимодействие с рецепторами;
- распределение в тканях;
- метаболизм и выведение из организма.

Механизм первого этапа (всасывание) определяется физико-химическими свойствами лекарства. Гидрофобные соединения легко проникают через мембраны простой диффузией, в то время как лекарственные вещества, нерастворимые в липидах, проникают через мембраны путём трансмембранного переноса при участии разных типов транслоказ. Некоторые нерастворимые крупные частицы могут проникать в лимфатическую систему путём пиноцитоза.

Следующие этапы метаболизма лекарственного вещества в организме тоже определяются его химическим строением — гидрофобные молекулы перемещаются по крови в комплексе с альбумином, кислым α_1-гликопротеином или в составе липопротеинов. В зависимости от структуры лекарственное вещество может поступать из крови в клетку или, являясь аналогами эндогенных веществ, связываться рецепторами клеточной мембраны.

Действие на организм большинства лекарств прекращается через определённое время после их приёма. Прекращение действия может происходить потому, что лекарство выводится из организма либо в неизменённом виде — это характерно для гидрофильных соединений, либо в виде продуктов его химической модификации (биотрансформации).

A. Характер изменений при биотрансформации лекарственных веществ

Биохимические превращения лекарственных веществ в организме человека, обеспечивающие их инактивацию и детоксикацию, являются частным проявлением биотрансформации чужеродных соединений.

В результате биотрансформации лекарственных веществ может произойти:

- инактивация лекарственных веществ, т.е. снижение их фармакологической активности;
- повышение активности лекарственных веществ;
- образование токсических метаболитов.

Инактивация лекарственных веществ

Инактивация лекарственных веществ, как и всех ксенобиотиков, происходит в 2 фазы. Первая фаза — химическая модификация под действием ферментов монооксигеназной системы ЭР. Например, лекарственное вещество барбитурат в ходе биотрансформации превращается в гидроксибарбитурат, который далее участвует в реакции конъюгации с остатком глюкуроновой кислоты. Фермент глюкуронил-трансфераза катализирует образование барбитуратглюкуронида, в качестве источника глюкуроновой кислоты используется УДФ-глюкуронил (рис. 12-17).

В первую фазу обезвреживания под действием монооксигеназ образуются реакционно-способные группы -OH, -COOH, $-NH_2$, -SH и др. Химические соединения, уже имеющие эти группы, сразу вступают во вторую фазу обезвреживания — реакции конъюгации.

Повышение активности лекарств

В качестве примера повышения активности вещества в процессе его превращений в организме можно привести образование дезметилимипрамина из имипрамина. Дезметилимипрамин обладает выраженной способностью ослаблять депрессивное состояние при психических расстройствах (рис. 12-18).

Химические превращения некоторых лекарств в организме приводят к изменению характера их активности. Например, ипразид — антидепрессант, который в результате дезалкилирования превращается в изониазид, обладающий противотуберкулёзным действием (рис. 12-19).

Образование токсических продуктов в результате реакции биотрансформации. В отдельных случаях химические превращения лекарственных средств в организме могут приводить к появлению у них токсических свойств. Так, жаропонижающее, болеутоляющее, противовоспалительное средство фенацетин превращается в парафенетидин, вызывающий гипоксию за счёт образования метгемоглобина — неактивной формы Hb (рис. 12-20).

Реакции конъюгации лекарственных веществ

Вторая фаза инактивации — конъюгация (связывание) лекарственных веществ, как подвергшихся каким-либо превращениям на первом этапе, так и нативных препаратов. К продуктам, образованным ферментами микросомального окисления, может присоединяться глицин по карбоксильной группе, глюкуроновая кислота или остаток серной кислоты — по OH-группе, ацетильный остаток — к NH_2-группе.

В превращениях второй фазы инактивации лекарственных веществ принимают участие эн-

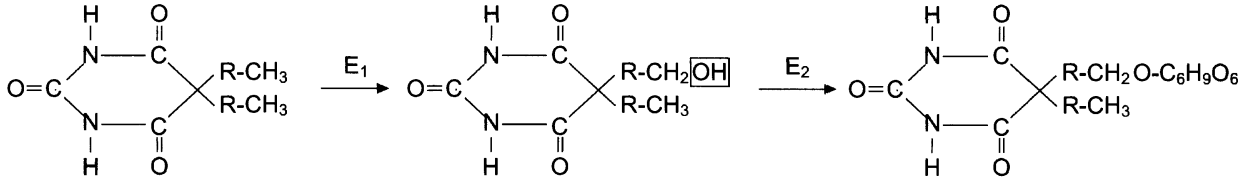


Рис. 12-17. Метаболизм барбитуратов в печени. E_1 — ферменты микросомального окисления; E_2 — глюкуронилтрансфераза.

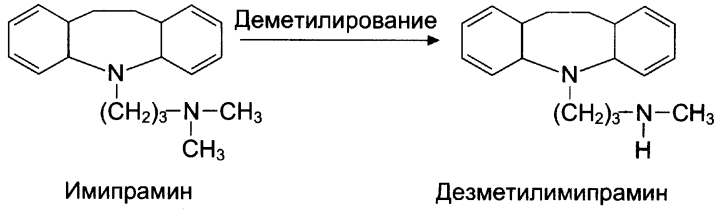


Рис. 12-18. Активация имипрамина в результате реакции деметилирования.

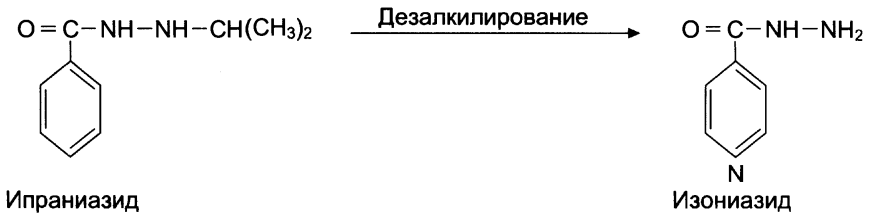


Рис. 12-19. Образование изониазида в ходе дезалкилирования ипраниазида.

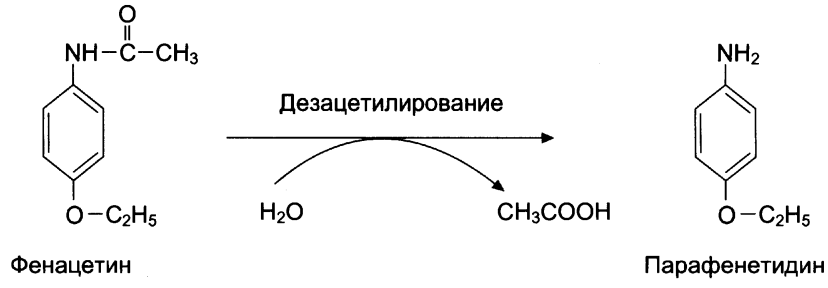


Рис. 12-20. Превращение фенацетина в токсический продукт — парафенетидин.

догенные соединения, образующиеся в организме с затратой энергии SAM: (АТФ), УДФ-глюкуронат (УТФ), Ацетил-КоА (АТФ) и др. Поэтому можно сказать, что реакции конъюгации сопряжены с использованием энергии этих макроэргических соединений.

Примером реакции конъюгации может служить глюкуронирование гидроксибарбитурата под действием глюкуронилтрансферазы, описанным ранее (см. рис. 12-17). В качестве примера О-метилирования лекарства можно привести один из этапов биотрансформации препарата метилдофа, нарушающего образование адренергического медиатора и применяемого в качестве гипотензивного средства (рис. 12-21).

В неизменённом виде выделяются главным образом высокогидрофильные соединения. Из липофильных веществ исключение составляют средства для ингаляционного наркоза, основная часть которых в химические реакции в организме не вступает. Они выводятся лёгкими в том же виде, в каком были введены.

Б. Факторы, влияющие на активность ферментов биотрансформации лекарств

Лекарственные средства в результате химической модификации, как правило, теряют свою биологическую активность. Таким образом, эти реакции лимитируют во времени действие ле-

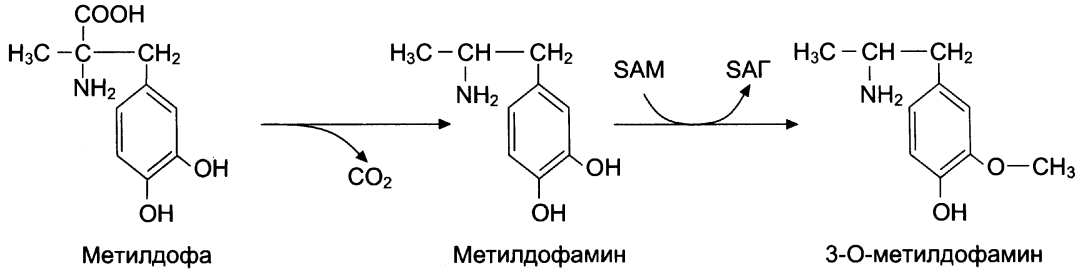


Рис. 12-21. Биотрансформация лекарственного вещества (метилдофа).

карств. При патологии печени, сопровождающейся снижением активности микросомальных ферментов, продолжительность действия ряда лекарственных веществ увеличивается.

Некоторые препараты снижают активность монооксигеназной системы. Например, левомицетин и бутадион ингибируют ферменты микросомального окисления. Антихолинэстеразные средства, ингибиторы моноаминооксидазы, нарушают функционирование фазы конъюгации, поэтому они пролонгируют эффекты препаратов, которые инактивируются этими ферментами. Кроме того, скорость каждой из реакций биотрансформации лекарственного вещества зависит от генетических, физиологических факторов и экологического состояния окружающей среды.

Возрастные особенности

Чувствительность к лекарственным средствам меняется в зависимости от возраста. Например, у новорождённых активность метаболизма лекарств в первый месяц жизни существенно отличается от взрослых. Это связано с недостаточностью многих ферментов, участвующих в биотрасформации лекарственных веществ, функции почек, повышенной проницаемостью гематоэнцефалического барьера, недоразвитием ЦНС. Так, новорождённые более чувствительны к некоторым веществам, влияющим на ЦНС (в частности, к морфину). Очень токсичен для них левомицетин; это объясняется тем, что в печени у новорождённых малоактивны ферменты, необходимые для его биотрансформации.

В пожилом возрасте метаболизм лекарственных веществ протекает менее эффективно: снижается функциональная активность печени, нарушается скорость экскреции препаратов почками. В целом чувствительность к большинству лекарственных средств в пожилом возрасте повышена, в связи с чем их доза должна быть снижена.

Генетические факторы

Индивидуальные различия в метаболизме ряда препаратов и в реакциях на препараты объясняют генетическим полиморфизмом, т.е. существованием в популяции изоформ некоторых ферментов биотрансформации.

В ряде случаев повышенная чувствительность к лекарственным средствам может быть обусловлена наследственной недостаточностью некоторых ферментов, участвующих в химической модификации. Например, при генетической недостаточности холинэстеразы плазмы крови длительность действия миорелаксанта дитилина резко возрастает и может достигать 6–8 ч и более (в обычных условиях дитилин действует в течение 5–7 мин). Известно, что скорость ацетилирования противотуберкулёзного средства изониазида варьирует довольно широко. Выделяют лиц с быстрой и медленной метаболизирующей активностью. Считают, что у лиц с медленной инактивацией изониазида нарушена структура белков, регулирующих синтез фермента ацетилтрансферазы, обеспечивающего конъюгацию изониазида с ацетильным остатком.

Факторы окружающей среды

Существенное влияние на метаболизм лекарственных веществ в организме оказывают также факторы окружающей среды, такие как ионизирующая радиация, температура, состав пищи и особенно различные химические вещества (ксенобиотики), в том числе и сами лекарственные вещества.

III. МЕТАБОЛИЗМ ЭТАНОЛА В ПЕЧЕНИ

Катаболизм этилового спирта осуществляется главным образом в печени. Здесь окисляется от 75% до 98% введённого в организм этанола.

Окисление алкоголя — сложный биохимический процесс, в который вовлекаются основные метаболические процессы клетки. Превращение этанола в печени осуществляется тремя путями с образованием токсического метаболита — ацетальдегида (рис. 12-22).

A. Окисление этанола NAD-зависимой алкогольдегидрогеназой

Основную роль в метаболизме этанола играет цинксодержащий NAD^+-зависимый фермент — алкогольдегидрогеназа, локализующаяся в основном в цитозоле и митохондриях печени (95%). В ходе реакции происходит дегидрирование этанола, образуются ацетальдегид и восстановленный кофермент NADH.

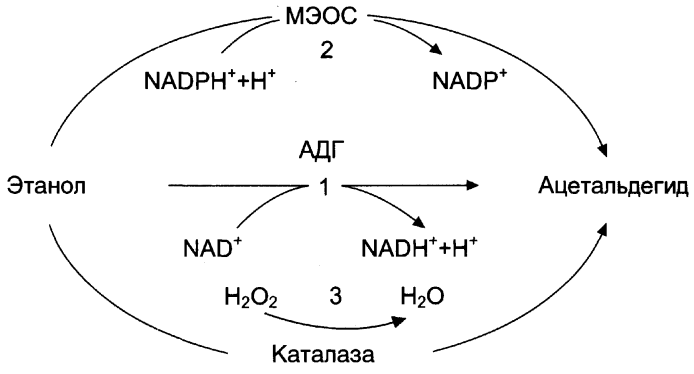


Рис. 12-22. Метаболизм этанола. 1 — окисление этанола NAD^+-зависимой алкогольдегидрогеназой (АДГ); 2 — МЭОС — микросомальная этанолокисляющая система; 3 — окисление этанола каталазой.

Алкогольдегидрогеназа катализирует обратимую реакцию, направление которой зависит от концентрации ацетальдегида и соотношения $NADH/NAD^+$ в клетке.

$$C_2H_5OH + HAD^+ \leftrightarrow CH_3CHO + NADH + H^+.$$

Фермент алкогольдегидрогеназа — димер, состоящий из идентичных или близких по первичной структуре полипептидных цепей, кодируемых аллелями одного гена. Существуют 3 изоформы алкогольдегидрогеназы (АДГ): $АДГ_1$, $АДГ_2$, $АДГ_3$, различающиеся по строению протомеров, локализации и активности. Для европейцев характерно присутствие изоформ $АДГ_1$ и $АДГ_3$. У некоторых восточных народов преобладает изоформа $АДГ_2$, характеризующаяся высокой активностью, это может быть причиной их повышенной чувствительности к алкоголю. При хроническом алкоголизме количество фермента в печени не увеличивается, т.е. он не является индуцируемым ферментом.

Б. Окисление этанола при участии цитохром P_{450}-зависимой микросомальной этанолокисляющей системы

Цитохром P_{450}-зависимая микросомальная этанолокисляющая система (МЭОС) локализована в мембране гладкого ЭР гепатоцитов. МЭОС играет незначительную роль в метаболизме небольших количеств алкоголя, но индуцируется этанолом, другими спиртами, лекарствами типа барбитуратов и приобретает существенное значение при злоупотреблении этими веществами. Этот путь окисления этанола происходит при участии одной из изоформ P_{450} — изофермента P_{450} II E_1. При хроническом алкоголизме окисление этанола ускоряется на 50–70% за счёт гипертрофии ЭР и индукции цитохрома P_{450} II E_1.

$$C_2H_5OH + NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow CH_3CHO + NADP^+ + 2\ H_2O.$$

Кроме основной реакции, цитохром P_{450} катализирует образование активных форм кислорода (O_2^-, H_2O_2), которые стимулируют ПОЛ в печени и других органах (см. раздел 8).

В. Окисление этанола каталазой

Второстепенную роль в окислении этанола играет каталаза, находящаяся в пероксисомах цитоплазмы и митохондрий клеток печени. Этот фермент расщепляет примерно 2% этанола, но при этом утилизирует пероксид водорода.

$$CH_3CH_2OH + H_2O_2 \rightarrow CH_3CHO + 2\ H_2O.$$

Г. Метаболизм и токсичность ацетальдегида

Ацетальдегид, образовавшийся из этанола, окисляется до уксусной кислоты двумя ферментами: FAD-зависимой альдегидоксидазой и NAD^+-зависимой ацетальдегиддегидрогеназой (АлДГ).

$$CH_3CHO + O_2 + H_2O \rightarrow CH_3COOH + H_2O_2.$$

Повышение концентрации ацетальдегида в клетке вызывает индукцию фермента альдегидоксидазы. В ходе реакции образуются уксусная кислота, пероксид водорода и другие активные формы кислорода, что приводит к активации ПОЛ.

Другой фермент ацетальдегиддегидрогеназа (АлДГ) окисляет субстрат при участии кофермента NAD^+.

$$CH_3CHO + H_2O + NAD^+ \rightarrow CH_3COOH + NADH + H^+.$$

Полученная в ходе реакции уксусная кислота активируется под действием фермента ацетил-КоА-синтетазы. Реакция протекает с использованием кофермента А и молекулы АТФ. Образовавшийся ацетил-КоА, в зависимости от соотношения АТФ/АДФ и концентрации оксалоацетата в митохондриях гепатоцитов, может «сгорать» в ЦТК, идти на синтез жирных кислот или кетоновых тел.

В разных тканях организма человека встречаются полиморфные варианты АлДГ. Они характеризуются широкой субстратной специфичностью, разным распределением по клеткам тканей (почки, эпителий, слизистая оболочка желудка и кишечника) и в компартментах клетки. Например, изоформа АлДГ, локализованная в митохондриях гепатоцитов, обладает более высоким сродством к ацетальдегиду, чем цитозольная форма фермента.

Ферменты, участвующие в окислении этанола, — алкогольдегидрогеназа и АлДГ по разному распределены: в цитозоле — 80%/20% и митохондриях — 20%/80%. При поступлении больших доз алкоголя (более 2 г/кг) из-за разных скоростей окисления этанола и ацетальдегида в цитозоле резко повышается концентрация последнего. Ацетальдегид — очень реакционно-способное соединение; он неферментативно может ацетилировать SH-, NH_2-группы белков и других соединений в клетке и нарушать их функции. В модифицированных (ацетилированных) белках могут возникать «сшивки», нехарактерные для нативной структуры (например, в белках межклеточного матрикса — эластине и коллагене, некоторых белках хроматина и липопротеинов, формирующихся в печени). Ацетилирование ядерных, цитоплазматических ферментов и структурных белков приводит к снижению синтеза экспортируемых печенью в кровь белков, например альбумина, который, удерживая Na^+, поддерживает коллоидно-осмотическое давление, а также участвует в транспорте многих гидрофобных веществ в крови (см. раздел 14). Нарушение функций альбумина в сочетании с повреждающим действием ацетальдегида на мембраны сопровождается поступлением в клетки по градиенту концентрации ионов натрия и воды, происходит осмотическое набухание этих клеток и нарушение их функций.

Активное окисление этанола и ацетальдегида приводит к увеличению отношения NADH/NAD^+, что снижает активность NAD^+-зависимых ферментов в цитозоле и менее значительно в митохондриях.

Равновесие следующей реакции смещается вправо:

$$\text{Дигидроксиацетонфосфат} + NADH + H^+ \leftrightarrow \text{Глицерол-3-фосфат} + NAD^+,$$

$$\text{Пируват} + NADH + H^+ \leftrightarrow \text{Лактат} + NAD^+.$$

Восстановление дигидроксиацетонфосфата, промежуточного метаболита гликолиза и глюконеогенеза, приводит к снижению скорости глюконеогенеза. Образование глицерол-3-фосфата повышает вероятность синтеза жира в печени. Увеличение концентрации NADH по сравнению с NAD^+ ($NADH > NAD^+$) замедляет реакцию окисления лактата, увеличивается соотношение лактат/пируват и ещё больше снижается скорость глюконеогенеза (см. раздел 7). В крови возрастает концентрация лактата, это приводит к гиперлактацидемии и лактоацидозу (рис. 12-23).

NADH окисляется ферментом дыхательной цепи NADH-дегидрогеназой. Возникновение трансмембранного электрического потенциала на внутренней митохондриальной мембране не приводит к синтезу АТФ в полном объёме. Этому препятствует нарушение структуры внутренней мембраны митохондрий, вызванное мембранотропным действием этилового спирта и повреждающим действием ацетальдегида на мембраны.

Можно сказать, что ацетальдегид опосредованно активирует ПОЛ, так как связывая SH-группы глутатиона, он снижает количество активного (восстановленного) глутатиона в клетке,

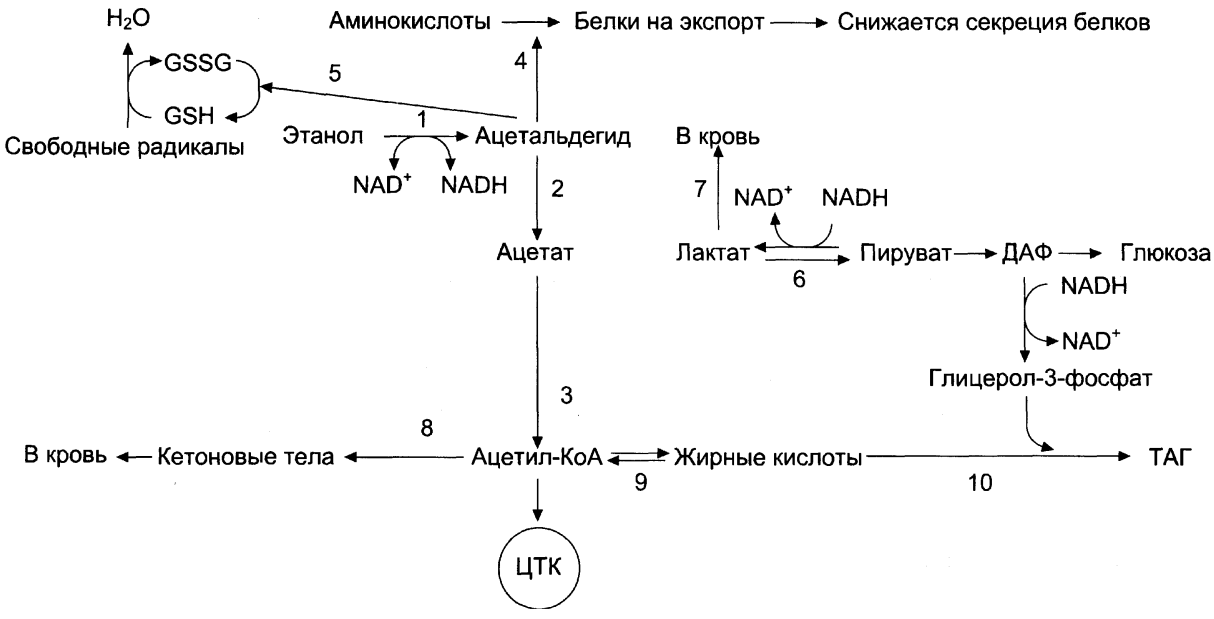


Рисунок 12-23. Эффекты этанола в печени. 1→2→3 — окисление этанола до ацетата и превращение его в ацетил-КоА (1 — реакция катализируется алкогольдегидрогеназой, 2 — реакция катализируется АлДГ). Скорость образования ацетальдегида (1)часто при приёме большого количества алкоголя выше, чем скорость его окисления (2), поэтому ацетальальдегид накапливается и оказывает влияние на синтез белков (4), ингибируя его, а также понижает концентрацию восстановленного глутатиона (5), в результате чего активируется ПОЛ. Скорость глюконеогенеза (6) снижается, так как высокая концентрация NADH, образованного в реакциях окисления этанола (1, 2), ингибирует глюконеогенез (6). Лактат выделяется в кровь (7), и развивается лактоацидоз. Увеличение концентрации NADH замедляет скорость ЦТК; ацетил-КоА накапливается, активируется синтез кетоновых тел (кетоз) (8). Окисление жирных кислот также замедляется (9), увеличивается синтез жира (10), что приводит к ожирению печени и гипертриацилглицеролемии.

который необходим для функционирования фермента глутатионпероксидазы (см. раздел 8), участвующего в катаболизме H_2O_2. Накопление свободных радикалов приводит к активации ПОЛ мембран и нарушению структуры липидного бислоя.

На начальных стадиях алкоголизма окисление ацетил-КоА в ЦТК — основной источник энергии для клетки. Избыток ацетил-КоА в составе цитрата выходит из митохондрий, и в цитоплазме начинается синтез жирных кислот. Этот процесс, помимо АТФ, требует участия NADPH, который образуется при окислении глюкозы в пентозофосфатном цикле. Из жирных кислот и глицерол-3-фосфата образуются ТАГ, которые в составе ЛПОНП секретируются в кровь. Повышенная продукция ЛПОНП печенью приводит к гипертриацилглицеролемии. При хроническом алкоголизме снижение синтеза фосфолипидов и белков в печени, в том числе и апобелков, участвующих в формировании ЛПОНП, вызывает внутриклеточное накопление ТАГ и ожирение печени.

Однако в период острой алкогольной интоксикации, несмотря на наличие большого количества ацетил-КоА, недостаток оксалоацетата снижает скорость образования цитрата. В этих условиях избыток ацетил-КоА идёт на синтез кетоновых тел, которые выходят в кровь. Повышение в крови концентрации лактата, ацетоуксусной кислоты и β-гидроксибутирата служит причиной метаболического ацидоза при алкогольной интоксикации.

Как уже было сказано ранее, реакция образования ацетальдегида из этанола протекает под действием алкогольдегидрогеназы. Поэтому при повышении концентрации ацетальдегида и NADH в клетках печени направление реакции меняется — образуется этанол. Этанол — мембранотропное соединение, он растворяется в липидном бислое мембран и нарушает их функции. Это негативно отражается на трансмемб-

ранном переносе веществ, межклеточных контактах, взаимодействиях рецепторов клетки с сигнальными молекулами. Этанол может проходить через мембраны в межклеточное пространство и кровь и далее в любую клетку организма.

Д. Влияние этанола и ацетальдегида на метаболизм ксенобиотиков и лекарств в печени

Характер влияния этанола на метаболизм ксенобиотиков и лекарств зависит от стадии алкогольной болезни: начальная стадия алкоголизма, хронический алкоголизм или острая форма алкогольной интоксикации.

Микросомальная этанолокисляющая система (МЭОС) наряду с метаболизмом этанола участвует в детоксикации ксенобиотиков и лекарств. На начальной стадии алкогольной болезни биотрансформация лекарственных веществ протекает более активно вследствие индукции ферментов системы. Этим объясняют феномен лекарственной «устойчивости». Однако при острой интоксикации этиловым спиртом тормозится биотрансформация лекарственных веществ. Этанол конкурирует с ксенобиотиками за связывание с цитохромом P_{450} II E_1, вызывая гиперчувствительность (лекарственную «неустойчивость») к некоторым принятым одновременно с ним лекарственным препаратам.

Кроме того, у людей, страдающих хроническим алкоголизмом, наблюдают избирательную индукцию изоформы P_{450} II E_1 и конкурентное ингибирование синтеза других изоформ, принимающих участие в метаболизме ксенобиотиков и лекарств. При злоупотреблении алкоголем индуцируется также синтез глюкуронил-трансфераз, но снижается образование УДФ-глюкуроната.

Алкогольдегидрогеназа обладает широкой субстратной специфичностью и может окислять разные спирты, в том числе и метаболиты сердечных гликозидов — дигитоксина, дигоксина и гитоксина. Конкуренция этанола с сердечными гликозидами за активный центр алкогольдегидрогеназы приводит к снижению скорости биотрансформации этой группы лекарств и повышает опасность их побочного эффекта у лиц, принимающих большие дозы алкоголя.

Повышение концентрации ацетальдегида вызывает целый ряд нарушений в структуре белков (ацетилирование), мембран (ПОЛ), модификацию глутатиона, необходимого для одного из самых важных ферментов обезвреживания ксенобиотиков — глутатионтрансферазы и фермента антиоксидазной защиты глутатионпероксидазы. Таким образом, представленные данные свидетельствуют, что алкогольное поражение печени сопровождается нарушением важнейшей функции этого органа — детоксикационной.

РАЗДЕЛ 13

МЕТАБОЛИЗМ ГЕМА И ОБМЕН ЖЕЛЕЗА

Гем является простетической группой многих белков: гемоглобина, миоглобина, цитохромов митохондриальной ЦПЭ, цитохрома P_{450}, участвующего в микросомальном окислении. Ферменты каталаза, пероксидаза, цитохромоксидаза содержат гем в качестве кофермента.

Все клетки организма имеют гемсодержащие белки, поэтому синтез гема идёт во всех клетках, за исключением эритроцитов, не имеющих, как известно, белоксинтезирующей системы.

При распаде гема в клетках РЭС образуется жёлчный пигмент билирубин. Дальнейший катаболизм билирубина в печени, кишечнике и почках приводит к образованию конечных продуктов распада гема стеркобилина и уробилина, содержащихся, соответственно, в кале и моче. Железо, освобождающееся при распаде гема, снова используется для синтеза железосодержащих белков.

I. СТРОЕНИЕ И БИОСИНТЕЗ ГЕМА

A. Строение гема

Гем состоит из иона двухвалентного железа и порфирина (рис. 13-1). В основе структуры порфиринов находится порфин. Порфин представляет собой четыре пиррольных кольца, связанных между собой метеновыми мостиками (рис. 13-1). В зависимости от структуры заместителей в кольцах пирролов различают несколько типов порфиринов: протопорфирины, этиопорфирины, мезопорфирины и копропорфирины. Протопорфирины — предшественники всех других типов порфиринов.

Гемы разных белков могут содержать разные типы порфиринов (см. раздел 6). В геме гемоглобина находится протопорфирин IX, который имеет 4 метильных, 2 винильных радикала и 2 остатка пропионовой кислоты. Железо в геме находится в восстановленном состоянии (Fe^{+2}) и связано двумя ковалентными и двумя координационными связями с атомами азота пиррольных колец. При окислении железа гем превращается в гематин (Fe^{3+}). Наибольшее количество гема содержат эритроциты, заполненные гемоглобином, мышечные клетки, имеющие миоглобин, и клетки печени из-за высокого содержания в них цитохрома P_{450}.

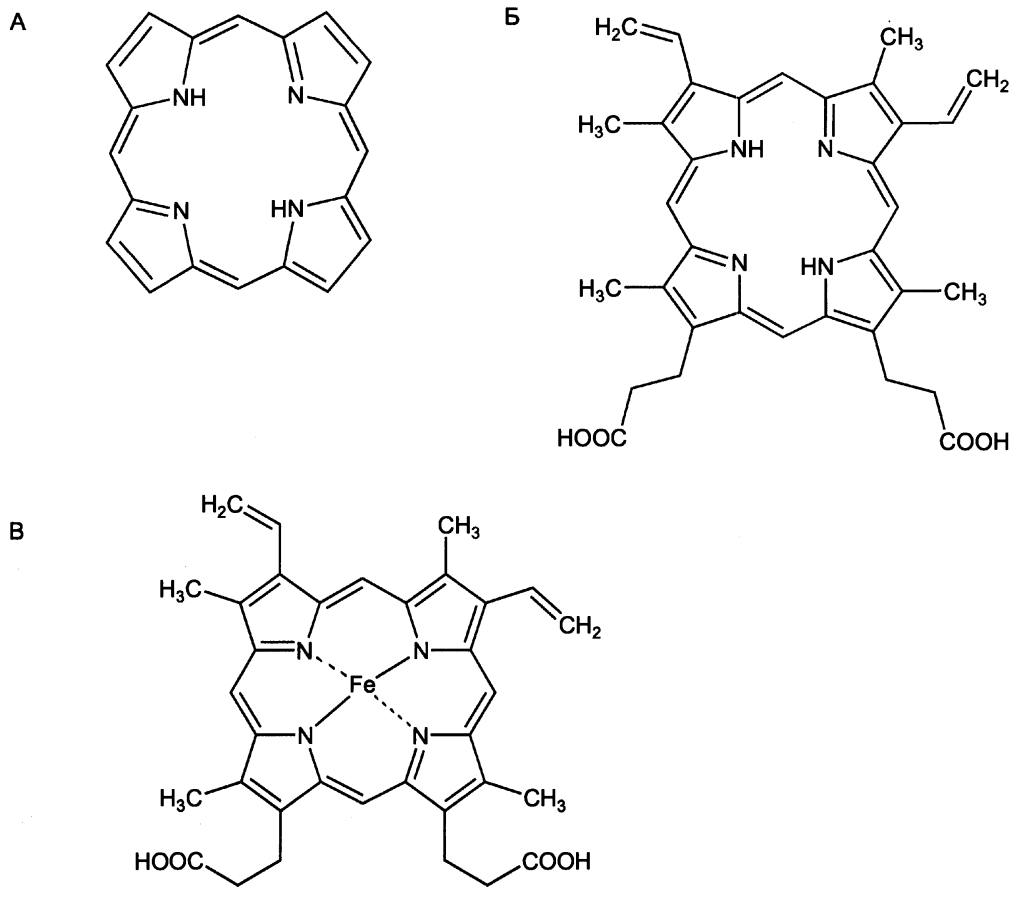


Рис. 13-1. Строение порфина (А), протопорфирина IX (Б) и гема гемоглобина (В). Порфин — циклическая структура, состоящая из четырёх пиррольных колец, связанных между собой метеновыми мостиками. Протопорфирин IX имеет четыре метильных, два винильных радикала и два остатка пропионовой кислоты. В геме гемоглобина Fe^{2+} образует две ковалентные и две координационные связи с атомами азота пиррольных колец протопорфирина IX.

Б. Биосинтез гема

Гем синтезируется во всех тканях, но с наибольшей скоростью в костном мозге и печени (рис. 13-2). В костном мозге гем необходим для синтеза гемоглобина в ретикулоцитах, в гепатоцитах — для образования цитохрома P_{450}.

Первая реакция синтеза гема — образование 5-аминолевулиновой кислоты из глицина и сукцинил-КоА (рис. 13-3) идёт в матриксе митохондрий, где в ЦТК образуется один из субстратов этой реакции — сукцинил-КоА. Эту реакцию катализирует пиридоксальзависимый фермент аминолевулинатсинтаза.

Из митохондрий 5-аминолевулиновая кислота поступает в цитоплазму. В цитоплазме проходят промежуточные этапы синтеза гема: соединение 2 молекул 5-аминолевулиновой кислоты в молекулу порфобилиногена (рис. 13-4), дезаминирование порфобилиногена с образованием гидроксиметилбилана, ферментативное превращение гидроксиметилбилана в молекулу уропорфобилиногена III, декарбоксилирование последнего с образованием копропорфириногена III. Гидроксиметилбилан может также неферментативно превращаться в уропорфириноген I, который декарбоксилируется в копропорфириноген I. Из цитоплазмы копропорфириноген III опять поступает в митохондрии, где проходят заключительные реакции синтеза гема. В результате двух последовательных окислительных реакций копропорфириноген III превращается в протопорфириноген IX, а протопорфириноген IX — в протопорфирин IX. Фермент феррохелатаза, присоединяя к протопорфирину IX двухва-

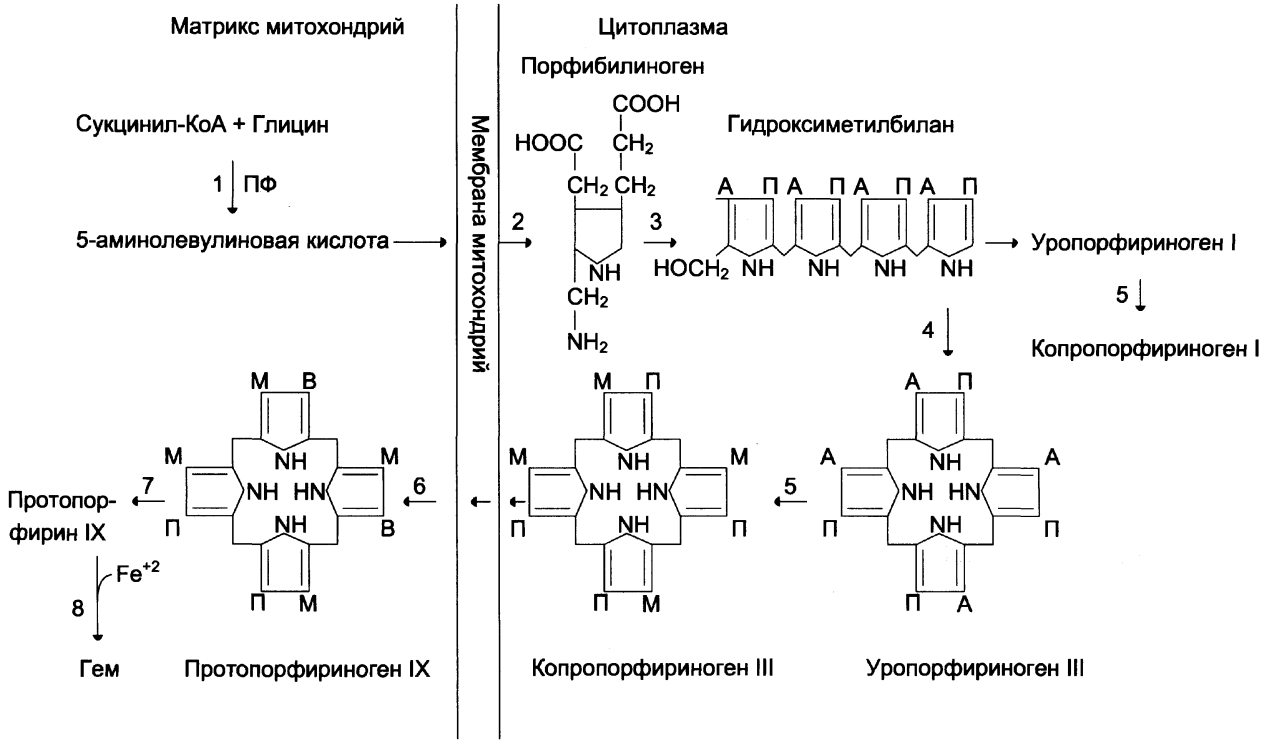


Рис. 13-2. Синтез гема. Цифрами на схеме указаны ферменты: 1 — аминолевулинатсинтаза; 2 — аминолевулинатдегидратаза; 3 — порфобилиногендезаминаза; 4 — уропорфириноген III косинтаза; 5 — уропорфириногендекарбоксилаза; 6 — копропорфириноген III оксидаза; 7 — протопорфириногеноксидаза; 8 — феррохелатаза. Буквами обозначены заместители в пиррольных кольцах: М — метил, В — винил, П — остатки пропионовой кислоты, А — ацетил, ПФ — пиридоксальфосфат. Донором железа служит депонирующий железо в клетках белок ферритин.

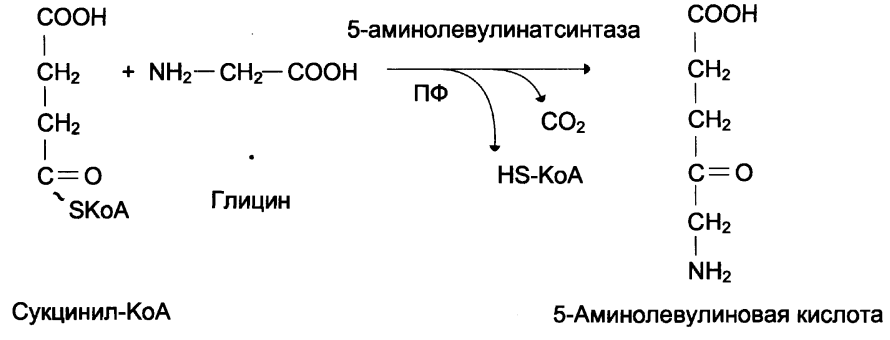


Рис. 13-3. Реакция образования 5-аминолевулиновой кислоты.

лентное железо, превращает его в гем (рис. 13-2). Источником железа для синтеза гема служит депонирующий железо белок ферритин. Синтезированный гем, соединяясь с α- и β-полипептидными цепями глобина, образует гемоглобин. Гем регулирует синтез глобина: при снижении скорости синтеза гема синтез глобина в ретикулоцитах тормозится.

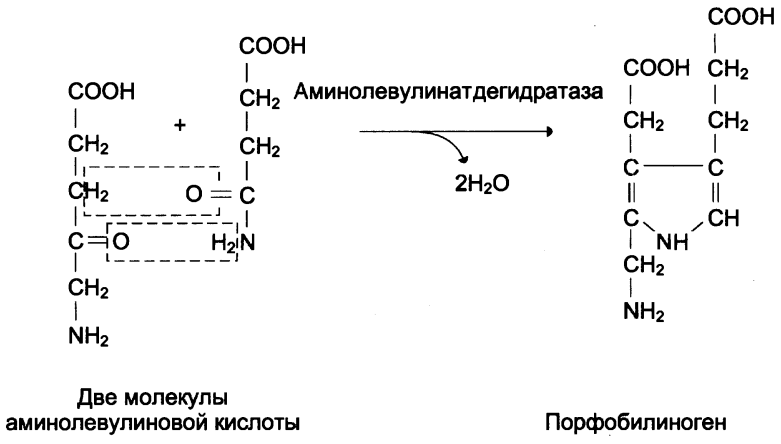


Рис. 13-4. Реакция образования порфобилиногена.

В. Регуляция биосинтеза гема

Регуляторную реакцию синтеза гема катализирует пиридоксальзависимый фермент аминолевулинатсинтаза. Скорость реакции регулируется аллостерически и на уровне трансляции фермента.

Аллостерическим ингибитором и корепрессором синтеза аминолевулинатсинтазы является гем (рис. 13-5).

В ретикулоцитах синтез этого фермента на этапе трансляции регулирует железо. На участке инициации мРНК, кодирующей фермент, име-

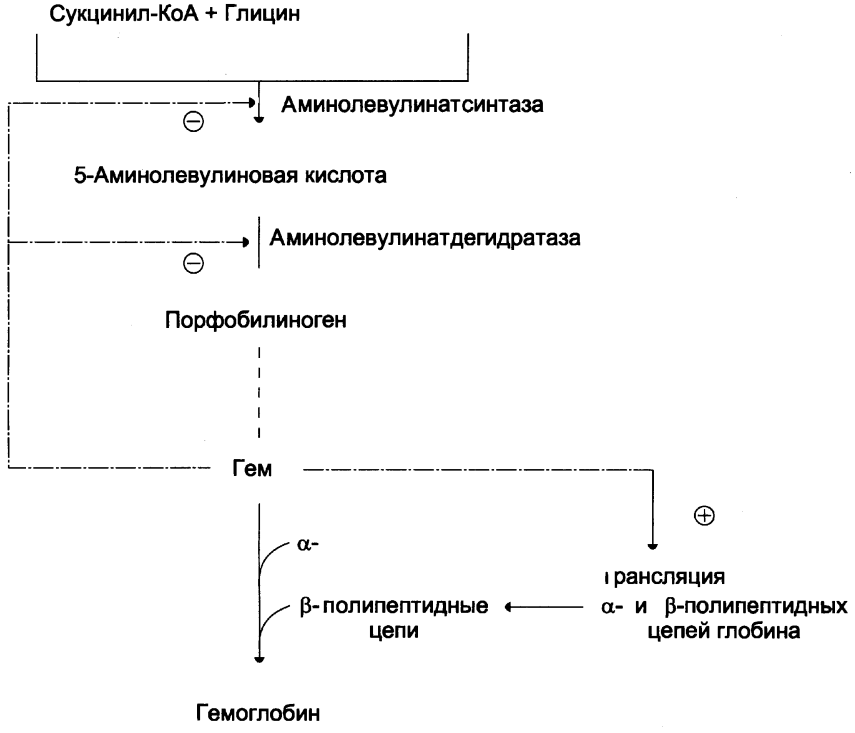


Рис. 13-5. Регуляция синтеза гема и гемоглобина. Гем по принципу отрицательной обратной связи ингибирует аминолевулинатсинтазу и аминолевулинатдегидратазу и является индуктором трансляции α- и β-цепей гемоглобина.

ется последовательность нуклеотидов, образующая шпилечную петлю, которая называется железочувствительным элементом (от англ. *iron-responsive element*, IRE) (рис. 13-6).

При высоких концентрациях железа в клетках оно образует комплекс с остатками цистеина регуляторного железосвязывающего белка. Взаимодействие железа с регуляторным железосвязывающим белком вызывает снижение сродства этого белка к IRE-элементу мРНК, кодирующей аминолевулинатсинтазу, и продолжение трансляции (рис. 13-6, А). При низких концентрациях железа железосвязывающий белок присоединяется к железочувствительному элементу, находящемуся на 5′-нетранслируемом конце мРНК, и трансляция аминолевулинатсинтазы тормозится (рис. 13-6, Б).

Аминолевулинатдегидратаза также аллостерически ингибируется гемом, но так как активность этого фермента почти в 80 раз превышает активность аминолевулинатсинтазы, то это не имеет большого физиологического значения.

Дефицит пиридоксальфосфата и лекарственные препараты, которые являются его структурными аналогами, снижают активность аминолевулинатсинтазы.

Г. Нарушения биосинтеза гема. Порфирии

Наследственные и приобретённые нарушения синтеза гема, сопровождающиеся повышением содержания порфириногенов, а также

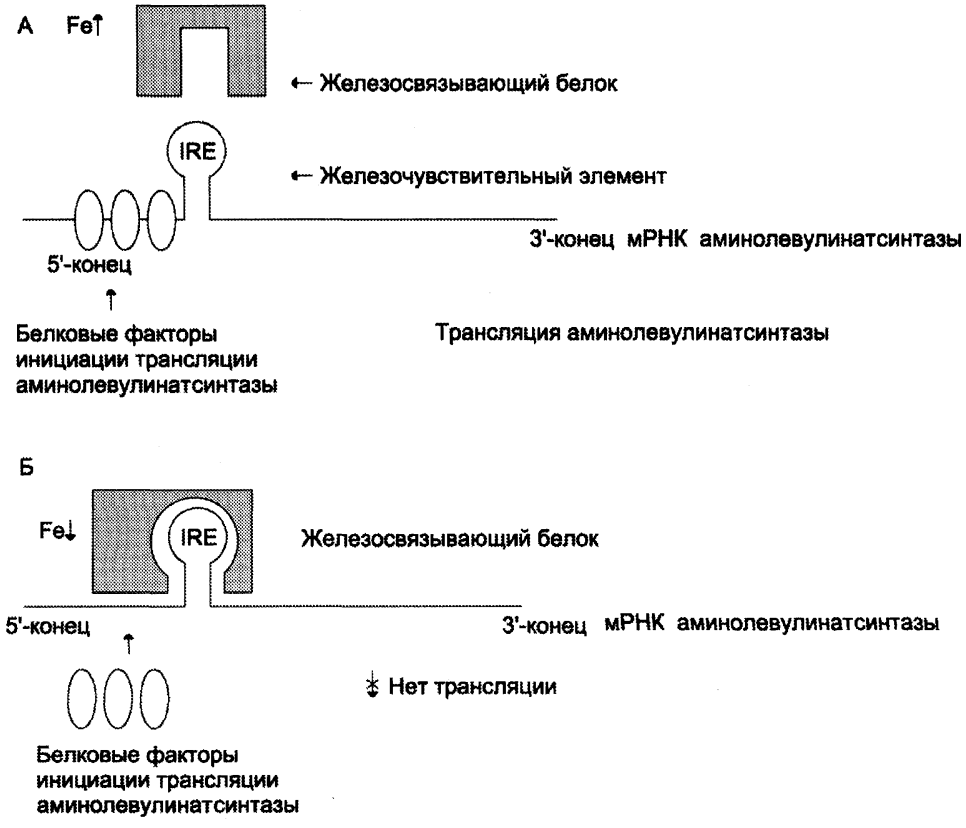


Рис. 13-6. Регуляция синтеза аминолевулинатсинтазы. А — при высокой концентрации железа в ретикулоцитах оно присоединяется к железосвязывающему белку и снижает сродство этого белка к железочувствительному элементу (IRE) матричной РНК, кодирующей аминолевулинатсинтазу. Белковые факторы инициации трансляции связываются с мРНК и инициируют трансляцию аминолевулинатсинтазы. Б — при низком содержании железа в ретикулоцитах железосвязывающий белок обладает высоким сродством к IRE и взаимодействует с ним. Белковые факторы инициации трансляции не могут присоединиться к мРНК. и трансляция прекращается.

продуктов их окисления в тканях и крови и появлением их в моче, называют порфириями («порфирин» в переводе с греч. означает пурпурный).

Наследственные порфирии обусловлены генетическими дефектами ферментов, участвующих в синтезе гема, за исключением аминолевулинатсинтазы. При этих заболеваниях отмечают снижение образования гема. Поскольку гем — аллостерический ингибитор аминолевулинатсинтазы, то активность этого фермента повышается, и это приводит к накоплению промежуточных продуктов синтеза гема — аминолевулиновой кислоты и порфириногенов.

В зависимости от основной локализации патологического процесса различают печёночные и эритропоэтические наследственные порфирии. Эритропоэтические порфирии сопровождаются накоплением порфиринов в нормобластах и эритроцитах, а печёночные — в гепатоцитах.

При тяжёлых формах порфирий наблюдают нейропсихические расстройства, нарушения функций РЭС, повреждения кожи. Порфириногены не окрашены и не флуоресцируют, но на свету они легко превращаются в порфирины. Последние проявляют интенсивную красную флуоресценцию в ультрафиолетовых лучах. В коже на солнце в результате взаимодействия с порфиринами кислород переходит в синглетное состояние. Синглетный кислород вызывает ускорение ПОЛ клеточных мембран и разрушение клеток, поэтому порфирии часто сопровождаются фотосенсибилизацией и изъязвлением открытых участков кожи. Нейропсихические расстройства при порфириях связаны с тем, что аминолевулинат и порфириногены являются нейротоксинами.

Иногда при лёгких формах наследственных порфирий заболевание может протекать бессимптомно, но приём лекарств, являющихся индукторами синтеза аминолевулинатсинтазы, может вызвать обострение болезни. Индукторами синтеза аминолевулинатсинтазы являются такие известные лекарства, как сульфаниламиды, барбитураты, диклофенак, вольтарен, стероиды, гестагены. В некоторых случаях симптомы болезни не проявляются до периода полового созревания, когда повышение образования β-стероидов вызывает индукцию синтеза аминолевулинатсинтазы. Порфирии наблюдают и при отравлениях солями свинца, так как свинец ингибирует аминолевулинатдегидратазу и феррохелатазу. Некоторые галогенсодержащие гербициды и инсектициды являются индукторами синтеза аминолевулинатсинтазы, поэтому попадание их в организм сопровождается симптомами порфирии.

II. ОБМЕН ЖЕЛЕЗА

В гемсодержащих белках железо находится в составе гема. В негемовых железосодержащих белках железо непосредственно связывается с белком. К таким белкам относят трансферрин, ферритин, окислительные ферменты рибонуклеотидредуктазу и ксантиноксидазу, железофлавопротеины NADH-дегидрогеназа и сукцинатдегидрогеназа.

В организме взрослого человека содержится 3—4 г железа, из которых только около 3,5 мг находится в плазме крови. Гемоглобин имеет примерно 68% железа всего организма, ферритин — 27%, миоглобин — 4%, трансферрин — 0,1%, На долю всех содержащих железо ферментов приходится всего 0,6% железа, имеющегося в организме. Источниками железа при биосинтезе железосодержащих белков служат железо пищи и железо, освобождающееся при постоянном распаде эритроцитов в клетках печени и селезёнки.

В нейтральной или щелочной среде железо находится в окисленном состоянии — Fe^{3+}, образуя крупные, легко агрегирующие комплексы с OH^-, другими анионами и водой. При низких значениях pH железо восстанавливается и легко диссоциирует. Процесс восстановления и окисления железа обеспечивает его перераспределение между макромолекулами в организме. Ионы железа обладают высоким сродством ко многим соединениям и образуют с ними хелатные комплексы, изменяя свойства и функции этих соединений, поэтому транспорт и депонирование железа в организме осуществляют особые белки. В клетках железо депонирует белок ферритин, в крови его транспортирует белок трансферрин.

A. Всасывание железа в кишечнике

В пище железо в основном находится в окисленном состоянии (Fe^{3+}) и входит в состав белков или солей органических кислот. Освобож-

дению железа из солей органических кислот способствует кислая среда желудочного сока. Наибольшее количество железа всасывается в двенадцатиперстной кишке. Аскорбиновая кислота, содержащаяся в пище, восстанавливает железо и улучшает его всасывание, так как в клетки слизистой оболочки кишечника поступает только Fe^{2+}. В суточном количестве пищи обычно содержится 15—20 мг железа, а всасывается только около 10% этого количества. Организм взрослого человека теряет около 1 мг железа в сутки.

Количество железа, которое всасывается в клетки слизистой оболочки кишечника, как правило, превышает потребности организма. Поступление железа из энтероцитов в кровь зависит от скорости синтеза в них белка апоферритина. Апоферритин «улавливает» железо в энтероцитах и превращается в ферритин, который остаётся в энтероцитах. Таким способом снижается поступление железа в капилляры крови из клеток кишечника. Когда потребность в железе невелика, скорость синтеза апоферритина повышается (см. ниже «Регуляция поступления железа в клетки»). Постоянное слущивание клеток слизистой оболочки в просвет кишечника освобождает организм от излишков железа. При недостатке железа в организме апоферритин в энтероцитах почти не синтезируется. Железо, поступающее из энтероцитов в кровь, транспортирует белок плазмы крови трансферрин (рис. 13-7).

Б. Транспорт железа в плазме крови и его поступление в клетки

В плазме крови железо транспортирует белок трансферрин. Трансферрин — гликопротеин, который синтезируется в печени и связывает только окисленное железо (Fe^{3+}). Поступающее в кровь железо окисляет фермент ферроксидаза, известный как медьсодержащий белок плазмы крови церулоплазмин. Одна молекула трансферрина может связать один или два иона Fe^{3+}, но одновременно с анионом CO_3^{2-} с образованием комплекса трансферрин-2 (Fe^{3+}-CO_3^{2-}). В норме трансферрин крови насыщен железом приблизительно на 33%.

Трансферрин взаимодействует со специфическими мембранными рецепторами клеток. В результате этого взаимодействия в цитозоле клетки образуется комплекс Ca^{2+}-кальмодулин-ПКС, который фосфорилирует рецептор трансферрина и вызывает образование эндосомы. АТФ-зависимый протонный насос, находящийся в мембране эндосомы, создаёт кислую среду внутри эндосомы. В кислой среде эндосомы железо освобождается из трансферрина. После этого ком-

Рис. 13-7. Поступление экзогенного железа в ткани. В полости кишечника железо освобождается из белков и солей органических кислот пищи. Усвоению железа способствует аскорбиновая кислота, восстанавливающая железо. В клетках слизистой оболочки кишечника избыток поступившего железа соединяется с белком апоферритином с образованием ферритина, при этом ферритин окисляет Fe^{2+} в Fe^{3+}. Поступление железа из клеток слизистой оболочки кишечника в кровь сопровождается окислением железа ферментом сыворотки крови ферроксидазой. В крови Fe^{3+} транспортирует белок сыворотки крови трансферрин. В тканях Fe^{2+} используется для синтеза железосодержащих белков или депонируется в ферритине.

плекс рецептор—апотрансферрин возвращается на поверхность плазматической мембраны клетки. При нейтральном значении pH внеклеточной жидкости апотрансферрин изменяет свою конформацию, отделяется от рецептора, выходит в плазму крови и становится способным вновь связывать ионы железа и включаться в новый цикл его транспорта в клетку. Железо в клетке используется для синтеза железосодержащих белков или депонируется в белке ферритине.

Ферритин — олигомерный белок с молекулярной массой 500 кД. Он состоит из тяжёлых (21 кД) и лёгких (19 кД) полипептидных цепей, составляющих 24 протомера. Разный набор протомеров в олигомере ферритина определяет образование нескольких изоформ этого белка в разных тканях. Ферритин представляет собой полую сферу, внутри которой может содержаться до 4500 ионов трёхвалентного железа, но обычно содержится менее 3000. Тяжёлые цепи ферритина окисляют Fe^{2+} в Fe^{3+}. Железо в виде гидроксидфосфата находится в центре сферы, оболочка которой образована белковой частью молекулы. Оно поступает внутрь и освобождается наружу через каналы, пронизывающие белковую оболочку апоферритина, но железо может откладываться и в белковой части молекулы ферритина. Ферритин содержится почти во всех тканях, но в наибольшем количестве в печени, селезёнке и костном мозге. Незначительная часть ферритина экскретируется из тканей в плазму крови. Поскольку поступление ферритина в кровь пропорционально его содержанию в тканях, то концентрация ферритина в крови — важный диагностический показатель запасов железа в организме при железодефицитной анемии. Метаболизм железа в организме представлен на рис. 13-8.

В. Регуляция поступления железа в клетки

Содержание железа в клетках определяется соотношением скоростей его поступления, использования и депонирования и контролируется двумя молекулярными механизмами. Скорость поступления железа в неэритроидные клетки зависит от количества белков-рецепторов трансферрина в их мембране. Избыток железа в клетках депонирует ферритин. Синтез апоферритина и рецепторов трансферрина регулируется на уровне трансляции этих белков и зависит от содержания железа в клетке.

На нетранслируемом 3′-конце мРНК рецептора трансферрина и на нетранслируемом 5′-конце мРНК апоферритина имеются шпилечные петли — железочувствительные элементы IRE (рис. 13-9 и 13-10). Причём мРНК рецептора трансферрина имеет 5 петель, а мРНК апоферритина — только 1.

Эти участки мРНК могут взаимодействовать с регуляторным IRE-связывающим белком. При низких концентрациях железа в клетке IRE-связывающий белок соединяется с IRE мРНК апоферритина и препятствует присоединению белковых факторов инициации трансляции (рис. 13-9, А). В результате этого снижаются скорость трансляции апоферритина и его содержание в клетке. Вместе с тем при низких концентрациях железа в клетке IRE-связывающий белок связывается с железочувствительным элементом мРНК рецептора трансферрина и предотвращает её разрушение ферментом РНК-азой (рис. 13-10, А). Это вызывает увеличение количества рецепторов трансферрина и ускорение поступления железа в клетки.

При повышении содержания железа в клетке в результате его взаимодействия с IRE-связывающим белком происходит окисление SH-групп активного центра этого белка и снижение сродства к железочувствительным элементам мРНК. Это приводит к двум последствиям:

- во-первых, ускоряется трансляция апоферритина (рис. 13-9, Б);
- во-вторых, IRE-связывающий белок освобождает шпилечные петли мРНК рецептора трансферрина, и она разрушается ферментом РНК-азой, в результате снижается скорость синтеза рецепторов трансферрина (рис. 13-10, Б). Ускорение синтеза апоферритина и торможение синтеза рецепторов трансферрина вызывают снижение содержания железа в клетке.

В целом эти механизмы регулируют содержание железа в клетках и его использование для синтеза железосодержащих белков.

Г. Нарушения метаболизма железа

Железодефицитная анемия может наблюдаться при повторяющихся кровотечениях, беременности, частых родах, язвах и опухолях ЖКТ,

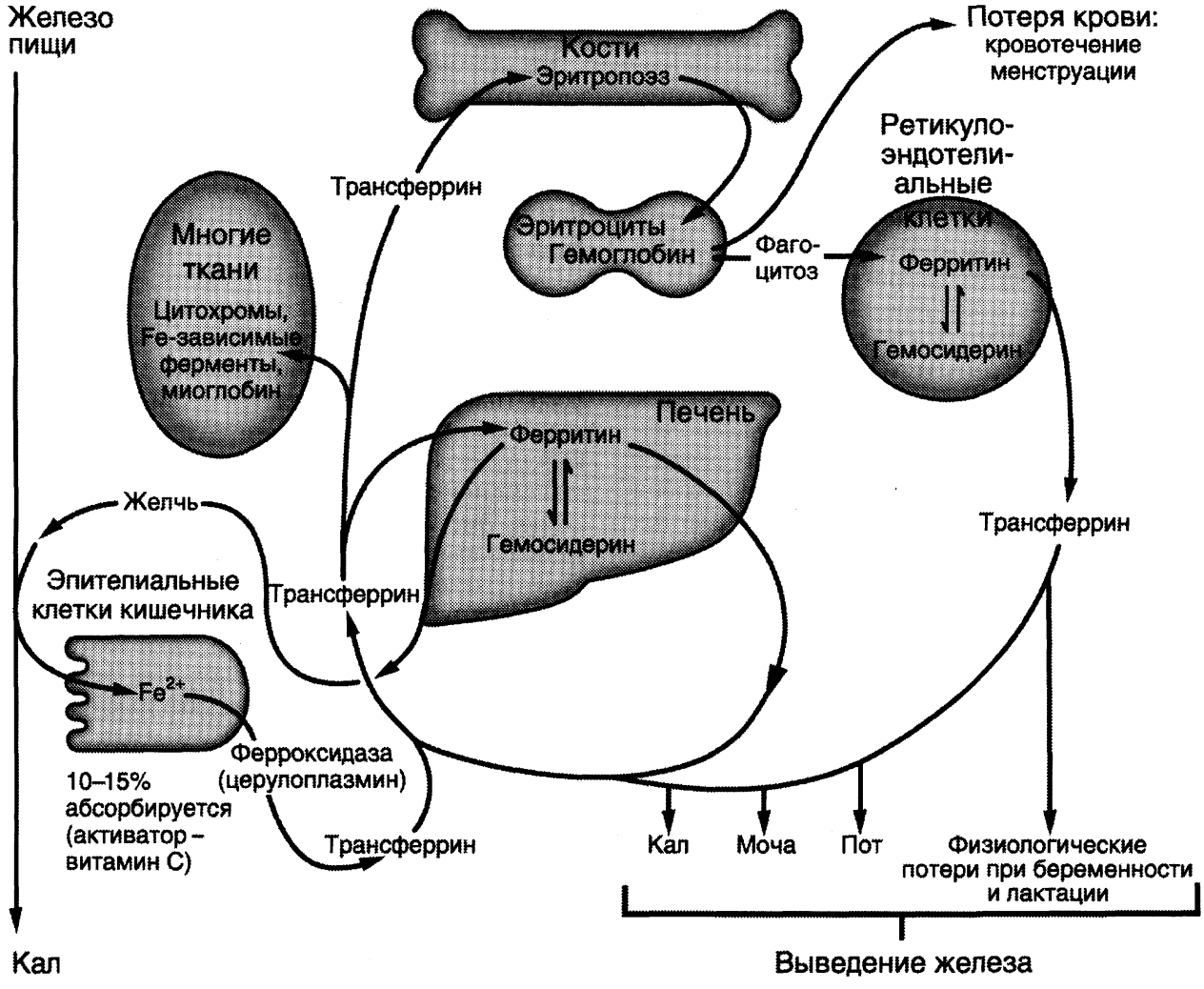


Рис. 13-8. Метаболизм железа в организме.

после операций на ЖКТ. При железодефицитной анемии уменьшается размер эритроцитов и их пигментация (гипохромные эритроциты малых размеров). В эритроцитах уменьшается содержание гемоглобина, понижается насыщение железом трансферрина, а в тканях и плазме крови снижается концентрация ферритина. Причина этих изменений — недостаток железа в организме, вследствие чего снижается синтез гема и ферритина в неэритроидных тканях и гемоглобина в эритроидных клетках.

Гемохроматоз. Когда количество железа в клетках превышает объём ферритинового депо, железо откладывается в белковой части молекулы ферритина. В результате образования таких аморфных отложений избыточного железа ферритин превращается в гемосидерин. Гемосидерин плохо растворим в воде и содержит до 37% железа. Накопление гранул гемосидерина в печени, поджелудочной железе, селезёнке и печени приводит к повреждению этих органов — гемохроматозу. Гемохроматоз может быть обусловлен наследственным увеличением всасывания железа в кишечнике, при этом содержание железа в организме больных может достигать 100 г. Это заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу, причём около 0,5% европеоидов гомозиготны по гену гемохроматоза. Накопление гемосидерина в поджелудочной железе приводит к разрушению β-клеток островков Лангер-

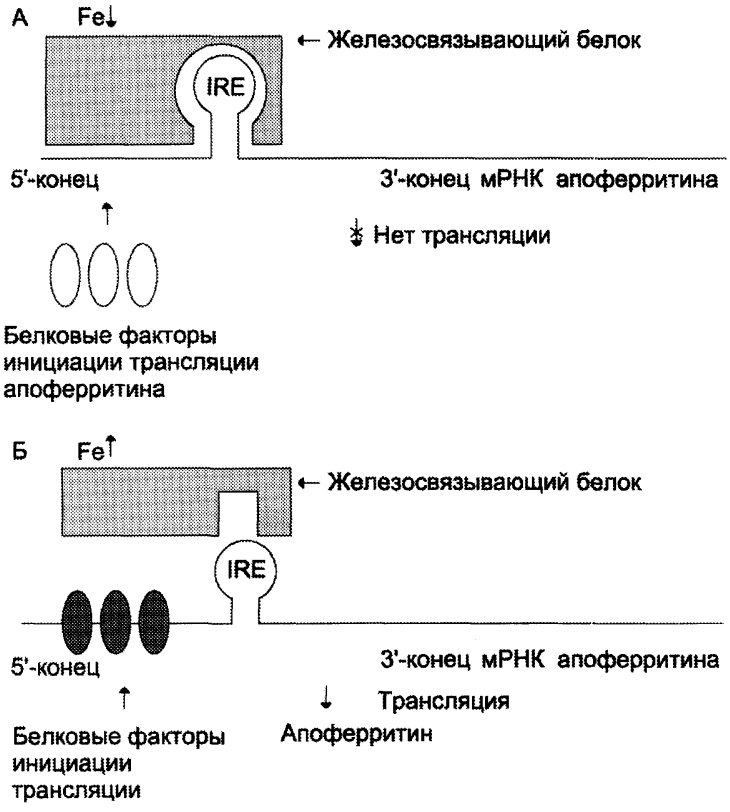


Рис. 13-9. Регуляция синтеза апоферритина. А — при снижении содержания железа в клетке железосвязывающий белок обладает высоким сродством к IRE и взаимодействует с ним. Это препятствует присоединению белковых факторов инициации трансляции к мРНК, кодирующей апоферритин, и синтез апоферритина прекращается; Б — при повышении содержания железа в клетке оно взаимодействует с железосвязывающим белком, в результате чего снижается сродство этого белка к IRE. Белковые факторы инициации трансляции присоединяются к мРНК, кодирующей апоферритин, и инициируют трансляцию апоферритина.

ханса и, как следствие этого, к сахарному диабету. Отложение гемосидерина в гепатоцитах вызывает цирроз печени, а в миокардиоцитах — сердечную недостаточность. Больных наследственным гемохроматозом лечат регулярными кровопусканиями, еженедельно или один раз в месяц в зависимости от тяжести состояния больного. К гемохроматозу могут привести частые переливания крови, в этих случаях больных лечат препаратами, связывающими железо.

III. КАТАБОЛИЗМ ГЕМОГЛОБИНА

Эритроциты имеют короткое время жизни (примерно 120 дней). При физиологических условиях в организме взрослого человека разрушается около $1–2\times10^{11}$ эритроцитов в сутки. Их катаболизм происходит главным образом в ретикулоэндотелиальных клетках селезёнки, лимфатических узлов, костного мозга и печени. При старении эритроцитов снижается содержание сиаловых кислот в составе гликопротеинов плазматической мембраны. Изменённые углеводные компоненты гликопротеинов мембран эритроцитов связываются рецепторами клеток РЭС, и эритроциты «погружаются» в них эндоцитозом. Распад эритроцитов в этих клетках начинается с распада гемоглобина на гем и глобин и последующего гидролиза ферментами лизосом белковой части гемоглобина.

А. Катаболизм гема

Первая реакция катаболизма гема происходит при участии NADPH-зависимого ферментатив-

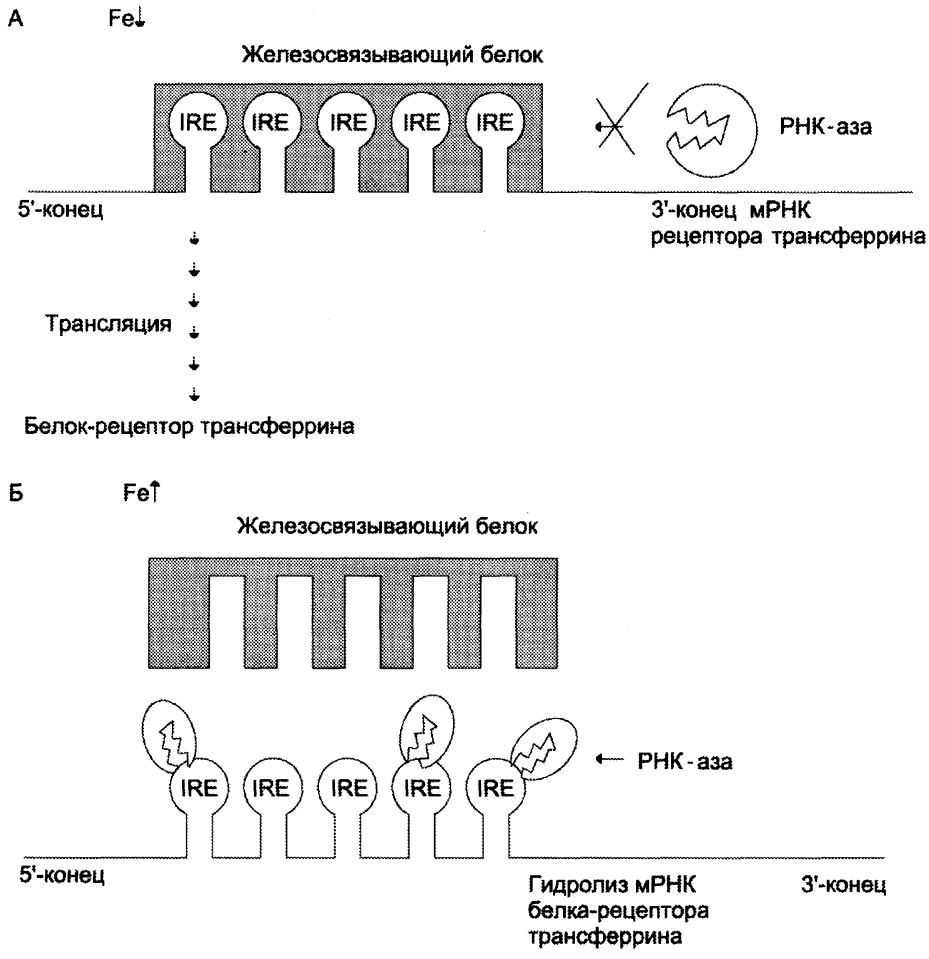


Рис. 13-10. Регуляция синтеза рецептора трансферрина. А — при низком содержании железа в клетке железочувствительный белок обладает высоким сродством к IRE мРНК, кодирующей белок-рецептор трансферрина. Присоединение железосвязывающего белка к IRE мРНК предотвращает её разрушение РНК-азой и синтез белка-рецептора трансферрина продолжается; Б — При высоком содержании железа в клетке сродство железосвязывающего белка к IRE снижается, и мРНК становится доступной для действия РНК-азы, которая её гидролизует. Разрушение мРНК ведёт к снижению синтеза белка-рецептора трансферрина.

