

УЧЕБНИК ДЛЯ ВЫСШЕЙ ШКОЛЫ

Л. В. Коваленко

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ



Лаборатория
ЗНАНИЙ

Л. В. Коваленко

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Учебное пособие

Допущено

Учебно-методическим объединением по образованию
в области химической технологии и биотехнологии
в качестве учебного пособия
для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по специальности
«Химическая технология синтетических
биологически активных веществ»

5-е издание, электронное



Москва
Лаборатория знаний
2020

УДК 577
ББК 28.072я73
К56

Серия основана в 2009 г.

Рецензенты:

проф. кафедры биотехнологии РХТУ им. Д. И. Менделеева,
д. б. н. Н. Б. Градова;
проф. зав. лабораторией геномики и липидомики ГУ НИИ
общей патологии и патофизиологии РАМН,
д. х. н. Р. И. Жданов

Коваленко Л. В.

К56 Биохимические основы химии биологически активных веществ : учебное пособие / Л. В. Коваленко. — 5-е изд., электрон. — М. : Лаборатория знаний, 2020. — 232 с. — (Учебник для высшей школы). — Систем. требования: Adobe Reader XI ; экран 10". — Загл. с титул. экрана. — Текст : электронный.

ISBN 978-5-00101-860-5

Рассмотрены основные биополимеры и их составляющие, принципы главных катаболических и анаболических превращений, пути их регуляции, механизмы взаимодействия некоторых биологически активных соединений с биохимическими мишенями, различные направления метаболизма ксенобиотиков и роль активного кислорода в живых системах.

Для студентов, аспирантов, преподавателей и научных работников химических, биохимических и химико-фармацевтических специальностей.

УДК 577

ББК 28.072я73

Деривативное издание на основе печатного аналога: Биохимические основы химии биологически активных веществ : учебное пособие / Л. В. Коваленко. — 4-е изд. — М. : Лаборатория знаний, 2017. — 229 с. : ил. — (Учебник для высшей школы). — ISBN 978-5-00101-036-4.

ISBN 978-5-00101-860-5

© Лаборатория знаний, 2015

Оглавление

Предисловие	5
Список сокращений	7
Введение	9
Глава 1. Углеводы.....	23
1.1. Строение углеводов.....	24
1.2. Химические свойства углеводов	27
1.3. Производные углеводов	36
Глава 2. Нуклеиновые кислоты	43
Глава 3. Липиды и клеточные мембраны	57
3.1. Эфиры жирных кислот и глицерина.....	58
3.2. Липидные компоненты клеточных мембран.....	61
3.3. Клеточные мембраны	65
Глава 4. Аминокислоты, пептиды и белки	70
4.1. Аминокислоты.....	70
4.2. Пептиды и белки	81
Глава 5. Ферменты	87
5.1. Индуцированное соответствие	100
5.2. Эффект сближения реагирующих групп	101
5.3. Дестабилизация связей	103
5.4. Согласованный кислотно-основный катализ	103
5.5. Ингибирование ферментов	104
Глава 6. Метаболизм	109
Глава 7. Катаболические превращения	118
7.1. Гликолиз.....	118
7.2. Окислительное декарбоксилирование пирувата	122
7.3. Цикл Кребса	124
7.4. Катаболизм жирных кислот	128
7.5. Катаболические превращения аминокислот	131

Глава 8. Окислительное фосфорилирование.....	140
Глава 9. Фотосинтез	149
Глава 10. Основные анаболические процессы	161
10.1. Глюконеогенез	161
10.2. Биосинтез жирных кислот	164
10.3. Биосинтез терпеноидов	167
10.4. Биосинтез аминокислот	170
10.5. Биосинтез пептидов и белков	174
10.6. Образование азотистых оснований и нуклеиновых кислот	180
Глава 11. Нейрогуморальная регуляция	185
Глава 12. Метаболизм ксенобиотиков	199
Глава 13. Клетки и активный кислород	214
Заключение	222
Предметный указатель	224
Литература	229

Предисловие

Развитие промышленного производства в России предполагает значительное увеличение капиталовложений в химическую промышленность, положение которой в общем объеме национального продукта в настоящее время не соответствует оптимальному балансу производственных отношений. Доля химической промышленности в ВВП составляет всего лишь 5–6%, а в мировой химической и нефтехимической промышленности мы занимаем двадцатое место. Правда, экспорт продукции химических предприятий пока превышает импорт, но основное место в поставляемом на внешние рынки ассортименте по-прежнему занимают удобрения, полуфабрикаты полимеров и продукты первичной переработки природного сырья. Наиболее значительное отставание наблюдается в производстве биологически активных веществ, используемых в качестве действующих начал агрохимических препаратов и субстанций лекарственных средств.

Именно в этой сфере химических производств реализуются высокие технологии, использующие специальные производственные аппараты и аналитические приборы, а также эффективные способы реализации многостадийных химических процессов. Высокие технологии востребованы как при получении уже известных соединений, так и при организации производства новых разрабатываемых лекарств и других средств воздействия на живую природу.

Наша страна нуждается в опережающих темпах развития тонкого органического синтеза с внедрением высокотехнологичных производств не только биологически активных веществ, но и высокоэффективных катализаторов, красителей, пигментов, добавок самого разного назначения. Однако все эти вещества обязательно будут воздействовать на окружающую среду, на людей, занятых в их производстве, и на потребителей этой продукции. Именно поэтому разработчики новых технологических процессов и занятые в синтезе новых соединений исследователи должны иметь достаточно объективные представления о функционировании живых систем на молекулярном уровне и о возможных механизмах включения целевых и побочных продуктов химических производств в биохимические превращения.

Уже сейчас ощущается острая потребность в квалифицированных специалистах в области тонкого органического синтеза и анализа химических соединений для работы в исследовательских институтах РАН и на передовых предприятиях, работающих в сфере здравоохранения. В ближайшее время систему высшего образования ожидают глубокие реформы, которые должны привести в соответствие уровень подготовки выпускников высших учебных заведений и постоянно растущие требования науки и производства к приобретаемому багажу знаний и умений специалистов, которые должны легко и эффективно адаптироваться к поставленным перед ними задачам. В условиях современной организации технологических процессов и научных исследований важную роль приобретает готовность персонала к изменениям в производственной и научной деятельности. Это обуславливает необходимость организации учебного процесса в высшей школе в соответствии с новыми стандартами, учитывающими современные тенденции в кадровой политике руководителей предприятий и научно-исследовательских коллективов.

Для химиков, которые занимаются разработкой новых биологически активных веществ и организацией их производства, становится обязательным изучение таких дисциплин, как, например, биохимия, медицинская химия, молекулярная патофизиология, супрамолекулярная химия. Эти знания требуются для эффективной работы в составе комплексных коллективов, в работе которых принимают участие биологи самой разной специализации и медики. В новых учебных планах высших учебных заведений серьезное внимание уделяется организации самостоятельной работы студентов, однако учебники и специализированные учебные пособия по этим предметам или отсутствуют совсем, или же сильно устарели. В соответствии с изложенным издание данного учебного пособия удачно дополняет существующие материалы по биохимии, предназначенные в первую очередь для студентов биологических специальностей.

Президент РХТУ им. Д. И. Менделеева,
действительный член РАН
П. Д. САРКИСОВ

Список сокращений

COX	—	циклооксигеназа
CoA	—	кофермент А
FAD	—	флавинадениндинуклеотид
FMN	—	флаavinмононуклеотид
Hb	—	гемоглобин
metHb	—	метгемоглобин
NADH	—	никотинамидадениндинуклеотид
IF	—	белковый фактор инициации
NADPH	—	никотинамидадениндинуклеотид фосфат в восстановленной форме
QSAR	—	теория о количественных зависимостях активности веществ от их строения (Quantitative Structure-Activity Relationship)
P_i и PP_i	—	анионы фосфорной и пирогосфорной кислот (i — inorganic)
АДФ, ADP	—	аденозиндифосфат
АПБ	—	ацилпереносащий белок
АКТГ	—	адренокортикотропный гормон
АМФ, AMP	—	аденозинмонофосфат
АТФ, ATP	—	аденозинтрифосфат
БАВ	—	биологически активное вещество
ГЛБ, HLB	—	гидрофильно-липофильный баланс
ГМФ	—	гуанозинмонофосфат
ГДФ	—	гуанозиндифосфат
ГТФ, GTP	—	гуанозинтрифосфат
ДНК	—	дезоксирибонуклеиновая кислота
МКЦ	—	микрористаллическая целлюлоза
мяРНК	—	малая ядерная РНК

ПАСК	—	<i>n</i> -аминосалициловая кислота
РНК	—	рибонуклеиновая кислота
мРНК	—	матричная РНК
ПАВ	—	поверхностно-активное вещество
рРНК	—	рибосомальная рибонуклеиновая кислота
ТПП, ТРР	—	тиаминпирофосфат
тРНК	—	транспортная РНК
тРНК ^{Met}	—	транспортная РНК, предназначенная для связывания с метионином
цАМФ, сАМР	—	циклический аденозинмонофосфат
ЦНС	—	центральная нервная система
Фп	—	фосфопантетеил

Введение

Я состою из действующей силы и телесной материи. Ни одно из них не обращается в ничто, так как они не возникают из ничего. Каждая часть моего существа через превращение входит в какую-нибудь часть мира, и эта, в свою очередь, опять в другую часть его, и так бесконечно совершаются его превращения. В силу подобных превращений, возник и я, как и мои родители, и так назад до бесконечности.

Марк Аврелий Антонин, 121–180 гг.

Биохимия, или химия живого, представляет собой самостоятельную естественнонаучную дисциплину, которая включается в учебные планы не только для подготовки специалистов в области молекулярной биологии или других биологических наук, но и для подготовки химиков самых разных направлений, поскольку любые их разработки так или иначе будут взаимодействовать с живой природой. При этом понятно, что освоение всего материала, накопленного за многие годы развития этой области естествознания, даже для специалистов в области химии и технологии биологически активных веществ не представляется возможным. Задача предлагаемого курса состоит в том, чтобы в рамках целостного курса биохимии создать основы для понимания механизмов действия и биотрансформации лекарственных средств, агрохимических препаратов и других ксенобиотиков, тем более что классификация биологически активных веществ все чаще и чаще основывается на механизмах их биологической активности.

В одном из номеров журнала «Химия и жизнь» было предложено оценить возможность проявления токсических свойств у ряда химических соединений, представленных только их химическими формулами. Хорошо зная неорганическую химию, можно было на основании различия в химических свойствах тетрафторида серы и гексафторида серы предположить безвредность второго и высо-

кую токсичность первого, но думаю, что ни один читатель этого журнала, даже из тех, кто подробно изучил обычные учебники по биохимии, не сможет правильно оценить токсичность химически инертного 2,3,4,6-тетрахлордibenздиокси́на, если, конечно, он не занимался проблемой метаболизма ксенобиотиков специально.

Курс биохимии, преподаваемый будущим специалистам в области синтеза и применения биологически активных веществ (БАВ), во-первых, дает полное представление об этой области естественных наук, а во-вторых, закладывает основы, необходимые для изучения курсов медицинской химии (Medicinal chemistry), токсикологии, химии агрохимических препаратов и молекулярной патофизиологии (Medical chemistry). В 1997 г. Комиссия ИЮПАК дала определение медицинской химии: «Медицинская химия является химической дисциплиной, включающей также аспекты биологии, медицины и фармацевтики. Она заключается в изобретении, открытии, дизайне, идентификации и получении БАВ, в изучении их метаболизма и интерпретации их механизма действия на молекулярном уровне, а также в установлении взаимосвязей структура-активность». Из этого определения следует, что медицинская химия представляет собой область знаний, которая непосредственно контактирует с органической химией и с биохимией.

Возможны два подхода к проблеме направленного поиска новых биологически активных веществ и изучения отклика объектов живой природы на химические соединения естественного или искусственного происхождения — статистический и биорациональный. Первый из них представлен накоплением информации о биологической активности в отдельных классах органических соединений и предсказанием свойств новых веществ на основании анализа зависимости активности от строения для известных соединений. Для этого в определенном классе веществ синтезируют несколько десятков структурных аналогов и проводят детальное изучение их биологической активности и физико-химических характеристик. Затем соединения разбивают на две группы, составляющие обучающую и проверяющую матрицы. Основная задача состоит в том, чтобы представить строение молекулы и ее свойства в виде числовых характеристик — дескрипторов. Потом на соединениях, входящих в обучающую матрицу, составляют математическое описание зависимости свойств веществ от их строения, и валидность этого описания проверяют на второй контрольной группе соединений (10–20% от общего числа). Если математическое описание верно (валидно), то

его можно использовать для предсказания свойств аналогичных соединений на основании их структурных формул.

Первые закономерности, соответствующие современным представлениям о количественных зависимостях активности веществ от их строения (Quantitative Structure-Activity Relationship — QSAR), были получены еще в середине XIX в., когда было показано, что с увеличением молекулярной массы токсичность простейших алифатических спиртов сначала возрастает до определенного максимального значения по мере уменьшения их растворимостей в воде и затем снова снижается. В 30-е гг. XX в. Л. Гаммет в США предложил известное уравнение, которое связывает электронные свойства ароматических соединений с их реакционной способностью, и разработал концепцию линейных зависимостей свободных энергий, с помощью которых химические свойства веществ могут быть представлены аддитивными комбинациями корреляционных факторов. Следующим этапом в развитии техники QSAR стали стерические параметры Р. Тафта, распространившего идеи Л. Гаммета на алифатические соединения. Но основоположником современной техники QSAR стал калифорниец А. Р. Ханш (Ганч, Hansch), дополнивший электронные параметры Гаммета и стерические параметры Тафта показателями растворимости веществ в полярных и неполярных средах, поскольку гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ, HLB) вещества характеризует его транспорт в многоклеточных организмах.

Сейчас в уравнениях QSAR используются топологические дескрипторы, описывающие связанность атомов в молекуле, ее разветвленность, электронные дескрипторы, включающие константы Гаммета, дипольные моменты, значения pK_a , молекулярные рефракции, потенциалы ионизации, а также коэффициент распределения в системе октанол—вода (показатель ГЛБ), показатели стерических эффектов, константы Тафта, ван-дер-ваальсовы радиусы, общую поверхность молекулы и т. д. Несмотря на то, что сам Ханш оценивает современное состояние техники QSAR очень критично («Мне кажется, что даже начало еще не положено»), этот подход уже широко используется в исследовательской практике.

Особенность *статистического подхода* к проблеме биологической активности состоит в том, что при этом живая система остается «черным ящиком» — молекулярные механизмы взаимодействия биохимических систем с изучаемым классом соединений в этом случае не рассматриваются. При всех достоинствах техники QSAR ее недостатки очевидны: такой подход к оценке биологи-

ческой активности применим только для соединений, входящих в большой ряд тщательно изученных и охарактеризованных по многим параметрам (число дескрипторов может быть более тысячи) структурных аналогов. В таких рядах с помощью методологии QSAR можно, не синтезируя соединение, по его химической формуле оценить токсичность, выбрать структуру, которая обеспечит максимальную фотостабильность, или получить другую информацию о свойствах вещества. У известных соединений можно выявить структурные элементы, отвечающие за тот или иной вид биологической активности. И все же поиск новых классов БАВ с помощью техники QSAR пока невозможен, поскольку статистические методы анализа, соединяющие экспериментальные физико-химические и биологические параметры, анализируют структуры только в определенной узкой группе близких по строению соединений. В будущем, когда удастся преодолеть ограниченность современных приемов QSAR, области применения этой методологии, конечно, расширятся.

Чисто *химический подход* к синтезу новых биологически активных соединений сейчас стал малопродуктивным, хотя использование комбинаторного синтеза значительно расширило возможности получения большого числа микроколичеств новых веществ, направляемых на выявление у них биологической активности. Если в начале 1950-х гг. до практического использования доводилось одно из 8–10 тысяч полученных новых соединений, то сейчас из-за ужесточения требований к эффективности и безопасности, а также из-за широкого внедрения комбинаторного синтеза эту цифру даже трудно оценить. Абсурдность чисто химического подхода к поиску новых БАВ легко продемонстрировать таким примером: число всех возможных соединений с молекулярной массой до 800 Да превышает 10^{180} , но число атомов в видимой Вселенной менее 10^{100} (это самое большое число — гугол). Это означает, что для синтеза всех возможных веществ с такими молекулярными массами даже всего лишь по одной молекуле не хватит атомов во Вселенной. Ограничившись синтезом структурных аналогов уже известных биологически активных соединений, надо будет синтезировать 10^{80} образцов. Это, конечно, меньше чем гугол, но тогда можно привести еще одно ограничение: масса видимой Вселенной равна 10^{53} мг.

Наработанный за многие десятилетия экспериментальный материал позволяет более разумно подходить к поиску новых биологически активных веществ, особенно, если при этом у экспериментатора есть четкие представления о протекании метаболических и

регуляторных процессов в живых организмах. До 40% веществ, претендующих на роль лекарств, отбраковываются на основании плохих фармако-кинетических характеристик, то есть эти соединения не проходят по таким показателям, как абсорбция, распределение в тканях организма, метаболические превращения и выведение их из организма (Absorbtion, Distribution, Metabolism, Excretion — ADME). Еще до 11% оказываются токсичными в опытах на животных. Однако самые большие проблемы представляют вещества, у которых токсичность выявляется уже после их выпуска на рынок лекарственных средств. Не менее катастрофична и ошибка при отбраковке препаратов, поскольку она может свести на нет многолетний труд больших исследовательских коллективов.

В рамках совершенствования *биорационального подхода* к синтезу новых БАВ большое внимание уделяется изучению механизмов взаимодействия природных и синтетических соединений с биологическими мишенями, а также исследованию путей трансформации ксенобиотиков в живой природе. В 80-е гг. XX в. благодаря прогрессу в технике рентгеноструктурного анализа, в вычислительной технике и в компьютерной графике в исследовательских центрах стали использовать методику компьютерного молекулярного моделирования (Computer Assisted Molecular Modeling — CAMM), которую по праву можно отнести к самым современным методам изучения и конструирования биоактивных соединений. В рамках техники CAMM постоянно совершенствующиеся программы, основанные на точном знании строения рецепторных участков и активных центров биомолекул, позволяют проводить проверку гипотетических структур на совместимость с белками-мишенями. Только биорациональный подход, дополняемый техникой CAMM, позволяет направленно модифицировать первоначальные структуры с перспективной биологической активностью, значительно сокращая усилия по синтезу и многофакторным биологическим испытаниям новых соединений.

Изучаемые биохимией механизмы функционирования клеток на молекулярном уровне уже послужили отправной точкой при поиске новых средств воздействия на живую природу, но возможности использования синтетиками представляемых биохимией знаний неисчерпаемы.

Что же является объектом изучения биохимии, история которой насчитывает уже более 100 лет? Традиционно изучение химии живого (термин «биохимия» используется с 1903 г.) начинается с простейших структурных элементов биомолекул — углеводов, amino-

кислот, простейших липидов. Большой вклад в эту область биохимии внес немецкий исследователь Э. Фишер классическими работами по химии сахаров. Им были также разработаны способы выделения аминокислот из продуктов гидролиза белков. Работы по поиску новых простых биомолекул продолжаются до сих пор, в ходе изучения обмена веществ (метаболизма) и его регуляции постоянно открывают новые соединения, которые могут лечь в основу направленного синтеза новых БАВ. Многие регуляторные соединения и продукты метаболизма встречаются в самых разных видах живого, то есть существует качественное сходство на клеточном уровне, и часто речь идет лишь о количественных расхождениях.

Важнейший вопрос биохимии — как построены макромолекулы живой природы? В опытах по изучению молекулярного состава клеток первые биохимики обнаруживали высокомолекулярные вещества: полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты, сложные липиды. Их качественный состав был установлен достаточно быстро, но казалось, что последовательность соединения сотен аминокислотных составляющих в белковых молекулах или тысяч нуклеозидов в нуклеиновых кислотах не удастся установить никогда. Однако современные методы выделения и анализа макромолекул биологического происхождения позволили определить не только первичное строение, но и пространственное расположение свернутых в компактные образования биополимеров.

В 1800 г. Французская академия предлагала премию в 1 кг золота тому, кто сможет вразумительно ответить на вопрос о различии между ферментом и субстратом. Еще в XIX в. считалось, что дрожжи (первый объект биохимии) представляют собой неживые образования, а сама биохимия начиналась с работ по сбраживанию глюкозы бесклеточными гомолизатами дрожжей. Отсюда и появился термин «энзим» (от греч. *en zimes* — в дрожжах), используемый иногда для обозначения ферментов, действующих вне клетки. Ответ на вопрос о принципах функционирования этих избирательных и эффективных биокатализаторов имеет значение не только для биохимии, но и для теории и практики органической химии.

Что требуется для существования живого организма? На этот вопрос уже можно ответить достаточно однозначно как на уровне всего организма, так и на уровне отдельной клетки. Нарушения обмена веществ, связанные с отсутствием незаменимых компонент пищи, легли в основу расшифровки основных метаболических путей.

Что обеспечивает превращение молекул в необходимые клеткам организма вещества? Растения поглощают только воду, минеральные соли и диоксид углерода, синтезируя из них огромное богатство органических соединений. Взрослый человек ежедневно потребляет около 400 г пищевых продуктов, их компоненты меняются день ото дня, но в норме тело человека сохраняет постоянный состав и вес.

Как потенциальная энергия поступающих с пищей веществ используется живыми организмами? Тепловые машины работают на разнице температур, тогда как живые клетки изотермичны. И в то же время потенциальная энергия, заключенная в пище, утилизируется живыми организмами гораздо эффективнее, чем в тепловых машинах, а использование энергии света для синтеза всего разнообразия веществ, участвующих в развитии растений, вообще не имеет аналогий в неживой природе. В живых клетках все энергетические процессы так или иначе протекают через аденозинтрифосфат АТФ (в уравнениях реакций далее будет использоваться сокращение АТР, соответствующее его названию в латинской транскрипции) — универсальный источник свободной химической энергии, используемый клетками для генерирования теплоты, биосинтеза, совершения механической работы, создания градиентов концентраций и для других энергозатратных процессов.

Важнейший объект изучения биохимии — синхронизация биохимических превращений. Клетки нуждаются в определенных количествах источника свободной химической энергии АТФ и строительных блоков, и их всегда ровно столько, сколько требуется. Регуляция обменных процессов и ее принципы — одна из ключевых проблем биохимии. На уровне многоклеточных организмов объектом изучения становится и согласованная работа различных органов, регулируемая нервной системой с помощью таких веществ, как гормоны, нейромедиаторы и цитокины.

И, наконец, биохимия изучает взаимодействие биомолекул с ксенобиотиками, необратимую и обратимую блокировку ферментов и рецепторных белков, ферментативные превращения ксенобиотиков, реакции продуктов превращений ксенобиотиков.

Еще до формирования биохимии как самостоятельной науки произошло разделение химии на органическую и неорганическую. Некоторое время существовала теория «жизненной силы», сторонники которой считали, что синтез органических соединений из неорганических может проходить только с участием живых организмов, а уделом химиков остается лишь изучение превращений органических веществ, выделенных из живой природы. Несостоятельность

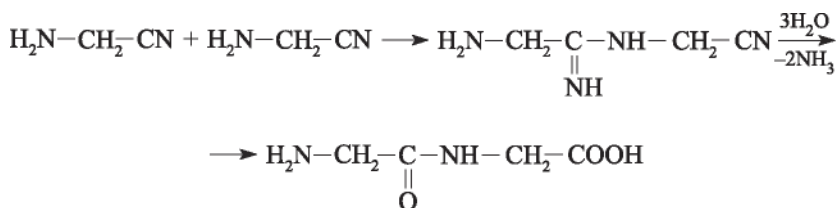
виталистов достаточно быстро была показана в многочисленных экспериментах, но углубление философского спора о происхождении органической материи и живой природы имеет принципиальное значение. Ограниченный фактический материал по клеточному строению живых организмов и глубокий анализ данных палеонтологии позволили Ч. Дарвину сформулировать концепцию *непрерывной биологической эволюции*. После этого осталось решить основной вопрос о возникновении простейших форм жизни.

Первичный состав земной атмосферы и климатические условия могут быть смоделированы на основе данных, полученных при изучении других планет Солнечной системы и космогонических теорий. Воздействия жесткой радиации, искровых и тлеющих разрядов на искусственные смеси воды, метана, аммиака и водорода (а именно такой и представляется первичная атмосфера Земли) приводят к образованию широкого спектра органических соединений, среди которых есть аминокислоты, углеводы, гетероциклические соединения и другие вещества, являющиеся простейшими строительными элементами живой природы.

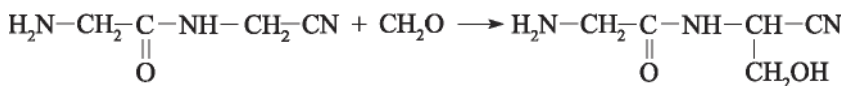
Вот примеры химизма таких превращений: из метана и воды, а также из метана и аммиака в условиях ионизирующего излучения образуются формальдегид и циановодород. Аммиак, синильная кислота и формальдегид реагируют по реакции Штрекера с образованием аминоацетонитрила:



Аминоацетонитрил — это нитрил простейшей аминокислоты глицина. Его гидролиз приводит к образованию глицина, а в аналогичных превращениях других альдегидов могут быть получены и более сложные по строению аминокислоты (например, по цепочке: этан → ацетальдегид → аланин). Интересно, что на основе аммонитрилов могут быть получены и пептиды: аминокислоты реагируют с нитрильными функциями с образованием амидинов, которые гидролизуются в мягких условиях до амидов (пептидов):



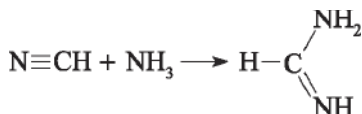
При конденсации с формальдегидом производные глицина в пептидных цепях могут быть преобразованы в производные другой аминокислоты — серина:



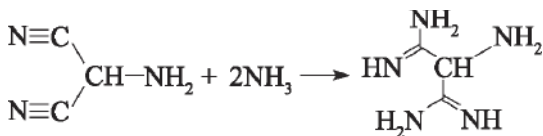
Важнейшим структурным элементом нуклеиновых кислот и многих ферментных систем является гетероциклическое соединение 6-аминопурин, или аденин, который также может быть получен в абиотических условиях. Например, в газовой фазе циановодород тримеризуется в динитрил аминмалоновой кислоты:



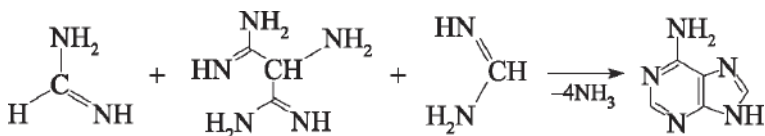
Циановодород реагирует с аммиаком с образованием формамида:



Точно также реагируют с аммиаком и нитрильные группы тримера циановодорода:



Образующийся при этом диамидин аминмалоновой кислоты может реагировать с двумя молекулами формамида с образованием аденина:



В запаянной ампуле аденин образуется из циановодорода и аммиака с выходом около 40%. Возможны, конечно, и другие пути образования аденина на основе этих исходных продуктов.

В 20-е гг. XX в. появилась гипотеза о происхождении жизни абиотическим путем (А. И. Опарин), основанная на первичности белков, которые собирались из аминокислот и простейших пептидов в результате реакций переамидирования. Большие белковые молекулы могли образовывать сложные трехмерные структуры, некоторые из которых проявляли каталитическую активность. Последующая ассоциация разных белков приводила к формированию так называемых коацерватов, то есть фаз с повышенной концентрацией полимера. Коацерваты могли сорбировать на поверхности прототипы современных мембранных липидов и превращаться в клетки, отделенные от маточного раствора слоем этих липидов. Однако у этой гипотезы есть слабые места. Первое из них — это более низкая вероятность протекания реакции переамидирования по сравнению с реакцией гидролиза: самосборка пептидов в белки с увеличением молекулярной массы по кинетическим соображениям невозможна, поскольку реакция их гидролиза идет с более высокой скоростью. Второе слабое место в гипотезе Опарина — это полное отсутствие каких-либо предположений о путях перехода от белков к нуклеиновым кислотам, определяющим последовательность расположения аминокислот в белках при их биосинтезе. Сюда же можно отнести и до сих пор не решенную проблему однородности белков по стерической характеристике входящих в их состав аминокислот (все белковые аминокислоты имеют *L*-конфигурацию по асимметрическому атому углерода).

Более логичной на сегодняшний день представляется гипотеза о первичности в процессе зарождения жизни прототипов рибонуклеиновых кислот (РНК). Надо сказать, что у этих молекулярных структур гораздо больше возможностей самосовершенствования за счет модификации составляющих компонент, чем у белков, да и наращивание молекулярной массы при переэтерификации полиэфиров фосфорной кислоты более вероятно, чем переамидирование пептидов. Диэфиры фосфорной кислоты, составляющие основу полимерной цепи нуклеиновых кислот, легко образуются в кислой среде и достаточно стабильны в нейтральной и слабо щелочной средах. После обнаружения в клетках рибонуклеиновых кислот с каталитической активностью (рибозимов) РНК стали полноправными претендентами на первенство в роли зачинателей

жизни. Они состоят из молекул, которые также получаются абиотическим путем и имеют только одну компоненту с асимметрическими атомами углерода (рибозу), но первичные РНК могли быть построены на основе более простого связующего между фосфатной и гетероциклической составляющими. Сворачиваясь в спираль, РНК создают хиральную матрицу, в которой главную роль играют ахиральные компоненты. Образуя комплексы с простейшими пептидами и аминокислотами, РНК могли катализировать их поликонденсацию в белки селективно с использованием для этого только одного типа пространственных изомеров из рацемической смеси аминокислот. Главное же состоит в том, что и сейчас биосинтез белков идет при непосредственном участии РНК в рибосомах. В принципе, прототипом живого можно считать вирусы — комплексы ДНК или РНК и белков, которые на начальном этапе эволюции воспроизводили себе подобных из абиотических органических веществ в первичном «бульоне». Сегодня они используют для этого компоненты живых клеток.

Не очень сложно объяснить, почему составляющие биомолекул в природе присутствуют только в одной стереоизомерной форме: биомолекулы и так слишком сложны, и протекающие с их участием процессы высоко специфичны. На молекулярном уровне взаимодействие субстратов с биокатализаторами (ферментами) не может идти одинаково с различными стереоизомерами из-за сложной пространственной конфигурации каталитического центра фермента. Исходя из первичности белков трудно объяснить то, что все двадцать аминокислот, из которых построены белки, имеют *L*-конфигурацию. Для разгадки этого феномена привлекались самые разные гипотезы, например, катализ образования или поликонденсации аминокислот такими оптически активными неорганическими материалами, как кристаллы кварца. В то же время не исключено, что наша Вселенная асимметрична и с ее асимметричностью лучше всего согласуются *L*-изомеры аминокислот. Так, например, в рацемической аминокислоте тирозине в присутствии радиоактивного стронция более интенсивно идет радиолиз *D*-изомера и повышается относительное содержание *L*-изомера. Если же принять за основу первичность РНК, то, как отмечалось выше, эта проблема может быть сведена к тому, что отбор пространственных изомеров аминокислот для построения белков осуществлялся с участием РНК с определенным направлением закручивания спирали (опять асимметричность Вселенной).