ного комплекса **гемоксигеназы**. Ферментная система локализована в мембране ЭР, в области электронтранспортных цепей микросомального окисления. Фермент катализирует расщепление связи между двумя пиррольными кольцами, содержащих винильные остатки, — таким образом, раскрывается структура кольца (рис. 13-11). В ходе реакции образуются линейный тетрапиррол — **биливердин** (пигмент жёлтого цвета) и монооксид углерода (CO), который получается из углерода метениловой группы. Гем индуцирует транскрипцию гена гемоксигеназы, абсолютно специфичной по отношению к гему.

Ионы железа, освободившиеся при распаде гема, могут быть использованы для синтеза новых молекул гемоглобина или для синтеза других железосодержащих белков. Биливердин восстанавливается до билирубина NADPH-зависимым ферментом **биливердинредуктазой**. Билирубин образуется не только при распаде гемоглобина, но также при катаболизме других гемсодержащих белков, таких как цитохромы и миоглобин. При распаде 1 г гемоглобина образуется 35 мг билирубина, а в сутки у взрослого человека — примерно 250—350 мг билирубина. Дальнейший метаболизм билирубина происходит в печени.

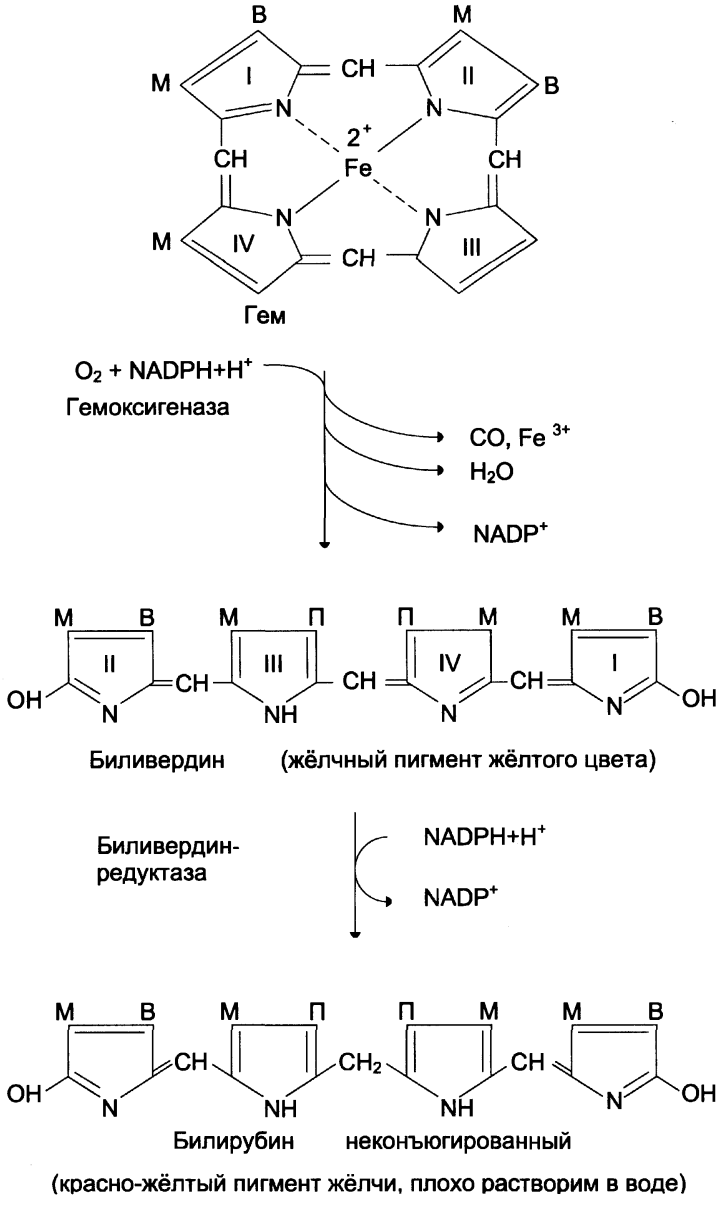


Рис. 13-11. Распад гема. М — (-CH_3) — метильная группа; В — (-$CH{=}CH_2$) — винильная группа; П — (-CH_2-CH_2-COOH) — остаток пропионовой кислоты. В ходе реакции одна метильная группа превращается в окись углерода и, таким образом, раскрывается структура кольца. Образованный биливердин под действием биливердинредуктазы превращается в билирубин.

Б. Метаболизм билирубина

Билирубин, образованный в клетках РЭС (селезёнки и костного мозга), плохо растворим в воде, по крови транспортируется в комплексе с белком плазмы крови альбумином. Эту форму билирубина называют неконъюгированным билирубином. Каждая молекула альбумина связывает 2 (или даже 3) молекулы билирубина, одна из которых связана с белком более прочно (более высокое сродство), чем другие. При сдвиге pH крови в кислую сторону (повышение концентрации кетоновых тел, лактата) изменяются заряд, конформация альбумина, снижается сродство к билирубину. Поэтому билирубин, связанный с альбумином непрочно, может вытес-

няться из центров связывания и образовывать комплексы с коллагеном межклеточного матрикса и липидами мембран. Ряд лекарственных соединений конкурирует с билирубином за высокоаффинный, имеющий высокое сродство центр альбумина.

Поглощение билирубина паренхиматозными клетками печени

Комплекс «альбумин—билирубин», доставляемый с током крови в печень, на поверхности плазматической мембраны гепатоцита диссоциирует. Высвобожденный билирубин образует временный комплекс с липидами плазматической мембраны. Облегчённая диффузия билирубина в гепатоциты осуществляется двумя типами белков-переносчиков: **лигандина** (он транспортирует основное количество билирубина) и **протеина Z**. Активность поглощения билирубина гепатоцитом зависит от скорости его метаболизма в клетке.

Лигандин и протеин Z обнаружены также в клетках почек и кишечника, поэтому при недостаточности функции печени они способны компенсировать ослабление процессов детоксикации в этом органе.

Конъюгация билирубина в гладком ЭР

В гладком ЭР гепатоцитов к билирубину присоединяются (реакция конъюгации) полярные группы, главным образом от **глюкуроновой кислоты**. Билирубин имеет 2 карбоксильные группы, поэтому может соединяться с 2 молекулами глюкуроновой кислоты, образуя хорошо

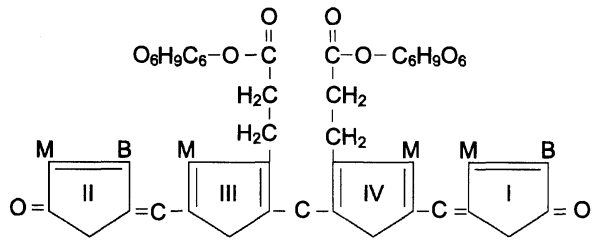


Рис. 13-12. Структура билирубиндиглюкуронида (конъюгированный, «прямой» билирубин). Глюкуроновая кислота присоединяется эфирной связью к двум остаткам пропионовой кислоты с образованием ацилглюкуронида.

растворимый в воде конъюгат — диглюкуронид билирубина (конъюгированный, или прямой, билирубин) (рис. 13-12).

Донором глюкуроновой кислоты служит УДФ-глюкуронат. Специфические ферменты, УДФ-глюкуронилтрансферазы (уридиндифосфоглюкуронилтрансферазы) катализируют образование моно- и диглюкуронидов билирубина (рис. 13-13). Индукторами синтеза УДФ-глюкуронилтрансфераз служат некоторые лекарственные препараты, например, фенобарбитал (см. раздел 12).

Секреция билирубина в жёлчь

Секреция конъюгированного билирубина в жёлчь идёт по механизму активного транспорта, т.е. против градиента концентрации. Активный транспорт является, вероятно, скорость-лимитирующей стадией всего процесса метаболизма билирубина в печени. В норме диглюкуронид билирубина — главная форма экскреции билирубина в жёлчь, однако не ис-

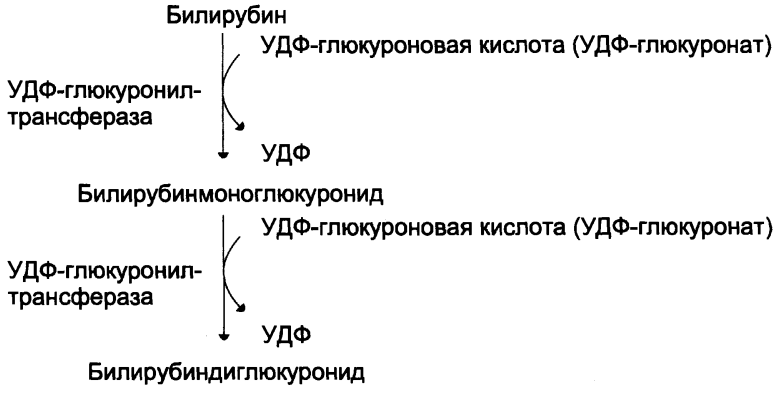


Рис. 13-13. Образование билирубиндиглюкуронида.

ключается присутствие небольшого количества моноглюкуронида. Транспорт конъюгированного билирубина из печени в жёлчь активируется теми же лекарствами, которые способны индуцировать конъюгацию билирубина. Таким образом, можно сказать, что скорость конъюгации билирубина и активный транспорт билирубинглюкуронида из гепатоцитов в жёлчь строго взаимосвязаны (рис. 13-14).

В. Катаболизм билирубиндиглюкуронида

В кишечнике поступившие билирубинглюкурониды гидролизуются специфическими бактериальными ферментами β-глюкуронидазами, которые гидролизуют связь между билирубином и остатком глюкуроновой кислоты. Освободившийся в ходе этой реакции билирубин под действием кишечной микрофлоры восстанавливается с образованием группы бесцветных тетрапиррольных соединений — **уробилиногенов** (рис. 13-15).

В подвздошной и толстой кишках небольшая часть уробилиногенов снова всасывается, попадает с кровью воротной вены в печень. Основная часть уробилиногена из печени в составе жёлчи выводится в кишечник и выделяется с фекалиями из организма, часть уробилиногена

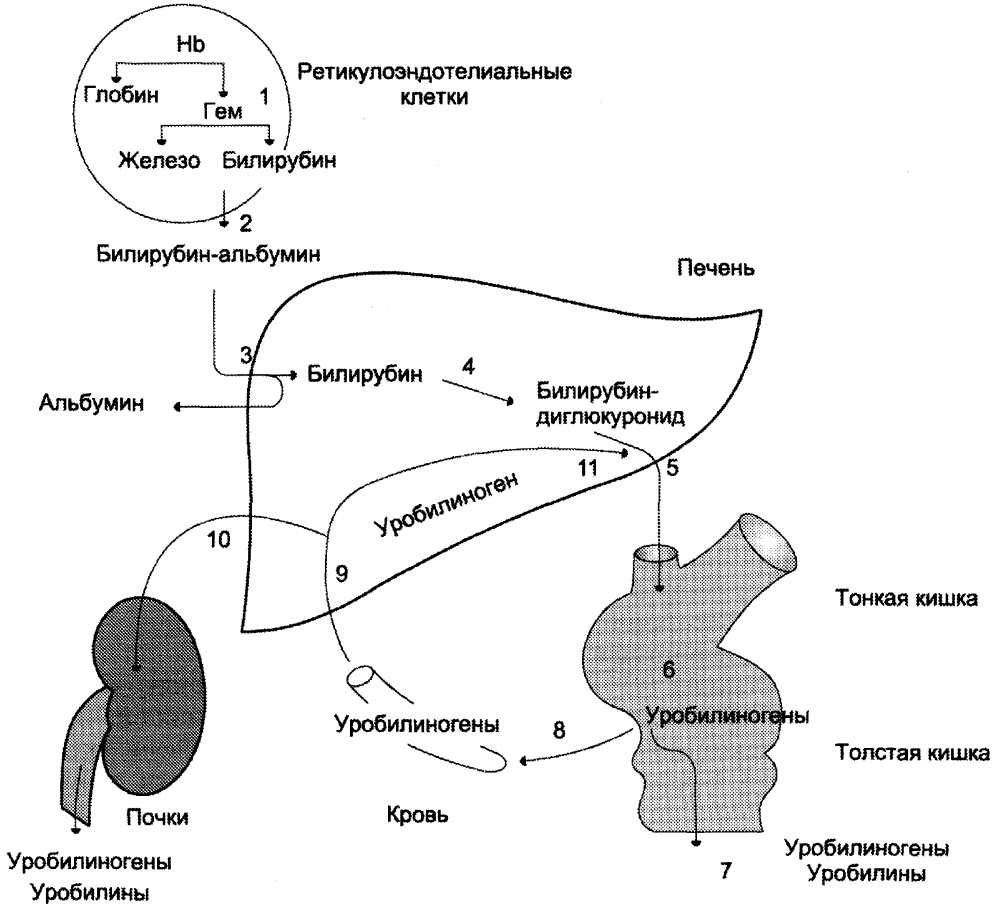


Рис. 13-14. Билирубин-уробилиногеновый цикл в печени. 1 — катаболизм Hb в ретикулоэндотелиальных клетках костного мозга, селезёнки, лимфатических узлов; 2 — образование транспортной формы комплекса билирубин–альбумин; 3 — поступление билирубина в печень; 4 — образование билирубинглюкуронидов; 5 — секреция билирубина в составе жёлчи в кишечник; 6 — катаболизм билирубина под действием кишечных бактерий; 7 — удаление уробилиногенов с фекалиями; 8 — всасывание уробилиногенов в кровь; 9 — усвоение уробилиногенов печенью; 10 — поступление части уробилиногенов в кровь и выделение почками с мочой; 11 — небольшая часть уробилиногенов секретируется в жёлчь.

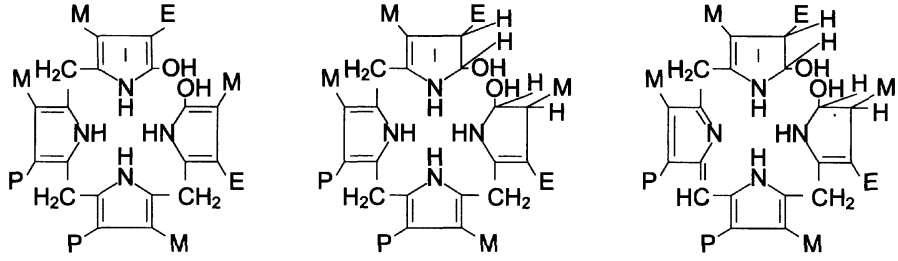


Рис. 13-15. Структура некоторых жёлчных пигментов. Мезобилиноген — промежуточный продукт катаболизма билирубина в кишечнике.

из печени поступает в кровь и удаляется с мочой в форме уробилина (рис. 13-14). В норме большая часть бесцветных уробилиногенов, образующихся в толстой кишке, под действием кишечной микрофлоры окисляется в прямой кишке до пигмента коричневого цвета **уробилина** и удаляется с фекалиями. Цвет фекалий обусловлен присутствием уробилина.

IV. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БИЛИРУБИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ЧЕЛОВЕКА

В настоящее время для определения содержания билирубина в сыворотке (плазме) крови используют предложенный в 1916 г. Ван дер Бергом метод определения билирубина в сыворотке крови, основанный на диазореакции.

В нормальном состоянии концентрация общего билирубина в плазме составляет 0,3–1 мг/дл (1,7–17 мкмоль/л), 75% от общего количества билирубина находится в неконъюгированной форме (непрямой билирубин). В клинике конъюгированный билирубин называют прямым, потому что он водорастворим и может быстро взаимодействовать с диазореагентом, образуя соединение розового цвета, — это и есть прямая реакция Ван дер Берга. Неконъюгированный билирубин гидрофобен, поэтому в плазме крови содержится в комплексе с альбумином и не реагирует с диазореактивом до тех пор, пока не добавлен органический растворитель, например этанол, который осаждает альбумин. Неконъюгированный билирубин, взаимодействующий с азокрасителем только после осаждения белка, называют непрямым билирубином.

Когда содержание билирубина превышает норму, говорят о гипербилирубинемии. В зависимости от того, концентрация какого типа билирубина повышена в плазме — неконъюгированного или конъюгированного, — гипербилирубинемию классифицируют как неконъюгированную и конъюгированную.

У больных с печёночно-клеточной патологией, сопровождающейся длительным повышением концентрации конъюгированного билирубина, в крови обнаруживают третью форму плазменного билирубина, при котором билирубин ковалентно связан с альбумином, и поэтому его невозможно отделить обычным способом. В некоторых случаях до 90% общего содержания билирубина крови может находиться в этой форме.

A. Желтухи

Причинами гипербилирубинемии могут быть увеличение образования билирубина, превышающее способность печени экскретировать его, или повреждение печени, приводящее к нарушению секреции билирубина в жёлчь в нормальных количествах. Гипербилирубинемию отмечают также при закупорке желчевыводящих протоков печени.

Во всех случаях содержание билирубина в крови повышается. При достижении определённой концентрации он диффундирует в ткани, окрашивая их в жёлтый цвет. Пожелтение тканей из-за отложения в них билирубина называют **желтухой**. Клинически желтуха может не

проявляться до тех пор, пока концентрация билирубина в плазме крови не превысит верхний предел нормы более чем в 2,5 раза, т.е. не станет выше 50 мкмоль/л.

1. Гемолитическая (надпечёночная) желтуха

Известно, что способность печени образовывать глюкурониды и выделять их в жёлчь в 3–4 раза превышает их образование в физиологических условиях. Гемолитическая (надпечёночная) желтуха — результат интенсивного гемолиза эритроцитов. Она обусловлена чрезмерным образованием билирубина, превышающим способность печени к его выведению. Гемолитическая желтуха развивается при исчерпании резервных возможностей печени. Основная причина надпечёночной желтухи — наследственные или приобретённые гемолитические анемии. При гемолитических анемиях, вызванных сепсисом, лучевой болезнью, дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы эритроцитов, талассемией, переливанием несовместимых групп крови, отравлением сульфаниламидами, количество освобождающегося из эритроцитов гемоглобина за сутки может доходить до 45 г (при норме 6,25 г), что значительно увеличивает образование билирубина. Гипербилирубинемия у больных гемолитической желтухой обусловлена значительным повышением (103–171 мкмоль/л) в крови концентрации альбуминсвязанного неконъюгированного билирубина (непрямой билирубин). Образование в печени и поступление в кишечник больших количеств билирубинглюкуронидов (прямой билирубин) ведёт к усиленному образованию и выделению с калом и мочой уробилиногенов и более интенсивной их окраски (рис. 13-16).

Один из главных признаков гемолитической желтухи — повышение содержания в крови неконъюгированного (непрямого) билирубина. Это позволяет легко отличить её от механической (подпечёночной) и печёночно-клеточной (печёночной) желтух.

Неконъюгированный билирубин токсичен. Гидрофобный, липофильный неконъюгированный билирубин, легко растворяясь в липидах мембраны и проникая вследствие этого в митохондрии, разобщает в них дыхание и окислительное фосфорилирование, нарушает синтез белка, поток ионов калия через мембрану клетки и органелл. Это отрицательно сказывается на состоянии ЦНС, вызывая у больных ряд характерных неврологических симптомов.

Желтуха новорождённых

Частая разновидность гемолитической желтухи новорождённых — «физиологическая желтуха», наблюдающаяся в первые дни жизни ребёнка. Причиной повышения концентрации непрямого билирубина в крови служит ускоренный гемолиз и недостаточность функции белков и ферментов печени, ответственных за поглощение, конъюгацию и секрецию прямого билирубина. У новорождённых не только снижена активность УДФ-глюкуронилтрансферазы, но и, по-видимому, недостаточно активно происходит синтез второго субстрата реакции конъюгации УДФ-глюкуроната.

Известно, что УДФ-глюкуронилтрансфераза — индуцируемый фермент (см. раздел 12). Новорождённым с физиологической желтухой вводят лекарственный препарат фенобарбитал, индуцирующее действие которого было описано в разделе 12.

Одно из неприятных осложнений «физиологической желтухи» — билирубиновая энцефалопатия. Когда концентрация неконъюгированного билирубина превышает 340 мкмоль/л, он проходит через гематоэнцефалический барьер головного мозга и вызывает его поражение.

2. Печёночно-клеточная (печёночная) желтуха

Печёночно-клеточная (печёночная) желтуха обусловлена повреждением гепатоцитов и жёлчных капилляров, например, при острых вирусных инфекциях, хроническом и токсических гепатитах.

Причина повышения концентрации билирубина в крови — поражение и некроз части печёночных клеток. Происходит задержка билирубина в печени, чему способствует резкое ослабление метаболических процессов в поражённых гепатоцитах, которые теряют способность нормально выполнять различные биохимические и физиологические процессы, в частности переводить конъюгированный (прямой) билирубин из клеток в жёлчь против градиента концентрации. Для печёночно-клеточной желтухи характерно то, что вместо преобладающих в норме диглюкуронидов билирубина в поражённой печёночной клетке об-

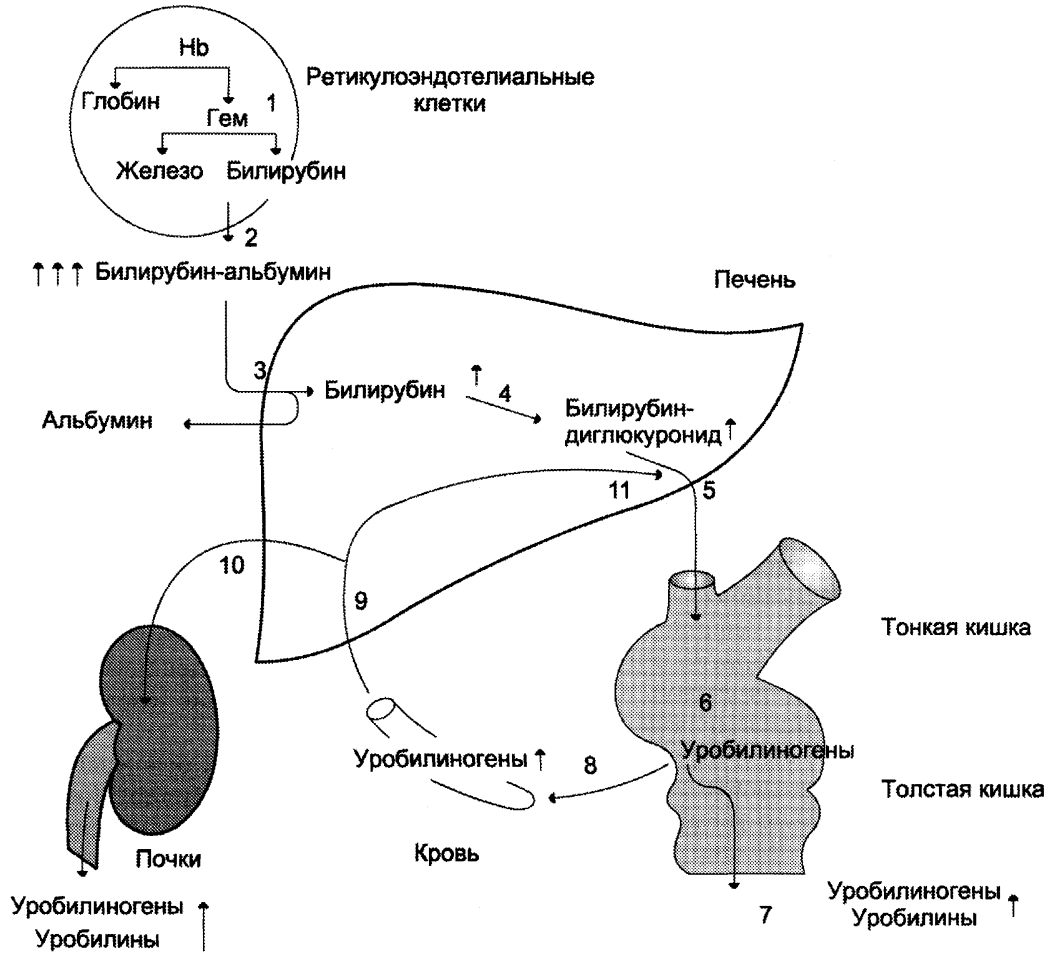


Рис. 13-16. Билирубин-уробилиногеновый цикл при гемолитической желтухе. 1 — катаболизм Hb идёт с повышенной скоростью; 2 — в крови примерно в 10 раз повышена концентрация непрямого билирубина; 3 — альбумин высвобождается из комплекса билирубин-альбумин; 4 — активность реакции глюкуронирования возрастает, но она ниже, чем скорость образования билирубина; 5 — секреция билирубина в жёлчь повышена; 6, 7,10 — повышенное содержание уробилиногенов в кале и моче придаёт им более интенсивную окраску; уробилиноген всасывается из кишечника в кровь (8) и снова попадает в печень по воротной вене (9).

разуются главным образом моноглюкурониды (рис. 13-17).

В результате деструкции печёночной паренхимы образующийся прямой билирубин частично попадает в большой круг кровообращения, что ведёт к желтухе. Экскреция жёлчи также нарушена. Билирубина в кишечник попадает меньше, чем в норме.

При печёночно-клеточной желтухе повышается концентрация в крови как общего билирубина, так и обеих его фракций — неконъюгированного (непрямого) и конъюгированного (прямого).

Так как в кишечник поступает меньше билирубинглюкуронида, то и количество образующегося уробилиногена также снижено. Поэтому кал гипохоличный, т.е. менее окрашенный. Моча, наоборот, имеет более интенсивную окраску за счёт присутствия там не только уробилинов, но и конъюгированного билирубина, который хорошо растворим в воде и экскретируется с мочой.

3. Механическая, или обтурационная (подпечёночная) желтуха

Механическая, или обтурационная (подпечёночная), желтуха развивается при наруше-

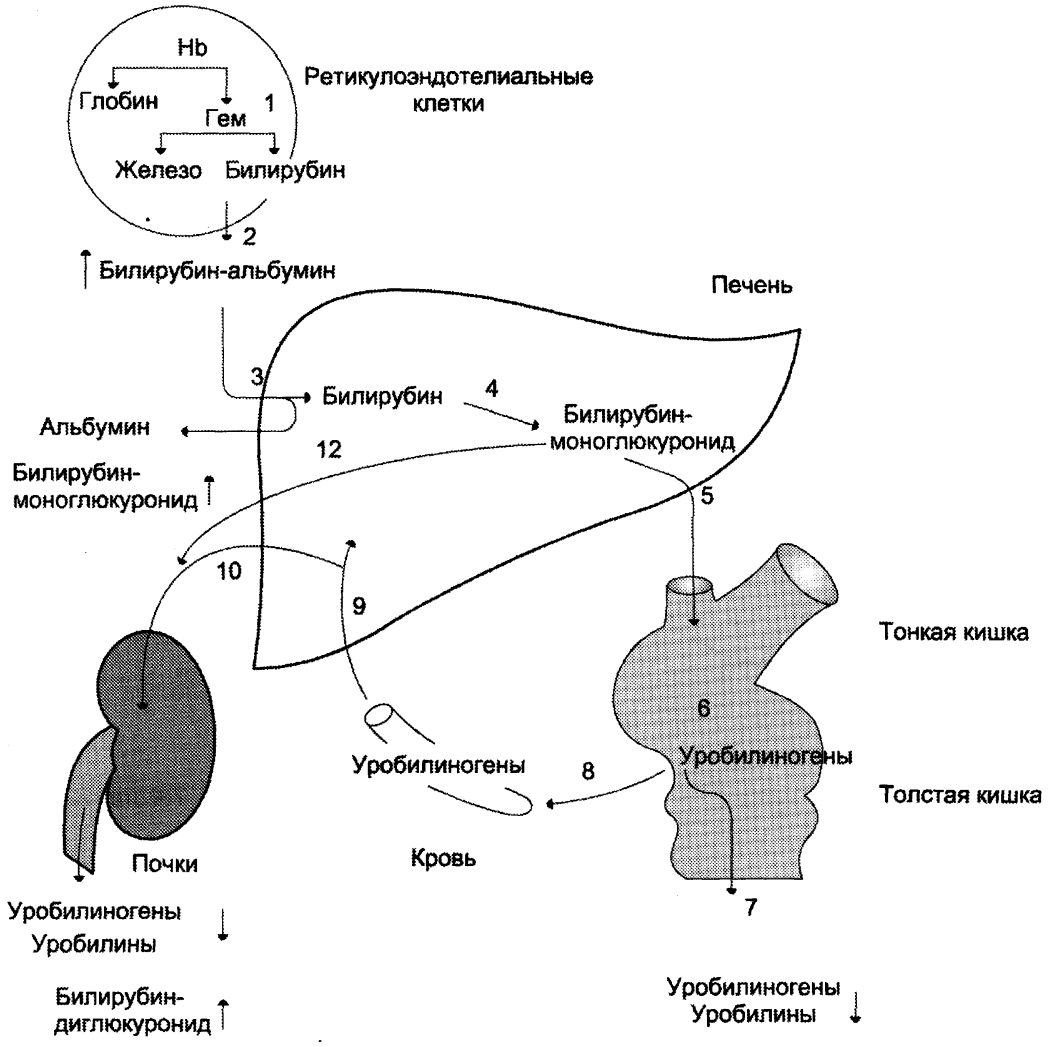


Рис. 13-17. Нарушение билирубин-уробилиногенового цикла при печёночно-клеточной желтухе. В печени снижена скорость реакции глюкуронирования билирубина (4), поэтому в крови повышается концентрация непрямого билирубина; вследствие нарушения паренхимы печени часть образованного в печени билирубинглюкуронида попадает в кровь (12) и далее с мочой (10) удаляется из организма. В моче больных присутствуют уробилины и билирубинглюкурониды. Остальные цифры соответствуют этапам метаболизма билирубина на рис. 13-16.

нии желчеотделения в двенадцатиперстную кишку. Это может быть вызвано закупоркой жёлчных протоков, например при желчнокаменной болезни, опухолью поджелудочной железы, жёлчного пузыря, печени, двенадцатиперстной кишки, хроническим воспалением поджелудочной железы или послеоперационным сужением общего жёлчного протока (рис. 13-18).

При полной закупорке общего жёлчного протока конъюгированный билирубин в составе жёлчи не поступает в кишечник, хотя гепатоциты продолжают его вырабатывать. Поскольку билирубин в кишечник не попадает, продуктов его катаболизма уробилиногенов в моче и кале нет. Кал обесцвечен. Так как нормальные пути экскреции билирубина заблокированы, происходит его утечка в кровь, поэтому в крови больных повышена концентрация конъюгированного билирубина. Растворимый билирубин экскретируется с мочой, придавая ей насыщенный оранжево-коричневый цвет.

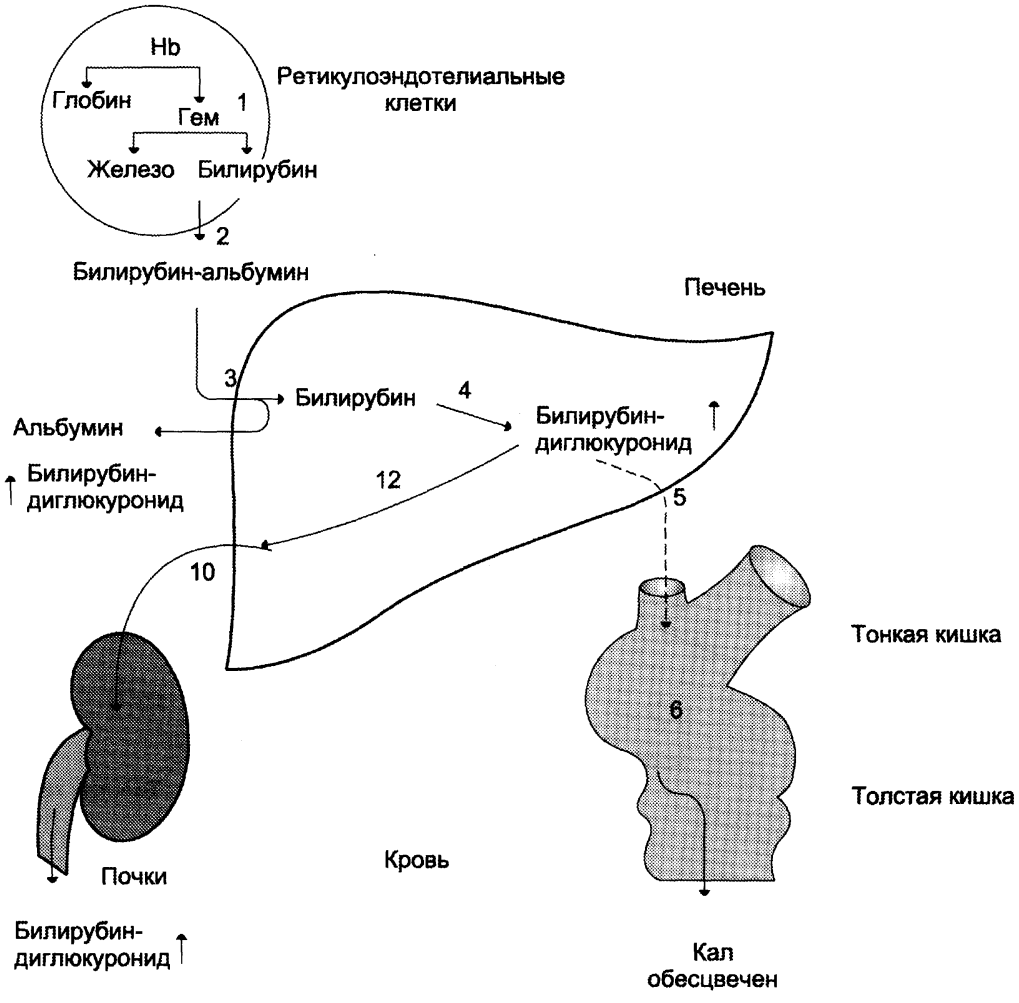


Рис. 13-18. Нарушение билирубин-уробилиногенового цикла при обтурационной желтухе. Вследствие закупорки жёлчного пузыря билирубинглюкуронид не секретируется в жёлчь (5); отсутствие билирубина в кишечнике приводит к обесцвечиванию кала (6); растворимый билирубинглюкуронид выделяется почками с мочой (10). Уробилинов в моче нет; образующийся в печени билирубинглюкуронид поступает в кровь (12), вследствие этого возрастает содержание прямого билирубина. Остальные цифры соответствуют этапам метаболизма билирубина на рис. 13-16.

Б. Дифференциальная диагностика желтух

При диагностике желтух надо иметь в виду, что на практике редко отмечают желтуху какого-либо одного типа в «чистом» виде. Чаще встречается сочетание того или иного типа. Так, при выраженной гемолитической желтухе, сопровождающейся повышением концентрации непрямого билирубина, неизбежно страдают различные органы, в том числе и печень, что может вносить элементы паренхиматозной желтухи, т.е. повышение в крови и моче прямого билирубина. В свою очередь, паренхиматозная желтуха, как правило, включает в себя элементы механической. При подпечёночной (механической) желтухе, например при раке головки поджелудочной железы, неизбежен повышенный гемолиз как следствие раковой интоксикации и, как следствие, повышение в крови как прямого, так и непрямого билирубина.

Итак, гипербилирубинемия может быть следствием избытка как связанного, так и свободного билирубина. Измерение их концентраций

по отдельности необходимо при постановке диагноза желтухи. Если концентрация билирубина в плазме <100 мкмоль/л и другие тесты функции печени дают нормальные результаты, возможно предположить, что повышение обусловлено за счёт непрямого билирубина. Чтобы подтвердить это, можно сделать анализ мочи, поскольку при повышении концентрации непрямого билирубина в плазме прямой билирубин в моче отсутствует.

При дифференциальной диагностике желтух необходимо учитывать содержание уробилиногенов в моче. В норме за сутки из организма выделяется в составе мочи около 4 мг уробилиногенов. Если с мочой выделяется повышенное количество уробилиногенов, то это — свидетельство недостаточности функции печени, например при печёночной или гемолитической желтухе. Присутствие в моче не только уробилиногенов, но и прямого билирубина указывает на поражение печени и нарушение поступления жёлчи в кишечник.

B. Наследственные нарушения метаболизма билирубина

Известно несколько заболеваний, при которых желтуха вызвана наследственными нарушениями метаболизма билирубина.

Примерно у 5% населения диагностируют наследственную желтуху, вызванную генетическими нарушениями в структуре белков и ферментов, ответственных за транспорт (захват) непрямого билирубина в печень и его конъюгацию с глюкуроновой кислотой. Эта патология наследуется по аутосомно-доминантному типу. В крови больных повышена концентрация непрямого билирубина.

Известно 2 типа наследственных желтух, обусловленных нарушением реакции глюкуронирования в печени — образования прямого билирубина.

Для первого типа характерно полное отсутствие УДФ-глюкуронилтрансферазы. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Введение фенобарбитала, индуктора УДФ-глюкуронилтрансферазы, не приводит к снижению уровня билирубина. Дети умирают в раннем возрасте из-за развития билирубиновой энцефалопатии.

Для второго типа характерно снижение активности (недостаточности) УДФ-глюкуронилтрансферазы, гипербилирубинемия происходит за счёт непрямого билирубина. Желтуха хорошо поддаётся лечению фенобарбиталом.

Нарушение активного транспорта образованных в клетках печени билирубинглюкуронидов в жёлчь характерно для желтухи, наследуемой по аутосомно-доминантному типу. Проявляется гипербилирубинемией за счёт прямого билирубина и билирубинурией (в моче определяется прямой билирубин).

Семейная гипербилирубинемия новорождённых связана с наличием конкурентных ингибиторов конъюгации билирубина (эстрогенов, свободных жирных кислот) в материнском молоке. При грудном вскармливании ингибиторы конъюгации билирубина обнаруживают в сыворотке крови ребёнка. Такая гипербилирубинемия была названа транзиторной. Гипербилирубинемия исчезает при переводе ребёнка на искусственное вскармливание. Не поддающаяся лечению гипербилирубинемия приводит к развитию билирубиновой энцефалопатии и ранней смерти.

РАЗДЕЛ 14

БИОХИМИЯ КРОВИ

Кровь — жидкая внутренняя среда организма. Общий объём крови взрослого человека составляет 5–6 л. Кровь состоит из жидкой части — плазмы, составляющей 55% её общего объёма, и форменных элементов, к которым относят эритроциты, лейкоциты и тромбоциты.

Благодаря работе сердца кровь циркулирует по замкнутой системе кровеносных сосудов и осуществляет транспорт различных химических веществ. Она переносит кислород из лёгких к тканям и углекислый газ из тканей в лёгкие в составе гемоглобина эритроцитов (дыхательная функция); доставляет продукты переваривания пищи из кишечника в ткани (трофическая функция); уносит конечные продукты обмена из тканей в выделительные органы (выделительная функция); перемещает промежуточные продукты обмена веществ, синтез и использование которых происходит в разных органах.

Кровь участвует в регуляции обмена веществ, доставляя сигнальные молекулы от органов внутренней секреции к тканям-мишеням.

Защитная функция крови имеет две стороны. Во-первых, в ней содержатся клеточные (лейкоциты) и гуморальные (антитела) элементы иммунного реагирования, которые защищают организм от любой чужеродной молекулы. Во-вторых, это способность крови свёртываться. При повреждении сосуда прерывается замкнутость циркуляции крови, а уменьшение количества крови может привести к серьёзным нарушениям функций клеток, вплоть до их гибели. Кровь здорового человека образует тромб в месте повреждения, который закупоривает просвет повреждённого сосуда и останавливает кровотечение.

Кровь поддерживает кислотно-щелочной и водный баланс организма. В норме pH крови составляет 7,36–7,4. Сохранение постоянства pH является важнейшей задачей, так как в кровь выделяется большое количество кислых (например, лактат, кетоновые тела, угольная кислота), а также основных (аммиак) продуктов метаболизма. Регуляцию pH осуществляют буферные системы крови, которые подробно рассмотрены в курсе физиологии.

Выполняя терморегуляторную функцию, кровь поддерживает постоянство температуры тела в разных его частях.

Химический состав растворимых в плазме крови веществ относительно постоянен, так как существуют мощные нервные и гуморальные механизмы, поддерживающие гомеостаз (постоянство внутренней среды). Растворимые вещества плазмы составляют около 10% массы крови, из них на долю белков приходится около 7%, на долю неорганических солей — 0,9%, остальную часть образуют небелковые органические соединения. Диапазон концентраций разных веществ плазмы крови у здорового человека представлен в специальных биохимических справочниках и является важнейшим материалом для медицинской биохимии.

Кровь связана со всеми тканями организма, поэтому возникновение патологического процесса в каком-либо органе приводит к изменению биохимических показателей крови. Эта информация может быть ценной при постановке диагноза и оценке эффективности лечебных мероприятий.

I. МЕТАБОЛИЗМ ЭРИТРОЦИТОВ

Эритроциты — высокоспециализированные клетки, которые переносят кислород от лёгких к тканям и диоксид углерода, образующийся при метаболизме, из тканей к альвеолам лёгких. Транспорт O_2 и CO_2 в этих клетках осуществляет гемоглобин, составляющий 95% их сухого остатка. Организм взрослого человека содержит около 25×10^{12} эритроцитов, при этом каждые сутки обновляется примерно 1% этого количества клеток, т.е. в течение одной секунды в кровоток поступает около 2 млн эритроцитов.

A. Особенности строения и дифференцировки эритроцитов

Эритроциты — единственные клетки, которые имеют только клеточную мембрану и цитоплазму. Дифференцировка стволовых клеток в специализированные происходит в клетках костного мозга и заканчивается в кровотоке. Особенности строения эритроцитов соответствуют их функциям: большая площадь поверхности обеспечивает эффективность газообмена, эластичная клеточная мембрана облегчает движение по узким капиллярам, специальная ферментативная система защищает эти клетки от активных форм кислорода.

Дифференцировка эритроцитов. Эритроциты, так же как и другие клетки крови, образуются из полипотентных стволовых клеток костного мозга (рис. 14-1).

Размножение и превращение начальной клетки эритроидного ряда в унипотентную стимулирует ростовой фактор интерлейкин-3. Интерлейкин-3 синтезируется Т-лимфоцитами, а также клетками костного мозга. Это низкомолекулярный белок группы цитокинов — регуляторов роста и дифференцировки клеток.

Дальнейшую пролиферацию и дифференцировку унипотентной клетки эритроидного ряда регулирует синтезирующийся в почках гормон эритропоэтин. Скорость образования эритропоэтина в почках зависит от парциального давления кислорода. При недостатке кислорода скорость образования гормона повышается и, соответственно, количество эритроцитов тоже увеличивается. Хроническая почечная недостаточность сопровождается снижением образования эритропоэтина в почках, что приводит к развитию анемии.

В процессе дифференцировки на стадии эритробласта происходят интенсивный синтез гемоглобина, конденсация хроматина, уменьшение размера ядра и его удаление. Образующийся ретикулоцит ещё содержит глобиновую мРНК и активно синтезирует гемоглобин. Циркулирующие в крови ретикулоциты лишаются рибосом, ЭР, митохондрий и в течение двух суток превращаются в эритроциты. Стволовая клетка превращается в эритроцит за две недели. Эритроциты не содержат ядра и поэтому не способны к самовоспроизведению и репарации возникающих в них повреждений. Эти клетки циркулируют в крови около 120 дней и потом разрушаются макрофагами в печени, селезёнке и костном мозге (см. раздел 13).

Строение эритроцитов. Двояковогнутая форма эритроцитов имеет большую площадь поверхности по сравнению с клетками сферической формы такого же размера. Это облегчает газообмен между клеткой и внеклеточной средой. Кроме того, такая форма, а также особенности строения мембраны и цитоскелета обеспечивают большую пластичность эритроцитов при прохождении ими мелких капилляров.

Важную роль в сохранении формы и способности к обратимой деформации эритроцитов играют липиды и белки плазматической мемб-

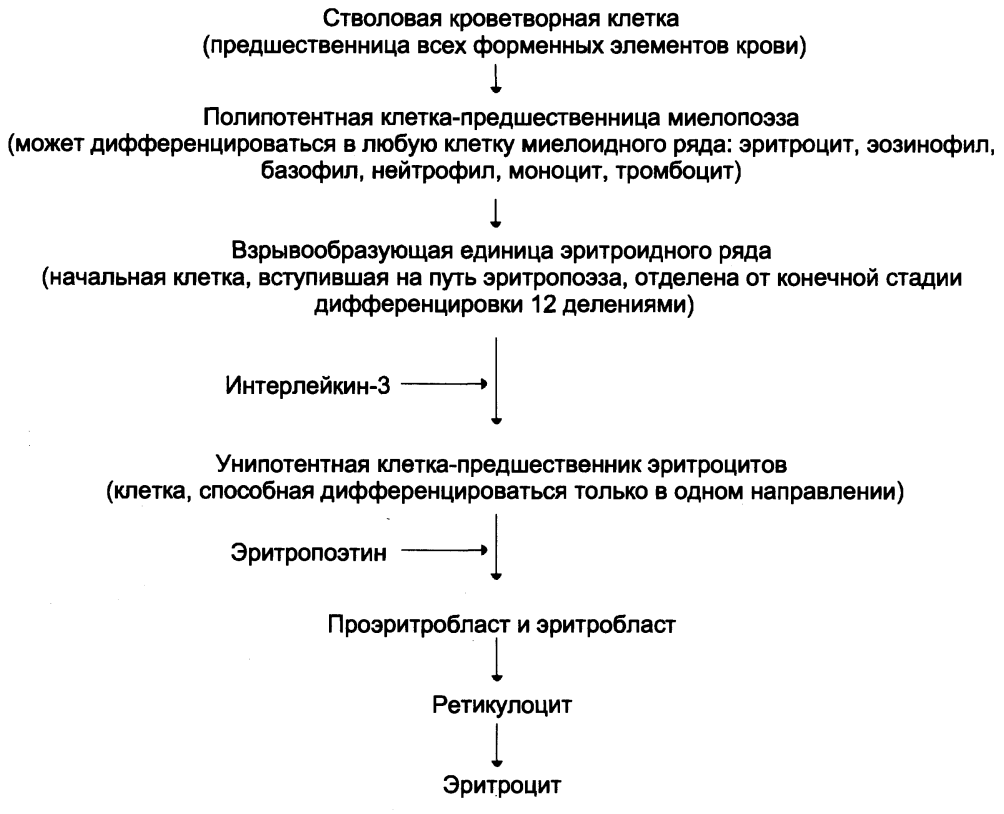


Рис. 14-1. Схема дифференцировки стволовых клеток костного мозга в зрелые эритроциты.

раны. Липиды бислоя плазматической мембраны эритроцитов, так же, как плазматические мембраны других клеток, содержат глицерофосфолипиды, сфингофосфолипиды, гликолипиды и холестерол (см. раздел 5). Увеличение содержания холестерола в составе мембраны, которое может наблюдаться при некоторых заболеваниях, снижает её текучесть и эластичность, а следовательно, и способность к обратимой деформации. Это, в свою очередь, затрудняет движение эритроцитов через капилляры и может способствовать развитию гемостаза.

Методом электрофореза в мембране эритроцитов обнаруживают около 15 основных мембранных белков с молекулярной массой от 15 до 250 кД. Около 60% массы мембранных белков приходится на спектрин, гликофорин и белок полосы 3 (называется так по расположению этой белковой фракции на электрофореграмме относительно других белков). Интегральный гликопротеин гликофорин присутствует только в плазматической мембране эритроцитов (рис. 14-2). К N-концевой части белка, расположенной на наружной поверхности мембраны, присоединено около 20 олигосахаридных цепей (см. раздел 5). Олигосахариды гликофорина — антигенные детерминанты системы групп крови АВ0 (см. раздел 10).

Спектрин — периферический мембранный белок, нековалентно связанный с цитоплазматической поверхностью липидного бислоя мембраны. Он представляет собой длинную, тонкую, гибкую фибриллу и является основным белком цитоскелета эритроцитов. Спектрин состоит из α- и β-полипептидных цепей, имеющих доменное строение; α- и β-цепи димера расположены антипараллельно, перекручены друг с другом и нековалентно взаимодействуют во многих точках. Спектрин может прикрепляться к мембране и с помощью белка анкирина. Этот крупный белок соединяется с β-цепью спектрина и цитоплазматическим доменом интегрального белка мембраны — белка полосы 3. Анкирин не только фиксирует

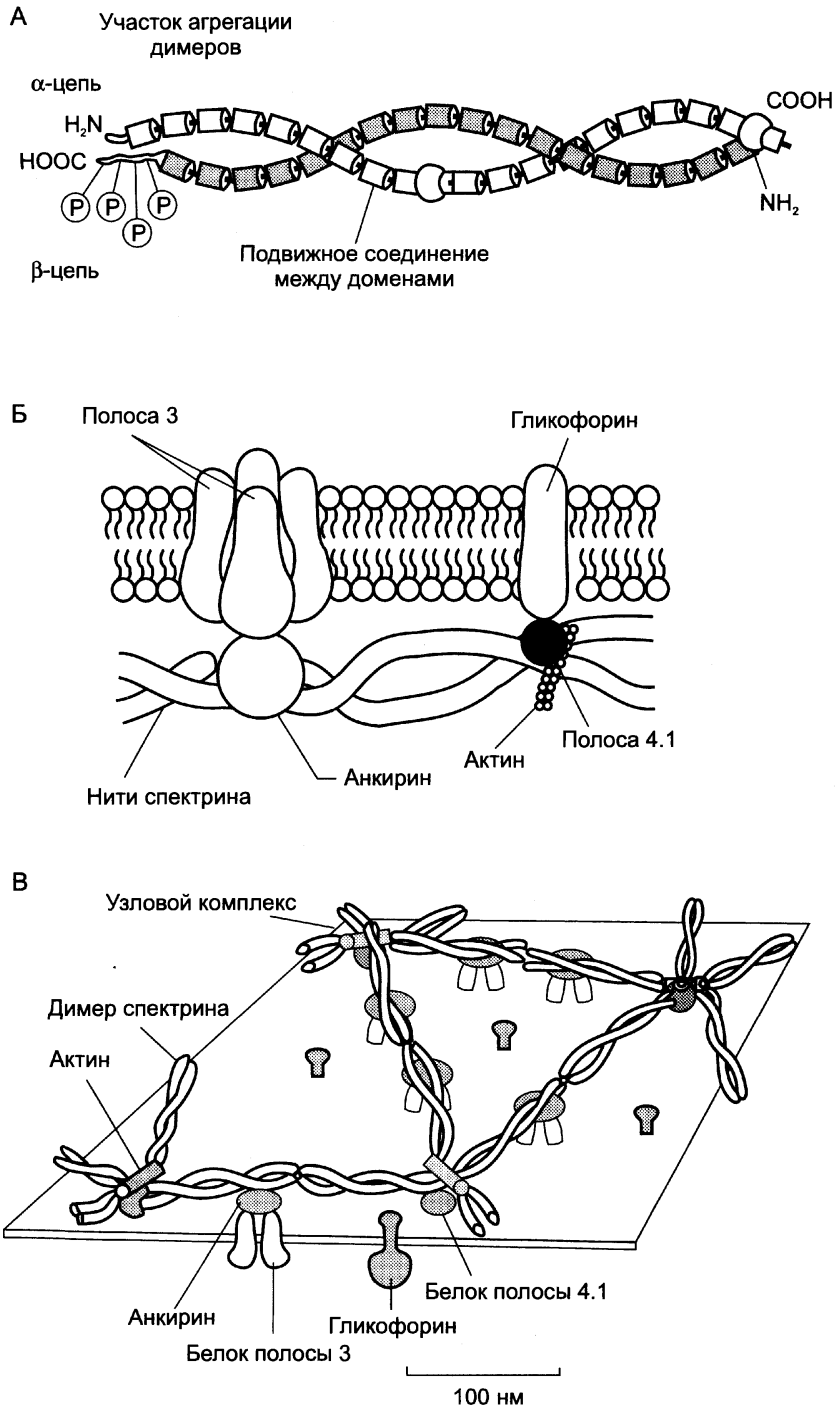


Рис. 14-2. Строение спектрина (А), околомембранного белкового комплекса (Б) и цитоскелета эритроцитов (В). Каждый димер спектрина состоит из двух антипараллельных, нековалентносвязанных между собой α- и β-полипептидных цепей (А). Белок полосы 4.1 образует со спетрином и актином «узловой комплекс», который посредством белка полосы 4.1 связывается с цитоплазматическим доменом гликофорина. Анкирин соединяет спектрин с основным интегральным белком плазматической мембраны — белком полосы 3 (Б). На цитоплазматической поверхности мембраны эритроцита имеется гибкая сетеобразная структура, состоящая из белков и обеспечивающая пластичность эритроцита при прохождении им через мелкие капилляры (В).

спектрин на мембране, но и уменьшает скорость диффузии белка полосы 3 в липидном слое. Таким образом, на цитоплазматической поверхности эритроцитов образуется гибкая сетевидная структура, которая обеспечивает сохранение их формы при прохождении через узкие капилляры сосудов (рис. 14-2).

Интегральный белок полосы 3 — белок-переносчик ионов Cl^- и HCO_3^- через плазматическую мембрану эритроцитов по механизму пассивного антипорта. В разделе 1 подробно описана роль эритроцитов в газообмене. Поступающий из тканей в эритроциты CO_2 под действием фермента карбоангидразы превращается в слабую угольную кислоту, которая распадается на H^+ и HCO_3^-. Образующиеся при этом протоны присоединяются к гемоглобину, уменьшая его сродство к O_2, а бикарбонаты с помощью белка полосы 3 обмениваются на Cl^- и выходят в плазму крови.

$$H_2O + CO_2 \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow H^+ + HCO_3^- \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{обмен на } Cl^-.$$

В лёгких увеличение парциального давления кислорода и взаимодействие его с гемоглобином приводят к вытеснению протонов из гемоглобина, обмену внутриклеточного Cl^- на HCO_3^- через белок полосы 3, образованию угольной кислоты и её разрушению на CO_2 и H_2O.

Мембранный фермент Na^+,K^+-АТФ-аза обеспечивает поддержание градиента концентраций Na^+ и K^+ по обе стороны мембраны. При снижении активности Na^+,K^+-АТФ-азы концентрация Na^+ в клетке повышается, так как небольшие ионы могут проходить через мембрану простой диффузией. Это приводит к увеличению осмотического давления, увеличению поступления воды в эритроцит и к его гибели в результате разрушения клеточной мембраны — гемолизу.

Ca^{2+}-АТФ-аза — ещё один мембранный фермент, осуществляющий выведение из эритроцитов ионов кальция и поддерживающий градиент концентрации этого иона по обе стороны мембраны.

Б. Метаболизм глюкозы в эритроцитах

Эритроциты лишены митохондрий, поэтому в качестве энергетического материала они могут использовать только глюкозу. В эритроцитах катаболизм глюкозы обеспечивает сохранение структуры и функции гемоглобина, целостность мембран и образование энергии для работы ионных насосов. Глюкоза поступает в эритроциты путём облегчённой диффузии с помощью ГЛЮТ-2. Около 90% поступающей глюкозы используется в анаэробном гликолизе, а остальные 10% — в пентозофосфатном пути.

Конечный продукт анаэробного гликолиза лактат выходит в плазму крови и используется в других клетках, прежде всего гепатоцитах. АТФ, образующийся в анаэробном гликолизе, обеспечивает работу Na^+,K^+-АТФ-азы и поддержание самого гликолиза, требующего затраты АТФ в гексокиназной и фосфофруктокиназной реакциях (см. раздел 7).

Важная особенность анаэробного гликолиза в эритроцитах по сравнению с другими клетками — присутствие в них фермента бисфосфоглицератмутазы. Бисфосфоглицератмутаза катализирует образование 2,3-бисфосфоглицерата из 1,3-бисфосфоглицерата (рис. 14-3). Образующийся только в эритроцитах 2,3-бисфосфоглицерат служит важным аллостерическим регулятором связывания кислорода гемоглобином (см. раздел 1).

Глюкоза в эритроцитах используется и в пентозофосфатном пути, окислительный этап которого обеспечивает образование кофермента NADPH, необходимого для восстановления глутатиона (рис. 14-4).

В. Обезвреживание активных форм кислорода в эритроцитах

Большое содержание кислорода в эритроцитах определяет высокую скорость образования супероксидного анион-радикала (O_2^-), пероксида водорода (H_2O_2) и гидроксил радикала ($OH^\bullet$). Эритроциты содержат ферментативную систему, предотвращающую токсическое действие активных форм кислорода и разрушение мембран эритроцитов (рис. 14-4). Постоянный источник активных форм кислорода в эритроцитах — неферментативное окисление гемоглобина в метгемоглобин:

$$Hb(Fe^{2+}) \downarrow \rightarrow e^- + O_2 \rightarrow O_2^-$$
$$Hb(Fe^{3+})$$

В течение суток до 3% гемоглобина может окисляться в метгемоглобин. Однако постоян-

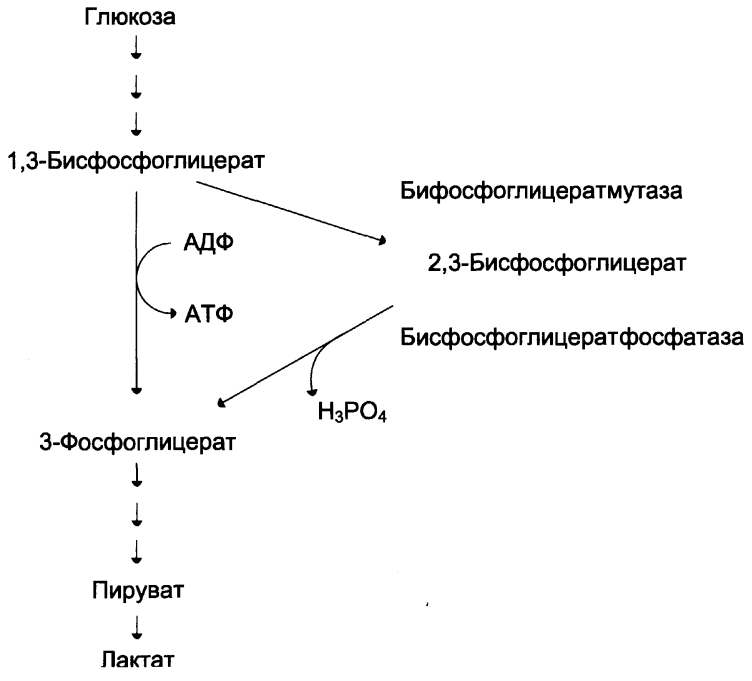


Рис. 14-3. Метаболизм 2,3-бисфосфоглицерата в эритроцитах.

но метгемоглобинредуктазная система восстанавливает метгемоглобин в гемоглобин. Метгемоглобинредуктазная система состоит из цитохрома b_5 и флавопротеина цитохром b_5 редуктазы, донором водорода для которой служит NADH, образующийся в глицеральдегиддегидрогеназной реакции гликолиза (рис. 14-4).

Цитохром b_5 восстанавливает Fe^{3+} метгемоглобина в Fe^{2+}:

$$Hb\text{-}Fe^{3+} + \text{цит. } b_{5\ \text{восст.}} \rightarrow HbFe^{2+} + \text{цит. } b_{5\ \text{ок.}}.$$

Окисленный цитохром b_5 далее восстанавливается цитохром b_5 редуктазой:

$$\text{Цит. } b_{5\ \text{ок.}} + NADH \rightarrow \text{цит. } b_{5\ \text{восст.}} + NAD^+.$$

Супероксидный анион с помощью фермента супероксиддисмутазы превращается в пероксид водорода:

$$O_2^- + O_2^- + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2.$$

Пероксид водорода разрушается каталазой и содержащим селен ферментом глутатионпероксидазой. Донором водорода в этой реакции служит глутатион — трипептид глутамилцистеинилглицин (GSH) (см. раздел 12).

$$2H_2O \rightarrow 2\ H_2O + O_2;\ 2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2\ H_2O.$$

Окисленный глутатион (GSSG) восстанавливается NADPH-зависимой глутатионредуктазой. Восстановление NADP для этой реакции обеспечивают окислительные реакции пентозофосфатного пути (см. раздел 7).

Г. Нарушения метаболизма эритроцитов

Энзимопатии, обусловливающие гемолиз эритроцитов. Для эффективного обезвреживания активных форм кислорода, образующихся в эритроцитах, необходимы все перечисленные выше ферментативные системы защиты. Однако у людей обнаружено около 3000 генетических дефектов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Этот фермент катализирует скорость-лимитирующую реакцию пентозофосфатного пути окисления глюкозы, которая обеспечивает образование $NADPH + H^+$. Как известно, от количества $NADP + H^+$ зависит активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы — ферментов, разрушающих пероксид водорода. Не менее 100 млн

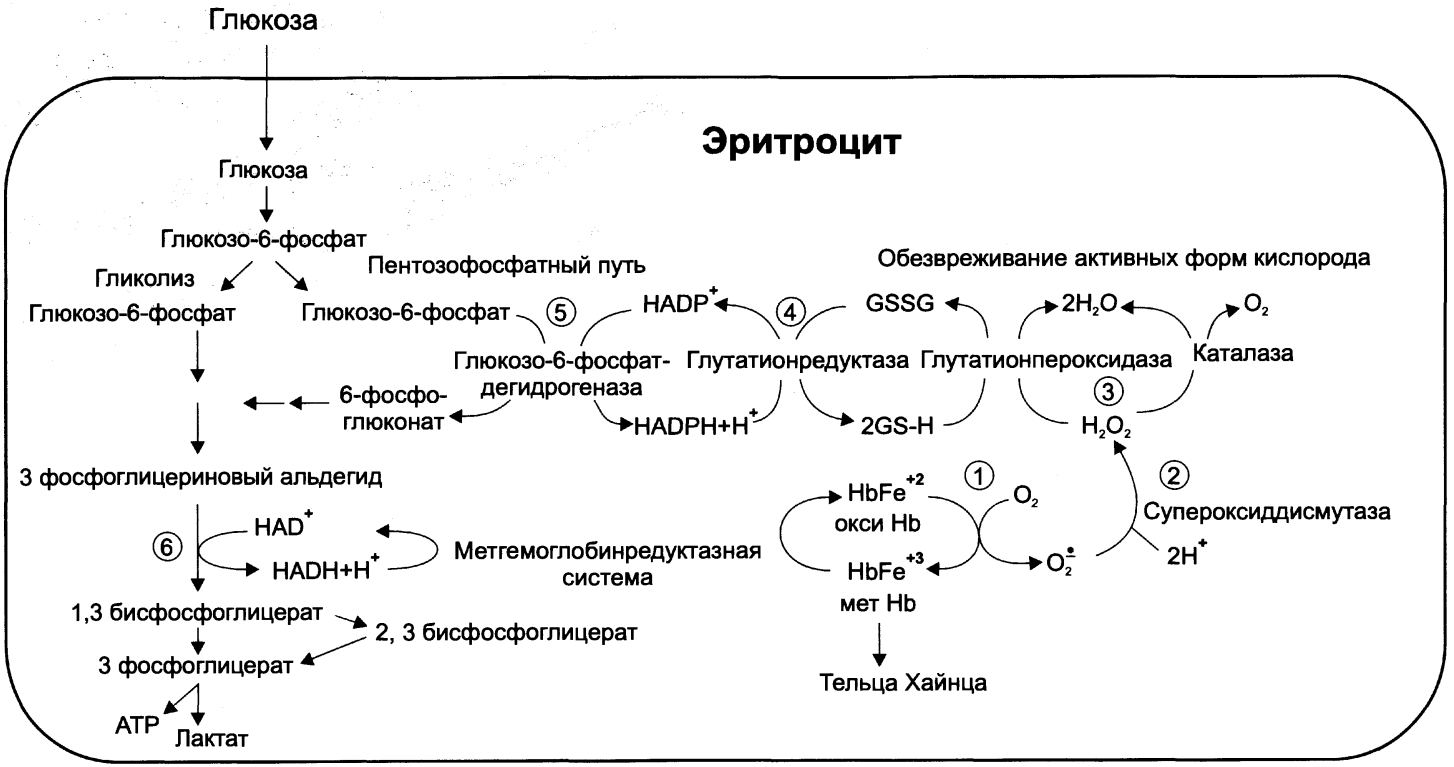


Рисунок 14-4. Образование и обезвреживание активных форм кислорода в эритроците:
1 — спонтанное окисление Fe^{2+} в геме гемоглобина — источник супероксидного аниона в эритроцитах;
2 — супероксиддисмутаза превращает супероксидный анион в пероксид водорода и воду: $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$;
3 — пероксид водорода расщепляется каталазой: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ или глутатионпероксидазой: $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$;
4 — глутатионредуктаза восстанавливает окисленный глутатион: $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$;
5 — NADPH, необходимый для восстановления глутатиона, образуется на окислительном этапе пентозофосфатного пути превращения глюкозы;
6 — NADH, необходимый для восстановления гемоглобина метгемоглобинредуктазной системой, образуется в глицеральдегидфосфатдегидрогеназной реакции гликолиза.

человек, у которых активность этого фермента снижена, являются носителями дефектных генов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. При приёме некоторых лекарств, являющихся сильными окислителями (антималярийного препарата примахина, сульфаниламидов), у пациентов, имеющих генетические дефекты глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы или глутатионредуктазы, глутатионовой защиты может оказаться недостаточно. Активные формы кислорода вызывают образование гидроперекисей ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов, входящих в состав клеточных мембран, их разрушение и гемолиз эритроцитов.

Генетический дефект любого фермента гликолиза приводит к уменьшению образования АТФ и NADH + H^+ в этих клетках. Вследствие снижения скорости синтеза АТФ падает активность Na^+,K^+-АТФ-азы, повышается осмотическое давление и возникает осмотический шок. Дефицит NADH + H^+ приводит к накоплению метгемоглобина и увеличению образования активных форм кислорода, вызывающих окисление SH-групп в молекулах гемоглобина. Молекулы метгемоглобина образуют дисульфидные связи между протомерами и агрегируют с образованием телец Хайнца (рис. 14-5).

Гемоглобинопатии

Серповидноклеточная анемия — тяжёлое наследственное заболевание, обусловленное точечной мутацией гена, кодирующего структуру β-цепи гемоглобина (см. раздел 4). В результате в эритроцитах больных присутствует HbS, β-цепи которого в шестом положении вместо гидрофильной глутаминовой кислоты содержат гидрофобную аминокислоту валин. Появление гидрофобной аминокислоты недалеко от начала молекулы способствует возникновению нового центра связывания, поэтому при низком парциальном давлении кислорода тетрамеры дезокси-HbS ассоциируют, образуя длинные микротрубчатые образования, которые полимеризуются внутри эритроцитов. Полимеризация приводит к нарушению структуры эритроцитов, они приобретают серповидную форму и легко разрушаются. При этом заболевании отмечают анемию, прогрессирующую слабость, отставание в развитии и желтуху.

Носители гена серповидноклеточной анемии чаще всего встречаются среди африканского населения, так как они приобретают некоторое преимущество при заболевании малярией, часто встречающейся в странах с тропическим климатом. Причина сохранения гена серповидноклеточной анемии в популяции связана с тем, что в эритроцитах гетерозигот хуже развивается малярийный плазмодий, часть жизненного цикла которого проходит в эритроцитах человека. В связи с этим гетерозиготные носители дефектного

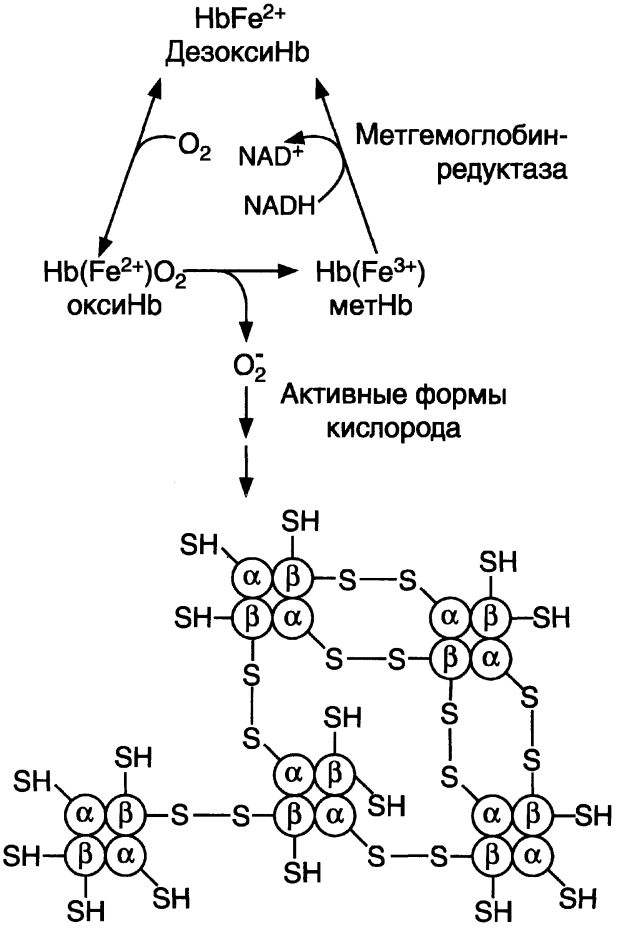


Рис. 14-5. Схема образования телец Хайнца — агрегация гемоглобина. В норме супероксиддисмутаза катализирует образование пероксида водорода, который под действием глутатионпероксидазы превращается в H_2O. При недостаточной активности ферментов обезвреживания активных форм кислорода между протомерами метгемоглобина образуются дисульфидные связи, и они агрегируют.

гена выживали при эпидемиях малярии, однако четверть их потомства погибала от серповидноклеточной анемии.

Талассемии — наследственные заболевания, обусловленные отсутствием или снижением скорости синтеза α- или β-цепей гемоглобина. В результате несбалансированного образования глобиновых цепей образуются тетрамеры гемоглобина, состоящие из одинаковых протомеров. Это приводит к нарушению основной функции гемоглобина — транспорту кислорода к тканям. Нарушение эритропоэза и ускоренный гемолиз эритроцитов и клеток-предшественников при талассемиях приводит к анемии.

При β-талассемии не синтезируются β-цепи гемоглобина. Это вызывает образование нестабильных тетрамеров, содержащих только α-цепи. При этом заболевании в костном мозге из-за преципитации нестабильных α-цепей усиливается разрушение эритробластов, а ускорение разрушения эритроцитов в циркулирующей крови приводит к внутрисосудистому гемолизу. Как известно, для образования фетального гемоглобина β-цепи не требуются (см. раздел 4), поэтому клинически β-талассемия не проявляется до рождения, после чего происходит переключение синтеза HbF на HbA.

В случае α-талассемии недостаток образования α-глобиновых цепей приводит к нарушению образования HbF у плода. Избыточные γ-цепи образуют тетрамеры, называемые гемоглобином Барта. Этот гемоглобин при физиологических условиях имеет повышенное сродство к кислороду и не проявляет кооперативных взаимодействий между протомерами. В результате гемоглобин Барта не обеспечивает развивающийся плод необходимым количеством кислорода, что приводит к тяжёлой гипоксии. При α-талассемии отмечают высокий процент внутриутробной гибели плода. Выжившие новорождённые при переключении с γ- на β-ген синтезируют β-тетрамеры или HbH, который, подобно гемоглобину Барта, имеет слишком высокое сродство к кислороду, менее стабилен, чем HbA и быстро разрушается. Это ведёт к развитию у больных тканевой гипоксии и к смерти вскоре после рождения.

Наследственный сфероцитоз. Причиной этой патологии чаще всего является дефект белков цитоскелета эритроцитов — спектрина или анкирина, которые обеспечивают поддержание двояковогнутой формы клетки и эластичности мембраны. Эритроциты приобретают шарообразную форму, что приводит к уменьшению площади их поверхности и снижению скорости газообмена. Потеря эластичности клеточной мембраны приводит к повышению хрупкости и травматичности клеток и, как следствие, к ускорению их разрушения в сосудистом русле и селезёнке. Заболевание сопровождается анемией и желтухой. Удаление селезёнки (спленэктомия) при наследственном сфероцитозе улучшает состояние больных, так как предотвращает разрушение сфероцитов в селезёнке.

Мегалобластная (макроцитарная) анемия развивается при дефиците фолиевой кислоты или витамина B_{12}.

Фолиевая кислота в виде кофермента (H_4-фолата) участвует в синтезе нуклеотидов. Недостаток фолиевой кислоты приводит к снижению скорости синтеза ДНК в быстроделящихся клетках, и в первую очередь в предшественниках эритроцитов. Клетки дольше пребывают в интерфазе, синтезируя гемоглобин, и становятся крупнее. Кроме того, из-за недостатка нуклеотидов они реже делятся, и количество эритроцитов снижается, а крупные мегалобласты быстрее разрушаются. Всё это в конечном итоге приводит к развитию анемии.

Аналогичная симптоматика развивается при недостатке в организме витамина B_{12}. Этот витамин участвует в переносе метильной группы с N^5-метил-H_4-фолата на гомоцистеин с образованием метионина и H_4-фолата (см. раздел 10). Недостаточность витамина B_{12} приводит к накоплению N^5-метил-H_4-фолата в клетках. Дефицит H_4-фолата приводит к нарушению деления клеток и развитию анемии.

II. ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ФАГОЦИТИРУЮЩИХ КЛЕТОК

Способность некоторых клеток крови к фагоцитозу — одна из защитных функций крови. В фагоцитозе участвуют 2 типа лейкоцитов —

нейтрофилы и моноциты. Нейтрофилы содержат многодольчатое ядро, поэтому их ещё называют полиморфноядерными лейкоцитами (ПЯЛ). Они поступают в кровоток из костного мозга и имеют продолжительность жизни около 8 сут. Взаимодействие белков интегринов (см. раздел 15) с рецепторами эндотелиальных клеток капилляров приводит к адгезии нейтрофилов, которые далее мигрируют в ткань.

Моноциты также могут выходить из кровяного русла, и тогда их называют макрофагами. Оба типа фагоцитов захватывают и разрушают бактерии. Макрофаги, кроме того, утилизируют старые повреждённые клетки и клеточные оболочки, в частности они поглощают около 10^{11} эритроцитов в сутки. Фагоцитоз — особая форма эндоцитоза, при которой образуются большие эндоцитозные пузырьки, размеры которых определяются размерами поглощаемых частиц.

Образование фагосомы начинается с взаимодействия специфических рецепторов фагоцитов с бактерией или комплексом антиген—антитело. Рецепторы, расположенные в тех участках плазматической мембраны, где локализован особый белок клатрин (см. раздел 5), «узнают» компоненты комплемента, олигосахариды на поверхности микроорганизмов или F_c области комплекса антиген—антитело (см. раздел 1). Активация рецепторов, передающих сигнал в клетку с участием инозитолфосфатной системы, инициирует процессы, определяющие фагоцитарный ответ клетки. Он включает в себя формирование фагосомы, слияние её с лизосомой, образование фаголизосомы, активацию кислородзависимых бактерицидных механизмов уничтожения микробов и/или выработку клетками токсичного для микробов оксида азота, а также действие кислороднезависимых механизмов уничтожения микроорганизмов.

Формирование фагосомы. Взаимодействие микробной клетки с поверхностью фагоцита приводит к образованию на его мембране выростов — псевдоподий, окружающих микробную клетку. Фагосома, сформированная таким образом, вместе с захваченной бактерией погружается внутрь фагоцита.

Образование фаголизосомы. В цитозоле фагосомы сливаются с первичными лизосомами, образуя фаголизосомы. Первичные лизосомы, образованные аппаратом Гольджи, содержат ряд заключённых в гранулы гидролаз, способных разрушать органические молекулы в кислой среде фаголизосом: протеиназы, фосфатазы, эстеразы, ДНК-азы, РНК-азы. Низкое значение pH внутри фагосом оказывает бактерицидное действие и создаёт оптимальную среду для активации лизосомальных гидролаз. В результате действия этих ферментов разрушаются полимерные молекулы микроорганизмов и образуются аминокислоты, моносахариды, нуклеотиды, которые поступают в цитозоль и могут использоваться клеткой. Большая часть мембранных компонентов и непереваренные субстраты локализуются в остаточных тельцах, которые путём экзоцитоза возвращаются на поверхность плазматической мембраны фагоцитов, при этом значительная часть мембранных компонентов может утилизироваться и в самой мембране (рис. 14-6).

Активация кислородзависимых бактерицидных механизмов уничтожения микробов. Ферментный комплекс мембраны фагосом — NADPH-оксидаза восстанавливает O_2, образуя супероксидный анион:

$$2\ O_2 + NADPH \rightarrow 2\ O_2^- + NADP^+ + H^+.$$

Супероксидный анион спонтанно или при участии фермента супероксиддисмутазы превращается в пероксид водорода:

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2.$$

Под действием миелопероксидазы, проникающей в фагосому при её слиянии с лизосомой, из пероксидов в присутствии галогенов (йодидов и хлоридов) образуются дополнительные токсичные окислители — гипойодид и гипохлорид.

$$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow HOCl + H_2O.$$

Все эти молекулы являются сильными окислителями и оказывают бактерицидное действие. Резкое увеличение потребления кислорода фагоцитирующей клеткой называется «респираторным взрывом» (рис. 14-7).

Активные формы кислорода инициируют свободнорадикальные реакции, разрушающие липиды клеточных мембран поглощённых фагоцитами бактерий.

Наследственная недостаточность NADP-оксидазы, обусловленная дефектом одного из генов этого ферментного комплекса, приводит к

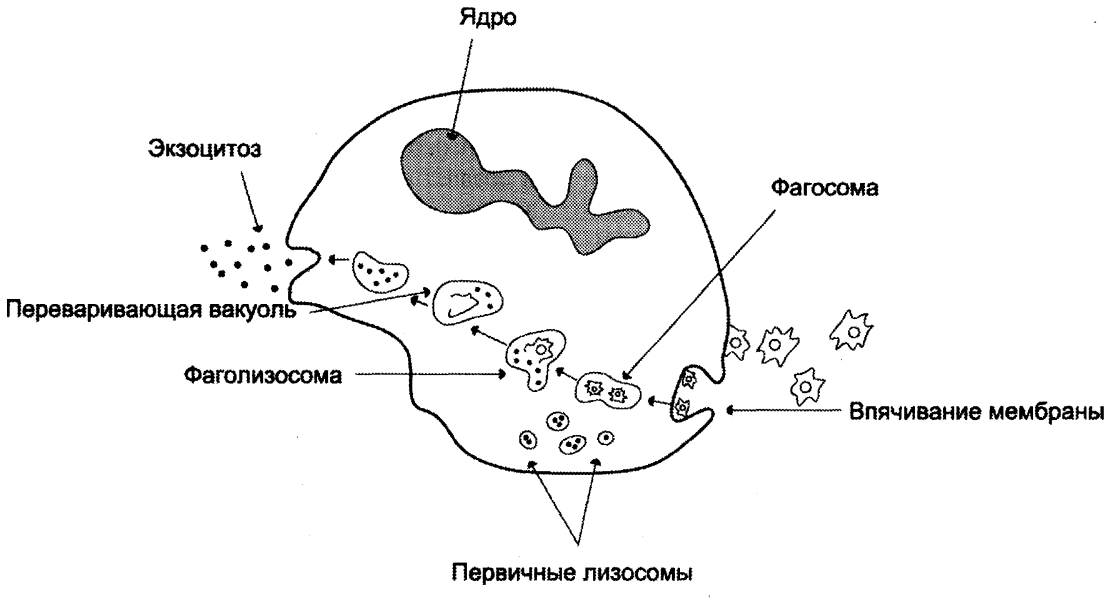


Рис. 14-6. Фагоцитоз в нейтрофилах.

хроническому гранулематозу. В результате дефекта фермента фагоциты больных не способны продуцировать супероксидный кислородный радикал и пероксид водорода и поэтому не могут быстро разрушать фагоцитированные клетки бактерий и грибов. Некоторые устойчивые микроорганизмы остаются жизнеспособными внутри фагоцитов, и их антигены вызывают в месте скопления фагоцитов клеточный иммунный ответ и формирование гранулём. Наиболее часто встречается сцепленная с Х-хромосомой форма этого заболевания, связанная с дефектом гена одной из полипептидных цепей комплекса, локализованного на коротком плече Х-хромосомы.

Образование реакционноспособных метаболитов азота. Бактерицидное действие в макрофагах оказывает и оксид азота (NO). Оксид азота в этих клетках образуется, так же как и в других, под действием фермента NO синтазы из аргинина (см. раздел 9). Активность NO синтазы в макрофагах заметно повышается при фагоцитозе в присутствии γ-интерферона и фактора некроза опухолей. Супероксид-анион образует с NO соединения, обладающие большими бактерицидными свойствами, чем сам NO:

$$NO + O_2^- \rightarrow ONOO^- \rightarrow OH^\bullet + NO_2.$$

Пероксинитрил ($ONOO^-$), оксид азота, диоксид азота, радикал гидроксила вызывают окислительное повреждение белков, нуклеиновых кислот и липидов бактериальных клеток. Оксид азота может непосредственно взаимодействовать с железосерными белками ЦПЭ, ингибируя дыхание и синтез АТФ в бактериях. При взаимодействии NO с O_2 образуются нитриты, которые превращаются в нитраты, также обладающие токсическим действием (см. раздел 12).

Вспышка метаболической активности нейтрофила заканчивается его гибелью. Погибшие нейтрофилы, макрофаги, бактерии и тканевая жидкость входят в состав гноя.

Действие кислороднезависимых бактерицидных механизмов. Некоторые грамположительные бактерии погибают в фагосомах нейтрофилов под действием лизосомального фермента лизоцима, который гидролизует связи между содержащимися в клеточной стенке N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетил-D-глюкозамином и вызывает её разрушение.

В нейтрофилах человека обнаружены катионные пептиды — дефензины, содержащие около 30 аминокислотных остатков и богатые цистеином и аргинином. Они составляют от 30 до 50% всех белков гранул. Дефензины вызывают образование ионных каналов в мембране микробной клетки сразу же после образования фа-

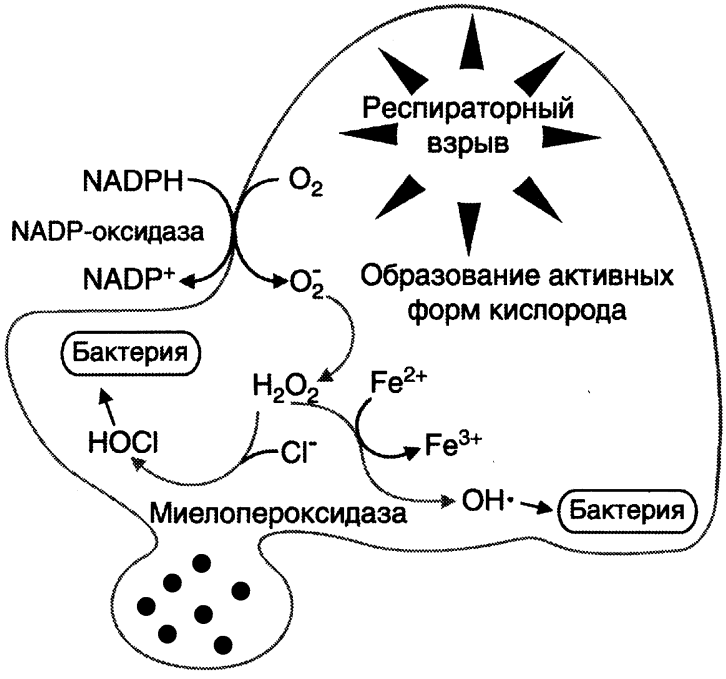


Рис. 14-7. Образование активных форм кислорода фагоцитирующими клетками при респираторном взрыве. Активация NADPH оксидазы, локализованной в мембране клетки, вызывает образование супероксидного аниона. В результате впячивания мембраны супероксид вместе с бактериальной клеткой оказываются в фагосоме. Супероксидный анион генерирует образование других токсичных молекул, включая H_2O_2 и $OH^\bullet$. Миелопероксидаза, содержащаяся в гранулах фагоцитирующих клеток, секретируется в фагосому, где образует HOCl.

голизосомы, и тем самым способствуют её уничтожению. Дефензины действуют и на обладающие оболочкой вирусы, например вирус простого герпеса.

Таким образом, огромное разнообразие микроорганизмов, атакующих клетки человека, определило многообразие бактерицидных механизмов, действующих как в аэробных, так и анаэробных условиях.

III. СВЁРТЫВАЮЩАЯ СИСТЕМА КРОВИ

При повреждении кровеносного сосуда инициируется каскад реакций, в результате которого образуется сгусток крови — тромб, предотвращающий кровотечение. Основную роль в свёртывании (коагуляции) крови играют тромбоциты и ряд белков плазмы крови.

В остановке кровотечения различают 3 этапа. На первом этапе происходит сокращение кровеносного сосуда. Затем к месту повреждения прикрепляются тромбоциты, которые, наслаиваясь друг на друга, образуют тромбоцитарную пробку (белый тромб). Белый тромб является непрочным и может закупорить только небольшой кровеносный сосуд. На третьем этапе растворимый белок плазмы крови фибриноген превращается в нерастворимый белок фибрин, который откладывается между тромбоцитами, и формируется прочный фибриновый тромб. Такой тромб содержит эритроциты и поэтому называется красным тромбом.

Образованию фибринового тромба предшествует каскад протеолитических реакций, приводящий к активации фермента тромбина, который и превращает фибриноген в фибрин. Все белки, участвующие в свёртывании крови, называют факторами свёртывания. Они синтезируются в основном в печени и клетках крови в виде неактивных предшественников, обозначаются римскими цифрами, но имеют и тривиальные названия (табл. 14-1). Большинство этих белков активируется в каскаде ферментативных реакций свёртывания крови. Активные

Таблица 14-1. Основные функции и содержание в плазме крови факторов свёртывания крови

Фактор	Тривиальное название	Содержание в плазме крови, г/л	Функции
1	2	3	4
I	Фибриноген	2–4	Растворимый белок-предшественник фибрина
Ia	Фибрин		Образует фибриновый гель
II	Протромбин	0,1	Профермент*
IIa	Тромбин		Протеаза, превращающая фибриноген в фибрин и активирующая факторы V, VII, VIII, XIII, C
III	Тканевый фактор		Белок-активатор мембранного комплекса VIIa-ТФ-Ca^{2+}
IV	Ca^{2+}	0,9–1,2 ммоль/л	Опосредует взаимодействие ферментов прокоагулянтного пути с фосфатидилсерином
V	Проакцелерин	0,01	Предшественник белка-активатора мембранного комплекса Xa-Va-Ca^{2+}
Va	Акцелерин		Белок-активатор мембранного комплекса Xa-Va-Ca^{2+}
VII	Проконвертин	0,005	Профермент*
VIIa	Конвертин		Протеаза*, активирующая факторы X и IX
VIII	Неактивный антигемофильный фактор A (неактивный антигемофильный глобулин)	0,01–0,02	Предшественник белка-активатора мембранного комплекса IXa-VIIIa-Ca^{2+}
VIIIa	Активный антигемофильный фактор A (активный антигемофильный глобулин)		Белок-активатор мембранного комплекса IXa-VIIIa-Ca^{2+}
IX	Неактивный антигемофильный фактор B (неактивный фактор Кристмаса)	0,003	Профермент*
IXa	Активный антигемофильный фактор B (активный фактор Кристмаса)		Протеаза*, активирующая фактор X
X	Неактивный фактор Стюарта–Прауэра	0,01	Профермент*
Xa	Активный фактор Стюарта–Прауэра		Протеаза*, активирующая фактор II
XI	Неактивный плазменный предшественник тромбопластина	0,005	Профермент контактного пути свёртывания крови

Продолжение таблицы 14-1

1	2	3	4
XIa	Активный плазменный предшественник тромбопластина		Протеаза, активирующая фактор IX
XII	Неактивный фактор Хагемана	0,03	Профермент контактного пути свёртывания крови
XIIa	Активный фактор Хагемана		Протеаза, активирующая фактор XI, прекалликреин, плазминоген
XIII	Неактивная трансглутамидаза (неактивный фибринстабилизирующий фактор)	0,01–0,02	Профермент
XIIIa	Активная трансглутамидаза (активный фибринстабилизирующий фактор)		Катализирует образование амидных связей между молекулами фибрина-мономера, фибрином и фибронектином
	Прекалликреин	0,05	Профермент контактного пути свёртывания крови
	Калликреин		Протеаза, активирующая фактор XII, плазминоген
	ВМК	0,06	Белок-активатор контактного пути свёртывания крови

* Содержит остатки карбоксиглутаминовой кислоты, необходимые для образования мембранных ферментных комплексов прокоагулянтного пути свёртывания крови.

формы этих белков обозначают такими же римскими цифрами, но с добавлением буквы «а».

А. Образование фибринового тромба

Образование фибринового тромба начинается с превращения растворимого белка плазмы крови фибриногена в нерастворимый фибрин.

Фибриноген (фактор I) — гликопротеин с молекулярной массой 340 кД. Он синтезируется в печени и содержится в плазме крови в концентрации 8,02–12,9 мкмоль/л (2–4 г/л). Молекула фибриногена состоит из шести полипептидных цепей, которые связаны друг с другом дисульфидными связями. Состав полипептидных цепей молекулы фибриногена обозначают $A\alpha_2$, $B\beta_2$, γ_2. Заглавные буквы соответствуют тем участкам, которые отщепляются под действием тромбина при превращении фибриногена в фибрин. Фрагменты А в цепях Аα и В в цепях Вβ содержат большое количество остатков аспартата и глутамата. Это создаёт сильный отрицательный заряд на N-концах молекул фибриногена и препятствует их агрегации.

Молекула фибриногена состоит из трех глобулярных доменов, по одному на каждом конце молекулы (домены Д) и один в середине (домен Е). Домены отделены друг от друга участками полипептидных цепей, имеющими стержнеобразную конфигурацию. Из центрального домена Е выступают N-концевые фрагменты А и В цепей Аα и Вβ (рис. 14-8).

В образовании фибринового тромба можно выделить 4 этапа.

1. Превращение фибриногена в мономер фибрина. Сначала молекулы фибриногена освобождаются от отрицательно заряженных фрагментов А и В, в результате чего образуются мономеры фибрина. Превращение фибриногена (фактор I) в фибрин (фактор Ia) катализирует фермент тромбин (фактор IIa). В каждой молекуле фибриногена тромбин гидролизует четыре пептидные связи аргинил-глицил, две из которых соединяют фрагменты А с α-цепью,

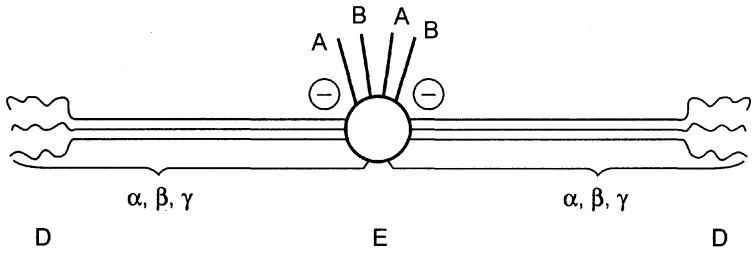


Рис. 14-8. Строение фибриногена. Фибриноген состоит из шести полипептидных цепей: $A\alpha_2$, $B\beta_2$ и γ_2. А, В — отрицательнозаряженные фрагменты, благодаря которым молекулы фибриногена не агрегируют. Д, Е — глобулярные домены молекулы фибриногена. Домены отделены участками полипептидных цепей, имеющими стержнеобразную конфигурацию. Из центрального глобулярного домена Е выступают N-концевые участки фрагментов А и В цепей $A\alpha_2$ и $B\beta_2$.

а две другие — В с β-цепью в $A\alpha_2$- и $B\beta_2$-цепях фибриногена. Мономер фибрина, образующийся из фибриногена, имеет состав $(\alpha, \beta, \gamma)_2$.

2. Образование нерастворимого геля фибрина. На втором этапе образуется нерастворимый полимерный фибриновый сгусток — гель фибрина. В результате превращения фибриногена в фибрин-мономер в домене Е открываются центры связывания с доменами D. Причём домен Е содержит центры агрегации, формирующиеся только после частичного протеолиза фибриногена под действием тромбина, а домен D является носителем постоянных центров агрегации. Первичная агрегация молекул фибрина происходит в результате взаимодействия центров связывания домена Е одной молекулы с комплементарными им участками на доменах D других молекул.Таким образом, между доменами молекул фибрина-мономера образуются нековалентные связи. При «самосборке» геля фибрина сначала образуются двунитчатые протофибриллы, в которых молекулы фибрина смещены друг относительно друга на 1/2 длины. После достижения протофибриллами определённой критической длины начинается их латеральная ассоциация, ведущая к образованию толстых фибриновых волокон (рис. 14-9). Образовавшийся гель фибрина непрочен, так как молекулы фибрина в нём связаны между собой нековалентными связями.

3. Стабилизация геля фибрина. В результате образования амидных связей между остатками лизина одной молекулы фибрина и остатками глутамина другой молекулы гель фибрина стабилизируется. Реакцию трансамидирования катализирует фермент трансглутамидаза (фактор XIIIa) (рис. 14-10). Фактор XIII активируется частичным протеолизом под действием тромбина.

Трансглутамидаза также образует амидные связи между фибрином и фибронектином — гликопротеином межклеточного матрикса и плазмы крови (см. раздел 15). Таким образом, тромб фиксируется в месте повреждения сосуда.

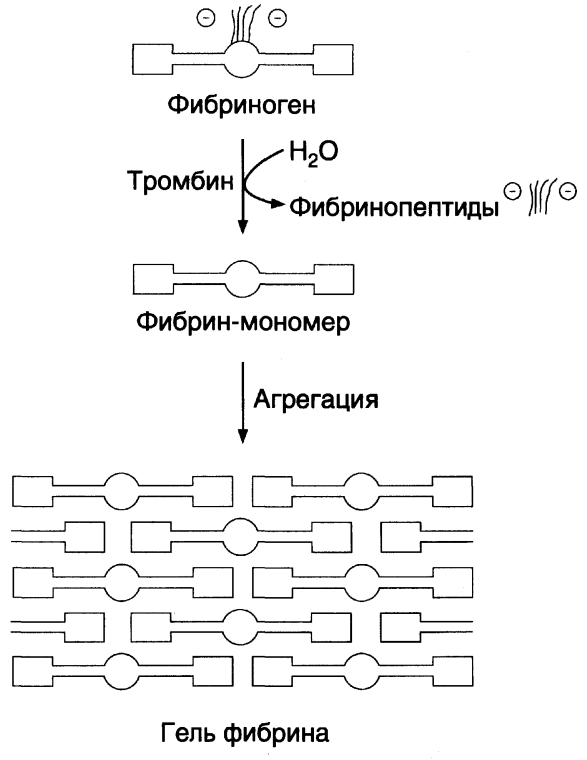


Рис. 14-9. Образование геля фибрина. Фибриноген, освобождаясь под действием тромбина от отрицательно заряженных фрагментов (фибринопептидов 2А и 2В), превращается в фибрин-мономер. В результате взаимодействия комплементарных участков Е- и D-доменов фибрина-мономера происходит сначала линейная, а затем латеральная полимеризация молекул с образованием геля фибрина.

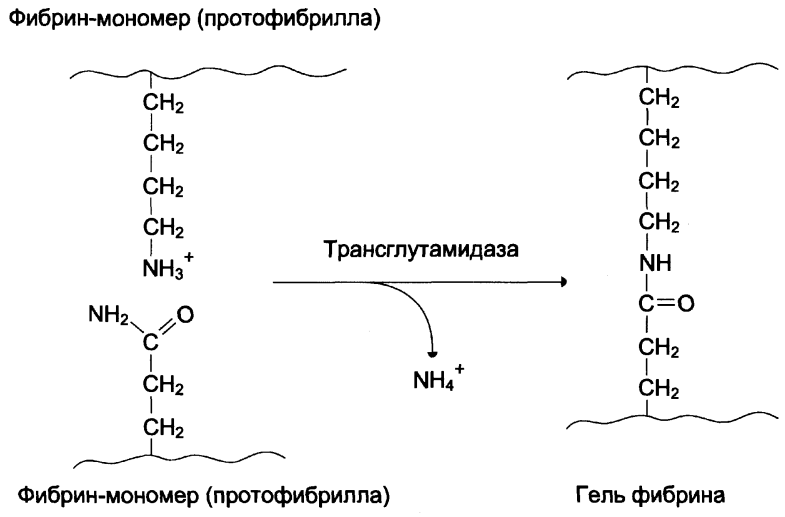


Рис. 14-10. Образование амидной связи между молекулами фибрина.

4. Ретракция фибринового сгустка. Сжатие (ретракцию) геля обеспечивает актомиозин тромбоцитов — сократительный белок тромбостенин, обладающий АТФ-азной активностью. Тромбостенин участвует также в активации и агрегации тромбоцитов. Ретракция кровяного сгустка предупреждает полную закупорку сосудов, создавая возможность восстановления кровотока.

В механизме образования тромба есть три функционально разных этапа: прокоагулянтный путь, контактный путь и антикоагулянтная фаза, препятствующая распространению тромба.

Б. Прокоагулянтный путь свертывания крови

Для остановки кровотечения из капилляров и сосудов необходимо быстрое образование прочного тромба, препятствующего потере крови. Это достигается каскадом ферментативных реакций с механизмами усиления на многих этапах.

Прокоагулянтный путь занимает центральное место в свёртывании крови (рис. 14-11).

В циркулирующей крови содержатся проферменты протеолитических ферментов: фактор II (протромбин), фактор VII (проконвертин), фактор IX (Кристмаса), фактор X (Стюарта). Находящиеся в крови факторы Va (акцелерин) и VIIIa (антигемофильный фактор), а также мембранный белок — тканевый фактор (ТФ, фактор III) являются белками-активаторами этих ферментов (табл. 14-1).

При повреждении сосуда «включается» каскадный механизм активации ферментов с последовательным образованием трёх связанных с фосфолипидами клеточной мембраны ферментных комплексов. Каждый комплекс состоит из протеолитического фермента, белка-активатора и ионов Ca^{2+}: VIIa-ТФ-Ca^{2+}, IXa-VIIIa-Ca^{2+} (теназа), Xa-Va-Ca^{2+} (протромбиназа) (рис. 14-12). Комплекс Xa-Va-Ca^{2+} (протромбиназный комплекс) активирует протромбин (фактор II). Каскад ферментативных реакций завершается образованием мономеров фибрина и последующим формированием тромба.

В активации ферментов каскада выделяют три основных механизма: частичный протеолиз, взаимодействие с белками-активаторами и взаимодействие с модифицированными клеточными мембранами.

Активация частичным протеолизом. Все ферменты прокоагулянтного пути являются сериновыми протеазами, синтезируются в печени в виде неактивных проферментов и в такой форме циркулируют в крови. В процессе реализации тромбогенного сигнала проферменты (факторы VII, IX, X и II) частичным протеолизом превращаются в активные ферменты.

Тромбин (фактор IIa) — гликопротеин с молекулярной массой 39 кД. Он образуется в крови из неактивного предшественника протромбина. Протромбин синтезируется в печени, имеет молекулярную массу 70 кД и содержит остатки

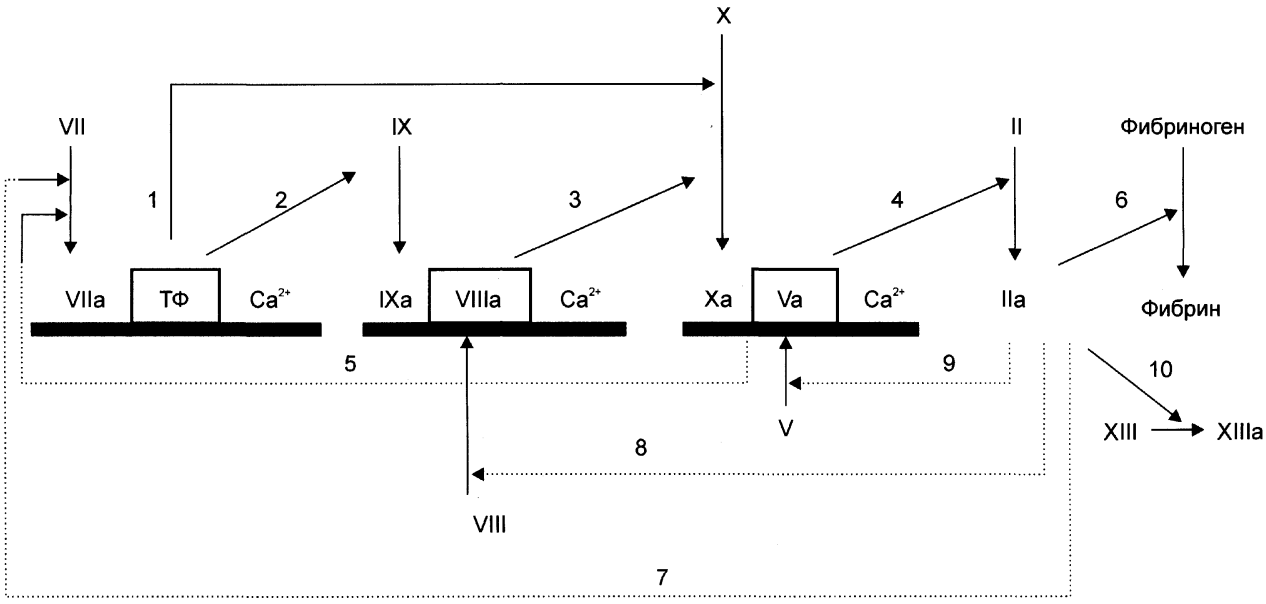


Рис. 14-11. Прокоагулянтный путь свёртывания крови. → активация факторов свертывания крови; ·····> активация факторов свертывания крови по принципу положительной обратной связи; ▬▬ мембранный фосфолипидный компонент ферментных комплексов. В рамку обведены белки-активаторы. 1, 2 — фактор VIIa мембранного комплекса VIIa-ТФ-CA^{2+} активирует факторы IX и X; 3 — фактор IXa мембранного комплекса IXa-VIIIa-Ca^{2+} активирует фактор X; 4, 5 — фактор Xa мембранного комплекса Xa-Va-Ca^{2+} превращает протромбин (фактор II) в тромбин (фактор IIa) и активирует фактор VII; 6–10 — тромбин (фактор IIa) превращает нерастворимый фибриноген в растворимый фибрин, активирует факторы VII, VIII, V и XIII.

γ-карбоксиглутаминовой кислоты. Концентрация этого белка в крови в норме составляет 0,1 г/л. Он фиксируется на мембранном ферментном комплексе Xa-Va-Ca^{2+}, взаимодействуя, с одной стороны, остатками γ-карбоксиглутамата с Ca^{2+}, а с другой — непосредственно с белком-активатором Va. Таким образом, создаются наилучшие стерические условия для протекания ферментативной реакции. Фактор Xa гидролизует две пептидные связи в молекуле протромбина. В результате этого образуется молекула тромбина, состоящая из двух цепей — лёгкой и тяжёлой, связанных между собой одной дисульфидной связью (рис. 14-12). Молекула тромбина не содержит остатков γ-карбоксиглутамата и освобождается из протромбиназного комплекса. Тромбин частичным протеолизом превращает фибриноген в фибрин и активирует факторы VII, VIII, V, XIII.

Тромбин выполняет ряд важных физиологических функций: является ферментом прокоагулянтного и контактного путей свёртывания крови, инициирует реакции антикоагулянтной фазы, вызывает агрегацию тромбоцитов и оказывает митогенное действие, участвуя в пролиферации и репарации клеток.

Частичным протеолизом активируются также факторы V и VIII, превращаясь, соответственно, в факторы Va и VIIIa. В результате активации этих факторов изменяется их конформация и повышается сродство к фосфолипидам мембран и ферментам, которые они активируют.

Взаимодействие белков-активаторов с протеолитическими ферментами. Тканевый фактор, фактор Va и фактор VIIIa имеют центры связывания с фосфолипидами мембран и ферментами VIIa, IXa и Xa, соответственно. При связывании с белками-активаторами в результате конформационных изменений активность этих ферментов повышается.

Тканевый фактор (фактор III) представляет собой комплекс, состоящий из белка и фосфатидилсерина. Белковая часть тканевого фактора (апопротеин III) экспонирована на поверхности многих клеток (мозга, лёгких, печени, селезёнки и др.) и связана с фосфатидилсерином плазматических мембран. Однако появление апопротеина III на поверхности клеток, сопри-

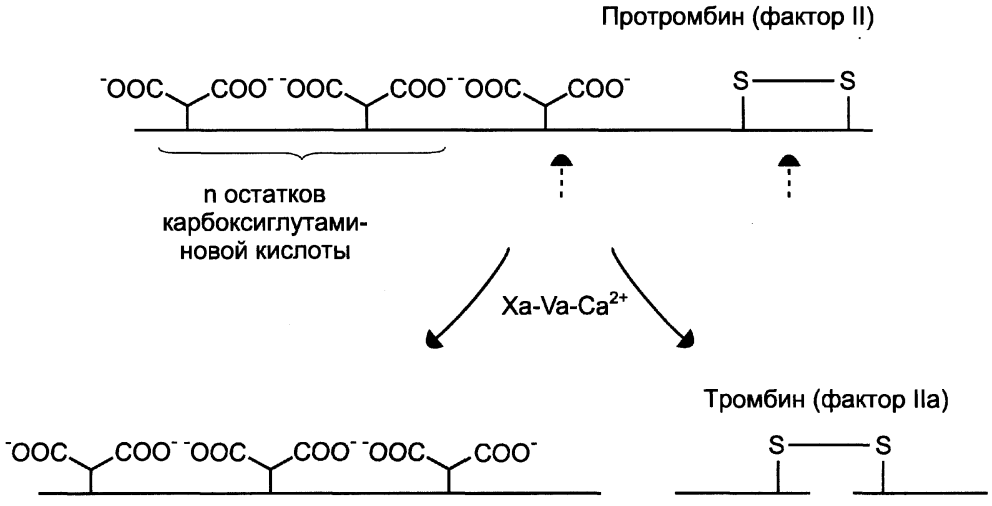


Рис. 14-12. Протеолитическая активация протромбина фактором Xa протромбиназного комплекса. $^{-}OOC\diagdown\diagup COO^{-}$ — остатки карбоксиглутаминовой кислоты; штрих-стрелки указывают положение гидролизуемых в молекуле протромбина пептидных связей. Молекула протромбина состоит из одной полипептидной цепи, а образующийся в результате частичного протеолиза протромбина тромбин состоит из двух полипептидных цепей, связанных между собой одной дисульфидной связью.

касающихся с кровью (эндотелиальных и моноцитов), происходит только при определённых условиях: при повреждении сосуда и/или нарушении нормальной асимметрии их плазматических мембран. Тканевый фактор в протеолитической активации не нуждается.

Фактор V и фактор VIII — доменные белки, циркулирующие в крови. Фактор V синтезируется в печени, а фактор VIII — эндотелиальными клетками. Оба фактора активируются частичным протеолизом под действием тромбина. Фактор VIII в плазме крови находится в комплексе с белком — фактором тромбоцитов фон Виллебранда. Фактор фон Виллебранда в этом комплексе стабилизирует фактор VIII, препятствуя его разрушению протеолитическим ферментом антикоагулянтной фазы фактором Ca.

Взаимодействие ферментных комплексов с клеточными мембранами происходит с участием ионов Ca^{2+}. Все проферменты прокоагулянтного пути (II, VII, IX, X) содержат остатки γ-карбоксиглутаминовой кислоты, образующиеся в результате посттрансляционной модификации этих белков в ЭР гепатоцитов.

Остатки γ-карбоксиглутаминовой кислоты в факторах VIIa, IXa и Xa обеспечивают взаимодействие этих ферментов посредством Ca^{2+} с отрицательно заряженными фосфолипидами клеточных мембран. В отсутствие ионов Ca^{2+} кровь не свёртывается.

Роль витамина K в карбоксилировании остатков глутаминовой кислоты в проферментах прокоагулянтного пути свёртывания крови. Карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты в проферментах прокоагулянтного пути катализирует карбоксилаза, коферментом которой служит восстановленная форма витамина K (нафтохинона) — дигидрохинон витамина K (см. раздел 3).

Поступивший в организм витамин K (нафтохинон) восстанавливается в печени NADPH-зависимой витамин K редуктазой с образованием дигидрохинона витамина K. В ходе реакции карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты в проферментах прокоагулянтного пути дигидрохинон окисляется и эпоксидируется с образованием 2,3-эпоксида витамина K. Регенерация эпоксида в дигидрохинон витамина K происходит следующим образом: сначала 2,3-эпоксид витамина K восстанавливается в витамин K тиолзависимой эпоксидредуктазой, коферментом которой является белок, подобный тиоредоксину. Затем образующийся в этой реакции витамин K восстанавливается ферментом витамин K тиолзависимой редуктазой в дигидрохинон витамина K. Донором водорода в

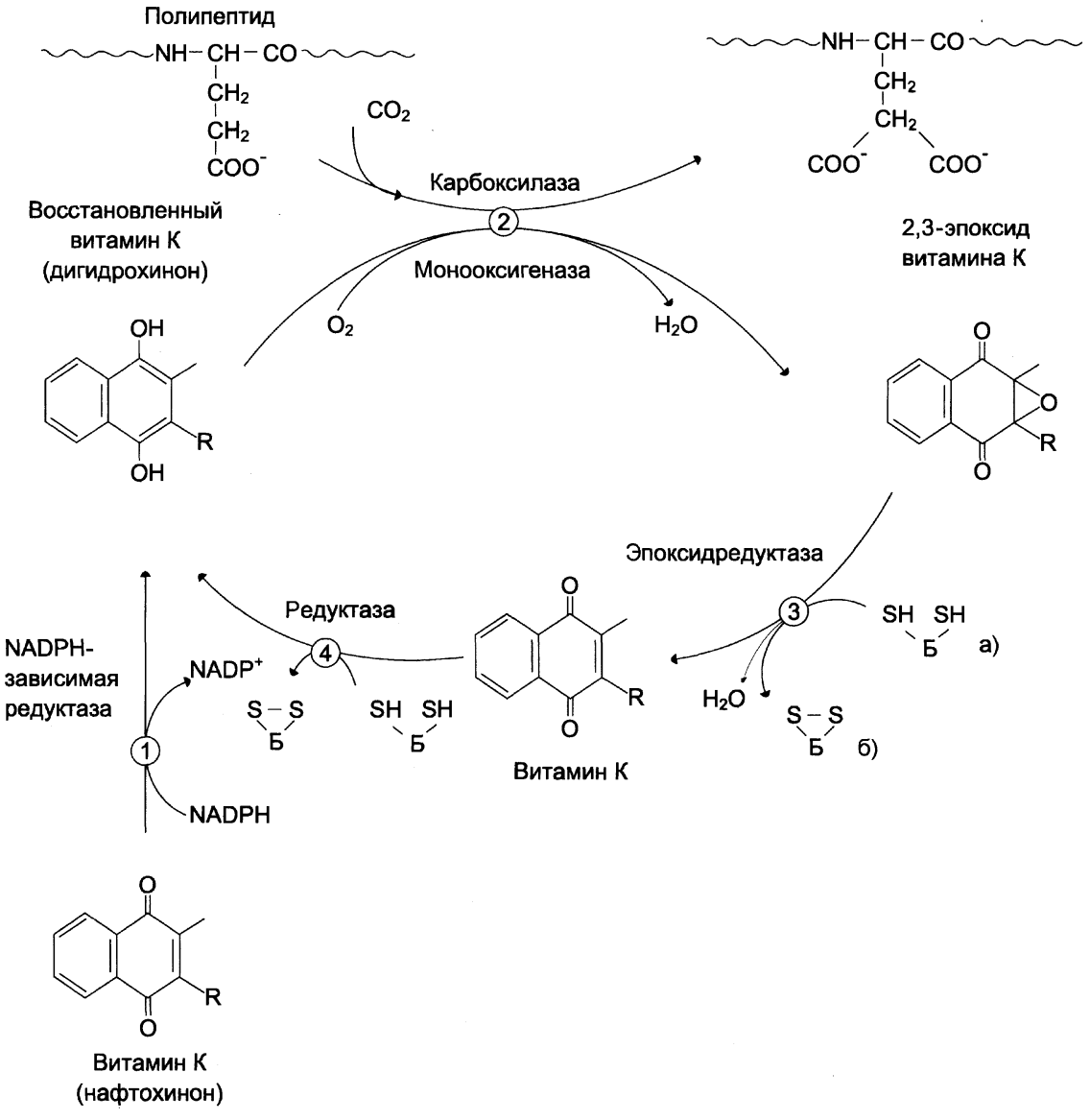


Рис. 14-13. Роль витамина К в посттрансляционном карбоксилировании глутаминовой кислоты. 1 — восстановление экзогенного витамина К NADPH-зависимой редуктазой; 2 — γ-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты в факторах II,VII, IX, X, протеине С витамин К зависимой карбоксилазой сопровождается окислением дигидрохинона с образованием 2,3-эпоксида витамина К; 3 — восстановление 2,3-эпоксида тиолзависимой витамин К редуктазой; 4 — восстановление витамина К тиолзависимой витамин К редуктазой; а) и б) — восстановленная и окисленная формы тиоредоксинподобного белка.

этой реакции, так же, как и в предыдущей, служит тиоредоксинподобный белок (рис. 14-13).

Недостаточность витамина К приводит к нарушению карбоксилирования проферментов прокоагулянтного пути и сопровождается кровоточивостью, подкожными и внутренними кровоизлияниями.

Структурные аналоги витамина К дикумарол и варфарин ингибируют тиолзависимые ферменты витамин К 2,3-эпоксидредуктазу и витамин К редуктазу, вызывая торможение свёртывания крови (рис. 14-14). Эти препараты применяют в клинической практике для предупреждения тромбозов.

Инициация каскада реакций прокоагулянтного пути. Ферментные мембранные комплексы прокоагулянтного пути образуются только при наличии на внешней поверхности плазматической мембраны клеток тканевого фактора и отрицательно заряженных фосфолипидов. Поперечная асимметрия плазматических мембран, в частности, определяется преобладанием в наружном слое нейтральных фосфолипидов (фосфатидилхолина и сфингомиелина), а во внутреннем — отрицательно заряженных (фосфатидилинозитолбисфосфата и фосфатидилсерина) (см. раздел 5). Специальная ферментная система обеспечивает трансмембранный перенос и такое распределение фосфолипидов в клеточных мембранах, при котором в норме внешняя поверхность плазматических мембран клеток не заряжена (см. раздел 5).

При нарушении поперечной асимметрии мембран тромбоцитов и эндотелиальных клеток на их поверхности формируются отрицательно заряженные (тромбогенные) участки и экспонируется апопротеин III тканевого фактора. Такие нарушения могут возникнуть при физической травме. В этом случае тканевый фактор и внутренняя поверхность клеточной мембраны становятся доступными для плазменных факторов прокоагулянтного пути. Кроме того, взаимодействие сигнальных молекул, вызывающих тромбогенез, с рецепторами эндотелиальных клеток и тромбоцитов активирует Ca^{2+}-зависимые регуляторные системы (см. раздел 5). В конечном итоге это приводит к повышению содержания в цитоплазме Ca^{2+}, который ингибирует АТФ-зависимую аминофосфолипидтранслоказу. Этот фермент играет важную роль в сохранении поперечной асимметрии мембран, так как переносит фосфатидилсерин из внешнего липидного слоя во внутренний. Снижение активности аминофосфолипидтранслоказы приводит к увеличению содержания во внешнем слое клеточной мембраны фосфатидилсерина и образованию отрицательно заряженных участков, необходимых для формирования мембранных ферментных комплексов. Кроме того, в результате такого нарушения структуры плазматической мембраны на её внешней поверхности экспонируется тканевый фактор и формируется первый ферментный комплекс прокоагулянтного пути свёртывания крови VII-ТФ-Ca^{2+}.

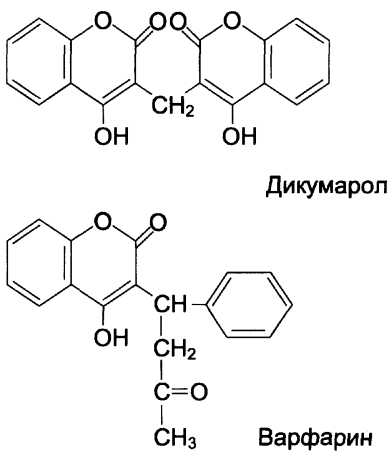


Рис. 14-14. Структурные аналоги витамина К дикумарол и варфарин.

Активация ферментов каждого комплекса — результат взаимодействия всех его компонентов. Если факторы IX, X и II требуют активации, то фактор VII обладает невысокой протеолитической активностью. Фактор VII мембранного комплекса VII-ТФ-Ca^{2+} частичным протеолизом активирует факторы IX и X. Активные факторы IXa и Xa включаются в образование мембранных комплексов IXa-VIIIa-Ca^{2+} и Xa-Va-Ca^{2+}. При этом фактор Xa протеолитически активирует фактор V, а протромбиназный комплекс не только превращает протромбин в тромбин, но и активирует фактор VII, протеолитическая активность которого в комплексе VIIa-Тф-Ca^{2+} в 10 000 раз выше, чем в комплексе VII-Тф-Ca^{2+}.

Образовавшийся в результате каскада реакций тромбин катализирует реакции частичного протеолиза фибриногена, фактора XIII и по принципу положительной обратной связи протеолитически активирует факторы V, VII и VIII.

В процессе свёртывания действуют 2 механизма усиления сигнала: каскад реакций, в котором каждое ферментативное звено обеспечивает усиление сигнала, и положительные обратные связи.

В. Контактный путь свертывания крови

Контактный путь свёртывания крови начинается с взаимодействия профермента фактора XII с повреждённой эндотелиальной поверхно-

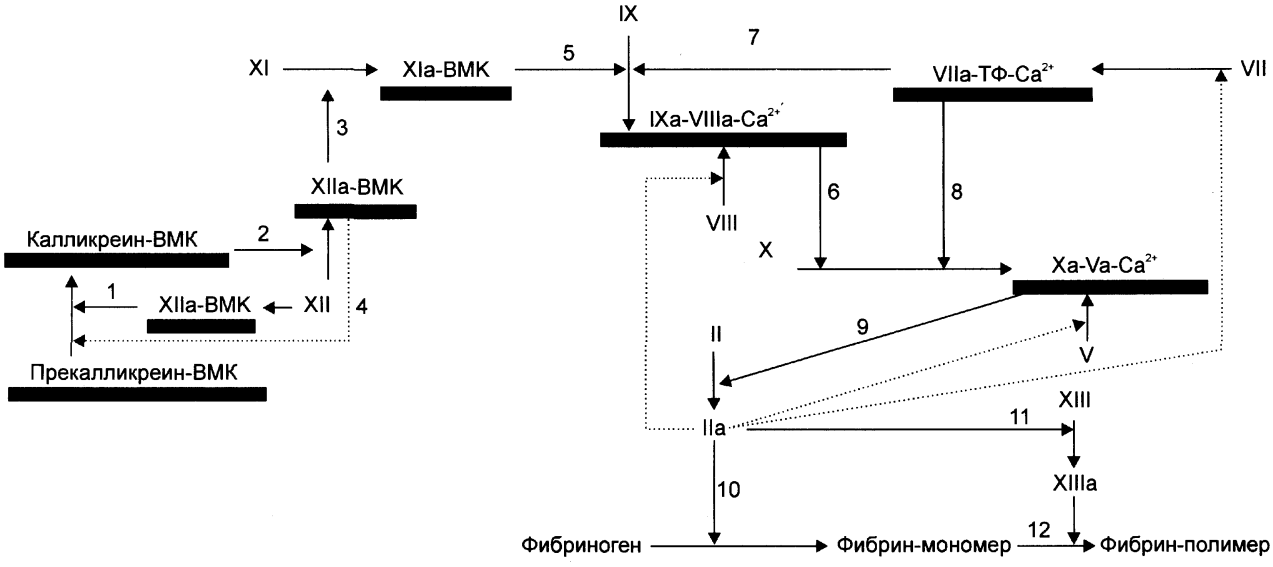


Рис. 14-15. Схема прокоагулянтного (внешнего) и контактного (внутреннего) путей свёртывания крови. Обозначения: ВМК — высокомолекулярный кининоген; ТФ — тканевый фактор; → — активация факторов свёртывания крови; ····> активация факторов свёртывания по принципу положительной обратной связи; ▬▬ — мембранный фосфолипидный компонент ферментных комплексов. Все ферменты мембранных комплексов свертывающей системы крови являются протеазами и активируются частичным протеолизом. 1 — активированный в результате контакта с субэндотелием фактор XII превращает прекалликреин в калликреин; 2 — калликреин мембранного комплекса калликреин-ВМК активирует фактор XII; 3 — фактор XIIa активирует фактор XI; 4 — активированный частичным протеолизом фактор XIIa превращает прекалликреин в калликреин по принципу положительной обратной связи; 5 — фактор XIa мембранного комплекса XIa-ВМК активирует фактор IX; 6 — фактор IXa мембранного комплекса IXa-VIIIa-Ca^{2+} активирует фактор X; 7, 8 — фактор VIIa мембранного комплекса VIIa-Тф-Ca^{2+} активирует факторы IX и X; 9 —фактор Xa протромбиназного комплекса активирует фактор II; 10, 11 — тромбин (фактор II) превращает фибриноген в фибрин и активирует фактор XIII; 12 — фактор XIIIa катализирует образование амидных связей в геле фибрина.

стью сосудистой стенки. Такое взаимодействие приводит к активации фактора XII и инициирует образование мембранных ферментных комплексов контактной фазы свёртывания. Они содержат ферменты калликреин, факторы XIa (плазменный предшественник тромбопластина) и XIIa (фактор Хагемана) , а также белок-активатор — высокомолекулярный кининоген (ВМК) (рис. 14-15).

Фактор XII — профермент, циркулирующий в крови. Он последовательно активируется двумя способами: сначала в результате изменения конформации при взаимодействии с отрицательно заряженной поверхностью повреждённого эндотелия, затем частичным протеолизом мембранным комплексом калликреин-ВМК.

Высокомолекулярный кининоген — белок-активатор в ферментных мембранных комплексах XIIa-ВМК, XIa-ВМК и калликреин-ВМК. ВМК — гликопротеин плазмы крови, который синтезируется в печени и имеет молекулярную массу 120 кД. Он опосредует взаимодействие протеолитических ферментов контактной фазы свёртывания крови с коллагеном субэндотелия и, кроме того, является компонентом калликреин-кининовой системы.

Калликреин — сериновая протеаза, субстратами которой являются, кроме фактора XII, белки плазмы крови плазминоген (профермент, участвующий в растворении фибрина) и кининогены с низкой (69 кД) и высокой (120 кД) молекулярной массой. При частичном протеолизе кининогенов образуются регуляторные пептиды кинины. В частности, мощный вазодилятатор брадикинин повышает проницаемость сосудов и вызывает разрушение клеточных мембран эндотелия.

В результате контакта фактора XII с субэндотелием сосудов он активируется. Активный фактор XIIa в комплексе с ВМК протеолити-

чески превращает прекалликреин, связанный с мембраной посредством ВМК, в калликреин. Мембранный комплекс калликреин-ВМК по принципу положительной обратной связи частичным протеолизом активирует фактор XII. При этом фактор XII приобретает максимальную ферментативную активность и по принципу положительной обратной связи активирует связанный с ВМК прекалликреин. Кроме того, образовавшийся в результате частичного протеолиза фактор XIIa протеолитически активирует фактор XI, а фактор XIa в составе ферментного комплекса XIa-ВМК активирует фактор IX. Фактор IXa мембранного комплекса IXa-VIIIa-Ca^{2+} активирует фактор X, который в составе протромбиназного комплекса активирует протромбин.

Каскад реакций, ведущий к образованию тромбина, может реализоваться двумя путями — прокоагулянтным (внешним) и контактным (внутренним) (рис. 14-15). Для инициации реакций внешнего пути необходимо появление тканевого фактора на внешней поверхности плазматической мембраны клеток, соприкасающихся с кровью. Внутренний путь начинается с активации фактора XII при его контакте с повреждённой поверхностью эндотелия сосудов и взаимной активации ферментов прекалликреина и фактора XII.

Таким образом, в прокоагулянтном и контактном путях свёртывания крови последовательное образование мембранных ферментных комплексов приводит к активации фактора X и образованию протромбиназы. Этапы, одинаковые для обоих путей свёртывания крови, называют общим путём свёртывания крови. В настоящее время понятие о внутреннем и внешнем путях свёртывания считают достаточно условным, так как стало ясно, что комплекс VIIa-ТФ-Ca^{2+} более эффективно активирует фактор IX, чем фактор X, а фактор VII активируется фактором IXa, хотя и значительно медленнее по сравнению с активацией фактором Xa. Следовательно, можно полагать, что каскад реакций свёртывания крови идёт преимущественно в линейной последовательности, а не по двум относительно независимым путям. Контактный путь, очевидно, не является абсолютно необходимым для инициации свёртывания; по-видимому, он служит для сопряжения системы свёртывания крови с различными регуляторными системами организма, например калликреин-кининовой и системой ферментов фибринолиза, растворяющей тромб.

Кровь здорового человека *in vitro* свёртывается за 5–10 мин. При этом образование протромбиназного комплекса занимает 5–8 мин, активация протромбина — 2–5 с и превращение фибриногена в фибрин — 2–5 с.

Снижение свёртываемости крови. При снижении свёртываемости крови наблюдают заболевания, сопровождающиеся повторяющимися кровотечениями. Гемофилии — наследственные болезни, характеризующиеся повышенной кровоточивостью. Причиной этих кровотечений (спонтанных или вызванных травмой) является наследственная недостаточность белков свёртывающей системы крови.

Гемофилия А (классическая гемофилия) обусловлена мутацией гена фактора VIII, локализованного в X хромосоме. Классическая гемофилия составляет 80% всех случаев заболевания гемофилией. Гемофилия В встречается реже и обусловлена генетическим дефектом фактора IX.

Дефект гена фактора VIII проявляется как рецессивный признак, поэтому этой формой гемофилии болеют только мужчины. Это заболевание сопровождается подкожными, внутримышечными и внутрисуставными кровоизлияниями, иногда опасными для жизни. Дефект фактора VIII встречается примерно у одного из 10 000 новорождённых. Больных лечат препаратами, содержащими фактор VIII, получаемыми из донорской крови или методами генной инженерии.

Г. Противосвертывающая система крови

Физиологические ингибиторы свёртывания крови играют важную роль в поддержании гемостаза, так как они сохраняют кровь в жидком состоянии и препятствуют распространению тромба за пределы повреждённого участка сосуда.

Тромбин, образующийся в результате реакций прокоагулянтного и контактного путей свёртывания крови, вымывается током крови из тромба. Он может инактивироваться при взаимодействии с ингибиторами ферментов свёртывания крови или активировать антикоагулянтную фазу, тормозящую образование тромба.

Антикоагулянтная фаза. Свёртывание крови должно быть ограничено не только в пространстве, но и во времени. Антикоагулянтная фаза

ограничивает время существования активных факторов в крови и инициируется самим тромбином. Следовательно, тромбин, с одной стороны, ускоряет свёртывание крови, являясь последним ферментом каскада реакций коагуляции, а с другой — тормозит его, вызывая образование ферментных комплексов антикоагулянтной фазы на неповреждённом эндотелии сосудов. Этот этап представляет собой короткий каскад реакций, в котором кроме тромбина участвуют белок-активатор тромбомодулин (Тм), витамин K-зависимая сериновая протеаза протеин С, белок-активатор S и факторы Va и VIIIa (рис. 14-16).

В каскаде реакций антикоагулянтной фазы последовательно образуются 2 мембранных комплекса IIa-Тм-Ca^{2+} и Ca-S-Ca^{2+}.

Тромбомодулин — интегральный белок мембран эндотелиальных клеток. Он не требует протеолитической активации и служит белком-активатором тромбина. Тромбин приобретает способность активировать протеин С только после взаимодействия с тромбомодулином, причём связанный с тромбомодулином тромбин не может превращать фибриноген в фибрин, не активирует фактор V и тромбоциты.

Протеин С — профермент, содержащий остатки γ-карбоксиглутамата. Тромбин в мембранном комплексе IIa-Тм-Ca^{2+} активирует частичным протеолизом протеин С. Активированный протеин С (Ca) образует с белком-активатором S мембраносвязанный комплекс Ca-S-Ca^{2+}. Ca в составе этого комплекса гидролизует в факторах Va и VIIIa по две пептидные связи и инактивирует эти факторы. Под действием комплекса Ca-S-Ca^{2+} в течение 3 мин. теряется 80% активности факторов VIIIa и Va. Таким образом, тромбин по принципу положительной обратной связи не только ускоряет своё образование, но и, активируя протеин С, тормозит процесс свёртывания крови.

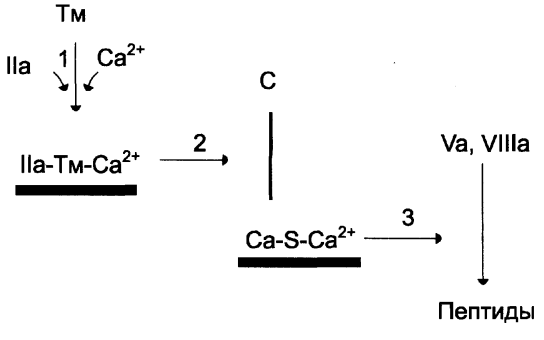


Рис. 14-16. Антикоагулянтная фаза. Тм — тромбомодулин; С — протеин С; Ca — активный протеин С; S — протеин S; жирные линии — мембранно-связанный комплекс. 1 — тромбин (IIa) образует мембранный комплекс с белком тромбомодулином (Тм); 2 — тромбин в составе мембранного комплекса IIa-Тм-Ca^{2+} активирует протеин С; 3 — активированный протеин С в составе ферментного мембранного комплекса Ca-S-Ca^{2+} гидролизует по 2 пептидные связи в факторах Va и VIIIa и превращает их в неактивные пептиды.

Наследственный дефицит протеина С и S ведёт к снижению скорости инактивации факторов VIIIa и Va и сопровождается тромботической болезнью. Мутация гена фактора V, при которой синтезируется фактор V, резистентный к протеину С, также приводит к тромбогенезу.

Антикоагулянтная фаза вызывает торможение каскада реакций свёртывания крови, а ингибиторы ферментов свёртывания инактивируют активные ферменты в кровяном русле.

Ингибиторы ферментов свёртывания крови. Физиологические ингибиторы ферментов свёртывания крови ограничивают распространение тромба местом повреждения сосуда. Белок плазмы крови **антитромбин III** — наиболее сильный ингибитор свёртывания крови; на его долю приходится около 80—90% антикоагулянтной активности крови. Он инактивирует ряд сериновых протеаз крови: тромбин, факторы IXa, Xa, XIIa, калликреин, плазмин и урокиназу. Антитромбин III не ингибирует фактор VIIa и не влияет на факторы в составе мембранных комплексов, а устраняет ферменты, находящиеся в плазме крови, препятствуя распространению тромбообразования в кровотоке.

Взаимодействие антитромбина с ферментами свёртывания крови ускоряется в присутствии гепарина. Гепарин — гетерополисахарид, который синтезируется в тучных клетках. В результате взаимодействия с гепарином антитромбин III приобретает конформацию, при которой повышается его сродство к сериновым протеазам крови. После образования комплекса антитромбин III-гепарин-фермент гепарин освобождается из него и может присоединяться к другим молекулам антитромбина.

При наследственном дефиците антитромбина III в молодом возрасте наблюдают тромбозы и эмболии сосудов, опасные для жизни.

α_2-Макроглобулин образует комплекс с сериновыми протеазами крови. В таком комплексе их активный центр полностью не блокируется,

и они могут взаимодействовать с субстратами небольшого размера. Однако высокомолекулярные субстраты, например фибриноген, становятся недоступными для действия протеаз в комплексе α_2-макроглобулин-тромбин.

Антиконвертин (тканевый ингибитор внешнего пути свёртывания) синтезируется в эндотелии сосудов. Он специфически соединяется с ферментным комплексом Тф-VIIa-Ca^{2+}, после чего улавливается печенью и разрушается в ней.

α_1-Антитрипсин ингибирует тромбин, фактор XIa, калликреин, однако он не рассматривается как важный ингибитор факторов свёртывания крови. α_1-Антитрипсин в основном на тканевом уровне ингибирует панкреатические и лейкоцитарные протеазы, коллагеназу, ренин, урокиназу.

Пептиды, образующиеся в результате протеолитической активации проферментов и профакторов, тоже обладают выраженными антикоагулянтными свойствами, но механизм их действия в настоящее время не выяснен.

Д. Роль тромбоцитов в гемостазе

Способность тромбоцитов прилипать к повреждённой поверхности стенки сосуда (адгезия) и друг к другу (агрегация), связываться с фибрином, образуя тромбоцитарный тромб, и секретировать в месте повреждения сосуда гемостатические факторы определяет их роль в гемостазе.

Циркулирующие в крови тромбоциты имеют дисковидную форму и не прилипают к неповреждённому эндотелию сосудов. Адгезию и агрегацию предотвращают взаимное отталкивание тромбоцитов и интактного эндотелия, а также простациклин (PG I_2). Механизм действия некоторых индукторов и репрессора агрегации тромбоцитов рассмотрен на рис. 14-17.

Простациклин образуется из арахидоновой кислоты в эндотелиии сосудов и поступает в кровь (см. раздел 8). Синтез и секрецию простациклина эндотелиальными клетками стимулируют тромбин, гистамин, ангиотензин II и калликреин. Он реализует своё действие через аденилатциклазную систему передачи сигнала (см. раздел 5). Взаимодействие простациклина с рецептором вызывает активацию протеинкиназы А. Активная протеинкиназа А фосфорилирует и таким образом активирует Ca^{2+}-АТФ-азу и Ca^{2+}-транслоказу. Это приводит к снижению уровня содержания Ca^{2+} в цитоплазме тромбоцитов, сохранению ими дисковидной формы и снижению способности к агрегации.

Активация тромбоцитов сопровождается появлением на поверхности плазматической мембраны отрицательно заряженных участков, образованных фосфатидилсерином.

Основные индукторы активации и агрегации тромбоцитов — фактор фон Виллебранда, коллаген, тромбин, АДФ.

Фактор фон Виллебранда — гликопротеин, присутствующий в плазме крови, эндотелии сосудов и α-гранулах тромбоцитов. При повреждении стенки сосудов коллаген, базальная мембрана и миоциты субэндотелия взаимодействуют с тромбоцитами посредством фактора фон Виллебранда. Плазматическая мембрана тромбоцитов содержит несколько типов рецепторов этого фактора. Фактор фон Виллебранда, взаимодействуя с рецепторами, действует на тромбоциты через инозитолфосфатную систему передачи сигнала (см. раздел 5). В конечном итоге это приводит к повышению содержания Ca^{2+} в цитоплазме тромбоцитов и образованию комплекса кальмодулин-4Ca^{2+} — миозинкиназа. Фермент миозинкиназа в составе этого комплекса фосфорилирует сократительный белок миозин, который взаимодействует с актином с образованием актомиозина (тромбостенина). В результате этого тромбоциты приобретают шиповидно-сферическую форму, облегчающую их взаимодействие друг с другом и с поверхностью повреждённого эндотелия.

Снижение концентрации фактора фон Виллебранда, уменьшение количества или изменение структуры его рецепторов ведут к нарушениям адгезии и агрегации тромбоцитов, что сопровождается кровоточивостью. Это наблюдают при синдроме Бернара—Сулье, обусловленном недостатком рецептора фактора фон Виллебранда гликопротеина Ia в тромбоцитах, и при болезни фон Виллебранда вследствие дефицита фактора фон Виллебранда.

Наиболее важные первичные индукторы активации тромбоцитов — тромбин и коллаген. Взаимодействие этих белков со специфическими рецепторами плазматической мембраны тромбоцитов приводит к мобилизации Ca^{2+} из плотной тубулярной системы в цитоплазму, что

в конечном итоге вызывает их адгезию и агрегацию.

Коллаген вызывает в тромбоцитах активацию фосфолипазы A_2, которая освобождает арахидоновую кислоту из фосфолипидов их мембраны. Арахидоновая кислота служит субстратом для фермента циклооксигеназы (ЦОГ). В результате реакции, катализируемой циклооксигеназой, образуются циклические эндоперекиси простагландин G_2 (PG G_2) и простагландин H_2 (PG H_2). Эти простагландины под действием тромбоксансинтетазы превращаются в тромбоксан A_2 (см. раздел 8). Тромбоксан A_2 снижает уровень цАМФ и, активируя фосфолипазу С, ускоряет освобождение Ca^{2+} из плотной тубулярной системы (рис. 14-17).

Тромбин взаимодействует со специфическим рецептором — интегральным белком, имеющим 7 трансмембранных доменов. Тромбин активирует рецептор частичным протеолизом, отщепляя от него N-концевой пептид, находящийся на внешней плазматической поверхности тромбоцита. Следовательно, тромбин, в отличие от других активаторов, действует каталитически, и одна молекула тромбина может активировать несколько рецепторов. Передача сигнала осуще-

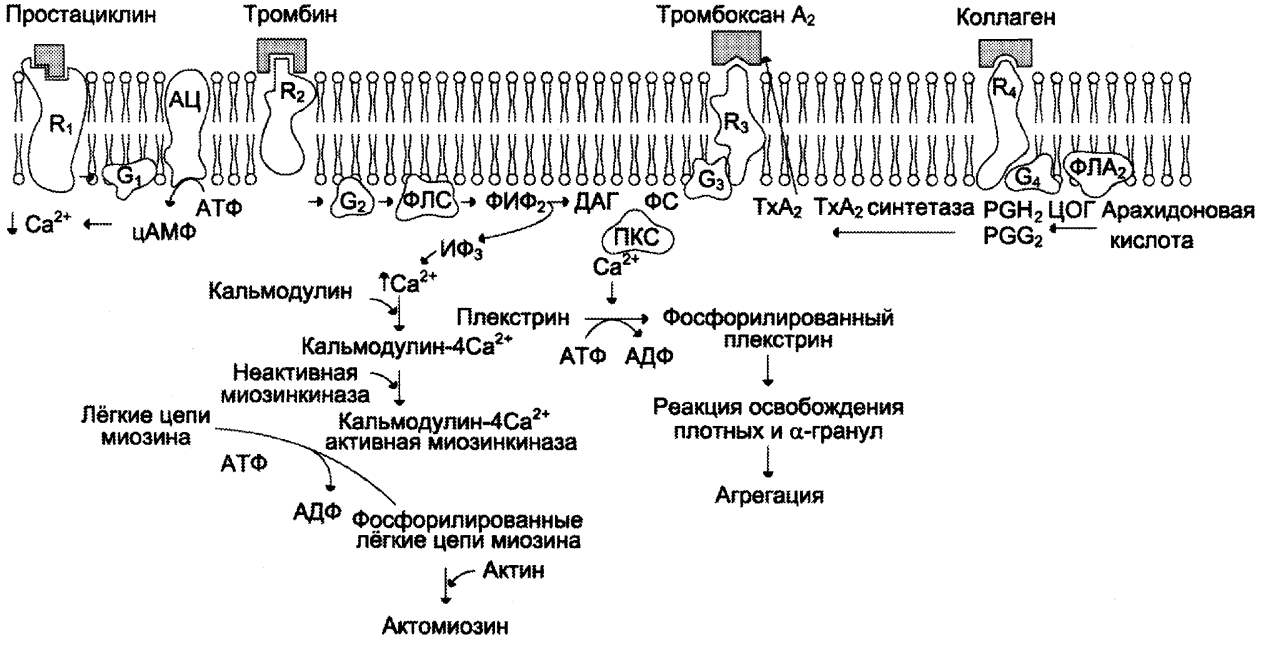


Рис. 14-17. Механизм действия некоторых индукторов и репрессора агрегации тромбоцитов. Взаимодействие простациклина с рецептором R_1 вызывает активацию аденилатциклазы, повышение концентрации цАМФ и вследствие этого снижение концентрации Ca^{2+} в цитозоле тромбоцитов. Взаимодействие коллагена с рецептором R_4 приводит к активации фосфолипазы A_2, которая гидролизует фосфолипиды клеточных мембран с образованием арахидоновой кислоты. Арахидоновая кислота ферментом циклооксигеназой превращается в простагландины PGG_2 и PGH_2, из которых под действием тромбоксансинтетазы образуется тромбоксан A_2. Тромбоксан A_2 секретируется активированными тромбоцитами. Тромбоксан и тромбин, соединяясь с соответствующими рецепторами R_3 и R_2, активируют фосфолипазу С. Фосфолипаза С гидролизует мембранный фосфолипид фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат с образованием 1,4,5-инозитолтрифосфата и 1,2-диацилглицерола. Инозитолтрифосфат ускоряет поступление из плотной тубулярной системы в цитоплазму клетки Ca^{2+}, который соединяется с кальмодулином. В комплексе кальмодулин-$4Ca^{2+}$ — миозинкиназа активная миозинкиназа фосфорилирует миозин. Фосфорилированный миозин взаимодействует с актином с образованием сократительного белка актомиозина, вызывающего изменение формы тромбоцитов, их адгезию и агрегацию. Комплекс протеинкиназа С-фосфатидилсерин–ДАГ–Ca^{2+} фосфорилирует белок плекстрин. Фосфорилированный плекстрин вызывает освобождение содержимого плотных гранул и α-гранул тромбоцитов: АДФ, ГДФ, Ca^{2+}, серотонина, фактора фон Виллебранда, β-тромбомодулина. R_1, R_2, R_3, R_4 — специфические мембранные рецепторы; АЦ — аденилатциклаза; G_1, G_2; G_3, G_4 — G-белки; ФЛС — фосфолипаза С; $ФЛА_2$ — фосфолипаза A_2; $ФИФ_2$ — фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат; $ИФ_3$ — 1,4,5-инозитол трифосфат; ДАГ — 1,2-диацилглицерол; ПКС — протеинкиназа С; ЦОГ — циклооксигеназа; $ТхА_2$ — тромбоксан A_2; $ТхА_2$ синтетаза — тромбоксансинтетаза.

ствляется через инозитолфосфатную систему, в результате чего в тромбоците повышается концентрация Ca^{2+} и активируется протеинкиназа С. Образующийся комплекс кальмодулин–$4Ca^{2+}$-миозинкиназа фосфорилирует миозин, взаимодействие которого с актином приводит к изменению формы тромбоцитов, к их адгезии и агрегации. Протеинкиназа С, кроме того, фосфорилирует белок тромбоцитов плекстрин. Фосфорилированный плекстрин вызывает «реакцию освобождения» содержащихся в гранулах тромбоцитов вторичных индукторов активации и агрегации тромбоцитов. К этим веществам относят содержащиеся в плотных гранулах тромбоцитов АДФ, Ca^{2+}, ГДФ, серотонин, гистамин и присутствующие в α-гранулах белок β-тромбоглобулин, фактор фон Виллебранда, белок фибронектин, тромбоспондин и ВМК. Тромбоспондин участвует во взаимодействии тромбоцитов друг с другом. β-Тромбоглобулин снижает секрецию простациклина и связывает гепарин. Фибронектин имеет центры связывания для коллагена, гепарина и тромбоцитов.