Одним из признаков жизни является способность живых систем обмениваться веществами и энергией (метаболизм) с окружающей средой. Предполагается, что полипептидные молекулы и нуклеиновые кислоты самоорганизовались в первые простейшие клеточные образования. Правда, вопрос о природе соединений, которые эти клетки могли использовать для построения клеточных мембран с избирательной проницаемостью для внутри- и внеклеточных веществ, пока даже не ставится. Любые химические структуры изменчивы, и для сохранения жизни каждая клетка должна воспроизвести себе подобную до того, как она станет неспособной к воспроизводству.

Первые живые клетки использовали накопленные в природе за пребиотический период органические вещества для получения своих биомолекул, воспроизводства себе подобных структур и их совершенствования, а это уже второй признак живого. Понятно, что уже на этом уровне шел процесс эволюции одноклеточных организмов, их специализация и усложнение. Изменчивость — это также обязательный признак живого, так как именно благодаря ей опасные изменения в окружающей среде не обязательно приводят к гибели всех копий начальной клетки: какие-то, отличные от исходной, могут сохраниться. Очевидно, что еще до исчерпания в природе абиотических органических веществ появились микроорганизмы, использовавшие в своей жизнедеятельности энергию солнечного света, а также микроорганизмы-хищники, которые не довольствовались разбавленными растворами остатков органических веществ, а активно поглощали другие клетки. После полного исчерпания внеклеточных органических веществ некоторые использовавшие свет бактерии приспособились к синтезу углеводов за счет энергии света из диоксида углерода и воды. Этот процесс сопровождается выделением кислорода, который некоторые клетки включали в свой метаболизм для более эффективного использования заложенной в органических соединениях энергии. Другие клетки не могли приспособиться к присутствию кислорода и погибали от вызванных им окислительных превращений или останавливали течение метаболизма, превращаясь в споры. Так, до сих пор существуют анаэробные бактерии, жизнь которых возможна только в отсутствии кислорода. Появление в атмосфере Земли кислорода вызвало, очевидно, первую глобальную экологическую катастрофу.

Главной особенностью живого можно считать не просто изменчивость живых систем, а их усложнение и самосовершенствование. Многоклеточные организмы развиваются из одной клетки в

невероятные с точки зрения неживой природы образования с огромным числом клеток, в которых лишь на молекулярном уровне можно найти идентичные исходной клетке структуры. Растения используют энергию света для получения восстановительного потенциала и носителя свободной химической энергии аденозинтрифосфата (АТФ), с помощью которых образуется все многообразие органических молекул не только в клетках растений, но и в клетках животных, так или иначе использующих заложенную в органических соединениях отрицательную энтропию для своего существования. В книге «Что такое жизнь с точки зрения физика» Э. Шредингер сравнивал энтропийные процессы в живых системах с часами. Они получают отрицательную энтропию с заводом пружины, а живые системы — из света или в виде высокоорганизованной материи, полученной с помощью света. И все же сложность и организация жизни не может не восхищать не только на макроуровне, но и на наноуровне. В качестве примера можно привести образование АТФ из аденозиндифосфата (АДФ) и фосфата в результате транспорта протонов через встроенную в клеточную мембрану многокомпонентную систему белков — АТФ-синтетазу, которая, как оказалось, работает по аналогии с турбиной и генератором гидроэлектростанции (используя протоны вместо воды), и по аналогии с турбиной процесс образования АТФ обратим: его избыток может быть использован АТФ-синтетазой для транспорта протонов против градиента их концентрации по разные стороны клеточной мембраны.

Специфика живого была выявлена человечеством на самой ранней стадии изучения окружающего мира:

Живым считается все, что проходит определенный цикл развития, обмениваясь с окружающей средой веществом и энергией, отвечая на определенные воздействия извне и воспроизводя себе подобное.

В биохимии на современном уровне ее развития господствует механистическая точка зрения на жизнь, то есть считается, что все законы живого, как и неживого, могут быть описаны с позиций химии и физики. В философии, но не в естествознании, сохранилась и виталистическая точка зрения, которая просто считает, что нельзя свести понятие жизни к простому сочетанию явлений неживой природы. Такой подход опровергнуть экспериментом нельзя; мы сами, являясь элементом жизни, никогда не сможем моделировать ее возникновение из неживого. Как отмечалось выше, синтез

основных строительных блоков живых клеток, аминокислот, простейших пептидов и нуклеиновых кислот можно воспроизвести в условиях, которые предположительно существовали на ранних этапах формирования облика нашей планеты. Но далее для формирования клетки эти вещества должны были собраться в полимеры, сгруппироваться в самый сложный набор, состоящий хотя бы из всего лишь нескольких каталитических, структурных и транспортных белков, закодировать их структуру в ДНК, в РНК или в их первоначальных аналогах, окружить себя мембраной из веществ, синтез которых не удастся воспроизвести так же легко, как синтез аминокислот и нуклеотидов, встроить в эту мембрану транспортные белки для избирательного обмена веществами с окружающей средой и начать воспроизводиться, усложняясь при этом до существ, которые пытаются все это осмыслить. Можно повторить, что принцип развития с усложнением присущ всему живому, но на какой стадии развития клетка была неживой и стала живой и что обусловило этот переход?

Вероятность всех этих событий настолько ничтожна, что в вопросе возникновения жизни на земле трудно обойтись без креационизма, то есть акта творения. Существует еще теория панспермии, которая полагает, что споры жизни разносятся небесными телами по всей Вселенной, но эта теория лишь отодвигает проблему возникновения жизни за временные и пространственные пределы нашей планеты.

В основе биохимических превращений лежат достаточно простые молекулы, из которых строится все многообразие веществ, участвующих в образовании живых клеток и в их функционировании. Взаимные превращения аминокислот, углеводов, липидов, гетероциклических компонент нуклеиновых кислот катализируются ферментами с участием богатых энергией веществ, главным из которых является аденозинтрифосфат с двумя ангидридными макроэргическими связями. Последовательность изложения основ биохимии по строительным блокам биомолекул учитывает их включение в более сложные структуры, поэтому, например, при изучении строения нуклеиновых кислот надо знать строение и химические свойства сахаров. И все же в отдельных случаях на начальном этапе изучения биохимии не удастся избежать обращения к материалу, который станет объектом более детального изучения в дальнейшем. Предполагается, что первичные знания по биохимии уже получены в курсе органической химии.

Глава 1

Углеводы

Этот класс природных соединений носит такое название потому, что первым изученным его представителям соответствовала общая формула $C_n(H_2O)_m$, то есть формально их можно было рассматривать как гидраты углерода. Позже были найдены близкие по свойствам и по роли в живой природе соединения, также относящиеся к углеводам, но такой простой общей формуле уже не соответствующие — это аминосахара и ациламиносахара, дезоксисахара, продукты окисления сахаров и другие их производные.

В живых клетках углеводы выполняют важные функции: полисахариды используются в качестве источников свободной химической энергии, они являются структурными элементами растительных и животных клеток, углеводы участвуют в построении более сложных молекул — различных гликозидов, гликопротеинов, протеогликанов, гликолипидов (в том числе антигенных ганглиозидов) и нуклеиновых кислот. Из углеводов образуется витамин С, фактор роста бактерий инозит и так называемые *заменяемые белковые аминокислоты*. Важнейшую функцию выполняют углеводы в биоэнергетических процессах, поставляя клеткам энергию, как в анаэробных, так и в окислительных превращениях, и поэтому продукты поликонденсации самого распространенного углевода *глюкозы* (крахмал, гликоген) используются всеми видами живого как запас легко мобилизуемой энергии и строительного материала для других молекул. Углеводные остатки входят в состав многих ферментов. С участием сахара с пятью атомами углерода — *рибозы* — построены молекулы рибонуклеиновых кислот, а дезоксирибоза входит в состав вещества наследственности — дезоксирибонуклеиновой кислоты. Гликопротеины (белки с углеводными составляющими) обеспечивают смазку в суставах и покрывают стенки кровеносных сосудов. В заключение можно сказать, что основная масса органических соединений на Земле представлена углеводами.

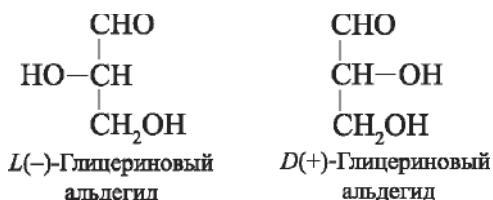
1.1. Строение углеводов

Кристаллические, растворимые в воде и имеющие чаще всего сладкий вкус низкомолекулярные углеводы называют *сахарами*. Высокомолекулярные углеводы в воде нерастворимы. Строение сахаров изучалось многими исследователями XIX в., например, А. Байер установил, что функциональные группы сахаров представлены одной карбонильной группой и несколькими гидроксильными. Но наибольший вклад в эту область химии внес Э. Фишер. Им, в частности, была разработана методика установления пространственного строения этих соединений, поскольку одной только изомерией положений функциональных групп нельзя было объяснить разнообразие углеводов, полученных синтетическим путем и выделенных из живой природы.

Для сахаров, содержащих одну неразветвленную и неразделенную гетероатомами цепочку атомов углерода (такие сахара называют моносахаридами), общая формула $C_n(H_2O)_m$ может быть уточнена, так как при $n > 9$ их молекулы разлагаются на моносахариды с меньшим числом атомов углерода по реакции, обратной реакции альдольной конденсации. Соответствующий брутто-формуле $C_2H_4O_2$ гликолевый альдегид $HOCH_2CHO$ не имеет асимметрического атома углерода и к углеводам не относится. В последние годы перестали относить к углеводам и называвшиеся ранее триозами глицериновый альдегид с диоксиацетоном ($n = 3$), поскольку у диоксиацетона нет асимметрического центра и, кроме того, эти соединения не образуют циклических внутренних полуацеталей, которые определяют биохимическую специфику углеводов. В соответствии с этим в общей формуле углеводов n для моносахаридов принимает значения от 4 до 9.

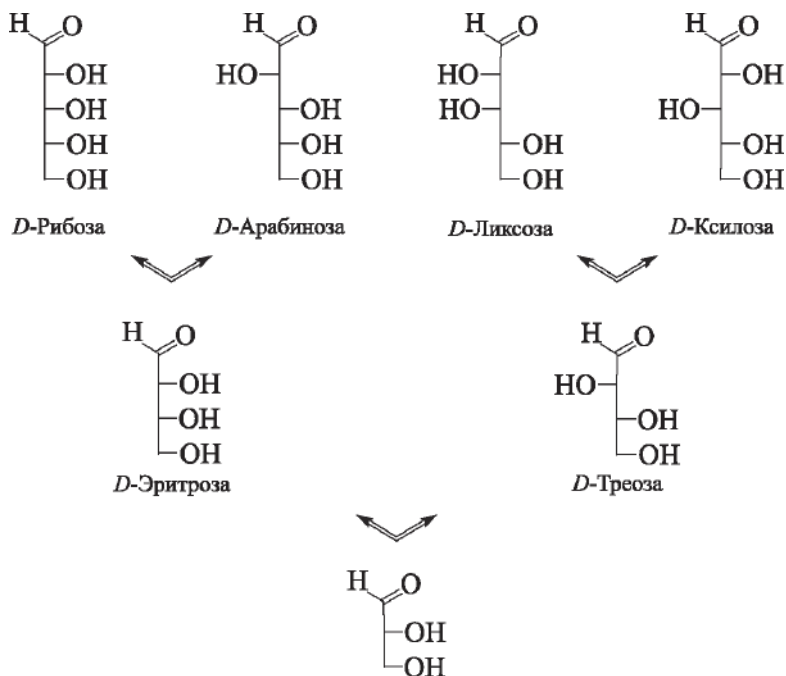
Тем не менее, асимметрический атом углерода глицеринового альдегида, из которого могут быть получены все другие сахара, используется в качестве отправной точки при установлении пространственного строения всех моносахаридов. В проекциях Фишера молекулы сахаров изображают на плоскости с гидроксильными группами справа или слева от атомов углерода. Фишер предложил считать, что у левовращающего

глицеринового альдегида при его изображении с карбонильной группой сверху молекулы гидроксильная группа направлена влево (*L* от *laevo*) у левовращающего и вправо (*D* от *dextro*) у правовращающего:

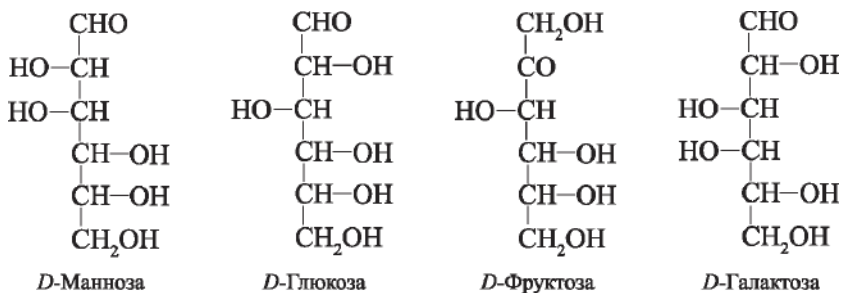


В более сложных сахарах с несколькими асимметрическими атомами углерода обозначение *L* или *D* не говорит о направлении вращения плоскости поляризованного света их растворами, а только об абсолютной конфигурации наиболее удаленного от карбонильной группы асимметрического атома углерода с гидроксильной группой. Если в названии сахара надо отразить и показатель оптической активности, то его дополняют значками (-) для левовращающих и (+) для правовращающих веществ. Оказалось, что практически все природные сахара могут быть получены из *D*-глицеринового альдегида и поэтому они относятся к *D*-ряду. Реакции наращивания цепи, начинающиеся с альдегидной группы *D*-глицеринового альдегида, не затрагивают гидроксильную группу у асимметрического атома углерода, поэтому и было принято брать за основу систематизации конфигурацию у наиболее удаленного от карбонильной группы атома углерода. Кроме того, именно эта гидроксильная группа чаще всего участвует в образовании циклических полуацеталей и определяет их истинное пространственное строение.

Нумерация атомов углерода у сахаров начинается с альдегидной функции у альдоз или с наиболее близкого к карбонильному углероду концевому атому углерода у кетоз. Тогда генеалогическое древо альдоз будет выглядеть следующим образом:



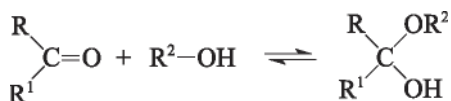
Наиболее распространенные природные гексозы в таком упрощенном варианте представления формул выглядят следующим образом:



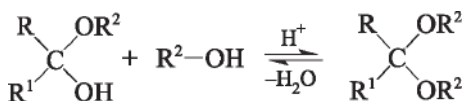
1.2. Химические свойства углеводов

Проекции Фишера удобны для формального рассмотрения и классификации сахаров, но они не отражают истинное строение этих веществ. Глюкоза не образует бисульфитное соединение и не дает цветной реакции с фуксинсернистой кислотой, которая характерна для функциональных групп $-\text{CHO}$, но она взаимодействует с производными гидразина и с некоторыми другими реагентами подобно альдегидам более простого строения. При растворении глюкозы в воде образуется раствор с удельным вращением $[\alpha]_D^{22} = +122^\circ$, однако со временем его удельное вращение снижается до $+53^\circ$. Это явление, называемое *мутаротацией*, свидетельствует о том, что кристаллизовавшаяся из воды *D*-глюкоза после растворения переходит в другую форму с меньшим удельным вращением. В обычных условиях из воды кристаллизуется форма с меньшей растворимостью и с большим удельным вращением, получившая обозначение α , но кристаллизацией из пиридина удалось получить в чистом виде и β -*D*-глюкозу, удельное вращение которой оказалось равным $+18,7^\circ$; при растворении ее в воде удельное вращение раствора растет до того же значения $+53^\circ$.

В основе мутаротации лежит реакция гидроксильных групп с карбонильными функциональными группами, протекающая с образованием полуацеталей из альдегидов ($\text{R}^1 = \text{H}$) и полукеталей из кетонов по схеме:



При нагревании с избытком спирта в присутствии кислоты с удалением из реакционной массы воды могут быть получены и полные ацетали (кетали):

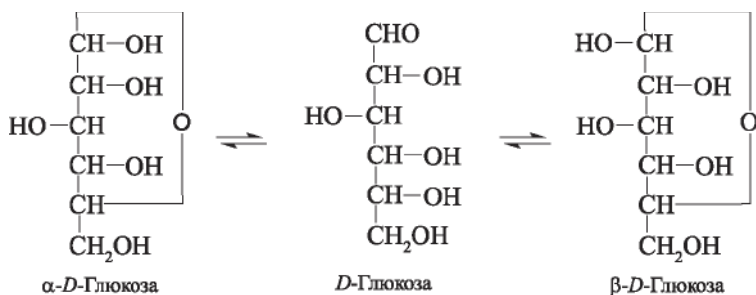


Экспериментально показано, что в молекуле глюкозы есть пять гидроксильных групп, однако одна из них заметно отличается по реакционной способности от четырех остальных. Так, например, при нагревании с метиловым спиртом в присутствии кислоты

образуется монометилвый эфир глюкозы, тогда как остальные четыре гидроксильные группы метилируются только метилиодидом в присутствии оксида серебра.

Пентаметилглюкоза гидролизуетсЯ водным раствором кислоты по одной эфирной группе, а остальные четыре метоксильных группы устойчивы к гидролизу. Кроме того, полученная гидролизом пентаметилглюкозы в кислой среде тетраметилглюкоза мутаротирует, то есть при растворении ее кристаллов в воде удельное вращение плоскости поляризованного света изменяется во времени, выходя на равновесное значение.

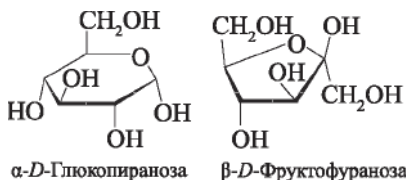
Для всего этого есть только одно объяснение: молекулы углеводов имеют как карбонильную, так и спиртовые функции, и поэтому они легко образуют стабильные циклические внутримолекулярные полуацетали, представляемые в проекциях Фишера следующим образом:



С переходом атома углерода карбонильной группы из sp^2 - в sp^3 -гибридизованное состояние появляется новый асимметрический центр, а два соответствующих оптических изомера Фишер предложил обозначать символами α и β : α — в том случае, когда новая гидроксильная группа расположена с той же стороны, что и кислород гетероцикла, β — если она на другой от него стороне, правда, так просто это выглядит только в плоской проекции.

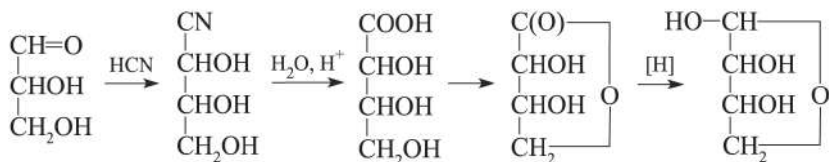
Полуацетальная (аномерная) гидроксильная группа значительно отличается по реакционной способности от других гидроксильных групп сахаров, и при замещении ее на другие функции образуются производные, называемые в общем случае гликозидами (глюкозиды, фруктозиды, галактозиды, рибозиды и т. д.). Так, при нагревании глюкозы с метанолом в присутствии кислоты образуются метил- α -D-глюкозид и метил- β -D-глюкозид.

У глюкозы образование внутреннего полуацетала протекает с участием гидроксильной группы у пятого атома углерода и поэтому ее можно рассматривать как производное шестичленного гетероцикла тетрагидропирана. Часто также реализуется пятичленный цикл, и тогда сахар является производным тетрагидрофурана. В более приближенных к реальным структурам формулах Хэйуорта глюкоза и фруктоза, например, изображаются так:



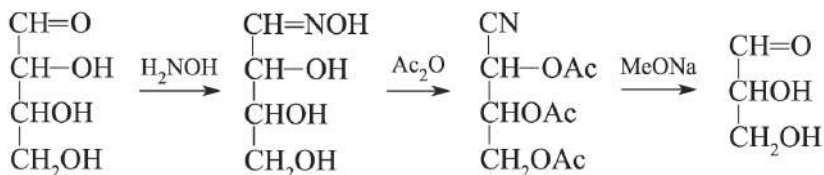
Такие циклические полуацетальные структуры могут образовываться только из сахаров с числом атомов углерода больше трех. Поскольку глицериновый альдегид такие структуры не образует, его, как отмечалось выше, сейчас исключают из числа сахаров, хотя в биохимии диоксиацетон и глицериновый альдегид достаточно значимы.

Уже говорилось о том, что сахара могут быть получены из глицеринового альдегида. Для этого используется реакция карбонильных групп с синильной кислотой, протекающая с образованием циангидрина. После омыления нитрильной группы образуется лактон, который легко восстанавливается амальгамой натрия в спирте до полуацетальной формы соответствующего сахара, число атомов углерода в молекуле которого увеличилось до четырех:

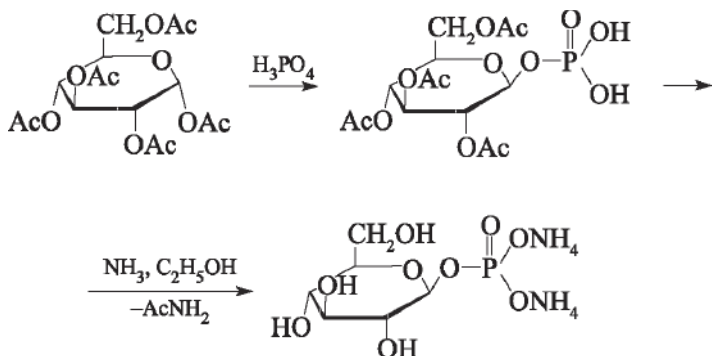


Представленная схема увеличения длины углеродной цепочки рассматривает образование и превращения только одного из двух возможных пространственных изомеров циангидрина глицеринового альдегида, приводящие к эритрозе; с другим изомером образуется треоза. Есть и обратный путь, по которому из сахара получают

оксим, затем действием ацетангидрида в присутствии пиридина превращают оксимную группу в нитрильную и ацетилируют гидроксильные группы. После этого действием основания укорачивают цепочку на один атом углерода, отщепляя синильную кислоту, и снимают ацетатные группы в результате реакции переэтерификации:

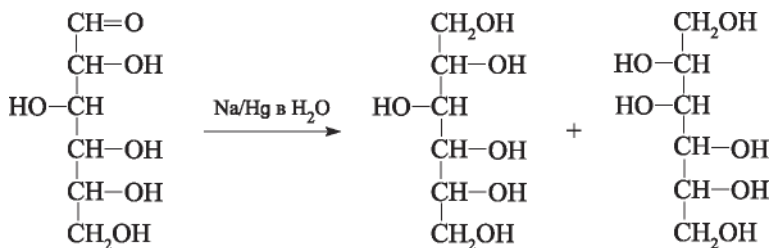


Аномерная гидроксильная группа легче чем спиртовая вступает в различные реакции замещения. Так, например, именно по этой группе идет реакция глюкозы с метанолом в присутствии сильной кислоты с образованием метилглюкозида, а нагревание пентаацетата глюкозы с концентрированной фосфорной кислотой приводит к образованию тетраацетата α -D-глюкозо-1-фосфата, из которого α -D-глюкозо-1-фосфат получают действием раствора аммиака в абсолютном спирте; эфирная связь неполных эфиров фосфорной кислоты устойчива в щелочных средах:

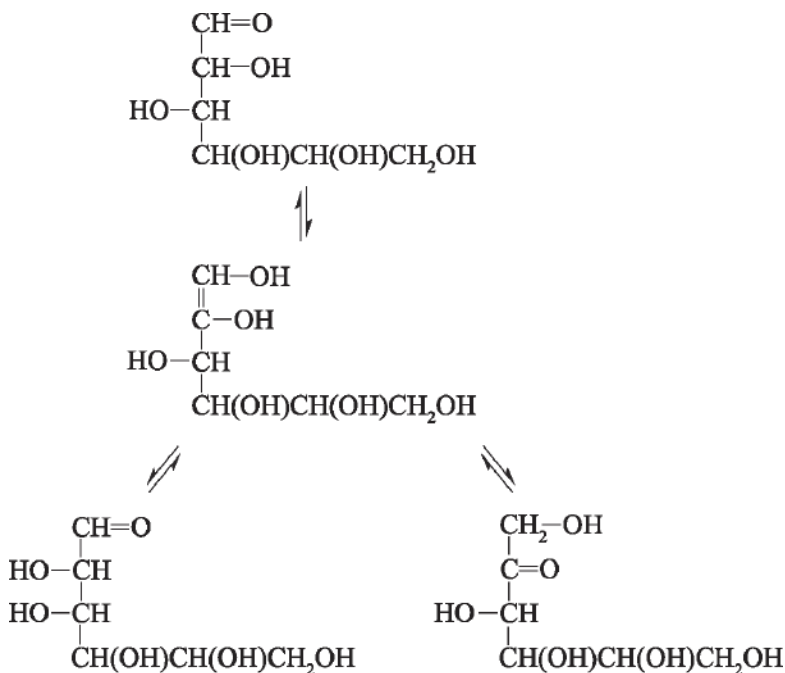


В присутствии концентрированных щелочей из сахаров образуются окрашенные в коричневый цвет продукты поликонденсации. Очевидно, что это связано с превращениями по типу альдольной и кротоновой конденсации. Однако разбавленные щелочи и гидроксиды щелочно-земельных металлов вызывают перегруппировку Лобри-де-Брюйна—ван-Экенштейна, затрагивающую асимметрический атом углерода. Впервые с таким превращением встретился

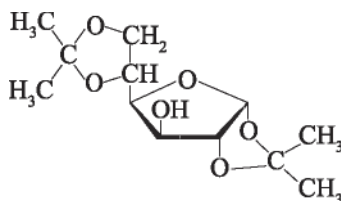
Фишер, обнаруживший, что при восстановлении глюкозы амальгамой натрия в воде наряду с сорбитом образуется также маннит:



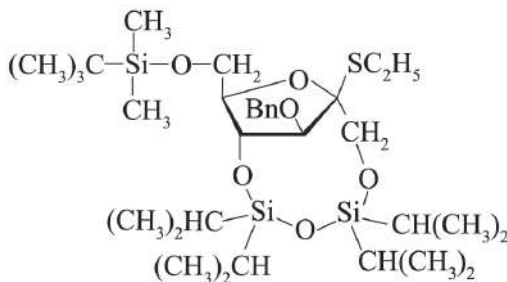
Не найдя объяснения этому экспериментальному факту, Фишер только отметил его в своей публикации (1889 г.), посвященной реакциям восстановления сахаров. Позже было установлено, что в присутствии оснований идет взаимное превращение сахаров, связанное с образованием енолов. Так, из глюкозы образуется енольная форма, которая может снова превратиться как в глюкозу, так и в маннозу или фруктозу (на схемах этих превращений сахара показаны в формулах Фишера для более наглядного представления химизма превращений):



Живая природа использует молекулы сахаров для получения растворимых в воде производных, которые участвуют в обменных процессах, переносятся жидкими средами в многоклеточных организмах или выводятся из организма. Биосинтетические пути получения таких соединений основаны на высокоизбирательных ферментативных реакциях. Химический синтез соединений, в состав которых входят молекулы сахаров, основан на использовании ряда защитных групп, позволяющих проводить избирательные превращения по отдельным функциональным группам в их молекулах. Так, например, в водном растворе не удастся обнаружить фуранозные формы глюкозы, но при нагревании ее с ацетоном в присутствии кислоты образуется 1,2,5,6-диизопропилиден-*D*-глюкофураноза со свободной гидроксильной группой в 3-положении:

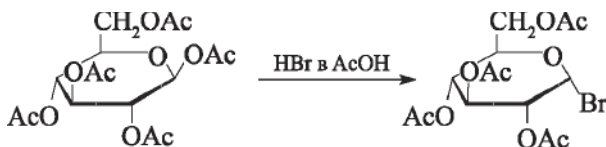


Сахароза легко образуется в растениях в результате ферментативной конденсации глюкозы и фруктозы, тогда как для ее синтеза приходится использовать различные защитные группы. В одной из самых успешных методик используют реакцию пентабензил- α -глюкозы с защищенным тиопроизводным фруктозы формулы ($\text{Bn} = \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$):

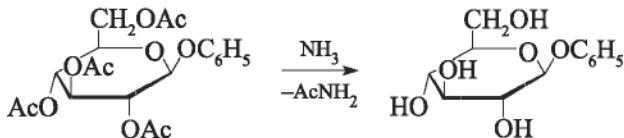
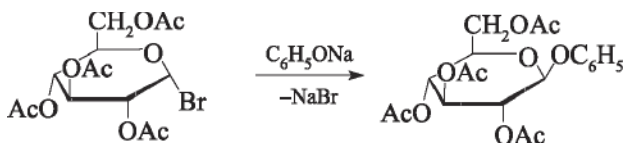


При нагревании глюкозы с уксусным ангидридом при катализе хлоридом цинка образуется пентаацетил- α -глюкоза, а при действии на это соединение раствора бромистого водорода в ледяной

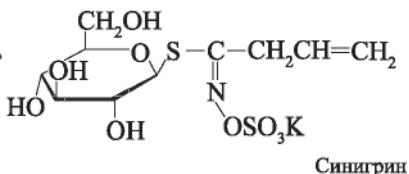
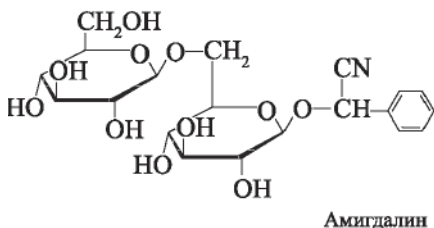
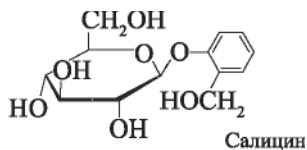
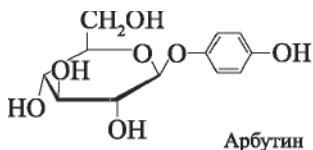
уксусной кислоте ацетоксигруппа аномерного атома углерода заменяется на атом брома:



Это соединение, отличающееся высокой реакционной способностью по атому брома, используют для синтеза глюкозидов. Например, фенолглюкозид получают при взаимодействии этого вещества с фенолятом натрия с последующим снятием ацетильных защитных групп омылением в присутствии оснований (гликозидная связь в этих условиях устойчива) или действием спиртового раствора аммиака:

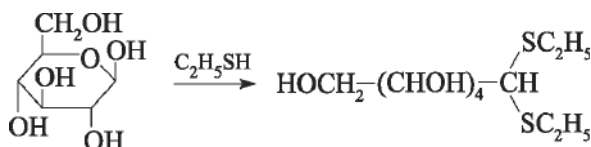


В качестве примеров некоторых природных глюкозидов можно привести арбутин, салицин, синигрин и содержащий два сахаридных остатка амигдалин из плодов косточковых (вишня, горький миндаль):



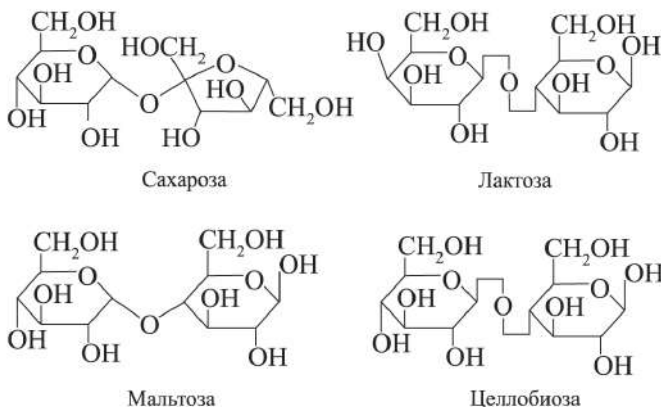
Связанные с сахарами несахаридные фрагменты гликозидов называют агликонами. В соответствии с этим, агликоном арбутина является гидрохинон, агликоном салицина — салициловый спирт, агликоном амигдалина — циангидрин бензальдегида. Синигрин, представляющий собой тиоглюкозид, в присутствии фермента мирозиназы разлагается с образованием аллилизотиоцианата (хрен, горчица, лук).

При действии на альдозы меркаптанов очень легко образуются тиаоацетали, например:



Продуктом этой реакции является полный тиаоацеталь, что подразумевает возможность участия в реакции альдегидной формы глюкозы, содержание которой в водном растворе глюкозы оценивается в 0,0026%.

При образовании гликозидных связей между молекулами моносахаридов образуются дисахариды, трисахариды, олигосахариды и полисахариды. Именно эти соединения оправдывают общий вид формулы углеводов $C_n(H_2O)_m$, поскольку, как отмечалось выше, для моносахаридов n принимает значения от 4 до 9. Самые известные дисахариды — это сахароза, лактоза и мальтоза, а также целлобиоза, образующаяся при частичном гидролизе целлюлозы:



В этом ряду выделяется *сахароза*, у которой в образовании одной гликозидной связи принимают участие две аномерных гидроксильных группы: из молекулы глюкозы и из молекулы фруктозы. В результате образуется эфирная связь, которая достаточно устойчива к гидролизу. Это означает, что карбонильные группы фрагментов глюкозы и фруктозы не могут проявлять характерные для других сахаров свойства. Сахароза не мутаротирует и не восстанавливает обычные реагенты, используемые для выявления карбонильных групп. Сахароза, в отличие от других производных сахаров, сравнительно устойчива к действию ферментных систем многих микроорганизмов. Поэтому растения часто используют ее в качестве запасного углевода. Гидролитическое расщепление сахарозы на глюкозу и фруктозу протекает под действием фермента сахаразы (инвертазы). В организме человека он локализован в стенках тонкого кишечника. Пчелы с помощью этого фермента переводят сахарозу нектара в мед. Смесь глюкозы и фруктозы (инвертный сахар) плохо кристаллизуется, и густая консистенция концентрированного раствора этой смеси облегчает использование его пчелами в зимнее время. Название продукта гидролиза сахарозы — инвертный сахар — основано на том, что это превращение сопровождается инверсией (изменением направления вращения плоскости поляризованного света): сахароза вращает вправо, а эквимольная смесь глюкозы ($+53^\circ$) и фруктозы (-92°) — влево.

Лактоза — это сахар, который содержится в молоке. Она состоит из молекулы галактозы и молекулы глюкозы, причем в образовании гликозидной связи принимает участие α -D-галактоза. Для сохранения привычной формы представления молекул сахаров для таких случаев используются разные способы условного изображения этой связи, один из которых показан на структурных формулах лактозы и целлобиозы. В кишечнике младенцев есть фермент лактаза, разлагающий лактозу на гексозы, но с возрастом его активность снижается. Кроме того, у взрослых перестает вырабатываться сычужный фермент, вызывающий коагуляцию казеина. Поэтому многие испытывают неприятные ощущения в кишечнике от молока, поскольку оно становится средой для развития гнилостных бактерий.

Соединение в одну молекулу большего числа моносахаридов приводит к образованию три-, тетра- и других олигосахаридов. Два основных полисахарида — это *крахмал* и его разновидности, а также *целлюлоза*. Различие между этими продуктами поликон-

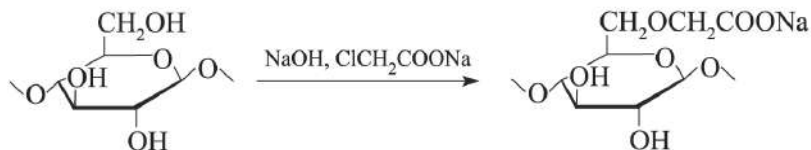
денсации глюкозы состоит в том, что крахмал, гликоген и другие запасные полисахариды построены из остатков α -глюкопиранозы, а целлюлоза — из β -глюкопиранозы. Различие в геометрии гликозидных связей определяет и различие в свойствах этих изомерных полисахаридов. Молекула крахмала сворачивается в спираль, тогда как молекула целлюлозы стабилизируется водородными связями в линейном виде другими молекулами целлюлозы и образует очень плотно упакованные молекулярные пучки с высокой прочностью взаимного связывания, что и определяет роль этого полисахарида как конструкционного элемента клеточных стенок (не путать с мембранами) и внутреннего скелета растений. Степень поликонденсации целлюлозы зависит от локализации ее в растениях. В межклеточной среде, окружающей растительные клетки, содержится гемицеллюлоза, ее молекулы включают нескольких сот молекул глюкозы. Целлюлоза волокон хлопчатника построена из 2000–6000 молекул глюкозы, но есть и образцы целлюлозы с более высокими значениями молекулярных масс.

При гидролизе в присутствии кислот в жестких условиях целлюлоза превращается в глюкозу, правда, чистота этой глюкозы недостаточна для использования ее в пищевых целях. Тем не менее, она может служить сырьем для получения технического спирта при сбраживании ее дрожжами. В мягких условиях разбавленная соляная кислота (1,0–2,5 н.) гидролизует только нерегулярные участки в пучках ассоциированных молекул целлюлозы. При этом образуется так называемая микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ). В воде она сильно разбухает, и поэтому ее используют в пищевой промышленности в качестве загустителя соков и мороженого, а в производстве лекарственных средств МКЦ используют как наполнитель и для образования покрытий для таблетированных лекарств. Кроме того, ее можно принимать внутрь для создания эффекта насыщения и выведения из организма токсинов и ионов тяжелых металлов (набухшая МКЦ — это хороший сорбент).

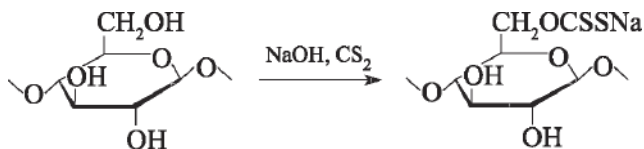
1.3. Производные углеводов

Целлюлозу можно растворить в концентрированном растворе хлорида цинка, в медно-аммиачном растворе, в концентрированной серной кислоте, что используется для получения пергаментной бумаги и искусственного волокна. Вовлеченность гидроксильных групп в образование водородных связей определяет способность

целлюлозы взаимодействовать со щелочами с образованием солей, которые могут быть использованы для проведения реакций алкилирования. Так, например, действием на натриевое производное целлюлозы метилхлорида получают метилцеллюлозу, которая, несмотря на замену части гидрофильных гидроксильных групп на гидрофобные метоксильные, лучше растворяется в воде, чем целлюлоза: система водородных связей нарушается, и молекулы расходятся. Другими растворимыми в воде производными целлюлозы являются гидроксикалксилцеллюлозы, образующиеся по реакции целлюлозы с алкиленоксидами, а также карбоксиметилцеллюлоза — продукт алкилирования ее натриевого производного хлорацетатом натрия:

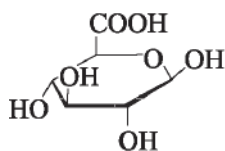


Натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы также широко используется в самых разных областях, включая фармацевтическую промышленность. Важную роль играют продукты этерификации целлюлозы ангидридами уксусной и пропионовой кислот (они растворимы в органических растворителях), из которых получают упаковочные пленки. К сложным эфирам целлюлозы относится и ксантогенат, образующийся из натриевого производного целлюлозы и сероуглерода:

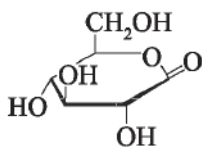


Его вязкий раствор, называемый *вискозой*, используется для получения искусственного волокна и упаковочных пленок (целлофан). Растворимые в органических растворителях эфиры целлюлозы и азотной кислоты служили основой для получения пластмасс (целлулоид), волокон (нитратный шелк) и пленок, но из-за горючести нитраты целлюлозы сейчас используют только для производства пороха.

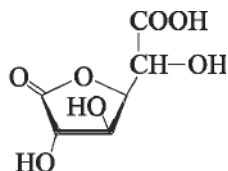
Сахара вступают также в реакции окисления. При этом могут быть получены три типа кислот. Если в молекуле глюкозы окисляется альдегидная группа, то это приводит к образованию глюконовой кислоты, которая в свободном виде превращается в лактон. Кальциевая соль глюконовой кислоты (глюконат) используется в фармации для покрытия дефицита по этому катиону. Окисление концевой С6-гидроксильной группы приводит к глюкуроновой кислоте. Она участвует в образовании многих биополимеров. Так, например, содержащийся наряду с гемицеллюлозой в межклеточной среде растений пектин (структурирующая основа мармелада) представляет собой полиглюкуроновую кислоту, часть карбоксильных групп которой этерифицирована метанолом. Дикарбоновая кислота на основе глюкозы называется глюкаровой. Это достаточно сильная кислота, используемая в фармации для образования солей с субстанциями основного характера. Она также образует лактон.



Глюкуроновая
кислота

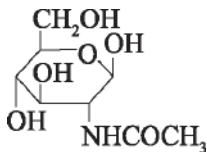


Лактон глюконовой
кислоты



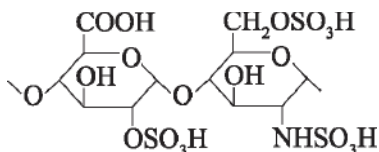
Глюкаровая
кислота

Важными структурными аналогами гексоз являются аминосахара, у которых одна из гидроксильных групп заменена аминогруппой. Так, по типу целлюлозы из N-ацетилглюкозамина построен хитин — основа панциря членистоногих (насекомые, пауки, ракообразные).



Хитозан — это деацетилированный хитин. Гиалуроновая кислота, содержащаяся в тканях кожи, в хрящах, в синовиальной жидкости, играющей роль смазки в суставах, представляет собой продукт поликонденсации с чередованием фрагментов глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Гель, структурированный гиалуроновой кислотой, образует стекловидное тело глаза. В нем всего лишь 1% гиалуроновой кислоты связывает 99% водной составляющей.

Особого разговора заслуживает *гепарин*, состоящий в среднем из 80 сахаридных остатков, которые представлены чередующимися молекулами глюкуроновой кислоты, сульфатированной по гидроксильной группе у второго атома углерода, и глюкозамина, который сульфатирован по аминогруппе и по гидроксильной группе у шестого атома углерода. Пример фрагмента этого содинения:



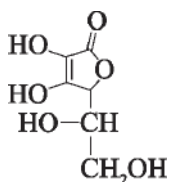
Часть остатков глюкуроновой кислоты в гепарине заменена на остатки *L*-идуруновой кислоты, это эпимер глюкуроновой кислоты по пятому атому углерода, а у некоторых глюкозаминовых остатков сульфамидная группа может быть заменена ацетамидной.

Этот важный биополимер, образующийся в тучных клетках рыхлой соединительной ткани животных, выполняет ряд важных биологических функций. Более всего известна антикоагулянтная активность гепарина (препятствует свертыванию крови), и поэтому его вводят в состав средств для лечения заболеваний, связанных с тромбообразованием, но гепарин также участвует в развитии эмбриона, в процессе ангиогенеза (рост новых кровеносных сосудов), в развитии болезни Альцгеймера, кроме того, он выполняет сигнальные функции. Было установлено, что антикоагулянтная активность гепарина сохраняется при сокращении числа сахаридных остатков до 10 (пять пар приведенной выше структуры). Более того, такие олигосахаридные гепарины оказались более избирательными антикоагулянтами, лишенными некоторых побочных эффектов высокомолекулярного гепарина.

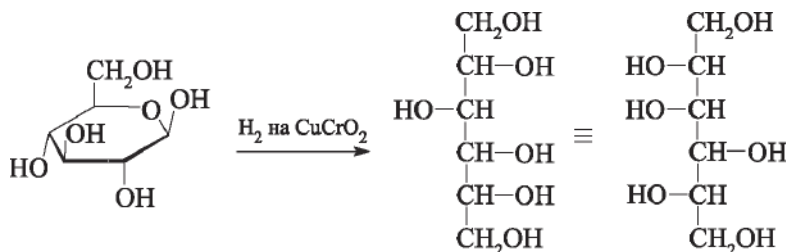
Еще одним натуральным антикоагулянтом является растворимый в воде белок *гирудин*, который выделяет в кровь медицинская пиявка. Гепарин и гирудин различаются по механизмам действия. Гепарин усиливает активность антикоагулянтного фактора крови III, тогда как гирудин блокирует фермент тромбин, участвующий в образовании белка фибрина. Как лекарственное средство гирудин по многим показателям превосходит гепарин, поскольку роль его ограничивается только предотвращением тромбообразования. Важно также, что в отличие от дру-

гих белков гирудин не вызывает иммунной реакции. Понятно, что выделение достаточного для лекарственных целей количества гирудина из медицинских пиявок не представляется возможным. В связи с этим были проведены опыты по получению генетически модифицированных культур дрожжей и бактерий, которые продуцируют этот белок. Однако синтез белка в бактериях начинается с аминокислоты N-формилметионина, остаток которой добавляется к истинной структуре этого белка и делает его малоактивным; более активный гирудин синтезируют генетически модифицированные дрожжи. В то же время небольшой размер этого белка и хорошая растворимость в воде делает его идеальным объектом для экспрессии в системах, основанных на генетически модифицированных растительных клетках. Гирудин очень стабилен и легко определяется с помощью цветных реакций, что облегчает проведение аналитических исследований с его участием. Во всяком случае, в арсенале лекарственных средств уже появился препарат лепиридин, который полностью идентичен натуральному гирудину.

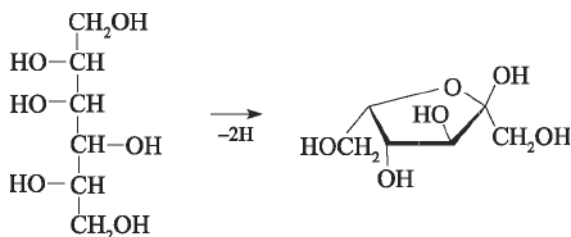
Особый интерес среди производных сахаров представляет *аскорбиновая кислота* (витамин С) — противогинготный фактор и специфический регулятор многих окислительно-восстановительных реакций. В организмах многих животных, к числу которых относятся, например, морские свинки и приматы, нет биохимических систем, предназначенных для синтеза эндогенной аскорбиновой кислоты. В соответствии с этим аскорбиновая кислота обязательно должна содержаться в продуктах питания. Считается, что для человека оптимальная доза этого вещества равна 30–60 мг в сутки, хотя в организме крыс, которые не нуждаются во внешнем источнике аскорбиновой кислоты, она образуется в количестве около 7,5 мг в сутки, что в пересчете на вес человека соответствует ежедневной дозе примерно в 2000 мг. Аскорбиновая кислота представляет собой циклический лактон, кислотные свойства которого определяются енольной функциональной группой:



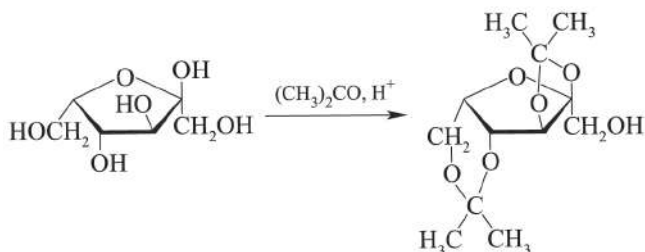
Из представленной формулы следует, что аскорбиновая кислота является продуктом окисления сахара в *L*-форме. Для ее получения были разработаны многочисленные методики, использующие в качестве исходного продукта глюкозу. При гидрировании глюкозы на нейтральном медно-хромитном катализаторе с выходом до 97% образуется сорбит:



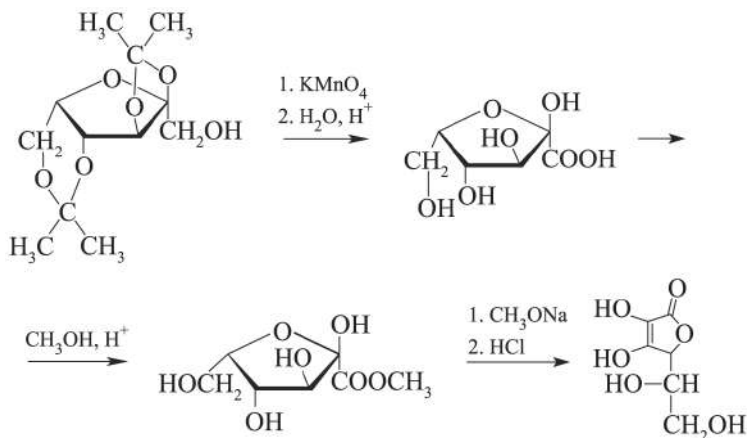
Поворот молекулы сорбита на 180° (вторая формула на схеме) показывает, что атом углерода, находившийся рядом с карбонильной группой в молекуле глюкозы, при окислении другого конца молекулы окажется в *L*-конфигурации. Окисление сорбита химическими способами при любом подборе известных защитных групп не дает высокого выхода продуктов, которые могут быть использованы для получения аскорбиновой кислоты. Поэтому в ее производстве на второй стадии используют биохимическое окисление. Сорбит содержится в ягодах рябины, где он служит субстратом для бактерии *Acetobacter suboxydans*. Ферментные системы этой бактерии избирательно дегидрируют сорбит до кетосахара *L*-сорбозы, которая включается в метаболизм этих бактерий:



При нагревании *L*-сорбозы с ацетоном в присутствии кислого катализатора защищаются гидроксильные группы (образуются кетали в виде диоксоланового и 1,3-диоксанового циклов):



Затем в щелочной среде можно окислить свободную гидроксиметильную группу, и после снятия защитных изопропилиденовых групп получить кетокислоту, для перевода которой в аскорбиновую кислоту проводят сначала реакцию этерификации, затем эфир обрабатывают метилатом натрия (идет внутримолекулярная переэтерификация и образование енольной формы) и подкисляют:

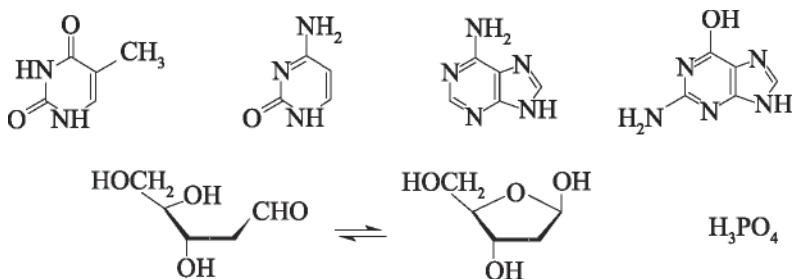


Отсутствие аскорбиновой кислоты в продуктах питания приводит к серьезным нарушениям обменных процессов, но такое тяжелое последствие этого, как цинга (другое название этой болезни скорбут), сегодня практически не встречается. Тем не менее, нельзя не принимать во внимание, что недостаток аскорбиновой кислоты приводит к снижению сопротивляемости организма по отношению к вирусным инфекциям, экстремальным нагрузкам, стрессам и др. Есть данные, свидетельствующие о положительной роли больших доз витамина С в профилактике и лечении простудных заболеваний. Так, например, известный ученый Л. Полинг рекомендовал при первых признаках простуды принимать несколько граммов витамина С.

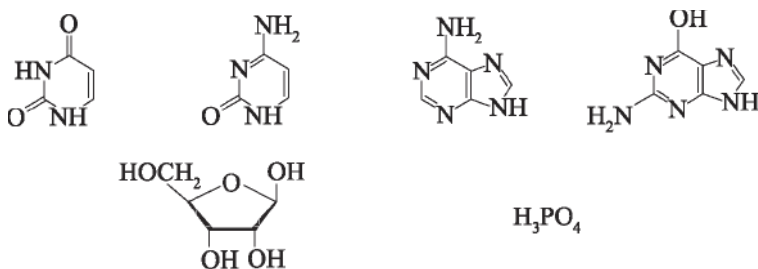
Глава 2

Нуклеиновые кислоты

Еще в XIX в. было показано, что клетки содержат значительно различающиеся по молекулярным массам полимерные кислоты, строение которых удалось установить только в конце 1940-х гг. Высокомолекулярные фракции этих биополимеров были собраны в ядрах (*nucleus*) клеток, и поэтому они получили общее название нуклеиновые кислоты. При гидролизе высокомолекулярные нуклеиновые кислоты разлагались на производные пиримидина — тимин и цитозин, на производные пурина — аденин и гуанин, а также на дезоксирибозу и фосфорную кислоту; по сахаридной компоненте их называли *дезоксирибонуклеиновыми кислотами* (ДНК):

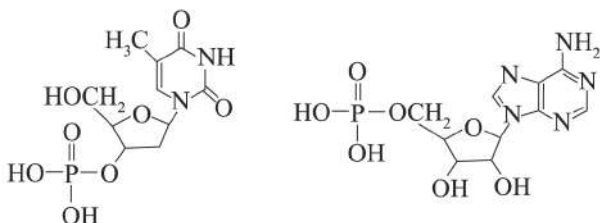


При гидролизе нуклеиновых кислот меньшей молекулярной массы получали урацил, цитозин, аденин, гуанин, рибозу и фосфорную кислоту; их стали называть *рибонуклеиновыми кислотами* (РНК):

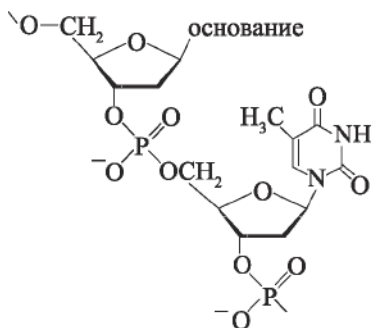


Наряду с этими структурными элементами в продуктах гидролиза нуклеиновых кислот содержались также состоявшие из этих же

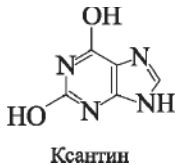
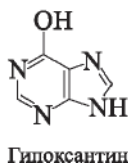
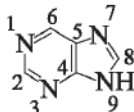
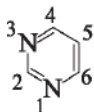
молекул продукты неполного гидролиза более сложного строения, среди которых были построенные по принципу N-гликозидов продукты конденсации гетероциклов и рибозы или дезоксирибозы — *нуклеозиды*, а также продукты фосфорилирования нуклеозидов по 5'-положению — *нуклеотиды* — и по 3'-положению рибозидного или, соответственно, дезоксирибозидного фрагмента, например:



Исходя из этого можно было сделать вывод о том, что нуклеиновые кислоты представляют собой линейные продукты поликонденсации нуклеотидов, в которых к полимерной цепочке из чередующихся фрагментов рибозы (или дезоксирибозы) и фосфорной кислоты присоединены гетероциклические основания:

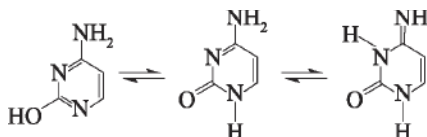


Урацил, тимин и цитозин относятся к производным гетероциклического соединения пиримидина, а аденин и гуанин — это производные пурина. В метаболических процессах (но не в построении нуклеиновых кислот) участвуют также 6-гидроксипурин (гипоксантин) и 2,6-дигидроксипурин (ксантин), а 1,3,7-триметилксантин — это кофеин.

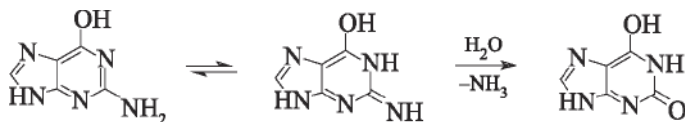


Одним из продуктов метаболического превращения пуриновых оснований является *мочевая кислота* — 2,6,8-тригидроксипурин. Это вещество плохо растворимо в воде и его отложение в тканях тела и в суставах является причиной болезни, известной под названием подагра.

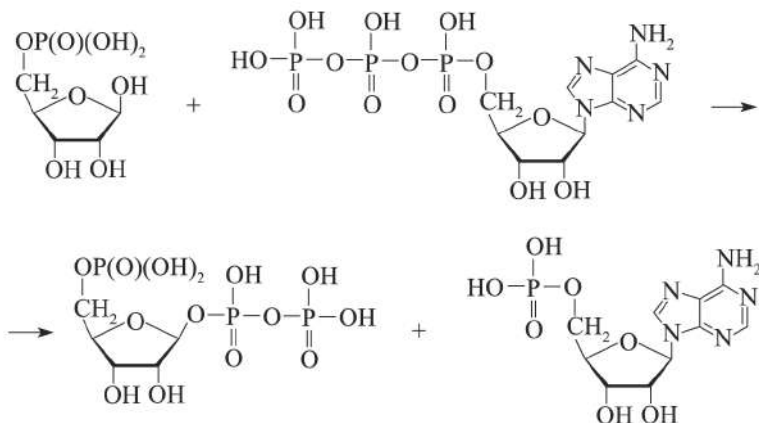
Для всех оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот, характерна так называемая *лактam-лактимная таутомерия*. Так, например, на цитозине это выражается равновесием:



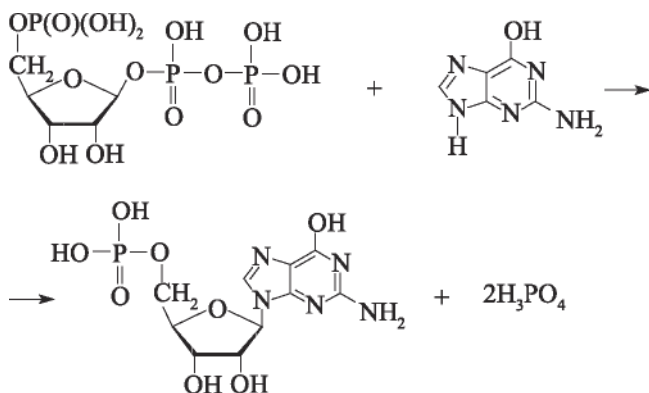
В лактимных формах возможны реакции гидролитического дезаминирования, в результате которых, например, цитозин может превращаться в урацил, а гуанин — в ксантин:



Если в клетке есть эти гетероциклические основания, то биосинтез нуклеотидов идет следующим образом: 5'-фосфат дезоксирибозы (или 5'-фосфат рибозы) фосфорилируется аденозинтрифосфатом по аномерной гидроксильной группе с образованием соответствующего 1'-пирофосфата. Например, для пирофосфата 5'-фосфорибозы:



Затем пирофосфатное производное пентозы реагирует с азотистым основанием с образованием соответствующего β -фосфорибозида и с выделением пирофосфата, который при этом гидролизуется на две молекулы фосфорной кислоты (чтобы реакция стала необратимой).



Так образуются аденозинмонофосфат (АМФ), гуанозинмонофосфат (ГМФ, на представленной выше схеме представлен его биосинтез) и другие нуклеотиды (в латинской транскрипции CMP, UMP, AMP, GMP, dAMP, dGMP, dCMP и TMP).

Из представленной схемы следует, что роль азотистых оснований не сводится только к участию в образовании ДНК и РНК. В виде рибозидов они участвуют в образовании основного носителя свободной химической энергии аденозинтрифосфата (АТФ, АТР), его аналога гуанозинтрифосфата (ГТФ, ГТР), некоторых участвующих в метаболизме веществ, относящихся к коферментам, и других биомолекул.

По аналогичной схеме с участием АТФ идет и поликонденсация нуклеотидов с образованием ДНК или РНК. ДНК представляет собой вещество, несущее наследственную информацию. В этих биополимерах записана вся программа построения многих вирусов, прокариотических клеток (у многих из них молекула ДНК — плазмида — имеет кольцевую структуру), эукариотических клеток и многоклеточных организмов. Собранные в клеточном ядре эукариотической клетки молекулы ДНК включают генные участки. Ген — это часть гигантской молекулы ДНК, содержащая информацию о последовательности аминокислот, составляющих одну белковую молекулу. В эукариотических клетках в ходе их деления

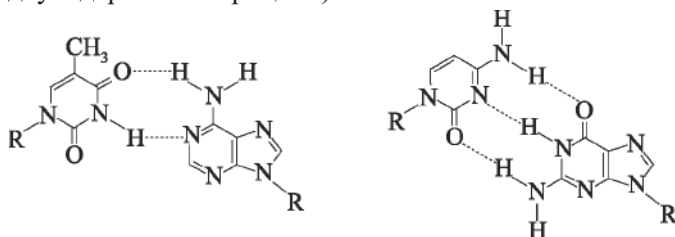
различаются компактные образования из различных белков и молекул ДНК, называемые *хромосомами* (от греч. *chroma* и *soma* — окрашиваемые тельца). Из всех содержащихся в клетках структур только хромосомы подходили на роль носителей наследственности, и именно содержащиеся в них молекулы ДНК лучше всего соответствовали этой роли. Это было показано в различных экспериментах. Одно из таких доказательств роли ДНК было получено в опытах на пневмококках. Мутантный невирулентный штамм этого микроорганизма можно было снова сделать вирулентным, добавив в среду, на которой он развивается, ДНК из вирулентного штамма. Для полного исключения возможного участия в этом белков, от которых ДНК на том этапе исследований не удавалось очистить полностью, выделенную из вирулентных штаммов ДНК обрабатывали дезоксирибонуклеазой, гидролизующей только ДНК; после этого продукт гидролиза терял способность переносить свойство вирулентности.