АДФ содержится в тромбоцитах, а также попадает в кровь при разрушении эритроцитов. АДФ взаимодействует со специфическими рецепторами и подавляет активность аденилатциклазы. Это вызывает увеличение мобилизации внутриклеточного Ca^{2+} и в конечном итоге приводит к агрегации тромбоцитов.

Активация тромбоцитов, таким образом, сопровождается изменением их метаболизма и освобождением биологически активных веществ. Эти вещества вызывают морфологические изменения, адгезию, агрегацию тромбоцитов и участвуют в образовании тромба.

Нарушение функциональной активности рецепторов и системы вторичных посредников тромбоцитов приводит к изменению их функции и может явиться причиной ряда заболеваний, сопровождающихся тромбозами или кровотечениями.

Лекарственные препараты, нарушающие агрегацию тромбоцитов, используют для предупреждения возникновения тромбозов. Аспирин (ингибитор циклооксигеназы), никотиновая кислота (ингибитор тромбоксансинтетазы) и Ca^{2+}-блокаторы угнетают агрегацию тромбоцитов, влияя на разные этапы реализации тромбогенного сигнала.

Е. Фибринолиз

Тромб растворяется в течение нескольких дней после образования. Фибринолиз — ферментативное расщепление волокон фибрина с образованием растворимых пептидов, которые удаляются из сосудистого русла. Разрушение фибрина в составе тромба происходит под действием сериновой протеазы плазмина.

Плазмин образуется из плазминогена под действием активаторов. Неактивный профермент плазмина плазминоген синтезируется в печени, почках и костном мозге.

Тканевый активатор плазминогена (ТАП) — протеолитический фермент, содержащийся в эндотелии сосудов всех тканей, кроме печени. Поступление этого активатора в кровь увеличивается при эмоциональном напряжении, боли, венозной тромбоэмболии, умеренной физической работе. ТАП частичным протеолизом превращает неактивный плазминоген в активный плазмин. Активаторами плазминогена также служат фактор XIIa и калликреин.

Растворение фибринового сгустка происходит при взаимодействии фибрина, плазминогена и ТАП (рис. 14-18).

Формирование сети фибриновых волокон при образовании тромба сопровождается сорбцией на ней плазминогена и его активаторов. В молекуле плазмина и плазминогена есть участки, комплементарные доменам фибрина, причём одна молекула плазмина может связывать несколько молекул фибрина. Молекулы ТАП тоже имеют центры связывания с фибрином. Образующийся из плазминогена под действием ТАП плазмин гидролизует фибрин с образованием пептидов X и Y, активирующих фибринолиз, и пептидов D и E, его тормозящих. Растворимые пептиды X, Y, D, E поступают в кровоток и там фагоцитируются. Разрушение тромба приводит к освобождению из него плазмина и ТАП. В кровяном русле последние быстро инактивируются специфическими ингибиторами и улавливаются печенью.

ТАП ингибируется ингибиторами тканевого активатора плазмина первого (и-ТАП-1) и второго (и-ТАП-2) типов, а плазмин — α_2-антиплазмином или другими ингибиторами сериновых протеаз.

В почках синтезируется протеолитический активатор плазминогена урокиназа, которая, превращая плазминоген в плазмин, способствует

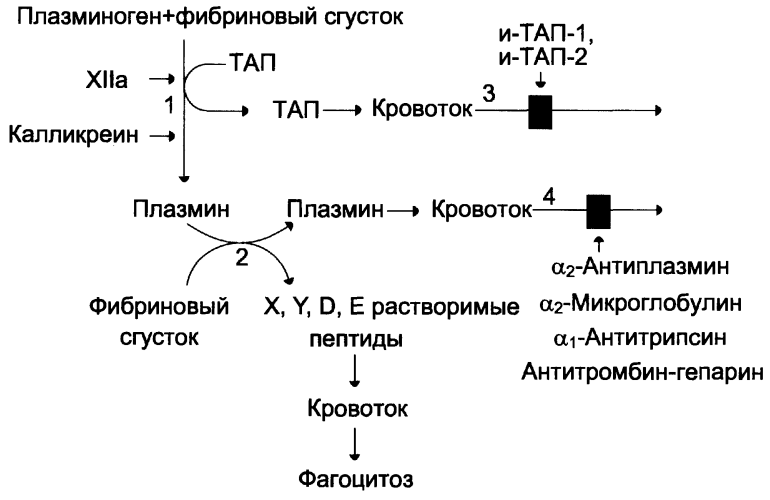


Рис. 14-18. Схема фибринолиза. 1 — абсорбированный на фибриновом сгустке плазминоген под действием активаторов (фактор XIIa, калликреин, ТАП) частичным протеолизом превращается в плазмин; 2 — плазмин гидролизует фибрин с образованием растворимых пептидов X, Y,D, E; 3 — в кровотоке ТАП инактивируется специфическими белками и-ТАП-1, и-ТАП-2; 4 — активность плазмина снижается под действием неспецифических ингибиторов сериновых протеаз (α_2-антиплазмина, α_2-макроглобулина, α_1-антитрипсина, комплекса антитромбин–гепарин).

освобождению почечных клубочков от фибриновых волокон.

Из β-гемолитического стрептококка выделили белок стрептокиназу, образующий комплекс с плазминогеном, в котором плазминоген аутокаталитически превращается в плазмин.

Урокиназу, стрептокиназу и ТАП используют при тромболитической терапии инфаркта миокарда, тромбозах вен и артерий, гемодиализе.

Такие ингибиторы ферментов свёртывания крови, как α_2-макроглобулин, α_1-антитрипсин и комплекс антитромбин III-гепарин также обладают небольшой фибринолитической активностью.

Снижение фибринолитической активности крови сопровождается тромбозами. Нарушение разрушения фибринового сгустка может быть вызвано наследственным дефицитом плазминогена или генетическим дефектом его структуры, снижением поступления в кровь активаторов плазминогена, повышением содержания в крови ингибиторов фибринолиза (и-ТАП-1, и-ТАП-2, α_2-антиплазмина).

Наследственные и приобретённые нарушения гемостаза могут привести как к геморрагическим заболеваниям, характеризующимся кровоточивостью, так и к тромботической болезни. Однако следует отметить, что повышенная склонность к тромбообразованию и внутрисосудистому свёртыванию (тромбофилии) встречается гораздо чаще, чем гемофилии. Например, частота разных форм гемофилий колеблется в разных странах от 6 до 18 на 100 000 мужчин, в то время как тромбофилии, вызванные дефицитом антитромбина III, встречаются у 1-2 больных на 5000, а при недостатке протеина С — у одного на 15 000 человек.

IV. БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

В плазме крови содержится 7% всех белков организма при концентрации 60–80 г/л. Белки плазмы крови выполняют множество функций. Одна из них заключается в поддержании осмотического давления, так как белки связывают воду и удерживают её в кровеносном русле.

- Белки плазмы образуют важнейшую буферную систему крови и поддерживают pH крови в пределах 7,37–7,43.
- Альбумин, транстиретин, транскортин, трансферрин и некоторые другие белки (табл. 14-2) выполняют транспортную функцию.
- Белки плазмы определяют вязкость крови и, следовательно, играют важную роль в гемодинамике кровеносной системы.

- Белки плазмы крови являются резервом аминокислот для организма.
- Иммуноглобулины, белки свёртывающей системы крови, α_1-антитрипсин и белки системы комплемента осуществляют защитную функцию.

Методом электрофореза на ацетилцеллюлозе или геле агарозы белки плазмы крови можно разделить на альбумины (55–65%), α_1-глобулины (2–4%), α_2-глобулины (6–12%), β-глобулины (8–12%) и γ-глобулины (12–22%) (рис. 14-19).

Применение других сред для электрофоретического разделения белков позволяет обнаружить большее количество фракций. Например, при электрофорезе в полиакриламидном или крахмальном гелях в плазме крови выделяют 16–17 белковых фракций. Метод иммуноэлектрофореза, сочетающий электрофоретический и иммунологический способы анализа, позволяет разделить белки плазмы крови более чем на 30 фракций.

Большинство сывороточных белков синтезируется в печени, однако некоторые образуются и в других тканях. Например, γ-глобулины синтезируются В-лимфоцитами (см. раздел 4), пептидные гормоны в основном секретируют клетки эндокринных желёз, а пептидный гормон эритропоэтин — клетки почки.

Для многих белков плазмы, например альбумина, α_1-антитрипсина, гаптоглобина, трансферрина, церулоплазмина, α_2-макроглобулина и иммуноглобулинов, характерен полиморфизм (см. раздел 4).

Почти все белки плазмы, за исключением альбумина, являются гликопротеинами. Олигосахариды присоединяются к белкам, образуя гликозидные связи с гидроксильной группой серина или треонина, или взаимодействуя с карбоксильной группой аспарагина. Концевой остаток олигосахаридов в большинстве случаев представляет собой N-ацетилнейраминовую кислоту, соединённую с галактозой. Фермент эндотелия сосудов нейраминидаза гидролизует связь между ними, и галактоза становится доступной для специфических рецепторов гепатоцитов. Путём эндоцитоза «состарившиеся» белки поступают в клетки печени, где разрушаются. $T_{1/2}$ белков плазмы крови составляет от нескольких часов до нескольких недель.

При ряде заболеваний происходит изменение соотношения распределения белковых фракций при электрофорезе по сравнению с нормой (рис. 14-20).

Такие изменения называют диспротеинемиями, однако их интерпретация часто имеет относительную диагностическую ценность. Например, характерное для нефротического синдрома снижение альбуминов, α_1- и γ-глобулинов и увеличение α_2- и β-глобулинов отмечают и при некоторых других заболеваниях, сопровождающихся потерей белков. При снижении гуморального иммунитета уменьшение фракции γ-глобулинов свидетельствует об уменьшении содержания основного компонента иммуноглобулинов — IgG, но не отражает динамику изменений IgA и IgM.

Содержание некоторых белков в плазме крови может резко увеличиваться при острых воспалительных процессах и некоторых других патологических состояниях (травмы, ожоги, инфаркт миокарда). Такие белки называют белками острой фазы, так как они принимают участие в развитии воспалительной реакции организма. Основной индуктор синтеза большинства белков острой фазы в гепатоцитах — полипептид интерлейкин-1, освобождающийся из мононуклеарных фагоцитов. К белкам острой фазы относят С-реактивный белок, называемый так, потому что он взаимодействует с С-полисахаридом пневмококков, α_1-антитрипсин, гаптоглобин, кислый гликопротеин, фибриноген. Известно, что С-реактивный белок может стимулировать

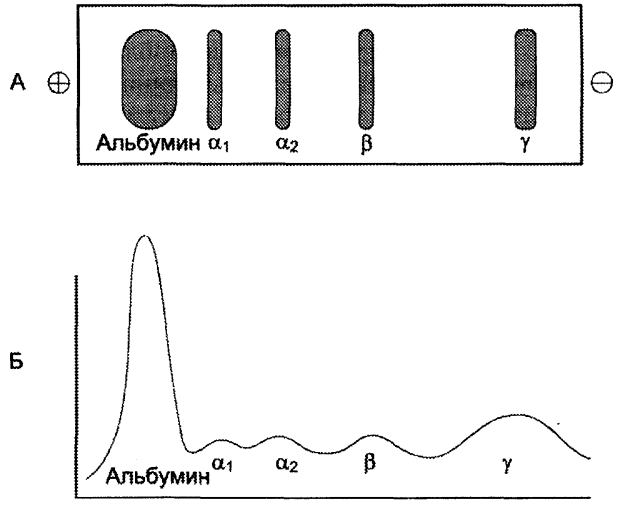


Рис. 14-19. Электрофореграмма (А) и денситограмма (Б) белков сыворотки крови.

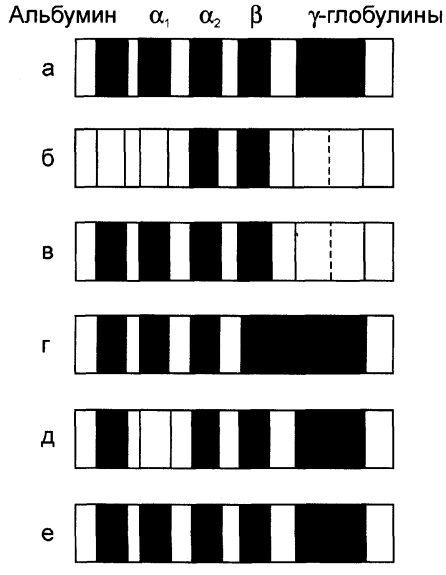


Рис. 14-20. Протеинограммы белков сыворотки крови. а — в норме; б — при нефротическом синдроме; в — при гипогаммаглобулинемии; г — при циррозе печени; д — при недостатке α_1-антитрипсина; е — при диффузной гипергаммаглобулинемии.

систему комплемента, и его концентрация в крови, например, при обострении ревматоидного артрита может возрастать в 30 раз по сравнению с нормой. Белок плазмы крови α_1-антитрипсин может инактивировать некоторые протеазы, освобождающиеся в острой фазе воспаления.

Содержание некоторых белков в плазме крови и их функции представлены в таблице 14-2.

Альбумин. Концентрация альбумина в крови составляет 40–50 г/л. В сутки в печени синтезируется около 12 г альбумина, $T_{1/2}$ этого белка — примерно 20 дней. Альбумин состоит из 585 аминокислотных остатков, имеет 17 дисульфидных связей и обладает молекулярной массой 69 кД. Молекула альбумина содержит много дикарбоновых аминокислот, поэтому может удерживать в крови катионы Ca^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}. Около 40% альбумина содержится в крови и остальные 60% в межклеточной жидкости, однако его концентрация в плазме выше, чем в межклеточной жидкости, поскольку объём последней превышает объём плазмы в 4 раза.

Благодаря относительно небольшой молекулярной массе и высокой концентрации альбумин обеспечивает до 80% осмотического давления плазмы. При гипоальбуминемии осмотическое давление плазмы крови снижается. Это приводит к нарушению равновесия в распределении внеклеточной жидкости между сосудистым руслом и межклеточным пространством. Клинически это проявляется как отёк. Относительное снижение объёма плазмы крови сопровождается снижением почечного кровотока, что вызывает стимуляцию системы ренин-ангиотензин-альдостерон, обеспечивающей восстановление объёма крови (см. раздел 11). Однако при недостатке альбумина, который должен удерживать Na^+, другие катионы и воду, вода уходит в межклеточное пространство, усиливая отёки.

Гипоальбуминемия может наблюдаться и в результате снижения синтеза альбуминов при заболеваниях печени (цирроз), при повышении проницаемости капилляров, при потерях белка из-за обширных ожогов или катаболических состояний (тяжёлый сепсис, злокачественные новообразования), при нефротическом синдроме, сопровождающемся альбуминурией, и голодании. Нарушения кровообращения, характеризующиеся замедлением кровотока, приводят к увеличению поступления альбумина в межклеточное пространство и появлению отёков. Быстрое увеличение проницаемости капилляров сопровождается резким уменьшением объёма крови, что приводит к падению АД и клинически проявляется как шок.

Альбумин — важнейший транспортный белок. Он транспортирует свободные жирные кислоты (см. раздел 8), неконъюгированный билирубин (см. раздел 13), Ca^{2+}, Cu^{2+}, триптофан, тироксин и трийодтиронин (см. раздел 11). Многие лекарства (аспирин, дикумарол, сульфаниламиды) связываются в крови с альбумином. Этот факт необходимо учитывать при лечении заболеваний, сопровождающихся гипоальбуминемией, так как в этих случаях повышается концентрация свободного лекарства в крови. Кроме того, следует помнить, что некоторые лекарства могут конкурировать за центры связывания в молекуле альбумина с билирубином и между собой.

Транстиретин (преальбумин) называют тироксинсвязывающим преальбумином. Это белок острой фазы. Транстиретин относят к фракции альбуминов, он имеет тетрамерную молекулу. Он способен присоединять в одном центре связывания ретинолсвязывающий белок, а в другом — до двух молекул тироксина и трийодти-

Таблица 14-2. Содержание и функции некоторых белков плазмы крови

Группа	Белки	Концентрация в сыворотке крови, г/л	Функция
Альбумины	Транстиретин	0,25	Транспорт тироксина и трийодтиронина
	Альбумин	40	Поддержание осмотического давления, транспорт жирных кислот, билирубина, жёлчных кислот, стероидных гормонов, лекарств, неорганических ионов, резерв аминокислот
α_1-Глобулины	α_1-Антитрипсин	2,5	Ингибитор протеиназ
	ЛПВП	0,35	Транспорт холестерола
	Протромбин	0,1	Фактор II свёртывания крови
	Транскортин	0,03	Транспорт кортизола, кортикостерона, прогестерона
	Кислый α_1-гликопротеин	1	Транспорт прогестерона
	Тироксинсвязывающий глобулин	0,02	Транспорт тироксина и трийодтиронина
α_2-Глобулины	Церулоплазмин	0,35	Транспорт ионов меди, оксидоредуктаза
	Антитромбин III	0,3	Ингибитор плазменных протеаз
	Гаптоглобин	1	Связывание гемоглобина
	α_2-Макроглобулин	2,6	Ингибитор плазменных протеиназ, транспорт цинка
	Ретинолсвязывающий белок	0,04	Транспорт ретинола
	Витамин D связывающий белок	0,4	Транспорт кальциферола
β-Глобулины	ЛПНП	3,5	Транспорт холестерола
	Трансферрин	3	Транспорт ионов железа
	Фибриноген	3	Фактор I свёртывания крови
	Транскобаламин	25×10^{-9}	Транспорт витамина B_{12}
	Глобулин связывающий белок	20×10^{-6}	Транспорт тестостерона и эстрадиола
	С-реактивный белок	<0,01	Активация комплемента
γ-Глобулины	IgG	12	Поздние антитела
	IgA	3,5	Антитела, защищающие слизистые оболочки
	IgM	1,3	Ранние антитела
	IgD	0,03	Рецепторы В-лимфоцитов
	IgE	<0,01	Реагин

ронина. Соединение с этими лигандами происходит независимо друг от друга. В транспорте последних транстиретин играет существенно меньшую роль по сравнению с тироксинсвязывающим глобулином.

α_1-Антитрипсин относят к α_1-глобулинам. Он ингибирует ряд протеаз, в том числе фермент эластазу, освобождающийся из нейтрофилов и разрушающий эластин альвеол лёгких. При недостаточности α_1-антитрипсина могут возникнуть эмфизема лёгких (см. раздел 15) и гепатит, приводящий к циррозу печени. Существует несколько полиморфных форм α_1-антитрипсина, одна из которых является патологической. У людей, гомозиготных по двум дефектным аллелям гена антитрипсина, в печени синтезируется α_1-антитрипсин, который образует агрегаты, разрушающие гепатоциты. Это приводит к нарушению секреции такого белка гепатоцитами и к снижению содержания α_1-антитрипсина в крови.

Гаптоглобин составляет примерно четверть всех α_2-глобулинов. Гаптоглобин при внутрисосудистом гемолизе эритроцитов образует комплекс с гемоглобином, который разрушается в клетках РЭС. Если свободный гемоглобин, имеющий молекулярную массу 65 кД, может фильтроваться через почечные клубочки или агрегировать в них, то комплекс гемоглобин–гаптоглобин имеет слишком большую молекулярную массу (155 кД), чтобы пройти через гломерулы. Следовательно, образование такого комплекса предотвращает потери организмом железа, содержащегося в гемоглобине. Определение содержания гаптоглобина имеет диагностическое значение, например, снижение концентрации гаптоглобина в крови наблюдают при гемолитической анемии. Это объясняют тем, что при $T_{1/2}$ гаптоглобина, составляющем 5 дней, и $T_{1/2}$ комплекса гемоглобин–гаптоглобин (около 90 мин) увеличение поступления свободного гемоглобина в кровь при гемолизе эритроцитов вызовет резкое снижение содержания свободного гаптоглобина в крови.

Гаптоглобин относят к белкам острой фазы, его содержание в крови повышается при острых воспалительных заболеваниях.

Информация о некоторых других белках плазмы крови, представленных в табл. 14-2, имеется в соответствующих разделах учебника.

РАЗДЕЛ 15

БИОХИМИЯ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

У многоклеточных организмов большинство клеток окружено вне- или межклеточным матриксом. Межклеточный матрикс — сложный комплекс связанных между собой макромолекул. Эти макромолекулы (белки и гетерополисахариды), как правило, секретируются самими клетками, а в межклеточном матриксе из них строится упорядоченная сеть. Межклеточный матрикс, окружающий клетки, влияет на их прикрепление, развитие, пролиферацию, организацию и метаболизм.

Межклеточный матрикс вместе с клетками разного типа, которые в нём находятся (фибробласты, хондро- и остеобласты, тучные клетки и макрофаги), часто называют **соединительной тканью**.

Межклеточный матрикс выполняет в организме самые разнообразные функции:

- образует каркас органов и тканей;
- является универсальным «биологическим» клеем;
- участвует в регуляции водно-солевого обмена;
- образует высокоспециализированные структуры (кости, зубы, хрящи, сухожилия, базальные мембраны).

Основные компоненты межклеточного матрикса — структурные белки коллаген и эластин, гликозаминогликаны, протеогликаны, а также неколлагеновые структурные белки (фибронектин, ламинин, тенасцин, остеонектин и др.).

I. КОЛЛАГЕН

Коллаген — основной структурный белок межклеточного матрикса. Он составляет от 25 до 33% общего количества белка в организме, т.е. ~6% массы тела. Название «коллаген» объединяет семейство близкородственных фибриллярных белков, которые являются основным белковым элементом кожи, костей, сухожилий, хряща, кровеносных сосудов, зубов. В разных тканях преобладают разные типы коллагена, а это, в свою очередь, определяется той ролью, которую коллаген играет в конкретном органе или ткани. Например, в пластинчатой костной ткани, из которой построено большинство плоских и трубчатых костей скелета, коллагеновые волокна имеют строго ориентированное направление:

продольное — в центральной части пластинок, поперечное и под углом — в периферической. Это способствует тому, что даже при расслоении пластинок фибриллы одной пластинки могут продолжаться в соседние, создавая таким образом единую волокнистую структуру кости. Поперечно ориентированные коллагеновые волокна могут вплетаться в промежуточные слои между костными пластинками, благодаря чему достигается прочность костной ткани. В сухожилиях коллаген образует плотные параллельные волокна, которые дают возможность этим структурам выдерживать большие механические нагрузки. В хрящевом матриксе коллаген образует фибриллярную сеть, которая придаёт хрящу прочность, а в роговице глаза коллаген участвует в образовании гексагональных решёток десцеметовых мембран, что обеспечивает прозрачность роговицы, а также участие этих структур в преломлении световых лучей. В дерме фибриллы коллагена ориентированы таким образом, что формируют сеть, особенно хорошо развитую в участках кожи, которые испытывают сильное давление (кожа подошв, локтей, ладоней), а в заживающей ране они агрегированы весьма хаотично. Аминокислотный состав и конформация коллагена описаны в подразделе «Фибриллярные белки» раздела 1.

Здесь будут разобраны синтез и созревание коллагена, структуры, которые он образует, и их функции, а также заболевания, связанные с нарушением этих процессов.

Полиморфизм коллагена

Коллаген — ярко выраженный полиморфный белок. В настоящее время известно 19 типов коллагена, которые отличаются друг от друга по первичной структуре пептидных цепей, функциям и локализации в организме. Вариантов α-цепей, образующих тройную спираль, гораздо больше 19 (около 30). Для обозначения каждого вида коллагена пользуются определённой формулой, в которой тип коллагена записывается римской цифрой в скобках, а для обозначения α-цепей используют арабские цифры: например коллагены II и III типа образованы идентичными α-цепями, их формулы, соответственно $[\alpha_1(II)]_3$ и $[\alpha_1(III)]_3$; коллагены I и IV типов являются гетеротримерами и образуются обычно двумя разными типами α-цепей, их формулы, соответственно $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$ и $[\alpha_1(IV)]_2\alpha_2(IV)$. Индекс за скобкой обозначает количество идентичных α-цепей. Распределение коллагенов по органам и тканям представлено в табл. 15-1.

Гены коллагена называются соответственно типам коллагена и записываются арабскими цифрами, например *COL1* — ген коллагена I типа, *COL2* — ген коллагена II типа, *COL7* — ген коллагена VII типа и т.д. К этому символу приписываются буква A (обозначает α-цепь) и арабская цифра (обозначает вид α-цепи). Например, *COL1A1* и *COL1A2* кодируют, соответственно, α_1 и α_2-цепи коллагена I типа.

А. Этапы синтеза и созревания коллагена

Синтез и созревание коллагена — сложный многоэтапный процесс, начинающийся в клетке, а завершающийся в межклеточном матриксе. Синтез и созревание коллагена включают в себя целый ряд посттрансляционных изменений (рис. 15-1):

- гидроксилирование пролина и лизина с образованием гидроксипролина (Hyp) и гидроксилизина (Hyl);
- гликозилирование гидроксилизина;
- частичный протеолиз — отщепление «сигнального» пептида, а также N- и C-концевых пропептидов;
- образование тройной спирали.

Синтез полипептидных цепей коллагена

Полипептидные цепи коллагена синтезируются на полирибосомах, связанных с мембранами ЭР, в виде более длинных, чем зрелые цепи, предшественников — препро-α-цепей. У этих предшественников имеется гидрофобный «сигнальный» пептид на N-конце, содержащий около 100 аминокислот.

Основная функция сигнального пептида — ориентация синтеза пептидных цепей в полость ЭР. После выполнения этой функции сигнальный пептид сразу же отщепляется. Синтезированная молекула проколлагена содержит дополнительные участки — N- и C-концевые пропептиды, имеющие около 100 и 250 аминокислот, соответственно. В состав пропептидов входят остатки цистеина, которые образуют внутри- и межцепочечные (только в C-пептидах) S-S-связи. Концевые пропептиды не образуют тройную спираль, а формируют глобулярные домены. Отсутствие N- и C-

Таблица 15-1. Распределение коллагена в тканях и органах

Типы	Гены	Ткани и органы
I	*COL1A1, COL1A2*	Кожа, сухожилия, кости, роговица, плацента, артерии, печень, дентин
II	*COL2A1*	Хрящи, межпозвоночные диски, стекловидное тело, роговица
III	*COL3A1*	Артерии, матка, кожа плода, строма паренхиматозных органов
IV	*COL4A1–COL4A6*	Базальные мембраны
V	*COL5A1–COL5A3*	Минорный компонент тканей, содержащих коллаген I и II типов (кожа, роговица, кости, хрящи, межпозвоночные диски, плацента)
VI	*COL6A1–COL6A3*	Хрящи, кровеносные сосуды, связки, кожа, матка, лёгкие, почки
VII	*COL7A1*	Амнион, кожа, пищевод, роговица, хорион
VIII	*COL8A1–COL8A2*	Роговица, кровеносные сосуды, культуральная среда эндотелия
IX	*COL9A1–COL9A3*	Ткани, содержащие коллаген II типа (хрящи, межпозвоночные диски, стекловидное тело)
X	*COL10A1*	Хрящи (гипертрофированные)
XI	*COL11A1–COL11A2*	Ткани, содержащие коллаген II типа (хрящи, межпозвоночные диски, стекловидное тело)
XII	*COL12A1*	Ткани, содержащие коллаген I типа (кожа, кости, сухожилия и др.)
XIII	*COL13A1*	Многие ткани
XIV	*COL14A1*	Ткани, содержащие коллаген I типа (кожа, кости, сухожилия и др.)
XV	*COL15A1*	Многие ткани
XVI	*COL16A1*	Многие ткани
XVII	*COL17A1*	Гемидесмосомы кожи
XVIII	*COL18A1*	Многие ткани, например печень, почки
XIX	*COL19A1*	Клетки рабдомиосаркомы

концевых пептидов в структуре проколлагена нарушает правильное формирование тройной спирали.

Посттрансляционные модификации коллагена

Гидроксилирование пролина и лизина. Роль витамина С

Гидроксилирование пролина и лизина начинается в период трансляции коллагеновой мРНК на рибосомах и продолжается на растущей полипептидной цепи вплоть до её отделения от рибосом. После образования тройной спирали дальнейшее гидроксилирование пролиловых и лизиловых остатков прекращается.

Реакции гидроксилирования катализируют оксигеназы, связанные с мембранами микросом. Пролиловые и лизиловые остатки в Y-положении пептида $(Гли\text{-}x\text{-}y)_n$ подвергаются действию, соответственно, пролил-4-гидроксилазы и лизил-5-гидроксилазы. Пролил-3-гидроксилаза действует на некоторые остатки пролина в X-положениях. Необходимыми компонентами этой реакции являются α-кетоглутарат, O_2 и витамин С (аскорбиновая кислота). Донором атома кислорода, который присоединяется к С-4 пролина, является молекула O_2, второй атом O_2 включается в сукцинат, который образуется при декарбоксилировании α-кетоглутарата, а из карбоксильной группы α-кетоглутарата образуется CO_2 (см. схему А на с. 691).

Гидроксилазы пролина и лизина содержат в активном центре атом железа Fe^{2+}. Для сохранения атома железа в ферроформе необходим восстанавливающий агент. Роль этого агента выполняет кофермент гидроксилаз — аскорбиновая кислота, которая легко окисляется в дегидроаскорбиновую кислоту. Обратное превращение происходит в ферментативном процессе за счёт восстановленного глутатиона (см. схему Б на с. 691).

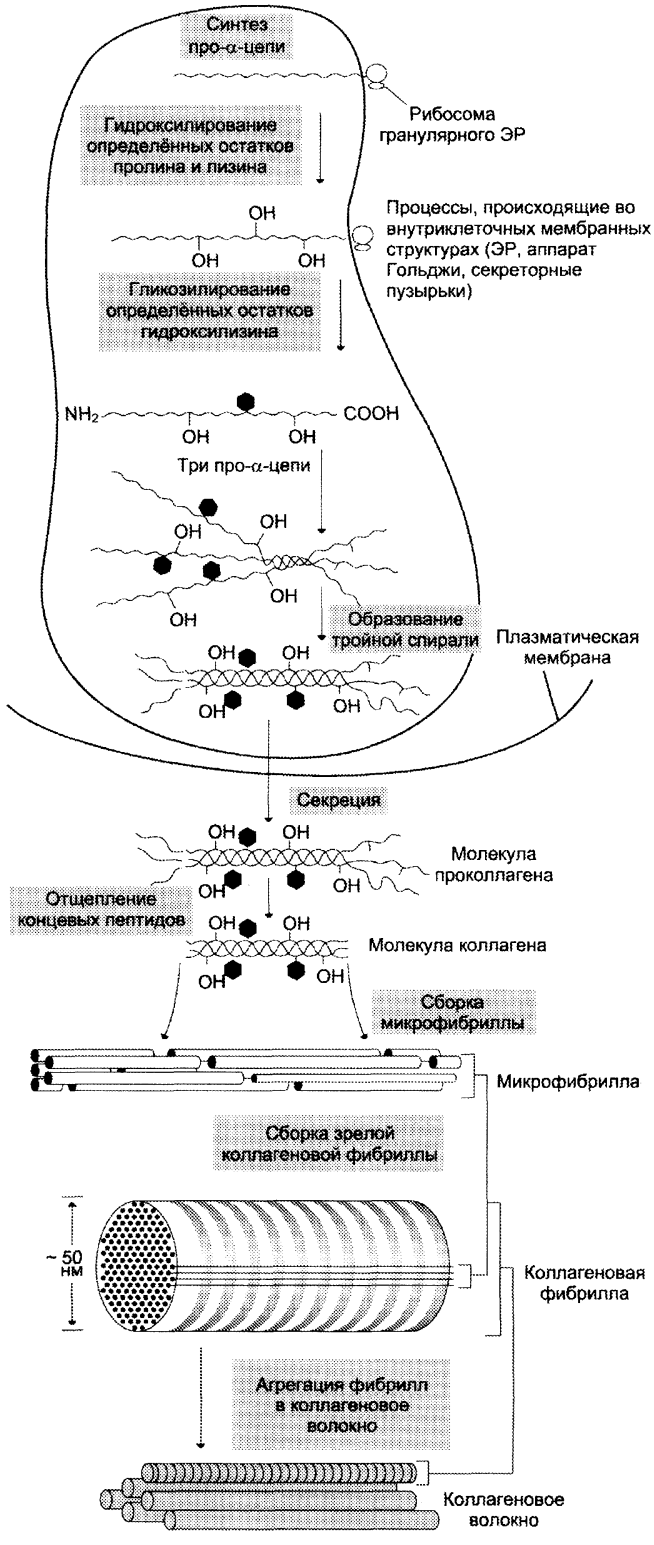


Рис. 15-1. Синтез и созревание коллагена.

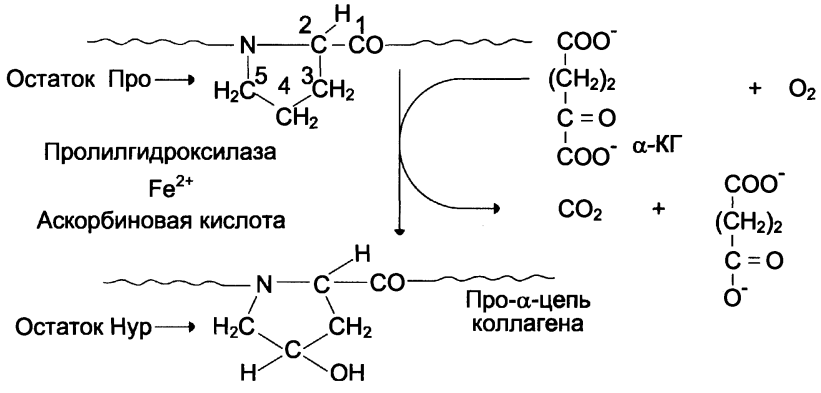


Схема А

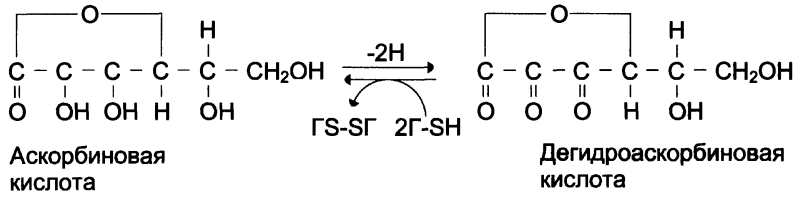


Схема Б

Гидроксилирование пролина необходимо для стабилизации тройной спирали коллагена, ОН-группы гидроксипролина (Нур) участвуют в образовании водородных связей. А гидроксилирование лизина очень важно для последующего образования ковалентных связей между молекулами коллагена при сборке коллагеновых фибрилл. При цинге — заболевании, вызванном недостатком витамина С, нарушается гидроксилирование остатков пролина и лизина. В результате этого образуются менее прочные и стабильные коллагеновые волокна, что приводит к большой хрупкости и ломкости кровеносных сосудов с развитием цинги. Клиническая картина цинги характеризуется возникновением множественных точечных кровоизлияний под кожу и слизистые оболочки, кровоточивостью дёсен, выпадением зубов, анемией.

Гликозилирование гидроксилизина

После завершения гидроксилирования при участии специфических гликозилтрансфераз в состав молекулы проколлагена вводятся углеводные группы. Чаще всего этими углеводами служат галактоза или дисахарид галактозилглюкоза (рис. 15-2).

Они образуют ковалентную О-гликозидную связь с 5-ОН-группой гидроксилизина. Гликозилирование гидроксилизина происходит в коллагене, ещё не претерпевшем спирализации, и завершается после образования тройной спирали. Число углеводных единиц в молекуле коллагена зависит от вида ткани. Так, например, в коллагене сухожилий (тип I) это число равно 6, а в коллагене капсулы хрусталика (тип IV) — 110. Роль этих углеводных групп неясна; известно только, что при наследственном заболевании, причиной которого является дефицит лизилгидроксилазы (синдром Элерса–Данло–Русакова, тип VI), содержание гидроксилизина и углеводов в образующемся коллагене снижено; возможно, это является причиной ухудшения механических свойств кожи и связок у людей с этим заболеванием.

Образование проколлагена и его секреция в межклеточное пространство

После гидроксилирования и гликозилирования каждая про-α-цепь соединяется водородными связями с двумя другими про-α-цепями, образуя тройную спираль проколлагена. Эти процессы происходят ещё в просвете ЭР и на-

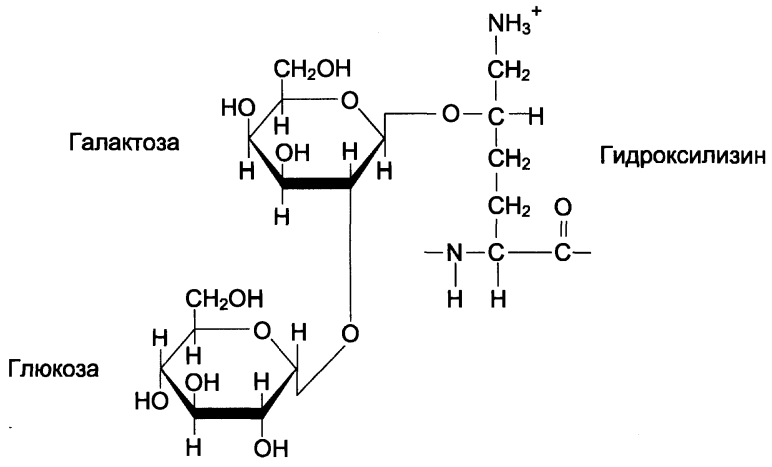


Рис. 15-2. Углеводные компоненты коллагена.

чинаются после образования межцепочечных дисульфидных мостиков в области С-концевых пропептидов. Из ЭР молекулы проколлагена перемещаются в аппарат Гольджи, включаются в секреторные пузырьки и секретируются в межклеточное пространство.

Образование тропоколлагена. Болезни, связанные с нарушениями этого процесса

В межклеточном матриксе концевые пропептиды коллагенов I, II и III типов отщепляются специфическими проколлагенпептидазами, в результате чего образуются молекулы тропоколлагена, которые и являются структурной единицей коллагеновых фибрилл. При снижении активности этих ферментов (синдром Элерса–Данло–Русакова, тип VII) концевые пропептиды проколлагена не отщепляются, вследствие чего нарушается образование тропоколлагена и далее нарушается образование нормальных коллагеновых фибрилл. Нити коллагена видны под микроскопом в виде дезорганизованных пучков. Клинически это проявляется малым ростом, искривлением позвоночника, привычными вывихами суставов, высокой растяжимостью кожи.

У коллагенов некоторых типов (IV, VIII, X) концевые пропептиды не отщепляются. Это связано с тем, что такие коллагены образуют не фибриллы, а сетеподобные структуры, в формировании которых важную роль играют концевые N- и С-пептиды.

Б. Особенности структуры и функции разных типов коллагенов

19 типов коллагена подразделяют на несколько классов в зависимости от того, какие структуры они могут образовывать. Эти структуры представлены в табл. 15-2.

Фибриллообразующие (I, II, III, V и XI) типы

95% всего коллагена в организме человека составляют коллагены I, II и III типов, которые образуют очень прочные фибриллы. Значительное содержание именно этих типов коллагена объясняется тем, что они являются основными структурными компонентами органов и тканей, которые испытывают постоянную или перио-

Таблица 15-2. Классификация коллагенов по видам структур, которые они образуют

Структура	Тип
Фибриллы	I, II, III, V, XI
Ассоциированные с фибриллами	IX, XII, XIV, XVI, XIX
Сети	IV, VIII, X
Микрофибриллы	VI
«Заякоренные» фибриллы	VII
Трансмембранные домены	XIII, XVII
Другие	XV, XVIII

дическую механическую нагрузку (кости, сухожилия, хрящи, межпозвоночные диски, кровеносные сосуды), а также участвуют в образовании стромы паренхиматозных органов. Поэтому коллагены I, II и III типов часто называют интерстициальными. К классу фибриллообразующих относят также минорные коллагены V и XI типов.

Структура фибрилл коллагена и их формирование

Основа структурной организации коллагеновых фибрилл — ступенчато расположенные параллельные ряды молекул тропоколлагена, которые сдвинуты на 1/4 относительно друг друга (рис. 15-3).

На схеме хорошо видно, что молекулы коллагена не связаны между собой «конец в конец», а между ними имеется промежуток в 35–40 нм. Предполагается, что в костной ткани эти промежутки выполняют роль центров минерализации, где откладываются кристаллы фосфата кальция. При электронной микроскопии фиксированные и контрастированные фибриллы коллагена выглядят поперечно исчерченными с периодом 67 нм, который включает одну тёмную и одну светлую полоски. Считают, что такое строение максимально повышает сопротивление всего агрегата растягивающим нагрузкам.

Фибриллы коллагена образуются спонтанно, путём самосборки. Но эти фибриллы ещё не являются зрелыми, так как не обладают достаточной прочностью (известно, что зрелое коллагеновое волокно толщиной в 1 мм выдерживает нагрузку до 10 кг).

Образовавшиеся коллагеновые фибриллы укрепляются внутри- и межцепочечными ковалентными сшивками (они встречаются только в коллагене и эластине). Эти сшивки образуются следующим образом:

- внеклеточный медьсодержащий фермент лизилоксидаза осуществляет окислительное дезаминирование ε-аминогрупп в некоторых остатках лизина и гидроксилизина с образованием реактивных альдегидов (аллизина и гидроксиаллизина). Для этих реакций необходимо присутствие витаминов РР и B_6 (рис. 15-4).
- образовавшиеся реактивные альдегиды участвуют в формировании ковалентных связей между собой, а также с другими остатками лизина или гидроксилизина соседних молекул тропоколлагена, и в результате возникают поперечные «Лиз-Лиз-сшивки», стабилизирующие фибриллы коллагена (рис. 15-5).

Количество поперечных связей в фибриллах коллагена зависит от функции и возраста ткани. Например, между молекулами коллагена

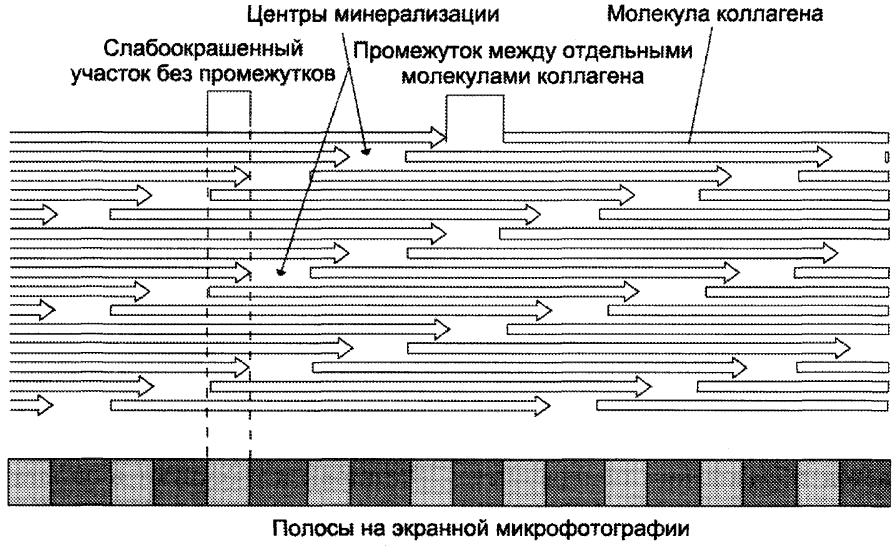


Рис. 15-3. Схема ступенчатого расположения молекул коллагена в коллагеновой фибрилле.

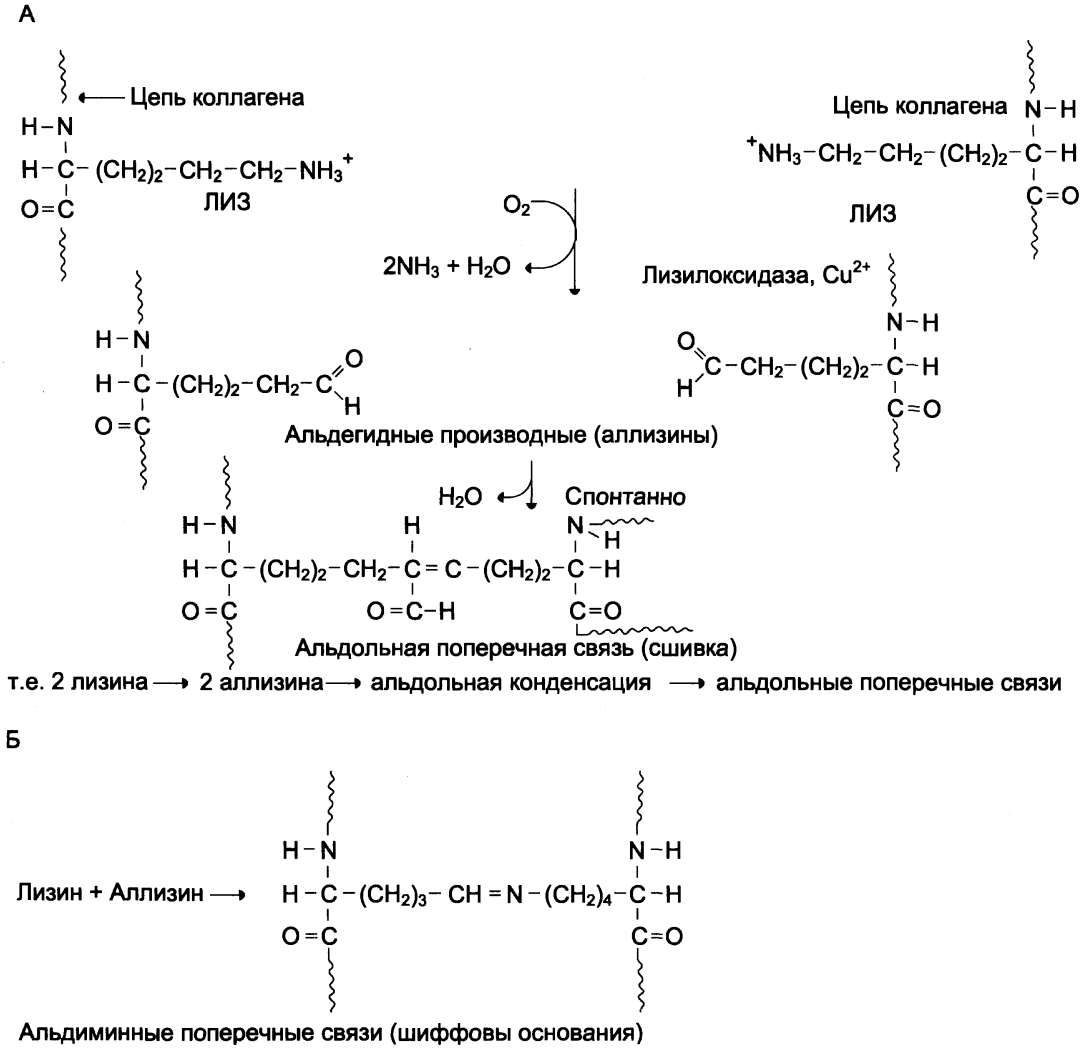


Рис. 15-4. Образование поперечных связей в коллагене. А — образование альдольной поперечной сшивки из двух боковых цепей лизина; Б — образование шиффовых оснований из боковых цепей лизина и аллизина.

ахиллова сухожилия сшивок особенно много, так как для этой структуры важна большая прочность. С возрастом количество поперечных связей в фибриллах коллагена возрастает, что приводит к замедлению скорости его обмена у пожилых и старых людей.

При снижении активности лизилоксидазы, а также при недостатке меди или витаминов PP или B_6 нарушается образование поперечных сшивок и, как следствие, снижаются прочность и упругость коллагеновых волокон. Такие структуры, как кожа, сухожилия, кровеносные сосуды, становятся хрупкими, легко разрываются. Подробнее эти вопросы рассматриваются ниже в подразделе, посвящённом эластину.

Коллагены, ассоциированные с фибриллами

Этот класс объединяет коллагены, которые выполняют очень важную функцию: они ограничивают размер фибрилл, образуемых интерстициальными коллагенами (прежде всего, I и II типов), и участвуют в организации межклеточного матрикса в костях, коже, хрящах, сухожилиях. К этим коллагенам относят коллагены IX, XII, XIV и XVI типов. Коллагены этого класса сами фибрилл не формируют, но не-

посредственно связаны с фибриллами, которые образуют интерстициальные коллагены. Функционирование таких типов коллагенов можно рассмотреть на примере коллагена IX типа, который в хряще связан с фибриллами коллагена II типа, он присоединяется к ним антипараллельно с периодичностью ~67 нм (рис. 15-6).

Коллаген IX типа состоит из трёх коллагеновых (фибриллярных) доменов ($Кол_1 \rightarrow Кол_3$) и четырёх неколлагеновых (глобулярных) доменов ($НК_1 \rightarrow НК_4$) (нумерация с С-конца) (рис. 15-7).

Коллаген IX типа связан с фибриллами коллагена II типа поперечными «Лиз-Лиз-мостиками» в области доменов $Кол_1$ и $Кол_2$, а также и $НК_1$, $НК_2$ и $НК_3$.

$НК_4$-домен не связан с фибриллами коллагена II типа; к его особенностям относят наличие большого количества положительно заряженных групп, поэтому к нему могут присоединяться отрицательно заряженные гликозаминогликаны, например, гиалуроновая кислота и хондроитинсульфат. Эти особенности обеспечивают участие коллагена IX типа в организации межклеточного матрикса в хряще.

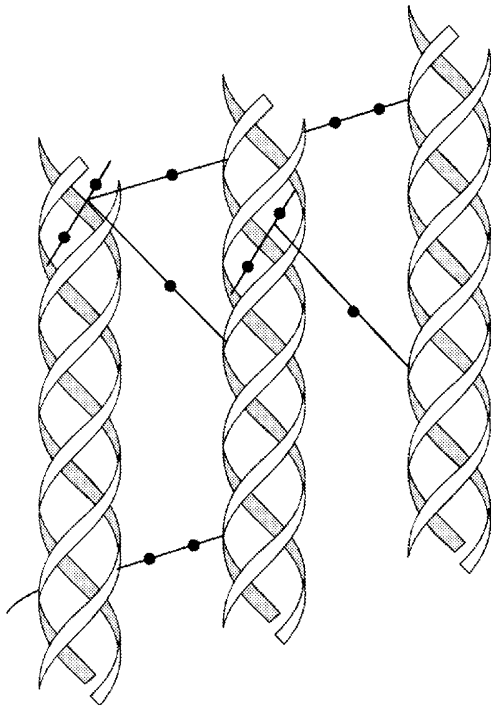


Рис. 15-5. Внутри- и межмолекулярные поперечные связи в коллагене.

Коллагены, образующие сетеподобные структуры

К этому классу относят коллагены IV, VIII, X типов. Особенности строения и функционирования таких белков можно рассмотреть на примере наиболее изученных к настоящему времени коллагенов IV и VIII типов.

Коллаген IV типа является ключевым структурным компонентом базальных мембран, кото-

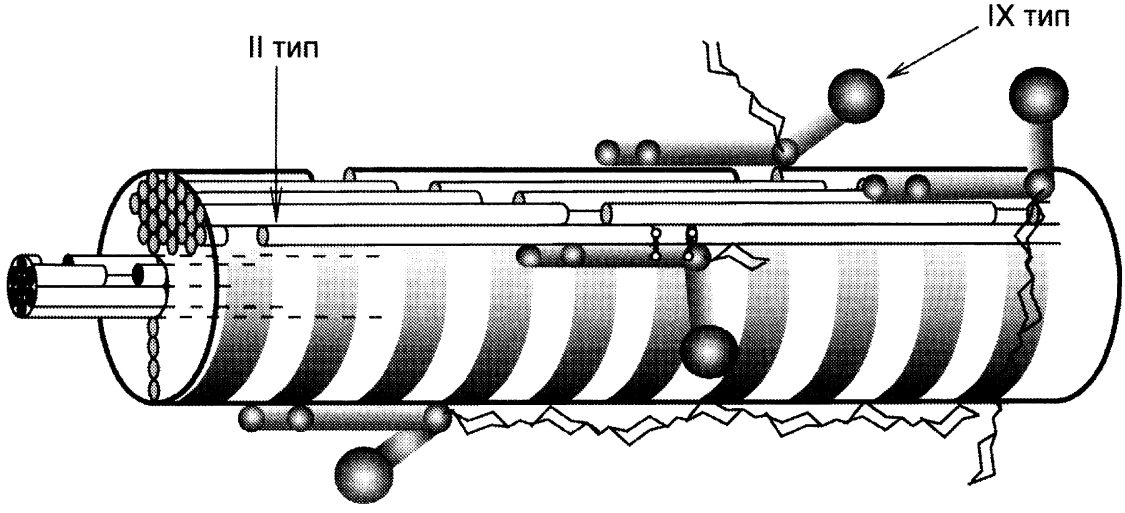


Рис. 15-6. Структура коллагеновых фибрилл II типа и ассоциированного с ним коллагена IX типа.

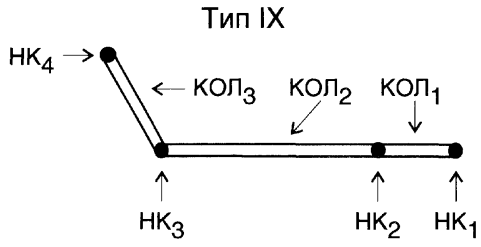


Рис. 15-7. Модель структуры коллагена IX типа. $КОЛ_1$–$КОЛ_3$ — коллагеновые домены; $НК_1$–$НК_4$ — неколлагеновые структуры.

рые представляют собой особую форму межклеточного матрикса. Его секретируют различные типы клеток: эпителиальные, эндотелиальные, мышечные, нервные, жировые. Особенностью коллагена IV типа является то, что повторяющиеся спирализованные участки с последовательностью $(Гли\text{-}х\text{-}у)_n$ часто прерываются короткими неспиральными сегментами. Это, вероятно, увеличивает гибкость коллагена IV типа и способствует образованию на его основе сетчатых структур (рис. 15-8).

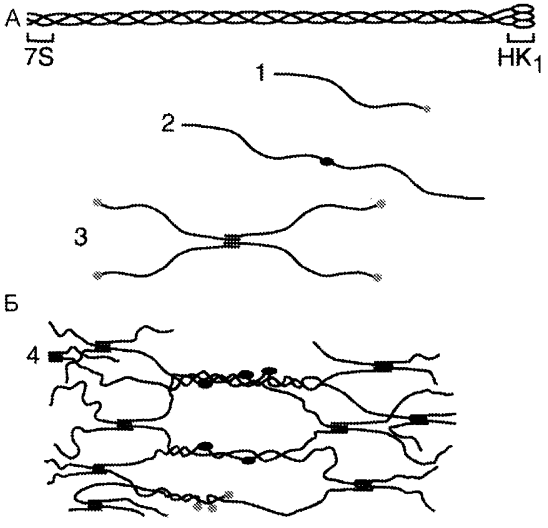


Рис. 15-8. Организация коллагена IV типа. А. Тройная спираль мономера коллагена: 7S — N-конец; $НК_1$ — С-конец. Б. Полимеризация коллагена IV типа: 1 — мономер; 2 — димеры, образованные соединением мономеров в области $НК_1$-доменов; 3 — тетрамеры, образованные соединением мономеров в области 7S-сегментов в параллельном и антипараллельном направлениях; 4 — образование сетчатой структуры из олигомерных форм коллагена IV типа.

Молекулы этого коллагена не могут ассоциироваться латерально с образованием фибрилл, так как N- и С-концевые пропептиды у него не отщепляются. Но именно эти фрагменты участвуют в образовании олигомерных форм коллагена, так как они имеют ряд потенциальных мест связывания (остатки цистеина и лизина). Дисульфидные мостики и поперечные лизиновые связи стабилизируют образующиеся олигомеры. Кроме этого, возможны латеральные взаимодействия спирализованных участков разных молекул с образованием суперспиралей. В базальной мембране из этих компонентов формируется сетчатая структура с гексагональными ячейками размером 170 нм.

Коллагены VIII и X типов относят к так называемым короткоцепочечным коллагенам. Каждая их молекула состоит из короткого коллагенового домена, который составляет ~1/2 длины интерстициальных коллагенов, и неколлагеновых фрагментов на N- и С-концах.

Коллаген VIII типа — главный компонент десцеметовых мембран эндотелия роговицы. Молекулы этого коллагена собираются антипараллельно с образованием тетрамеров, из которых образуются гексагональные решётки, обеспечивающие прозрачность роговицы (рис. 15-9).

Кроме роговицы, коллаген VIII типа присутствует во многих других тканях, но ещё одна его преимущественная локализация — кровеносные сосуды, в которых он в основном находится в матриксе под эндотелиальными клетками. Образует ли этот коллаген и здесь гексагональные решётки, неизвестно. Возможно, что в сосудах коллаген VIII типа образует сетевидные структуры, подобные тем, которые формирует коллаген IV типа в базальных мембранах.

Коллагены, образующие микрофибриллы

К этому классу относят коллаген VI типа, который является короткоцепочечным белком. Он образует микрофибриллы, которые располагаются между крупными фибриллами интерстициальных коллагенов. Этот коллаген широко представлен в хрящевом матриксе, но больше всего его содержится в межпозвоночных дисках: в *nucleus pulposus* он составляет ~20% общего коллагена. Две молекулы этого коллагена соединяются антипараллельно с образованием димера. Из димеров образуются тетрамеры, которые секретируются из клетки, и вне клетки

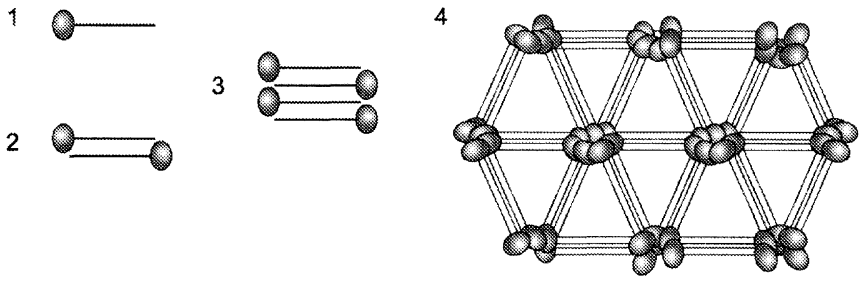


Рис. 15-9. Возможный механизм образования гексагональных решёток молекулами коллагена VIII типа. 1 — мономер; 2 — димер; 3 — тетрамер; 4 — гексагональные решётки.

связываются «конец в конец» с образованием микрофибрилл (рис. 15-10).

Функции коллагена VI типа пока полностью не ясны, хотя известно, что его микрофибриллы могут связываться со многими компонентами межклеточного матрикса: фибриллами интерстициальных коллагенов, гиалуроновой кислотой, протеогликанами. Молекула этого коллагена содержит многочисленные последовательности Арг-Гли-Асп (RGD), поэтому возможно его участие в клеточной адгезии через присоединение к мембранным адгезивным молекулам, например интегринам $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_1$.

Коллагены, образующие «заякоренные» фибриллы

К этому классу относят коллагены VII и XVII типов, которые называют также коллагенами, связанными с эпителием, так как они обычно находятся в местах соединения эпителия с субэпителиальными слоями.

Коллаген VII типа — основной структурный компонент «заякоренных» фибрилл. Каждая молекула этого белка содержит два неколлагеновых домена ($НК_1$ — у С-конца, $НК_2$ — у N-конца) и один коллагеновый домен между ними. Из мономеров образуются димеры, при этом молекулы соединяются в области $НК_2$-доменов антипараллельно по отношению друг к другу. Затем $НК_2$-домены отщепляются, и димеры соединяются между собой «бок о бок» с образованием фибрилл (рис. 15-11).

Эти фибриллы играют важную роль в присоединении эпидермиса к дерме, так как одним концом они могут присоединяться к *lamina densa*, на которой лежит кожный эпителий, а другой их конец проникает в более глубокие субэпидермальные слои кожи и связывается там со структурами, называемыми «якорные диски».

Коллаген XVII типа представляет собой трансмембранный белок и обычно находится в гемидесмосомах эпидермиса. Предполагают, что этот коллаген взаимодействует с другими молекулами гемидесмосом и таким образом участвует в процессе присоединения эпидермиса к дерме.

B. Катаболизм коллагена

Как и любой белок, коллаген функционирует в организме определённое время. Его относят к медленно обменивающимся белкам; $T_{1/2}$ составляет недели или месяцы. Разрушение коллагеновых волокон осуществляется активными формами кислорода и/или ферментативно (гидролитически).

Коллагеназы, особенности их функционирования

Нативный коллаген не гидролизуется обычными пептидгидролазами. Основной фермент

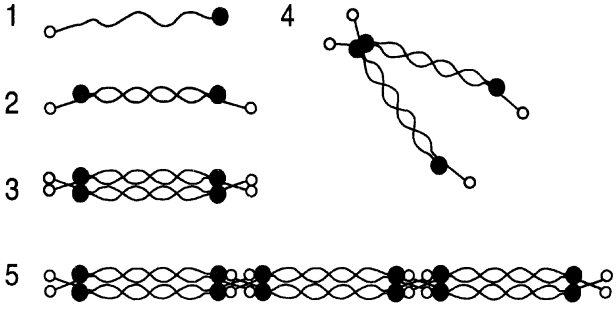


Рис. 15-10. Организация коллагена VI типа. 1 — мономер; 2 — димер; 3 — тетрамер, соединённый полностью; 4 — тетрамер, соединённый частично; 5 — микрофибриллы, соединённые «конец в конец».

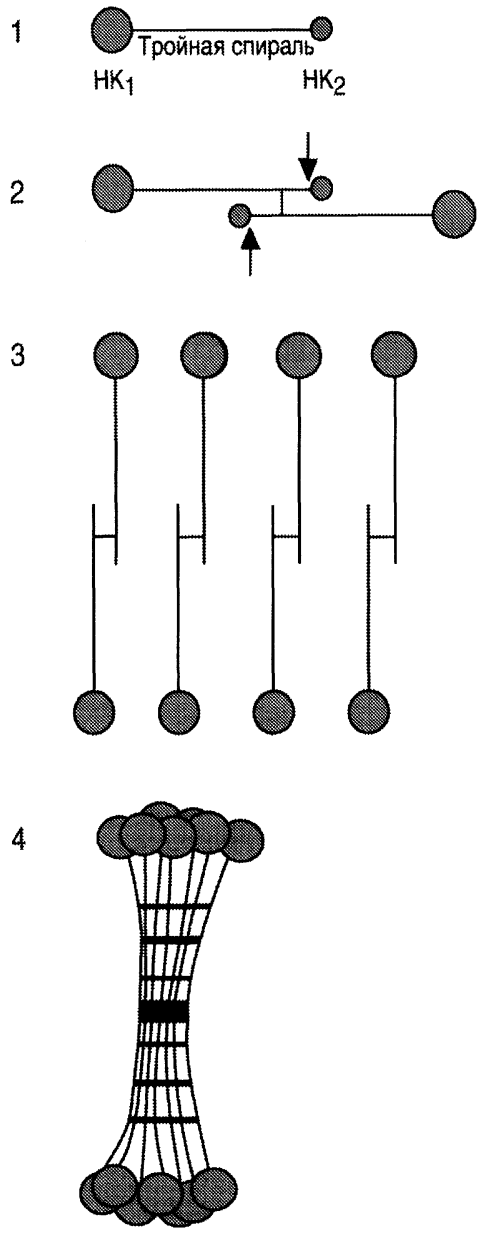


Рис. 15-11. Организация коллагена VII типа. 1 — мономер коллагена VII типа, $НК_1$ и $НК_2$ — неколлагеновые домены у С- и N-конца; 2 — димер коллагена VII типа, молекулы собраны антипараллельно с перекрытиями на N-конце; 3 — димеры коллагена VII типа после удаления $НК_2$-доменов; 4 — фибрилла, образованная димерами коллагена VII типа, соединёнными «бок о бок».

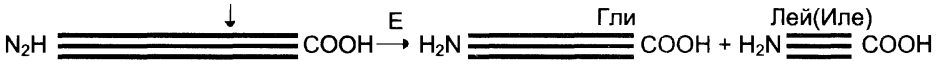
его катаболизма — коллагеназа, которая расщепляет пептидные связи в определённых участках спирализованных областей коллагена. Известны 2 типа коллагеназ.

Тканевая коллагеназа присутствует у человека в различных органах и тканях. В норме она синтезируется клетками соединительной ткани, прежде всего, фибробластами и макрофагами. Тканевая коллагеназа — металлозависимый фермент, который содержит Zn^{2+} в активном центре. В настоящее время известно 4 изоформы этого фермента. Активность коллагеназы зависит от соотношения в межклеточном матриксе её активаторов и ингибиторов. Среди активаторов особую роль играют плазмин, калликреин и катепсин В (см. раздел 14). Тканевая коллагеназа обладает высокой специфичностью, она перерезает тройную спираль коллагена в определённом месте, примерно на 1/4 расстояния от С-конца, между остатками глицина и лейцина (или изолейцина) (см. схему ниже).

Образующиеся фрагменты коллагена растворимы в воде, при температуре тела они спонтанно денатурируются и становятся доступными для действия других протеолитических ферментов. Нарушение катаболизма коллагена ведёт к фиброзу органов и тканей (в основном печени и лёгких). А усиление распада коллагена происходит при аутоиммунных заболеваниях (ревматоидном артрите и системной красной волчанке) в результате избыточного синтеза коллагеназы при иммунном ответе.

Бактериальная коллагеназа синтезируется некоторыми микроорганизмами. Например, *Clostridium histolyticum* (возбудитель газовой гангрены) выделяет коллагеназу, расщепляющую пептидную цепь коллагена более чем в 200 местах. Этот фермент гидролизует следующую связь —Х—Гли—Про—У— между звеньями Х и Гли.

Таким образом разрушаются соединительнотканные барьеры в организме человека, что обеспечивает проникновение (или инвазию) этого микроорганизма и способствует возникновению и развитию газовой гангрены. Сам возбудитель не содержит коллагена и поэтому не подвержен действию коллагеназы.



Схема

Применение коллагеназ в медицине

Коллагеназа используется в медицинской практике для лечения ожоговой болезни в хирургии и для лечения гнойных заболеваний глаз в офтальмологии.

Определение гидроксипролина в физиологических жидкостях человека как показатель скорости распада коллагена

В результате распада коллагена в крови и моче появляется свободный гидроксипролин. Большая часть этой аминокислоты катаболизируется под действием фермента гидроксипролиноксидазы, а часть её выводится с мочой, и поэтому гидроксипролин является маркёрной аминокислотой, по которой судят о скорости распада коллагена.

При некоторых заболеваниях, связанных с поражением соединительной ткани, экскреция гидроксипролина увеличивается вследствие ускоренного распада коллагена. Это наблюдается при болезни Педжета, гиперпаратиреозе, коллагенозах, некоторых инфекционных заболеваниях. При нарушении катаболизма гидроксипролина, причиной которого обычно выступает дефект фермента гидроксипролиноксидазы, выделение гидроксипролина может превышать 1 г/сут.

Особенности обмена коллагена

У молодых людей обмен коллагена протекает интенсивно, с возрастом (и особенно в старости) заметно снижается, так как у пожилых и старых людей увеличивается количество поперечных сшивок, что затрудняет доступность коллагена для действия коллагеназы. Поэтому, если у молодых людей в возрасте 10–20 лет содержание гидроксипролина в моче может достигать 200 мг/сут, то с возрастом экскреция гидроксипролина снижается до 15–20 мг/сут.

В некоторых ситуациях синтез коллагена заметно увеличивается. Например, фибробласты мигрируют в заживающую рану и начинают активно синтезировать в этой области основные компоненты межклеточного матрикса. Результат этих процессов — образование на месте раны соединительнотканного рубца, содержащего большое количество хаотично расположенных фибрилл коллагена. Сходным образом происходит замещение погибающих клеток соединительной тканью в печени при циррозе, в стенках артерий при атеросклерозе, в мышцах при их дистрофии.

Г. Регуляция обмена коллагена

Синтез коллагена регулируется разными способами. Прежде всего, сам коллаген и N-пропептиды после своего отщепления тормозят трансляцию коллагена по принципу отрицательной обратной связи. Аскорбиновая кислота стимулирует синтез коллагена и протеогликанов, а также пролиферацию фибробластов.

Особую роль в регуляции синтеза коллагена играют гормоны. Глюкокортикоиды тормозят синтез коллагена, во-первых, путём снижения уровня мРНК проколлагена, а во-вторых — ингибированием активности ферментов пролил- и лизилгидроксилазы. Недостаточное гидроксилирование остатков пролина и лизина повышает чувствительность коллагена к действию коллагеназы и неспецифических протеаз. Макроскопически угнетающее действие глюкокортикоидов на синтез коллагена проявляется уменьшением толщины дермы, а также атрофией кожи в местах продолжительного парентерального введения этих гормонов.

На синтез коллагена влияют также половые гормоны, рецепторы к которым обнаружены не только в строме половых органов, но и в фибробластах других органов и тканей. Обмен коллагена в матке находится под контролем половых гормонов. Синтез коллагена кожи зависит от содержания эстрогенов, что подтверждает тот факт, что у женщин в менопаузе снижается содержание коллагена в дерме.

Д. Заболевания, связанные с нарушением синтеза и созревания коллагена

Существует ряд заболеваний, связанных с нарушением структуры или синтеза коллагена. Основная причина — мутации в генах коллагена, которые широко представлены в разных хромосомах. Они очень большие, имеют много коротких экзонов, между которыми располагаются большие интроны.

Так как около 50% всех коллагеновых белков содержится в тканях скелета, около 40% — в коже и 10% — в строме внутренних органов,

клиническая картина заболеваний, вызванных дефектами синтеза и созревания коллагена, будет крайне полиморфной. При многих заболеваниях наблюдают не только костно-суставную патологию или изменения со стороны кожи, но и ярко выраженные висцеральные проявления (поражения кишечника, почек, лёгких, сердца, сосудов).

К настоящему времени описано много наследственных заболеваний, причинами которых являются дефекты коллагенов разных типов (см. ниже табл. 15-3).

II. ЭЛАСТИН

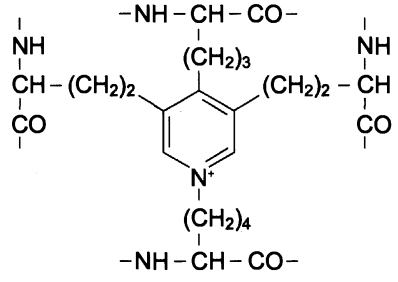
Эластин — основной белок эластических волокон, которые в больших количествах содержатся в межклеточном веществе таких тканей, как кожа, стенки кровеносных сосудов, связки, лёгкие. Эти ткани обладают очень важными свойствами: они могут растягиваться в несколько раз по сравнению с исходной длиной, сохраняя при этом высокую прочность на разрыв, и возвращаться в первоначальное состояние после снятия нагрузки. Резиноподобные свойства названных тканей обеспечиваются особенностями состава и строения эластина — гликопротеина с молекулярной массой 70 кД.