Синтез белка идет в цитозоле на рибосомах, представляющих собой комплекс белков и рибосомальных рибонуклеиновых кислот (рРНК), а собранная в ядре эукариотических клеток ДНК передает информацию об аминокислотной последовательности белка с помощью еще одной РНК — матричной (мРНК), синтезируемой на основе кодирующей цепи генного участка ДНК. Взаимоотношения ДНК–РНК–белок строятся по схеме:

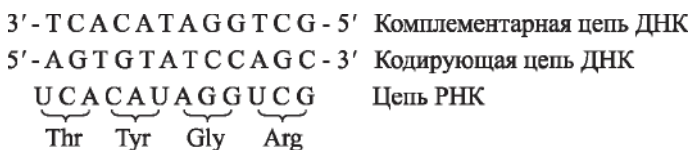


Основа полимерной цепи ДНК представлена чередующимися молекулами фосфорной кислоты и дезоксирибозы, аномерные гидроксильные группы которой замещены на остатки тимина, цитозина, аденина и гуанина. Эти фрагменты нуклеотидов и определяют пространственную организацию ДНК, образуя знаменитую двойную спираль из двух цепей ДНК за счет реализации водород-

ных связей в парах аденин–тимин и цитозин–гуанин (одноядерный и двухядерный гетероцикл):



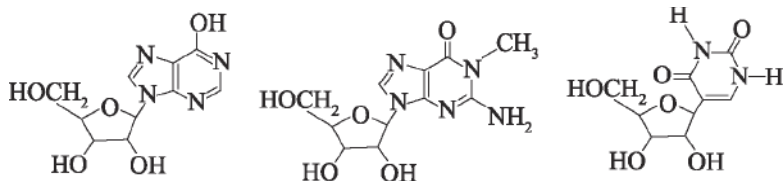
Цепи ДНК в паре антипараллельны, одну из них называют *кодирующей* (на ней идет синтез РНК), а другую *комплементарной* (по ней проверяются ошибки, нарушения структуры ДНК). Кодирование аминокислотной последовательности в белке осуществляется тройками из нуклеотидных фрагментов. Здесь простая арифметика: пара из четырех оснований даст только 16 различных сочетаний, а белковых аминокислот — 20. Число возможных комбинаций из четырех оснований по три равно 64. Из этого следует, что многие аминокислоты кодируются не одним, а несколькими триплетами (вырожденность генетического кода). Кодирующие аминокислоты тройки оснований называют *кодонами*, и лишь три кодона не относятся ни к одной аминокислоте. Их обычно называют *бессмысленными*, но на самом деле у них есть смысл — они обозначают конец гена, завершение информации о белковой цепи на этом участке ДНК. Молекула РНК подобна комплементарной цепи ДНК, но вместо тиминового фрагмента у нее стоит урацильный:



Можно представить себе, что есть рамка считывания информации с молекулы ДНК, в которую входят три нуклеотидных участка. Смещения рамки из-за выпадения одного нуклеотидного фрагмента (*делеции*) или добавления лишнего (*вставки*) приведут к транскрипции с образованием мРНК, трансляция с которой даст совсем другую аминокислотную последовательность, причем синтезируемый с этим сбоем белок может оказаться достаточно большим, поскольку из 64 вариантов кодонов только три останавливают биосинтез белка.

На самом деле процесс считывания информации с ДНК гораздо сложнее. Последовательность кодирующих белок участков ДНК в гене (*экзоны*) прерывается участками, которые не несут информации о белке — это так называемые *интроны*. При транскрипции сначала считывается вся последовательность экзонов и интронов с образованием первичного транскрипта РНК, из которого затем вырезаются участки, соответствующие интронам, а экзонные участки соединяются в одну цепь — идет процесс образования *зрелой* мРНК (*сплайсинг*). Понятно, что начало и конец интронов обозначены определенным сочетанием оснований: во всяком случае, все они начинаются с GU и кончаются AG [сплайсинг осуществляет аналог рибосомальной РНК — *мяРНК* (малая ядерная РНК)]. Биологическая роль интронов состоит, очевидно, в облегчении эволюции живого за счет ошибок в ходе сплайсинга с перетасовкой готовых блоков из РНК.

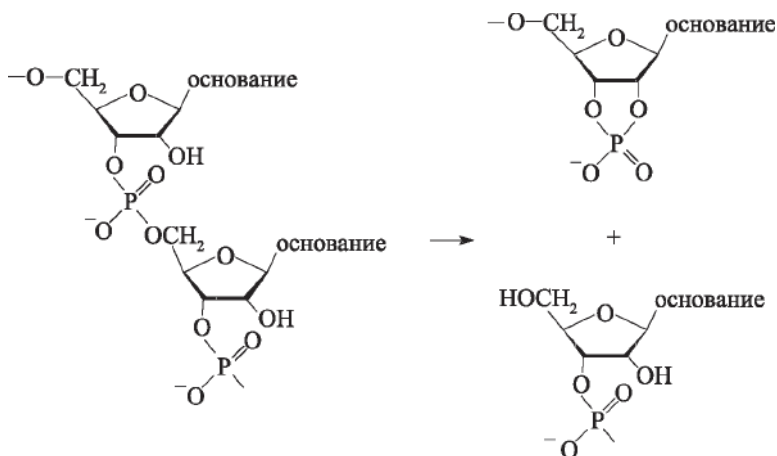
Как отмечалось во Введении, именно РНК претендует сейчас на роль молекулы, с которой начиналось зарождение жизни. Одним из веских подтверждений этому является возможность самополимеризации фрагментов РНК с образованием более длинных цепей, сворачивающихся в компактные структуры с небольшими спиральными участками, которые аналогичны двойным спиральям ДНК. Кроме матричной и рибосомальной РНК, клетки содержат значительное количество других РНК с меньшей молекулярной массой, например, транспортные РНК (тРНК), которые при синтезе белка переносят аминокислоты к рибосомам, а также РНК с каталитической активностью (*рибозимы*). Интересно, что в составе этих «дополнительных» РНК есть гетероциклические структурные элементы, отличные от входящих в состав ДНК и мРНК, например, инозин, 1-метилгуанозин и псевдоуридин:



Повреждения структуры ДНК. Сочетание кислотных и основных функциональных групп в молекуле ДНК делает ее достаточно чувствительной к pH среды и к присутствию в ней катионов металлов. Так, например, двухнитевая спираль устойчива только в среде с определенным содержанием ионов натрия и калия в достаточно узком интервале значений pH. В то же время ионы переходных ме-

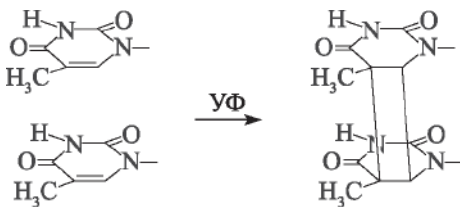
таллов легко образуют комплексы с азотными функциями гетероциклических фрагментов молекулы ДНК, и поэтому они могут серьезно влиять на процессы репликации и транскрипции. Ионы металлов могут образовывать комплексы с ДНК как с участием воды (в гидратированной форме), так и без нее. Понятно, что включение в структуру ДНК дополнительных компонент нарушает естественный ход считывания информации с этой макромолекулы, что ведет к мутациям, то есть к изменению исходной структуры образовавшейся в результате репликации ДНК. В многоклеточном организме это может привести к появлению аномальных клеток, что лежит в основе тератогенного (отклонения в развитии плода) или онкогенного (возникновение злокачественных опухолей) эффекта ионов тяжелых металлов. В частности, установлено, что в присутствии повышенных концентраций ионов меди и марганца резко возрастает число мутантных клеток бактерий. Установлена канцерогенность солей хрома и никеля, токсичны соли кадмия, ртути, серебра, висмута. В отдельных случаях бактерицидные свойства таких солей (особенно серебра) используются для борьбы с патогенными микроорганизмами, хотя, конечно, токсическое действие этих металлов не ограничивается взаимодействием только с нуклеиновыми кислотами.

В полимерной молекуле ДНК, которая предназначена для длительного хранения информации, нет свободных гидроксильных групп. В отличие от этого молекула РНК достаточно легко деполимеризуется по реакции перэтерификации с образованием циклического фосфата:



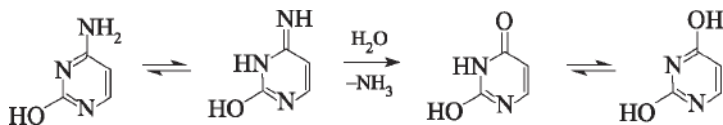
И все же, ионы меди, ртути, кадмия даже в очень низких концентрациях приводят к появлению разрывов в цепях ДНК из-за гидролиза. Еще более серьезные повреждения молекул наследственного вещества вызываются совместным действием ионов таких металлов и ионизирующего (или коротковолнового электромагнитного) излучения. Это особенно важно в связи с растущим загрязнением окружающей среды тяжелыми металлами на фоне радиоактивного заражения и возрастающей интенсивности ультрафиолетового излучения в результате разрушения озонового слоя. Свой вклад в этот процесс вносят и высокочастотные излучения различного происхождения (радиоволны дециметрового и более коротковолновых диапазонов, спутниковые и сотовые телефоны, печи СВЧ).

Постоянные повреждения структуры ДНК вызывает ультрафиолетовое и рентгеновское излучение, а также другие виды радиации. Известно, например, что УФ-излучение вызывает димеризацию расположенных рядом тиминовых фрагментов в молекуле ДНК. Такое связывание приводит к изменению расстояния между основаниями и к сбою в рамке считывания:



Природа готова к такому повреждению структуры ДНК: специальная ферментная система обнаруживает участки со связанными тиминовыми молекулами и вырезает их, вставляя «исправные». Если эта ферментная система дефектна (наследственное заболевание), то это проявляется в виде болезни ксеродермии, которая заставляет больных избегать солнечного света, сильно сушащего кожу и даже вызывающего злокачественные опухоли на коже.

В малой степени, но все же идет гидролиз образующихся в таутомерном превращении иминных функциональных групп в фрагментах цитозина и гуанина, в результате чего эти фрагменты превращаются, соответственно, в урациловый и ксантиновый. Превращение цитозинового остатка в урацильный по схеме

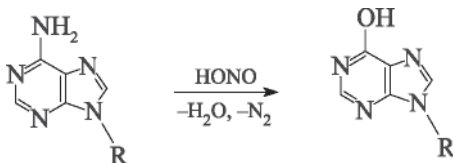


также распознается репарирующей ферментной системой (именно поэтому в молекуле ДНК роль урацила выполняет тимин). Если бы возможность такого распознавания была исключена, то урацил, образовавшийся из цитозина, оказался бы в аномальной паре с гуанином, и тогда репарирующая система встала бы перед неразрешимым вопросом: что надо заменить — урацил на цитозин или гуанин на аденин? Именно для таких исправлений возможных ошибок и служит вторая комплементарная нить ДНК. Кодировочная и комплементарная нити взаимно контролируют друг друга. Возможность саморепарации показана в опыте с культурой дрожжей: после облучения летальной для них дозой радиации некоторые дрожжевые клетки могут восстановить жизнеспособность, если их на несколько дней поместить в холодильник.

К химическим мутагенам относятся:

- дезаминирующие вещества и N-нитрозопроизводные;
- алкилаторы (диметилсульфат, метилиодид, метилбромид, бензилхлорид, азотистый и сернистый иприт, соединения с активированными двойными связями и т. д.);
- структурные аналоги азотистых оснований и нуклеозидов.

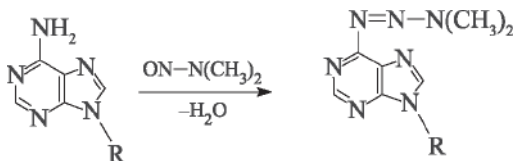
На параметаболический процесс (химическое превращение без участия ферментов) гидролиза лактимной формы цитозинового, аденинового или гуанинового фрагментов может накладываться действие азотистой кислоты, образующейся, например, из нитратных удобрений или из добавляемых в мясные продукты нитратов и нитритов:



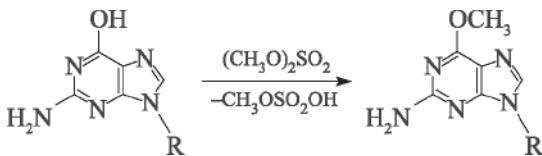
Пока число таких мутаций не превышает возможности их репарации соответствующими ферментными системами, контролирующими соответствие кодирующей и комплементарной нитей ДНК, отрицательные последствия минимальны. Если же ДНК с дезаминированными фрагментами включается в процесс транскрипции, то это приводит к фатальным последствиям, поэтому большие концентрации нитритов токсичны.

Важными мутагенами и цитостатиками (вещества, останавливающие деление клеток) являются все N-нитрозопроизводные и

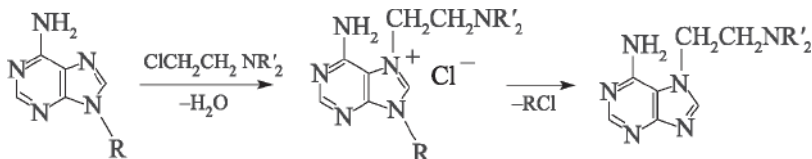
многие вещества с алкилирующей способностью. Так, например, одним из мощнейших мутагенов является N-нитрозодиметиламин и другие нитрозамины, которые легко образуются из нитритов и вторичных аминов. N-Нитрозодиметиламин образуется также из несимметричного диметилгидразина, используемого в качестве ракетного топлива. N-Нитрозопроизводные реагируют с аминогруппами в ДНК с образованием триазенов, например:



Среди алкиляторов можно выделить вещества, которые более или менее избирательны по отношению к различным нуклеофильным центрам (зарядовый и орбитальный контроль); есть С-алкиляторы, S-алкиляторы, N-алкиляторы, О-алкиляторы. Так, например, диметилсульфат алкилирует преимущественно атом кислорода в гуаниновом фрагменте ДНК:

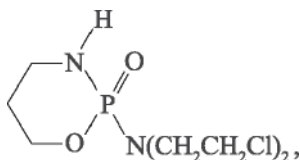


Алкилирование, конечно, приводит к изменению системы водородных связей в молекуле ДНК, хотя небольшие количества метилированных азотистых оснований обязательно присутствуют в ДНК. В отличие от этого азотистый иприт атакует атом азота в имидазольном цикле пуриновых оснований, что приводит к отщеплению азотистого основания:



Первыми средствами для лечения злокачественных опухолей стали β-хлорэтиламины. Их действие было направлено на клетки, которые часто делятся и система репарации которых не успевает

заменить дефектные участки в ДНК, образовавшиеся в результате действия этих веществ. С этим механизмом действия связан и токсический эффект алкилаторов, так как в организме человека достаточно много нормальных тканей, в которых идет интенсивное деление клеток. Совершенствование структур β -хлорэтиламинов улучшило их терапевтические показатели. В качестве примера можно привести современное химиотерапевтическое средство циклофосфан (циклофосфамид)

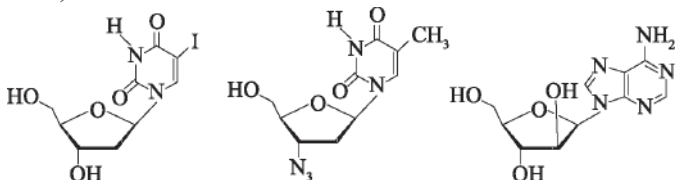


избирательность которого основана на гидролитическом отщеплении бис(β -хлорэтил)амин от этого производного фосфорной кислоты. Алкилирующая способность хлорэтильных групп в амиде очень низка, а в злокачественных клетках очень активны ферменты, гидролизующие производные фосфорной кислоты (фосфорилазы), поэтому цитотоксичный бис(β -хлорэтил)амин образуется преимущественно в клетках опухоли.

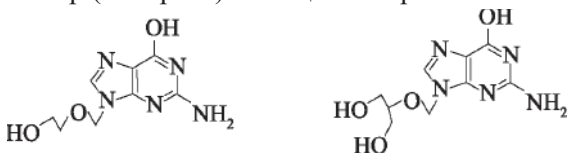
Химические мутагены третьего типа относятся к *антиметаболитам* — структурным аналогам естественных метаболитов. Одним из примеров может служить 5-фторурацил. Его применение в роли антибактериального препарата основано на том, что часто делящиеся, интенсивно размножающиеся клетки испытывают острую потребность в строительных элементах ДНК и РНК, а ферментные системы бактерий не столь совершенны, чтобы различать присутствие лишнего заместителя. Поэтому они чаще встраивают этот структурный аналог урацила или тимина в свои РНК или ДНК, которые оказываются в результате этого дефектными. Для повышения избирательности 5-фторурацила его ацилируют короткой пептидной цепью из *D*-аминокислот. В организме человека нет ферментов для разложения таких пептидных связей, а в клетках бактерий они есть. В клетках человека такой ацилированный 5-фторурацил не изменяется и, в конце концов, выводится, а в клетках бактерий гидролиз идет и в результате выделяется 5-фторурацил, приводящий к образованию дефектной ДНК.

Другими примерами антиметаболитов структурных элементов ДНК служат, в частности, 5-иодуридин, азидотимидин (ле-

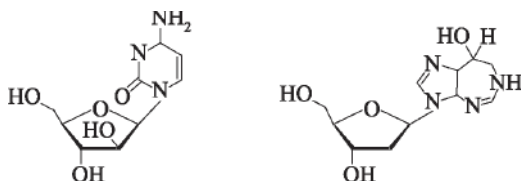
карство от СПИДа), арабиноаденозин (антибиотик и лекарство от герпеса):



Антиметаболитами с противогерпесной активностью являются также ацикловир (Зовиракс) и ганцикловир:

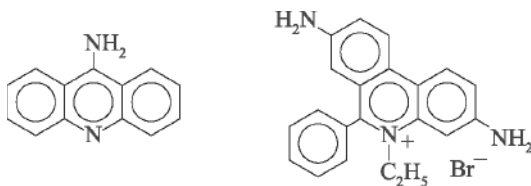


Для лечения лейкозов и лейкоемий используются антибиотики цитарабин и пентостатин:

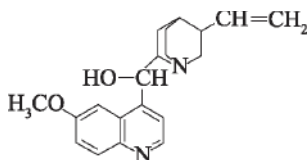


Особое место в нарушении репликации и транскрипции занимают вещества, называемые *интеркаляторами*. Дело в том, что несмотря на плотную упаковку молекулы ДНК в двойной спирали, в ней все же остается место для встраивания плоских молекул, и это, конечно, сопровождается изменением геометрии спирали, ее витки растягиваются, освобождая место для «квартиранта». Чем больше у внедрившейся в спираль ДНК молекулы возможностей для образования ионных, водородных или иных типов связей, тем более прочное соединение включения она образует.

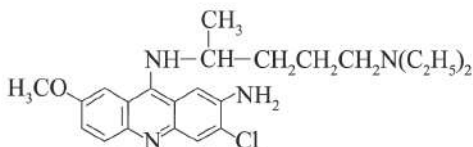
Интеркаляторами являются многие полиядерные гетероциклические соединения, например 9-аминоакридин и этидийбромид:



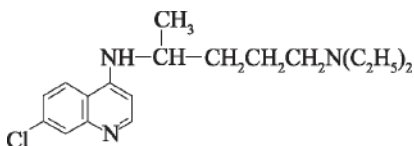
По механизму интеркаляции действуют также многие средства для борьбы с болезнетворными микроорганизмами. Например, типичным интеркалятором является алкалоид хинин, в течение многих лет использовавшийся для лечения малярии:



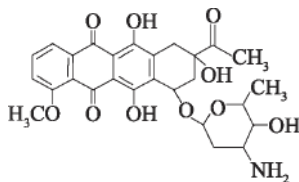
Интеркаляторами являются также синтетические аналоги хинина акрихин



и хлорохин



Большая группа интеркаляторных антибиотиков используется для лечения злокачественных новообразований. Так, например, рубомицин



плоской системой четырех сконденсированных циклов встраивается между парами оснований в молекуле ДНК, а дидезоксиаминосахаридный фрагмент служит подобием якоря, фиксируясь в пространстве между полиэфирными цепями двух нитей ДНК с фосфатными группами.

Липиды и клеточные мембраны

В большую группу биогенных веществ входят компоненты клеток липидной природы, извлекаемые из них неполярными растворителями. Полный анализ всех составляющих таких экстрактов дает очень сложную картину. Во всяком случае, вещества с преобладанием липофильных фрагментов, содержащиеся в клетках растений и животных, можно разделить на четыре основных группы:

- жирные кислоты;
- глицеринсодержащие липиды:
 - моно-, ди- и триацилглицерины (жиры),
 - простые эфиры глицерина,
 - фосфоглицериды;
- липиды, в составе которых нет глицерина:
 - сфинголипиды,
 - алифатические спирты и воска,
 - терпены,
 - стероиды.

Кроме них, есть еще липопротеины, гликолипиды и другие высокомолекулярные соединения с преобладанием гидрофобных составляющих.

Нейтральные триглицериды (триацилглицерины), известные как жировые вещества, малополярны; их главное предназначение — это обеспечение энергетических потребностей клетки. Молекулы многих других липидов включают полярные фрагменты, придающие им свойства поверхностно-активных веществ. Эти амфифильные молекулы (от греч. *amphi* — оба, *phile* — сродство, любовь), имеющие гидрофильные и липофильные фрагменты, входят, например, в состав клеточных мембран и выполняют регуляторные функции.

3.1. Эфиры жирных кислот и глицерина

Трехатомный спирт глицерин может быть частично или полностью этерифицирован высшими монокарбоновыми кислотами, которые чаще всего называют жирными кислотами. Моноацилглицерины — это пищевые поверхностно-активные вещества. Их вводят в состав многих пищевых продуктов; хлеб с добавкой моноацилглицеринов не черствеет в течение многих дней. Очень важно, что эти вещества являются также хорошими средствами для защиты от микроорганизмов. Как и многие другие поверхностно-активные вещества они повреждают мембраны болезнетворных бактерий, разрушают ансамбль белков в оболочках вирусов. Особенно активен в этом отношении монолаурат глицерина. В последние годы была обнаружена важная роль некоторых производных жирных кислот — нейролипидов — в функционировании нервной системы.

В небольших количествах глицерин и жирные кислоты содержатся в клетках в свободном состоянии, но основная их часть связана с другими молекулами. Глицерин обычно находится в виде эфира с фосфорной кислотой, а жирные кислоты, если они не связаны с глицерином, чаще всего находятся в виде тиоэфиров кофермента А (CoA-S-CO-R) или в виде различных амидов. Входящие в состав жиров карбоновые кислоты состоят из четного числа атомов углерода в неразветвленной ациклической цепи. Они могут быть как насыщенными, так и ненасыщенными. Важнейшие из насыщенных карбоновых кислот: масляная (C_4), капроновая (C_6), каприновая (C_8), каприловая (C_{10}), лауриновая (C_{12}), миристиновая (C_{14}), пальмитиновая (C_{16}), стеариновая (C_{18}) и арахидовая (C_{20}). Названия их происходят от названий жиров [например, капринос (от греч. — коза)], из которых они были выделены. В различных метаболических превращениях могут принимать участие и карбоновые кислоты с нечетным числом атомов углерода: пропионовая (C_3), валериановая (C_5), энантовая (C_7), пеларгоновая (C_9), но в составе жиров они могут присутствовать лишь в очень малых количествах.

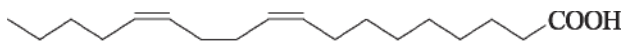
Широко распространены в составе жиров и липидов клеточных мембран производные ненасыщенных жирных кислот, содержащих от одной до четырех двойных связей. У кислот и их производных, имеющих в структуре двойные связи, возможна *цис-транс*-изомерия; свойства таких соединений (физические и биохимические) определяются геометрией этих связей. Так, например, растворимость стеариновой кислоты в холодном спирте составляет всего лишь

2,5%, тогда как олеиновая кислота (ее содержание в оливковом масле доходит до 82%), линолевая кислота и линоленовая кислота (из льняного масла) смешиваются с холодным спиртом в любом соотношении.

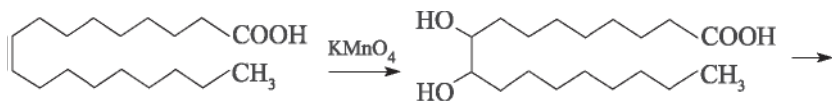


Обычно двойные связи природных ненасыщенных кислот имеют *цис*-конфигурацию. При нагревании и при получении маргарина остатки этих кислот в составе растительных жиров частично изомеризуются (в результате реакций гидрирования-дегидрирования) в *транс*-изомеры (олеиновая кислота — в элаидиновую), которые очень вредны для здоровья.

Но есть жиры и с ненасыщенными кислотами с сопряженными двойными связями, например, в состав тунгового масла входит элеостеариновая кислота



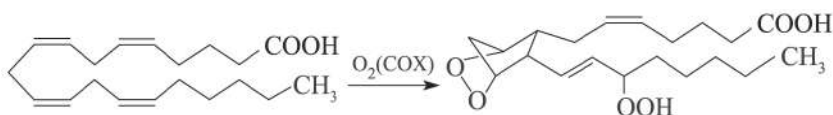
Эфиры полиненасыщенных жирных кислот очень легко окисляются кислородом воздуха с образованием пероксидов и гидропероксидов (прогоркание масел). Особенно легко этот процесс идет на свету, когда возможна и радикальная полимеризация (по этой причине тара для растительных масел должна быть темноокрашенной). Ненасыщенные кислоты озонируются, что позволяет установить их строение. При окислении олеиновой кислоты перманганатом в мягких условиях образуется диоксистеариновая кислота, разлагающаяся в более жестких условиях на пеларгоновую кислоту и дикарбоновую (C_9) азелаиновую кислоту:



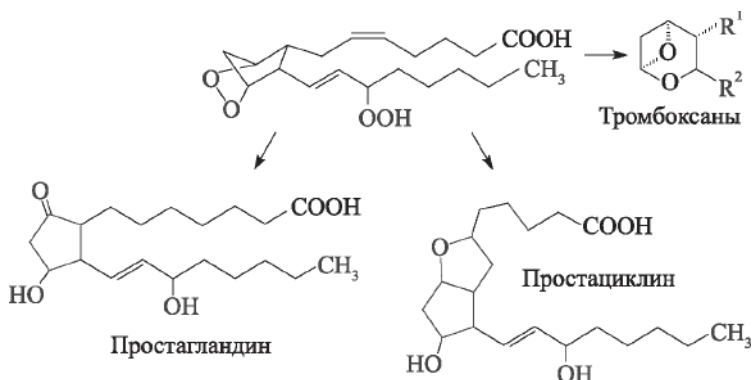
Очень важную роль в структуре клеточных мембран и в биосинтезе простагландинов, простациклинов и тромбоксанов (эти вещества выполняют в организме регуляторные функции, их часто объединяют общим названием *простаноиды*) играет арахидоновая кислота — C_{20} -кислота с четырьмя двойными связями:



Арахидоновая кислота входит в состав липидов клеточных мембран, но возможности ее биосинтеза в организме человека ограничены. В большом количестве полиненасыщенные жирные кислоты (в том числе и арахидоновая) содержатся в жире планктона холодных морей, из которого они попадают в криль и в жир холодноводных рыб (лосось, треска). Обилие двойных связей делает арахидоновую кислоту очень чувствительной к окислению, но будучи включенной в плазматические мембраны в составе липидов со сложноэфирными связями, она защищена от окисления гидрофобным окружением. При нарушении целостности мембран липиды могут подвергаться ферментативному гидролизу, а выделяющаяся при этом свободная арахидоновая кислота окисляется кислородом при катализе ферментом циклооксигеназой (COX) с образованием пероксидного производного:



Это вещество далее превращается в простаноиды, которые запускают целый ряд физиологических процессов, связанных с реакцией на вызвавшее повреждение клеток воздействие. Простагландины (впервые выделены из предстательной железы — простаты) и простациклины являются биологическим регуляторами с многочисленными и разнообразными функциями, в частности, они принимают участие в развитии воспалительного процесса и усиливают болевой сигнал, а тромбоксаны стимулируют агрегацию тромбоцитов. Это является биологическим ответом на повреждение клетки, в результате которого произошло высвобождение арахидоновой кислоты из липидов клеточной мембраны.



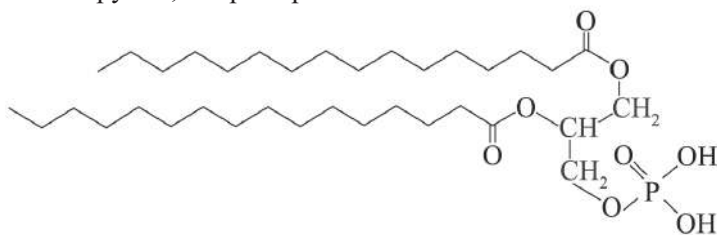
Интересно, что эндогенным каннабиноидом, то есть веществом, действие которого имитирует тетрагидроканнабинол (активное вещество марихуаны и гашиша), является амид арахидоновой кислоты и этаноламина, или анандамид (*ананд* на санскрите — блаженство), выполняющий в организме определенные медиаторные функции. В центральной нервной системе (ЦНС) обнаружен аналог анандамида — 2-арахидонилглицерин. Его содержание в нервной ткани в 170 раз превышает содержание анандамида. Заметные количества анандамида содержатся в шоколаде. Сейчас синтез агонистов и антагонистов анандамида и других нейрוליпинов является одной из приоритетных областей химической фармакологии.

Состав жиров по кислотам сильно различается не только по происхождению из разных организмов, но и по локализации в одном организме. Так, например, в жире молока коровы много короткоцепочечных жирных кислот (9% C₄, 3% C₆, 2% C₈, 4% C₁₀, 3% C₁₂). В жире мяса крупного рогатого скота их нет, но много трудно усвояемой стеариновой кислоты. Жир печени богаче ненасыщенными жирными кислотами, чем жир подкожных тканей. Много ненасыщенных жирных кислот в растительных маслах, в свином жире. В организме гидролиз жиров катализируется ферментами — липазами.

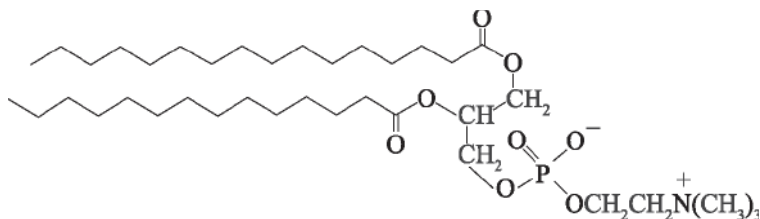
3.2. Липидные компоненты клеточных мембран

До 50% липидов клеточных мембран составляют производные фосфатидных кислот, которые представляют собой продукт этери-

фикации диацилглицеринов фосфорной кислотой по первичной спиртовой группе, например:



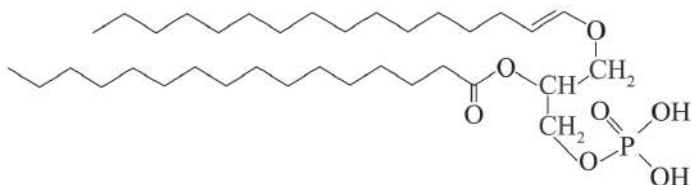
В свою очередь фосфатидные кислоты можно рассматривать как продукты диацилирования *L*-глицерин-3-фосфата или, что то же самое, *D*-глицерин-1-фосфата, но стерические эффекты у жиров и производных фосфатидных кислот особой роли не играют. На основе фосфатидных кислот в организме образуется несколько важных амфифильных соединений, представляющих собой продукты этерификации одной из кислотных групп фосфорной кислоты гидроксильными группами холина, этаноламина или серина:



Эта формула соответствует фосфатидилхолину (лецитин, эфир фосфатидной кислоты и холина $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), другими соединениями этой группы являются фосфатидилэтанолмин (кефалин, эфир фосфатидной кислоты и этаноламина $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) и фосфатидилсерин (эфир фосфатидной кислоты и аминокислоты серина $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$).

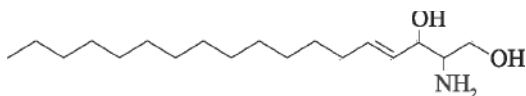
Амфифильные свойства могут быть также обусловлены неионогенными гидрофильными остатками. При этерификации одной из гидроксильных групп фосфатного фрагмента остатком инозита — гексагидроксициклогексана — образуется фосфатидилинозит, а его гидроксильные группы могут быть дополнительно фосфорилированы. Определенную роль в построении мембран играют и простые эфиры глицерина — вещества, построенные по типу фосфатидных производных, у которых один из остатков

жирной кислоты (у первичной гидроксильной группы) заменен на енольный остаток или остаток жирного спирта (плазмалогены), например:

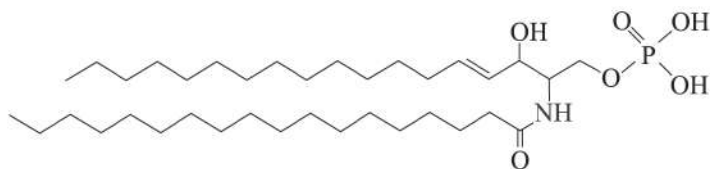


В этих веществах фрагмент фосфорной кислоты также образует эфирные связи с различными гидрофильными остатками.

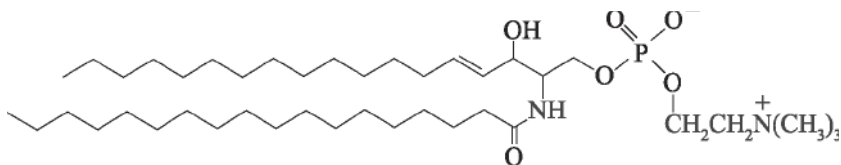
Близки фосфатидилхолину по биологическим функциям сфингомиелины, построенные на основе ненасыщенного аминодиола — сфингозина:



Ацилированный по аминогруппе остатком жирной кислоты сфингозин — это керамид, образующий аналогичный фосфатидной кислоте эфир с фосфорной кислотой (приведена формула фосфата керамида):

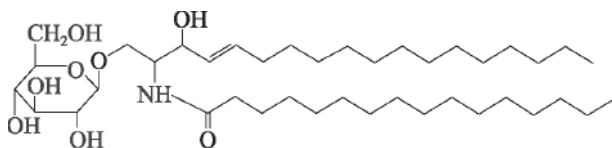


Эфир фосфата керамида и холина — это сфингомиелин:



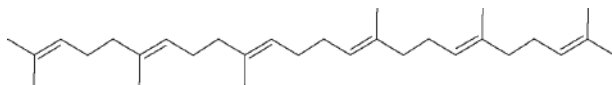
В керамидных производных гидрофильный фрагмент может быть представлен остатками полиоксисоединений, в частности са-

харов. Церамид, соединенный гликозидной связью с глюкозой — это глюкоцереброзид:

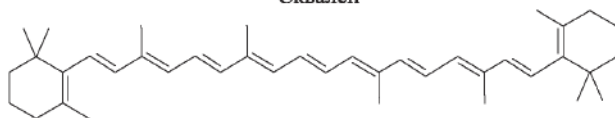


В результате присоединения к первичной гидроксильной группе церамидов олигосахаридных остатков образуются ганглиозиды, которые формируют антигенные и рецепторные участки на клеточных мембранах.

В построении клеточных мембран участвуют и липиды терпеноидной природы, построенные из фрагментов изопрена. В их число входят полиненасыщенные линейные и алициклические соединения:

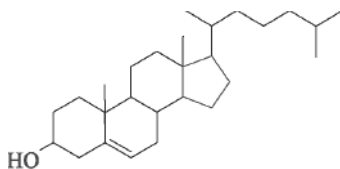


Сквален

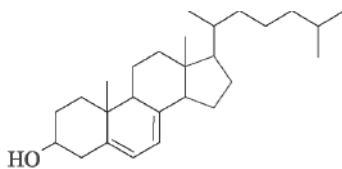


β-Каротин

В состав мембран входят также стероиды, например, холестерин и эргостерин:



Холестерин

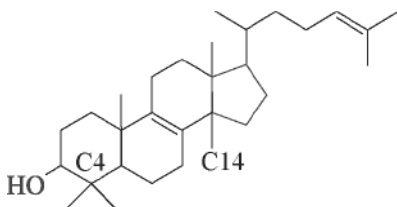


Эргостерин

Из дегидрохолестерина (эргостерина) на свету образуется витамин D, регулирующий, в частности, кальцевый обмен. В норме в организм человека он должен поступать (или образовываться) в количестве около 10 мкг в сутки, а доза в 1,5 мг этого витамина — уже яд. Скорость образования витамина D в значительной мере зависит от светового потока, поэтому люди южных широт имеют темную кожу (светлокожие загорают), а северяне — блон-

дины. Правда, есть еще смуглые и черноволосые эскимосы, но они получают много витамина D с рыбой и мясом морских животных.

Вещества стероидной природы очень важны в составе клеточных мембран всего живого. Они определяют их лабильность, проницаемость для многих необходимых клетке веществ, для которых нет специальных транспортных систем. Если мембраны клеток животных включают преимущественно холестерин, то мембраны растительных клеток содержат большое число (в зависимости от растения) стероидов иного строения. Первичным продуктом стероидной природы, образующимся из сквалена (тритерпен линейного строения), становится чаще всего ланостерин:



Ланостерин трижды подвергается деметилированию (две метильные группы у C4 и метильная группа C14) и трансформации по боковой цепи. Окисленные стероиды с карбоксильной группой в укороченной боковой цепи — это желчные кислоты. Они играют роль поверхностно-активных веществ в пищеварительной системе. Без них скорость переваривания жиров резко снижается. Растительные клетки, наоборот, усложняют эту боковую цепь. Паразитирующие на растениях грибы чаще всего используют в качестве исходного продукта для своего мембранного стероида — эргостерина — ланостерин. Нарушение деметилирования ланостерина по C14 лежит в основе действия современных противогрибковых препаратов — фунгицидов. Стероидную природу имеют многие гормоны и токсины.

3.3. Клеточные мембраны

При изучении строения клеток методом электронной микроскопии были получены экспериментальные данные, позволившие Сингеру и Николсону (1972) предложить жидкостно-мозаичную модель клеточной мембраны. На электронных микрофотографиях срезов клеток, окрашенных тетроксидом осмия и перманганатом калия, выявляются образования толщиной 6–10 нм с темными наружны-

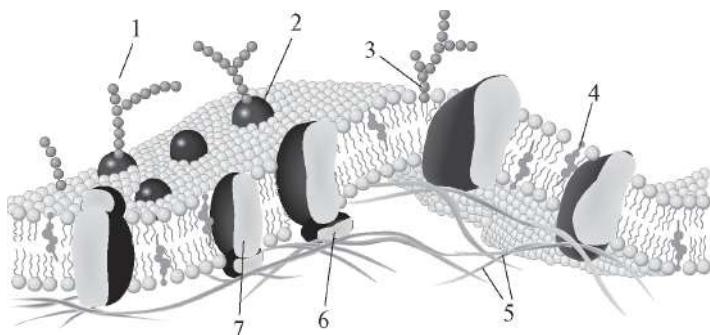


Рис. 3.1. Жидкостно-мозаичная модель клеточной мембраны (Сингер и Николсон)

ми (по 2–2,5 нм) и светлым внутренним (около 3 нм) слоями, которые по всем показателям соответствуют клеточным мембранам. В темных слоях повышено содержание металлического осмия.

При скалывании замороженных клеток линия скола проходит по светлomu слою, примерно по середине этих образований. При этом в плоскости скола обнаруживаются крупные включения, представляющие собой интегрированные в мембраны белковые молекулы. При обработке клеток растворами с высокой ионной силой от них отделяется часть связанных белков, которые удерживались на внешней стороне мембраны только ионными силами или водородными связями (периферические белки).

Представленная на рис. 3.1 мембрана состоит из бислоя липидов, в котором плавают (или закреплены) белковые молекулы, образуя в нем своеобразную мозаику. Мембранные белки могут пронизывать бислой насквозь и погружаться в него (интегральный белок 7) или примыкать к бислою (периферический белок 6). Многие мембранные белки являются гликопротеинами 2, а мембранообразующие липиды — гликолипидами 3. На рисунке показаны также холестерин 4, олигосахарид 1, элементы цитоскелета (5).

Ко времени разработки этой модели было хорошо изучено строение амфифильных соединений, которые по их способности растворяться в неполярных растворителях относились к липидам, то есть жироподобным веществам. В отличие от обычных поверхностно-активных веществ выделенные из клеток амфифильные липиды имеют по два гидрофобных углеводородных остатка, которые придают им способность к образованию в воде ассоциатов

с двойным слоем молекул, где полярные фрагменты обращены в сторону водной фазы, а неполярные, закрытые от воды полярными, образуют внутренний гидрофобный слой. В отличие от обычных мицелл (мицеллы образуются при ассоциации ПАВ с одним гидрофобным остатком) такие двухслойные системы могут формировать шарообразные или иные полые образования, внутри которых заключена часть захваченной водной фазы, их называют липосомами. Полученные простым смешением мембранных липидов с водой липосомы различаются по размеру в широких пределах, они могут иметь достаточно сложное строение, когда внутри одной липосомы находится несколько более мелких или когда просто идет чередование слоев с прослойками из включенной в липосому жидкости. В пределах липидного бислоя составляющие его молекулы достаточно подвижны, но перемещение одной молекулы с внешней стороны на внутреннюю и наоборот затруднено, поскольку для этого полярная часть молекулы должна пройти через неполярный слой. В общем случае мембрана представляет собой двухмерную жидкость. Углеводородные составляющие амфифильных липидов имеют разную длину, и поэтому есть взаимопроникновение «хвостов» липидных молекул одного слоя в другой, что еще более стабилизирует систему.

Включенные в клеточную мембрану белки могут перемещаться в этой двухмерной жидкости в результате латеральной диффузии. В принципе должно было бы происходить даже слипание, агрегация интегрированных в мембрану белковых молекул, но этого не происходит из-за присутствия в мембранах стероидных составляющих и фиксации белков микротрубочками и микронитями, структурирующими все внутреннее пространство клетки (это и есть цитоскелет).

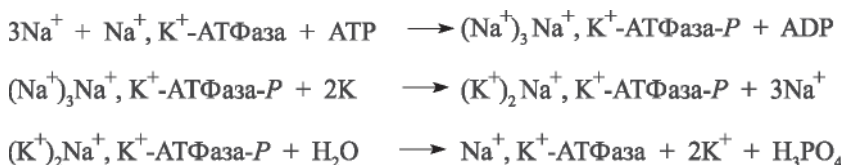
Мембраны разных клеток отличаются как составом входящих в их состав липидов, так и набором интегрированных и ассоциированных белков. В клетках есть также различие в составе липидов внутреннего и внешнего слоя мембраны. Это связано, во-первых, со строением и ролью белков, находящихся на внутренней и на внешней поверхности мембраны, а во вторых, с различием в составе внутренней среды клетки и окружающей ее (интерстициальной) жидкости. На внешней поверхности клетки находятся также гликолипиды и гликопротеины с олигосахаридными участками, определяющими иммунный статус клетки. Асимметрия мембран по составу липидов на примере эритроцитов такова: на внешнюю сто-

рону мембраны, окружающей эти клетки, смотрят гидрофильные фрагменты фосфатидилхолина и ганглиозидов, с внутренней, цитозольной стороны мембраны — фрагменты фосфатидилэтаноламина (кефалина), фосфатидилсерина и сфингомиелина. Стероидные липиды служат для регуляции жидкокристаллических свойств мембран и для фиксации в них белков.

Важнейшая функция мембран — это транспорт через нее веществ и частиц в обоих направлениях. Частицы, в том числе болезнетворные бактерии или вирусы, могут захватываться клеткой (эндоцитоз), когда клеточная мембрана обволакивает частицу и отделяется внутри клетки в виде пузырька (везикулы) с включением. При экзоцитозе протекает обратный процесс, при котором мембрана везикулы, образовавшейся, например, в результате работы аппарата Гольджи, сливается с внутренней стороны с мембраной клетки и образует пору, через которую содержимое везикулы выходит в интерстициальную жидкость. Более сложен механизм обмена молекулярными веществами. Мембрана является хорошей преградой на пути диффузии полярных молекул и ионов. Плотный внутренний слой гидрофобных остатков мембранных липидов задерживает их достаточно эффективно, но диффузия ионов все же идет через небольшие поры в мембране или через участки с пронизывающими мембрану интегрированными белками. Более легко проходят через клеточную мембрану молекулы неполярных веществ, поскольку внешние гидрофильные фрагменты мембранных липидов не образуют плотного слоя. Непреодолима клеточная мембрана для любых крупных молекул. Внутренняя среда клетки — цитозоль — содержит много кислот с высокой молекулярной массой, из-за чего с внутренней стороны мембраны (если, конечно, ее целостность не нарушена) формируется отрицательный заряд, а с внешней стороны — положительный. Это является результатом пассивной диффузии катионов и небольших анионов, хотя определенный вклад в возникновение этой разницы потенциалов могут внести и белковые системы активного транспорта ионов, называемые чаще всего насосами, но общее название таких транспортных белков — *транслоказы*.

Переносящие ионы транслоказы предназначены для поддержания определенного водно-солевого баланса между клеткой и окружающей средой. В частности, у человека в норме концентрация ионов калия внутри клетки примерно в 40 раз выше, чем в интерстициальной жидкости, а концентрация ионов натрия в цитоплаз-

ме в 10 раз меньше, чем вне клетки. Поскольку транслоказы осуществляют активный транспорт веществ против градиента концентраций, для него нужен источник энергии. Чаще всего это энергия ангидридной связи в молекуле аденозинтрифосфата (АТФ). Так, например, Na^+, K^+ -насос (Na^+, K^+ -АТФаза) представляет собой комплекс белков, пронизывающих клеточную мембрану. В цитозоле специальный участок этого комплекса фосфорилируется аденозинтрифосфатом и связывается с тремя ионами натрия. Это вызывает структурную перестройку белков, в результате которой участок с ионами натрия оказывается на внешней стороне клеточной мембраны, где они обмениваются на два иона калия. Это приводит к новой структурной перестройке с перемещением участка белка с ионами калия на внутреннюю сторону мембраны. Здесь гидролитически отщепляется фосфатная группа, и ионы калия заменяются на ионы натрия. Следует новое фосфорилирование и описанная последовательность повторяется. Один цикл работы Na^+, K^+ -АТФазы описывается следующей схемой:



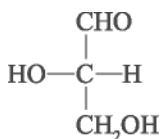
Первое превращение протекает в цитозоле, второе — в интерстициальной жидкости и третье — снова в цитозоле. На поддержание водно-солевого баланса в тканях тела человека может тратиться до 40% всего образующегося в организме АТФ. Работа Na^+, K^+ -АТФазы может быть заблокирована некоторыми соединениями стероидной природы, называемыми сердечными гликозидами. Они ингибируют гидролитическое отщепление остатка фосфорной кислоты от фосфорилированной Na^+, K^+ -АТФазы.

Аминокислоты, пептиды и белки

4.1. Аминокислоты

Все разнообразие веществ пептидной природы основано на 20 аминокислотах, называемых белковыми аминокислотами. Обязательным структурным элементом у них является атом углерода, к которому присоединена аминогруппа и карбоксильная группа, то есть они являются α -аминокислотами. У 19 аминокислот несущий аминогруппу и карбоксильную группу атом углерода замещен еще одним радикалом, из-за чего этот атом становится асимметрическим. Среди белковых аминокислот есть как левовращающие (гистидин, пролин, серин, треонин, фенилаланин), так и правовращающие (аланин, аргинин, глутаминовая кислота, изолейцин, лизин), но все белковые аминокислоты имеют одинаковую пространственную конфигурацию по этому асимметрическому атому углерода. Величина и знак удельного вращения используются в аналитических целях, но при изучении строения производных хиральных молекул гораздо важнее их абсолютная конфигурация.

При рассмотрении пространственной конфигурации углеводов стереоизомеры глицеринового альдегида были представлены в виде фишеровских плоскостных структур. Методом рентгеноструктурного анализа установлено, что у тетраэдрического sp^3 -гибридизованного атома углерода при левом расположении гидроксильной группы у левовращающего глицеринового альдегида

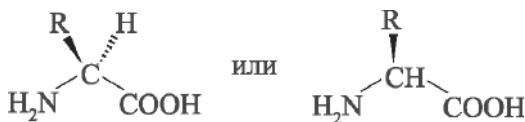


формильная группа и гидроксиметильная группа расположены за плоскостью, проходящей через асимметрический атом углерода, а атом водорода и гидроксильная группа направлены вперед:



От глицеринового альдегида можно без обращения конфигурации, окислив альдегидную группу до карбоксильной, восстановив гидроксиметильную группу до метильной и заменив гидроксигруппу на аминогруппу, перейти к простейшей аминокислоте с асимметрическим атомом углерода — аланину. При таком превращении оказывается, что выделяемый из белков аланин соответствует по конфигурации *L*-глицериновому альдегиду. То же самое получится и для 18 других оптически активных аминокислот. Две белковые аминокислоты — треонин и изолейцин — имеют еще один асимметрический атом углерода, но и здесь в живой природе встречается только один диастереомер, хотя обычный синтез приводит с равной вероятностью к образованию четырех изомеров, представляющих собой две пары диастереомеров.

В химии аминокислот более удобно изображать пространственное строение этих соединений, помещая в одну плоскость аминогруппу и карбоксильную группу. Тогда атом водорода у *L*-аминокислот будет расположен за этой плоскостью, а группа R перед ней:

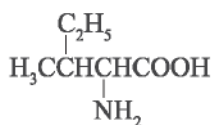
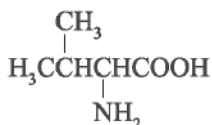
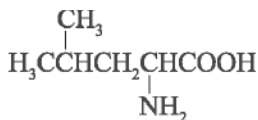
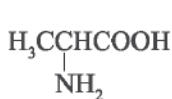


Существуют различные классификации белковых аминокислот по заместителям в радикале R, но проще всего различать аминокислоты с нейтральными, кислыми и основными группами в остатках, соединенных с атомом углерода, несущим аминогруппу и карбоксильную группу. К аминокислотам с нейтральными радикалами R относятся глицин (Гли, Gly, G), аланин (Ала, Ala, A), валин (Вал, Val, V), лейцин (Лей, Leu, L), изолейцин (Иле, Ile, I), метионин (Мет, Met, M), серин (Сер, Ser, S), треонин (Тре, Thr, T), цистеин (Цис, Cys, C), фенилаланин (Фен, Phe, F), тирозин (Тир, Tyr, Y), триптофан (Трп, Trp, W), аспарагин (Асп, Asn, N), глутамин (Глн, Gln, Q), пролин (Про, Pro, P). В некоторых классификациях перечисленные аминокислоты подразделяют на полярные и неполярные, но такое выделение неизбежно будет носить субъективный характер. Аминокислоты с карбоксильными группами в радикале R (кислые аминокислоты) — это аспарагиновая кислота (Асп, Asp, D) и глутаминовая кислота (Глу, Glu, E). И, наконец, аминокислоты с основными группами в радикале R — это гистидин (Гис, His, H), лизин (Лиз, Lys, K) и аргинин (Арг, Arg, R).

Обозначения аминокислот трехбуквенными символами используются для краткого изображения олигопептидов, а для полипептидов и белков даже такие символы оказались слишком длинными и сейчас чаще всего используют однобуквенные символы.

Названия аминокислот сложились исторически от греческих корней. Так, глицин, выделенный из продуктов гидролиза желатина, имеет сладкий вкус (гликос); лейцин (лейкос — белый) был выделен из мышечной ткани, тирозин (тирос — сыр) — из казеина, цистин — продукт окисления цистеина — из камней мочевого пузыря (кистос — пузырь) и т. д.

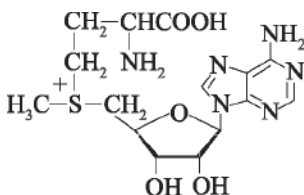
Понятно, что большие молекулы пептидов и белков могут сворачиваться в компактные образования, стабилизированные солевыми связями, водородными связями и гидрофобными взаимодействиями. Роль аминокислот с алифатическими неполярными группами сводится к образованию гидрофобных зон и гидрофобных «карманов» в молекулах белков. Слабые гидрофобные взаимодействия между алифатическими группами позволяют белковым молекулам с минимальным изменением энергии перестраивать третичные структуры в ответ на связывание функциональных групп на поверхности белковой молекулы с соответствующими субстратами или на изменение pH среды. Такие структурные перестройки лежат в основе функционирования рецепторных участков сенсорных клеток, транспортных белков, ферментов и вообще всех проявлений роли белков в живой природе. Аминокислоты *аланин* ($R = CH_3$), *валин* ($R = (CH_3)_2CH$), *лейцин* ($R = (CH_3)_2CHCH_2$) и *изолейцин* ($R = C_2H_5CH(CH_3)CH$)



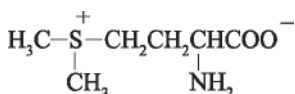
могут быть использованы организмом в качестве источника энергии, но в первую очередь — это основной материал для построения белков мышечной ткани.

Остаток *R метионина* ($R = CH_3SCH_2CH_2$) также может исполнять роль гидрофобного фрагмента. Так, например, есть две разли-

чающиеся только одной аминокислотой молекулы нейропептида энкефалина (пентапептид, участвующий в работе ЦНС) — Мет-энкефалин (Тир-Гли-Гли-Фен-Мет) и Лей-энкефалин (Тир-Гли-Гли-Фен-Лей), из чего следует, что остатки R метионина и лейцина при всем их химическом различии в этом случае играют всего лишь роль гидрофобного фрагмента. Кроме того, метионин входит в состав многих белков с каталитическими функциями. В частности, он служит донором метильных групп при биохимическом метилировании, например, аминогрупп. При этом промежуточным продуктом является S-аденозилметионин с сульфониевой группой:



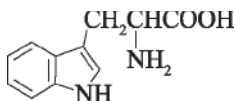
При взаимодействии с нуклеофильной молекулой S-аденозилметионин деметилируется и разлагается на аденозин и гомоцистеин (небелковая аминокислота, гомолог цистеина). В растениях S-аденозилметионин превращается в циклопропанаминокислоту, которая служит источником этилена, регулирующего процесс созревания плодов и листопада. Метилирование метионина по атому серы приводит к сульфониевому соединению:



которое может быть использовано в лечении язвы желудка (его даже называют витамин U от латинского названия язвы — ulcer). В общем случае метионин — это источник сернистых соединений для организма. Очень мало этой аминокислоты в белках сои, поэтому при составлении комбикормов на основе сои добавляют метионин. Метионин — это единственная аминокислота, для которой существует многотоннажное синтетическое производство. Кстати, у метионина нет необходимости в выделении *L*-изомера, поскольку его *D*-изомер нетоксичен.

Триптофан также может выполнять роль аминокислоты с гидрофобным остатком, но его роль в живой природе далеко выходит за эти рамки. Индольная гетероциклическая система триптофана

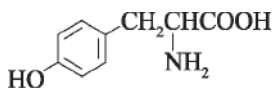
представляет собой донор электронов для образования комплексов с переносом заряда:



Кроме того, из триптофана образуется переносчик сигналов в ЦНС (нейромедиатор) серотонин и регулирующий сон гормон мелатонин. Экзогенный триптофан можно было бы использовать в качестве пищевой добавки со свойствами успокаивающего средства (транквилизатора), которое из-за его естественного характера, конечно, было бы безопаснее синтетических препаратов. На рынке лекарственных средств триптофан вытеснял обычные транквилизаторы, и фармацевтические фирмы развернули против него широкую кампанию, собрав статистику сомнительного характера о повышенной частоте заболеваний крови у тех, кто употреблял его. Тем не менее на основании этих данных американское Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами (Food and Drug Administration — FDA) запретила использование триптофана в качестве пищевой добавки, и этот запрет действует до сих пор, хотя позже было установлено, что выявленные противопоказания были связаны с употреблением триптофана, произведенного по упрощенной технологии одной японской компанией.

Ароматический цикл *фенилаланина* ($R = C_6H_5CH_2$) также представляет π -электроны для образования комплексов с переносом заряда, но в этом он уступает триптофану. Важно, что фенилаланин — это предшественник практически всех биогенных веществ с бензольным циклом. В растениях эта аминокислота служит источником многих окрашенных веществ — антоцианов, флаваноидов. Кроме того, из фенилаланина в клетках растений образуется лигнин — важная составляющая древесины. У животных из фенилаланина через тирозин образуются такие регуляторные вещества, как адреналин и дофамин, гормоны щитовидной железы и другие вещества, например, меланин, окрашивающий кожу и волосы.

В состав многих пептидов с регуляторной и нейромедиаторной активностью входит аминокислота *тирозин*:



Тирозин образуется при ферментативном окислении фенилаланина, поэтому все, что было сказано выше о фенилаланине, относится и к тирозину.

Амидные группы *аспарагина* ($R = H_2NCOCH_2$) и *глутамина* ($R = H_2NCOCH_2CH_2$) играют важную роль в образовании водородных связей в белковых молекулах. Кроме того, амидная группа свободного (то есть не включенного в белковую молекулу глутамина) участвует в детоксикации аммиака, образующегося при дезаминировании аминокислот.

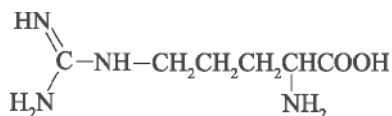
Очень важна гидроксильная группа *серина* ($R = CH_2OH$). В ферментах с гидролазной активностью она находится в каталитическом центре и принимает на себя ацильный остаток гидролизуемого амида или сложного эфира, а сам серин — это исходный продукт для образования глицина, который не только участвует в образовании белков, но и выполняет функцию нейромедиатора торможения в нейронах спинного мозга.

Участие в каталитических процессах гидроксильной группы *треонина* ($R = CH_3CHON$), входящего в состав белковой молекулы фермента, пока не подтверждено, поэтому ее роль, очевидно, заключается только в образовании водородных связей и в гидрофиллизации белка.

Аспарагиновая ($R = HOOCCH_2$) и *глутаминовая* ($R = HOOCCH_2CH_2$) кислоты имеют карбоксильные группы, которые не участвуют в образовании пептидных связей. Эти карбоксильные группы предоставляют белкам возможность образования солей с основными группами других фрагментов аминокислот, а также для связывания с основными группами субстратов в активных центрах ферментов. γ -Карбоксильная группа глутаминовой кислоты участвует в детоксикации эндогенного аммиака, превращаясь в амидную (глутаминовая кислота превращается в глутамин), кроме того, аминная функция глутаминовой кислоты также включена в процесс обмена аммиака через кетоглутаровую кислоту. Кроме того, глутаминовая кислота — это исходный продукт для образования γ -аминомасляной кислоты, выступающей в роли нейромедиатора торможения, а сама глутаминовая кислота — это нейромедиатор возбуждения в ЦНС: до 70% контактов между нейронами ЦНС обеспечиваются этой аминокислотой. Глутаминовая и аспарагиновая кислоты при дезаминировании превращаются в кетоглутаровую и, соответственно, щавелевоуксусную кислоту, которые

являются промежуточными продуктами в циклическом превращении лимонной кислоты (цикл Кребса), обеспечивающем энергетику аэробных клеток.

В составе белков *аргинин* предоставляет для образования солевых связей сильное органическое основание — гуанидиновую группу:

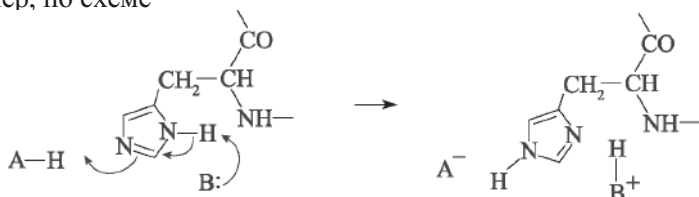


В свободном виде аргинин участвует в циклическом процессе, предназначенном для перевода образующегося в метаболических превращениях аминокислот токсичного аммиака в нетоксичную мочевины. Кроме того, гуанидиновая группа аргинина является единственным эндогенным источником монооксида азота. Исследования последних лет (в 1992 г. монооксиду азота присвоено звание Молекулы года) показали, что монооксид азота участвует в регуляции тонуса кровеносных сосудов (лекарства на основе нитроглицерина и других нитратов). Отмечен положительный эффект диеты с повышенным содержанием аргинина на иммунитет и на состав липопротеинов крови, которые переносят холестерин. Диета для снижения веса также должна содержать повышенные количества аргинина, иначе уменьшение объема жировой ткани будет сопровождаться деградацией мышечной ткани.

В образовании солевых связей в белках участвует еще одна аминокислота — *лизин* ($\text{R} = \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), но в некоторых ферментах ее аминогруппа служит для присоединения простетических групп, выполняющих каталитическую функцию. В качестве пищевой добавки лизин используется для профилактики остеопороза и катаракты. Диета с повышенным содержанием лизина позволяет преодолеть отрицательные воздействия стресса на мышечную ткань, а добавки лизина в количестве 1–3 г в день значительно облегчают течение герпесных инфекций. Лизин, как и метионин, производится в промышленном масштабе для введения в состав комбикормов (очень мало этой аминокислоты в составе белка зерен пшеницы глатина), но получают его микробиологическим путем.

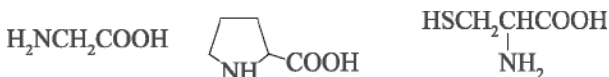
Аминокислота с самой слабой основной группой — *гистидин* — играет важную роль в функционировании ферментов. С участием

имидазольного фрагмента гистидина идет перенос протонов, например, по схеме



Гистидин относится к незаменимым аминокислотам, однако обычно недостаток в этой аминокислоте не ощущается, в полноценной белковой пище ее вполне достаточно.