А. Структура эластина

1. Аминокислотный состав и особенности конформации эластина описаны в 1-м разделе учебника.

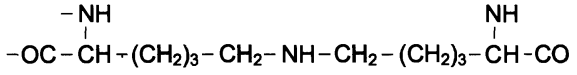
Значение десмозина и лизиннорлейцина

В межклеточном пространстве молекулы эластина образуют волокна и слои, в которых отдельные пептидные цепи связаны множеством жёстких поперечных сшивок в разветвлённую сеть. В образовании этих сшивок участвуют остатки лизина двух, трёх или четырёх пептидных цепей. Структуры, образующиеся при этом, называются десмозинами (десмозин или изодесмозин). Предполагают, что эти гетероциклические соединения формируются следующим образом: вначале 3 остатка лизина окисляются до соответствующих ε-альдегидов, а затем происходит их соединение с четвёртым остатком лизина с образованием замещённого пиридинового кольца. Окисление остатков лизина в ε-альдегиды осуществляется медьзависимой лизилоксидазой, активность которой зависит также от наличия пиридоксина (см. подразд. I, Б).



Десмозин (образован четырьмя остатками лизина)

Кроме десмозинов, в образовании поперечных сшивок может участвовать лизиннорлейцин, который образуется двумя остатками лизина.



Лизиннорлейцин (образован двумя остатками лизина)

Наличие ковалентных сшивок между пептидными цепочками с неупорядоченной, случайной конформацией позволяет всей сети волокон эластина растягиваться и сжиматься в разных направлениях, придавая соответствующим тканям свойство эластичности (рис. 15-12).

Следует отметить, что эластин синтезируется как растворимый мономер, который называется «тропоэластин». После образования поперечных сшивок эластин приобретает свою конечную внеклеточную форму, которая характеризуется нерастворимостью, высокой стабильностью и очень низкой скоростью обмена.

Нарушения структуры эластина и их последствия

При снижении образования десмозинов (или их отсутствии) поперечные сшивки образуются в недостаточном количестве или не образуются вообще. Вследствие этого у эластических тканей снижается предел прочности на разрыв и появляются такие нарушения, как истончённость, вялость, растяжимость, т.е. утрачиваются их резиноподобные свойства. Клинически такие нарушения могут проявляться кардиовас-

Таблица 15-3. Заболевания, связанные с нарушением синтеза и созревания коллагена

Тип коллагена	Ген	Локализация коллагена в тканях	Заболевания	Причина	Клинические проявления
I	*COL1A1* *COL1A2*	Кости, кожа, связки, сухожилия, склера, роговица, строма внутренних органов	Несовершенный остеогенез	Мутации в генах (более 160), чаще всего делеции и замены. Самая неблагоприятная — замена глицина на другую аминокислоту, в результате чего в молекуле проколлагена появляется перелом или изгиб, и нормальная тройная спираль не образуется	Повышенная ломкость костей, аномалии зубов, треугольная форма лица, гиперподвижность суставов, голубые склеры
II	*COL2A1*	Хрящи, межпозвоночные диски, стекловидное тело	Болезнь Книста	Делеция в гене, которая приводит к синтезу укороченных цепей коллагена	Укорочение и деформации конечностей, тугоподвижность суставов, кифосколиоз, миопия высокой степени
			Синдром Стиклера и Вагнера	Образование терминирующего кодона, вследствие чего в стекловидном теле синтезируется половина молекулы коллагена	Прогрессирующая миопия, часто отслойка сетчатки; патология суставов по типу хронического остеоартрита
III	*COL3A1*	Кожа, сосуды, строма паренхиматозных органов, матка	Синдром Элерса–Данло–Русакова, IV тип	Мутации в гене (более 20) по типу делеций, вставок, замен. В результате этого синтезируется молекула коллагена с нарушением первичной структуры, которая отличается сниженной стабильностью. Фибриллы, которые образуют такие молекулы коллагена, тоньше нормальных и менее организованы	Спонтанные разрывы крупных сосудов, перфорации кишечника, разрывы беременной матки, спонтанный пневмоторакс
IV	*COL4A3–COL4A6*	Базальные мембраны (почки и лёгкие)	Синдром Альпорта	Мутации в генах, которые сопровождаются нарушением образования базальных мембран	Преимущественное поражение почек, проявляющееся гематурией и протеинурией; при некоторых формах одновременно развивается диффузный эзофагеальный лейомиоматоз (доброкачественная опухоль гладких мышц пищевода).
			Синдром Гудпасчера	Образование антител к молекулам коллагена IV типа	Гломерулонефрит, лёгочный гемосидероз

Продолжение таблицы 15-3.

VII	*COL7A1*	Кожа	Буллёзный эпидермолиз	Мутации в гене, приводящие к снижению общего количества «заякоренных» фибрилл в коже, а также синтез дефектных фибрилл	Эпидермис слабо связан с дермой, легко слущивается и образует пузыри (буллы), которые легко травмируются, и на их месте образуются эрозии

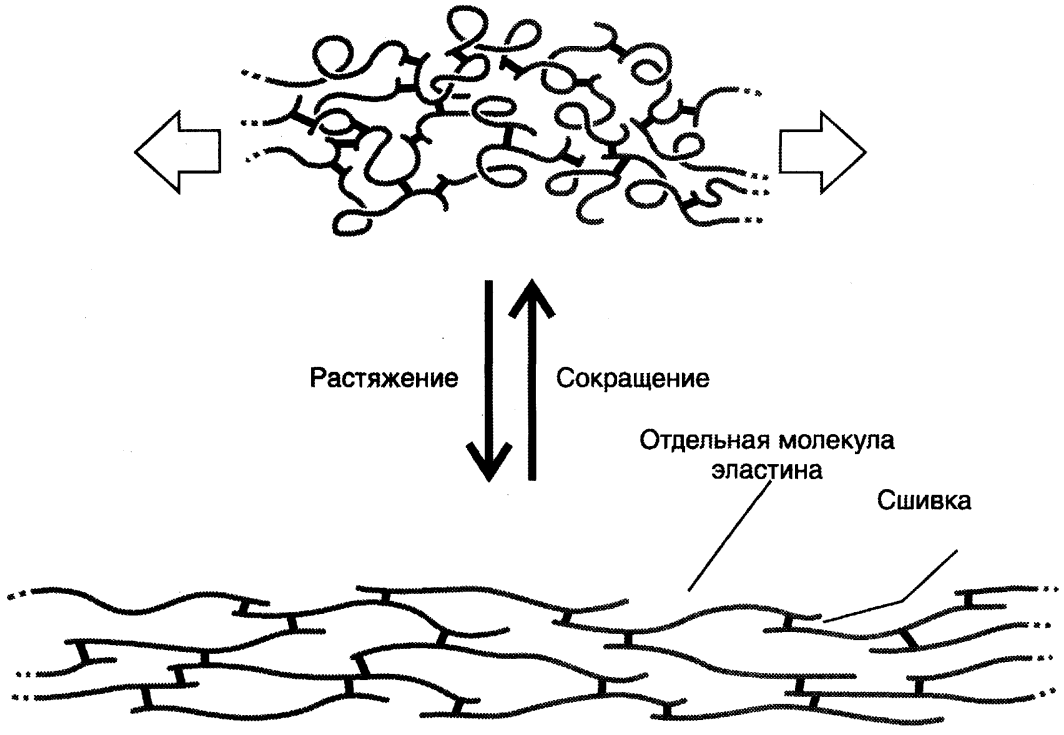


Рис. 15-12. Молекулы эластина связаны ковалентными сшивками в обширную сеть.

кулярными изменениями (аневризмы и разрывы аорты, дефекты клапанов сердца), частыми пневмониями и эмфиземой лёгких.

Причины нарушений структуры эластина

- снижение активности лизилоксидазы, вызванное дефицитом меди или пиридоксина;
- дефицит лизилоксидазы при наследственных заболеваниях;
- синдром Менкеса — нарушение всасывания меди.

Б. Катаболизм эластина

Переваривание эластина

Нативный эластин, содержащийся в пище, не гидролизуется трипсином и химотрипсином, но медленно расщепляется пепсином при pH 2,0. Эластаза поджелудочной железы гидролизует эластин после выраженного лаг-периода. Это эндопептидаза, которая преимущественно расщепляет связи, образованные карбоксильными группами алифатических аминокислот.

Разрушение эластина

Катаболизм эластина происходит при участии эластазы нейтрофилов. Это очень активная протеаза, которая выделяется во внеклеточное пространство нейтрофилами и разрушает эластин и другие структурные белки. Особое значение это имеет в лёгких. Поскольку лёгочная ткань не регенерирует, разрушение эластина в альвеолярных стенках ведёт к потере эластичных свойств, разрушению альвеол и развитию эмфиземы лёгких (растяжение лёгких воздухом или образовавшимся в тканях газом).

В норме этого не происходит, так как эластазу нейтрофилов и другие протеазы ингибирует белок, называемый α_1-антитрипсином (α_1-АТ). Основное количество α_1-АТ синтезируется печенью и находится в крови. В лёгких α_1-АТ синтезируется альвеолярными макрофагами, что и обеспечивает защиту альвеол от действия эластазы (рис. 15-13). При дефиците α_1-АТ, который может быть следствием различных мутаций в гене этого белка, повышается риск развития эмфиземы лёгких. В настоящее время это состояние поддаётся профилактике и лечению еженедельным внутривенным введением α_1-АТ.

III. ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ И ПРОТЕОГЛИКАНЫ

Гликозаминогликаны — линейные отрицательно заряженные гетерополисахариды. Раньше их называли мукополисахаридами, так как они обнаруживались в слизистых секретах (мукоза) и придавали этим секретам вязкие, смазочные свойства. Эти свойства обусловлены тем, что гликозаминогликаны могут связывать большие количества воды, в результате чего межклеточное вещество приобретает желеобразный характер.

Протеогликаны — высокомолекулярные соединения, состоящие из белка (5—10%) и гликозаминогликанов (90—95%). Они образуют основное вещество межклеточного матрикса соединительной ткани и могут составлять до 30% сухой массы ткани.

Белки в протеогликанах представлены одной полипептидной цепью разной молекулярной массы. Полисахаридные компоненты у разных протеогликанов разные. Протеогликаны отличаются от большой группы белков, которые называют **гликопротеинами**. Эти белки тоже содержат олигосахаридные цепи разной длины, ковалентно

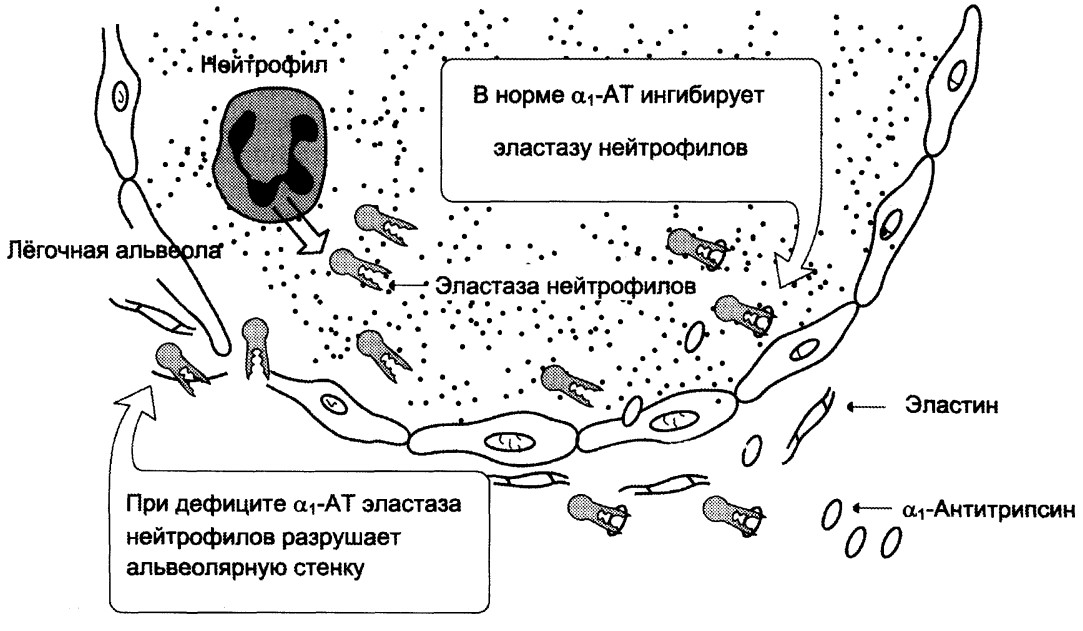


Рис. 15-13. Разрушение лёгочных альвеол эластазой нейтрофилов.

присоединённые к полипептидной основе. Углеводный компонент гликопротеинов гораздо меньше по массе, чем у протеогликанов, и составляет не более 40% от общей массы. Гликопротеины выполняют в организме человека разные функции и присутствуют во всех классах белков — ферментах, гормонах, транспортных, структурных белках и др. Представители гликопротеинов — коллаген и эластин, иммуноглобулины, ангиотензиноген, трансферрин, церулоплазмин, внутренний фактор Касла, тиреотропный гормон.

Гликозаминогликаны и протеогликаны, являясь обязательными компонентами межклеточного матрикса, играют важную роль в межклеточных взаимодействиях, формировании и поддержании формы клеток и органов, образовании каркаса при формировании тканей.

Благодаря особенностям своей структуры и физико-химическим свойствам, протеогликаны и гликозаминогликаны могут выполнять в организме человека следующие функции:

- они являются структурными компонентами межклеточного матрикса;
- протеогликаны и гликозаминогликаны специфически взаимодействуют с коллагеном, эластином, фибронектином, ламинином и другими белками межклеточного матрикса;
- все протеогликаны и гликозаминогликаны, являясь полианионами, могут присоединять, кроме воды, большие количества катионов (Na^+, K^+, Ca^{2+}) и таким образом участвовать в формировании тургора различных тканей;
- протеогликаны и гликозаминогликаны играют роль молекулярного сита в межклеточном матриксе, они препятствуют распространению патогенных микроорганизмов;
- гиалуроновая кислота и протеогликаны выполняют рессорную функцию в суставных хрящах;
- гепарансульфатсодержащие протеогликаны способствуют созданию фильтрационного барьера в почках;
- кератансульфаты и дерматансульфаты обеспечивают прозрачность роговицы;
- гепарин — антикоагулянт;
- гепарансульфаты — компоненты плазматических мембран клеток, где они могут функционировать как рецепторы и участвовать в клеточной адгезии и межклеточных взаимодействиях. Они также выступают компонентами синаптических и других пузырьков.

А. Строение и классы гликозаминогликанов

Гликозаминогликаны представляют собой длинные неразветвлённые цепи гетерополисахаридов. Они построены из повторяющихся дисахаридных единиц. Одним мономером этого дисахарида является гексуроновая кислота (D-глюкуроновая кислота или L-идуроновая), вторым мономером — производное аминосахара (глюкоз- или галактозамина). NH_2-группа аминосахаров обычно ацетилирована, что приводит к исчезновению присущего им положительного заряда. Кроме гиалуроновой кислоты, все гликозаминогликаны содержат сульфатные группы в виде О-эфиров или N-сульфата.

В настоящее время известна структура шести основных классов гликозаминогликанов, которые представлены в табл. 15-4.

Гиалуроновая кислота находится во многих органах и тканях. В хряще она связана с белком и участвует в образовании протеогликановых агрегатов, в некоторых органах (стекловидное тело глаза, пупочный канатик, суставная жидкость) встречается и в свободном виде. Предполагается, что в суставной жидкости гиалуроновая кислота выполняет роль смазочного вещества, уменьшая трение между суставными поверхностями.

Повторяющаяся дисахаридная единица в гиалуроновой кислоте имеет следующую структуру:

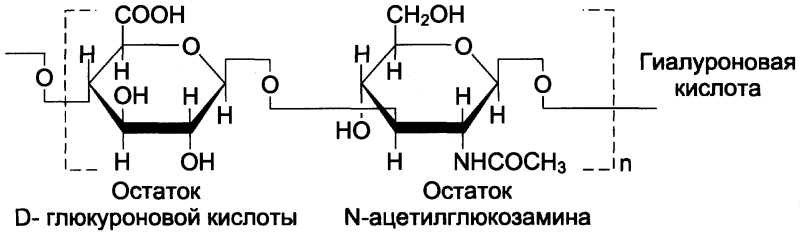


Таблица 15-4. Структура различных классов гликозаминогликанов

Класс гликозаминогликанов	Компоненты, входящие в состав дисахаридных единиц	Структура гликозаминогликанов
Гиалуроновая кислота	1. D-глюкуроновая кислота 2. N-ацетил-D-глюкозамин	D-глюкуроновая кислота (β1→3) N-ацетил-глюкозамин (β1→4) D-глюкуроновая кислота (β1→3) N-ацетилглюкозамин (β1→4)
Хондроитин-4-сульфат (хондроитинсульфат А)	1. D-глюкуроновая кислота 2. N-ацетил-D-галактозамин-4-сульфат	D-глюкуроновая кислота (β1→3) N-ацетил-галактозамин-4-сульфат (β1→4) D-глюкуроновая кислота (β1→3) N-ацетилгалактозамин-4-сульфат (β1→4)
Хондроитин-6-сульфат (хондроитинсульфат С)	1. D-глюкуроновая кислота 2. N-ацетил-D-галактозамин-6-сульфат	D-глюкуроновая кислота (β1→3) N-ацетилгалактозамин-6-сульфат (β1→4) D-глюкуроновая кислота (β1→3) N-ацетилгалактозамин-6-сульфат (β1→4)
Дерматансульфат[1]	1. L-идуроновая кислота 2. N-ацетил-D-галактозамин-4-сульфат	L-идуроновая кислота (β1→3) N-ацетилгалактозамин-4-сульфат (β1→4) L-идуроновая кислота (β1→3) N-ацетилгалактозамин-4-сульфат (β1→4)
Кератансульфат	1. D-галактоза 2. N-ацетил-D-галактозамин-6-сульфат	D-галактоза (β1→4) N-ацетилглюкозамин (β1→3) D-галактоза (β1→4) N-ацетилглюкозамин-6-сульфат (β1→3)
Гепарансульфат[2]	1. D-глюкуронат-2-сульфат 2. N-ацетил-D-галактозамин-6-сульфат	D-глюкуронат-2-сульфат (α1→4) N-ацетилглюкозамин-6-сульфат (α1→4) D-глюкуронат-2-сульфат (β1→4) N-ацетилглюкозамин-6-сульфат (α1→4)

[1] В состав дисахаридной единицы может входить D-глюкуроновая кислота.
[2] Может содержать N-сульфопроизводное глюкозамина вместо N-ацетилглюкозамина и различное количество идуроновой и глюкуроновой кислот.

Гиалуроновая кислота содержит несколько тысяч дисахаридных единиц, молекулярная масса её достигает 10^5–10^7 Д.

Хондроитинсульфаты — самые распространённые гликозаминогликаны в организме человека; они содержатся в хряще, коже, сухожилиях, связках, артериях, роговице глаза. Хондроитинсульфаты являются важным составным компонентом агрекана — основного протеогликана хрящевого матрикса. В организме человека встречаются 2 вида хондроитинсульфатов: хондроитин-4-сульфат и хондроитин-6-сульфат. Они построены одинаковым образом, отличие касается только положения сульфатной группы в молекуле N-ацетилгалактозамина (см. схему А).

Одна полисахаридная цепь хондроитинсульфата содержит около 40 повторяющихся дисахаридных единиц и имеет молекулярную массу 10^4–10^6 Д.

Кератансульфаты — наиболее гетерогенные гликозаминогликаны; отличаются друг от друга по суммарному содержанию углеводов и распределению в разных тканях. Кератансульфат I находится в роговице глаза и содержит кроме повторяющейся дисахаридной единицы L-фукозу, D-маннозу и сиаловую кислоту. Кератансульфат II был обнаружен в хрящевой ткани, костях, межпозвоночных дисках. В его состав помимо сахаров дисахаридной единицы входят N-ацетилгалактозамин, L-фукоза, D-манноза и сиаловая кислота. Кератансульфат II входит в состав агрекана и некоторых малых протеогликанов хрящевого матрикса. В отличие от других гликозаминогликанов, кератансульфаты вместо гексуроновой кислоты содержат остаток галактозы (см. схему Б).

Молекулярная масса одной цепи кератансульфата колеблется от 4×10^3 до 20×10^3 Д.

Дерматансульфат широко распространён в тканях животных, особенно он характерен для кожи, кровеносных сосудов, сердечных клапанов.

В составе малых протеогликанов (бигликана и декорина) дерматансульфат содержится в меж-

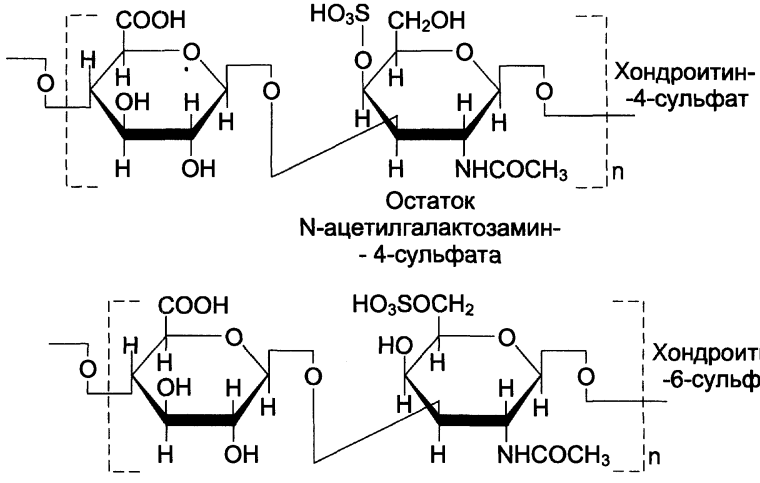


Схема А

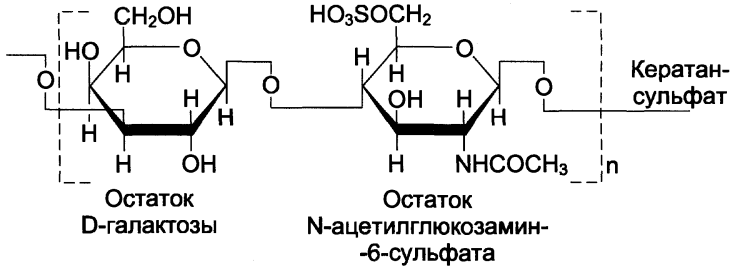


Схема Б

клеточном веществе хрящей, межпозвоночных дисков, менисков. Повторяющаяся дисахаридная единица дерматансульфата имеет следующую структуру (см. схему А).

Молекулярная масса одной цепи дерматансульфата колеблется от 15×10^3 до 40×10^3 Д.

Гепарин — важный компонент противосвёртывающей системы крови (его применяют как антикоагулянт при лечении тромбозов). Он синтезируется тучными клетками и находится в гранулах внутри этих клеток. Наибольшие количества гепарина обнаруживаются в лёгких, печени и коже. Дисахаридная единица гепарина похожа на дисахаридную единицу гепарансульфата. Отличие этих гликозаминогликанов заключается в том, что в гепарине больше N-сульфатных групп, а в гепарансульфате больше N-ацетильных групп. Молекулярная масса гепарина колеблется от 6×10^3 до 25×10^3 Д (см. схему Б).

Гепарансульфат находится во многих органах и тканях. Он входит в состав протеогликанов базальных мембран. Гепарансульфат является постоянным компонентом клеточной поверхности. Структура дисахаридной единицы гепарансульфата такая же, как у гепарина. Молекулярная масса цепи гепарансульфата колеблется от 5×10^3 до 12×10^3 Д.

Б. Синтез и разрушение гликозаминогликанов

Метаболизм гликозаминогликанов зависит от соотношения скорости их синтеза и распада.

Синтез гликозаминогликанов

Полисахаридные цепи гликозаминогликанов практически всегда связаны с белком, который называется ко́ровым, или сердцевинным. Присоединение полисахарида к белку осуществляется через связующую область, в состав которой чаще всего входит трисахарид галактоза-галактоза-ксилоза (рис. 15-14).

Олигосахариды связующей области присоединяются к ко́ровому белку ковалентными связями 3 типов:

1. O-гликозидной связью между серином и ксилозой;
2. O-гликозидной связью между серином или треонином и N-ацетилгалактозамином;
3. N-гликозиламиновой связью между амидным азотом аспарагина и N-ацетилглюкозамином.

Полисахаридные цепи гликозаминогликанов синтезируются путём последовательного присоединения моносахаридов. Донорами моносахаридов обычно являются соответствующие нук-

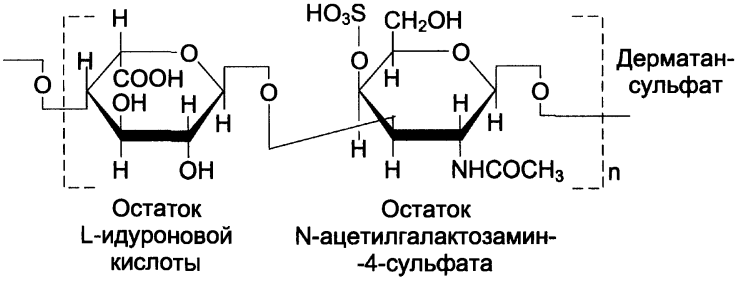


Схема А

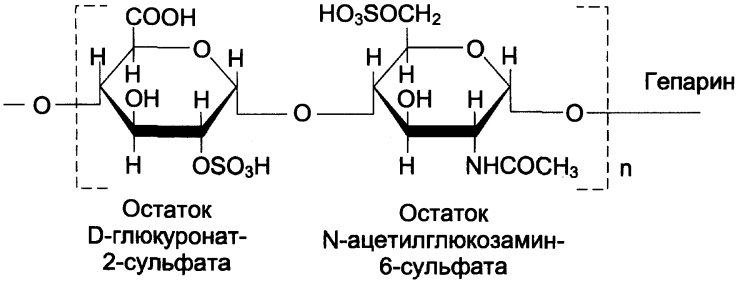


Схема Б

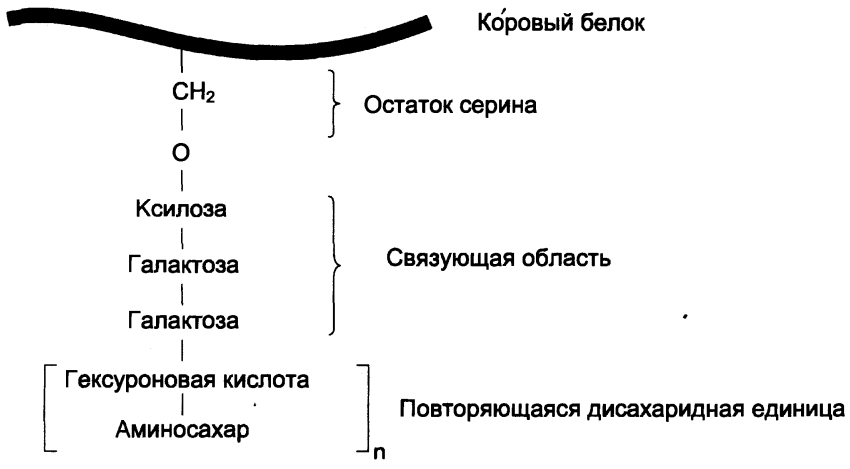


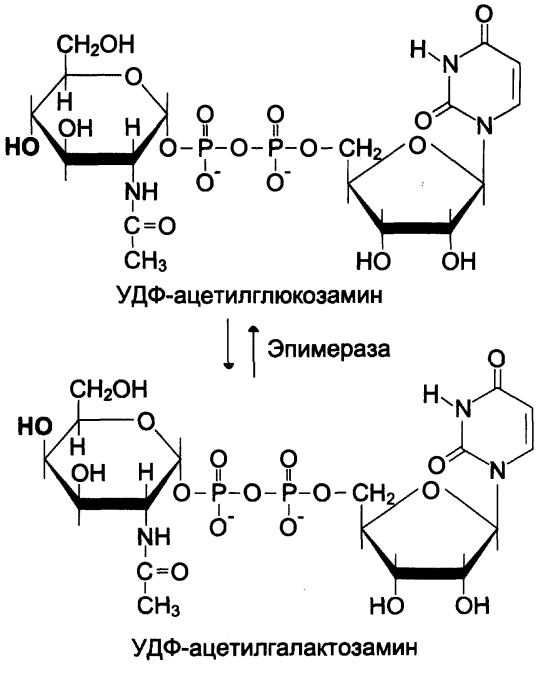
Рис. 15-14. Связующая область гликозаминогликанов.

леотид-сахара. Реакции синтеза гликозаминогликанов катализируют ферменты семейства трансфераз, обладающие абсолютной субстратной специфичностью. Эти трансферазы локализованы на мембранах аппарата Гольджи. Сюда по каналам ЭР поступает коровый белок, синтезированный на полирибосомах, к которому присоединяются моносахариды связующей области и затем наращивается вся полисахаридная цепь. Сульфатирование углеводной части происходит здесь с помощью сульфотрансферазы, донором сульфатной группы выступает ФАФС (см. раздел 12).

Аминосахара синтезируются из глюкозы; в соединительной ткани ~20% глюкозы используется таким образом. Непосредственным предшественником N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина и сиаловой кислоты является фруктозо-6-фосфат. Источником NH_2-группы в этих сахарах служит глутамин. Аминосахар далее ацетилируется с помощью ацетил-КоА. Активированными формами этих аминосахаров служат их УДФ-производные (схема, рис. 15-15).

Источниками глюкуроновой кислоты в организме человека могут быть пища, внутриклеточное лизосомальное разрушение гликозаминогликанов и синтез глюкуроновой кислоты. Активированная форма глюкуроновой кислоты (УДФ-глюкуронат) образуется при окислении УДФ-глюкозы (см. схему на с. 709).

L-идуроновая кислота образуется после включения D-глюкуроновой кислоты в углеводную цепь в результате реакции эпимеризации.



Схема

На синтез гликозаминогликанов влияют глюкокортикоиды: они тормозят синтез гиалуроновой кислоты и сульфатированных гликозаминогликанов. Показано также тормозящее действие половых гормонов на синтез сульфатированных гликозаминогликанов в органах-мишенях.

Разрушение гликозаминогликанов

Гликозаминогликаны отличаются высокой скоростью обмена: полупериод жизни ($T_{1/2}$) многих из них составляет от 3 до 10 дней (только для кератансульфата $T_{1/2}$ ≈120 дней). Разрушение полисахаридных цепей осуществляется экзо- и эндогликозидазами и сульфатазами, к которым относят гиалуронидазу, глюкуронидазу, галактозидазу, идуронидазу и др. Из внеклеточного пространства гликозаминогликаны поступают в клетку по механизму эндоцитоза и заключаются в эндоцитозные пузырьки, которые затем сливаются с лизосомами. Лизосомальные гидролазы обеспечивают постепенное полное расщепление гликозаминогликанов до мономеров.

Мукополисахаридозы — наследственные тяжёлые заболевания, проявляющиеся значительными нарушениями в умственном развитии детей, поражениями сосудов, помутнением роговицы, деформациями скелета, уменьшением продолжительности жизни. В основе мукополисахаридозов лежат наследственные дефекты каких-либо гидролаз, участвующих в катаболизме гликозаминогликанов. Эти заболевания характеризуются избыточным накоплением гликозаминогликанов в тканях, приводящим к деформации скелета и увеличению органов, содержащих большие количества внеклеточного матрикса. Обычно поражаются

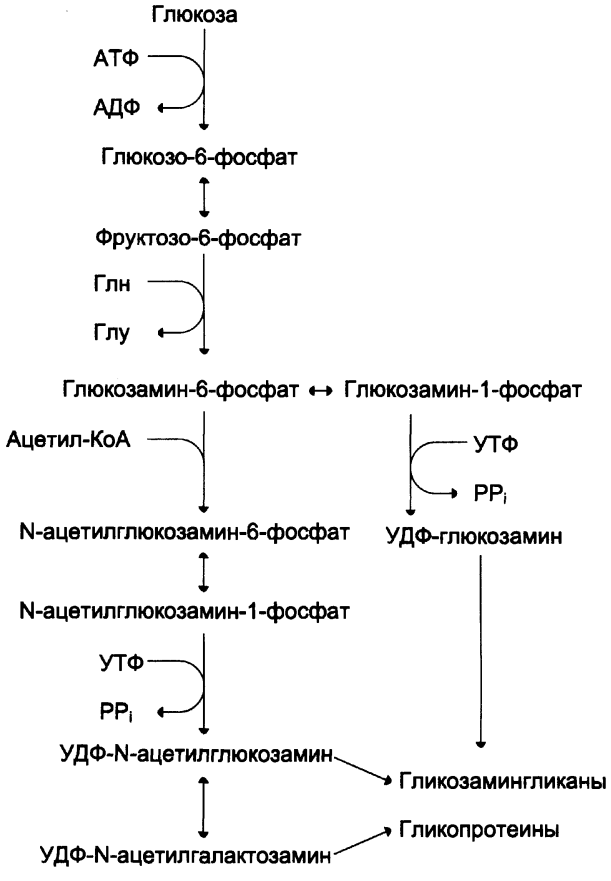
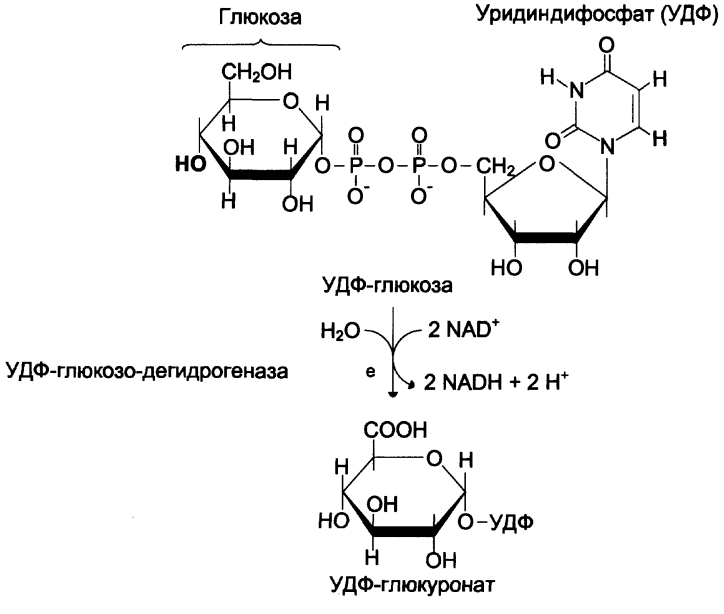


Рис. 15-15. Схема синтеза аминосахаров.



Схема

ткани, в которых в норме синтезируются наибольшие количества гликозаминогликанов. В лизосомах при этом накапливаются не полностью разрушенные гликозаминогликаны, а с мочой выделяются их олигосахаридные фрагменты. Известно несколько типов мукополисахаридозов, вызванных дефектами разных ферментов гидролиза гликозаминогликанов. Основные типы мукополисахаридозов приведены в табл. 15-5.

Для постановки диагноза конкретного заболевания обычно определяют активность лизосомальных гидролаз. Так как эти болезни в настоящее время не поддаются лечению, необходимо проводить пренатальную диагностику при подозрении на носительство дефектных генов.

В. Строение и виды протеогликанов

В межклеточном матриксе присутствуют разные протеогликаны. Среди них есть очень крупные — например агрекан и версикан. Кроме них, в межклеточном матриксе имеется целый набор так называемых малых протеогликанов, которые широко распространены в разных видах соединительной ткани и выполняют там самые разнообразные функции.

Основной протеогликан хрящевого матрикса называется **агрекан**, он составляет 10% по весу исходной ткани и 25% сухого веса хрящевого матрикса. Это очень большая молекула, в которой к одной полипептидной цепи присоединены до 100 цепей хондроитинсульфатов и около 30 цепей кератансульфатов. По форме молекула агрекана напоминает бутылочный «ёршик» (рис. 15-16).

В хрящевой ткани молекулы агрекана собираются в агрегаты с гиалуроновой кислотой и небольшим связывающим белком. Оба компонента присоединяются к агрекану нековалентными связями в области домена G_1. Домен G_1 взаимодействует примерно с пятью дисахаридными единицами гиалуроновой кислоты, далее этот комплекс стабилизируется связывающим белком; домен G_1 и связывающий белок вместе занимают 25 дисахаридных единиц гиалуроновой кислоты. Конечный агрегат с молекулярной массой более 200×10^6 Д состоит из одной молекулы гиалуроновой кислоты и ~100 молекул агрекана (и такого же количества связывающего белка). Координация сборки этих агрегатов является центральной функцией хондроцитов. Агрекан и связывающий белок продуцируются этими клетками в необходимых количествах. Эти компоненты могут взаимодействовать друг с другом внутри клетки, но процесс агрегации полностью завершается в межклеточном матриксе. Показано, что гиалуроновая кислота образуется на поверхности хондроцитов специфической синтетазой и «выталкивается» в межклеточное пространство, чтобы связаться с агреканом и связывающим белком. Созревание функционально активного тройного комплекса составляет около 24 ч.

Катаболизм агрекана изучен в настоящее время недостаточно. Имеются данные о наличии в хрящевом межклеточном матриксе фермента агреканазы. Местом действия этого фермента является интерглобулярная область между доменами G_1 и G_2. Кроме того, в зоне присоеди-

Таблица 15-5. Типы мукополисахаридозов

Название болезни	Продукты накопления	Дефектный фермент
Болезнь Хюрлер	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-ацетил-галактозамин-6-сульфатсульфатаза
Болезнь Марото–Лами	Дерматансульфат	Хондроитинсульфат — N-ацетил-галактозамин-4-сульфатсульфатаза
Болезнь Слая	Хондроитинсульфаты	β-глюкуронидаза

нения цепей хондроитинсульфата в коровом белке имеются ещё 3 места протеолитического расщепления агрекана. Конечный продукт расщепления агрекана представляет собой комплекс домена G_1, связывающего белка и гиалуроновой кислоты. Он поступает в хондроцит по механизму эндоцитоза и подвергается расщеплению лизосомальными гидроксилазами.

Малые протеогликаны

Малые протеогликаны — протеогликаны с низкой молекулярной массой. Они содержатся в хрящах, сухожилиях, связках, менисках, коже и других видах соединительной ткани.

Эти протеогликаны имеют небольшой ко́ровый белок, к которому присоединены одна или две цепи гликозаминогликанов. Наиболее изучены декорин, бигликан, фибромодулин, люмикан, перлекан.

Ко́ровые белки бигликана и декорина похожи по размерам и структуре (молекулярная масса 36 000 и 38 000 Д, соответственно). Они имеют несколько тандемных повторов, богатых лейцином, которые образуют α-спирали или β-структуры. На N- и C-концах этих белков имеются домены, содержащие S-S-связи. Ко́ровые белки значительно различаются по первичной структуре в N-концевых областях, что определяет различия в присоединении гликозаминогликанов. Бигликан содержит серин в положениях 5 и 11, что обеспечивает присоединение двух полисахаридных цепей. Декорин содержит один серин в положении 4, поэтому к нему присоединяется одна полисахаридная цепь. У этих протеогликанов полисахаридные цепи представлены дерматансульфатом с молекулярной массой ~30 000 Д (рис. 15-17).

Ко́ровый белок фибромодулина (молекулярная масса ~40 000 Д) тоже имеет области тандемных повторов, богатые лейцином, но его N-концевая область отличается тем, что не содержит серина, а имеет несколько сульфатированных остатков тирозина, поэтому одна или две цепи кератансульфата присоединяются к ко́ровому белку фибромодулина не в N-концевой, а в области, богатой лейцином, через NH_2-группу аспарагина.

Малые протеогликаны являются мультифункциональными макромолекулами. Они могут связываться с другими компонентами соединительной ткани и оказывать влияние на их строение

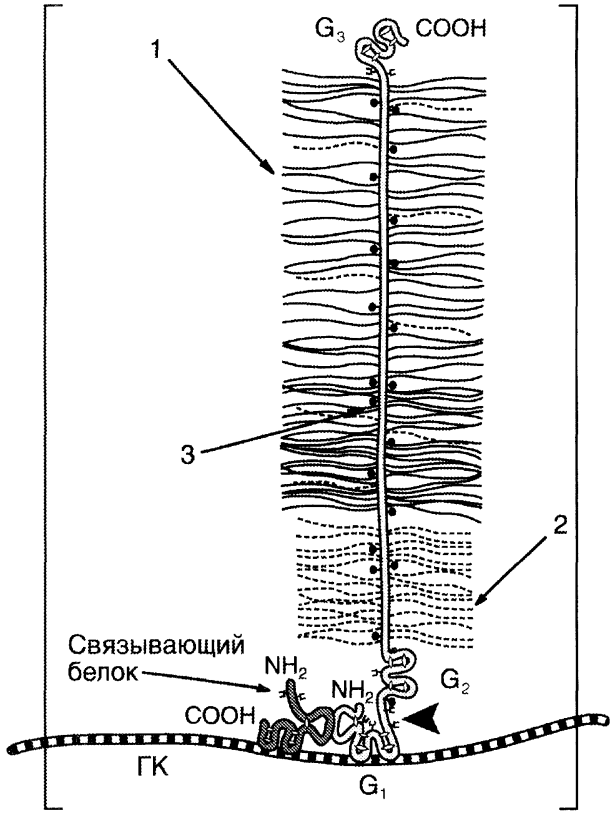


Рис. 15-16. Строение агрекана. ГК — гиалуроновая кислота; 1 — хондроитинсульфат; 2 — кератансульфат; 3 — сердцевинный белок. В центре молекулы находится сердцевинный белок (молекулярная масса ~220 кД), имеющий три глобулярных домена: G_1, G_2, G_3, выполняющих разные функции. N-концевой домен G_1 обеспечивает связывание агрекана с гиалуроновой кислотой и низкомолекулярным связывающим белком; функция домена G_2 пока неизвестна; C-концевой домен G_3 обеспечивает присоединение агрекана к другим молекулам межклеточного матрикса и, возможно, участвует в межклеточных взаимодействиях. Между доменами G_2 и G_3 находятся области, в которых к белку присоединяются кератансульфаты и хондроитинсульфаты. В этих областях в ко́ровом белке имеются пептидные участки, состоящие из 6 и 19 аминокислотных остатков, которые повторяются от 10 до 20 раз.

и функции. Например, декорин и фибромодулин присоединяются к фибриллам коллагена II типа и ограничивают их диаметр (т.е. препятствуют образованию толстых фибрилл). Декорин и бигликан, присоединяясь к фибронектину, подавляют клеточную адгезию, а присоединяясь к фактору роста опухолей β, снижают его митогенную активность. Кроме этого, имеется большое количество данных о том, что малые протеогликаны играют важную регуля-

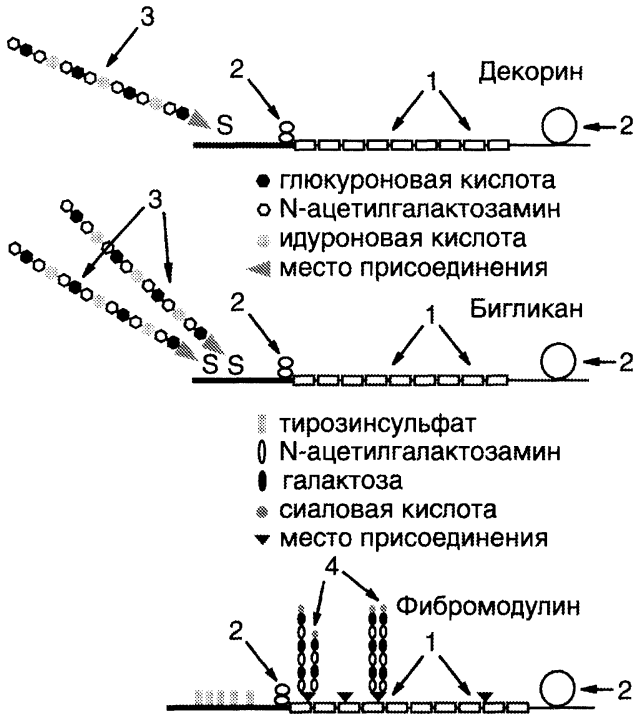


Рис. 15-17. Малые протеогликаны хряща. 1 — области повторяющихся аминокислотных последовательностей, богатых лейцином, образуют α-спирали или β-структуры; 2 — домены в N- и С-концевых областях сердцевинных белков, содержащие S-S-связи; 3 — цепи дерматансульфатов, которые присоединяются к ОН-группе серина (S) в N-концевой области; 4 — короткие цепи, которые присоединяются к белку в области повторов, богатых лейцином; это присоединение опосредовано олигосахаридами ▼, которые связываются с белком по NH_2-группе аспарагина.

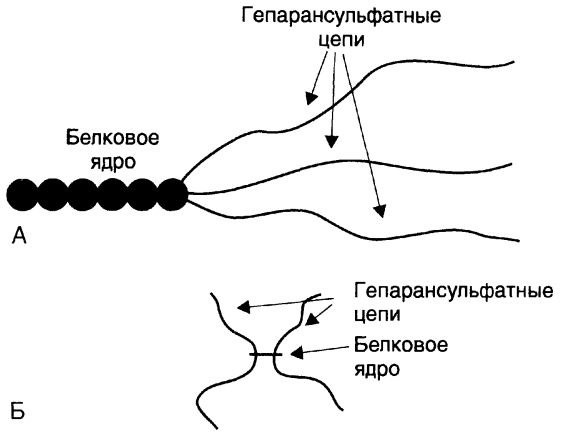


Рис. 15-18. Гепарансульфатсодержащие протеогликаны низкой (А) и высокой (Б) плотности. Гепарансульфатсодержащие протеогликаны высокой плотности имеют звёздообразную форму и состоят из четырёх коротких гепарансульфатных цепей, связанных с небольшим белковым ядром. Гепарансульфатсодержащие протеогликаны низкой плотности имеют большое многодоменное белковое ядро, представленное одной полипептидной цепью. К одному из полюсов ядра прикреплены три длинные гепарансульфатные цепи.

торную роль в процессах развития и восстановления соединительной ткани.

Протеогликаны базальных мембран

Протеогликаны базальных мембран отличаются значительной гетерогенностью. Это преимущественно гепарансульфатсодержащие протеогликаны (ГСПГ), представленные двумя разновидностями: высокой и низкой плотности (рис. 15-18).

IV. СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ БЕЛКИ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Белки межклеточного матрикса выполняют различные функции, но их можно разделить на две большие группы по одному весьма важному признаку: 1) белки, обладающие адгезивными свойствами; 2) белки, подавляющие адгезию клеток.

А. Адгезивные белки

К первой группе белков с выраженными адгезивными свойствами относят фибронектин, ламинин, нидоген, фибриллярные коллагены и коллаген IV типа; их относят к белкам «зрелой» соединительной ткани.

Фибронектин

Фибронектин — один из ключевых белков межклеточного матрикса, неколлагеновый структурный гликопротеин, синтезируемый и выделяемый в межклеточное пространство многими клетками. Он построен из двух идентичных полипептидных цепей, соединённых дисульфидными мостиками у своих С-концов (рис. 15-19).

Полипептидная цепь фибронектина содержит 7-8 доменов, на каждом из которых расположены специфические центры для связывания разных веществ. Фибронектин может связывать

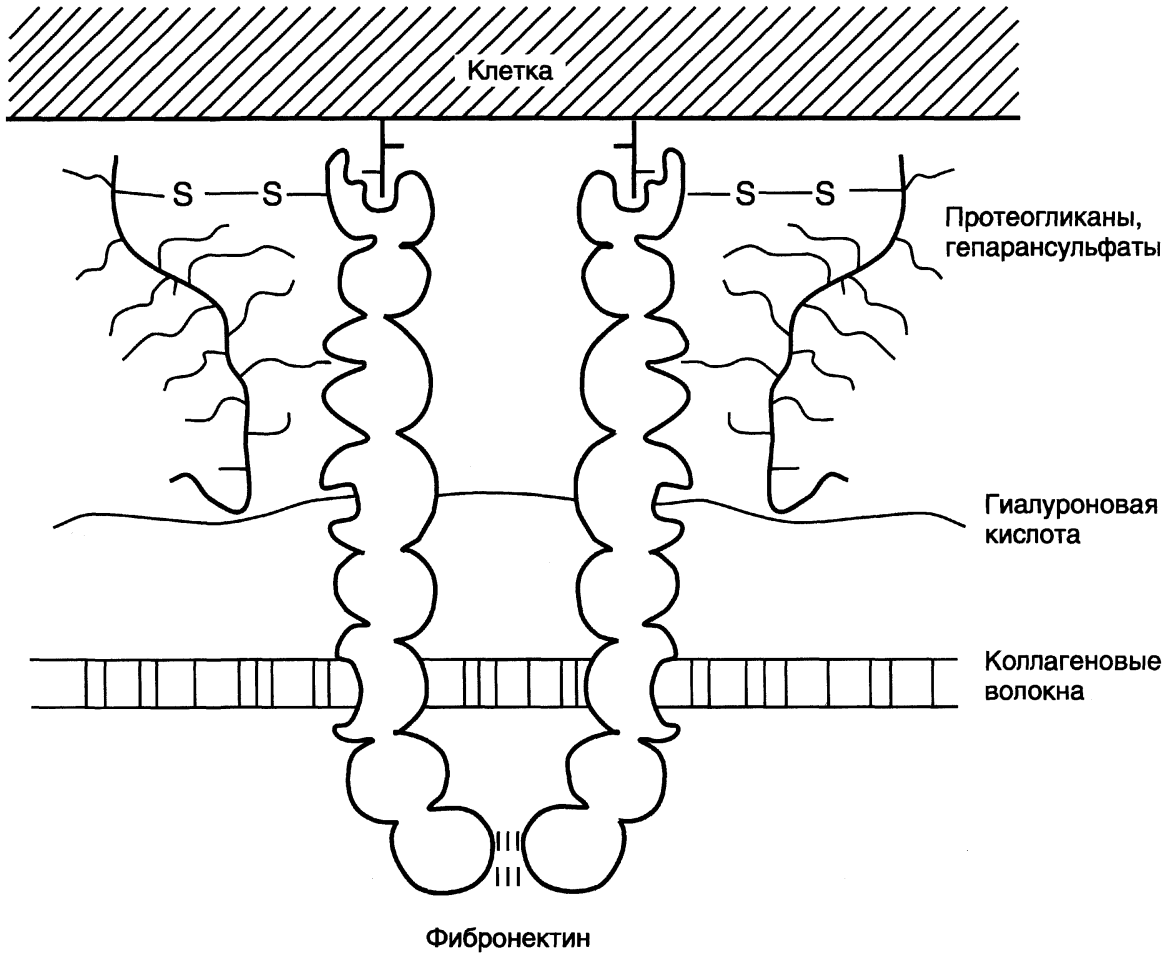


Рис. 15-19. Строение фибронектина.

коллаген, протеогликаны, гиалуроновую кислоту, углеводы плазматических мембран, гепарин, фермент трансглутаминазу. Благодаря своей структуре фибронектин может выполнять интегрирующую роль в организации межклеточного вещества, а также способствовать адгезии клеток.

Существует несколько форм фибронектина, которые синтезируются разными клетками. Растворимый, или плазменный, фибронектин синтезируется гепатоцитами. Нерастворимый, или тканевый фибронектин синтезируется в основном фибробластами или эндотелиоцитами, глиоцитами и эпителиальными клетками.

Обе формы фибронектина вовлекаются в разнообразные процессы: способствуют адгезии и распространению эпителиальных и мезенхимальных клеток, стимулируют пролиферацию и миграцию эмбриональных и опухолевых клеток, контролируют дифференцировку и поддержание цитоскелета клеток, активно участвуют в воспалительных и репаративных процессах. Это связано с тем, что каждая субъединица фибронектина содержит последовательность Арг-Гли-Асп (RGD), с помощью которой он может присоединяться к клеточным рецепторам (интегринам). Эти рецепторы опосредованно взаимодействуют с актиновыми микрофиламентами, которые находятся в цитозоле. В этом процессе участвуют так называемые белки прикрепления (от англ. *attach — прикреплять proteins*): талин, винкулин, α-актинин (рис. 15-20).

С помощью таких белок-белковых взаимодействий информация может передаваться из меж-

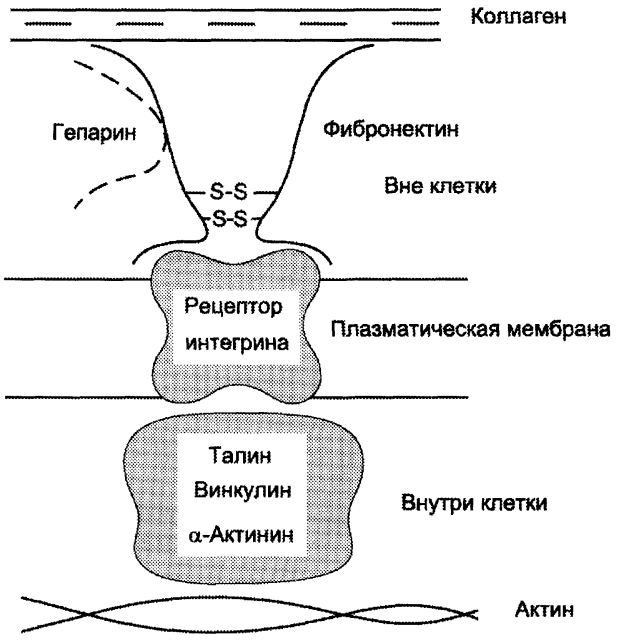


Рис. 15-20. Схема взаимодействия фибронектина с интегрином.

клеточного матрикса внутрь клетки, а также в обратном направлении — из клетки наружу, таким образом влияя на протекающие в клетке процессы.

Известно также, что фибронектин участвует в миграции клеток, которые могут присоединяться к его RGD-участкам, и, таким образом, фибронектин как бы помогает им перемещаться в межклеточном матриксе.

В межклеточном матриксе, окружающем трансформированные (или опухолевые) клетки, количество фибронектина заметно снижено, что может быть одной из причин появления метастазов.

Ламинин — наиболее распространённый неколлагеновый гликопротеин базальных мембран. Он состоит из трёх полипептидных цепей: A, B_1 и B_2. Молекула ламинина имеет крестообразную форму с тремя одноцепочечными ветвями и одной трёхцепочечной ветвью (рис. 15-21). Каждая цепь ламинина содержит несколько глобулярных и стержневидных доменов, на которых имеются специфические центры связывания для различных веществ. Ламинин взаимодействует со всеми структурными компонентами базальных мембран, включая коллаген IV типа, нидоген, фибронектин, ГСПГ. Кроме того, молекула ламинина имеет несколько центров связывания с клетками. Главные функции ламинина определяются его способностью связывать клетки и модулировать клеточное поведение. Он может влиять на рост, морфологию, дифференцировку и подвижность клеток.

Ламинин выполняет роль адгезивного белка для различных эпителиальных и мезенхимальных клеток.

Нидоген — сульфатированный гликопротеин базальных мембран, образует с ламинином плотный, нековалентно связанный комплекс; сила связывания нидогена с коллагеном IV типа гораздо меньше, чем с ламинином. Этот белок представлен одной полипептидной цепью, содержащей три глобулярных домена (рис. 15-21). Один из доменов нидогена имеет центр связывания ламинина, в области другого домена находится центр связывания коллагена IV типа. Таким образом, нидоген может выступать в качестве одного из связывающих мостов между различными компонентами межклеточного матрикса и участвовать в образовании тройных комплексов ламинин-нидоген-коллаген. Кроме этого, нидоген содержит RGD-последовательность и поэтому может присоединяться к клеточной поверхности.

Б. Антиадгезивные белки

Ко второй группе белков, обладающих антиадгезивными свойствами, относят такие гликопротеины, как **остеонектин, тенасцин и тромбоспондин**. Эти белки появляются и играют заметную роль в эмбриогенезе и морфогенезе, развитии клеточного ответа на повреждение. Их концентрация в матриксе повышается при некоторых опухолевых заболеваниях.

Остеонектин (синонимы: BM-40, SPARC, от англ. *secreted protein acidic and rich in cysteine*) состоит из 4 доменов, к 2 из которых могут присоединяться ионы Ca^{2+}. Остеонектин — кислый белок, богатый цистеином. Показано, что он может ингибировать G_1-S′-фазу роста эндотелиальных клеток.

Тенасцин (антиген мышечных сухожилий) — олигомерный гликопротеин, состоящий, подобно фибронектину, из 2 субъединиц, соединённых дисульфидной связью. Эту большую молекулу, похожую на осьминога, называют ещё «гексабрахион», так как она имеет 6 «рук», отходящих радиально от одного участка. Благода-

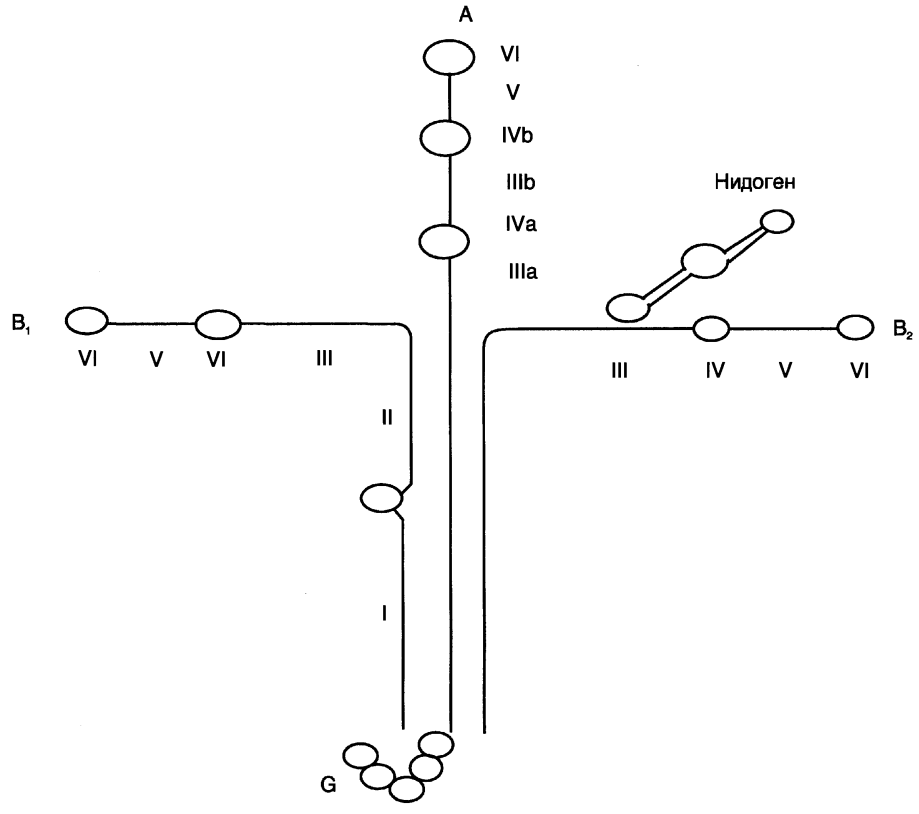


Рис. 15-21. Строение комплекса ламинин-нидоген.

ря такому строению, тенасцин может взаимодействовать с большим количеством лигандов, к которым относят различные молекулы межклеточного матрикса.

Тенасцин обладает как адгезивными, так и антиадгезивными свойствами, синтезируется в различных тканях эмбриона (наиболее интенсивно — в зонах эпителиально-мезинхимальных контактов и в развивающейся нервной ткани). В зрелых тканях небольшие количества тенасцина находятся в сухожилиях и хрящах, его синтез увеличивается в заживающих ранах.

Тромбоспондин, как и другие белки межклеточного матрикса, может взаимодействовать со многими лигандами: коллагеном, фибронектином, ламинином, протеогликанами, ионами Ca^{2+} и др. В клетках роговицы глаза и тромбоцитах тромбоспондин проявляет адгезивные свойства, а в клетках эндотелия и фибробластах он функционирует как антиадгезивный белок.

Таким образом, функции этих белков определяются их локализацией и окружением.

V. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Как уже говорилось, межклеточный матрикс представляет собой супрамолекулярный комплекс, образованный сложной сетью связанных между собой макромолекул. В организме человека межклеточный матрикс формирует такие высокоспециализированные структуры, как хрящ, сухожилия, базальные мембраны, а также (при вторичном отложении фосфата кальция) кости и зубы.

Эти структуры различаются между собой как по молекулярному составу, так и по способам организации основных компонентов (белков и полисахаридов) в различных формах межклеточного матрикса.

A. Межклеточный матрикс костной и зубной ткани

Костная и зубная ткань — специализированный тип соединительной ткани. Эти ткани вы-

полняют в организме человека следующие важные функции:

- из костей образуется скелет организма;
- кости защищают и поддерживают внутренние органы;
- кости служат местом депонирования кальция и неорганического фосфата;
- костный мозг входит в состав кроветворной и иммунной систем;
- зубы как часть жевательного аппарата входят в состав пищеварительной системы;
- зубы — часть речевого аппарата человека.

Замечательным свойством костей является сочетание в них таких качеств, как высокая прочность на разрыв с очень лёгким весом. Костная и зубная ткань отличаются высокой минерализацией (или кальцификацией) межклеточного матрикса и содержат по массе ~50% неорганических соединений, 25% органических компонентов и 25% воды.

Неорганическая часть

В состав костей входит 99% всего кальция организма, 87% фосфора, ~60% магния и ~25% натрия. Кальций в костях находится в форме минерала гидроксиапатита, примерный состав которого $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Гидроксиапатит образует кристаллы, имеющие обычно размер 20×5×1,5 нм. В костной ткани содержится много микроэлементов, таких как медь, стронций, барий, цинк, фтор и др., которые играют важную роль в обмене веществ в организме. Минеральная часть костей включает также карбонаты, гидроксиды и цитраты.

Минеральный состав зуба различен в разных его частях. Твёрдые части зуба (эмаль, дентин и цемент) содержат от 70% (цемент и дентин) до 96–97% (эмаль) неорганических веществ. Основную часть этих веществ составляют фосфат кальция, входящий в состав кристаллов гидроксиапатита (75%), а также карбонат и фторид кальция.

Мягкие части зуба (пульпа и периодонт) не относят к тканям с высокой степенью минерализации. Пульпа состоит из рыхлой волокнистой соединительной ткани (такая ткань находится практически во всех органах и образует их строму, или каркас), а периодонт образован плотной волокнистой соединительной тканью, которая также входит в состав сухожилий и связок.

Органическая часть

Органические вещества костного матрикса представлены белками, липидами и небольшим количеством протеогликанов.

Основной белок костной ткани — коллаген I типа (90–95%). Кроме него, в матриксе костей присутствуют такие белки, как коллаген V типа, остеонектин, остеокальцин, так называемые морфогенетические белки кости (BMP) и ферменты — щелочная фосфатаза (в остеобластах) и кислая фосфатаза (в остеокластах). Оба эти фермента служат маркёрами соответствующих клеток костной ткани. Углеводная часть протеогликанов костного матрикса представлена дерматан- и кератансульфатами.

Главный компонент органических веществ зубной ткани — коллаген I типа. Углеводы и липиды присутствуют в небольших количествах. Содержание органических веществ в твёрдых частях зуба варьирует от 2% (эмаль) до 30% (дентин и цемент). Содержание органических веществ в мягких частях зуба такое же, как в соответствующих видах соединительной ткани.

Минерализация кости

Механизмы минерализации кости пока ещё недостаточно понятны, хотя известно, что в этом процессе важную роль играют все основные компоненты костной ткани, в том числе костеобразующие клетки (остеобласты) и клетки, разрушающие костную ткань (остеокласты). Определяющий фактор минерализации — взаимное расположение молекул тропоколлагена со смещением на 1/4 длины молекулы (см. рис. 15-3). Считается, что промежутки между молекулами тропоколлагена являются центрами минерализации кости, в которых начинается отложение фосфата кальция сначала в аморфном виде с последующим образованием кристаллов гидроксиапатита.

Остеобласты контролируют минерализацию посредством регуляции транспорта ионов кальция и фосфата через свои мембраны. Присутствующая в них щелочная фосфатаза высвобождает неорганический фосфат из органических фосфорсодержащих соединений. Освобождающаяся фосфорная кислота реагирует с солями кальция с образованием $Ca_3(PO_4)_2$. Гликопротеин остеонектин имеет высокое сродство к коллагену I типа и к гидроксиапатиту. Он со-

держит Ca^{2+}-связывающие домены и способствует осаждению Ca^{2+} и PO_4^{3-} в присутствии коллагена. Определённую роль в процессе минерализации играют также кислые фосфопротеины, специфичные для костной ткани. Они содержат последовательности поли-Асп и поли-Глу, к которым присоединяется кальций, это может быть пусковым моментом в процессе минерализации.

Костная ткань, несмотря на высокую степень минерализации, находится в динамическом состоянии, в ней постоянно происходят процессы обновления входящих в её состав веществ, адаптационные перестройки к изменяющимся условиям окружающей среды.

Регуляция метаболизма костной ткани

Формирование матрикса кости регулируется биомеханическими, гормональными и другими факторами. Остеобласты, которые являются клетками-мишенями для паратгормона, реагируют на повышение содержания этого гормона в крови снижением синтеза коллагена, а также повышением активности коллагеназ. Кальцитриол, как и паратгормон, вызывает резорбцию кости опосредованно через остеобласты, так как остеокласты не имеют к нему рецепторов. По-видимому, стимуляция остеокластов происходит при их контактном взаимодействии с остеобластами или в результате синтеза остеобластами активирующего остеокласты фактора.

Простагландины (A, B, E_1, E_2 и F) и некоторые цитокины (эпидермальный фактор роста, фактор некроза опухолей, ИЛ-1) стимулируют резобцию кости и перестройку костной ткани, воздействуя на остеобласты, которые выделяют фактор, активирующий остеокласты.

Глюкокортикоиды тормозят пролиферацию остеобластов, подавляя в них синтез ДНК, РНК и белков.

Определённую роль в регуляции функционального состояния костной ткани играют половые гормоны. Известно, что в менопаузе у женщин постепенно развивается остеопороз и что предотвратить его можно заместительной терапией эстрогенами, которые, по-видимому, снижают резорбцию кости. Параллельно с этим были получены данные, что эстрогены тормозят также и формирование кости, в результате чего общее количество коллагена не изменяется, а в итоге замедляется смена костной ткани.

Кальцитонин действует непосредственно на остеокласты, которые имеют к нему рецепторы.

Б. Межклеточный матрикс суставного хряща

Основные компоненты межклеточного хрящевого матрикса — коллаген II типа, агрекан, гиалуроновая кислота и вода. Кроме них, в матриксе находятся малые протеогликаны, коллагены VI, IX, XI типов, связывающий белок, другие неколлагеновые белки (фибронектин, анкорин, хрящевой олигомерный белок, хондроадгерин), разнообразные ростовые факторы. «Эндоскелет» хрящевого матрикса образован фибриллярной сетью, которая состоит из коллагенов II, IX и XI типов и придаёт хрящу прочность (рис. 15-22).

Коллаген XI типа находится внутри фибрилл, образованных коллагеном II типа, он играет определённую роль в сборке этих фибрилл. Коллаген IX типа антипараллельно присоединяется к фибриллам коллагена II типа. Его глобулярный $НК_4$-домен — основ́ный, он не связан с фибриллами коллагена II типа, и поэтому к нему может присоединяться такой компонент матрикса, как гиалуроновая кислота. Микрофибриллы, которые образуются тетрамерами коллагена VI типа, присоединяются к фибриллам коллагена II типа и к гиалуроновой кислоте. Кроме того, они могут присоединяться к клеткам, поэтому коллаген VI типа называют «мостовой» молекулой между поверхностью клетки и фибриллами коллагена во внеклеточном матриксе.

Высокомолекулярные агрегаты, состоящие из агрекана и гиалуроновой кислоты, являются полианионами, так как содержат большое количество кислых групп. Это способствует высокой гидратации хрящевого матрикса и обеспечивает выполнение им рессорных функций. Содержание воды в суставном хряще непостоянно: при нагрузке жидкость вытесняется, пока давление набухания не уравновесит внешнюю нагрузку. Когда нагрузка прекращается, вода вновь возвращается в хрящ (рис. 15-23). Очень наглядно это проявляется в межпозвоночных дисках. Утром, после ночного сна, на долю воды приходится около 75% массы диска. При внешней нагрузке на диски в течение дня содержание воды уменьшается примерно на 20%. Вслед-

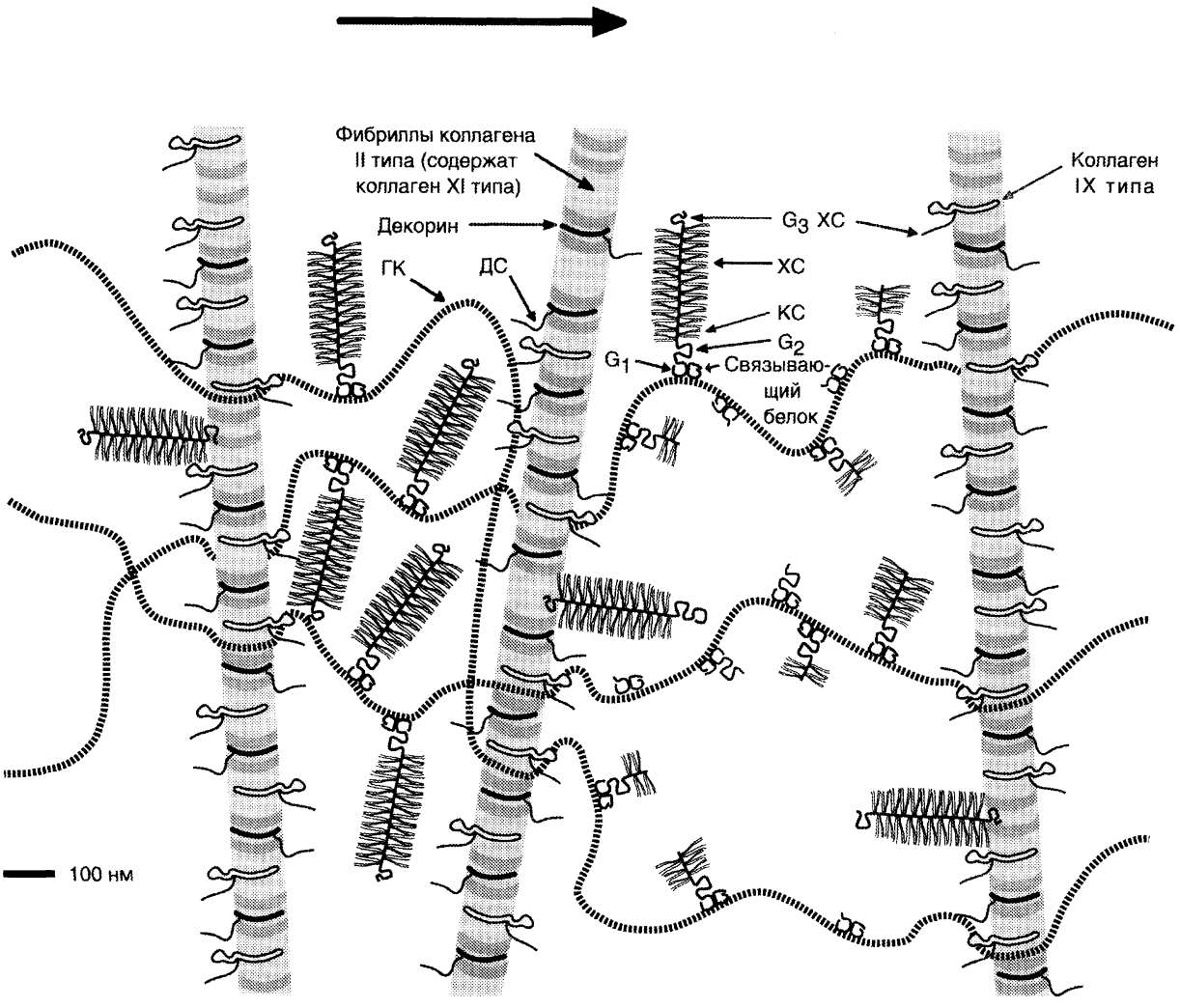


Рис. 15-22. Организация межклеточного матрикса в суставном хряще. ГК — гиалуроновая кислота; ДС — дерматансульфат; ХС — хондроитинсульфат.