К аминокислотам, которые выполняют особую роль в организации структуры белков, можно отнести *глицин*, *пролин* и *цистеин*:



У глицина отсутствует боковой радикал ($R = H$), и поэтому в белках он обычно играет роль вставки между аминокислотами с объемными радикалами. Что касается пролина, то его пятичленный пирролидиновый цикл имеет углы связей, отличающиеся от углов в молекулах с ациклическими sp^3 -гибридизованными атомами углерода. Поэтому остаток пролина в молекуле белка всегда находится в точке изгиба, поворота в ее вторичной структуре. Очень важна в организации третичной структуры белка роль цистеина. Тиольные группы двух фрагментов этой аминокислоты в составе белка легко окисляются с образованием дисульфидных связей (две молекулы цистеина, соединенные дисульфидной связью — это аминокислота *цистин*). Дисульфидные связи образуют поперечные сшивки между далеко отстоящими друг от друга фрагментами цистеина в пептидной цепи, фиксирующие ее в определенном положении. Этот эффект проще всего демонстрируется на химической завивке волос. Обработка белка волос кератина восстановителем (тиогликолевая кислота) приводит к разрыву дисульфидных связей, что позволяет белковым молекулам скользить относительно друг друга. Затем действие окислителя восстанавливает дисульфидные связи, но после смещения молекул эти мостики возникают уже в других точках, фиксируя новое положение этих молекул, то есть такая завивка обеспечивается новым положением химических связей.

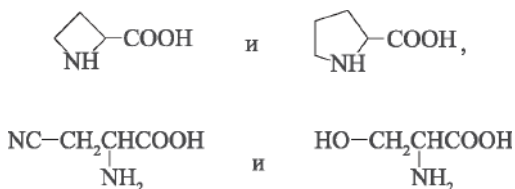
Очень важна лекарственная роль цистеина. N-Ацетилцистеин используется в качестве средства от кашля (препарат АСС), цистеином лечат колиты и потерю волос у женщин. В основе андрогенного облысения лежат мужские гормоны, а у женщин потеря волос чаще всего связана с недостатком серы в пище (диеты!). Однако гораздо важнее участие цистеина в образовании трипептида глутатиона (γ -Глу-Цис-Гли) — регулятора окислительно-восстановительных процессов, антиоксиданта и нейтрализатора попадающих в организм алкилаторов (здесь используется высокая нуклеофильность атома серы в тиольной группе). Недостаток глутатиона в организме приводит к возникновению злокачественных опухолей, к обострению сердечно-сосудистых заболеваний, диабету и артритам. Есть данные о применении глутатиона в терапии ВИЧ-инфекций. Очень важно, что N-ацетилцистеин повышает уровень глутатиона больше, чем прием более дорогого глутатиона. Одно из современных средств для лечения злокачественных новообразований — реканколат — представляет собой композицию из цистеина, глутатиона и антоциановых красителей (черника).

Цистеин является также исходным продуктом для образования небелковой аминокислоты *таурина* ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$), который регулирует транспорт субстратов через клеточные мембраны. Недостаток таурина вызывает болезни сердца, судорожные припадки и нарушения зрения.

Кроме приведенных двадцати аминокислот белки могут также содержать и некоторые другие аминокислоты. Так, например, в состав белка соединительной ткани коллагена входят 5-гидроксилизин и 4-гидроксипролин (в их образовании из лизина и пролина участвует аскорбиновая кислота). Одним из факторов свертывания крови является гликопротеин протромбин, содержащий γ -карбоксиглутаминовую кислоту. Необычные аминокислоты могут входить в состав пептидов: антибиотик — циклический декапептид грамицидин С — включает две молекулы орнитина (эта аминокислота образуется при гидролитическом отщеплении мочевины от аргинина) и две молекулы D-фенилаланина. В составе многих антибиотиков есть α -аминоизомасляная кислота. В состав витамина фолиевой кислоты входит 4-аминобензойная кислота, а другой витамин — пантотеновая кислота — содержит β -аланин ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$).

Многие небелковые аминокислоты (их известно около 300) токсичны. Чаще всего их токсичность основана на подобию их

структур структурам белковых аминокислот. Системы биосинтеза встраивают их в пептидную цепь вместо соответствующих белковых аминокислот, что приводит к образованию аномальных белков. Таковы, например, пары азетидин-2-карбоновая кислота и пролин, цианаланин и серин:



В организме человека отсутствуют биохимические системы, синтезирующие *аргинин, гистидин, валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан*. Эти аминокислоты обязательно должны поступать с пищей и их называют незаменимыми, то есть их недостаток не может покрываться другими белковыми аминокислотами. При поступлении в организм достаточного количества фенилаланина он может превращаться в тирозин и покрывать потребность и в этой аминокислоте, а цистеин можно относить к заменимым аминокислотам только в том случае, когда пища содержит избыточное количество метионина.

С учетом этого условия к заменимым аминокислотам относятся *аланин, аспарагиновая кислота, аспарагин, глутаминовая кислота, глутамин, цистеин, глицин, пролин, серин и тирозин*, которые могут образовываться в организме человека из других (незаменимых) аминокислот или из других продуктов метаболических превращений.

Недостаток аминокислот в пище и дефицит даже по одной незаменимой аминокислоте приводит к снижению уровня белков в крови, что сопровождается замедлением образования белков в организме. Интересно, что при этом перестают вырабатываться и пищеварительные ферменты (они ведь тоже имеют белковую природу) и тогда нарушается течение пищеварительных процессов, то есть недостаток аминокислот приводит к сокращению их поступления даже в тех случаях, когда они есть в пище, но в неполноценном составе или в дефиците. Недостаток цистеина, особенно на фоне алкогольной интоксикации, вызывает некроз печени, при недостаточном поступлении гистидина и триптофана развивается

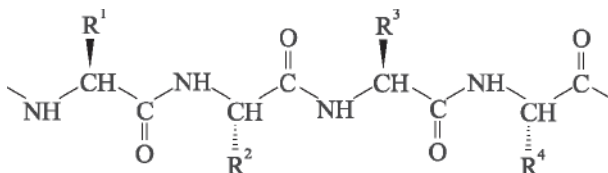
катаракта, а дефицит по лизину и метионину приводит к анемии. Отечные явления наблюдаются при недостатке треонина (человек «пухнет» от голода). При исключении белков из рациона организм человека начинает терять до 25 г аминокислот в день. Это означает, что замена белковых компонент организма новыми (разбор белков на запчасти) идет так, что остаются «лишние» детали. Дефицитной по отдельным аминокислотам может быть пища растительного происхождения (вегетарианская диета), тогда как белки животного происхождения обычно покрывают потребность в незаменимых аминокислотах, хотя в отдельных случаях, как отмечалось выше, их поступление в организм должно быть повышено.

Если в пище мало даже одной какой-либо незаменимой аминокислоты, то остальные аминокислоты не могут быть ассимилированы в полном объеме и тогда они идут на обеспечение энергетических потребностей или превращаются в жиры. При составлении комбикормов для скота это приводит к непроизводительному расходованию белковой компоненты. Стоит восполнить недостаток в корме несколькими граммами такой дефицитной аминокислоты, как привесы откармливаемого скота заметно возрастают.

Что касается питания человека, то здесь следует принимать во внимание, что наиболее чувствительны к дефициту незаменимых аминокислот дети (болезнь квашиоркор — от африканского языка суахили — является следствием недостатка белковой пищи у детей), но для нормального обмена веществ и взрослые должны получать с пищей немного менее 1 г белков с оптимальным составом аминокислот на 1 кг веса тела в день. Более всего близки к оптимальному составу аминокислот белки яиц и молока. В растительной пище и в соединительной ткани животных чаще всего отсутствуют триптофан, лизин и метионин. Так, например, в картофеле понижено содержание триптофана и метионина, и для покрытия дефицита по этим аминокислотам человеку весом около 70 кг пришлось бы съедать 6 кг картофеля в день. Очень богаты белками семена бобовых, но они дефицитны по лизину, а кукуруза содержит сравнительно много лизина и мало триптофана. Комбинирование бобов и кукурузной муки (индейское блюдо суккоташ) позволяет резко сократить общее потребление этих продуктов питания, поскольку аминокислотный состав комбинированной смеси более близок к идеальному, а энергетические потребности покрываются углеводными составляющими продукта.

4.2. Пептиды и белки

В пептидах и белках аминокислоты соединены пептидными связями, которые представляют собой амидные группы, образованные карбоксильными и аминными функциональными группами у асимметрического атома углерода. В соответствии с этим β -карбоксильная группа аспарагиновой кислоты и γ -карбоксильная группа глутаминовой кислоты, а равно и концевая аминогруппа лизина, в образовании пептидных связей не участвуют. Порядок расположения аминокислот в продукте их поликонденсации с образованием пептидных связей, их последовательность, представляет собой то, что называется *первичной структурой* белка или пептида



Если пептид содержит не более 20 аминокислот, то его обычно называют *олигопептидом*, затем идут *полипептиды*, а от 100 аминокислот начинаются белки. Правда, по некоторым классификациям считается, что полипептиды заканчиваются на 50 аминокислотных компонентах, при этом полагается, что промежуток между ними и белками не заслуживает внимания. В составе белка или пептида аминокислота со свободной α -аминогруппой называется N-концевой аминокислотой, а аминокислота со свободной α -карбоксильной группой — C-концевой аминокислотой. Существуют, конечно, и циклические пептиды, у которых концевые аминокислоты отсутствуют. Первичный порядок пептидов в одно- и трехбуквенном обозначении аминокислот всегда начинается с N-конца и заканчивается C-концом. Иногда это подчеркивается тем, что в формуле с трехбуквенным обозначением аминокислот показывают положение аминной и карбоксильной групп, например:



В реальных условиях пространственная организация пептидных и, тем более, белковых молекул не может быть линейной. Важную роль в образовании истинной структуры играют водородные связи, которые устанавливаются между атомами водорода NH-групп и атомами карбонильного кислорода в чередующихся

амидных связях. В простейшем случае белковая цепь закручивается в спираль, в которой на один виток приходится 3,6 пептидных фрагментов. Шаг такой спирали равен 0,54 нм, радикалы аминокислот R отходят от спирали, как ветви от ствола дерева. Однако такая пространственная организация, получившая обозначение α -спирали, не может быть образована пептидной цепью из любых аминокислот. У молекулы пролина, как уже отмечалось выше, иной угол связей у атома углерода несущего аминогруппу и карбоксильную группу, и это небольшое различие оказывается достаточно значимым для того, чтобы нарушить регулярность в чередовании пептидных фрагментов в спирали. На этой аминокислоте α -спираль всегда заканчивается и переходит в другую вторичную структуру. Не помещаются в спирали и расположенные рядом аминокислоты с объемными заместителями, а аминокислоты с основными и кислотными группами редко оказываются включенными в α -спирали из-за ионных взаимодействий.

Еще одна возможность стабилизации определенной пространственной структуры представлена образованием водородных связей между двумя линейными параллельными или антипараллельными пептидными цепями. Это так называемая *складчатая β -структура*. В ее состав также могут входить лишь пептидные участки, состоящие из сравнительно простых аминокислот, например аланина, глицина, пролина. В соответствии с принятой классификацией структур белковых молекул α -спирали, β -структуры и иррегулярные участки представляют собой *вторичную структуру* белка, а сочетание элементов вторичной структуры в белковой молекуле с участием дисульфидных связей пар цистеиновых фрагментов образуют целостную пространственную *третичную структуру* белка.

Первым белком, на кристалле которого с помощью рентгеноструктурного анализа была установлена третичная структура, стал *миоглобин*. Его молекула представляет собой комплекс белка и небелковой гемовой молекулы. Биологическая роль миоглобина заключается в транспорте кислорода внутри клетки к митохондриям и в создании запаса кислорода внутри клетки для восполнения его недостатка в критических ситуациях. Гемовые составляющие присутствуют во многих белках с каталитическими и транспортными функциями. Атом железа, находящийся в центре порфириновой гетероциклической системы гема, может связывать молекулу кислорода или же переносить электроны, меняя валентность от +2 до +3 и обратно. В гемоглобинах, предназначенных для переноса кислорода, у атома двухвалентного железа с координационным чис-

лом, равным шести, пять координаций заняты атомами азота: четыре — из порфиринового цикла, пятая в перпендикулярном к плоскости молекулы гема направлении занята атомом азота из имидазольного фрагмента гистидина, входящего в пептидную цепочку белковой компоненты гемоглобина. Шестая координация служит для связывания кислорода. Это положение может занимать и другими молекулами, так, например, монооксид углерода связывается гемом в гемоглобине в 200–250 раз прочнее, чем кислород.

Расшифровка структуры миоглобина проводилась в несколько этапов. Миоглобин был получен в виде монокристалла и на рентгенограмме низкого разрешения было сначала установлено пространственное расположение полипептидной цепи без учета отходящих от нее радикалов R. Затем в результате съемки с более высокой разрешающей способностью была получена рентгенограмма, позволившая установить положение тяжелых атомов, входящих в состав этих радикалов.

Оказалось, что в миоглобине около 80% всех аминокислотных остатков (всего их 159) включено в восемь почти прямолинейных α -спиралей, из которых самая длинная включает 23 аминокислоты, а самая короткая — 7. Все четыре входящих в состав этого белка молекулы пролина образуют изгиб полипептидной цепи. Все полярные функциональные группы, кроме двух, расположены на наружной поверхности белковой глобулы, а большая часть гидрофобных групп — внутри ее. Молекула миоглобина настолько компактна, что во внутренней сфере могут поместиться всего лишь четыре молекулы воды. Из различных организмов было выделено несколько разновидностей миоглобина, но образуемые ими глобулы очень близки по форме. Оказалось также, что в некоторых ключевых точках полипептидных цепей разных миоглобинов находятся одинаковые аминокислотные последовательности. Такие аминокислоты называют *инвариантными*.

Третичная структура миоглобина, составленная почти исключительно α -спиралями, определена его ролью переносчика кислорода. Такая жесткая структура мало приспособлена для многообразных конформационных переходов. В соответствии с этим в молекулах ферментов на долю α -спиралей приходится обычно не более 40% аминокислотных составляющих, но именно α -спирали образуют каталитические центры ферментов и предназначенные для связывания с другими молекулами участки рецепторных и регуляторных белков.

Миоглобин и еще один белок с гемовой составляющей — *цитохром с* — не содержат складчатых β -структур, но эти элементы третичной структуры белков обязательны для подавляющего большин-

ства ферментов. В качестве примера можно привести защитный белок с гидролазной активностью лизоцим (от греч. *lysis* — разрыв, растворение). Он содержится в яичном белке, в слезах и в слюне, а его антимикробная активность основана на расщеплении олигосахаридных фрагментов, соединенных со структурными элементами мембран многих бактерий. В β -структуры лизоцима включено 12% аминокислотных фрагментов, в α -спирали — 40%, а остальные образуют различные изгибы и иррегулярные участки. Активный центр лизоцима составлен только α -спиралями.

Еще один фермент *рибонуклеаза* предназначен для гидролитического расщепления рибонуклеиновых кислот. Рибонуклеаза секретируется клетками поджелудочной железы в двенадцатиперстную кишку и поступает в тонкий кишечник. Молекула рибонуклеазы состоит из 124 аминокислот, из которых 26% входят в состав участков, образующих α -спирали, а 35% находятся в β -структурах. Нативная конфигурация рибонуклеазы поддерживается четырьмя дисульфидными мостиками. Организация третичной структуры белка происходит в процессе его последовательного биосинтеза из аминокислот, а нарушение нативной структуры нагреванием или высокими значениями pH чаще всего приводит к необратимой потере ферментативной активности. Этот процесс называется *денатурацией*. Однако многие белки с небольшой молекулярной массой в определенных условиях могут подвергаться обратимой денатурации. К таким белкам относится и рибонуклеаза.

При обработке рибонуклеазы концентрированным раствором мочевины (разрыв водородных связей между пептидными функциональными группами) и меркаптоэтанола (разрыв дисульфидных связей) белковая цепь рибонуклеазы разворачивается и теряет каталитическую активность, поскольку в этом случае пространственная организация активного центра оказывается полностью нарушенной. Если денатурированную таким мягким способом рибонуклеазу подвергнуть диализу, то есть с помощью полупроницаемой мембраны отмыть от нее мочевины и избыток меркаптоэтанола, то она почти полностью (на 95%) восстановит каталитическую активность, а через некоторое время в процессе окисления кислородом воздуха восстановятся дисульфидные мостики и структура белка стабилизируется. После этого рибонуклеаза станет гораздо более устойчивой к внешним воздействиям, чем без этих жестких сшивок, поддерживающих оптимальную третичную структуру.

Интересно, что простой вероятностный перебор вариантов самоорганизации белка из 100 пептидных фрагментов для получе-

ния конфигурации с минимумом энергии занял бы 10^{50} лет. Очевидно, правильная укладка небольшого участка полипептидной цепи значительно упрощает организацию расположенных рядом участков, и чем больший участок белковой молекулы принял оптимальную структуру, тем скорее в этот процесс вовлекаются остальные участки. Простота такой самоорганизации денатурированного щадящими способами белка может быть связана и с тем, что в нем сохраняются определенные критические структурные элементы, вокруг которых затем и идет ренатурация.

В связи с этим понятно, что расшифровка генетического кода пока не может быть эффективно использована для получения белков с правильной третичной структурой. Здесь можно вспомнить, что ДНК кроме значащих участков содержит так называемые *интроны*, вычленив которые на основании формальных признаков без ошибок не так просто. Если это все же удастся, то самопроизвольное сворачивание синтезированной в соответствии с кодонами ДНК белковой молекулы в требуемую для правильного функционирования белка пространственную структуру (фолдинг) еще менее вероятно.

По строению белки разделяются на две основные группы — *фибриллярные* (нитевидные) и *глобулярные* (овальной или округлой формы).

По биологической функции можно выделить следующие группы белков:

- ферменты;
- транспортные белки (гемоглобин, сывороточный альбумин, липопротеины);
- пищевые или запасные белки (глиадин из зерен пшеницы, яичный альбумин, казеин);
- сократительные и двигательные белки (актин, миозин, тубулин);
- структурные белки (коллаген, эластин, кератин, фиброин);
- защитные белки (антитела, тромбин, токсины, например, токсин ботулизма, рицин, яды змей и паукообразных);
- регуляторные белки (инсулин, кортикотропин, репрессоры и др.).

Белковые молекулы в биологических объектах всегда находятся в состоянии сборки и разборки, что объясняет присутствие в клетках как свободных аминокислот, так и очень большого числа пептидных молекул различного размера в разных концентрациях. Так, например, в клетках можно с помощью экстракции и хрома-

тографии обнаружить около 100 пептидов с концентрацией, превышающей 100 пмоль/г, с концентрацией от 10 до 100 пмоль/г их уже около 1000 и еще на порядок возрастает число пептидов, содержание которых не превышает 1 пмоль/г. Понятно, что состав пептидов в значительной мере зависит от способов их выделения.

Многие аминокислоты выполняют определенные метаболические и регуляторные функции, и поэтому их роль не ограничивается только участием в биосинтезе белков в качестве их структурных элементов.

Постоянно расширяются знания о регуляторной роли пептидов. Многие из них играют роль гормонов. Сравнительно простое соединение — глутатион, представляющий собой ацилированный γ -карбоксильной группой глутаминовой кислоты цистеинилглицин, защищает все живые клетки от алкилаторов, окислителей и свободных радикалов. Пентапептид энкефалин Тир–Гли–Гли–Фен–Мет выполняет функцию нейромедиатора в нервной системе человека, то есть это вещество участвует в межнейрональных взаимодействиях. Из мозга быка выделен дипептид киоторфин с аналогичной ролью (Тир–Арг), а у насекомых нейромедиатором является пентапептид проктолин Арг–Тир–Лей–Про–Тре.

Проявляют биологическую активность и некоторые пептиды, образующиеся при неполном ферментативном гидролизе белков и полипептидов. Так, например, сравнительно устойчивы к действию пищеварительных ферментов продукты протеолиза казеина β -казоморфины Тир–Про–Фен–Про–Гли–Про–Иле (из молока коровы) или Тир–Про–Фен–Вал–Глу–Про–Иле (из материнского молока).

Эти вещества могут поступать в кровь из пищеварительной системы, особенно легко они всасываются стенками кишечника детей. Казоморфины оказывают мягкое снотворное и успокаивающее действие, являясь аналогами (агонистами) нейромедиатора энкефалина.

При гидролизе адренокортикотропного гормона (АКТГ), состоящего из 39 аминокислот, образуется тетрапептид Мет–Глу–Гис–Фен, стимулирующий высшую нервную деятельность. Многие продукты неполного протеолиза белков являются иммуномодуляторами, например, тафцин Тре–Лиз–Про–Арг. Этот тетрапептид также улучшает познавательные функции ЦНС.

Пептидами являются также некоторые антибиотики.

Ферменты

Вещества белковой природы, катализирующие химические превращения в живых клетках, называют *ферментами* или *энзимами*. Эти понятия имеют не просто лингвистическое расхождение. На начальном этапе развития биохимии в 50-е гг. XIX в. шел спор между Л. Пастером с одной стороны и П. Бертло и Ю. Либихом с другой. Пастер был убежден в том, что процесс брожения неотделим от дрожжевых клеток и осуществляющие это превращение катализаторы — организованные ферменты (от лат. *fermentum* — закваска) — от клеток неотделимы. Бертло и Либих оперировали понятием энзим (от греч. *en* — в, *zyme* — закваска, то есть то, что в закваске), относя его к секретируемым клетками катализаторам пищеварительных процессов: пепсину, трипсину, амилазе и др. Позиция Пастера основывалась на том, что он проводил стерилизацию клеточных культур нагреванием, при котором шла и денатурация ферментов, а Бертло и Либих работали с ферментами из пищеварительных соков, не проводя их термическую обработку. В соответствии с этим биокатализаторы вне продуцирующей их клетки принято называть энзимами. Это означает, что биокатализаторы в составе стирального порошка, в названии которого есть приставка «био», или в таблетке фестала можно называть энзимами, в то же время в биохимии, рассматривающей обменные процессы в клетках, говорят обычно о ферментах, хотя относящийся к ферментам раздел биохимии называют энзимологией для того, чтобы понятие было составлено из слов только одного языка (в данном случае греческого).

Работу ферментов выбрал для иллюстрации особенности биохимических процессов известный биохимик А. Сент-Дьерди. Во введении к своей книге по биохимии он напомнил, что в гробнице Тутанхамона несколько тысяч лет пролежала высохшая трапеза фараона, оставленная ему для загробной жизни. Будучи съеденной, она превратилась бы в диоксид углерода, воду и другие продукты метаболизма в считанные часы.

Надо сказать, что начало биохимии в нашем сегодняшнем понимании было положено работами Э. Бухнера (1898 г.), показав-

шего, что после длительного перемешивания дрожжевых клеток с инфузорной землей происходит их разрушение, но полученный бесклеточный сок некоторое время сохраняет способность к сбраживанию глюкозы. На самом деле аналогичные опыты ставились намного раньше, например, за 25 лет до публикации Бухнера появилась статья на эту тему М. Манасеиной (Коркуновой) на русском и немецком языках; были и более ранние сообщения.

Что же отличает ферменты как катализаторы? В общем можно выделить три особенности этих катализаторов:

1. Высокая эффективность. Под этим подразумевается, что реакции, которые в обычных условиях идут очень медленно или вообще не идут, в присутствии ферментов протекают с очень высокой скоростью. (Правда, скорость при этом понятие относительное. Если одна молекула пепсина вызывает расщепление примерно десяти пептидных связей в секунду, то молекула каталазы, разлагающая пероксид водорода на воду и кислород, осуществляет десятки тысяч превращений в секунду.)
2. Ферменты высокоспецифичны по типу реакций, то есть каждый фермент катализирует только одну реакцию, например, глютаминовая кислота в присутствии соответствующей декарбоксилазы превращается в γ -аминомасляную кислоту, а в присутствии фермента, относящегося к трансаминазам, из нее образуется кетоглутаровая кислота.
3. Ферменты чаще всего специфичны, избирательны по субстрату. Например, превращение гидроксильной группы в карбонильную осуществляют ферменты, относящиеся к дегидрогеназам, но этанол превращается в ацетальдегид алкогольдегидрогеназой, а молочная кислота в пировиноградную — лактатдегидрогеназой. Хотя, конечно, есть и ферменты с невысокой избирательностью, например, пищеварительные.

Из этого следует, что ферментов, осуществляющих все многообразие метаболических превращений, должно быть очень много. В 1930 г. было известно всего лишь 80 ферментов, а в 1994 г. уже около 3200. Долгое время безуспешно искали ферменты не только среди белков, но и среди других классов биополимеров и лишь в последние годы было показано, что превращения определенных субстратов могут катализировать и некоторые рибонуклеиновые кислоты, названные рибозимами.

Ферменты, выделенные и охарактеризованные на ранней стадии развития биохимии, получали имена собственные (трипсин, пепсин, тромбин), затем названия ферментов стали образовывать по названию субстратов с окончанием *-аза* (аргинин → аргиназа, аспарагин → аспарагиназа, мочеви́на → уреаза и т. д.). Сейчас название субстрата чаще всего дополняют типом осуществляемого ферментом химического превращения (лактатдегидрогеназа, холинэстераза, супероксиддисмутаза). Обилие таких названий может напугать приступающего к изучению биохимии, но этот испуг легко преодолим, так как, в конце концов, даже специалисты имеют обычно дело с ограниченным числом биохимических превращений. Если выделять из биохимии раздел энзимологии, то такая путаница в названиях становится слишком обременительной, и поэтому была принята цифровая классификация ферментов, включающая четыре группы цифр: класс, подкласс, подподкласс и номер фермента в подподклассе. Исторически выделилось шесть классов ферментов.

Первый класс представляют *оксидоредуктазы*. В их число входят, например, дегидрогеназы, то есть ферменты, катализирующие дегидрирование спиртовых групп до карбонильных групп, окисление карбонильных групп до карбоксильных, дегидрирование с образованием этиленовых соединений, дегидрирование групп $\text{CH}-\text{NH}_2$, приводящее к образованию иминов ($\text{C}=\text{NH}$), и т. д. Реакции дегидрирования протекают по схеме:



Чаще всего в роли акцепторов водорода выступают небелковые молекулы (коферменты), входящие в состав дегидрогеназ. Если атомы водорода или электроны непосредственно переносятся на кислород, то такие ферменты относятся к подклассу оксигеназ.

Второй класс представляют *трансферазы* — это ферменты, катализирующие перенос многоатомных групп с одной молекулы на другую. В их число входят, например, ферменты, переносящие фосфатные остатки с аденозинтрифосфата на молекулы сахаров (фосфофруктокиназа), ферменты, переносящие одноуглеродные фрагменты (фолатзависимые ферменты). К трансферазам относятся также трансаминазы, обменивающие аминокруппы на карбонильные функциональные группы.

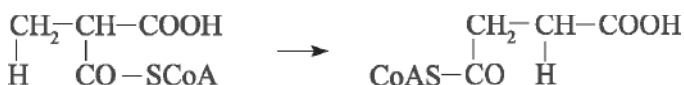
Ферменты третьего класса — это *гидролазы*. Они катализируют перенос двух фрагментов расщепляемой молекулы на молекулу

воды, то есть реакцию гидролиза. Если они гидролизуют пептидные связи в белках, то это протеазы или пептидазы. Отщепление С-концевой аминокислоты катализируют карбопептидазы, а N-концевой — аминопептидазы. Гидролитическое расщепление нуклеиновых кислот идет в присутствии нуклеаз (ДНКазы, РНКазы).

Четвертый класс ферментов — это *лиазы*. Они катализируют расщепление субстрата с образованием кратной связи или в обратном направлении — присоединение по кратной связи (в этом варианте обратной реакции их называют обычно синтазами). В качестве примера можно привести карбоангидразу, катализирующую реакцию образования бикарбоната из диоксида углерода и воды:



К пятому классу относятся *изомеразы*. Уже их название характеризует тип катализируемых этими ферментами превращений. Можно только добавить, что наряду с простой изомеризацией, связанной, например, с переносом ацильной (фосфорильной) группы с одной гидроксильной группы на другую, изомеразы катализируют и более сложные реакции. Например, к ним относятся рацемазы и эпимеразы (если речь идет об образовании другого диастереоизомера), а кобаламинзависимые изомеразы по радикальному механизму катализируют и перестройку углеродного скелета молекул. С их участием, например, метилмалоновая кислота в виде ее тиоэфира с коферментом А превращается в сукцинил-кофермент А:



Шестой класс ферментов — это *лигазы* (синтетазы). Главная особенность этих ферментов состоит в том, что энергию, требуемую для протекания катализируемых ими превращений, поставляют так называемые макроэргические вещества, главным из которых является АТФ. Примером катализируемых лигазами реакций служит образование С–N-, С–S- и С–С-связей (например, пептидных связей, тиоэфиров).

Набор функциональных групп в белковых аминокислотах невелик, и с их помощью белковая молекула не может обеспечить катализ всех необходимых для протекания метаболических процессов реакций. Вследствие этого во многих случаях к работе ферментов подключаются вещества небелковой природы, которые

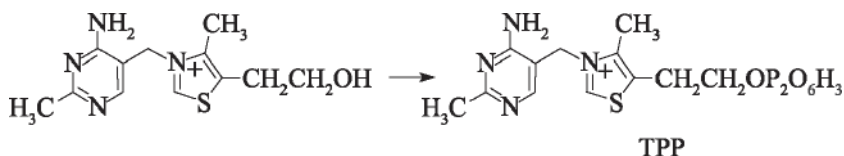
могут быть связаны с белковой молекулой ковалентными связями, ионными связями или же они могут образовывать более или менее прочные комплексы с белковой частью фермента, которую называют *апоферментом*. Если небелковая составляющая фермента связана с белком ковалентной связью, то ее называют *простетической группой*, а связанную с апоферментом водородными связями, ионными, ван-дер-ваальсовыми или гидрофобными взаимодействиями небелковую компоненту называют коферментом (в последнее время входит в употребление термин *косубстрат*, то есть дополнительный, вспомогательный субстрат). Обладающий каталитической активностью комплекс кофермента и апофермента, если это надо подчеркнуть, называют *холоферментом*. Коферменты или простетические группы отвечают за химизм катализируемого превращения. Образование холофермента стабилизирует апофермент, поскольку при этом реализуется наиболее выгодная в энергетическом отношении структура. Но белковая компонента не только определяет специфичность фермента по субстрату, обеспечивает связывание с субстратом и отход от каталитического центра продуктов реакции. В отдельных случаях, как отмечалось выше, она определяет и химизм катализируемой реакции. Кроме коферментов или простетических групп в состав ферментов могут входить и *кофакторы* — чаще всего это ионы металлов, известные нам как микроэлементы.

Существуют также ферменты, каталитический центр которых составлен только функциональными группами аминокислот, но и они чаще всего наиболее активны при наличии в их структуре кофакторов. Так, например, в каталитическом центре сериновых гидролаз находится ион цинка.

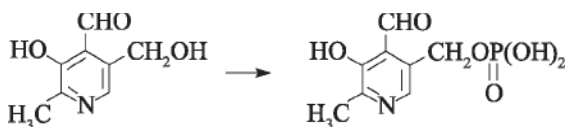
Особую роль в метаболических процессах играют аллостерические ферменты, молекулы которых, кроме каталитических центров, имеют еще и регуляторные участки. В результате связывания с ними веществ, называемых *эффекторами*, активность фермента может возрастать (положительный эффектор) или снижаться (отрицательный). Аллостерические ферменты отличаются более сложным строением и более высокой молекулярной массой.

Строение многих коферментов и простетических групп было установлено еще в 1930-е гг. Оказалось, что чаще всего они образуются в результате более или менее сложных биохимических превращений витаминов. Так, например, витамин В₁ (или тиамин), входит в состав лиаз, декарбоксилирующих α -кетокислоты (пируватдекарбоксилаза, пируватдегидрогеназа, кетоглутаратдегидро-

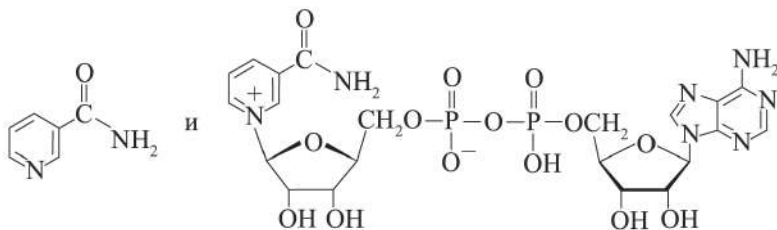
геназа), в виде эфира с пиродифосфорной кислотой — тиаминпиродифосфата (ТПП):



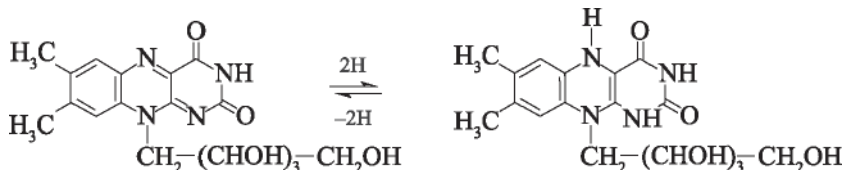
Кофермент пиридоксальфосфат, принимающий участие в реакциях переаминирования (трансминазы) и декарбоксилирования аминокислот (лиазы), образуется в результате монофосфорилирования витамина В₆ — пиридоксала:



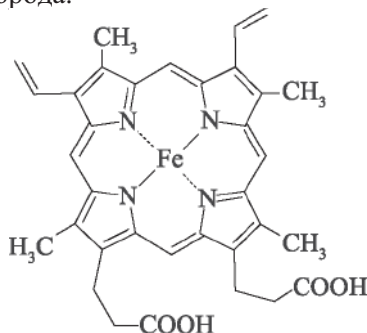
Более сложная цепочка превращений идет от никотинамида (витамина В₃) к коферменту реакций гидрирования-дегидрирования — никотинамидадениндинуклеотиду NAD⁺ (никотинамид и никотиновую кислоту сейчас принято называть ниацином):



Еще одна группа ферментов, принимающих участие в реакциях гидрирования-дегидрирования, представлена флавопротеинами (FMN и FAD, флавиномононуклеотид и флавинадениндинуклеотид), у которых донором-акцептором атомов водорода является рибофлавиновый структурный элемент, поступающий в организм в виде витамина В₂. Его окислительно-восстановительное превращение протекает по схеме:



Важную роль в биологических системах играют цитохромы (от греч. *kytos* (цитос) — вмещающее, клетка; *chroma* (хрома) — цвет, окрашивание). В их состав входят железопорфирины, которые представлены макроциклами из четырех связанных метиновыми мостиками пиррольных колец с атомом железа в центре. В качестве примера приведем структуру гема — железопорфирина, входящего в состав гемоглобина и предназначенного для переноса молекулярного кислорода.

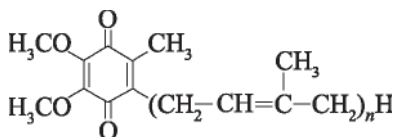


Гем соединен с белковыми молекулами тиозфирными связями, образовавшимися в результате присоединения сульфгидрильных групп из остатков цистеина по винильным группам гема.

Содержащие гемовые структуры цитохромы оксидоредуктаз, окрашенные в цвета от красного до коричневого, участвуют в переносе электронов ($\text{Fe}^{+2} \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{e}^-$), например, когда образовавшиеся в реакциях дегидрирования атомы водорода отдают соответствующим акцепторам свои электроны и превращаются в протоны. Цитохромы обозначают буквами латинского алфавита с цифровыми индексами (**a**, **a**₃, **b**, **c**₁, **c**, **f**₆), всего их известно более двадцати. В частности в цитохроме **c** феррипорфириновый фрагмент в отличие от гема вместо остатков пропионовой кислоты содержит пропильные группы. Цитохромы участвуют также в реакциях окислительного гидроксирования органических соединений, а пара цитохромоксидаз **a** и **a**₃ переносит четыре электрона на молекулу кислорода (аэробные процессы).

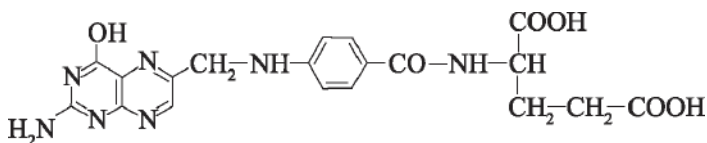
В некоторых учебниках по биохимии в качестве универсального кофермента реакций гидрирования-дегидрирования рассматривается также **убихинон** (от лат. *ubi* — везде, то естьездесущий хинон). На самом деле существует несколько соединений этого класса с алкенильными заместителями на основе олигомеров

изопрена различной длины (их иногда называют витаминами Q), например:

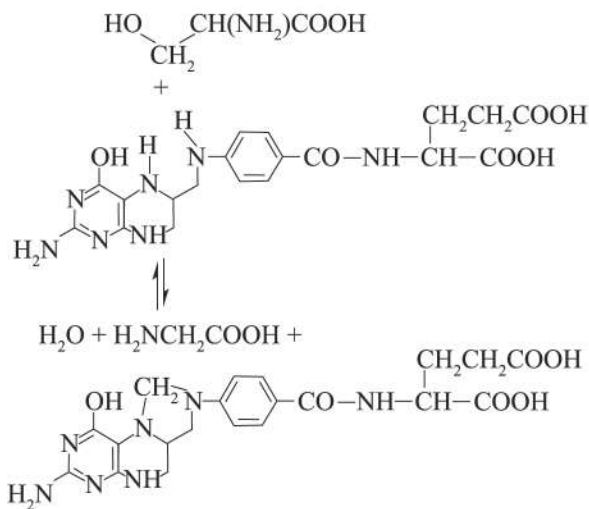


В частности, из печени млекопитающих выделен убихинон с $n = 10$, однако это соединение с гидрофобным разветвленным алкильным остатком из 50 атомов углерода не предназначено для связывания с белками и поэтому не может претендовать на роль истинного кофермента. Убихинон входит в состав пигментов электронпереносящей цепи в мембранах митохондрий. Аналогичный по строению хинон переносит электроны в мембранах хлоропластов в клетках растений при фотосинтезе.

Фолиевая кислота (витамин B₉)



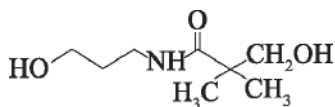
после ее превращения в тетрагидрофолиевую кислоту участвует в работе ферментов, переносящих одноуглеродные фрагменты. Так, например, с участием фолатзависимого фермента серин превращается в глицин:



В работе ацилтрансфераз принимает участие кофермент А, обозначаемый CoA-SH. В этом соединении 3'-фосфоаденозиндифосфат соединен его пиррофосфатным фрагментом с 2-меркаптоэтил-амидом пантотеновой кислоты, которая является обязательным фактором питания (витамин B₅):



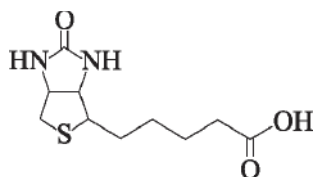
3-Гидроксипропиламид 2,4-дигидрокси-3,3-диметилмасляной кислоты (пантотеновой кислоты) используют для лечения ран и других поражений кожных покровов под торговым названием пантенол:



В этом соединении 3-гидроксиэтиламидный остаток окисляется и превращается в остаток β-аланина, то есть пантенол — это провитамин B₅.

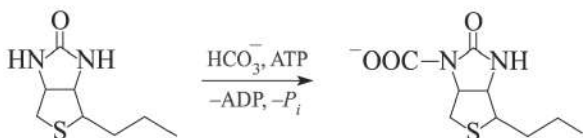
С участием АТФ или в результате обменной реакции с другим тиоэфиром кофермент А ацилируется по сульфгидрильной группе с образованием тиоэфира, например ацетилкофермента А (CoA-S-COCH₃), и снова может переносить ацильные группы на другие молекулы по различным механизмам.

Биотин, или витамин Н,

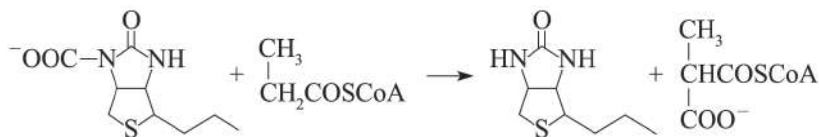


выполняет роль простетической группы у карбоксилаз, относящихся к лиазам. Витамин Н достаточно стабилен и авитаминоз по нему встречается только у людей, которые едят много сырых яиц,

так как яйца содержат белок, который связывает биотин в прочный комплекс. Биотин присоединен к белковой составляющей фермента путем образования амидной связи между карбоксильной группой биотина и концевой аминогруппой лизинового фрагмента в молекуле белка. Это связано с тем, что мочевиный участок бициклической системы простетической группы должен с минимальной структурной перестройкой перемещаться на таком поводке из десяти атомов из одного активного центра фермента в другой, так как механизм его действия основан на двух реакциях. Сначала протекает реакция карбоксилирования бикарбонатом с участием АТФ:



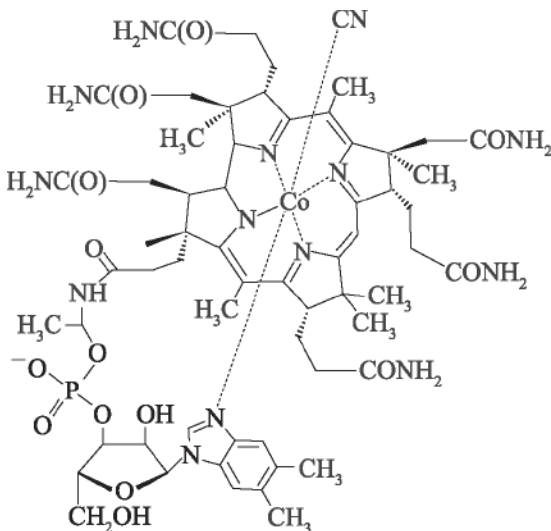
После этого уже в другом участке фермента карбоксильная группа переносится на другую молекулу. Например, так из пропионил-кофермента А образуется метилмалонил-СoА:



Одним из наиболее изучаемых витаминов является витамин С — аскорбиновая кислота, однако ее роль в функционировании ферментов до сих пор не установлена во всех ее проявлениях. Предполагается, что аскорбиновая кислота участвует в образовании входящих в состав коллагена (белок соединительной ткани) 4-гидроксипролина и 5-гидроксилизина, и поэтому ее присутствие важно для заживления ран. Не исключено и участие аскорбиновой кислоты в ассимиляции неорганического железа.

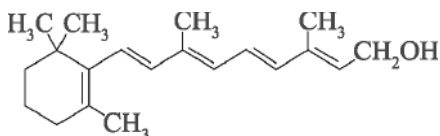
Сложное строение отличает группу веществ, относящихся к витаминам В₁₂. Чаще всего витамин В₁₂ представлен кобальторганическим соединением, известным под названием *цианкобаламин*, раствор которого в воде окрашен в пурпурный цвет. Он выполняет роль кофермента изомераз, функционирующих по радикальному механизму. Источниками кобаламина являются бактерии, в частности бактериальная флора пищеварительного тракта; в растениях

витамин В₁₂ отсутствует. В этом соединении атом кобальта встроен в систему из четырех гидрированных пиррольных колец на основе порфиринов:



Наиболее ярко авитаминоз по В₁₂ проявляется в нарушении процесса кроветворения.

Из других обязательных факторов питания можно назвать витамин А, или ретинол:



В организме витамин А выполняет несколько функций. Наиболее известна его роль в зрительном процессе, где он в виде ретиналя, образующегося при дегидрировании ретинола, участвует в образовании реагирующего на свет пигмента родопсина. Но дефицит по витамину А не ограничивается только «куриной слепотой», это всего лишь первый симптом авитаминоза по этому веществу. При недостаточности витамина А появляется сухость кожи, глаз (ксерофтальмия), задержка развития и роста, стерильность самцов. Но и гипervитаминоз опасен, особенно для беременных женщин.

активный неорганический катализатор — коллоидная платина — снижает ее до 11700 кал/моль, а фермент каталаза обеспечивает снижение энергии активации до менее 2000 кал/моль. Этиловый эфир масляной кислоты гидролизует в присутствии кислот с энергией активации (E_A) 16800 кал/моль, щелочи снижают значение E_A до 10200 кал/моль, а панкреатическая липаза (пищеварительный фермент, секретируемый поджелудочной железой) характеризуется энергией активации по этому субстрату, равной 4500 кал/моль. Очень медленно гидролизует водой сахара, в присутствии кислот этот процесс ускоряется ($E_A = 25600$ кал/моль), а дрожжевая инвертаза снижает этот показатель реакции до 8000–10000 кал/моль. В абсолютных величинах это различие выглядит не очень серьезным, но энергия активации в уравнении Аррениуса входит в экспоненциальный множитель

$$k = D \exp(-E/(RT)),$$

и тогда константа скорости ферментативной реакции (k_e) в логарифмическом виде представляется уравнением ($E_A = 8000$ кал/моль)

$$\lg k_e = \frac{B_e}{2,3} - \frac{8000}{2,3RT},$$

а константа скорости реакции, катализируемой протонами (k_h), уравнением ($E_A = 25600$ кал/моль)

$$\lg k_h = \frac{B_h}{2,3} - \frac{25600}{2,3RT}.$$

Постоянные реакций B_e и B_h примерно равны, и тогда для температуры 37 °С получаем

$$\lg \frac{k_e}{k_h} = \frac{25600 - 8000}{2,3 \cdot 1,98 \cdot 310} = \frac{17600}{1415} = 12,4,$$

что соответствует отношению $k_e/k_h = 2,5 \cdot 10^{12}$ (двенадцать порядков!).

В чем же заключается уникальная избирательность и высокая каталитическая активность ферментов? Прежде всего — в особенности пространственного строения белковой молекулы, лежащего в основе этих катализаторов. Форма глобулярного белка во многом определяется гидрофобными взаимодействиями между структурными элементами входящих в его состав аминокислот. Эти взаимо-

действия слабы, но когда их много — они дают достаточно значимый выигрыш в энергии. Гидрофобные структурные элементы заполняют внутреннюю среду белковой глобулы, однако слабость каждого отдельного взаимодействия позволяет белку в ответ на воздействие на внешнюю сферу (в результате изменения pH или присоединения другой молекулы) легко перестраиваться, принимая новую форму и меняя местами различные функциональные группы боковых цепей аминокислотных фрагментов. Еще Фишер выдвинул гипотезу о взаимодействии субстрата с активным центром фермента по принципу «ключ-замок». Очень часто и сейчас используют это представление для схематической иллюстрации ферментативного катализа. Однако этот подход слишком упрощен, он не отражает того, что в ответ на связывание с субстратом происходит перестройка белковой молекулы фермента, и тогда образуемому комплексу субстрата с ферментом соответствует минимум энергии уже при ином расположении составляющих фермент структурных элементов, а по мере протекания ферментативной реакции такие перестройки белковой молекулы могут происходить неоднократно до отхода продукта реакции от реакционного центра.

В разделе, посвященном строению белков, уже были представлены данные по третичной структуре миоглобина, рибонуклеазы и лизоцима. Активный центр лизоцима представлен только α -спиралями. Расстояние, равное шагу α -спирали (0,54 нм) или кратное ему, разделяет атомы с повышенной или с пониженной электронной плотностью во многих субстратах или биологически активных веществах.

Одной из главных особенностей ферментов является реализуемая с их помощью возможность использования свободной химической энергии, заключенной в таких макроэргических веществах, как аденозинтрифосфат, для осуществления эндотермических реакций, а также синтез аденозинтрифосфата за счет использования энтропийного фактора. Однако и без этого ферменты представляют собой уникальные катализаторы, специфику которых объясняют перечисленными далее механизмами.

5.1. Индуцированное соответствие

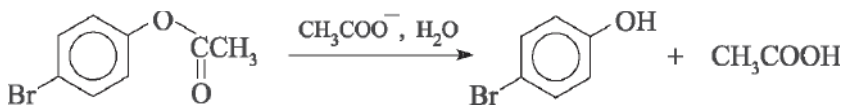
Взаимодействующая с активным центром фермента молекула субстрата включается во внешнюю сферу белковой молекулы и меняет характер отношений между полярными группами внешней сфе-

ры. В результате этого минимум энергии соответствует уже другому расположению этих групп, что обеспечивает легкость протекания внутренних перестроек гидрофобного наполнения белковой глобулы. Конформационная перестройка завершается тем, что субстрат оказывается в окружении других функциональных групп, которые и обеспечивают каталитическое превращение. Часто после перестройки субстрат оказывается включенным во внутреннюю сферу белковой глобулы. В растворах ферментов это выражается в изменении многих физико-химических показателей: оптического вращения, скорости седиментации, вязкости, термической стабильности.

После протекания реакции снова изменяется характер взаимодействия теперь уже продуктов превращения субстрата с окружающими его функциональными группами фермента, и тогда новая перестройка приводит к отходу продуктов превращения от активного центра и восстановлению его строения в том состоянии, которое готово к присоединению новой молекулы субстрата. В соответствии с этим каждое состояние субстрата вызывает иное распределение окружающих его функциональных групп, что и отличает индуцируемое соответствие от модели «ключ-замок».

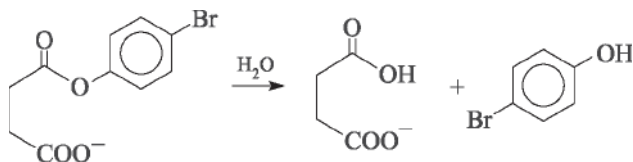
5.2. Эффект сближения реагирующих групп

Одна из главных особенностей ферментативного катализа заключается в эффекте сближения реагирующих групп. В результате взаимодействия субстрата с его окружением в активном центре реагирующие группы оказываются в наиболее благоприятном для протекания реакции положении. Этот эффект наблюдается и в обычной органической химии. Так, например, реакция гидролиза *n*-бромфениловых эфиров карбоновых кислот катализируется карбоксилатными ионами:



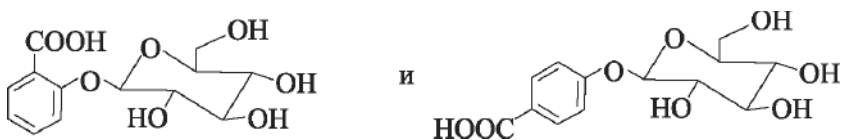
Если скорость гидролиза *n*-бромфенилацетата в присутствии эквивалентного количества ацетата натрия принять за единицу, то соль моно-*n*-бромфенилового эфира глутаровой кислоты гид-

ролизуется примерно в 1000 раз быстрее, в $2,2 \cdot 10^5$ раза быстрее гидролизуется соль соответствующего моноэфира янтарной кислоты:



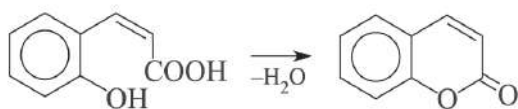
Для моно-*n*-бромфенилового эфира малеиновой кислоты скорость гидролиза возрастает в 10^7 раз. Интересно, что для солей моно-*n*-бромфениловых эфиров некоторых 2,2-дизамещенных глутаровых кислот скорость гидролиза может увеличиваться в $3 \cdot 10^{18}$ раз. Это связано с уменьшением степеней свободы при вращении молекул, что обеспечивает оптимальное расположение катализирующей гидролиз анионной карбоксилатной группы около сложной группы.

Еще один пример рассматриваемого эффекта представлен реакцией гидролиза гликозидов 2-гидроксibenзойной кислоты (салициловой) и 4-гидроксibenзойной кислоты. Скорость гидролиза первого соединения на 4 порядка выше, чем второго:



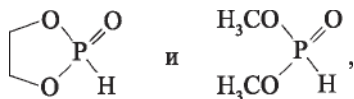
Здесь очевидна каталитическая роль кислотной группы, которая у производного салициловой кислоты находится непосредственно у аномерного (гликозидного) атома кислорода.

И последний пример: известно, что прямая реакция этерификации фенола карбоновыми кислотами идет крайне медленно, но в то же время 2-гидроксикоричная кислота циклизуется в лактон (кумарин) даже в щелочной среде:

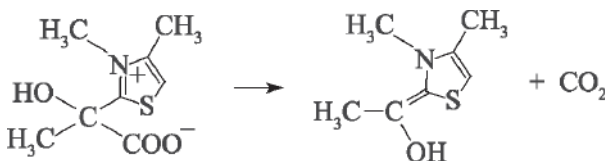


5.3. Дестабилизация связей

Известно, что изменение геометрии связей приводит к их дестабилизации. В качестве примера можно привести гидролиз циклического и ациклического фосфитов: константа скорости гидролиза этиленфосфита на семь порядков больше константы скорости гидролиза диметилфосфита:



что связано с разной геометрией связей в этих двух соединениях. К этой же группе возможных влияний относится и изменение характера сольватации промежуточных продуктов или переходных состояний. Этот эффект иллюстрируется реакцией декарбоксилирования продукта присоединения пировиноградной кислоты к соли диметилтиазолия, имитирующей *in vitro* тиаминпирофосфат — кофермент пируватдекарбоксилазы:

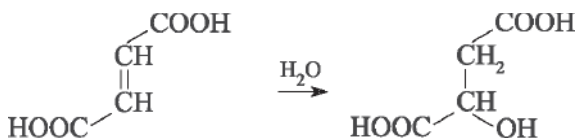


В воде продукт присоединения пирувата достаточно устойчив, в спирте скорость декарбоксилирования возрастает на 4–5 порядков, а в полярном апротонном диметилсульфоксиде скорость декарбоксилирования не удастся измерить, так как уже при растворении в нем продукта присоединения происходит вспенивание от выделяющегося диоксида углерода.

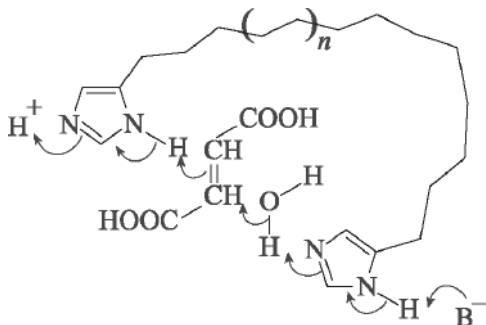
5.4. Согласованный кислотно-основный катализ

В органической химии известно достаточно большое количество реакций, катализируемых кислотами и основаниями, но только ферменты могут в результате структурной перестройки молекулы последовательно менять окружение у промежуточного соединения, создавая в нанопространстве активного центра полярную и неполярную среду, кислую или щелочную среду. В качестве при-

мера можно привести катализируемую лиазой реакцию гидратации фумаровой кислоты:



Фермент фумараза присоединяет молекулу воды по двойной связи фумаровой кислоты с образованием *L*-яблочной кислоты. Это превращение быстро и избирательно протекает при температуре, не превышающей 40 °С, благодаря тому, что в активном центре фермента на разные атомы углерода, соединенные двойной связью, одновременно действуют кислота и основание:



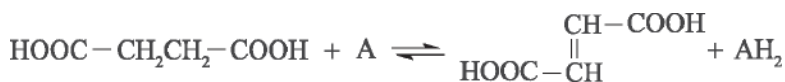
Понятно, что у синтетика нет возможности для создания условий с одновременным присутствием в растворе кислоты и основания. Для гидратации двойных связей синтетическим путем приходится, например, нагревать вещество с концентрированной серной кислотой.

5.5. Ингибирование ферментов

Ингибирование ферментов представляется важным как с токсикологической, так и с фармакологической точек зрения. Особое место занимают процессы необратимого ингибирования ферментов. Чаще всего это связано с нарушением нативной структуры апофермента. В частности, такими ингибиторами являются ионы тяжелых металлов, образующих прочные связи с сульфгидрильными группами, алкилаторы, например иодуксусная кислота, которая реаги-

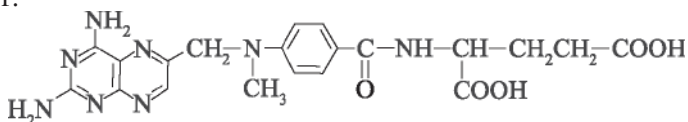
рует по имидазольным фрагментам белка (из гистидина) и по другим нуклеофильным центрам. Необратимыми ингибиторами металлопротеиновых ферментов (каталаза, супероксиддисмутаза) являются сильные восстановители (арсин, фосфин), которые изменяют валентность ионов участвующих в катализе металлов (марганец, кобальт, железо), переводя их даже в металлическое состояние, а также некоторые кислоты (сероводород, синильная кислота), образующие прочные соли с этими металлами. Однако возможны необратимые блокировки ферментов и в результате превращения простетических групп и коферментов. Так, например, гидразиды кислот реагируют с формильными группами в активном центре пиридоксальфосфатзависимых трансаминаз и декарбоксилаз с образованием стабильных гидразонов и нарушают, в частности, биосинтез аминных нейромедиаторов, участвующих в передаче нервных импульсов.

С фармакологической точки зрения наиболее интересны обратимые ингибиторы ферментов. Причем здесь можно выделить три вида ингибирования — конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное. В случае *конкурентного ингибирования* речь идет о включении в активный центр фермента вещества, строение которого подобно строению естественного субстрата (метаболита), поэтому такие вещества часто называют антиметаболитами. В качестве примера можно привести реакцию дегидрирования янтарной кислоты сукцинатдегидрогеназой, протекающую по схеме:



Эта реакция блокируется многими соединениями, сходными по строению с янтарной кислотой, но не способными к реакции дегидрирования. Антиметаболитами янтарной кислоты являются малоновая, щавелевая, глутаровая, фенилпропионовая кислоты. В частности, сродство малоновой кислоты к активному центру фермента даже выше, чем у естественного субстрата: 50%-е ингибирование фермента происходит при концентрации малоната в 50 раз ниже концентрации сукцината. При конкурентном ингибировании пониженную ингибитором скорость реакции можно повысить до прежнего значения повышением концентрации субстрата.

Еще один пример — антиметаболит фолиевой кислоты метотрексат:



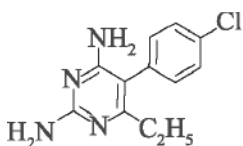
Тетрагидрофолиевая кислота переносит одноуглеродные фрагменты с образованием пятичленного цикла (см. стр. 94), а ее структурный аналог с третичной аминной группой, который может образовываться из метотрексата, по этой схеме не реагирует.

Фолиевая кислота синтезируется бактериями с участием *n*-аминобензойной кислоты (обязательный фактор роста многих микроорганизмов). Близкий ей по структуре и по многим свойствам *n*-аминобензолсульфамид (стрептоцид, антиметаболит *n*-аминобензойной кислоты)

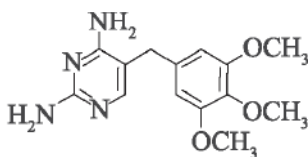


блокирует биосинтез фолата в бактериях, так как его сульфамидная группа не может вступать в реакцию ацилирования с глутаминовой кислотой.

Этим определяются бактериостатические свойства стрептоцида и таких сульфамидных препаратов, как сульфодиметоксин и др. Животные получают фолат в готовом виде (это витамин В_с), поэтому их клетки не имеют транспортной системы для *n*-аминобензойной кислоты, а следовательно, и для стрептоцида. В отличие от этого метотрексат транспортируется в клетки животных вместе с фолатом и связывается с соответствующим апоферментом настолько прочно, что даже без образования ковалентной связи ингибирование им фолатзависимых ферментов носит необратимый характер. В клетки бактерий фолат не поступает, он в них синтезируется, поэтому метотрексат не является бактерицидом. В то же время, более простые антиметаболиты фолата на основе диаминопиридина используются в качестве антибактериальных препаратов:

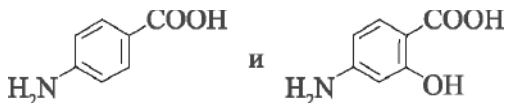


Хлоридин



Триметоприм

Еще один пример использования структурного подобия представлен противотуберкулезным средством — *n*-аминосалициловой кислотой (ПАСК), которая аналогична *n*-аминобензойной кислоте, но отличается от нее присутствием «лишней» гидроксильной группы:



В этом случае вероятнее всего реализуется иной механизм биологической активности, отличный от антиметаболического, основанного на блокировке активного центра фермента. Транспортная система в мембране микробактерий туберкулеза плохо различает эти два вещества, и ПАСК попадает в цитоплазму патогенов, где проявляются цитотоксические свойства этого вещества, обусловленные присутствием в его структуре токсифорной фенольной группы. В мембранах клеток легочной ткани и других поражаемых палочками Коха тканей организма транспортная система для *n*-аминобензойной кислоты отсутствует, а пассивная диффузия через мембраны протекает очень медленно, поэтому ПАСК мало токсична. Правда, эффективность этого противотуберкулезного средства очень низка и принимать ПАСК приходится дозами до десятков граммов в день.

Неконкурентное ингибирование имеет место в тех случаях, когда его эффективность зависит только от концентрации ингибитора и не зависит от концентрации субстрата. Это означает, что неконкурентные ингибиторы связываются белковой молекулой фермента не в активном центре, а в другом (от греч. *allos* — другой) месте, причем это может быть регуляторный центр аллостерического фермента или участвующий в перестройке структуры белка «гидрофобный карман».

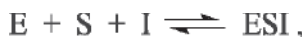
С кинетической точки зрения при неконкурентном ингибировании возможно образование двух заблокированных комплексов по схеме:



Поскольку место связывания неконкурентного ингибитора не совпадает с местом связывания субстрата, структуры неконкурентных ингибиторов чаще всего не имеют ничего общего со структурами субстратов, а их взаимодействие с ферментами носит обычно необратимый характер. При неконкурентном ингибировании снижение

скорости реакции соответствует снижению концентрации катализатора, поэтому повышением концентрации субстрата компенсировать действие ингибитора не удастся.

По типу второй реакции протекает и так называемое *бесконкурентное ингибирование*



но в этом случае ингибитор вместе с субстратом занимает каталитический центр.