ствие этого рост человека к вечеру на 1–2 см меньше, чем утром. У космонавтов в условиях невесомости отмечается увеличение роста даже на 5 см.

Малые протеогликаны, например, декорин, присоединяются к фибриллам коллагена II типа; они влияют на фибриллогенез, так как ограничивают диаметр этих фибрилл.

Важную роль в организации хрящевого межклеточного матрикса играет также фибронектин. Биологическое значение этих и других минорных компонентов хрящевого матрикса заключается в том, что они участвуют в сборке и организации высокомолекулярных компонентов межклеточного вещества и в регуляции функции хондроцитов.

В. Межклеточный матрикс кожной ткани

Основной организующий компонент матрикса кожной ткани — коллаген VII типа. Пучки фибрилл, образованные димерами этого коллагена, своими С-концами могут присоединяться к *lamina densa* базальной мембраны (как бы «заякориваться» в ней) и образовывать петли в субэпидермисе. Такие «заякоренные» фибриллы могут соединять *lamina densa* базальной мембраны с «якорными дисками», которые находят-

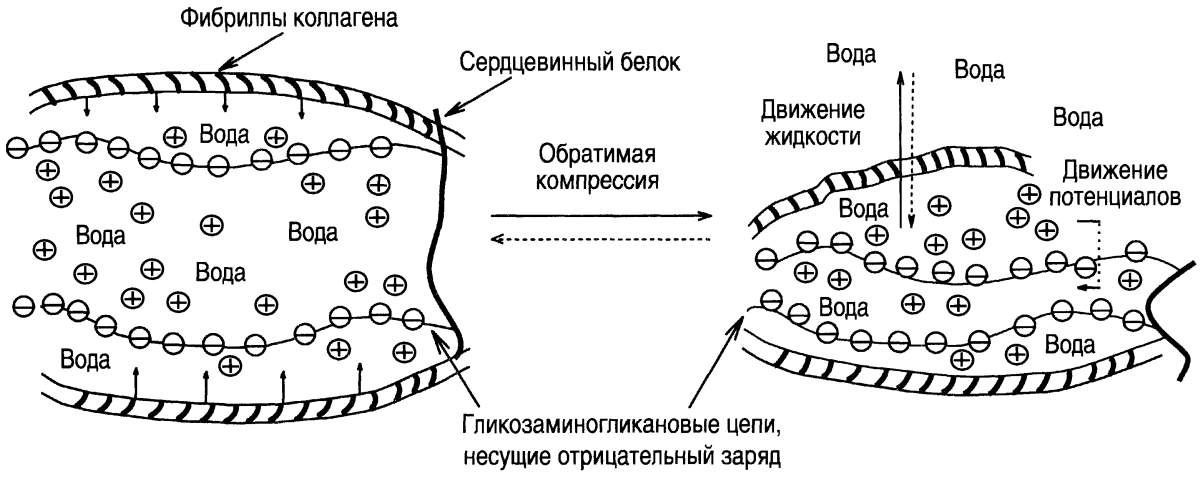


Рис. 15-23. Изменения, происходящие в суставном хряще при его сжатии и при снятии нагрузки. ⊕ — ионы Na^+, K^+, Ca^{2+}.

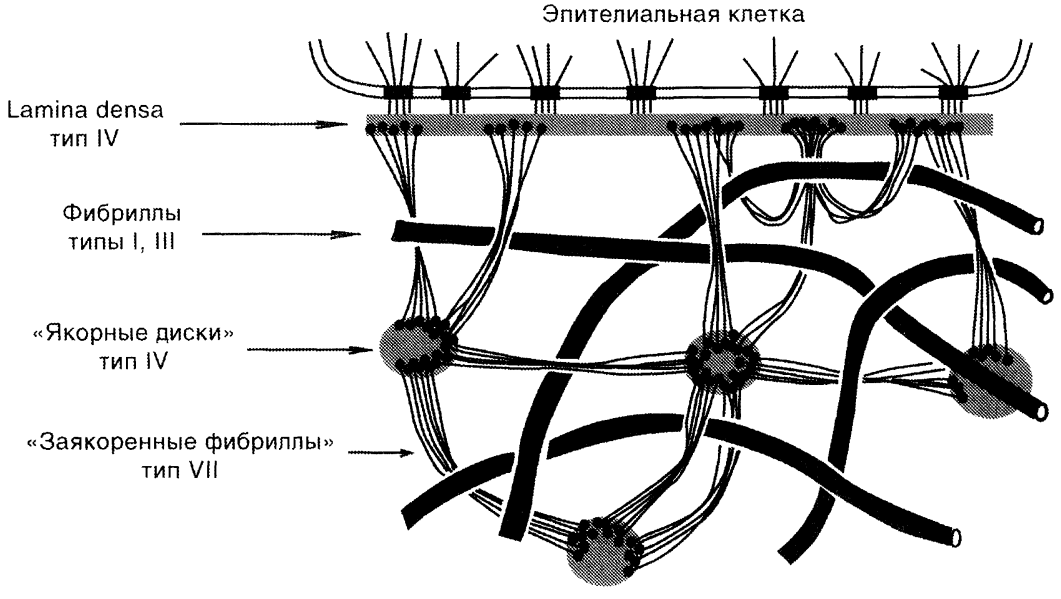


Рис. 15-24. Организация «заякоренных» фибрилл в субэпителиальных слоях.

ся в более глубоких субэпителиальных слоях и по своему составу похожи на базальные мембраны (содержат коллаген IV типа). «Заякоренные» фибриллы также захватывают фибриллы коллагена I и III типов (рис. 15-24).

Таким способом «заякоренные» фибриллы коллагена VII типа обеспечивают присоединение эпидермиса к дерме.

Г. Базальные мембраны

Базальные мембраны — специализированная форма межклеточного матрикса. Они синтезируются различными клетками: эндотелиальными, эпителиальными, мышечными, нервными, жировыми. Базальные мембраны представляют собой тонкие слои, которые обычно отделяют

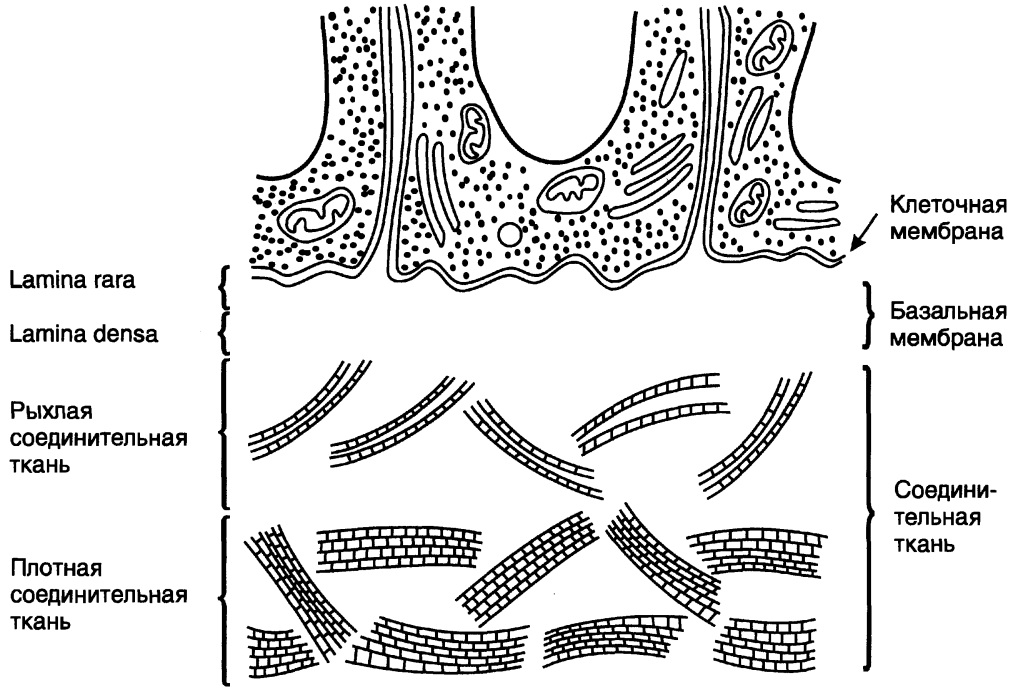


Рис. 15-25. *Строение типичной базальной мембраны.*

клетки и клеточные слои от окружающей соединительной ткани. Например, они окружают отдельные мышечные волокна, жировые и шванновские клетки. В таких структурах, как почечные клубочки и лёгочные альвеолы, базальные мембраны расположены между двумя различными слоями клеток и играют роль высокоселективного фильтрационного барьера.

С помощью электронной микроскопии выявлена двухслойная структура базальных мембран: *lamina rara*, которая находится со стороны клеточной мембраны, и *lamina densa*, которая соединена с подлежащей соединительной тканью (рис. 15-25). Основными компонентами базальных мембран являются коллаген IV типа, ламинин, гепарансульфатсодержащие протеогликаны (ГСПГ).

Нерастворимость и механическую стабильность базальных мембран обеспечивают молекулы коллагена IV типа, которые организуются в специальную опорную сеть. Эта эластичная трёхмерная сеть образует структурный остов, к которому прикрепляются другие компоненты базальных мембран.

Ламинин взаимодействует практически со всеми структурными компонентами базальных мембран: коллагеном IV типа, нидогеном, ГСПГ.

Нидоген формирует с ламинином нековалентно связанный комплекс. Кроме этого, нидоген имеет центр связывания коллагена IV типа и, таким образом, может играть роль «мостовой» молекулы между различными компонентами базальной мембраны.

ГСПГ базальных мембран могут образовывать олигомеры, соединяясь концевыми доменами белкового ядра, а также связываться с ламинином и коллагеном IV типа.

Базальные мембраны выполняют разнообразные и сложные функции. В почечных клубочках базальная мембрана служит полупроницаемым фильтром, препятствующим переходу макромолекул из плазмы в первичную мочу. Большое значение в этом процессе имеет высокий отрицательный заряд протеогликанов, который препятствует прохождению через базальную мембрану других отрицательно заряженных молекул (например, белков), а также отрицательно заряженных эритроцитов. Кроме этого, базальные мембраны играют важную роль в прикреплении и ориентации клеток в пространстве, в процессах эмбрионального развития и тканевой регенерации.

РАЗДЕЛ 16

ОНКОГЕНЕЗ

Опухоли представляют собой группу генных болезней, характеризующихся неконтролируемой клеточной пролиферацией. По способности к распространению в организме их делят на 2 группы:

доброкачественные, или локальные, не обладающие способностью прорастать в соседние ткани;

злокачественные, способные к разрастанию (инвазии) в определённых тканях и перемещению в другие части тела, давая начало вторичным опухолям (метастазам).

Описано более 100 различных видов рака, хотя 5 из них дают более 50% от всех диагностируемых случаев заболевания. Это — рак лёгкого, молочной железы, толстой и прямой кишки, простаты, матки и яичников (рис. 16-1).

Опухоли классифицируют также в зависимости от тканей и типов клеток, из которых они возникли:

карциномы — опухоли из клеток эктодермы и эндодермы;

саркомы — из клеток мезодермы;

гемобластозы (лейкозы и лимфомы) — из камбиальной клетки кроветворной и лимфатической ткани.

После заболеваний ССС рак как причина смертности населения занимает второе место. У человека наиболее изученными причинами рака являются радиация, химические канцерогены и вирусы.

Исследования вирусов как возможной причины онкологических болезней привели к созданию онкогенной теории, которая позволила дать объяснение механизму, с помощью которого различные агенты вызывают превращение нормальной клетки в опухолевую.

I. ФИЗИЧЕСКИЕ, ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ВОЗНИКНОВЕНИЕ ОПУХОЛЕЙ

Около 80% случаев рака у людей — результат воздействия факторов окружающей среды, под которыми понимают стиль жизни, пищевые продукты, заболевания, увеличивающие риск развития опухолей, и наследственные изменения в геноме.

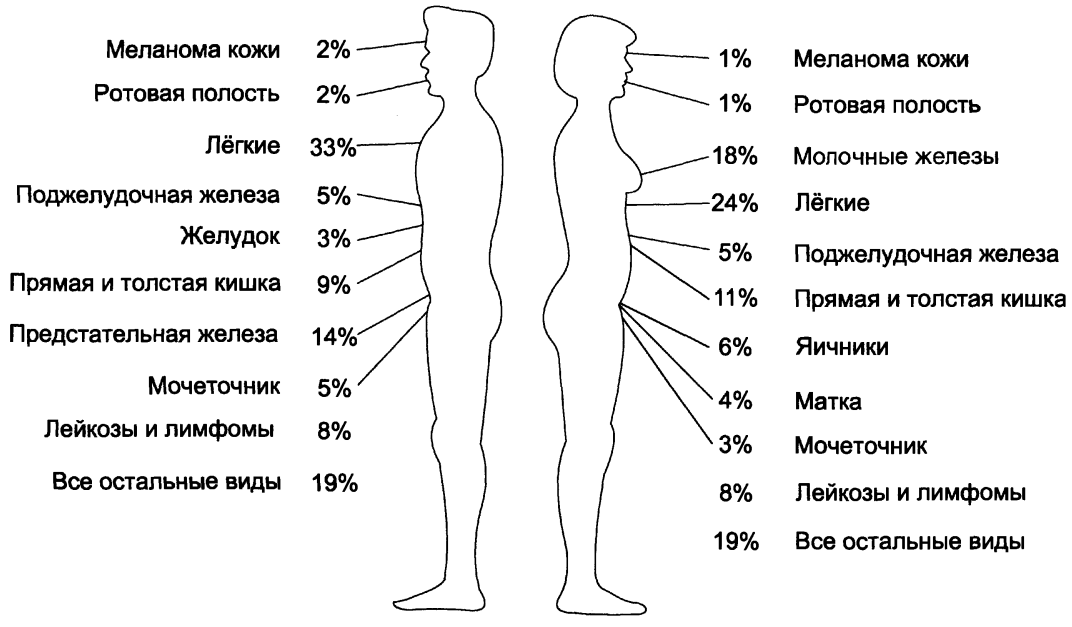


Рис. 16-1. Смертность от разных видов рака среди мужчин и женщин.

Агенты, стимулирующие возникновение опухолей (канцерогены), можно разделить на три большие группы: излучения, химические соединения и вирусы.

А. Излучения

Установлено, что УФО, x- и γ-лучи оказывают мутагенное и канцерогенное действие. Они повреждают ДНК несколькими способами. Под воздействием излучений из полинуклеотидных цепей могут удаляться азотистые основания и образовываться апуринизированные или апиримидинизированные участки, могут появляться одно- и двухцепочечные разрывы или сшивки. УФО вызывает образование тиминовых димеров (см. раздел 4). Наряду с прямым воздействием x- и γ-излучения индуцируют образование в тканях свободных радикалов (O_2^{2-}, OH^-, $OH^\bullet$, O_2 и др.), воздействие которых на ДНК и другие макромолекулы повреждает генетический аппарат и нарушает матричный синтез в клетке.

Так, в Австралии и Новой Зеландии, где высока интенсивность УФО солнечных лучей, у части населения возникают карциномы и меланомы. Отмечено увеличение случаев заболевания лейкозами у жителей Японии после взрыва на их территории атомных бомб. Учащение случаев рака лёгких наблюдают у шахтёров, работающих с радиоактивными рудами.

Б. Химический канцерогенез

Канцерогенным действием обладает огромное количество различных по химическому строению веществ, основные группы которых представлены в табл. 16-1.

В печени большинство из этих веществ **проканцерогены** — соединения, не взаимодействующие с генетическим аппаратом клеток. После дополнительной метаболической модификации они превращаются в **канцерогены**, способные реагировать с молекулами нуклеиновых кислот и белков, нарушать работу регуляторных механизмов клеток и вызывать рост опухолей. Трансформация клеток под действием канцерогенов получила название химического канцерогенеза.

Установлено, что ферменты детоксикации, участвующие в метаболизме проканцерогенов, обнаруживают поразительный полиморфизм. Отдельные изоформы этих белков имеют низкую активность. У индивидуумов с такими вариантами ферментов проканцерогены медленнее подвергаются метаболическим превращениям и выводятся из организма, не успевая превратиться в

Таблица 16-1. *Основные химические канцерогены*

Группы веществ	Представители групп
Полициклические ароматические углеводороды	Бензопирен, диметилбензантрацен
Ароматические амины	2-Ацетиламинофлуорен, N-метил-4-аминоазобензол
Нитрозамины	Диметилнитрозамин, диэтилнитрозамин
Алкилирующие агенты	Циклофосфамид, диэтилстильбэстрол
Природные вещества	Дактиномицин, афлатоксин B_1
Неорганические вещества	Хром, бериллий, асбест, свинец, кадмий

активные канцерогены. С этим явлением связаны разная чувствительность людей к канцерогенам табачного дыма и предрасположенность курильщиков к раку лёгкого.

В покоящихся клетках ДНК двухспиральна, и азотистые основания защищены от воздействия повреждающих агентов. Однако в ходе репликации полинуклеотидные цепи очень чувствительны к канцерогенам, и клетки, получившие повреждения, могут иметь разную судьбу (рис. 16-2).

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) входят в состав продуктов неполного сгорания каменного угля и нефти, продуктов пиролиза масел и веществ, найденных в жжёном мясе, а также образуются при курении табака. Они могут связываться с пуриновыми основаниями (особенно гуанином) только после ферментативной активации монооксигеназами (см. раздел 12), работающими при участии различных изоформ цитохрома P_{450}. Эти ферменты катализируют образование эпоксидов, которые превращаются в диолы с помощью эпоксидгидролазы. Первичные или вторичные эпоксиды, обладая высокой реакционной способностью, могут взаимодействовать с нуклеофильными группами в молекуле ДНК (рис. 16-3).

ПАУ стали первыми соединениями, канцерогенность которых была доказана экспериментально в начале XX века, когда из каменноугольной смолы были выделены бензантрацен, бензо(а)пирен, 7,12-диметилбензантрацен и другие соединения, содержащие конденсированные ароматические кольца. Наблюдения, связывающие контакты людей с определёнными веществами, и развитие рака были описаны значительно раньше. Так, ещё в 1775 г. появилось сообщение о том, что у трубочистов Лондона особенно часто встречается рак мошонки, и было сделано предположение о том, что это объясняется их постоянным контактом с каменноугольной смолой и сажей. Почти в то же время была обнаружена взаимосвязь между употреблением нюхательного табака и раком носа, курением и раком губ или лёгких.

Ароматические амины. К ароматическим аминам относят вещества, использующиеся в производстве анилиновых красителей и резиновой промышленности. Контакт с ними приводит к развитию у рабочих, занятых в указанных производствах, рака мочевого пузыря. Одним из представителей этой группы является 2-нафтиламин, химическая модификация которого происходит главным образом в печени (рис. 16-4).

Канцероген 2-амино-1-нафтол образуется в ходе гидроксилирования 2-нафтиламина. Однако в печени он быстро взаимодействует с ФАФС,

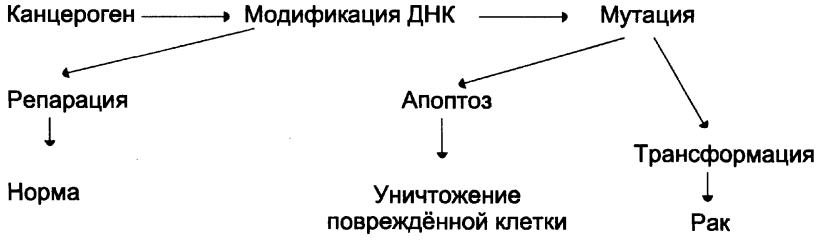


Рис. 16-2. Последствия повреждения ДНК клетки канцерогенами.

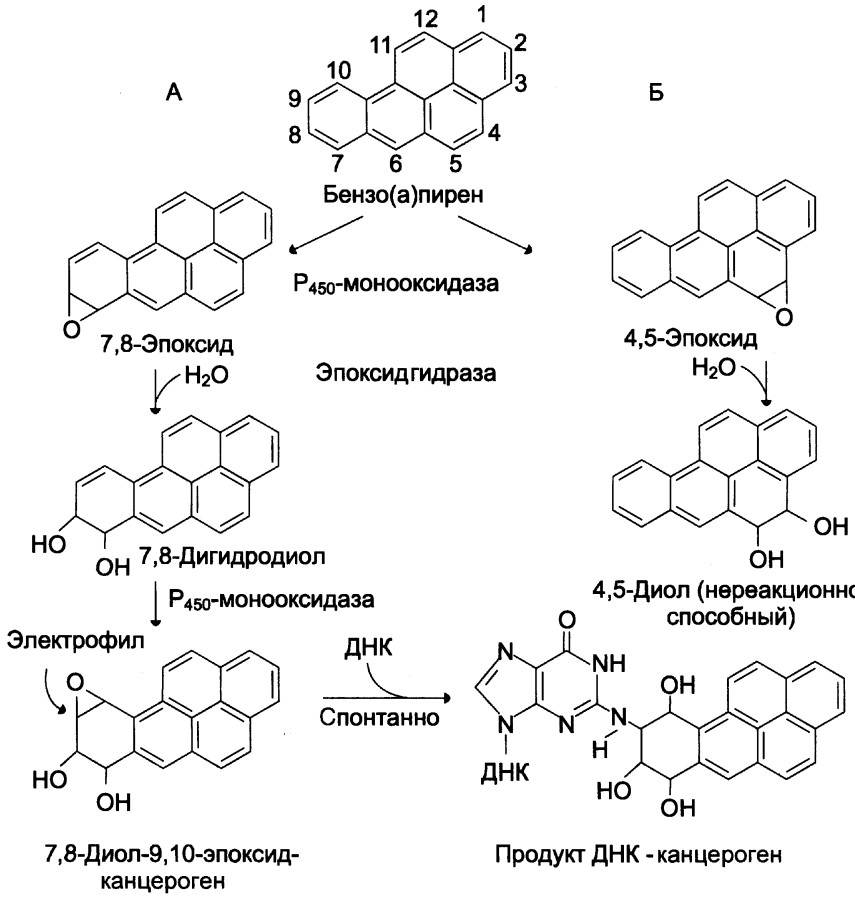


Рис. 16-3. Образование канцерогенов из ПАУ под действием ферментов детоксикации ксенобиотиков. А и Б — два разных метаболических пути, по которым может превращаться бензо(а)пирен. Путь Б приводит к образованию нереакционно-способного продукта, а путь А превращает бензо(а)пирен в канцероген, способный связываться с остатками гуанина и аденина в молекуле ДНК.

превращаясь в нейтральный продукт, который выводится с мочой. В мочевом пузыре часть конъюгатов расщепляется гидролазами, присутствующими в незначительных количествах в моче. Вновь образуется 2-амино-1-нафтол — канцероген, который при повторяющихся контактах человека с нафтиламином вызывает развитие рака мочевого пузыря.

Нитрозамины появляются в организме в результате взаимодействия вторичных алифатических аминов с нитритами. Вторичные амины и нитриты являются постоянными компонентами пищи, поэтому нитрозамины синтезируются при запекании мяса, рыбы. Одно время нитриты широко применялись как консерванты мяса и рыбы, образуются они также в зелёных растениях.

Метаболизм нитрозаминов микросомальной системой окисления приводит к образованию иона метилдиазония, который способен метилировать ДНК клеток, индуцируя возникновение злокачественных опухолей лёгких, желудка, пищевода, печени и почек (рис. 16-5).

Основным продуктом взаимодействия нитрозаминов с ДНК клетки является N_7-метилгуанин-ДНК, но наибольшей канцерогенностью обладает минорный продукт этого взаимодействия — O_6-метилированный гуанин-ДНК.

Алкилирующие и ацилирующие агенты, взаимодействуя с нуклеофильными амино- и гидроксильными группами ДНК, могут повреждать структуру генов и индуцировать образование опухолей. Такие соединения, как винилхлорид, используемый в производстве пластмасс и упа-

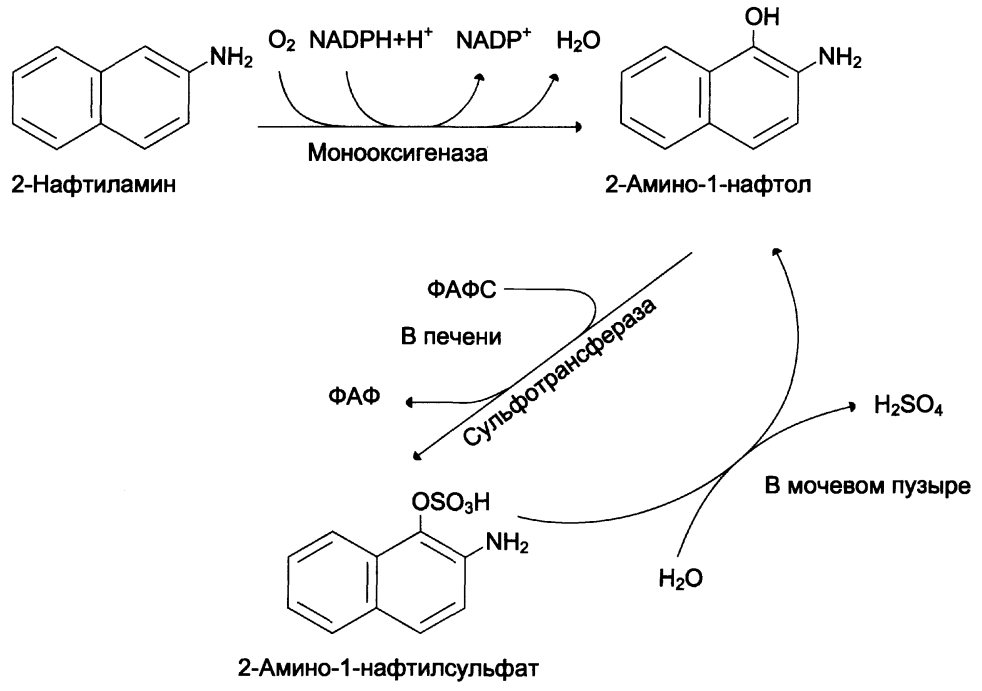


Рис. 16-4. Метаболизм 2-нафтиламина.

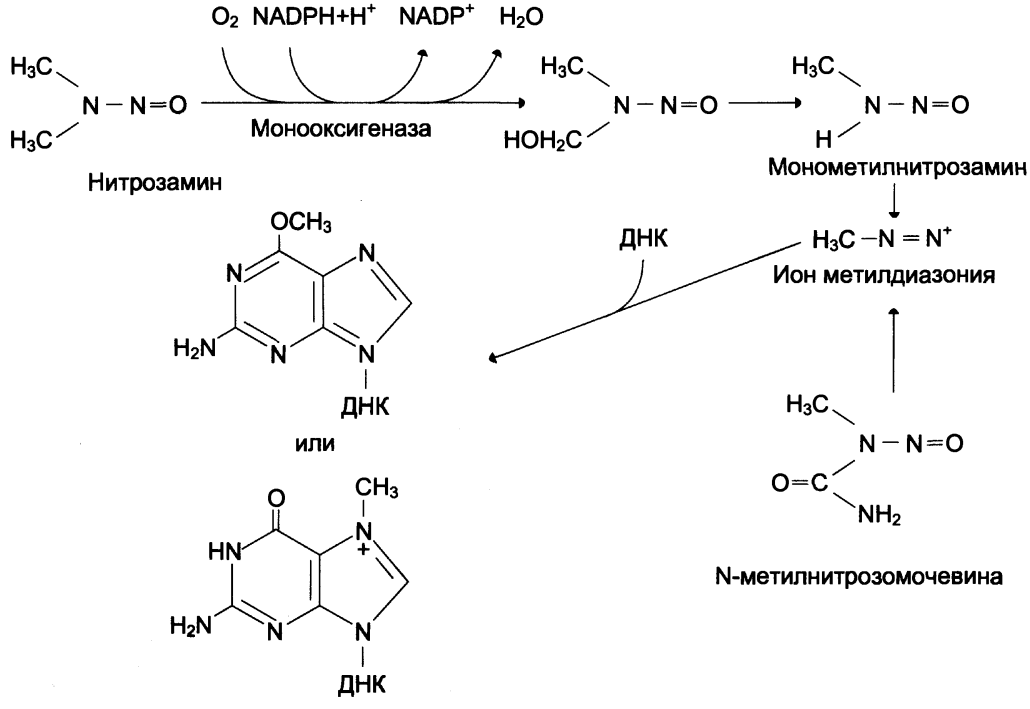


Рис. 16-5. Метилирование ДНК продуктами метаболизма нитрозаминов: диметилнитрозамина и N-метилнитрозомочевины.

ковочных материалов, некоторые лекарства, применяемые в лечении опухолей или как иммуносупрессоры (циклофосфамид, бисульфан, диэтилстильбэстрол), можно рассматривать как факторы риска. Лекарственные препараты этой группы соединений способны вызывать вторичные опухоли у небольшого процента больных.

В. ДНК- и РНК-содержащие вирусы

Данные о роли вирусов в развитии опухолей были получены в начале XX столетия. Так, в 1908 г. лейкоз у кур удалось вызвать под действием бесклеточного экстракта из опухолевых клеток, а в 1910 г. Р. Раус описал первый онкогенный вирус, способный инициировать саркому у кур. В 1968 г. российским учёным Л.А. Зильбером была сформулирована вирусно-генетическая теория возникновения опухолей под действием онкогенных вирусов. Хотя вирусный канцерогенез первоначально был описан только у птиц и животных, но в последнее время получены данные об участии вирусов в развитии некоторых опухолей у человека. Так, ДНК-содержащий вирус Эпштейна–Барр вызывает развитие лимфомы Бёркитта, ДНК вируса папилломы — развитие рака кожи и гениталий, РНК-содержащий вирус иммунодефицита человека — возникновение сарком.

ДНК-содержащие вирусы частично, а иногда полностью встраиваются в клеточный геном человека, экспрессируют вирусные гены, в результате чего образующиеся в ядре белки нарушают регуляцию клеточного цикла. К ДНК-содержащим онковирусам, помимо упомянутых выше, относят вирус герпеса, аденовирус, папова-вирус, вирус ветряной оспы. Как правило, эти вирусы вызывают инфекционные болезни и лишь в одном из миллиона случаев — злокачественную трансформацию. С другой стороны, ДНК-содержащий вирус гепатита В является причиной рака печени, от которого в мире умирает ежегодно около 500 000 человек. При этом инфицирование пациентов происходит, как правило, за 20–25 лет до возникновения опухоли.

РНК-содержащие вирусы, попадая в клетки человека, синтезируют ДНК с помощью обратной транскриптазы и частично или полностью включают её в геном эукариотов в виде провируса (латентного вируса).

В 1976 г. с помощью техники рекомбинантных ДНК для вируса саркомы Рауса была рас-

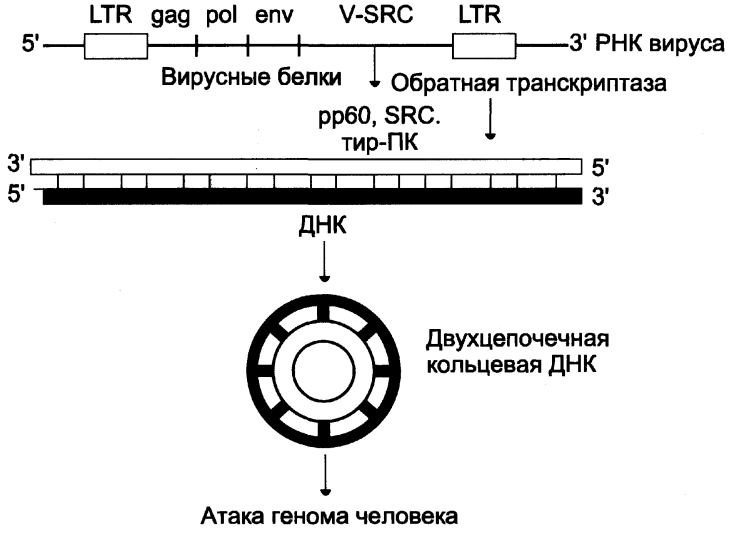


Рис. 16-6. Структура генома вируса саркомы Рауса. LTR — длинные концевые повторы (от англ. long terminal repeats),содержащие промоторы, к которым присоединяется РНК-полимераза; *gag, pol, env* — гены, кодирующие вирусные белки; *src* — ген, кодирующий тирозиновую протеинкиназу (тир-ПК) с молекулярной массой 60 кД (pp60), которая вызывает нарушение контактного торможения (прекращения деления клеток при возникновении физического контакта между ними) и трансформацию клеток. Обратная транскриптаза — фермент, который синтезирует ДНК на матрице РНК. Благодаря активности этого фермента генетический материал вируса в клетках хозяина превращается в двухцепочечную кольцевую ДНК и может включаться в геном человека.

шифрована структура генома (рис. 16-6). Наряду с тремя обычно встречающимися у всех вирусов генами был обнаружен ген, ответственный за злокачественную трансформацию. Он назван *src*-онкогеном, так как выделен из клеток саркомы. Показано, что, когда *src*-ген встраивается в геном нормальных клеток, растущих в культуре, то они теряют способность к контактному торможению и приобретают все свойства трансформированных клеток.

Г. Наследственная предрасположенность

Наследственные изменения в геноме играют важную роль в канцерогенезе. Так, у детей предрасположенность к ретинобластоме (злокачественная опухоль сетчатки глаза) наследуется как аутосомно-доминантный признак, и примерно 40% случаев заболевания имеют семейный характер. Также наследуется предрасположенность к множественному полипозу толстой кишки, и практически во всех случаях в зрелом возрасте у пациентов образуются аденокарциномы.

Нестабильность хромосомной ДНК может быть связана с дефектом ферментов репарации. Это нарушение встречается у пациентов с пигментной ксеродермой, которая часто сопровождается развитием карциномы кожи на участках, подверженных действию УФО.

II. ХАРАКТЕРИСТИКА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Дифференцированные клетки соблюдают границы ткани и не вторгаются в сопредельные территории, подчиняясь правилу контактного торможения. При трансформации это свойство утрачивается.

Клетки опухолей, как правило, имеют округлую или звёздчатую форму и крупнее, чем нормальные. В них изменено ядерно-цитоплазматическое соотношение, имеет место **полиплоидия** (состояние, при котором ядро содержит 3 и большее число гаплоидных наборов хромосом) или **анэуплоидия**, когда число хромосом изменяется и становится не кратным гаплоидному набору. Они могут расти, не прикрепляясь к поверхности из-за сниженной способности к адгезии, и образовывать мультислои.

А. Особенности метаболизма

В метаболизме опухолевых клеток обнаруживается ряд характерных особенностей, которые сообщают им существенные преимущества по сравнению с нормальными клетками. Так, в раковых клетках:

- возрастает активность рибонуклеотидредуктазы и снижается катаболизм пиримидинов и пуринов, увеличивается синтез ДНК и РНК;
- повышается скорость гликолиза (как аэробного, так и анаэробного) и увеличивается продукция лактата. Характерная для многих опухолей повышенная секреция лактата получила название «**эффект Варбурга**». Преимущественный анаэробный гликолиз является, по-видимому, не внутренне присущим опухолевым клеткам свойством, а скорее следствием быстрого роста при слабой обеспеченности сетью кровеносных сосудов. Поскольку установлено, что чем менее дифференцирована опухоль и чем выше скорость её роста, тем интенсивнее протекает в ней анаэробный гликолиз и слабее окислительное фосфорилирование;
- в изоферментном спектре различных белков и ферментов возрастает содержание фетальных форм. Так, в углеводном обмене это фосфофруктокиназа, не ингибирующаяся АТФ и цитратом, изофермент гексокиназы, характеризующийся чрезвычайно высоким сродством к глюкозе, и очень активная лактатдегидрогеназа.

Такие изменения обеспечивают раковую клетку чрезвычайно высоким сродством к глюкозе и способностью ассимилировать её даже при очень низких концентрациях в крови. Аналогичные сдвиги в спектре изоферментов наблюдаются и в других обменах. Это позволяет опухолевым клеткам успешно конкурировать с окружающими тканями за жизненно важные метаболиты.

Б. Появление эмбриональных белков и ферментов

Клетки синтезируют, а иногда и секретируют в кровь эмбриональные белки и антигены, такие как α-фетопротеин, карциноэмбриональный антиген и многие другие. В них появляется характерный для эмбриональных тканей вы-

сокоактивный фермент **теломераза**. Как уже указывалось ранее (см. раздел 4), у животных и человека на концах линейных хромосом расположены тысячи высоко консервативных повторов гексадезоксинуклеотидов –TTAGGG, называемых теломерами, которые позволяют концам хромосом прикрепляться к ядерной оболочке и предотвращают их разрушение и рекомбинации. При каждой репликации длина теломер укорачивается примерно на 120 пар оснований. Для делящихся соматических клеток укорочение теломер служит репликометром. После достижения теломерными последовательностями критического размера клетки теряют способность к делению, стареют и подвергаются апоптозу (запрограммированной гибели).

В опухолевых и эмбриональных тканях теломераза достраивает теломеры на 3'-концах ДНК хромосом и после репликации восстанавливает их исходную длину. За счёт работы этого фермента прекращается старение клеток, и они становятся бессмертными.

В. Изменения в структуре плазматических мембран и секреции

Трансформация клеток приводит к изменению состава и структуры олигосахаридных цепей гликопротеинов и гликосфинголипидов плазматической мембраны, а как следствие — к её проницаемости и заряда. В частности, снижается интенсивность синтеза и изменяется структура адгезивных молекул и интегриновых рецепторов (см. раздел 5), входящих в состав мембран опухолевых клеток.

Наблюдается секреция некоторых протеаз, коллагеназ и гликозидаз, которые разрушают коллаген, белки, гликозаминогликаны межклеточного матрикса и способствуют инвазии опухоли в соседние ткани и сосуды. Усиливается синтез факторов ангиогенеза, стимулирующих развитие сосудов, которые должны снабжать раковые клетки питательными веществами.

Г. Роль гормонов и факторов роста в развитии опухолей

Рост и развитие клетки в нормальных и опухолевых линиях начинаются с воздействия на клетку факторов роста (ФР). Взаимодействуя с рецепторами, расположенными на поверхности клеток, или с внутриклеточными рецепторами, они стимулируют в клетке каскад событий, приводящих к активации генов, ответственных за синтез белков, обеспечивающих рост и деление клеток (рис. 16-7).

Очевидно, что если гены, кодирующие рецепторы, трансдукторы сигналов и транскрипционные факторы, изменены вследствие мутаций таким образом, что экспрессируются постоянно, то контролируемый рост заменяется неограниченной пролиферацией.

В опухолевых клетках возрастает скорость синтеза и секреции некоторых гормонов и факторов роста. Опухоли приобретают способность к автономному росту за счёт перехода на паракринный или аутокринный механизмы регуляции клеточного роста.

При аутокринном механизме регуляции опухоли синтезируют факторы роста и рецепторы к ним (рФР) или онкобелки, являющиеся аналогами ФР или рФР, которые, взаимодействуя между собой, вызывают аутостимуляцию роста и деления клеток.

Паракринная регуляция предполагает взаимодействие ФР, вырабатываемых одними клетками, с рФР, расположенными на соседних клетках. Так, например, при раке лёгкого клетки стромы вырабатывают инсулиноподобный фактор II, который взаимодействует с рецепторами раковых клеток лёгкого и стимулирует их рост и деление.

III. ОНКОГЕНЫ, ПРОТООНКОГЕНЫ И ГЕНЫ-СУПРЕССОРЫ ОПУХОЛЕЙ

В течение многих лет было неясно, почему и откуда у вирусов появились гены, вызывающие рост опухолей. Сначала предполагали, что они изначально принадлежат вирусному геному. Однако в 1989 г. в опытах по гибридизации вирусной ДНК с ДНК из клеток животных установили, что онкогены не присущи вирусам исходно, но получены ими из генома тех клеток, в которых они обитают. За время существования в составе вирусного генома соответствующие гены млекопитающих, включая человека, подверглись многочисленным мутациям и приобрели онкогенные свойства. В некоторых случаях опухолеродные вирусы не содержат онко-

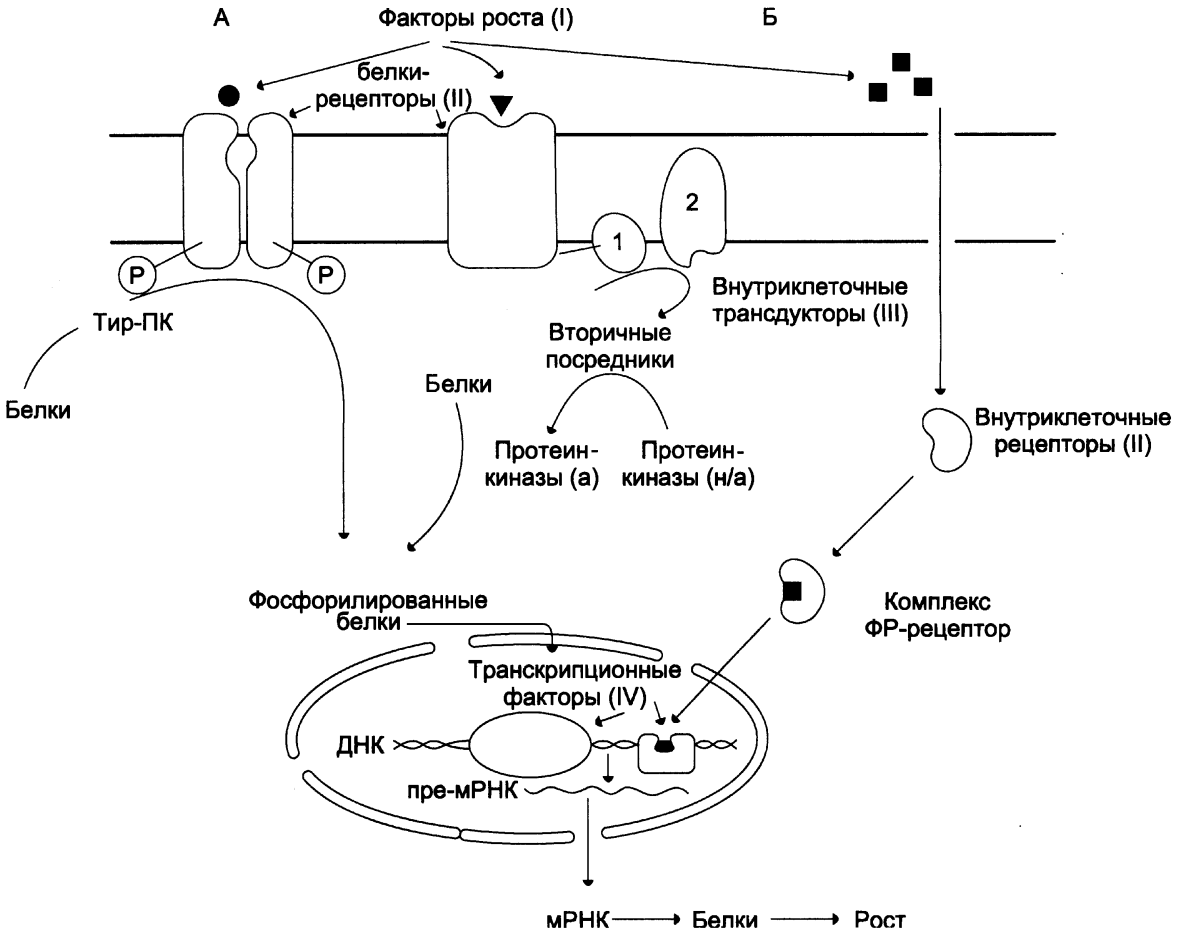


Рис. 16-7. Действие факторов роста на клетку. ФР связываются с рецепторами либо на поверхности мембраны, либо внутри клетки. А — ФР вызывают фосфорилирование белков либо непосредственно при взаимодействии с рецептором, являющимся тир-ПК-азой (ИФР-1, ИФР-2, инсулин), либо за счёт включения аденилатциклазного или фосфатидилинозитольного каскадов и активации протеинкиназ. Фосфорилированные белки активируют транскрипционные факторы, вызывающие синтез новых мРНК и белков. Б — ФР входит в клетку, в комплексе с внутриклеточным рецептором поступает в ядро, активируя транскрипцию генов, стимулирующих рост клетки. Гены, которые кодируют ФР (I), белки-рецепторы (II), трансдукторы сигналов (III) и транскрипционные факторы (IV), называют протоонкогенами. При изменении структуры I, II, III, IV протоонкогены становятся онкогенами и вызывают аномальный рост: 1 — G-белок; 2 — ферменты, синтезирующие вторичные посредники: аденилатциклаза, фосфолипаза С, гуанилатциклаза.

генов, но случайное внедрение в геном человека их генетического материала, содержащего промоторы в регуляторных участках, может менять экспрессию соседних хозяйских генов и вызвать трансформацию.

Чтобы отличать нормальные хозяйские гены от вирусных онкогенов, для первых было введено название **протоонкогены**. В группу протоонкогенов вошли гены, кодирующие белки, которые играют центральную роль в регуляции процессов роста и развития организма, такие как факторы роста (ФР), рецепторы ФР, транскрипционные факторы и белки, вовлечённые в трансдукцию сигналов.

А. Номенклатура

Онкогены записывают трёхзначным кодом из строчных латинских букв, который обычно указывает объект, из которого данный онкоген был выделен впервые. Так, название онкогена *ras* указывает на ген, впервые идентифицированный в саркоме крысы (от англ. *rat sarcomes*). Иногда за трёхбуквенным кодом следует буква или циф-

ра. Это становится необходимым, когда из одного и того же объекта выделяют онкогены, имеющие разные активности. В вирусе эритробластоза идентифицированы гены: *erb A*, являющийся вирусным гомологом рецептора тиреоидного гормона, и *erb B* — гомолог рецептора ЭФР.

Проставление числа за обозначением гена часто отражает тот факт, что гены являются членами близко родственных семейств, а номер указывает место гена в данном семействе: *bcl 1*, *bcl 2* и т.д.

Для обозначения вирусных онкогенов перед трёхбуквенным названием онкогена вводят строчную букву *v* (от англ. *virus* — вирус) — *v-onc*, а для обозначения клеточных онкогенов, образующихся в трансформированных клетках при мутациях, букву *c* (от англ. *cell* — клетка) — *c-onc*.

Гены-супрессоры опухолей, кодирующие белки, которые ингибируют рост и деление клеток, имеют ещё более разнообразную номенклатуру. Наряду с двух- и трёхбуквенным кодом (ген *rb*) в некоторых случаях указывают размер белкового продукта. Ген *p53* так называют потому, что он кодирует синтез белка с молекулярной массой 53 кД.

Белковые продукты генов часто обозначают так же, как гены, но с заглавной буквы. Так, ген *ras* кодирует белок Ras, ген *p53* — белок P53.

Б. Тип наследования онкогенов и генов-супрессоров опухолей

Большинство опухолей возникает из соматических клеток, а так как соматические клетки диплоидны, то они несут два аллеля каждого гена. Если мутация в одном из аллелей ведёт к нарушению функции клеток, то говорят о доминантном типе наследования. Именно такой тип наследования характерен для онкогенов и гена *p53*.

Если мутация в одном аллеле не проявляется функционально, то говорят о рецессивном типе наследования. В этом случае биологический эффект достигается только при повреждении обоих аллелей. По рецессивному механизму проявляются мутации в генах-супрессорах опухолей (за исключением *p53*). Когда вслед за первым аллелем в молекуле ДНК второй аллель также изменяется, то клетка переходит от гетерозиготного к гомозиготному наследованию информации о данном белке, т.е. наблюдается потеря гетерозиготности — LOH (от англ. *loss of heterozygosity*). Результатом повреждений генома такого типа является синтез изменённого и функционально неактивного белка.

В. Функции онкогенов

Изучение вирусных онкогенов показало, что более 50% из них кодируют тирозиновые протеинкиназы (тир-ПК), а остальные содержат информацию о различных функционально активных белках: укороченном ФР тромбоцитов, укороченном эпидермальном факторе роста (ЭФР) и рецепторе ЭФР (рЭФР), ДНК-связывающих, ГТФ-связывающих и некоторых других регуляторных белках.

Рассмотрим основные группы белков, которые кодируются онкогенами.

Тирозиновые протеинкиназы (тир-ПК)

К группе тир-ПК относят: онкоген *erb-B* вируса эритробластоза птиц, кодирующий белок, идентичный β-субъединице ЭФР, гомологи факторов роста тромбоцитов и рецепторов инсулиноподобных факторов I и II. *Src*-ген, выделенный из вируса саркомы Рауса, кодирует белок PP60, который обладает активностью тир-ПК. Он фосфорилирует некоторые ферменты гликолиза и ускоряет использование глюкозы в трансформированных клетках, нарушает контактное торможение клеток и стимулирует трансформацию клеток.

В группу тир-ПК помимо онкогенов входят некоторые протоонкогены (рецептор инсулина, рЭФР, рФР тромбоцитов). Следует отметить, что хотя некоторые белки организма и обладают активностью тир-ПК, но количество фосфотирозина в нормальных клетках очень низко (не более 1% от всех фосфорилированных аминокислот). При опухолевом перерождении ткани активность тир-ПК сильно возрастает, и количество фосфотирозина в фонде аминокислот, входящих в белки, увеличивается.

Ras-онкогены

Другую группу онкобелков кодирует семейство генов *ras*. Протоонкогены *ras* содержат информацию о семействе Ras-белков, представляющих собой небольшие G-белки. Подобно G-белкам основных сигнальных систем, эти белки присоединяют ГТФ и обнаруживают ГТФ-азную активность, однако, в отличие от G-белков, имеющих

олигомерную αβγ-структуру, Ras-белки мономерны. Они участвуют в трансдукции сигналов, полученных мембранными рецепторами клетки, и, будучи локализованы на внутренней поверхности мембран, тесно контактируют с фосфолипидами и мембранными белками. Установлено участие Ras-белков в изменении структуры цитоскелета, регуляции экзо- и эндоцитоза, реализации митогенных сигналов и активации белков, участвующих в транскрипции генов.

Ras-онкобелки, образующиеся в результате единичных миссенс-мутаций в ГТФ-связывающем домене, обладают очень низкой ГТФ-азной активностью. В результате аденилатциклаза или фосфолипаза С остаются в активированном состоянии дольше, чем обычно, и, таким образом, обеспечивают проведение более длительного сигнала.

Ras-онкобелки обнаружены в 25% всех опухолей человека, причём при некоторых формах опухолей значительно чаще: в 90% карцином поджелудочной железы и более чем в 50% карцином прямой кишки.

Ядерные онкобелки

В семейство ядерных онкогенов входят гены *jun*, *fos*, *myc*, *myb* и *erb A*. Онкобелки, образующиеся при экспрессии этих генов, связываются со специфическими последовательностями на ДНК и функционируют как транскрипционные факторы.

Например, онкобелки Jun и Fos образуют димер, который присоединяется к ДНК, *Erb A* является изменённой формой рецептора тиреоидного гормона, который тоже связывается со специфическими последовательностями на молекуле ДНК.

Аминокислотная последовательность онкобелка, закодированного геном *v-jun*, на 80% гомологична ядерному транскрипционному фактору AP1. Когда белки Jun и Fos объединяются, они образуют структуру лейциновой молнии — хорошо известного активатора транскрипции (см. раздел 1).

Г. Роль супрессоров опухолей в метаболизме клеток

При слиянии нормальных клеток с опухолевыми возникают гибридные клетки, которые, как правило, не обладают злокачественностью. Из этого был сделан вывод о том, что в нормальных клетках присутствуют гены, белковые продукты которых сдерживают репликативный потенциал клеток и предотвращают развитие опухолей. Эти гены получили название генов-супрессоров опухолей, или антионкогенов. Установлено, что в ходе злокачественной трансформации функции этих генов часто утрачиваются, что влечёт за собой нарушение контроля клеточной пролиферации.

В настоящее время описано более 10 генов-супрессоров опухолей (*rb1*, *p53*, *p21*, *p16*, *p15*, *wt1* и др.), которые кодируют регуляторные белки, ингибирующие аномальный рост и трансформацию клеток.

Ген *rb1*. Продуктом гена *rb1* является ядерный белок с молекулярной массой 105 кД, участвующий в регуляции вступления клетки из фазы покоя G_0 в фазу подготовки к синтезу ДНК G_1 и прохождения проверочной точки G_1/S. Белок Rb1, подобно циклинзависимым киназам (см. раздел 4), подвергается модификациям путём фосфорилирования и дефосфорилирования. В дефосфорилированной форме он может связываться и инактивировать транскрипционный фактор E2F, который, в свою очередь, усиливает экспрессию рост-стимулирующих белков и ферментов: ДНК-полимеразы α, MYC, CDC2 и некоторых других (рис. 16-8).

В норме, когда клетка вступает в S-фазу и начинает удваивать ДНК, белок Rb1 сильно фосфорилируется и перестает тормозить продвижение клетки по клеточному циклу.

Ген *p53* — другой наиболее изученный пример гена-супрессора опухолей. Этот ген кодирует ядерный фосфопротеин с молекулярной массой 53 кД, который препятствует вхождению клеток в S-фазу, амплификации и мутациям ДНК. Полагают, что физиологическая функция белка P53 состоит в том, чтобы задерживать в G_1- и G_2-фазах клетки, имеющие повреждения в структуре ДНК до тех пор, пока эти повреждения не будут устранены. В том случае, если репарирующие системы не способны устранить дефекты в структуре ДНК, то этот белок обеспечивает включение механизма апоптоза, уничтожающего повреждённую клетку.

Белок P53 у человека содержит 393 аминокислоты и состоит из 3 доменов: N-концевого, обогащённого дикарбоновыми аминокислотами, который регулирует транскрипцию; централь-

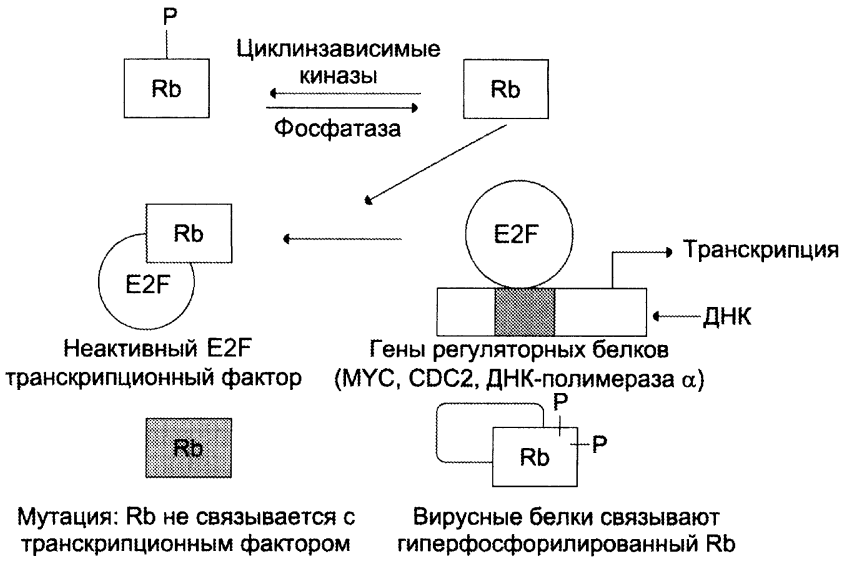


Рис. 16-8. Механизм действия белка Rb1. E2F — транскрипционный фактор, усиливающий транскрипцию ряда белков и ферментов, которые регулируют рост и деление клетки. Присоединяясь к E2F, белок-супрессор Rb1 ингибирует подготовку клеток к митозу. Гиперфосфорилированные и мутантные формы белка Rb1 не имеют сродства к E2F и перестают тормозить рост клеток.

ного, обеспечивающего связывание с ДНК; С-концевого, ответственного за образование олигомерной структуры этого белка.

P53 функционирует в форме тетрамера и связывается с регуляторными участками ДНК. Довольно много генов клетки имеют последовательности, способные присоединять P53 и изменять экспрессию соответствующих генов (рис. 16-9).

К генам-мишеням относят ген, кодирующий белок P21 — ингибитор большинства циклинзависимых киназ. P53 усиливает транскрипцию гена *p21*, в результате продвижение по клеточному циклу, рост и деление клетки тормозятся.

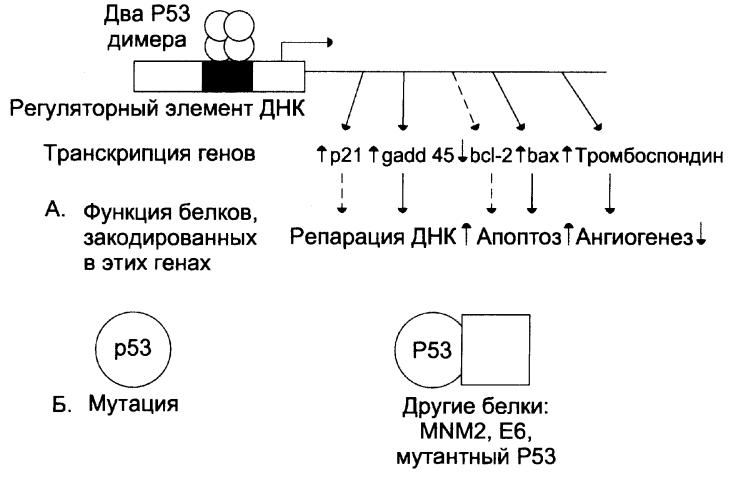


Рис. 16-9. Влияние белка P53 на транскрипцию ряда генов. А — основные гены-мишени, экспрессию которых регулирует белок P53; Б — инактивация P53 в результате мутаций в гене или связывания с белками-ингибиторами делает его неспособным ингибировать транскрипцию указанных генов мишеней.

P53 усиливает транскрипцию гена *gadd45*, белковый продукт которого стимулирует репаративные процессы. Показано, что экспрессия этого гена значительно возрастает в клетках, подвергнутых облучению.

К P53 чувствительны 2 гена *bcl 2* и *bax*, кодирующие белки, которые участвуют в регуляции апоптоза. Апоптоз активируется в том случае, когда P53 присоединяется к регуляторным участкам генов *bcl 2* и *bax*, при этом экспрессия антиапоптотического гена *bcl 2* снижается, а проапоптотического гена *bax* увеличивается.

Активируя ключевые гены, реализующие программированную гибель клетки, P53 ускоряет разрушение потенциально опасных клеток, которые повреждены и способны трансформироваться.

P53 увеличивает экспрессию гена, который кодирует белок тромбоспондин, препятствующий росту сосудов в опухоли (ангиогенез) и, следовательно, препятствующего образованию метастазов (см. раздел 14).

Таким образом, P53 функционирует в тканях как «хранитель» здоровья клеток, или «молекулярный полицейский».

IV. МЕХАНИЗМЫ НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

В настоящее время установлено, что в регуляции роста и дифференцировки клеток принимает участие более 100 различных генов и около 10 генов-супрессоров опухолей. Злокачественная трансформация не является результатом единичного события. Прежде чем возникает малигнизированная клетка, проходит 5–7 стадий, вызывающих изменения в генетическом аппарате клетки (**гипотеза многоступенчатого канцерогенеза**).

А. Превращение протоонкогенов в онкогены

В настоящее время выявлено пять основных механизмов превращения протоонкогенов в онкогены либо в результате повреждения структуры генов, либо за счёт изменения уровня экспрессии.

Включение в геномную ДНК новых промоторов

Ранее уже указывалось, что геном ДНК- и РНК-содержащих вирусов интегрирует с ДНК клетки хозяина в форме провирусов. Известно, что ДНК провирусов имеет с обоих концов длинные повторы — LTR, которые играют роль промоторов транскрипции (рис. 16-10). Так, после инфицирования В-лимфоцитов цыплёнка некоторыми вирусами лейкоза птиц провирусы иногда включаются около гена *c-myc*. В результате ген *myc* активируется, возрастает его транскрипция с образованием значительных количеств *myc*-мРНК и последующая трансляция.

Появление новых энхансерных последовательностей

В ряде случаев провирус встраивается в молекулу ДНК перед геном *c-myc* или после него, либо может быть ориентирован в противоположном направлении, и тем не менее ген *c-myc* активируется. Этот эффект свидетельствует о том, что в провирусе присутствуют энхансерные последовательности, которые увеличивают экспрессию гена (рис. 16-11).

Амплификация генов

Это явление обнаружено у ряда опухолей. Показано, что амплификация *c-ras* онкогенов играет существенную роль в прогрессии клеток в

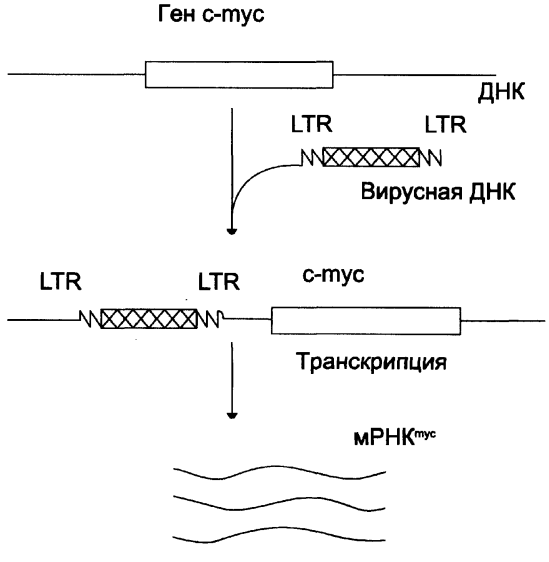


Рис. 16-10. Появление новых промоторов в геноме человека при включении генетического материала вируса в молекулу ДНК.

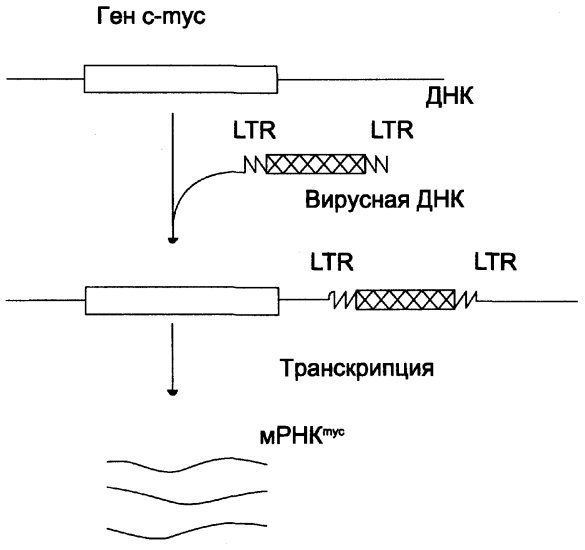


Рис. 16-11. Включение в геном человека провируса, содержащего энхансерную последовательность.

направлении большей злокачественности. А введение противоопухолевого препарата метотрексата (ингибитора дигидрофолатредуктазы) вызывает в ходе лечения амплификацию гена дигидрофолатредуктазы более чем в 400 раз, снижая чувствительность опухолевых клеток к лекарству. В ходе цитологического исследования амплифицированные гены можно обнаружить в виде гомологично окрашенных областей на хромосомах, лишённых центромеров.

Точечные мутации

Онкоген *c-ras*, первоначально обнаруженный в некоторых ретровирусах, кодирует белок с молекулярной массой 21 кД, который назван белком P21. Анализ ДНК-последовательностей *c-ras* протоонкогена из нормальных клеток и *c-ras* онкогена из опухоли жёлчного пузыря человека показал, что эти гены различаются по одному азотистому основанию, соответствующие им белки имеют разные аминокислоты в двенадцатом положении P21. Аналогичные результаты были получены при исследовании структуры *c-ras* онкогена из других опухолей человека. Результат во всех случаях был одним и тем же: в структуре онкогена обнаруживалась одна миссенс-мутация, хотя положение мутации в гене могло быть разным. Тем не менее эта мутация изменяла конформацию кодируемого белка и снижала его ГТФ-азную активность. Мутантный белок вызывал длительную стимуляцию аденилатциклазы, повышение в клетке концентрации цАМФ и активацию цАМФ-зависимых протеинкиназ.

Обнаружены мутации, вызывающие постоянную активацию цитозольной тир-ПК онкогена *src* и Сер-Тре-ПК онкогенов *mos* и *ret*. В результате ферменты фосфорилируют одну из изоформ фосфолипазы С, включают инозитолфосфатный путь передачи сигнала, активируют транскрипционные факторы, которые стимулируют клетки к пролиферации и делению.

В карциномах молочной железы и яичников часто обнаруживают онкоген *erb B2* или *neu*, являющийся гомологом рецептора эпидермального фактора роста. Молекула рецептора содержит 3 домена: внеклеточный, или рецепторный домен, домен, пронизывающий мембрану, и внутриклеточный домен, обладающий активностью Тир-ПК.

В ходе трансформации этот ген рецептора амплифицируется и утрачивает фрагмент, ответственный за связывание фактора роста. В результате в клетках образуется белок с нерегулируемой активностью Тир-ПК («эффект нажатой кнопки»), который стимулирует митотические процессы в клетке.

Хромосомные транслокации

В опухолевых клетках часто обнаруживаются хромосомные транслокации, когда фрагмент одной хромосомы отделяется и включается в другую хромосому. Если участок второй хромосомы отдаёт на первую соответствующий фрагмент, то такую транслокацию называют реципрокной транслокацией. Изменение положения гена в ряде случаев увеличивает его экспрессию и стимулирует малигнизацию. Так, в геноме пациентов с хроническим миелолейкозом имеет место **реципрокная транслокация**, в ходе которой протоонкоген *abl* перемещается из хромосомы 9 в хромосому 22 (t 9:22) с образованием укороченной филадельфийской хромосомы (рис. 16-12, А), которая легко обнаруживается при рассмотрении хромосом под микроскопом. В результате в филадельфийской хромосоме появляется гибридный ген *c-abl-bcr*, кодирующий белок с высокой активностью тир-ПК. Этот фермент вызывает последовательность событий, стимулирующих злокачественную трансформацию кроветворных клеток.

При лимфоме Бёркитта протоонкоген *c-myc* переносится из положения на хромосоме 8 в

хромосому 14 (t 8:14). Транслокация такого типа обнаружена у 90% больных, а в 10% случаев имеет место t 8:2 или t 8:22. Установлено, что во всех случаях ген *c-myc* перемещается в область сильного промотора генов, кодирующих H- или L-цепи иммуноглобулинов. В результате в клетках происходит гиперпродукция нормального белка C-MYC, который представляет собой транскрипционный фактор, участвующий в ранних стадиях пролиферации (рис. 16-12, Б).

Б. Мутации в генах-супрессорах опухолей

При ретинобластоме (редком детском онкологическом заболевании сетчатки глаза, 1:20 000 детей) наблюдают делецию в локусе *rb1* хромосомы 13. На основании эпидемиологических исследований и статистического анализа было установлено, что ретинобластома развивается в случае мутации в гене обоих аллелей ретинобласта (рис. 16-13). Анализ ДНК из участков нормальной ткани и опухоли, полученных от больных в ходе операции, показал, что в образцах нормальной ткани ДНК гена *rb1* гетерозиготна, т.е. содержит один неизменённый и другой изменённый аллели, тогда как в опухолевой ткани оба аллеля изменены, т.е. произошла потеря гетерозиготности. Мутация инактивирует белок, и он перестаёт оказывать ингибирующее действие на пролиферативные процессы, инактивация наблюдается и в том

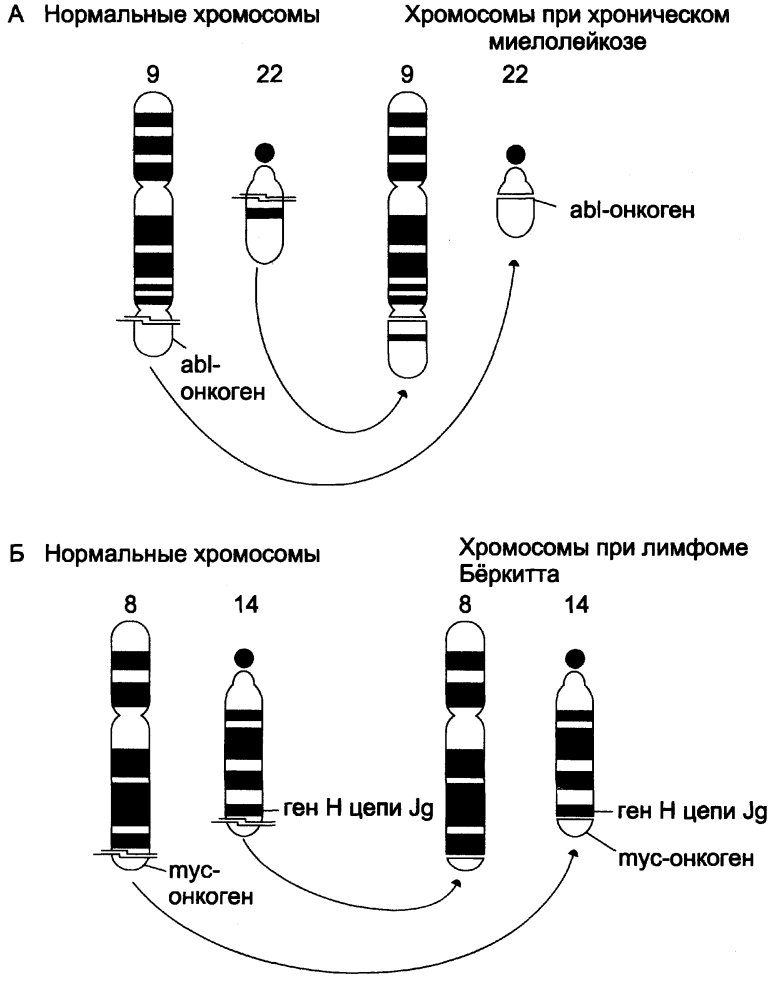


Рис. 16-12. Хромосомные транслокации и активация протоонкогенов. А — хронический миелолейкоз; Б — лимфома Бёркитта.

случае, если *rb1* связывается с вирусными белками-ингибиторами.

При наследственной ретинобластоме (~40% случаев) часто встречаются множественные опухоли. Они вызваны тем, что мутации в единственном неповреждённом аллеле могут возникать в нескольких ретинобластах. При ненаследственной спорадической форме болезни (~60% случаев) множественные опухоли редки, так как инактивация гена в обоих аллелях одной клетки происходит крайне редко.

Мутации в гене *p53* встречаются более чем у половины онкологических больных. Статистика показывает, что функционально неактивный P53 обнаруживается у 70% больных раком толстой кишки, в 50% случаев рака лёгких и 40% — рака груди.

Около 80% мутаций в гене *p53* — миссенс-мутации, затрагивающие наиболее консервативные области гена в участках CG динуклеотидных последовательностей, которые имеют как наследственный, так и ненаследственный характер.

Другой отличительной особенностью гена *p53* является то, что мутации в нём проявляются по доминантному типу в результате нарушения структуры в одной из копий генов диплоидной клетки, тогда как для остальных генов-супрессоров опухолей мутации проявляются по рецессивному механизму.

В нормальных тканях концентрация белка P53 очень низка. Мутации удлиняют полупериод жизни этого белка от нескольких минут до нескольких часов, в результате в ядрах клеток повышается концентрация мутантной формы P53. Это нашло практическое применение в иммуногистохимическом исследовании опухолей на содержание мутантного белка.

Инактивация белка P53 происходит не только в результате повреждений в структуре гена, но и при образовании неактивных белок-белковых комплексов с вирусными белками (например, SV40 большим Т-антигеном) или при разрушении белка, которое стимулируют онкобелки, образующиеся при заражении вирусом папилломы человека.

V. ТЕОРИЯ МНОГОСТУПЕНЧАТОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА НА МОДЕЛИ РАКА ПРЯМОЙ КИШКИ

К числу наиболее распространённых типов злокачественных опухолей относят рак прямой кишки. Большинство заболеваний этой этиологии начинается с возникновения доброкачественных опухолей, называемых аденомами. На

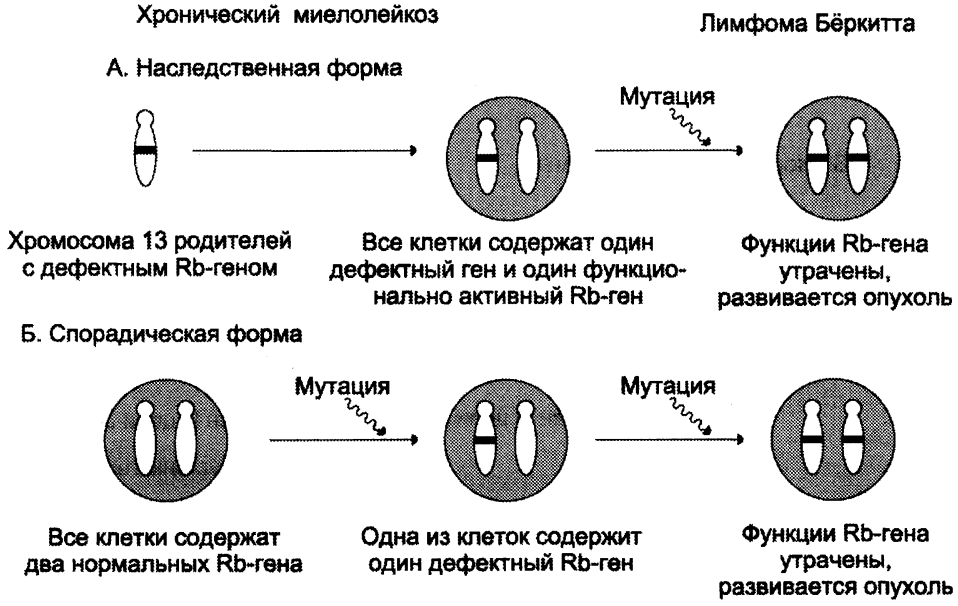


Рис. 16-13. Развитие наследственной (А) и спорадической (Б) форм ретинобластомы.

основании сравнения характерных хромосомных кариотипов, онкогенов, генов-супрессоров опухолей и уровня метилирования ДНК в образцах неизменённой ткани прямой кишки, аденом разного размера, карцином и метастазов рака прямой кишки была предложена модель, устанавливающая последовательность событий в ходе образования карцином прямой кишки.

Как видно из рис. 16-14, развитию рака предшествуют 5—7 мутаций в онкогенах и генах-супрессорах опухолей, гипометилирование ДНК и нарушения в работе ДНК-репарирующих систем. К ранним событиям этого процесса относят мутации в гене-супрессоре опухолей, локализованном в хромосоме 5. Они обнаружены у пациентов с семейным аденоматозным полипозом FAP (от англ. *familial adenomatous polyposis*), в результате чего заболевание дало соответствующее название гену (*fap*-ген).

На ранних стадиях процесса происходит снижение уровня метилирования ДНК и активация *ras*-онкогена на хромосоме 12, которые способствуют росту аденом. Дефекты в работе репарирующих систем, утрата или инактивация генов-супрессоров опухолей вызывают появление генетической нестабильности и озлокачествление опухоли. При этом последовательность изменений несущественна, важнее общее накопление изменений в геноме. Дедифференцировка и продолжающееся накопление мутаций сообщают опухолевым клеткам способность к инвазии и метастазированию.

Нарушения в работе ДНК-репарирующей системы, участвующей в исправлении ошибок репликации, отмечены при наследственной форме неполипозного рака прямой кишки и опухолях некоторых других тканей. В этих случаях имела место микросателлитная нестабильность. Микросателлитные последовательности — короткие некодирующие последовательности ДНК, которые повторяются в геноме много раз. В опухолях, в отличие от нормальной ткани, микросателлитные последовательности варьируют по

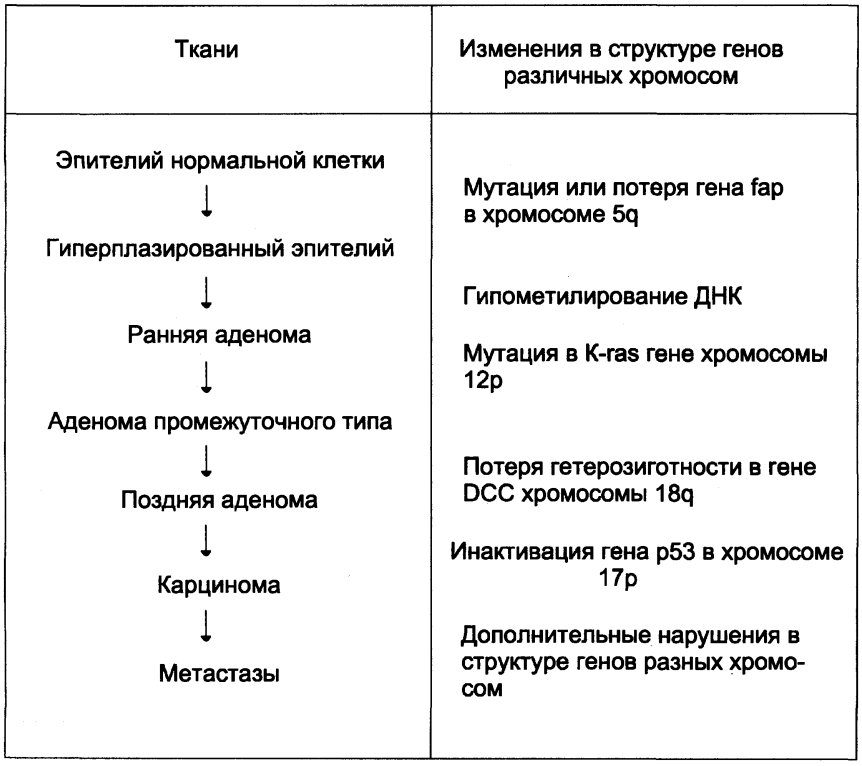


Рис. 16-14. Генетическая модель развития рака прямой кишки. Ранняя аденома имеет диаметр менее 1 см; промежуточный тип аденомы имеет больший размер, чем ранняя аденома. У поздних аденом отмечают локусы раковых клеток.

длине, указывая на то, что опухолевые клетки либо теряют, либо приобретают лишние нуклеотиды. Это явление может наблюдаться в том случае, если в ходе репликации две нити ДНК скользят друг относительно друга. В зависимости от направления скольжения новая нить ДНК будет короче или длиннее родительской. В результате во вновь синтезированной двухцепочечной ДНК появятся небольшие петли неспаренной ДНК, которые в нормальных тканях устраняются репарирующей системой. В опухолях эта система работает плохо: так, практически во всех случаях рака прямой кишки обнаружена мутация в генах, кодирующих белки репарирующего комплекса.

VI. ИНВАЗИЯ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ

Доброкачественные опухоли иногда могут расти быстро и достигать больших размеров, но они не метастазируют. Только для злокачественных опухолей обнаруживается способность прорастать в другие ткани, как соседние, так и отдалённые, где они образуют вторичные опухоли.

Первоначально опухолевые клетки образуют клон генетически идентичных (моноклональных) клеток, которые делятся чаще, чем соседние, нормальные клетки. Они не запрограммированы к движению. Однако состав и поведение таких клеток не статичны, и потомки одной клетки начинают «расходиться» как генетически, так и фенотипически. Каждое последующее поколение клеток обнаруживает увеличение отклонений от нормы.

Когда клеточная масса опухоли достигает диаметра около 2 мм, клетки секретируют белковые факторы, стимулирующие рост соединительной ткани, которая бы окружила опухоль, и васкулярные клетки, индуцирующие рост кровеносных сосудов, или ангиогенез. Установлено, что рост сосудов является ключевым звеном в прогрессии опухоли. Щелочной и кислый факторы роста фибробластов, секретируемые опухолевыми клетками, стимулируют пролиферацию эндотелиальных клеток и образование новых капилляров. Ангиогенез создаёт опухолевым клеткам дополнительные преимущества для роста и инвазии.

А. Изменение состава мембранных белков

В метастазирующих клетках происходит существенное изменение состава мембранных белков. В эпителиальных клетках основным белком, ответственным за адгезивные свойства, служит **Е-кадгерин** (см. раздел 5), внеклеточный домен которого ответственен за образование межклеточных связей с молекулами Е-кадгерина соседних клеток. Другой класс белков — **катенины** — отвечает за связывание Е-кадгерина с цитоскелетом.

В опухолевых клетках содержание Е-кадгерина снижено, а молекулы катенинов либо функционально неактивны, либо отсутствуют. Мутации в гене Е-кадгерина редки, но если они возникают, то у таких пациентов наблюдают низкодифференцированные формы рака. Контактное торможение и связь клеток друг с другом нарушаются, внутриклеточная архитектоника мало напоминает структуру нормальных клеток.

Было доказано, что β-катенин участвует также во внутриклеточной системе передачи сигналов и стимулирует пролиферацию клеток. Однако, будучи в комплексе с APC-белком (от англ. *adenomatous poliposis coli*), он ингибирует деление и участвует в уничтожении дефектных клеток через апоптоз. Если в результате мутаций один из этих белков будет изменён, то комплекс не образуется, и β-катенин, не сдерживаемый APC-белком, взаимодействует с ДНК и стимулирует вступление клеток в клеточный цикл. Появление мутаций в APC коррелирует с ростом полипов (небольших доброкачественных опухолей) в прямой кишке, а у людей с наследственной формой мутантного APC повышается риск перерождения полипов в опухоль.

В связывании клеток с коллагеном участвуют **белки-интегрины**, а с другими компонентами межклеточного матрикса и базальными мембранами — **фибронектин и ламинины** (см. раздел 15). При трансформации клеток количественное и качественное содержание этих белков меняется. В большинстве опухолей снижено количество фибронектина и синтезируются модифицированные интегрины, которые помогают инвазивным клеткам мигрировать через соединительную ткань и стенку капилляров.

Б. Ферменты, приспосабливающие опухолевые клетки к движению

Инвазия — активный процесс, включающий стадии, в которых опухолевая клетка:

- проходит через межклеточный матрикс, достигая кровеносного или лимфатического сосуда;
- преодолевает стенку сосуда и поступает в кровеносное русло или лимфу;
- циркулирует с током крови в виде надмолекулярных комплексов с белками и клетками крови;
- прикрепляется к стенке сосуда и повторяет процесс в обратном направлении, продвигаясь на 2–3 клеточных диаметра в инвазируемую ткань;
- закрепляется и начинает формировать новую опухоль.

Выполнение этих функций требует синтеза специфических ферментов, рецепторов и энергии. Метастазирующие клетки и окружающие опухолевую ткань фибробласты секретируют целый набор ферментов, обеспечивающих разрушение межклеточного матрикса и базальных мембран:

коллагеназы, расщепляющие коллаген межклеточного матрикса;

гепаразу, катализирующую гидролиз гепарансульфата — преобладающего протеогликана базальной мембраны;

катепсин В — мощную протеазу, которая в нормальных клетках локализована в лизосомах, а у метастазирующих клеток встроена в плазматическую мембрану и помогает им покинуть родительскую ткань. Этот фермент активирует проколлагеназу, которая специфически расщепляет коллаген IV типа (см. раздел 15);

плазмин, который расщепляет некоторые белки межклеточного матрикса неколлагенового происхождения;

семейство металлопротеаз, участвующее в разрушении различных компонентов межклеточного матрикса. Они секретируются в виде проферментов и активируются либо катепсином В, либо урокиназой типа активатора плазминогена.

В. Циркуляция метастазирующих клеток

После успешного прохождения через соединительную ткань органа опухолевые клетки продвигаются к ближайшему кровеносному сосуду, проталкиваются между эндотелиальными клетками, выстилающими сосудистую стенку, и выходят в кровоток (рис. 16-15).

Кровеносные сосуды являются каналами, по которым опухолевые клетки доставляются к местам новой локализации. Они транспортируются по крови в виде комплексов с тромбоцитами, миграционными факторами и фрагментами межклеточного матрикса, которые маскируют их от иммунологического надзора и обеспечивают прикрепление к базальной мембране в органах-мишенях.

Г. Формирование вторичных опухолей

Углеводы, выступающие на поверхность опухолевых клеток, связываются с селектином — углеводным компонентом рецепторов эндотелиальных клеток. Каждый тип опухолевых клеток имеет на плазматической мембране характерную для них углеводную часть, которая может взаимодействовать лишь с определёнными олиго- и полисахаридами клеток эндотелия. Однако эти взаимодействия между углеводами слабы, и клетка окончательно прикрепляется к стенке сосуда с помощью интегринов (рис. 16-16).

Эти особенности закрепления опухолевой клетки в другом органе лежат в основе тропности процесса: метастазы появляются не в любых, а в «излюбленных» данной формой опухоли местах. Так, рак простаты, как правило, даёт метастазы в кости, рак молочной железы и лёгкого — в мозг, а рак прямой кишки — в печень.

VII. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ И ЛЕЧЕНИЯ РАКА

Несмотря на серьёзные и разносторонние исследования последних лет, в области онкологии остаётся много проблем, которые в первую очередь связаны с ранней диагностикой и лечением отдельных нозологических форм заболевания. Одним из направлений диагностики опухолей являются поиск и разработка методов выявления индикаторов опухолевого процесса — опухолевых маркёров.

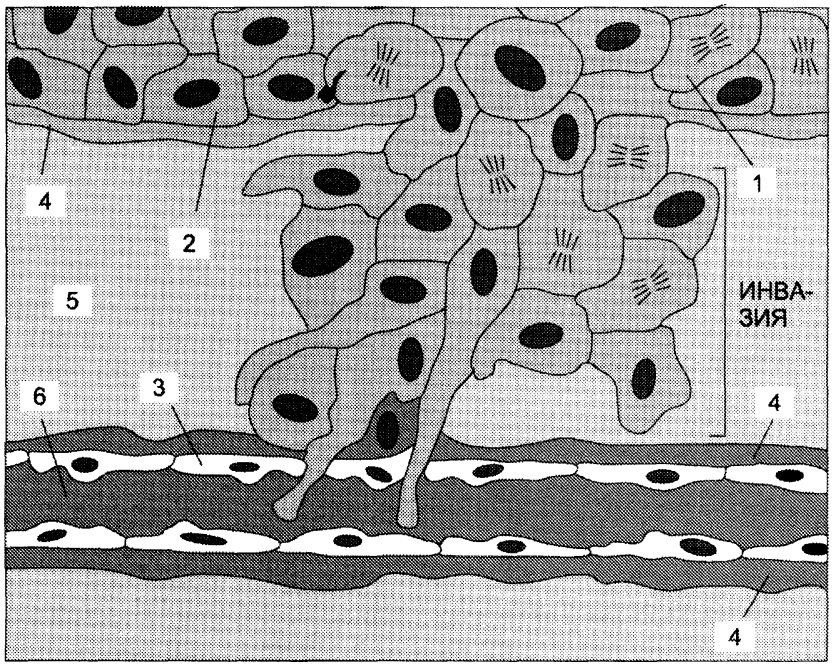


Рис. 16-15. Миграция опухолевых клеток в кровеносный или лимфатический сосуд. 1 — делящаяся опухолевая клетка; 2 — неделящаяся опухолевая клетка; 3 — эндотелиальная клетка; 4 — базальная мембрана; 5 — строма; 6 — просвет кровеносного сосуда.

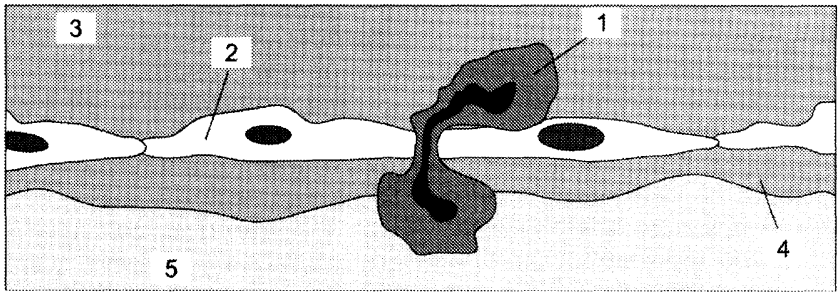


Рис. 16-16. Начало формирования вторичной опухоли. 1 — опухолевая клетка; 2 — эндотелиальная клетка; 3 — просвет кровеносного сосуда; 4 — базальная мембрана; 5 — строма.

А. Опухолевые маркеры

Опухолевыми маркёрами (ОМ) называют соединения (белки, биологически активные пептиды, гормоны, ферменты и метаболиты), которые синтезируются раковыми клетками, либо клетками нормальных тканей в ответ на развитие рака. Они должны синтезироваться в организме опухоленосителя и отсутствовать в нормальных клетках, так как являются продуктами аномальной экспрессии генома раковой клетки. ОМ, как правило, обнаруживают в крови или других биологических жидкостях организма и используют для скрининга населения на носительство опухоли, как прогностический фактор, для оценки состояния пациента в клинической стадии и мониторинга в ходе лечения, а также в целях обнаружения рецидивов болезни.

Согласно современной классификации ОМ делят на три основные группы:

- первичные опухолево-ассоциированные;
- вторичные, продуцируемые опухолью (специфические и неспецифические);
- вторичные, индуцируемые опухолевым процессом.

Эта классификация не лишена недостатков, так как одно и то же соединение может синтезироваться клетками опухоли и вырабатываться нормальными клетками органа в ответ на опухолевую инвазию.

Большинство известных в настоящее время ОМ не лишены недостатков. Почти во всех случаях при ряде патологических состояний, таких как воспалительные заболевания печени, поджелудочной железы и лёгких, отмечается неспецифическое, часто незначительное повышение уровня маркёра; иногда ОМ не определяется на ранней стадии болезни.

Онкофетальные белки

В клинической практике наиболее часто используют определение белков, которые обнаруживаются в эмбриональных тканях человека и крови в период внутриутробного развития. Они исчезают полностью либо остаются в следовых количествах после рождения. В ходе опухолевой прогрессии они начинают синтезироваться снова и секретируются в кровь.

Карциноэмбриональный антиген (КЭА) — одноцепочечный белок, гликопротеин с молекулярной массой от 150 до 300 кД, углеводная компонента которого составляет от 45 до 57% молекулярной массы. В углеводную часть молекулы в значительных количествах входят: фруктоза, манноза, галактоза, N-ацетил-глюкозамин. Определение этого ОМ наиболее часто проводят для диагностики рака прямой кишки и в слежении за состоянием больного в постоперационном периоде. После полного и удачного удаления опухоли концентрация КЭА снижается. Последующее повышение значений этого показателя у оперированных больных указывает на рецидив болезни и высокую вероятность метастазов.

α-Фетопротеин (α-ФП) — гликопротеин с молекулярной массой 61–70 кД, близкий по строению к альбумину. Углеводная часть составляет ~5% от общей массы белка. Он является нормальным сывороточным белком зародыша, синтезируется в печени, желточном мешке и ЖКТ и выделяется в кровь. Наиболее высокая концентрация этого белка наблюдается в ходе эмбриогенеза и внутриутробного развития плода. После рождения и в ходе первого года жизни ребёнка синтез и секреция α-ФП резко снижаются, и у взрослого человека его концентрация составляет лишь 20 нг/мл. Концентрация α-ФП повышается в крови при развитии рака печени, поэтому его определение используют для диагностики и в дальнейшем для оценки эффективности лечения.

В качестве опухолевых маркёров часто используют хорионический гонадотропин, плацентарную щелочную фосфатазу и некоторые другие плацентарные белки. β-Хорионический гонадотропин (β-ХГТ) — плацентарный гормон гликопротеиновой природы с молекулярной массой 45 кД, состоящий из α- и β-субъединиц. В норме он не обнаруживается вовсе или содержится в ничтожных концентрациях. При беременности гормон начинает синтезироваться и секретироваться в кровь, достигая максимальных значений к 12 нед (тест на беременность). Затем его содержание медленно снижается и остаётся на очень низком уровне до и после родов.

При опухолях яичников и семенников концентрация гормона, а в некоторых случаях только его β-субъединицы, повышается. Поскольку С-концевой участок β-субъединицы ХГТ иммунореактивен, то иммуногистохимическое обнаружение гормона служит хорошим онкомаркёром в диагностике и слежении за ходом лечения наследственных и спорадических опухолей. Измерение уровня β-ХГТ в спинномозговой жидкости помогает диагностировать метастазы в мозг и в ЦНС.

В качестве ОМ используют также дифференцировочные антигены, которые представляют собой органо- или опухолеспецифические гликопротеины лимфоцитов (тканевый полипептидный антиген, тканевый полипептидный специфический антиген и другие), определяющиеся в крови с помощью моноклональных антител.

Для рака предстательной железы в качестве ОМ наиболее чувствителен простатоспецифический антиген PSA (от англ. *prostate specific antigen*). Он практически не определяется у женщин, у мужчин в норме ниже 2 нг/мг, но существенно возрастает в злокачественных и доброкачественных опухолях предстательной железы.

Гормоны и их рецепторы (эстрогены и андрогены, паратгормон, кальцитонин, гормон роста, инсулин, глюкагон, АКТГ, катехоламины, серотонин) являются ОМ гормонпродуцирующих органов. Их определение широко используют в клинической практике (табл. 16-2).

Таблица 16-2. Гормоны как опухолевые маркёры некоторых видов опухолей

Гормон	Вид опухоли
АКТГ	Рак лёгкого, рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы
Катехоламины	Феохромоцитома
Инсулин	Инсулинома
Глюкагон	Глюкагонома
Кальцитонин	Карцинома и медуллярный рак щитовидной железы

Определение рецепторов гормонов в качестве опухолевых маркёров оказалось важным тестом в выявлении пациентов, у которых после хирургического вмешательства велика вероятность рецидивов заболевания и которым необходима химиотерапия.

Так, для больных раком молочной железы важнейшим фактором прогноза дальнейшего течения болезни является определение рецепторов эстрогенов и прогестерона. Присутствие рецепторов позволяет в большом проценте случаев (50–75%) получить положительные результаты при лечении антиэстрогеном тамоксифеном и увеличивает выживаемость.

Некоторые ферменты и белки используют для диагностики и контроля за эффективностью терапии. Так, при различных морфологических вариантах рака лёгкого наиболее перспективным является определение нейронспецифической енолазы и растворимого фрагмента цитокератина — структурного компонента цитоскелета эпителия бронхов.

Высокая активность в биопсийном материале катепсина D свидетельствует о высоком метастатическом потенциале опухоли и коррелирует с низкой выживаемостью онкологических больных. Другим ОМ, свидетельствующим о неблагоприятном течении болезни, является высокая активность сериновой протеазы — активатора плазминогена урокиназного типа. Этот фермент катализирует образование плазмина, который участвует в активации металлопротеаз и способствует развитию инвазивных процессов и метастазирования.

К ОМ, появляющимся в организме больного в ответ на развитие опухолевого процесса, относят белки острой фазы воспаления: ферритин, церулоплазмин, гаптоглобин, С-реактивный белок, изоформы ЛДГ и креатинкиназы.

Б. Лечение онкологических больных

К лечебным мероприятиям прибегают при обнаружении опухоли или на более поздних стадиях, используя химио-, радиотерапию и симптоматическое лечение. Важное условие успешного лечения — радикальное хирургическое удаление опухоли. Тактика лечения должна удовлетворять двум основным требованиям: оказывать **цитостатический** (предотвращающий пролиферацию) и **цитотоксический** (уничтожающий опухолевые клетки) **эффекты**. Однако химиотерапия прекращает синтез ДНК и клеточное деление по механизмам, общим для всех клеток, отсюда её токсичность и многочисленные побочные эффекты на здоровые, быстро пролиферирующие клетки: фолликулы волос, клетки кроветворной системы и кишечника. Успешность лечения связана с большей чувствительностью неопластических клеток к лекарствам по сравнению с нормальными, неизменёнными клетками и отражает компромисс между эффективностью в отношении опухоли и токсичностью для здоровых тканей. Лекарственные препараты, используемые в химиотерапии, включают алкилирующие агенты, повреждающие ДНК, антиметаболиты, которые ингибируют синтез нуклеиновых кислот, антибиотики, гормоны и природные соединения, оказывающие разнообразные эффекты.

Алкилирующие агенты

Алкилирующие агенты образуют связи с основаниями в молекуле ДНК и нарушают репликацию. Большинство алкилирующих агентов (циклофосфан, цисплатин, карбоплатин и др.) имеют две функциональные группы, каждая из которых может взаимодействовать с основаниями ДНК, образуя внутриклеточные и межцепочечные поперечные сшивки в двойной спирали ДНК. Эти связи могут формироваться на любой стадии клеточного цикла, благодаря чему действие алкилирующих агентов неспецифично в отношении фаз клеточного цикла (рис. 16-17).

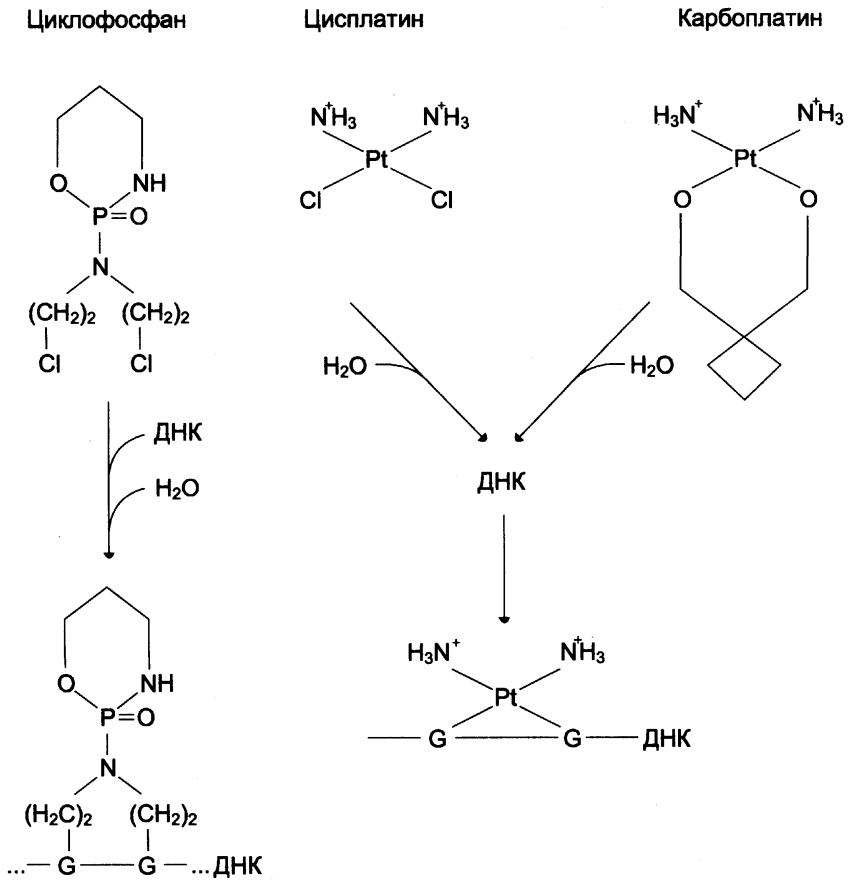


Рис. 16-17. Образование сшивок алкилирующих агентов с остатками гуанина в молекуле ДНК.

Антиметаболиты

Среди антиметаболитов в клинической практике наиболее часто используют метотрексат, 5-фторурацил и цитозинарабинозид (см. разд. 10).

Метотрексат — производное фолиевой кислоты, по конкурентному механизму ингибирующий дигидрофолатредуктазу, активность которой поддерживает необходимую скорость синтеза пуриновых и тимидиновых нуклеотидов в клетках, а в конечном счёте — РНК и ДНК.

5-фторурацил (5-FU) может превращаться в нуклеозидтрифосфат и включаться в РНК. Модифицированная таким образом РНК становится функционально неактивной. Кроме того, из 5-FU может синтезироваться 5-FdУМФ, который образует неактивный тройной комплекс с N^5,N^{10}-метилен-H_4-фолатом и тимидилатсинтазой и, нарушая обеспечение клетки тимидиловыми нуклеотидами, ингибирует синтез ДНК.

Цитозин арабинозид (Ara-C) может фосфорилироваться до Ara-ЦТФ, который, с одной стороны, служит ингибитором ДНК полимеразы α, а с другой — частично включается в ДНК. Оба эффекта Ara-C блокируют синтез ДНК в S-фазе клеточного цикла.

Антибиотики антрациклинового ряда: доксорубицин, карминомицин и рубомицин (см. разд. 4) широко используют в лечении лейкозов и солидных опухолей, таких как рак молочной железы, лёгких и яичников. Эти полициклические соединения оказывают многоплановое действие на структуру и синтез ДНК: инициируют и вызывают частичное расщепление двойной спирали; способствуют образованию одно- и двухцепочечных разрывов; связываются с топоизомеразой II, участвующей в продвижении репликативной вилки по матрице ДНК. Кроме того, они генерируют свободные радика-

лы, которые увеличивают число разрывов в молекуле ДНК.

Алкалоиды *Vinca* — винкристин и винбластин. Растительные алкалоиды, которые связываются с белком микротрубочек тубулином и препятствуют его полимеризации. Их рассматривают как митотические яды, препятствующие продвижению клеток по циклу на стадии метафазы. Алкалоиды *Vinca* нарушают все виды подвижности клеток и её органелл, связанные с сокращением или релаксацией микротрубочек. Винбластин и винкристин используют в клинической практике при лечении острого лимфобластного лейкоза, рака молочной железы, нейробластомы, сарком мягких тканей, меланомы, опухолей яичника.

Гормональная терапия

Хотя в процессе злокачественной трансформации нарушаются некоторые механизмы, контролирующие рост и дифференцировку тканей, но ряд опухолей всё же не ускользает полностью из-под регуляторного влияния организма, сохраняя рецепторы гормонов и нейромедиаторов на поверхности или внутри клеток. К ним прежде всего относят опухоли, происходящие из гормонзависимых тканей: молочной железы, матки, яичников, гипофиза, щитовидной железы, надпочечников, предстательной железы и некоторых других.

Поскольку синтез большинства стероидных гормонов регулируется гипоталамо-гипофизарной системой, то блокирование митогенного эффекта половых и кортикостероидных гормонов возможно на нескольких стадиях (рис. 16-18), например: на стадии действия гонадотропин-рилизинг гормона на переднюю долю гипофиза; ингибируя синтез стероидных гормонов на стадии превращения тестостерона в эстрадиол под действием фермента ароматазы; за счёт присоединения антагонистов к рецепторам стероидных гормонов.

Наиболее широко используют тамоксифен (рис. 16-19). Вместе с другими классами стероидных гормонов (прогестогенами, глюкокортикоидами, андрогенами) он очень эффективен в лечении рака молочной железы.

Более половины опухолей молочной железы, яичников и эндометрия содержат рецепторы эстрогенов и прогестерона и поддаются гормонотерапии эстрогенами, антиэстрогенами и прогестинами, а также комбинациями гормонов с цитостатиками. Опухоли, не содержащие рецепторов, малочувствительны к гормонотерапии, поэтому определение уровня рецепторов эстрогенов и прогестинов широко используют для прогнозирования эффективности гормонтерапии при опухолях молочной железы, яичников и матки.

B. Лекарственная устойчивость опухолевых клеток

Несмотря на существенные успехи в области новых препаратов и подходов к лечению опухолей, химиотерапия во многих случаях остаётся малоэффективной. Главным фактором, ограничивающим успешность применения противоопухолевых средств, является лекарственная устойчивость, которая может быть:

- первичной и, следовательно, свойственной злокачественным клеткам до начала лечения определёнными препаратами;
- вторичной, которая развивается в ответ на введение лекарства.

В последнем случае в начале лечения наблюдается положительная динамика, но через некоторое время она исчезает. Высокая изменчивость опухолевых клеток и постоянно действующий отбор на большую злокачественность приводят к тому, что первоначально с помощью препаратов удаётся уменьшить размер опухоли. Позже оставшаяся субпопуляция клеток становится резистентной сразу к целой группе лекарств, развивается так называемая **множественная лекарственная устойчивость** (МЛУ) , сопровождающаяся рецидивами болезни и метастазами. Так, при лечении, например, винкристином, может возникнуть устойчивость опухолевых клеток не только к самому винкристину, но и к другим препаратам, которые не сходны по структуре и функциям с использованным лекарством, таким как доксорубицин и этопозид. Существуют разные механизмы возникновения МЛУ (табл. 16-3).

Некоторые биохимические механизмы лекарственной устойчивости, обнаруженные в опухолевых клетках, вызваны:

- снижением накопления препарата в клетках;
- появлением альтернативных путей метаболизма лекарства;
- изменением структуры клеток-мишеней для данного препарата;

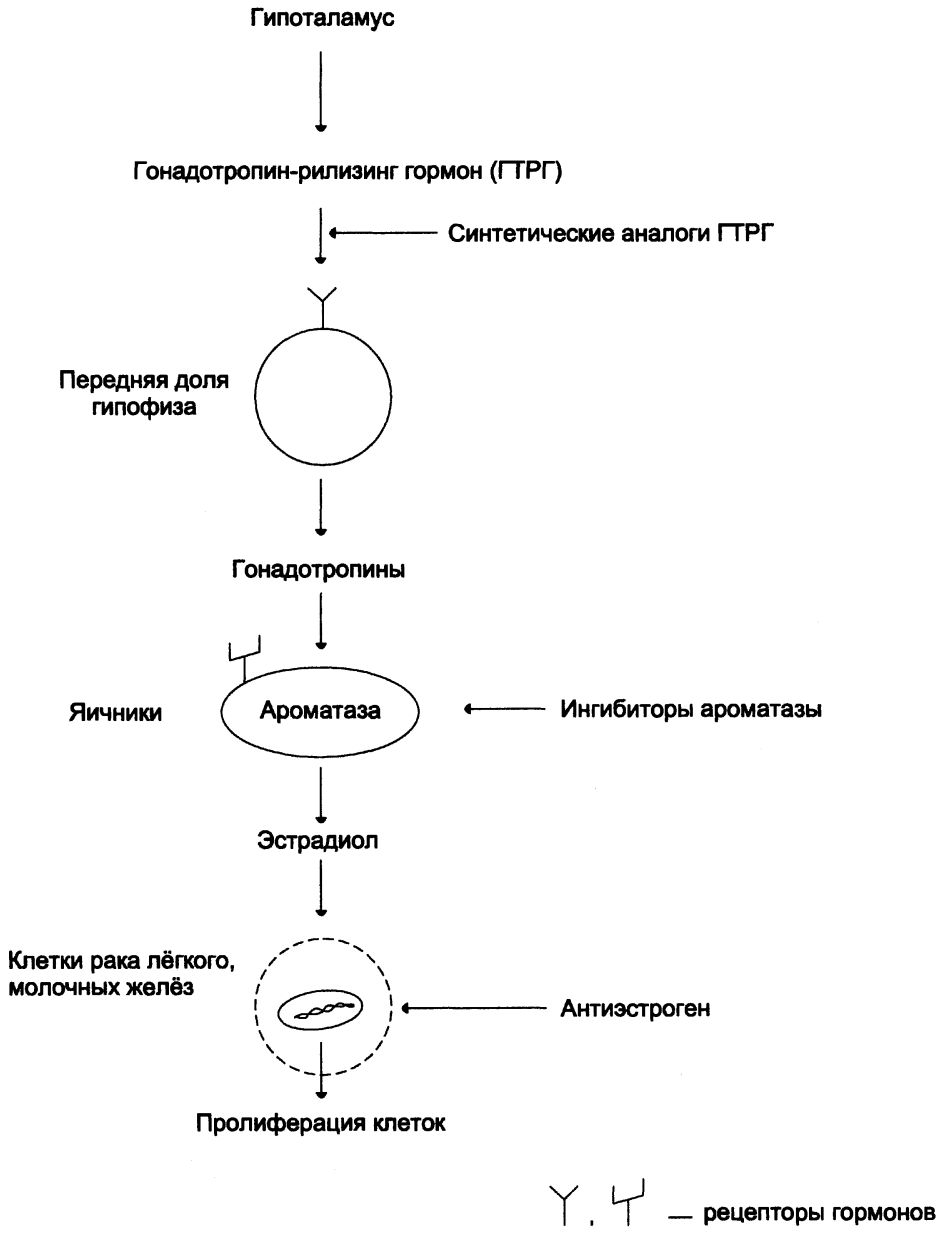
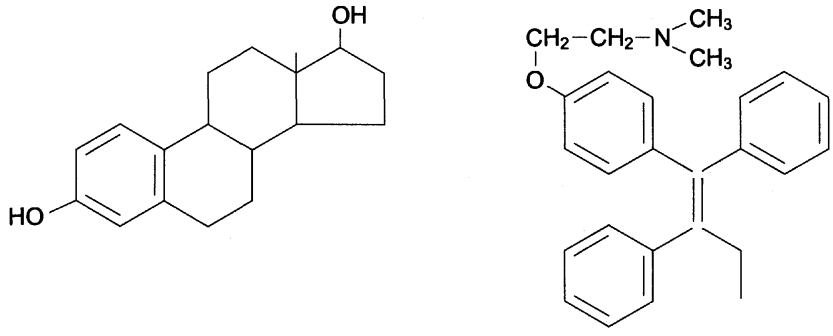


Рис. 16-18. Терапия гормонально-зависимого рака.

- ослаблением апоптоза — процесса запрограммированной гибели клеток, с помощью которого из организма удаляются изменённые клетки.

Мембранный транспорт и Р-гликопротеины

В ряде случаев причиной МЛУ является почти 1000-кратное увеличение синтеза в опухолевых клетках мембранного белка Р-гликопротеина (см. раздел 12). Этот белок действует как энергозависимая помпа, которая осуществляет АТФ-зависимую «откачку» лекарств из клеток и препятствует их внутриклеточному накоплению в цитотоксических концентрациях. Возникновение МЛУ вызвано амплификацией и/или точечными мутациями в *mdr*-генах. Появление МЛУ коррелирует с плохим прогнозом заболевания.



Эстрадиол Тамоксифен

Рис. 16-19. Строение эстрадиола и тамоксифена.

Таблица 16-3. Механизмы возникновения множественной лекарственной устойчивости

Механизм	Лекарство	Пример
Снижение поступления лекарственного препарата в клетки-мишени	Метотрексат	Мутация в белке-переносчике
Снижение скорости превращения лекарства в активную форму	Циклофосфамид	Снижение активности цитохрома P_{450}
Повышение скорости инактивации лекарства	Цитарабин	Повышение активности дезаминаз, действующих на цитозин
Связывание или расщепление лекарства	Цисплатин	Увеличение количества металлотионеина, связывающего тяжёлые металлы
Мутация в ферменте-мишени	Метотрексат	Мутантная дигидрофолатредуктаза
Увеличение количества фермента-мишени	Метотрексат	Амплификация гена дигидрофолат-редуктазы
Ускорение механизмов репарации	Алкилирующие агенты: эпозид, доксорубицин	Увеличение количества специфических репарирующих ферментов

Поиски ингибиторов Р-гликопротеина показали, что блокаторы Ca^{2+}-каналов верапамил и циклоспорин могут конкурировать с винкристином за активные центры этого белка и снижать устойчивость клеток к лекарству.

В этой связи практика показала, что лечение с помощью одного лекарства за редким исключением не способно привести к исцелению. Как правило, химиотерапию сочетают с радиотерапией, вызывающей в облучённой ткани индуцированные свободными радикалами разрывы нитей ДНК и апоптоз.

Г. Новые направления в лечении опухолей

Фотодинамическая терапия стала перспективным направлением лечения опухолей. Принцип терапии состоит в разрушении опухоли в результате введённых в неё веществ, которые переходят в активированное состояние при воздействии на них лазера. При облучении в присутствии молекулярного кислорода генерируются свободные радикалы. Цитотоксический эффект наблюдают главным образом в резуль-

тате разрушения мембран клеток, а не повреждения ДНК, так как фотодинамическая терапия не вызывает мутаций.

Направленная доставка лекарств в клетки-мишени основана на разной экспрессии мембранных антигенов (рецепторов ФР, карциноэмбрионального антигена и антител) на поверхности опухолевых и нормальных клеток. Количество таких белков на плазматической мембране раковых клеток сильно увеличено по сравнению с нормальными клетками.

Лиганды к этим белкам используют для доставки либо фермента, катализирующего превращение пролекарства на поверхности опухолевой клетки в активное лекарство, либо цитотоксического препарата, который благодаря этим белкам поступает в клетку-мишень по механизму эндоцитоза, не вызывая эффекта МЛУ (рис. 16-20).

Подавление ангиогенеза или образования новых кровеносных сосудов приводит к нарушению роста опухоли. Пролиферацию эндотелиальных клеток капилляров можно ингибировать, воздействуя недавно открытыми ингибиторами ангиогенеза: ангиостатином или тромбоспондином.

Перспективными лекарствами могут оказаться синтетические пептиды, являющиеся ингибиторами металлопротеаз. С помощью таких соединений в опытах на животных удавалось ингибировать рост и метастазирование рака прямой кишки.

Генная терапия представляет собой направление по использованию генов для лечения наследственных и опухолевых заболеваний (см. раздел 4). Такой способ лечения становится всё более реальным благодаря достижениям генной инженерии, которые позволяют получать рекомбинантные ДНК, содержащие «лечебный» ген. Основная трудность состоит в разработке метода транспорта импортируемых генов в организм больного.

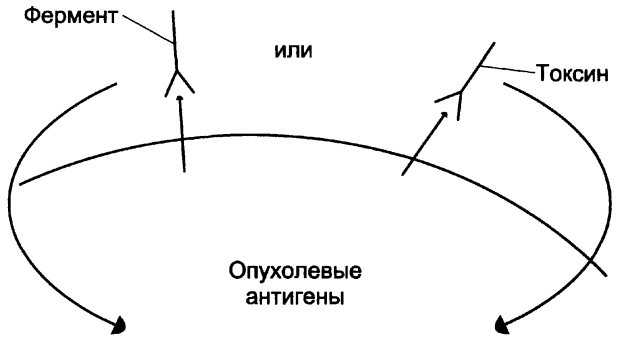


Рис. 16-20. Использование моноклональных антител для доставки лекарств или токсинов в опухолевые клетки.

Клинические испытания проходит лечение больных с меланомой и раком прямой кишки, в ходе которого у пациента извлекают опухоль или клетки костного мозга и облучают. В облучённые клетки вводят «лечебный» ген (например, ген интерлейкина-2 или фактора некроза опухолей) и реимплантируют их больному. Продукты «лечебных» генов увеличивают иммуногенность опухоли и способствуют уничтожению как самой опухоли, так и метастазов.

Применяют также введение в организм вирусов в качестве векторов «лечебных» генов. Чаще всего используют аденовирусные и ретровирусные конструкции, которые легко включаются в ДНК трансформированных клеток. Вирусы лишают генетического материала, существенного для репродукции вирусов и инактивации P53, и на его место вводят «лечебный» ген.

Всё вышесказанное даёт надежду на то, что в ближайшие годы человечество сможет эффективно бороться с онкологическими заболеваниями за жизнь и здоровье больных.

ПРИЛОЖЕНИЯ

АВТОРСКИЙ СПРАВОЧНИК

Составлен с дополнениями по: Англо-русский медицинский энциклопедический словарь (Stedman's Medical Dictionary). — М.: ГЭОТАР, 1995; «Merriam Webster's Medical Desk Dictionary». — Springfield: Merriam-Webster Inc., 1995; http://www.Britannica.com; http://www.rubricon.ru; Энциклопедический словарь медицинских терминов. — М.: Сов. энцикл., 1982–1984.

Аддисон Томас (Addison T.), английский врач (1793–1860); его называют отцом эндокринологии. В 1855 г. опубликовал монографию, содержащую, в частности, классические описания злокачественной анемии (витамин B_{12}–дефицитная анемия; впервые её описал Аддисон в 1849 г., а затем в 1872 г. — Бирмер, назвавший её «прогрессирующей пернициозной» [гибельной, злокачественной] анемией) и хронической надпочечниковой недостаточности; вскоре французский врач Арман Труссо предложил называть эти болезни *аддисоновой* анемией и болезнью Аддисона.

Альцха́ймер Алоис (Alzheimer Alois), немецкий врач-невролог, 1864–1915; опубликовал большое количество статей (алкогольный психоз, шизофрения, эпилепсия, сифилис мозга, хорея Хантингтона, артериосклеротическая атрофия мозга [1894], пресенильный психоз [1907, немецкий психиатр Эмиль Крепелин позднее назвал эту болезнь именем Альцхаймера]).

Андерсен Дороти (Andersen D.H.), американский патолог, 1901–1964; её именем назван гликогеноз типа IV.

Базе́дов Карл Адольф, фон (Basedow Karl Adolph, von), немецкий врач, 1799–1854; приведённое им в 1840 г. описание диффузного токсического зоба считается классическим; в частности, им выделена триада: экзофтальм, тахикардия, зоб.

Барр Ивонна (Barr Yvonne M.), английский вирусолог, р. 1932; вместе с Майклом Энтони Эпстайном в 1964 г. выделила герпес-вирус, в настоящее время называемый Эпстайна–Барр вирус (Epstein–Barr virus — EBV) и вызывающий развитие лимфомы Бёркитта и ряд других злокачественных опухолей человека.

Барр Мюррей (Barr Murray), канадский анатом (р. 1908); в 1949 г. обнаружил в ядрах нейронов скопление хроматина — тельце Барра, служащее признаком принадлежности исследуемых клеток генетически женской особи.

Браунште́йн А.Е. Отечественный учёный. Открыл аминотрансферазы.

Вагнер (E.L. Wagner), немецкий врач (1829–1888).

Ван дер Берг (A.A.H. Van den Bergh), датский врач (1869–1943). Предложил реакцию для определения билирубина в сыворотке.

Ван дер Ваальс Иоханес (Van der Waals J.D.), голландский физик (1837–1923); для объяснения отклонения поведения реальных газов от идеальных предложил (1873) наличие сил межмолекулярного взаимодействия, позднее получивших его имя; лауреат Нобелевской премии (1910).

вант Хофф Якобус (van't Hoff Jacobus H.), голландский химик и лауреат Нобелевской премии (1852–1911).

Ва́рбург Отто (O. Warburg), немецкий биохимик (1883–1970). Лауреат Нобелевской премии. Открыл характерную для многих опухолей повышенную секрецию лактата (эффект Варбурга).

Виллебра́нд Ерик Адольф, фон (Willebrand E.A., von), финский врач (1870–1949). В 1926 г. опубликовал описание наследственного заболевания крови, характеризующегося недостаточностью факторов свёртывания и кровотечениями (болезнь фон Виллебранда).

Ге́нзелейт К. (K. Henseleit), немецкий терапевт (род. 1907). Совместно с Г. Кребсом открыл цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса–Гензелейта).

Го́льджи Камилло (Golgi Camillo), итальянский нейрогистолог, 1843–1926, лауреат Нобелевской премии 1906 г. (за исследование морфологии нервной системы).

Грам Ханс Христиан (Gram H.Ch.), датский бактериолог, фармаколог и врач (1853–1938); предложил базовый метод дифференциального окрашивания микроорганизмов (1884); разработал метод определения относительного содержания фибрина

в плазме и крови (1922); известен исследованиями анемий при беременности и гемобластозов при витамин B_{12}-дефицитных анемиях.

Грейвс Роберт Джемс (Graves Robert James), британский врач, 1796–1853. Им была детально описана в 1835 г. клиническая картина гипертиреоза.

Гудпа́счер (Goodpasture Ernest W.), американский патолог, 1886–1960.

Гуле́вич В.С. — российский биохимик. В 1900 г. открыл карнозин.

Жако́б Франсуа. В 1961 г. совместно с Ж. Моно сформулировал гипотезу оперона, объяснявшую механизм контроля синтеза белков у прокариотов.

Ице́нко Николай Михайлович, отечественный невропатолог, 1889–1954; в 1925 г. привёл описание симптомокомплекса у двух пациентов с поражением гипоталамо-гипофизарной системы.

Касл У. (Castle W.), американский физиолог-гематолог, р. в 1897 г. Витамин B_{12}, поступающий в организм с пищей, по предложению Касла (1930), называют «внешним фактором» развития анемии. Внутренний фактор — см. «Фактор Касла».

Конн Джером (Conn Jerome W.), р. в 1907 г., американский врач. Работал в университетской клинике Энн Арбор (Мичиган). Его работы посвящены питанию, метаболическим нарушениям и нормальному метаболизму человека. Первичный альдостеронизм впервые был описан им в 1955 г. и получил название первичного (или синдрома Конна).

Коновалов Николай Васильевич, отечественный невропатолог (1900–1966). Изучал причины и расширил характеристику описанной ранее Вестфалем и Уилсоном гепатолентикулярной дегенерации — наследственной болезни, обусловленной нарушением обмена белков и меди (болезнь Вестфаля–Уилсона–Коновалова).

Ко́ри (Cori), Карл Фердинанд (Carl Ferdinand), 1896–1984, и Герти Тереза (Gerty Theresa), 1896–1957, США, Сент-Луи, супруги, чешско-американские биохимики; лауреаты Нобелевской премии 1947 г. (описали процесс ресинтеза гликогена из молочной кислоты, т.н. цикл Кори).

Кребс, сэр Ганс Адольф (Krebs Sir Hans Adolf), англо-немецкий биохимик (1900–1981). В 1937 г. открыл цикл трикарбоновых кислот (лимонной кислоты), известный как цикл Кребса, за что в 1957 г. был удостоен Нобелевской премии.

Крик, Фрэнсис Гарри Комптон (Crick Francis Harry Compton), английский биофизик и генетик, р. в 1916 г. В 1953 г. совместно с Дж. Уотсоном предложил модель пространственной структуры ДНК. Лауреат Нобелевской премии 1962 г. (за открытие молекулярной структуры нуклеиновых кислот и их значения для передачи генетического материала).

Ла́нгерханс Пауль (Langerhans P.), немецкий патолог (1847–1888). Под руководством фон Вирхова изучал строение поджелудочной железы и в 1869 г. описал в ней островки, позднее названные его именем.

Ларо́н (Laron Z.), израильский детский эндокринолог, р. в 1927 г. Описал форму карликовости.

Лунин Николай Иванович (1853–1937), отечественный педиатр. В 1880 г. защитил докторскую диссертацию «О значении неорганических солей в питании животных», в которой показал, что, кроме белков, жиров, углеводов, солей и воды, для нормального развития и жизни животных (мышей), необходимы ещё особые и неизвестные в то время вещества, названные позднее витаминами.

Ме́нтен Мо (Maud L. Menten), канадский патолог (1879–1960). Совместно с Л. Михаэлисом в 1913 г. разработал основы ферментативной кинетики.

Миллио́н (A. N. E. Millon), французский химик (1812–1867). Предложил метод определения тирозина и тирозин-содержащих белков.

Михае́лис Леонор (Leonor Michaelis), немецкий химик (1875–1949). Совместно с М. Ментеном в 1913 г. разработал основы ферментативной кинетики. В его честь названа константа ферментативных реакций (K_m).

Моно́ Жак (Monod Jacques), французский биохимик и микробиолог (1910–1976); лауреат Нобелевской премии 1965 г. (за открытие генетического контроля синтеза ферментов и вирусных частиц).

Мо́ркио Луи (L. Morquio), уругвайский врач (1867–1935). Описал мукополисахаридоз типа IV.

Му́ллис Кэрри. В 1983 г. разработал метод полимеразной цепной реакции (Нобелевская премия 1993 г.), что стало эпохальным открытием XX века в области молекулярной биологии.

Нернст Уолтер (W.H. Nernst), немецкий физик (1864–1941). Лауреат Нобелевской премии. Предложил уравнение для подсчёта редокс-потенциалов.

Ни́ренберг Маршалл (Nirenberg Marshall W.), американский биохимик, р. в 1927 г., лауреат Нобелевской премии 1968 г. (за расшифровку генетического кода и объяснение его функции в синтезе белка).

Павлов Иван Петрович, отечественный физиолог (1849–1936); лауреат Нобелевской премии 1904 г. (за исследование физиологии пищеварения).

Па́ркинсон (Parkinson James), английский хирург (1755–1824). В 1817 г. выпустил книгу о дрожательном параличе.

По́линг Лайнус Карл (Pauling), американский физик и химик (1901–1994). Автор первых фундаментальных исследований по применению квантовой механики к изучению химической связи. Дважды лауреат Нобелевской премии.

Ра́ус Ф. Пейтон (Rous F.P.), американский вирусолог и патолог (1879–1970); один из первых доказал вирусную природу саркомы кур (1911), получившей его имя; лауреат Нобелевской премии 1966 г. за открытие онкогенных вирусов.

Русаков А.В., отечественный патологоанатом (1885–1953). Описал врождённые патологические состояния, характеризующиеся нарушением формирования соединительной (синдром Элерса–Данло), хрящевой (Русакова несовершенный хондрогенез) тканей, пазушной резорбцией костей.

Северин С.Е. — отечественный биохимик. Изучал физиологическое действие гистидиновых дипептидов в 60-х гг. XX века.

Сельé Ганс (Selye H.), австрийский эндокринолог, работавший в Канаде (1907–1982). Его имя связано с адаптационным синдромом.

Сертóли Энрико (Sertoli E.), итальянский физиолог (1842–1910). В 1865 г. описал в извитых семенных канальцах особый тип клеток, ныне известных как клетки Сертоли.

Уóтсон Джеймс Дьюи (Watson James Dewey), американский генетик, р. в 1928 г.; лауреат Нобелевской премии 1962 г. (за открытие молекулярной структуры нуклеиновых кислот и их значения для передачи генетического материала).

Форбс Гилберт (Gilbert B. Forbes), американский педиатр, р. в 1915 г. С именем этого исследователя связано открытие III типа гликогеноза.

Ха́нтингтон Джордж (Huntington George S.), американский врач (1850–1916).

Ха́ртнап — фамилия английской семьи, у которой впервые описано заболевание, позднее названное болезнью Хартнапа.

Хашимóто (Хасимото) Хакару (Hashimoto H.), японский хирург и патолог (1881–1934). В 1912 г. описал форму тиреоидита, позднее названного его именем.

Хéррик Джеймс — чикагский врач. В 1904 г. впервые описал тяжёлую форму серповидно-клеточной анемии.

Херс (Hers G.). С именем этого исследователя связано открытие VI типа гликогеноза.

Хóджкен Дороти. В 1955 г. с помощью рентгеноструктурного анализа расшифровала структуру витамина B_{12}. За эту работу в 1964 г. ей была присуждена Нобелевская премия.

Хюрлер Гертруда (Hurler Gertrud), австрийский педиатр; в 1920 г. описала один из мукополисахаридозов.

Ча́ргафф Эрвин. В 1951 г. установил закономерности в соотношении пуриновых и пиримидиновых оснований в молекуле ДНК.

Шифф Гуго (Schiff H.J.), немецкий химик (1834–1915). В 1864 г. им открыт продукт конденсации альдегидов и аминов (основание Шиффа), в 1864 г. предложена реакция обнаружения альдегидов: обесцвеченный фуксин восстанавливает окраску в присутствии альдегида.

Эпста́йн Майкл Энтони (Epstein Michael Anthony), английский вирусолог, р. в 1921 г; совместно с канадским вирусологом Ивонной Барр выделил вирус семейства *Herpetoviridae*, обнаруживаемый в клеточных культурах лимфомы Бёркитта; позднее была доказана его этиологическая роль в заболеваемости инфекционным мононуклеозом, а возбудитель был назван в их честь.

ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Показатель	Значения в традиционных единицах	Коэф. пересчёта	Значения в системе СИ
1	2	3	4
Биохимические показатели крови			
Альбумин	3,6–5 г%	10	36–50 г/л
Аммиак (в сыворотке)			
Оптический тест, 340 нм			11–35 мкмоль/л
Аммиак плазмы			19–43 мкмоль/л
Аполипопротеин А-I			
Мужчины			
Женщины			1,15–1,9 г/л
Аполипопротеин В-100			
Мужчины			0,7–1,6 г/л
Женщины			0,6–1,5 г/л
Аполипопротеин(а)	3–30 мг/дл		
Ацетон (в сыворотке)			1,15–2,2 г/л
качественная реакция	Отрицательная		Отрицательная
количественная реакция	0,3–2 мг%		3–20 мг/л
Белок, общий	6,5–8,5 г%	10	65–85 г/л
Билирубин			
Общий	0,2–1,3 мг%	17,1	3,4–22,2 мкмоль/л
Конъюгированный	0–0,3 мг%	17,1	0–5,1 мкмоль/л
Гаптоглобин (в сыворотке)			
Суммарно	0,44–3,03 г/л		
Тип 1–1	0,8–2,1 г/л		
Тип 2–1	0,7–3,4 г/л		
Тип 2–1	0,1–2,1 г/л		
Гексозы, связанные с белками (в сыворотке)	1,05–1,15 г/л	5,62	5,8–6,4 ммоль/л
Глюкоза плазмы натощак	65–110 мг%	0,055	3,58–6,05 ммоль/л
Гликозилированный гемоглобин	4,4–6,3%		
Гликопротеиды (в сыворотке)	1,2–1,6 г/л		
Железо			
Общее	50–175 мкг%	0,179	9–31,3 мкмоль/л
Общая железосвязывающая способность сыворотки	250–450 мкг%	0,179	44,8–80,6 мкмоль/л
Насыщение трансферрина	20–50%		
Жёлчные кислоты (в сыворотке, суммарно)			2,5–6,8 мкмоль/л
Жирные кислоты неэтерифицированные, в сыворотке			0,30–0,90 ммоль/л
Олеиновая	26–45%		
Пальмитиновая	20–25%		
Стеариновая	10–14%		
Линолевая	8–25%		
Калий (сыворотка)	3,5–5 мЭкв/л	1	3,5–5 мЭкв/л
Кальций			
Общий	8,9–10,3 мг%	0,25	2,23–2,57 ммоль/л
Свободный	4,6–5,1 мг%	0,25	1,15–1,27 ммоль/л

1	2	3	4
Креатин (в сыворотке)			
Мужчины			13–53 мкмоль/л
Женщины			27–71 мкмоль/л
Креатинин (в сыворотке)			
Мужчины	0,5–1,7 мг%	88,3	44–150 мкмоль/л
Женщины	0,5–1,11 мг%	88,3	44–97 мкмоль/л
Лактат (плазма)			0,5–2,2 ммоль/л
Лактат (цельная кровь)			0,3–1,3 ммоль/л
Липиды общие (в сыворотке)	3,5–8 г/л		
Литий			0,5–1,5 ммоль/л
Магний (значения выше у женщин во время менструаций)	1,3–2,2 мЭкв/л	0,5	0,65–1,1 ммоль/л
α–макроглобулин (в сыворотке)			
Мужчины	1,50–3,50 г/л		
Женщины	1,75–4,20 г/л		
Медь (общая)	70–155 мкг%	0,157	11–24,3 мкмоль/л
Миоглобин (в сыворотке)	<95 нг/мл		
Мочевина (в сыворотке)			2,5–8,32 ммоль/л
Мочевая кислота	3–8 мг%	59,5	179–476 мкмоль/л
Натрий			
Сыворотка	135–145 мЭкв/л	1	135–145 ммоль/л
Эритроциты			13,5–22 ммоль/л
Осмолярность	270–290 мосм/кг	1	270–290 мосм/кг
Пировиноградная кислота (пируват)	0–0,11 мЭкв/л	1	0–0,11 ммоль/л
Порфирины			
Общие порфирины (в эритроцитах)			150–600 мкмоль/л
Свободный протопорфирин (в эритроцитах)			216–810 мкмоль/л
Протеиназные ингибиторы			
С1–активатор	0,15–0,35 г/л		
β_2–Антиколлагеназа	0,05 г/л		
α–Антитрипсин	0,06 г/л		
Антитромбин III	0,290 г/л		
α_1–Антихимотрипсин	0,3–0,6 г/л		
Интер–α–трипсин ингибитор	0,2–0,7 г/л		
α_2–Макроглобулин	0,5–2,5 г/л		
α_1–Протеиназный ингибитор	2–4 г/л		
Протромбин (в сыворотке)			1,4–2,1 мкмоль/л
Серомукоид (серогликоиды общие, в сыворотке)	0,22–0,28 г/л		
Серотонин			
Кровь			0,22–2,05 мкмоль/л
Плазма			0,28–1,7 мкмоль/л
Сыворотка	1/10 часть от цельной крови		
В тромбоцитах			230–610 нмоль/109 клеток

1	2	3	4
Сиаловые кислоты (N-ацетил и N-глицилпроизводные нейраминовой кислоты, в сыворотке)	0,180–0,220 усл. ед. 620–730 мг/л (реакция Гесса)		2–2,36 ммоль/л (по нейраминовой кислоте)
Среднемолекулярные пептиды (в сыворотке, нормальные величины вариабельны)	0,180–0,250 усл. ед. (254 нм) и 0,260–0,380 усл. ед. (280 нм)		
Тимоловая проба (в сыворотке)	0–4 ед.		
Трансферрин (сидерофилин) в сыворотке			
Мужчины	2,3–4 г/л		
Женщины	3–3, 8 г/л		
Триглицериды натощак			<2,2 ммоль/л
Триацилглицерины (триглицериды, желательные уровни для взрослых)			
Мужчины			0,45–1,81 ммоль/л
Женщины			0,40–1,53 ммоль/л
Тропонин Т	<0,1 нг/мл		
Тропонин I	<0,2 нг/мл		
Ферритин			
Мужчины	36–262 нг/мл	2,25	81–590 пмоль/л
Женщины	10–155 нг/мл	2,25	23–349 пмоль/л
α_1–Фетопротеин (в сыворотке)	<30 мкг/л		
Весовым методом	3,566–3,634 г/л		
Спектрографическим методом	3,371–3,649 г/л		
Фибронектин (по В.Н. Титову и соавт., 1985)	246–399 мкг/мл		
Фолиевая кислота			
Плазма	1,7–12,6 нг/мл	2,27	3,9–28,6 нмоль/л
Эритроциты	153–602 нг/мл	2,27	347–1367 нмоль/л
Фосфат	2,5–4,5 мг%	0,323	0,81–1,45 ммоль/л
Фосфолипиды общие (в сыворотке)			2,52–2,91 ммоль/л
Фосфор липоидный (в сыворотке)			1,97–4,68 ммоль/л
Фосфор неорганический (в сыворотке)			0,646–1,292 ммоль/л
Хлориды			
В крови			77–87 ммоль/л
В сыворотке			96–108 ммоль/л
В поте			0–30 ммоль/л
Холестерин			
Нормальный	<200 мг%	0,0259	<5,18 ммоль/л
Пограничный	200–239 мг%	0,0259	5,18–6,19 ммоль/л
Повышенный	>240 мг%	0,0259	>6,2 ммоль/л
Холестерин ЛПВП	36–75 мг%	0,0259	0,92–1,95 ммоль/л
Холестерин ЛПНП	<130 мг%		<3,36 ммоль/л
Церулоплазмин	21–53 мг%	0,063	1,3–3,3 ммоль/л
Цинк	70–150 мкг/мл		10,7–22,9 мкмоль/л
CO_2 плазмы		1	22–31 ммоль/л
Эритроциты, нуклеотиды			

1	2	3	4
Электрофорез			
АТФ			600–1400 мкмоль/л
АДФ			250–800 мкмоль/л
АТФ/АДФ	2		
Тонкослойная хроматография			
АТФ			723,6–728,4 мкмоль/л
АДФ			260,8–263,2 мкмоль/л
АМФ			2,8–5,4 мкмоль/л
Эритроциты, электролиты			
Калий			79,4–112,6 ммоль/л
Натрий			12,5–21,7 ммоль/л
Магний			1,65–2,65 ммоль/л
Медь			14,13–23,55 ммоль/л
Этанол			0–2,7 ммоль/л
Интоксикация			65–87 ммоль/л
Ступор			87–109 ммоль/л
Кома			>109 ммоль/л
Кислотно-щелочное состояние			
Кровь			
pH			7,35–7,45
Артериальная			7,37–7,45
Венозная			7,34–7,43
pCO_2			
Мужчины			4,7–6 кПа
Женщины			4,3–5,7 кПА
pO_2, артериальная кровь			10,2–13,1 кПа
HCO_3^-			
Мужчины			23,6–27,2 мЭкв/л
Женщины			21,8–27,2 мЭкв/л
Стандартный бикарбонат плазмы крови			
Мужчины			22,5–26,9 ммоль/л
Женщины			21,8–26,2 ммоль/л
Буферные основания, капиллярная кровь			43,7–53,5 ммоль/л
Избыток основания			
Капиллярная кровь			
Мужчины			от –2,7 до +2,5 ммоль/л
Женщины			от –3,4 до +1,4 ммоль/л
Артериальная кровь			
Мужчины			от –1 до +3,1 ммоль/л
Женщины			от –1,8 до +2,8 ммоль/л
Ферменты сыворотки			
Альдолаза	0–11 МЕ/л (30°)		0–11 МЕ/л (30°)
Амилаза	35–118 МЕ/л	0,01667	0,58–1,97 мккат/л
Аминотрансферазы			
Аланинаминотрансфераза	7–53 МЕ/л	0,01667	0,12–0,88 мккат/л
Аспартатаминотрансфераза	11–47 МЕ/л	0,01667	0,18–0,78 мккат/л
Антигиалуронидаза	<250 ед.		

1	2	3	4
Антистрептолизин О	<250 ед.		
α_2–Антиплазмин (x±20%)	80–120%		
α_1–Антитрипсин	300–600 МЕ; 2–2,4 г/л	18,52	37,04–74,08 мкмоль/л
Антитромбин III	22,5–25,9 Е/мл		
Гистаминаза	0,03–0,51 мг/ч/л		
Гликогенфосфорилаза	0–20 МЕ/л		
γ-Глутамилтранспептидаза			
Мужчины	20–76 МЕ/л	0,01667	0,33–1,27 мккат/л
Женщины	12–54 МЕ/л	0,01667	0,2–0,9 мккат/л
Кислая фосфатаза	0–0,7 МЕ/л	16,67	0–11,6 нкат/л
Креатинкиназа (КК)			
Мужчины	30–220 МЕ/л	0,01667	0,5–3,67 мккат/л
Женщины	20–170 МЕ/л	0,01667	0,33–2,86 мккат/л
МВ-фракция КК	0–12 МЕ/л	0,01667	0–0,20 мккат/л
ЛДГ	90–280 МЕ/л	0,01667	1,50–4,67 мккат/л
Липаза	2,3–20 МЕ%	0,1667	0,38–3,33 мккат/л
Липопротеинлипаза			
Общая ЛПЛ			18,9–28,62 ммоль/ч
Печёночная ЛПЛ			10,14–16,98 ммоль/ч
Внепечёночная ЛПЛ (субстрат интралипид, pH-метрия)			7,20–13,20 ммоль/ч
5′–нуклеотидаза	2–16 МЕ/л	0,01667	0,03–0,27 мккат/л
Пепсиноген	124–142 мкг/л		
Плазминоген			
Плазма	409–559 мг/л		
Сыворотка	388–564 мг/л		
Трипсин (в сыворотке)	10–60 мкг/л		
Фосфатаза кислая (в сыворотке)	0–0,7 МЕ/л	16,67	0–11,6 нкат/л
Фосфатаза щелочная (в сыворотке)	38–126 МЕ/л	0,01667	0,63–2,10 мккат/л
Холинэстераза			59,96–98,36 мкмоль/ с· л
Гормоны сыворотки			
Альдостерон			
Женщины (при беременности выше в 2 раза)	5–30 нг%		0,14–0,83 нмоль/л
Мужчины	6–22 нг%		0,17–0,61 нмоль/л
Ангиотензин I (в плазме)	11–88 нг/л		
Ангиотензин II (в артериальной крови, в венозной крови 50–75% от концентрации в артериальной крови)	2,4±1,2 нг/л		
Ангиотензиноген (в плазме)	2,4±0,4 мг/л		
АДГ (вазопрессин)	2,9±1 нг/л		
Гастрин натощак	0–130 пг/мл		
Гидрокортизон			
В 8 ч	50–230 мкг/л	0,003	0,14–0,64 мкмоль/л
В 16 ч	30–150 мкг/л	0,003	0,084–0,42 мкмоль/л
В 20 ч	<50% от уровня в 8 ч		
Глюкагон (в плазме)	30–210 нг/л		
Гормон роста (СТГ)	0–10 нг/мл		0–10 мкг/л

1	2	3	4
Инсулин натощак	5–25 мМЕ/л	7,18	36–180 пмоль/л
Кальцитонин			
Мужчины	0–14 пг/мл		0–4,1 пмоль/л
Женщины	0–28 пг/мл		0–8,2 пмоль/л
Катехоламины (в крови)			
Адреналин	0–6,28 нмоль/л		
Норадреналин	0–11,76 нмоль/л		
Катехоламины (в плазме)			
Адреналин			<0,480 нмоль/л
Норадреналин			0,615–3,239 нмоль/л
Дофамин			<0,888 нмоль/л
Кортизол (в плазме)			
8 ч	5–23 мкг%		138–635 нмоль/л
16 ч	3–16 мкг%		82–441 нмоль/л
Кортикостерон			3,8–66,5 нмоль/л
17-Оксикортикостероиды (17-ОКС, в плазме)	50–200 мкг/л	0,0028	0,14–0,55 мкмоль/л
Ренин, активность в плазме	0,9–3,3 нг/мл/ч		
Секретин (в течение 45 мин после еды выше 1200 нг/л)	29–45 нг/л		
С–пептид (в сыворотке)	1,4–2,2 мкг/л		
Тироксин, общий (T_4)	3–12 мкг%	12,9	39–155 нмоль/л
Тироксин, свободный	1–2,3 нг%	12,9	13–30 пмоль/л
ТТГ	0,32–5 мкМЕ/л		0,32–5 мМЕ/л
Поглощение смолой	20–40%		
Трийодтиронин (T_3)	80–200 нг%	0,0154	1,2–3,1 нмоль/л
T_4-индекс [T_4 (Т-связывание)]	0,85–3,5		
Тиреотропный гормон (ТТГ)	0,45–6,2 мкМЕ/мл		
Биохимические показатели мочи			
Общий азот	6–17 г/сут	71,39	428,4–1213,7 ммоль/сут
Азот аминокислот	50–200 мг/сут		3,5–14,3 нмоль/сут
АКТГ	15–70 пг/мл	0,22	3,3–15,4 пмоль/л
Альдостерон			8,34–41,7 нмоль/сут
Амилаза	0,04–0,30 МЕ/мин	6,67	0,67–5 нкат/мин
Аминокислоты			
Тирозин			
Мужчины	15–40 мг/сут		
Женщины	15–49 мг/сут		
Фенилаланин			
Мужчины	8–15 мг/сут		
Женщины	6–41 мг/сут		
Аммиак	30–50 ммоль/л		10–107 ммоль/сут
Ацетон (качественная реакция)	отрицательна		отрицательна
Белок общий	45–75 мг/сут		
Дневная моча	<60 мг/сут		
Ночная моча	<20 мг/сут		
Белковые фракции мочи			
Альбумины	37,9% (10–100 мг/сут)		10–100 мг/сут
Глобулины			

1	2	3	4
α_1	27,3%		
α_2	19,5%		
β	8,8%		
γ	3,3%		
Альбумины/Глобулины	0,64		
Гаптоглобин	0–5 мг/л		
Гликозаминогликаны			
Осаждение ЦПХ	1,03–3,35 мг/1 г креатинина		
Карбозоловая реакция	2,37–2,99 мг/л		
Глюкоза (качественные пробы на глюкозу мочи отрицательные)			0,06–0,83 ммоль/л
δ–Аминолевулиновая кислота	1,3–7 мг/сут	7,6	10–53 мкмоль/сут
Калий			38–77 ммоль/сут
Кальций	0–250 мг/сут	0,025	0–6,25 ммоль/сут
Катехоламины			
Адреналин	<10 мкг/сут		<55 нмоль/л
Норадреналин	<100 мкг/сут		<590 нмоль/л
Метанефрин	0,1–1,6 мг/сут		0,5–8,1 мкмоль/л
17–Кетостероиды			
Мужчины	27,7–79,7 мкмоль/сут	1	27,7–79,7 мкмоль/сут
Женщины	17,4–55,4 мкмоль/сут	1	17,4–55,4 мкмоль/сут
Копропорфирин	50–250 мкг/сут		80–380 нмоль/сут
Кортизол, свободный	20–90 мкг/сут	2,76	55–248 нмоль/сут
Креатин			
Мужчины			0–0,30 ммоль/сут
Женщины			0–0,61 ммоль/сут
Креатинин			
Клиренс	120 мл/мин		
Мужчины	1–2 г/сут	8,84	8,8–17,7 ммоль/сут
Женщины	0,6–1,5 г/сут	8,84	5,3–13,3 ммоль/сут
Магний			3–5 ммоль/сут
Медь	15–50 мкг/сут	0,0157	0,24–0,78 мкмоль/сут
Миоглобин	<4 мкг/сут (2–4 нг/мл)		
Мочевая кислота			1,48–4,43 ммоль/сут
Мочевина	20–35 г/сут	16,65	333–583 ммоль/сут
Натрий			40–220 ммоль/л
Оксалаты	10–40 мг/сут	11,4	114–456 мкмоль/сут
5-Оксиндолилуксусная кислота			5–42 мкмоль/сут
17–Оксикортикостероиды (17–ОКС)			
17–ОКС свободные			0,11–0,77 мкмоль/сут
17–ОКС суммарно			4,1–13,7 мкмоль/сут
Осмолярность	500–1400 мосмоль/кг		
Порфирины			
Копропорфирин	0–72 мкг/сут	1,53	0–110 нмоль/сут
Уропорфирин	0–27 мкг/сут	1,2	0–32 нмоль/сут
Порфобилиноген	0–2 мг/сут	4,4	0–8,8 мкмоль/сут
Серотонин			0,5–1,2 мкмоль/сут
Титруемая кислотность мочи (ТК)			20–40 мэкв/сут
Уробилиноген	0–6 мг/сут		

1	2	3	4
Фосфор неорганический			12,9–42 ммоль/сут
Хлориды			170–210 ммоль/сут
5–Гидроксиндолуксусная кислота	0,2–5,7 мг/сут	5,23	1–30 мкмоль/сут
Система свёртывания крови			
Время кровотечения	2,5–9,5 мин		
Продукты разрушения фибриногена/фибрина	<8 мг/мл		
ПТ	11–14 с		
Тромбиновое время	11,3–18,5 с		
Факторы свёртывания			
Фактор I (фибриноген)	150–360 мг%	0,01	4–10 мкмоль/л
Фактор II (протромбин)			0,60–1,40 мкмоль/л
Фактор V			0,60–1,40 мкмоль/л
Факторы VII–X			0,70–1,30 мкмоль/л
Фактор X			0,70–1,30 мкмоль/л
Фактор VIII			0,50–2 мкмоль/л
Фактор IX			0,60–1,40 мкмоль/л
Фактор XI			0,60–1,40 мкмоль/л
Фактор XII			0,60–1,40 мкмоль/л
Общий анализ крови			
Гематокрит			
Мужчины	40,7–50,3%	0,01	0,407–0,503
Женщины	36,1–44,3%	0,01	0,361–0,443
Гемоглобин (Hb)			
Мужчины	13,8–17,2 г%	0,620	8,56–10,7 ммоль/л
Женщины	12,1–15,1 г%	0,620	7,50–9,36 ммоль/л
Концентрация Hb в 1 эритроците	32,7–35,5 г%	0,620	20,3–22 ммоль/л
Содержание Hb в 1 эритроците	26,7–33,7 пг		
Лейкоцитарная формула			
Общее число лейкоцитов	$3,8–9,80\times10^3$/мкл	1	$3,8–9,8\times10^9$/л
Лимфоциты	$1,2–3,3\times10^3$/мкл	1	$1,2–3,3\times10^9$/л
Моноциты	$0,2–0,7\times10^3$/мкл	1	$0,2–0,7\times10^9$/л
Гранулоциты	$1,8–6,6\times10^3$/мкл	1	$1,8–6,6\times10^9$/л
Разброс размеров эритроцитов	11,8–14,6%	0,01	0,118–0,146
Ретикулоциты	0,5–1,5%	0,01	0,005–0,015
СОЭ	0–10 мм/ч		
Средний эритроцитарный объём	80–97,6 мкм		
Тромбоциты	$190–405\times10^3$/мкл	1	$190–405\times10^9$/л
Эритроциты			
Мужчины	$4,5–5,7\times10^6$/мкл	1	$4,5–5,7\times10^{12}$/л
Женщины	$3,9–5\times10^6$/мкл	1	$3,9–5\times10^{12}$/л
Иммунологические показатели			
Ig (в сыворотке)			
IgA	0,90–4,50 г/л		
IgA_1	90%		
IgA_2	10%		
IgD	0–0,15 г/л		
IgE	0–0,38 мг/л		
IgG	5,65–17,65 г/л		

1	2	3	4
IgG_1	60–70%		
IgG_2	14–20%		
IgG_3	4–8%		
IgG_4	2–6%		
IgM	0,60–3,50 г/л		
Комплемент (общий гемолитический)	118–226 CH50 МЕ/мл		
C1q			51–79 мг/л
C1r			22–46 мг/л
C1s			21–41 мг/л
C2			22–34 мг/л
C3			77–156 мг%
C4			15–39 мг%
C5			49–77 мг/л
C6			48–64 мг/л
C7			49–70 мг/л
C8			43–63 мг/л
C9			47–69 мг/л
Биохимические показатели спинно-мозговой жидкости			
Белок	150–350 мг/л		
Давление	100–180 мм водн.ст.		
Цитоз	3–4 клетки в мл		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

A

Абеталипопротеинемия 389
Агонисты 43, 44
Агрекан 710, 711, 717
Аденилатдезаминаза 529, 530
Аденилаткиназа 527
Аденилатциклаза 115, 254, 258
Аденилатциклазная система 258—260, 396, 397, 680
— — G-белки 253, 254, 680
3',5'-Адениловая кислота *см. AMP циклический*
Адениловая кислота *см. Аденозинмонофосфат*
Аденилосукциназа 526
Аденилосукцинатсинтаза 524, 526
Аденин 91, 142
Аденинфосфорибозилтрансфераза 527, 528
S-Аденозилгомоцистеин 500, 502
S-Аденозилметионин 88, 500, 508, 512, 516
Аденозин 542
Аденозиндезаминаза, недостаточность 542
Аденозиндифосфат 141, 403, 681
Аденозинкиназа 527
Аденозинмонофосфат (АМФ) 90, 91, 141, 400
Аденозинтрифосфат (АТФ) 141, 400, 403, 406
— свободная энергия гидролиза 267
Аденозин-5'-трифосфат, структура 267
Адреналин 44, 322, 324, 326, 396, 397, 508, 548, 577
β-Адренергическая стимуляция 396
Адреногенитальный синдром 576
Адренорецепторы 250
Адренокортикотропный гормон (кортикотропин, АКТГ) 548, 565
Азатиоприн 544
Азидотимидин 543
Азота оксид 516, 517
Азот аминокислот, катаболизм 472—489
Азотистое равновесие 459
Азотистый баланс 459
Аконитаза 286
— цикл лимонной кислоты 286
цис-Аконитат 286
Акромегалия 568
Активный центр
— — фермента 76—79
Актин 680
α-Актинин 713, 714
Актин-миозиновый комплекс 680
β-Аланилдипептиды 516
Аланин 10, 11, 81, 479, 481, 484, 488, 489
β-Аланин 516
Аланинаминотрансфераза (АЛТ) 81, 470
Алкаптонурия 119, 511
Алкалоз 478
Алкогольдегидрогеназа 96, 631
Аллантоин 531
Аллопуринол 533
Аллостерическая регуляция 52, 112—114
Аллостерические эффекторы 112
Аллостерический центр ферментов 112, 113
Альбинизм 118, 512
Альбумин(ы) 60, 393, 682, 684
— сывороточный 626, 647
Альдозы 299
Альдостерон 548, 573
— механизм действия 600
Альдостеронизм 602
Амилаза 305, 306
— слюны 305
Амило-[1 → 6]-глюкозидаза 321
Амилоза 305
Амилопектин 305
Амило-[1 → 4] → [1 → 6]-трансглюкозидаза 319

Амидофосфорибозилтрансфераза 523, 525, 529
Аминоацил-тРНК 173
Аминоацил-тРНК-синтетазы 173
γ-Аминобутират, метаболизм 478, 513
Аминокислоты 10—15
— биосинтез 491—494
— в белках 10, 460
— всасывание 466
— гликогенные 490
— дезаминирование 472
— ионные формы 13—14
— катаболизм азота 472—489
— — углеродного скелета 490, 491
— классификация 10—13
— метаболизм 469
— модифицированные 13
— незаменимые 460
— обмен между органами 488, 489
— образующие ацетил-СоА (кетогенные) 491
— серусодержащие, нарушения метаболизма 469
— стереоизомеры 10
— структура 11
— транспорт в клетки 466
— формулы 11
— цветные реакции 14—15
δ-Аминолевулиновая кислота (АЛК) 637
Аминолевулинатсинтез 639
Аминолевулинатдегидратаза 639
γ-Аминомасляная кислота (γ-аминобутират, ГАМК) 478, 513
Аминопептидаза(ы) 466
Аминосахар 704
— метаболизм 708, 709
Аминотрансферазы 81, 122, 469—472
Амины биогенные 512
Аммиак 472, 476
— в крови, нормальное содержание 477
— метаболизм 476—482
— образование 472
— транспорт 477, 488
Амитал 275
Амфиболические реакции 491
AMP циклический (цAMP) 115, 249, 254, 397
— — синтез 255
Анаболические процессы 264
— пути 108, 109
Анаплеротические реакции 491
Анацидность 463
Ангиотензин I 17, 601—603
— II 17, 552
— III 602
Ангиотензиноген 601, 603
Ангиотензин-превращающий фермент 601
Ангиотензины 601—603
Андрогены 609
— биосинтез 610
— механизм действия 612
Андростендион 610
Анемия 129, 130
Анзерин 516
Анемия мегалобластная 497
Анкирин 658, 659
α- и β-Аномеры 300
Антагонисты 43
Антикоагулянты 677—679
Антикодон 147
Антимицин А, окислительное фосфорилирование 275
Антиоксиданты 296
α_1-Антитрипсин 679, 685, 686, 703
Антитромбин III 678
Апобелки А 389, 445, 447
Апобелок В 382, 388, 389, 391
— В-100 (Апо-В-100), рецептор 388, 389
— С I 389
— С-II 382, 389, 445
— Е (Апо-Е) 382, 389, 391
Аполипопротеины (апобелки) 387, 388, 389, 391
Апоферменты 83
Апоферритин (регуляция синтеза) 645
Арахидоновая кислота 373, 375, 417, 419, 421—423, 427
Аргиназа 76, 100, 109, 483
Аргинин 76, 483, 493, 500
— биосинтез 483, 485, 516
Аргининосукциназа 483
Аргининосукцинат 482
Аргининосукцинатсинтетаза 482
Аскорбиновая кислота (витамин С) 86, 87, 130, 431, 689, 691
Аспарагин 11, 123, 480, 493
Аспарагиназа 123
Аспарагинсинтетаза 123, 480
Аспартат 11, 13, 482, 485
Аспарататаминотрансфераза (АСТ) 122, 470
Аспирин 108, 427
Атеросклероз 452—457
Атропин 43, 44
Ca^{2+}-АТФаза 241—242, 660
Na^+/K^+-АТФаза 241—242, 308, 311, 660
АТР-синтаза 277, 278
Ацетальдегид 632
N-Ацетилгалактозамин (GalNAc) 299, 704—709
N-Ацетилглюкозамин (GlcNAc) 299, 704—709

N-Ацетилнейраминовая кислота (NeuAc) 233, 299, 377, 378, 437, 438
Ацетилтрансацилаза 412
Ацетилтрансферазы 623
Ацетилхолин 43, 44, 513, 556
Ацетилхолиновые рецепторы 557
Ацетилхолинэстераза 513
Ацетилхолинэстераза 104, 105, 107
Ацетил-КоА 83, 281, 401, 402, 491
— катаболизм 285—293, 403
— метаболизм холестерола 442
— образование из аминокислот 491
— цикл лимонной кислоты 285—293
Ацетил-КоА-карбоксилаза 410
— биосинтез жирных кислот 410, 411, 414
— регуляция липогенеза 414, 415
Ацетоацетат 406
Ацетоацетил-КоА 406, 442
Ацетон 406, 408
Ацидурия дикарбоновая 405
Ацилглицеролы 373, 375
— биосинтез 392, 394
— метаболизм 392—396
Ацилтрансфераза 385
Ацилтрансферазы 385
Ацил-КоА-дегидрогеназа 401, 402
— дефект 405
Ацил-КоА-синтетаза (тиокиназа) 385, 400
Ацил-КоА-холестерол-ацилтрансфераза (АХАТ) 387, 442
Аэробный гликолиз 333—340

Б

Барбитураты, метаболизм в печени 629
Базальные мембраны 695, 712, 719, 720
Белки
— активный центр 39—41
— высаливание 70
— высокой подвижности (HMG-белки) 146
— главного комплекса гистосовместимости 210
— глобулярные и фибриллярные 56
— G-белки 253, 254
— денатурация 28—31
— дисульфидные связи 27
— домен 32
— изофункциональные 67
— классификация 56
— конформационная лабильность 27, 28
— мембранные 236—238
— — интегральные и поверхностные 236, 237
— неупорядоченная конформация (клубок) 25
— очистка от примесей 72, 73
— плазмы 71, 72, 682, 685
— растворимость 26
— регулярные GTP-зависимые 115
— SSB-белки 150, 152
— семейства белков 60, 61
— α-спираль 23, 24
— структура вторичная 23—25
— — первичная 20
— — — методы изучения 20—23
— — супервторичная 31—33
— — третичная 26, 27
— — четвертичная 33, 34
— субъединицы 33
— теплового шока 36, 37
— фолдинг 34—38
— хроматина 190
Белковая недостаточность 461
— пищевая ценность 460
— синтез 170—181
— — и генетический код 170
— — ингибиторы 182—184
— — инициация 175
— — терминация 178
— — элонгация 175—178
Z-Белок 648
Белки главного комплекса гистосовместимости 66, 67
Белок ацилпереносящий (АПБ) 412
— переносчик эфиров холестерола 447
— полосы 3 659
— полосы 4.1 659
Бензантрацен 623
Бензойная кислота 624
Бигликан 711, 712
Бикарбонаты сыворотки и плазмы 381, 462
Биливердин IX-α 646
Биливердинредуктаза 646
Билирубин, конъюгация 648
— метаболизм в кишечнике 649
— определение содержания в сыворотке 650
— поглощение печенью 648
— секреция в желчь 648
Билирубиндиглюкуронид 648
Билирубин-уробилиногеновый цикл 649
Биотин 87, 128, 292, 293, 410, 411
Биотинзависимые ферменты 292
Биоэнергетика 265
1,3-Бисфосфоглицерат 337
2,3-Бисфосфоглицерат (ДФГ) 51—53, 342—343, 660, 661

Бисфосфоглицератмутаза 344, 660, 661
2,3-Бисфосфоглицератфосфатаза 344, 660, 661
Бифункциональный фермент (БИФ) 351—353
Болезнь Аддисона 576
— Андерсен 332
— Альцхаймера 38
— Виллебранда 679
— Гирке 119, 330, 531
— Грейвса 571
— Паркинсона 512
— Книста 701
— Слая 710
Болезни прионовые 38, 39
— Гоше 440
— Кори 332
— Нимана—Пика 439
— Помпа 331
— Рефсума 405
— Тея—Сакса 439, 440
— Фабри 440
— Фарбера 440
— Форбса 331
— Хартнапа 469

В

Вазоактивный интестимальный пептид (ВИП) 587
Вазопрессин (АДГ) 17, 18, 548, 566, 598
Варфарин 675
Валин 11, 488, 491
Винкулин 713, 714
Вирус
— ингибиторы матричных синтезов 184
— саркомы Рауса, онкогены 726
Вирусы онкогенные 726
— Витамин А 132, 386
— B_1 125
— B_2 90, 126
— PP (B_3) 126
— пантотеновая кислота (B_5) 127
— B_6 127, 469—471, 512, 693
— биотин (Н) 128
— фолиевая кислота (B_{c0}, B_9) 129
— B_{12} 130, 502
— — всасывание 462
— С 130
— Р 132
— D 386
— D_2 и D_3 136
— Е 137, 386, 431, 432
— К 137, 386, 673, 674
Витамины 88
— водорастворимые 125, 133
— жирорастворимые 125, 139
Водородные связи 23, 26
Вторично-активный транспорт 242
— симпорт 242—244
— антипорт 242—244

Г

Галактоза 299, 705, 706
— метаболизм 366—369
— превращение в глюкозу 367
Галактоземия 368
α-, β-Галактозидаза(ы) 439, 440
β-Гликозидаза(ы) 308
— гидролиз лактозы 309—310
— недостаточность 313—314
Галактозилцереброзид 233, 378, 438
Галактозо-1-фосфат-уридилтрансфераза 367
Галактокиназа 367
Галактоцереброзиды 378, 438
Ганглиозиды 232, 233, 377, 378, 437
Гаптоглобин 686
Гастриксин 463
Гастрин 462
β-Гексозаминидаза 440
Гексокиназа 84, 316
Гем 46, 88, 636
— биосинтез, регуляция 637—640
— катаболизм 645—647
Гемоглобин(ы) 46—53, 208
— оксигенированный 48
— регуляция функций 48, 50—52
— фетальный 47, 53, 208
— S 54, 55, 208
Гемоглобинопатии 53—55, 663, 664
Гем А 274
Гем-оксигеназа 646
Гемопротеины железосодержащие 273, 274
Гемосидерин 644
Гемофилии 677
Гемохроматоз 644
Ген(ы), амплификация 191, 733
— — в ходе развития эукариотов 191
— вариабельных областей (V_l и V_H) 192, 193
— β-глобина 208
— глобиновые, мутации 209
— делеции и вставки 203

— иммуноглобулинов, перестройка 191—194
— индуцируемые 186
— константных областей 192, 193
— конститутивная экспрессия 183
— организация 190
— разнообразия (D) 193
— репрессируемые, регуляция экспрессии 186, 187
— рецептора ЛПНП 446, 453, 454
— соединяющей области (J) 192, 193
— транскрипция 194—197
— химерные 217
— человека, организация 205—207
— экспрессия антигенов групп крови 208—210
— — регуляция 194—197
— эукариотические, экспрессия 190
— gag, вирусные антигены 726
— myc, активация протоонкогена 733
— src, тирозиновая протеинкиназа 726, 730
Генетические перестройки 734, 735
Генетический код и синтез белка 170—181
Генная инженерия 222—225, 747
Геном гаплоидный человека 219
Гепарансульфат 705, 707
Гепарин 707
Гетерополисахариды 704
Гетерохроматин 190
Гиалуронидаза 709
Гиалуроновая кислота 704—706, 710, 711, 713, 717, 718
Гибридизация ДНК и РНК 148, 149
Гигантизм 567
Гидратаза 412
Гидроксиапатит 716
β-Гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа 402, 409
D(—)-3-Гидроксибутират 398, 407—409
D(—)-3-Гидроксибутиратдегидрогеназа 409
18-Гидроксилаза 573, 574
21-Гидроксилаза 573, 574
7α-Гидроксилаза 448
11β-Гидроксилаза 573, 574
Гидроксилазы 80
Гидроксилизин 688, 690—694
— биосинтез 691
Гидроксиметилбилан 637
3-Гидрокси-3-метилглутарил-КоА (ГМГ-КоА) 408, 442
3-Гидрокси-3-метилглутарил-КоА-лиаза (ГМГ-КоА-лиаза) 408
Гидроксиметилглутарил-КоА-редуктаза (ГМГ-КоА-редуктаза) 441—443, 446
Гидроксиметилглутарил-КоА-синтаза (ГМГ-КоА-синтаза) 408, 441
Гидроксипролин 688, 690, 691, 699
— биосинтез 691
— катаболизм 699
3β-Гидроксистероид-дегидрогеназа (3β-ОН-СГ) 573
n-Гидроксифенилпируватгидроксилаза 505
7α-Гидроксихолестерол 448
Гидролазы 81
Гидролиз протеолитическими ферментами 16
Гидрофобные взаимодействия 26
Гипераммониемия 486
Гипераргининемия 487
Гипербилирубинемия 654, 655
Гипергликемия 593
Гиперглицинемия 515
Гиперкетонемия 593
Гиперлипопротеинемия 451, 452
Гипероксалурия первичная, метаболизм глицина 499
Гиперпаратиреоз 605
Гиперплазия врожденная надпочечников 576
Гипертиреоз 571
Гиперурикемия 531—533
Гиперфенилаланинемия *см. Фенилкетонурия*
Гиперхиломикронемия 391, 452
Гиперхолестеролемия 451, 456
— семейная 452, 453
Гипогликемия 119
Гипоксантин 528
Гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза 527, 528
Гипоксия 293, 294
Гипопаратиреоз 606
Гипотиреоз 571
— основной обмен 571
Гипоурикемия 533
Гипофиз 560, 562
Гиппурат, биосинтез 626
Гистамин 462, 515, 516
Гистидаза 476, 515
Гистидин 493, 496, 515
Гистидиндекарбоксилаза 515
Гистидинемия 515
Гистон(ы) 145
— в хроматине 190
Гликоген 304, 316—333
— биосинтез, механизм ветвления 318—320
— метаболизм 316—333
— — регуляция 322—330
Гликогенозы 119, 330—333
Гликогенолиз 320—322
Гликогенсинтаза 320
Гликогенфосфорилаза 321, 323

— мышечная 329
Гликозаминогликаны 703—708, 711
— структура 704—707
— и протеогликаны, функции 703, 710—712, 720
Гликозидазы 305
Гликозилирование гликопротеинов, ингибиторы ферментов 596
Гликолиз 110, 111, 335—341
— анаэробный 340, 341
— аэробный 335—340
— последовательные стадии 335—337
— регуляция 114, 342
Гликолипиды 231, 232, 375, 377, 436—438
Гликопротеины 302, 703, 704, 716
— и метастазирование 738, 739
Гликосфинголипиды 375, 377, 436—438
Гликофорин 236, 659
Гликохенодезоксихолевая кислота 449
Гликохолевая кислота 380, 449
Глицентин 587
Глицеральдегид-3-фосфат 93, 335
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа 83, 92, 93, 336
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа 336
Глицерол 393, 394
Глицеролкиназа 351, 392
Глицерол-3-фосфат 338, 392—394
Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа 338, 392
Глицерофосфатный челночный механизм 337—339
Глицерофосфолипиды 375
— распад и обновление 432—436
Глицин 493—495, 500, 514
— образование холина 513
— превращение 494, 495
Глицинсинтазный комплекс 494
Глицинурия 499
Глобин 638
Глобозид 377
Глутамат 470, 473, 491, 513, 514
Глутаматдегидрогеназа 473, 480
L-Глутаматдекарбоксилаза 81, 513
Глутаматпируватаминотрансфераза (ТПТ) 471
Глутамин 478, 488, 493
Глутаминаза 479
Глутаминовая кислота (глутамат) 82, 470, 473
Глутаминсинтетаза 82, 478
Глутатион 17, 88, 431, 467, 504, 622, 689, 691
Глутатионпероксидаза 431, 661, 662
Глутатионредуктаза 364, 431, 661, 662
Глутатионтрансфераза 621, 622
Глюкагон 322, 324, 326, 327, 439, 548, 585
— биосинтез и метаболизм 586
— ингибирование липогенеза 415
— физиологические эффекты 117, 397, 415, 587
Глюкоза 79, 298, 333, 343, 355—358, 581, 709
— всасывание 11
— в сыворотке и плазме, нормальное содержание 355
— катаболизм 333—342
— липогенез 355, 393, 409
— метаболизм 317
— — в эритроцитах 660, 661
— мутаротация 298
— регуляция концентрации в крови 355—358
— синтез жирных кислот 355, 409
— структура 298
— толерантность 593
— транспорт 309, 312, 581
Глюкозамин 709
β-Глюкозидаза 440
Глюкоцереброзиды 378, 438
Глюкозо-аланиновый цикл 347, 350
Глюкозо-1-фосфат 79, 321
Глюкозо-6-фосфат 79, 316, 709
Глюкозо-6-фосфатаза 79, 347
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 79, 359, 362—364
Глюкозурия 593
Глюкокиназа 315
Глюкокортикоидные гормоны 572
— — механизм действия 575
— — регуляция скорости транскрипции 196, 555
Глюкокортикоидный рецептор 555, 556
Глюкокортикоиды 555, 556, 572—575, 699, 717
Глюконеогенез 343—355
— в печени, регуляция 350—355
— при голодании 356
— регуляция 350
Глюкуронидаза, недостаточность 709
β-Глюкуронидазы 709, 710
Глюкуроновая кислота 704, 705, 708
Голодание 397, 407, 591, 592
Гомеостаз 588
Гомогентизиновая кислота 505, 507
Гомогентизатдиоксигеназа 505
Гомоцистеин 502
Гомоцистинурия 503
Гонадотропин-рилизинг-гормон (гонадолиберин, ГнРГ) 558
Гонадотропин хронический человека (ХГЧ) 548, 563, 741
Гонадотропины 548, 609, 612
Гормон адренокортикотропный 548, 565, 566. *См. также Адренокортикотропный гормон*
— антидиуретический (АДГ) 548, 566, 598

— лютинизирующий (лютотропин, ЛГ) 548
— лютеотропный 548, 560, 561. *См. также Пролактин*
— меланоцит-стимулирующий (МСГ) 565, 566
— паратиреоидный (ПТГ) 548, 605, 717
— пролактин-ингибирующий (ПИГ) 558, 563. *См. также Пролактостатин*
— роста-рилизинг-гормон 558, 559. *См. также Соматолиберин*
— роста человека 560—563
— тиреотропный (тиреотропин, ТТГ) 548, 564
— фолликулостимулирующий (ФСГ) 548, 564, 565
Гормон-рецепторный комплекс, связывание с ДНК 196
Гормоны
— цАМФ как второй посредник 255, 256
— гипоталамуса 558—560
— гипофиза передней доли 560—566
— гликопротеиновые 565
— желудочно-кишечного тракта 462, 464, 587
— — механизм действия 587
— классификация 587
— коры надпочечников 572—577
— мозгового вещества надпочечников 577, 578
— поджелудочной железы 578—587
— половых желез 609—615
— регуляция метаболизма кальция 604—609
— рецепторы 249—252, 549
— роста (ГР) 553, 561—563
— — регуляция секреции по механизму обратной связи 562, 563
— семенников 609
— — биосинтез 610
— тиреоидные 506, 508, 548, 568—572
— щитовидной железы 506, 508
— — — регуляция синтеза и высвобождения 570
— эффект аутокринный 546
— — паракринный 546
— яичников 612—615
— — механизм действия 614
— — регуляция и физиологическое действие 614
Гуаназа 530
Гуанилатциклаза 88, 252, 516
— цитозольная 253
— мембранная 252, 253
Гуанин 142, 527, 528
Гуанозин 142
Гуанозиндифосфат 287, 527
Гуанозинмонофосфат 142, 528
— циклический (цГМФ) 252
Гуанозинтрифосфат 287, 527
ГЭТЕ — гидроксиэйнозатетраноаты 420, 422
ГПЭТЕ — гидропероксидэйкозатетраноаты 420, 422

Д

Дебранчинг-фермент 321
Дегидрогеназа жирных кислот, дефект 405
NADH-Дегидрогеназа 270
Дегидрогеназы 80, 270
— QH_2 273
— зависимые от никотинамидных коферментов 270
— флавопротеиновые 271
— NAD-зависимые 270
— NADP-зависимые 270
7-Дегидрохолестерол 136
Дегидроэпиандростерон (ДЭА) 573, 610
Дезаминирование аминокислот 472
Дезоксиаденилат 539
5'-Дезоксиаденозилкобаламин 131
Дезоксигемоглобин 54
11-Дезоксикортикостерон (ДОК) 573
Дезоксирибонуклеаза (ДНКаза) 522
Дизоксирибонуклеозидтрифосфат в синтезе ДНК 540
Дезоксихолевая кислота 449
Дезоксицитидилат 540
Дезоксицитидин 541
Дезоксицитидинкиназа 541
Дезоксицитозин 540
Декарбоксилирование окислительное 283, 286, 287
— — пирувата 283—285
— аминокислот 512
Декорин 711, 712, 718
Депуринизация 158
Денатурация белков 28—31
— ДНК 148, 217
Денатурирующие агенты 30, 31
Дерматансульфат 705—707, 711, 712, 716
Десатураза 619
— жирных кислот 417
Десенситизация 550
Десмозин 700
Детергенты 29, 30
Диабет несахарный нефрогенный наследственный 598
— — — приобретенный 598, 590
— сахарный 592
— — инсулинзависимый типа 592
— — — — (ИНСД) 592
— — метаболизм сорбитола 596
— — — фруктозы 596
Диабетическая катаракта 596
Диацилглицерол(ы) 373, 375

1,2-Диацилглицерол (ДАГ) 680
Дигидроксиацетонфосфат 336, 339, 392
3,4-Дигидроксифенилаланин (ДОФА) 508, 578
1,25-Дигидроксихолекальциферол 607, 608
Дигидрооротаза(ы) 535
Дигидрооротатдегидрогеназа 535
Дигидрооротовая кислота 534
Дигидротестостерон 610
Дигидроурацил (ДГУ) 537
Диизопропилфторфосфат (ДФФ) 106, 107
Дииодтирозин 569
Дикумарол 675
Динитрофенол 281
Диоксигеназы 506
Диол 623
Дипальмитоилфосфатидилхолин 434, 435
Дипептидазы 466
Дисахариды 306, 308, 691, 692, 704
— структура 303
Дислипопротеинемия 452
Дисульфидные связи в белках 27
Дитилин 44
Дифтерийный токсин 184
Диффузия
— облегченная 239
— простая 239
ДНК, апиримидинизация 722
— апуринизация 158, 722
— бороздка большая 145
— N-гликозилаза 158
— делеции, вставки и перестройки 201, 203
— диспергированные повторы длинные 206
— — — короткие 205
— генсертаза 158
— ионизирующая радиация 722
— клонирование 217
— кодирующая цепь 164
— липкие концы 214
— матричная цепь 164
— метилирование 153
— модель Уотсона и Крика 143, 144
— митохондриальная 146
— мутации 201—205
— репликация 150—153
— повреждения химическими канцерогенами 722—726
— полимеразы (α, β, γ, δ, ε) 151, 152
— полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) 221
— последовательности повторяющиеся (повторы) 205
— — уникальные 206
— «прыгающая» 201
— рекомбинантные, технология 216
— репликация 150—152
— ориджин репликации 153
— — полуконсервативный механизм 150
— репликон 153
— роль в канцерогенезе 722, 723
— секвенирование 215
— синтез, инициация 150—152
— — S-фаза 156
— теломерная 154
— топоизомеразы 150, 151
— транспозиции 201
— фрагменты Оказаки 152
— хеликаза 151
— химерные молекулы 218
— энхансеры 195
— эукариотических организмов 206
ДНК-зонды 215
ДНК-копии (кДНК) 726
— ретровирусов, длинные концевые повторы 726, 733
ДНК-лигаза 153
ДНК-полимераза РНК-зависимая 140, 726
ДНК-топоизомераза 150, 151
Долихол 439, 442
ДОФА-декарбоксилаза (ДП) 508
Дофамин 80, 86, 508, 578
Дофамингидроксилаза 80, 86, 87
Дофамин-β-гидроксилаза (ДБГ) 508
Дыхательная цепь 269
Дыхательный контроль 279

Е

Еноил-редуктаза 412

Ж

Железо 641, 689, 691
— в сыворотке, нормальное содержание 641
— всасывание железа в кишечнике 641
— транспорт железа в плазме крови 642
— негемовое 272
Желтуха 650
— гемолитическая (надпеченочная) 651
— новорожденных 651
— печеночно-клеточная (печеночная) 651
— механическая или обтурационная (подпеченочная) 652
Желудочно-кишечный тракт, гормоны 462, 578—587
— желудочный сок, кислотность 463

Желудочный ингибитооный полипептид (ЖИП) 586
Желчные камни, образование 451
— кислоты 380
— — биосинтез 448—450
— конъюгация 448
— — — регуляция 448, 450
— — энтерогепатическая циркуляция 450
— пигменты 650
— — образование 649, 650
Желчь 451
Жир(ы) 373, 374
— мобилизация 397
— ресинтез 385
— переваривание 381, 382, 384
Жирные кислоты 77, 371—373
— — активация 385
— — насыщенные, биосинтез 409—414
— — α- и ω-окисление 405, 406
— — β-окисление 400—405
— — полиеновые 371
— — — перекисное окисление 430
— — — регуляция синтеза 414
Жировая ткань 392, 394, 397
— — бурая, термогенез 280

З

Законы термодинамики 265

И

α-L-Идуронидаза 709
Изолейцин 488
Изомальтаза 308, 310
Изомальтоза 303
Изомераза(ы) 82
Изониазид 630
Изоферменты 120—122
Изоцитрат 286
Изоцитратдегидрогеназа 281
Имикрамин 629
Иммуноглобулины 60, 61—65
— домены 62
— классы и типы цепей 62
— область вариабельная (V) 62
— — гипервариабельная 62
— — константная (C) 62
— IgM 62, 63
— IgG 63, 64
— IgA 64
— IgE 64, 65
— IgD 65
— переключение синтеза классов 193
Ингибирование аллостерическое 113
— — кооперативность 48, 49, 113
— по принципу обратной связи 114
Ингибиторы дыхательной цепи 275
Ингибиторы трансляции 182—184
Ингибиторы холинергических рецепторов 43, 44
Индол 624
Инозин 530
Инозинмонофосфат (IMP) 523—526
Инозинтрифосфат (ITP) 680
Инозитолтрифосфат ($ИФ_3$) 235, 255
Инсулин 27, 28, 117, 548
— биосинтез 578
— влияние на экспрессию генов 585
— глюконеогенез 352, 582
— комплексы с цинком 580
— липогенез 394, 582, 585
— механизм действия 582
— расщепление проинсулина 580
— регуляция секреции 244, 245, 581
— синтез проинсулина 580
— стимуляция липогенеза 582
— структура 27, 28, 579
— проинсулина 579
— утилизация глюкозы 312—313, 581
— фосфорилирование-дефосфорилирование белка 582
— человека 579
Инсулиновая недостаточность 592
Инсулиновый рецептор 251, 581
Инсулинопопобный фактор роста (ИФР) 562, 729
— — — 1 (ИФР-1) 562
— — — 2 (ИФР-2) 562, 728
Итегрины 245, 246
Интрон(ы) 166
Ионные связи 26
Иодид, метаболизм 568—570
5'-Иод-2'-дезоксиуридин 543
Ионофоры 280
Ипраниазид 630

К

Кадгерины 246
КАД-фермент 534, 538
Калликреин 678, 698
Кальмодулин 87, 680, 681

Кальций 604
— гомеостаз 604
— действие гормонов 605—609
— как медиатор действия гормонов 551—553, 560, 566, 581, 584
— метаболизм 605—609
— регуляция метаболизма гормонами 605—609
Кальций-связывающий белок 608
Кальцитонин (КТ) 548, 717
— как опухолевый маркер 742
— механизм действия 608
— структура 608
Кальцитриол 548, 717
— биохимия 606
— механизм действия 608
— рецептор 608
Кальциферол 136
Карбамоилфосфат 480
Карбамоилфосфатсинтаза I 480
Карбоангидраза 86, 462
Карбоксипептидаза 100, 464
Кардиолипин 230, 375
Карликовость 567
Карнитин 400, 401, 500
Карнитин-ацилтрансфераза I 400
Карнитин-ацилкарнитин-транслоказа 401
Карнозин 516
Катаболизм 108, 264, 281—291
Катаболические процессы
— специфические 282
— общий 282—291
Каталаза 100, 431, 632, 661, 662
Катализ, ионы металлов 85, 86
— механизм «пинг-понг» 88, 89
— последовательный 89
Каталитический центр ферментов
— — — гипотеза индуцированного соответствия 95
— — — — «ключ—замок» 94
Катепсин В 698, 739
— D 742
Катехоламины 508, 517, 577
— биосинтез 508, 578
— классификация и механизм действия 577
Катехол-О-метилтрансфераза (КОМТ) 519
Квашиоркор 461
Кератансульфат(ы) 706, 710, 711, 716
Кетоацидоз 409, 593, 595
Кетоацил-КоА-редуктаза 412
α-Кетоглутарат 470, 689, 691
Кетонемия 409, 593, 595
Кетоновые тела 405—409
Кетонурия 409, 593, 595
Кетотиолаза 409
Киназа(ы)
— фосфорилазы 323
Кининоген высокомолекулярный 676
Клатрин 444, 665
Клетка(и)
— Лейдига 609, 611
— Сертоли 609, 611
Клеточный цикл 156, 157
Клофибрат 457
Кобаламин 130, 502
Ковалентные связи
— пептидные 15, 16
— дисульфидные 27
Кодон(ы) 170
— инициирующий 175
— «качание» 173
Колинеарность 173
Колипаза 381, 383
Коллаген 680, 687—700, 716—720
— взаимодействие с гликозаминогликанами и протеогликанами 717, 720
— синтез 688—691
— строение 57, 58
— тройная спираль 691, 692
Коллагеназа 697, 698, 717
Коллагеновые фибриллы 692—695, 711, 719
цис-Конфигурация 373
цис-Конформация белков 23
Копропорфиноген-оксидаза 637
Кора надпочечников 572
— — гормоны 572
— — биосинтез 572—575
— — зоны 572
Корепрессор 187
Кортизол 421, 548, 572
— в плазме 575
Кортикостероид-связывающий глобулин (транскортин) 575
Кортикостерон 573
Кортикотропин-рилизинг-гормон (кортиколиберин) 558
Кости, минерализация 608, 716, 717
Кофакторы 83—87
Кофермент А (КоА) 83, 284, 289—291, 385
— — синтез 504
— Q 272, 275, 277
Коферменты 87, 88
— как вторые субстраты 87
— никотинамидные 91, 92, 270

Крахмал 304
Креатин 500, 501
Креатинин 501
Креатинкиназа 121, 122, 501
Креатинфосфат 501
Крезол 623
Кретинизм 571
Кровь, плазма 657—686
— свертывание 667—686
Ксантин 530
Ксантиноксидаза (ксантиндегидрогеназа) 530
Ксантозинмонофосфат (КМФ) 524
Ксенобиотики, метаболизм 616
Ксерофтальмия 134
Ксилулозо-5-фосфат 361

Л

Лактаза 308—310
Лактат 93, 120, 340, 341
— в крови, нормальное содержание 348
Лактоацидоз 348, 594
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) 92, 93, 120—122, 341
Лактоген плацентарный 563
Лактоза 303, 309
— гидролиз β-галактозидазой 187, 308—310
Lac-оперон 186, 187
Ламинин 714, 715, 720
Ланостерол 442
Латеральная диффузия 238
Лейкотриены 420, 422, 424
Лейцин 488
Лиаза(ы) 81
C_{17-20}-Лиаза 572
Лигазы 82
Литандин 648
Лигноцериновая кислота 416
Лизилгидроксилаза 689
Лизин 11, 13, 469, 494
Лизосомные болезни 439
Лизофосфолипаза 384
Лизофосфолипиды 384, 433
Лимонная кислота 285, 286
Лимфома Беркитта 735
— — реципрокная транслокация 734
Линолевая кислота 372, 373
α-Линоленовая кислота 372, 373
Липаза
— гормон-чувствительная 397
— панкреатическая 77, 78, 87, 381—383
— языка 384
Липидный бислой 288
Липиды
— всасывание 382, 385
— перекисное окисление 428—431
— пищевая потребность 379
— транспорт 386—388
— — и запасание 394
Липогенез 394
— регулирующие факторы 394
— регуляция ацетил-КоА-карбоксилазы 414, 415
— — гормональная 394
Липоевая кислота 87
Липоксигеназный путь 420, 422
Липоксигеназы 420, 423
Липоксины 423
Липолиз 394
— регуляция 396
Липопротеинлипаза 391, 394, 396
— семейная недостаточность 452
Липопротеины 386, 387, 389
— высокой плотности (ЛПВП, α-липопротеины) 382, 389, 447
— низкой плотности (ЛПНП, β-липопротеины) 389, 394, 444, 446, 447
— очень низкой плотности (ЛПОНП) 389, 394, 395, 444, 447
— промежуточной плотности (ЛППП) 389, 394
Литохолевая кислота 449

М

Макроэргическая связь 267
Малат 80, 286—289, 293
Малатдегидрогеназа 80, 83, 287, 346
Малатный челночный механизм 337—339
Малик-фермент 414
Малонил-КоА 403, 410, 411, 413
— биосинтез 411
Малоновый диальдегид 430
Мальтаза (α-глюкозидаза) 310
Мальтоза 303, 306
Мевалонат 442, 443
Медь в оксидазах 270, 273, 295, 508, 693, 694, 700, 702
Межклеточная адгезия 245
— гомофильное связывание 247
— гетерофильное связывание 247
Мезобилиноген 650
Меланины 508
Мелатонин 513

Мембрана(ы), активный транспорт 240, 241
— аппарата Гольджи 228
— асимметрия 233
— белки, локализация 236
— жирно-кислотный состав 231
— лизосом 228
— липиды 229—234, 375
— митохондриальная 228, 269
— — транспортные системы 280
— текучесть 234
— транспортные системы 238—245
— — — антипорт 240, 243
— — — симпорт 240, 243
— — — унипорт 240
— ЭР 228
— ядерная 228
Мембранный «якорь» 237
Менопауза 699, 717
Менструальный цикл 576, 614, 615
Метаболизм промежуточный на уровне субклеточном 264, 108
Метаболиты 265
Метаболические пути 109
— — локализация 109
— — регуляция 110—118
Металлопротеазы 739, 747
Металлотионеин 191, 628
Металлоферменты 698
Металлоэнзимы 84
Металлы тяжелые 29
Метастазирование 738, 739
Метгемоглобинредуктаза 661—663
N^5,N^{10}-Метенил-H_4-фолат 496
3-Метилгистамин 515
N^7-Метилгуанин 148
Метилдофа 630
Метилтрансфераза 621, 623
5-Метилцитозин 148, 190
Метионил-тРНК 175
Метионин 11, 499—501
— активация 500
— регенерация 502
Миелопероксидаза 665, 667
Микросомы, цитохром Р-450 618—621
Минерализация костей 608
Минералокортикоиды 572
— синтез 574
Минорные основания 148
Миоглобин(ы) 45, 46, 49
Миорелаксанты 43
Миссенс-мутации 202, 208, 209
Митохондриальная мембрана 228, 269
— — транспортные системы 241, 270—274, 280
Митохондриальный матрикс 270
Митохондрии
— дыхательная цепь, организация 270, 274
Михаэлиса константа 101
Михаэлиса—Ментен уравнение 101
Мозг, аминокислоты 489
Моноаминоксидаза (МАО) 519
Моноацилглицерол 78, 375, 382, 386
Моноеновые кислоты 372
Моноиодтирозин 569
Монооксигеназы 506
Моносахариды 298
Мочевая кислота 529—531
— — выделение из организма 530
— — образование аллантоина 531
— — — из пуриновых нуклеозидов 530
Мочевина 110, 472, 481—486
Мукополисахаридозы 709, 710
Мукополисахариды 703
Мутагены 161
Мутаротация 298
Мутации 201—205
— ген белка-рецептора ЛНП 454
— глобиновых генов 208, 209
— сдвига рамки считывания 203
— точечные 202—205
Мышцы
— аминокислоты 489

Н

Надпочечники, мозговой слой 577
Нафтохинон 674
Нейраминовая кислота 377
Нейромедиаторы 546, 556
Нейрофизины 566
Неселективные каналы 239
Ниацин 126
Нидоген 714, 715, 720
Никотинамид 91, 126
Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) 87, 91, 92, 270, 401, 402, 408, 417
— восстановленный (NADH) 270, 271, 401, 402, 408—410
Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP) 87, 91, 92, 270, 410, 442
— восстановленный (NADPH) 92, 270, 410, 442
Никотинамидные коферменты, механизм окисления и

восстановления 270, 271
Никотиновая кислота 126
Нонсенс-кодон(ы) 203
Норадреналин 80, 86, 508, 577, 578
Нуклеазы (5'-экзонуклеазы) 166, 522
Нуклеиновые кислоты, структура и функция 140–170
Нуклеосомный кор 145
Нуклеосомы 145
Нуклеотидазы 522
Нуклеотидсахара 521, 707, 708
Нуклеотиды 142, 522–540
– синтез 110

О

Облегченная диффузия 240
Обмен промежуточный 264
Ожирение 396, 397
Окаймленные ямки 244
Окисление 268
– биологическое 264
– жирных кислот длинноцепочечных 400
Окислительно-восстановительный потенциал 268
Оксалоацетат 83, 286, 288, 290, 291, 292, 410, 470
Оксигеназы 80
Оксидаза(ы) 80, 429
– аминокислот 474
– жирных кислот 429
Оксидоредуктазы 80
Окситоцин 17, 18, 548, 566, 567
Олеиновая кислота 372
Олигосахариды 303, 707
Онкоген вирусный (v-onc) 730
– клеточный (c-onc) 730
Онкогены 728–731
Оператор 186
Оперон 186
– триптофановый 187
Lac-оперон 186
Опухолевые клетки, изменения биохимические 727
– – – свойств поверхности 728
– маркеры, использование при диагностике 740–742
Опухоли, прогрессия 737
Орнитин 76, 482, 516
Орнитин-декарбоксилаза, биосинтез полиаминов 517
Орнитин-карбамоилтрансфераза 482
Оротат-фосфорибозилтрансфераза 534, 535
Оротидилат (оротидинмонофосфат, OMP) 535
Оротидилатдекарбоксилаза (OMP-декарбоксилаза) 534, 535
Оротовая ацидурия 538
Остеонентин 714
Остеопороз 606, 717

П

Пальмитолеиновая кислота 372
Панкреатический полипептид 578
Пантотеновая кислота 127, 284
Паракринный эффект 546
Паратиреоидный гормон (ПТГ), биохимия 605, 717
– – механизм действия 605
– – протеолиз 605
Паращитовидные железы 605
Пассивный антипорт 241
Первично-активный транспорт 240, 241
Пентозофосфатный путь 360–364
Пентозы 142, 299
Пепсин 100, 123, 462, 463
Пепсиноген 462, 463
С-Пептид 580
Пептидилтрансфераза 176
Пептидил-тРНК 178
Пептиды 15–19
– биологическая роль 16–19
– первичная структура 15
– строение 15, 16
Пероксидаза(ы) 296
Печень
– гликоген 318, 322
– катаболизм хиломикронов 391
– кетоновые тела 406, 408
– метаболизм липидов 393, 395, 439, 444
– обезвреживание токсических веществ 616–617
– окисление жирных кислот длинноцепочечных 400
Пиридоксаль 127, 128
Пиридоксальфосфат 87, 89, 128, 469, 470, 512
Пиридоксамин, основные свойства 127
Пиридоксин, основные свойства 127
Пиримидин(ы) 142
– биосинтез 533, 534
– – регуляция 534–536
– катаболизм 536–538
– нарушения метаболизма 538, 539
Пируват 93, 120, 281, 470, 492, 512
– окисление 284, 285
Пируватдегидрогеназный комплекс 283, 284, 289, 290
Пируваткарбоксилаза 100, 292, 293, 345
Пируваткиназа 84, 85, 337
Пищеварение 265, 282

Плазма крови, белки 71, 72
Плазмалоген 376
Плазмин 698
Плазминоген 681, 682
Плацентарные лактогены (ПЛ) 563
Подагра 531
Поджелудочная железа, гормоны 578
– – островки Лангерганса 578
Полиамины 517
Полидипсия 594
Полиеновые жирные кислоты 372, 373, 417, 456
Полимераза бета (β) 151, 152, 159
Полимеразы альфа (α) 151
Полипептид(ы) 16
Полирибосомы (полисомы) 178–180
Полисахариды 302–305, 704
Полиурия 594
Половые железы, гормоны 609, 612
Порфирии 640, 641
Порфобилиноген 637, 639
Посттрансляционные модификации полипептидных цепей 180, 181
Потребности в белке и аминокислотах 460
Прегненолон 572, 573
Прекалликреин 676
Пре-мРНК, сплайсинг 166, 167
Провирус 726
Прогестерон 609, 613, 614
– биосинтез 573, 615
Прогестины 609
Прозерин 104, 105
Проинсулин 580
Прокарбоксипептидаза 464
Проколлаген 688–692
Пролактин (ПРЛ) 548, 563
Пролилгидроксилаза 689, 691
Пролин 469, 493, 688–691
Промотор 163–165
– активация протоонкогена 733
Промотирование канцерогенеза 724
Проопиомеланокортин (ПОМК) 565, 566
Простагландины (ПГ) 418–421, 424, 427, 680, 717
Простациклины 418, 679, 680
Протеаза(ы) 81, 87
Протеин С 678
Протеин S 678
Протеиназа G 256, 257
Протеинкиназа А 256
Протеинкиназа С 256
Протеинкиназа(ы) 81, 117, 256, 257, 552
– cAMP-зависимые 115, 552
– cAMP-независимая 552–554
– тирозиновая 251, 583
– Ca^{2+}/кальмодулин-зависимая 261
Протеинфосфатаза 117, 586
Протеогликаны 703, 704, 707, 708–712
– О-гликозидные связи 707
– N-гликозиламиновые связи 707
– деградация полисахаридных цепей 709
– структура 710–712
Протомеры 33, 34
Протон-транслоцирующая окислительно-восстановительная петля 277
Протоны, транслокация в митохондриальной мембране 276, 277
Протоонкоген(ы) 729
Протопорфирин 637
Протопорфириноген 637
Протромбин 668, 671, 673
Проферменты 463, 464
Процессинг белков РНК 169
Проэластаза 464
Псевдоген(ы) 206, 208
Псевдоурацил 148
Пуриннуклеозидфосфорилаза 529, 530
– недостаточность 542
Пуриновые и пиримидиновые основания 142
– нуклеотиды, метаболизм 522–541
Пурин(ы) 142, 522
– биосинтез, регуляция 522–529
– катаболизм 529–530
– нарушения метаболизма 530–533
Пуриннуклеозидфосфорилаза 529, 530, 542
Путресцин 517

Р

Р-гликопротеин 626, 627
Радиоавтография 215, 216, 222
Рак 737
Рахит 608
Рацемические смеси 10
Реакции анаплеротические 491
— окислительно-восстановительные 268
— разобщение дыхания и фосфорилирования 280, 281
— сопряженные 276
— — биоэнергетика 264–281
— химические экзергонические 266
— — эндергонические 266
Рекомбинация хромосом 191

Ренин 601
Реннин 463
Репарация 157–162
Репликация 150
Рестриктазы 213, 214
Ретинол 132
Рецепторы адренергические 577
– гормонов 249, 252, 549, 550
– – регуляция 550
– – – понижающая 550
– – структура 549, 550
– инсулина 251, 582
– инсулиноподобных факторов роста 562
– ЛПНП 238, 245
– Т-клеток 65
– холинергические 43
– эстрогенов 262, 614
Рибозимы 76
Рибозо-5-фосфат 361
Рибонуклеаза(ы) (РНКаза) 87, 522
Рибонуклеотидредуктаза (РНР) 539, 540
Рибонуклепротеины малые ядерные (МЯРНП) 167
Рибосома 148, 169, 174
Рибофлавин 90, 126
Рибофлавинфосфат 271
Рибулозо-5-фосфат 361
РНК (рибонуклеиновая кислота) 146, 148
– биологические функции 147
– матричные (мРНК) 147
– – триплетный код 170
– транспортные (тРНК) 147
– – процессинг 168
– – синтез белка 175–178
– рибосомные (рРНК) 174
РНК-праймер 151
Ротенон в окислительном фосфорилировании 275

С

Сайленсер 262
Саузерн-блоттинг 215
Сахараза 306, 307, 310
Сахароза 303
Свободная энергия 265, 267, 275
Связи высокоэнергетические 267
Седогептулозо-7-фосфат 361
Секретин 381, 464, 587
Секс-гормон-связывающий глобулин (СГСГ) 611
Селективные каналы 239
Селектины 246, 247
Серин 11, 488, 489, 493–495, 503, 513
Серин-гидроксиметилтрансфераза 494
Сериндегидратаза 476
Серотонин 513
Серповидноклеточная анемия 208, 222, 663
Синдром
– Альпорта 701
– Гудпасчера 701
– Иценко–Кушинга 576
– Леша–Нихена 532
– Марото–Лами 710
– Менкеса 702
– Моркио 710
– Стиклера и Вагнера 701
– Хантера 710
– Хурлера 710
– Элерса—Данлоса 691, 692, 701
Синдромы множественной эндокринной неоплазии (МЭН) Санфилиппо 710
Синтез белка, ингибиторы 182–184
Скатол 624
Слюна, переваривающее действие 305
Соматолиберин 558, 559
Соматомедин 562
Соматостатин 558, 559
Соматотрофы 560
Сорбитол, метаболизм 596
Спектрин 658, 659
Сперматогенез, регуляция 611
– роль тестостерона 612
Сперматогонии 611
Спермидин 517
Спермин 517
Спирты в составе липидов 373, 374
Сплайсинг 166
– альтернативный 167, 197, 198
Стероидные гормоны надпочечников, метаболизм и экскреция 572
– – – регуляция синтеза 574
– – – транспорт в крови 575
Стероиды 439
Субстраты, специфичность 76–79
Сукцинатдегидрогеназа 89, 90, 104, 286, 287
Сукцинаттиокиназа 286, 287
Сукцинил-КоА 286, 287
Сульфаниламиды 104, 498
Сульфатаза(ы), недостаточность 709
«Сульфат активный» (ФАФС) 708
Сульфотрансфераза 621, 624, 626
Супервторичная структура 31–33
Супероксиддисмутаза 296, 431

Супероксид-анион 428, 429
Супероксид-радикал 295, 660, 661
Супрессоры опухолей 731–733
Сурфактант 434–436
Сфингозин 232, 376, 439
Сфинголипиды 232, 233, 375, 436, 438
– метаболизм 435–489
Сфингомиелиназа 439
Сфингомиелины 232, 376, 377, 437, 439
Сфингофосфолипиды 232

T

Талассемия 212, 664
α и β-Талассемия 212
Таурин 449, 504
Таурохенодезоксихолевая кислота 449
Таурохолевая кислота 449
Теломераза 155
Тельца Хайнца 663
Тенасцин 714, 715
Терапия
– генная 224, 747
– фотодинамическая 746
Термогенин 280
Тестостерон 610
– биосинтез 610
– метаболиты 610
– стимуляция сперматогенеза 612
Тетрагидробиоптерин 80, 86, 505, 507
Тетраиодтиронин (тироксин, T_4) 508, 548, 569, 570
Тиамин (витамин B_1) 125
Тиаминдифосфат 87, 284
Тимидилат (TMP) 539
Тимидилатсинтаза 539, 541
Тимидин 541
Тимидинкиназа 541
Тимидинмонофосфат (TMP) 539
Тимин 540
Тимин-тиминовый димер 161
Тиоредоксин 539
Тиоредоксинредуктаза 539
Тиоэстераза 412
Тиреоглобулин 568
– метаболизм 568
Тиреоидные гормоны, биосинтез 568, 569
– – механизм действия 570
Тиреопероксидаза 569
Тиреотоксикоз 571
Тиреотропин 548
Тиреотропин-рилизинг-гормон (тиролиберин, ТРГ) 558
Тирозин 11, 493, 504–512, 568
– биосинтез 505
– иодинирование 569
– катаболизм 505–508, 570
Тирозиназа 118, 508
Тирозин-гидроксилаза 508
Тирозинемия 511
Тирозинтрансаминаза 505
Тироксин (тетраиодтиронин, T_4) 506, 508, 548
Тироксин-связывающий глобулин (ТСГ) 570
– преальбумин (ТСПА) 570
Тканевый активатор плазмина 681
Токоферолы 137, 431, 432
Токсины 184
Топоизомеразы 150, 151
Трансальдолаза 360
Трансаминаза(ы) 469–472
Трансаминирование 469–472
Трансгидрогеназа энергонезависимая 270
Транскетолаза 360
Транскетолазные реакции 361
Транскортин 575, 658
Транскрипт первичный 166
Транскрипция 162
– промотор 163, 164
– сайт терминации 163
– транскриптон 163
Трансмембранная передача сигнала 248
Трансмембранные каналы 239
Трансметилирование 500, 519
Транспозоны (прыгающие гены) 201
Транспорт активный в мембранах 240–241
Транстиретин 684
Трансфераза(ы) 81
Трансформация злокачественная 733
Трегалаза 308
Трегалоза 308, 309
Треонин 11, 469, 494
Треониндегидраза 476
Триацилглицерол(ы) 373, 392
– гидролиз 381
– липолиз 394, 396, 397
– синтез 393, 394
Триацилглицероллипаза гормон-чувствительная 397
Трииодтиронин (T_3) 508, 569, 570
– – биосинтез 569
– – механизм действия 570
Триозофосфат 335
Трипсин 107, 118, 464

Трипсиноген, активация 118, 464
Триптофан 11, 513
Тромбин 107, 668, 671–673, 680
Тромбоксаны (ТО) 418, 419, 421, 424, 425, 427, 680
Тромбомодулин 678
Тромбоспондин 714, 715
Тромбоцит-активирующий фактор (ТАФ) 376

У

Убихинон 88–90, 272
– биосинтез 442
Углеводы 297–367
– всасывание 240, 308, 309
– транспорт 308
– метаболизм 315–318
– – регуляция 355
– пищевая потребность 298
– энергетика окисления 338, 340
Угольная кислота, образование и диссоциация 50
Ультрафиолетовое излучение, образование пиримидин-пиримидиновых димеров 167, 722
Ультрацентрифугирование
– разделение липопротеинов 390
Урацил 142, 534, 537
Урацил-ДНК-гликозилаза 158, 161
Уреаза 77, 100, 119
Уридилат (уридинмонофосфат, УМФ) 142, 534, 535
Уридин 142
Уридиндифосфат (УДФ) 534, 536
UDP-N-Ацетилгалактозамин 708
UDP-N-Ацетилглюкозамин 708
Уридиндифосфатгалактоза (UDPGal) 367
UDP-глюкозо-4-эпимераза 367
Уридиндифосфатглюкоза (UDP-глюкоза) 320, 708, 709
UDP-глюкозодегидрогеназа 709
UDP-глюкозопирофосфорилаза (UDPGlc-пирофосфорилаза) 319
UDP-глюкуронилтрансфераза 621, 625
Уридиндифосфатглюкуроновая кислота 708, 709
Уридиндифосфатсахара 521, 708
УМФ-синтаза 534
Уридинтрифосфат (УТФ) 534, 536
Уридин-цитидинкиназа 534
Уробилиноген(ы) 649
Урокиназа 682
Уроканиназа 515
Уроканиновая кислота 477, 515
Уропорфобилиноген 637

Ф

Фаголизосомы 665, 666
Фагосомы 665
Фагоцитоз 664–667
Фактор адгезии тромбоцитов (фактор Виллебранда)
– внутренний 462
– роста тромбоцитарный (ТФР) 730
– – эпидермиса (ЭФР) 730
Факторы высвобождения (R-факторы) 178
– инициации белкового синтеза 175
– роста, действие, биохимические механизмы 728
– – – путь аутокринный 728
– – – – паракринный 728
– – инсулиноподобные (ИФР) 728, 730
– – и онкогены 729, 730
– – рецепторы 728–730
– свертывания крови 668, 669
– терминации 178
– элонгации 176
Фарнезилпирофосфат 442
Фенилаланин 504–512
Фенилаланин-гидроксилаза 505, 509, 513
Фенилацетилглутамин 487
Фенилацетат 487, 510
Фенилкетонурия 509
Фениллактат 510
Фенилпируват 510
Фенобарбитал 627, 651, 655
Фенол 623
Феохромоцитомы 578
Фермент-субстратный комплекс 94, 95
Ферменты
– активность 98, 99
– – влияние глюкагона 117
– – – инсулина 117
– аллостерические 112–114
– – кооперативность связывания субстратов 113
– биотинзависимые 292
– в клинической диагностике 119–123, 472
– внутриклеточное распределение 109
– группоспецифичность 77
– и коферменты в окислительно-восстановительных процессах 270–274
– ингибирование активности 102–108
– – конкурентное 102–105
– – неконкурентное 105–108
– ионы металлов 85–87
– как белковые катализаторы 76–80
– – катализаторы кислотно-основного и ковалентного типов 96, 97

– каталитический участок 77, 78
– кинетика 101, 102
– классификация 80–83
– компартментация 109
– механизм действия 92–97
– множественные формы (изозимы) 120–122
– обновление 111
– *общие свойства* 76–80
– β-окисления жирных кислот в митохондриях 110
– оптическая специфичность 78
– полимеризации ДНК 151–153
– простетическая группа 87
– регуляция активности 117, 118
– – аллостерическая 112–114
– – белок-белковыми взаимодействиями 114, 115
– – количества 111
– – доступностью молекул субстрата и коферментов 111
– – фосфорилированием/дефосфорилированием 116, 117
– – частичным протеолизом 117, 118
– рестрикции 213, 214
– специфичность 76–79
Ферритин 638, 643
Фибрин 668–671
Фибронектир рецептор 247
Фибриновый сгусток 669–671
Фибриноген 669–671
Фибринолиз 681, 682
Фибромодулин 711, 712
Фибронектин 712–714, 717
Филлохинон, основные свойства 137
Флавинадениндинуклеотид (FAD) 87, 89, 90, 271, 402
Флавин-зависимые дегидрогеназы 271
Флавинмононуклеотид (FMN) 87, 90, 271
Флавопротеин(ы) 271
— электронпереносящий 271
«Флип-флоп» перескоки 234
Фолацин, основные свойства 129
Фолиевая кислота (фолат) 129, 495–498
Фосфатаза(ы) 109
Фосфатидилинозитол 230, 436, 552
Фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат 235
Фосфатидилсерин 375, 433
Фосфатидилхолин 230, 375, 384, 433, 435, 500
Фосфатидилэтаноламин 230, 375, 433
Фосфатидная кислота 230, 375, 433, 436
Фосфаты высокоэнергетические 267, 337
3-Фосфоаденозин-5-фосфосульфат (ФАФС) 88, 708
2-Фосфоглицерат 337
3-Фосфоглицерат 336
Фосфоглицераткиназа 337
Фосфоглицератмутаза 337
Фосфоглюкоизомераза 79
Фосфоглюкомутаза 79, 346
6-Фосфоглюконат 359
6-Фосфоглюконатдегидрогеназа 359
6-Фосфоглюконолактон 79, 359
Фосфодиэстераза(ы) 257
Фосфоенолпируват 267, 337
Фосфоенолпируват–карбоксикиназа (ФЕПКК) 345, 346
Фосфоинозитиды, действие гормонов 584
Фосфолипаза(ы) 255, 680
– А 255, 383
– С 255, 261
Фосфолипиды 374, 375, 432–436
4'-Фосфопантетеин 128, 412
Фосфопротеинфосфатазы 117, 323, 324
Фосфопротеины 717
5'-Фосфорибозиламин 523, 525
5-Фосфорибозил-1-дирофосфат (ФРДФ) 522, 528
Фосфорибозил-дирофосфат-синтетаза 522, 528, 529, 531
Фосфорилирование АДФ 276
– окислительное 276–279
– – барбитураты 275
– – ингибиторы 275
– – хемиосмотическая теория 276
Фосфоролиз 320
Фосфотриозоизомераза 335
Фосфофруктокиназа 335
Фосфохолин 434
Фотолиаза 161
Фотореактивация тиминовых димеров 164
Фруктоза 300
– метаболизм 364–366
Фруктозо-1,6-бисфосфат 336
Фруктозо-1,6-бисфосфатаза 347
Фруктозо-2,6-бисфосфатаза 351–353
Фруктозо-6-фосфат 79, 335, 708, 709
5-Фторурацил 543, 743
Фукоза 706
Фумараза 81, 100, 287
Фумарат 81, 287
Фумаратгидратаза 81, 287
Фумарилацетоацетатгидролаза 506

X

Хемиосмотическая теория 276
Хиломикроны 382, 388, 389, 391
Химозин 463

Химотрипсин 107, 464, 465
Химотрипсиноген 464, 465
Холевая кислота 380, 448
Холекальциферол 136, 607
Холестерол 234, 339–448
– биосинтез 111, 442
– – регуляция 442–444
– в сыворотке и плазме, нормальное содержание 452
– выведение 448
– растворимость в желчи 451
– транспорт 444–448
– эфиры 380, 442
Холестеролэстераза 384
Холецистокинин 381, 464
Холин 432, 513
Хондроитинсульфаты 705, 706, 710, 711
Хроматография
– аффинная 72
– гель-фильтрация 70
– ионообменная 72
Хромаффинные гранулы 577, 578
Хромосомы гомологичные 207
– мутацин 201, 202
– рекомбинация 201

Ц

Целлюлоза 304, 306
Целиакия 469
Церамид 232, 376, 377, 378, 432, 437, 438
Церамидаза 439, 440
Цереброзиды 377
Цереброновая кислота 377, 416
Цианид 275
Цикл ATP/ADP 266, 268
– γ-Глутамильный 467
– Кори 348
–Кребса 285–291
– лимонной кислоты 285
– – – амфиболическая роль 291–293
– – – высокоэнергетические фосфатные связи 287, 288
– – – глюконеогенез 343
– – – реакции 286–288
– – – регуляция 289–291
– – – энергетика 288
– молочной кислоты 348
– орнитиновый 481
– – метаболические нарушения 486–488
– трикарбоновых кислот 110, 111, 285
Циклооксигеназа 108, 680
Циклины 156
Циклы субстратные «холостые» 350–354, 399
Цинк 580, 698
Циркуляция энтерогепатическая желчных кислот 450
Цирроз печени 699
Цистатионин 504
Цистатионинурия 503
Цистеин 493, 499, 503
– биосинтез 503
– превращение 503, 504
Цистеинсульфиновая кислота 504
Цистин 503
Цистинурия 469
Цитарабинозид 543
Цитидин 142, 534
Цитидиндифосфат (ЦДФ) 540
Цитидинтрифосфат (ЦТФ) 536
Цитохром b_5 619
Цитохром(ы) 86, 273
– P-450 618–620
– – в микросомах 618
Цитохромоксидаза 80, 273
Цитрат 286
Цитратсинтаза 83, 286
Цитруллин 482, 486
Цитруллинемия 486

Ч

Частичный протеолиз 463, 465

Ш

Шапероны 36–38

Щ

Щавелевоуксусная кислота см. Оксалоацетат
Щелочная фосфатаза сыворотки, нормальное содержание 716
Щитовидная железа 568
– – гормоны 568–571
– – патофизиология 571, 572

Э

Эйкозаноиды (5, 8, 11, 14) 417, 421–424

Эйкозапентаеноевая кислота (5, 8, 11, 14) 417, 419
Эйкозатриеноат (8, 11, 14) 417, 419
Экзергонические реакции 266
Экзон(ы) 166–168, 454, 699
Экзонуклеаза(ы) 159
Экзопептидаза 465
Экзоцитоз 244, 580
Экспрессия генов, дерепрессия 190
– – регуляция 187–197
– – – у эукариот 187–197
Эластаза 107, 464, 702, 703
Эластин 58, 700, 702, 703
Электрофорез в полиакриламидном геле (ПЭГ, ПААГ) 71, 72
– разделение липопротеинов плазмы 390
Элонгаза 416
Элонгация 175–178, 416
– факторы 176, 177
Эмульгирование жиров 381, 382
Эндергонические реакции 266
Эндокринная система, взаимосвязь с нервной системой 545–548
– – характеристика 545–548
Эндокринные железы, тканевое происхождение и локализация 547
Эндонуклеаза 161, 522
Эндонуклеазы рестрикции 213
– – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) 221
Эндопептидаза(ы) 463
Эндоплазматический ретикулум 261, 574, 580
β-Эндорфин 566
Эндорфины 19, 566
Эндосома 446
Эндоцитоз 243–244
Энергия радиационная, канцерогенный эффект 722
– свободная и законы термодинамики 265
Энзимодиагностика 119–123
Энтальпия 265
Энтеропептидаза 465
Энтропия 265
Энхансер(ы) 195
– активация протоонкогена 739
– эффективность транскрипции 196, 197
Эпимераза 361, 708
Эпоксидгидролаза 623
Эргокальциферол 136
Эргостерол 136
Эритромицин 183
Эритроциты, гликолиз 341
Эстрадиол 614
17β-Эстрадиол (E_2) 610
Эстрогены 612
– биосинтез 612
– рецепторы 614
Эукариоты, регуляция посттранскрипционная 197–199
Эумеланины 508
Эухроматин 190
Эффекторы аллостерические 112

Я

«Яблочный» фермент 293
Яичники, гормоны 614
Яйцеклетки 614
Ямка окаймленная 444, 446