Глава 6

Метаболизм

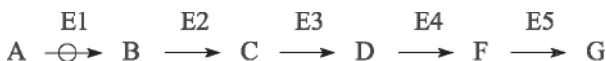
Совокупность ферментативных реакций, протекающих в живых клетках, называется *метаболизмом*. Метаболические процессы решают четыре основных задачи:

- генерирование в клетках свободной химической энергии путем преобразования энергии солнечного света или превращения богатых энергией веществ;
- превращение веществ в строительные блоки, используемые клетками для синтеза макромолекул и других биогенных веществ;
- биосинтез белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот и других клеточных элементов из этих строительных блоков;
- синтез новых веществ, разложение лишних веществ, поступающих в клетку, а также разложение выполнивших свою роль биомолекул.

Метаболические процессы сопровождаются выделением теплоты, поддерживающей оптимальный температурный режим для протекания биохимических превращений, хотя у теплокровных есть еще специальный механизм окислительного превращения субстратов, предназначенный только для регуляции температуры тела.

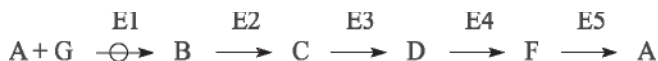
Таким образом, метаболические превращения включают обмен веществ и биоэнергетические процессы.

Высокая скорость и избирательность ферментативных реакций согласуются с тем, что метаболизм основан на высокоорганизованной и сопряженной работе взаимосвязанных мультиферментных систем. Простые, единичные превращения веществ в биохимии редки. Чаще всего речь идет о линейных или циклических путях превращений, протекающих при катализе многими ферментами (мультиферментными системами), и дирижерами при этом являются регуляторные ферменты, называемые также аллостерическими ферментами (см. стр. 91):



Здесь символом А обозначен субстрат регуляторного фермента, В, С, D, F и G — продукты последовательных превращений — метаболиты, E1–E5 — ферменты (E1 — регуляторный).

Часто метаболические превращения организованы как циклические процессы, и они отличаются от этой схемы тем, что конечный и один из начальных продуктов в такой цепочке представляют собой одно и то же вещество, например:



Метаболизм включает две основных составляющих — *катаболизм* и *анаболизм*. Катаболические превращения протекают с упрощением структур исходных молекул. Катаболизм — это основа биоэнергетики, так как превращение сложных молекул в более простые чаще всего сопровождается выигрышем в энергии. В живой природе эта энергия аккумулируется в определенных веществах, главным образом в аденозинтрифосфате (АТФ) и его аналоге гуанозинтрифосфате (ГТФ), а также в никотинамидадениндинуклеотиде (NADH) или никотинамидадениндинуклеотид фосфате в восстановленной форме (NADPH), которые образуются в ходе катаболических процессов. У аэробных организмов для биосинтеза АТФ может быть также использован энергетический выход реакции окисления NADH или NADPH. Богатые химической энергией вещества лежат в основе анаболических превращений, когда из простых веществ с затратой энергии получают более сложные.

Метаболизм складывается из различных ферментативных реакций, но центральные пути превращений углеводов, аминокислот, жирных кислот и биогенных фосфатов немногочисленны и, что самое главное, едины для всего живого (рис. 6.1).

Левая нисходящая ветвь на этой схеме представлена катаболическими процессами, правая — анаболическими. Катаболические пути сходятся: из всего разнообразия вовлеченных в них веществ образуется сравнительно немного одинаковых молекул. Так, например, все разнообразие белков при ферментативном гидролизе сводится к двадцати белковым аминокислотам, тогда как катаболические превращения сахаров, жирных кислот и некоторых аминокислот приводят к образованию одного вещества — ацетил-кофермента А (CoAS—COCH₃).

Анаболические пути расходятся: небольшое число аминокислот, сахаров, жирных кислот, нуклеотидов, а также одно- и двух-

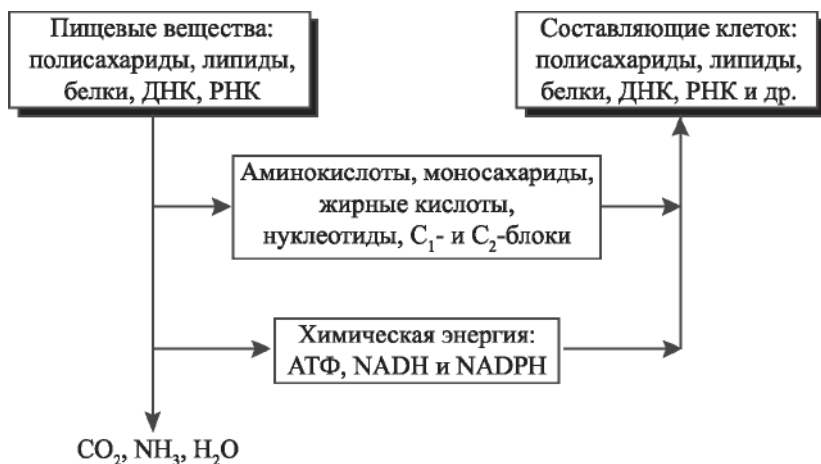


Рис. 6.1. Основные катаболические и анаболические пути

углеродных блоков являются исходными продуктами для всего разнообразия структурных элементов живой природы.

Все ферментативные процессы обратимы, но, несмотря на это, пути синтеза и деградации биомолекул в многостадийных превращениях различаются на одном или на нескольких этапах. Вторичной причиной тому служат термодинамические ограничения. Так, например, для более или менее разумной скорости протекания реакций при полной обратимости в цепи превращений



потребовались бы достаточно высокие значения стационарных концентраций метаболитов, а рост концентрации конечного продукта привел бы и к росту концентрации исходного продукта (аналогия с кладкой стены: если нет подвоза кирпичей, то Вы же не прекращаете работу, оставив часть кирпичей). Более существенна необходимость раздельной регуляции катаболических и анаболических процессов, поскольку иначе блокировка одного из этапов катаболического превращения привела бы к остановке и соответствующего анаболического процесса. Различие может состоять во включении обходных путей, иных промежуточных стадий, а также в появлении новых ферментов на одной или на нескольких стадиях прямых и обратных превращений. Важно также, что катаболические и анаболические пути должны быть разделены по месту их протекания (локализа-

ции), то есть разделены пространственно. Это необходимо для того, чтобы исключить холостые циклы. Так, например, в процессе катаболизма глюкозы с участием АТФ образуется 6-фосфоглюкоза, а при глюконеогенезе (при биосинтезе глюкозы) это вещество гидролизуется, но АТФ при этом не образуется. При совмещении этих путей в одном месте происходило бы непроизводительное расходование АТФ — важнейшего участника биоэнергетических процессов. В качестве примера пространственного разделения можно привести окислительные превращения с выигрышем энергии, которые идут в клеточных органеллах митохондриях, тогда как восстановительные энергозатратные анаболические процессы образования тех же самых веществ локализованы в жидкой среде клетки — цитозоле.

Генерируемая в катаболических превращениях энергия представляет собой свободную энергию (или энергию Гиббса ΔG°), за счет которой система может совершать работу при постоянных температуре и давлении.

В пределах клетки температура мало различается, и энергия химических превращений реализуется через образование макроэргических соединений, главным из которых является аденозинтрифосфат (АТФ, АТР). АТФ содержит две ангидридные связи, гидролиз которых сопровождается выделением энергии, равной $\sim 7,3$ ккал/моль (30,5 кДж/моль):



где АДР — аденозиндифосфат; АМР — аденозинмонофосфат; P_i и PP_i — принятые в биохимии обозначения анионов фосфорной и пирогосфорной кислот (i — inorganic), в общем случае для фосфорной кислоты в клетке это смесь кислых фосфатов.

Энергетический выход гидролиза аденозинмонофосфата на аденозин и фосфат (ΔG°) составляет 3,4 ккал/моль (14,2 кДж/моль), а макроэргическими являются связи, у которых ΔG° превышает 30 кДж/моль. Вещества с пирогосфатными связями — важнейшие, но не единственные макроэргические фосфаты в биохимии. Кроме них можно назвать еще смешанные ангидриды карбоновых кислот и фосфорной кислоты (около -49 кДж/моль), гуанидинофосфаты (около -43 кДж/моль) и енолфосфаты (около -62 кДж/моль).

Заложенная в АТФ химическая энергия используется для:

- метаболических превращений (при этом молекулы-предшественники фосфорилируются аденозинтрифосфатом в присутствии соответствующих ферментов с образованием активных фосфатов, которые и включаются в обменные процессы);
- обеспечения дигательных функций;
- переноса веществ через клеточные мембраны против градиента концентраций;
- осуществления процессов, связанных с передачей наследственной (генетической) информации.

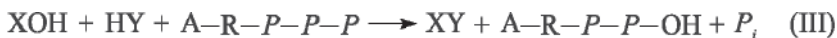
Легче всего роль пирофосфатной связи демонстрируется на реакциях конденсации. Предположим, что в клетке должна пройти эндотермическая реакция



для которой свободная энергия Гиббса $\Delta G^{\circ'}$ равна 12,5 кДж/моль. С участием АТФ (сопряженная реакция) эта схема приобретает следующий вид:



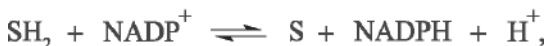
или в сумме:



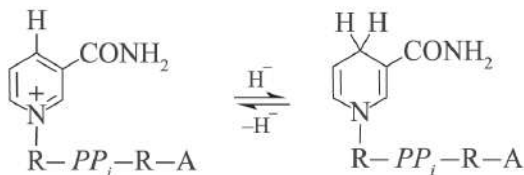
где А означает остаток аденина, R — остаток рибозы, Р — фосфатный фрагмент.

В суммарной схеме (III) на реакцию образования XY накладывается реакция гидролиза АТФ с образованием АДФ и фосфорной кислоты (P_i) с экзотермическим эффектом $-30,5$ кДж/моль. Тогда по свободной энергии в сумме получается экзотермический эффект: $12,5 - 30,5 = -18$ кДж/моль.

Помимо АТФ важнейшим источником химической энергии является восстановительный потенциал, универсальным носителем которого в живой природе стали NADH и NADPH, образующиеся в результате переноса гидрид-иона (H^-) или двух электронов и одного протона на NAD^+ или, соответственно, на NADP^+ , например:



где SH_2 представляет собой субстрат реакции дегидрирования. Химически этот процесс сопровождается переходом пиридиниевого фрагмента молекулы NAD^+ или NADP^+ в дигидропиридиновый путем присоединения гидрид-иона или протона и двух электронов, например:



Восстановленные формы NADH и NADPH включаются в другие окислительно-восстановительные процессы, в том числе и в биосинтез АТФ, и снова превращаются в NAD^+ и NADP^+ .

Химические свойства и окислительно-восстановительные потенциалы NADH и NADPH почти неразличимы ($-0,32 \text{ В}$), но лишняя фосфатная группа в последнем делает его несовместимым с апоферментами для пары NAD^+/NADH , что позволяет, например, разделять метаболические пути за счет участия этих двух коферментов (косубстратов).

Метаболические пути регулируются по трем механизмам. В соответствии с *первым механизмом* реализуется принцип обратной связи за счет участия в цепи превращений аллостерического (регуляторного) фермента, который практически всегда катализирует необратимую, лимитирующую скорость всего процесса стадию в цепи метаболических превращений. В роли положительных эффекторов аллостерических ферментов чаще всего выступают исходные продукты метаболических превращений или вещества из других метаболических реакций. В соответствии с этим, отрицательными эффекторами всегда являются конечные продукты метаболических превращений или также метаболиты из других реакций. Так, например, в процессах, связанных с образованием АТФ, положительными эффекторами являются АДФ и фосфат, а отрицательным сам АТФ. При этом надо понимать, что речь здесь идет отнюдь не о законе действующих масс, то есть скорость реакции повышается из-за увеличения активности катализатора в результате его взаимодействия с положительным эффектором.

По *второму механизму* регуляция метаболических превращений осуществляется гормонами. Эти вещества вырабатываются железами внутренней секреции (эндокринными железами). Выде-

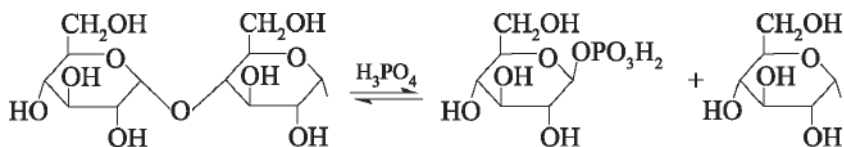
ляясь непосредственно в кровь, гормоны переносятся к другим клеткам и тормозят или стимулируют определенные виды метаболизма по различным механизмам.

Один из таких механизмов демонстрируется на адреналине — гормоне, который продуцируется мозговой (внутренней) частью надпочечников (отсюда англоязычное название адреналина — эпинефрин). Этот гормон вызывает широкий спектр биохимических и физиологических откликов, но здесь речь идет о мобилизации гликогена для покрытия энергетических потребностей организма. Гликоген представляет собой полисахарид, состоящий из соединенных 1,4- α -гликозидными связями молекул α -глюкопиранозы. Сама глюкоза не может присутствовать в клетках в значительных количествах из-за осмотических ограничений. Для обеспечения энергетических потребностей гликоген с участием фосфорной кислоты последовательно отщепляет молекулы фосфоглюкозы, которая далее подвергается катаболическому превращению с образованием АТФ.

В состоянии опасности по команде ЦНС клетки мозгового вещества надпочечников выбрасывают в кровь адреналин. Циркулирующий с кровью адреналин связывается с рецепторным белком на внешней стороне мембран клеток мышечной ткани и других клеток, что приводит к активации фермента аденилатциклазы (посредниками между адренорецептором и аденилатциклазой служат G-белки). Аденилатциклаза — это фермент, превращающий АТФ в циклический аденозинмонофосфат (цАМФ, сАМР). Этот внутриклеточный посредник («мессенджер») активирует другой фермент — *протеинкиназу* (Р); в неактивном виде она соединена с регуляторным белком (Р-Р). цАМФ связывается с этим регуляторным белком и освобождает активную протеинкиназу:



Протеинкиназа в свою очередь катализирует реакцию фосфорилирования фосфорилазы с участием АТФ, а фосфорилированная фосфорилаза в виде тетрамера уже катализирует реакцию гликогена с фосфорной кислотой, протекающую с образованием 1-фосфоглюкозы, используемой клетками для получения АТФ. Далее представлена схема отщепления фосфорной кислотой (фосфоролиза) конечного глюкозидного фрагмента молекулы гликогена:



Более выгодно запастись энергией в виде жиров, которые в окислительных превращениях дают больше энергии, чем углеводы. К тому же возможности организма человека по депонированию гликогена ограничены. В жировой же ткани находится в 50 раз больше энергии, чем в гликогене. При избыточном поступлении в организм углеводов они через двухуглеродные продукты катаболических превращений переводятся в жирные кислоты, образующие с глицерином триэфиры — это и есть жиры, откладывающиеся в специальных клетках (адипоцитах). Однако обратного пути из жирных кислот в сахара не существует. При диете, основанной на ограничении энергетической ценности пищи, или при голодании начинают расходоваться не жиры, а белки, поскольку, например, ткани мозга покрывают свои энергетические потребности только за счет глюкозы и некоторых кетопроизводных («кетоновых тел»), которые образуются из многих белковых аминокислот. Запасные белки существуют только в семенах растений или, например, в яйцах птиц. Если в диете отсутствуют углеводы и мало белков, то организму для обеспечения потребности в аминокислотах, из которых может синтезироваться глюкоза (их называют глюкострофами), приходится расходовать мышечную ткань.

Третий механизм регуляции метаболизма основан на изменении концентрации ферментов в зависимости от потребности в обеспечиваемых ими превращениях. Это означает, что ферменты, для которых отсутствует субстрат, перестают синтезироваться рибосомами, но при росте потребности в этих ферментах снова активируется соответствующий генный участок ДНК (вообще-то и этот процесс основан на гормональной регуляции), снова образу-

ется мРНК, и синтез фермента по этой матрице возобновляется. В качестве примера здесь можно привести изменение в балансе питания. При недостаточном поступлении углеводов с пищей интенсифицируется *глюконеогенез* — длинная цепь превращений образующихся из аминокислот трехуглеродных и четырехуглеродных кетокислот, которые завершаются образованием глюкозы. При нормальном балансе веществ в пище нет необходимости в этом процессе, но при недостатке глюкозы начинается биосинтез комплекса ферментов, отвечающих за глюконеогенез, и потребности организма в глюкозе начинают покрываться за счет образования ее из глюкогенных аминокислот, поступающих с пищей, или при недостатке их в пище — из гидролизующихся белков мышечной ткани.

Катаболические превращения

7.1. Гликолиз

Самым древним метаболическим процессом можно считать гликолиз, заключающийся в получении энергии путем расщепления сахаров до более простых молекул без участия кислорода. Процесс гликолиза характерен для всего живого, и отдельные его элементы, различающиеся механизмами регуляции и скоростью, реализуются в любой живой клетке.

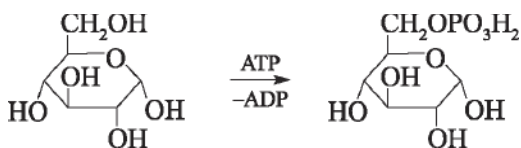
Центральный метаболический путь гликолиза завершается образованием из глюкозы двух молекул пировиноградной кислоты (пирувата). В аэробных условиях пируват подвергается окислительно-му декарбоксилированию с образованием ацетатного остатка, а в анаэробных условиях пировиноградная кислота (пируват) восстанавливается до молочной кислоты (лактата) или же после декарбоксилирования, протекающего с образованием ацетальдегида, превращается в спирт (в клетках дрожжей в отсутствии кислорода).

Расщепление молекулы глюкозы на две молекулы молочной кислоты сопровождается образованием двух молекул АТФ (АТР):

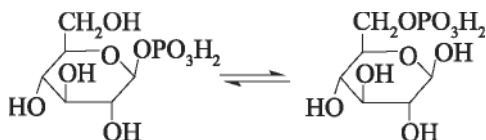


Если рассчитать изменение свободной энергии в этой системе, то окажется, что в результате превращения одного моля глюкозы в два моля лактата выделяется около 47 ккал/моль, тогда как образование двух молекул АТФ из АДФ и фосфата требует затрат энергии около 29 ккал/моль. Экзотермический эффект, равный 18 ккал/моль, делает этот процесс необратимым, хотя, конечно, с включением обходных путей становится возможным и энергозатратный глюконеогенез (см. стр. 161–164).

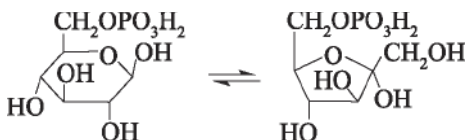
Гликолиз начинается с фосфорилирования концевой гидроксильной группы глюкозы действием АТФ при катализе АТФ-гексозо-6-фосфаттрансферазой (гексокиназой):



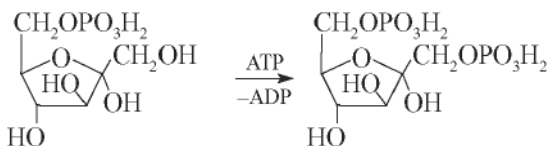
Если в этот катаболический процесс включается гликоген или крахмал, то 6-фосфоглюкоза образуется в результате изомеризации 1-фосфоглюкозы, отщепившейся от концевой гексозного остатка (см. стр. 116). Изомеризация 1-фосфоглюкозы в 6-фосфоглюкозу идет в присутствии фосфоглюкомутазы:



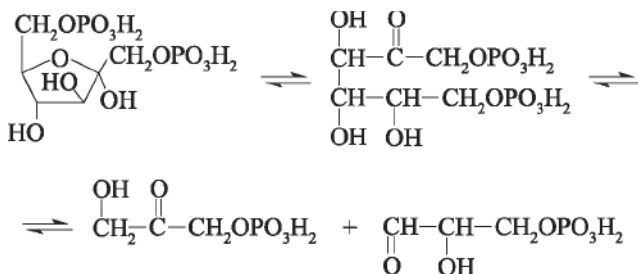
Затем фермент глюкозофосфатизомераза вызывает превращение 6-фосфоглюкозы в 6-фосфофруктозу:



Далее АТФ с участием фосфофруктокиназы фосфорилирует 6-фосфофруктозу с образованием 1,6-дифосфофруктозы:

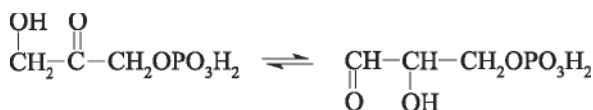


После этого дифосфорилированная фруктоза может разложиться на два трехуглеродных карбонильных соединения — фосфат глицеринового альдегида и фосфат диоксиацетона — в результате реализации обратного хода реакции альдольной конденсации:

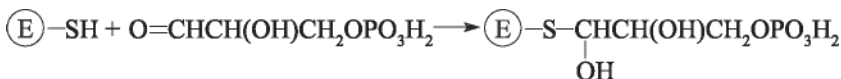


Это превращение осуществляется при катализе фруктозоdifосфатальдозазой, относящейся к лиазам.

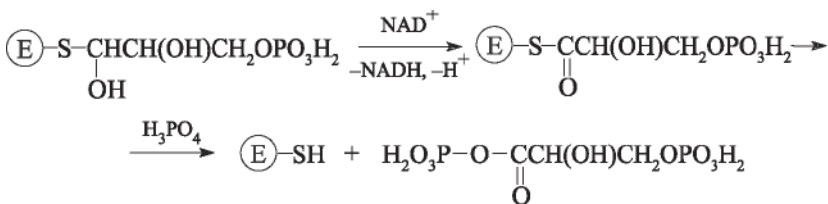
В дальнейшие превращения включается только фосфат глицеринового альдегида, однако фосфат диоксиаcetона может превращаться в фосфат глицеринового альдегида в присутствии триозофосфатизомеразы:



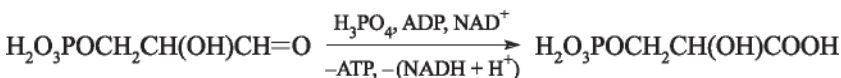
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа дегидрирует фосфат глицеринового альдегида в фосфат глицериновой кислоты. Катализируемый этим ферментом процесс состоит из ряда превращений. Сначала фосфат глицеринового альдегида присоединяется альдегидной группой к находящейся в активном центре фермента сульфгидрильной группе (E-SH) с образованием полутиоацетала:



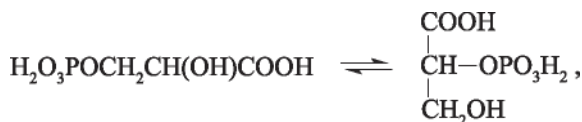
Затем идет реакция дегидрирования с участием NAD^+ , а регенерация свободного фермента происходит в результате реакции ацидолиза: образовавшийся тиоэфир расщепляется фосфорной кислотой с образованием смешанного ангидрида фосфорной и фосfogлицериновой кислот:



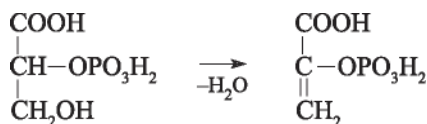
Макроэргическая ангидридная связь в этом соединении переносится на аденозиндифосфат (фосfogлицераткиназа), и конечным результатом становится образование фосfogлицерата и одной молекулы АТФ с генерированием восстановительного потенциала ($\text{NADH} + \text{H}^+$):



После этого фосфоглицератмутаза (изомеразы) переносит фосфатный остаток на соседнюю гидроксильную группу:



а фермент енолаза (отщепление воды, лиаза) превращает это вещество в фосфат енольной формы пировиноградной кислоты (фосфоенолпирuvat):



На следующей стадии пируваткиназа переносит макроэргическую связь фосфата (около 62 кДж/моль) енольной формы пировиноградной кислоты на аденозиндифосфат с образованием пировиноградной кислоты и аденозинтрифосфата:



В анаэробных условиях и при недостатке в клетках кислорода пировиноградная кислота гидрируется восстановительным потенциалом, образовавшимся на стадии превращения фосфата глицеринового альдегида в фосфат глицериновой кислоты, и конечным продуктом гликолиза становится молочная кислота:

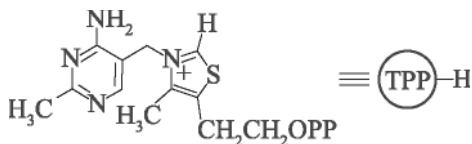


Осуществляющий это превращение фермент лактатдегидрогеназа назван по обратной реакции превращения лактата в пируват. Так обеспечивают себя энергией разные молочнокислые бактерии и мышцы животных при недостатке кислорода. Отложения молочной кислоты в нетренированных мышцах вызывают известные всем болевые ощущения на следующий после интенсивной нагрузки день.

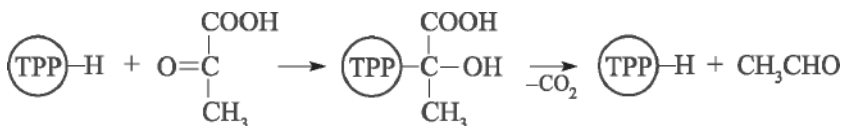
Энергетический выход гликолитического превращения глюкозы невелик: из одной молекулы глюкозы получается две молекулы

АТФ. Если же процесс начинается с концевой глюкозидного остатка гликогена или крахмала, то энергетический выход увеличивается в полтора раза (до трех молекул АТФ). Правда, эта, казалось бы, дополнительная, молекула АТФ была затрачена на образование глюкозидной связи в полисахариде, то есть истинный энергетический выход все равно сводится к двум молекулам АТФ.

Не увеличивается выход АТФ и в процессе брожения. В дрожжевых клетках в отсутствии кислорода воздуха (эти клетки являются факультативными анаэробами) образовавшаяся в ходе гликолиза пировиноградная кислота подвергается декарбоксилированию до уксусного альдегида, и только после этого в процесс включается NADH и образуется этиловый спирт. Декарбоксилирование пирувата идет на ферментах, в работе которых в качестве кофермента принимает участие тиаминпирофосфат (TPP):



Карбонильная группа пировиноградной кислоты присоединяется к тиазольному циклу тиаминпирофосфата, а образовавшийся аддукт декарбоксилируется и разлагается на тиаминпирофосфат и ацетальдегид:



После этого образовавшийся на стадии дегидрирования глицеральдегидфосфата NADH восстанавливает ацетальдегид до этилового спирта.

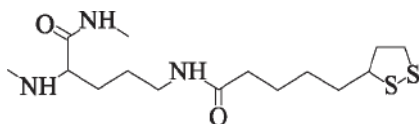
7.2. Окислительное декарбоксилирование пирувата

В аэробных условиях превращение пирувата идет на пируватдегидрогеназном мультиферментном комплексе, работу которого обеспечивают три фермента: пируватдегидрогеназа (E_1), дигидролипоилацетилтрансфераза (E_2) и дигидролипоилдегидрогеназа (E_3), объединенные в частицы диаметром около 45 нм. Комплекс включает пять коферментов и простетических групп (тиаминпиро-

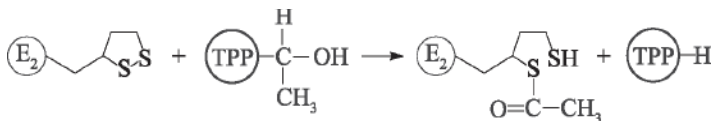
фосфат, липоевая кислота, кофермент А, флавинадениндинуклеотид и никотинамидадениндинуклеотид). Из них только липоевая кислота образуется в организме животных из обычных метаболитов, тогда как тиамин (в тиаминпирофосфате), рибофлавин (в FAD), пантотеновая кислота (в коферменте А) и никотинамид (в NAD^+) должны поступать в организм животных в виде витаминов.

Не нуждающийся в кислороде гликолиз идет в цитозоле клетки, но основные аэробные биоэнергетические процессы протекают в матриксе митохондрий, отделенном от цитозоля двумя мембранами. Через внешнюю мембрану митохондрий легко проходят все вещества с молекулярной массой до 10000, а для транспорта через внутреннюю мембрану существуют транспортные системы, одна из которых предназначена для переноса молекул пировиноградной кислоты.

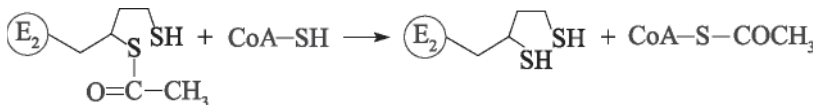
Окислительное декарбоксилирование пирувата начинается с присоединения его к тиаминпирофосфату так, как это было представлено выше для процесса спиртового брожения, но образовавшаяся после декарбоксилирования пирувата 1-гидроксиэтильная группа не отщепляется в виде альдегида, а переносится на один из атомов серы дитиолонового цикла липоевой кислоты в виде ацетата и атома водорода. Остаток липоевой кислоты присоединен к ферменту через аминокгруппу лизинового фрагмента белковой молекулы (простетическая группа):



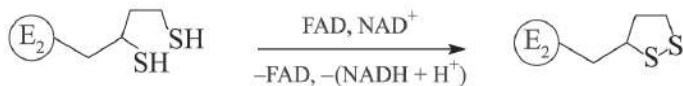
Декарбоксилированный тиамин остаток пировиноградной кислоты переносится на дитиолоновый фрагмент по схеме:



Ацетилированный фрагмент дигидролипоилацетилтрансферазы маятниковым движением отходит от тиаминпирофосфатного участка мультиферментного комплекса и отдает ацетильный остаток коферменту А:



Движение остатка дигидролипоевой кислоты после переноса ацетильной группы на кофермент А завершается у дегидрогеназного участка мультиферментного комплекса, где атомы водорода двух сульфгидрильных групп переходят на никотинамидадениндинуклеотид (посредником при этом является флавинадениндинуклеотид):



Образовавшийся при этом в результате дегидрирования дитиолановый цикл возвращается к тиаминпирофосфатному участку для того, чтобы снова принять гидроксиэтильный остаток в виде ацетильной группы и атома водорода.

Процесс превращения пировиноградной кислоты в ацетилкофермент А необратим. При включении в обмен веществ меченного по углероду угольного ангидрида радиоактивная метка никогда не обнаруживается в пировиноградной кислоте.

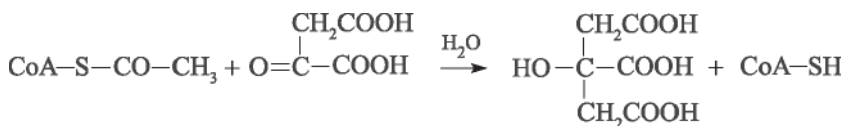
7.3. Цикл Кребса

Последовательность превращений ацетильного остатка, образовавшегося после декарбоксилирования пирувата, была открыта в 1937 г. немецким биохимиком Х. Кребсом, эмигрировавшим в 1933 г. в Великобританию. Чаще всего это многостадийное циклическое превращение называют по имени открывшего его ученого, но можно также встретить такие названия, как «цикл лимонной кислоты» или «цикл трикарбоновых кислот». Открытие цикла Кребса было отмечено Нобелевской премией 1953 г. Кребс поделил ее с Ф. Липманном, открывшим аденозинтрифосфатный цикл.

В основу расшифровки биохимических превращений цикла Кребса легли наблюдения за обменными процессами в мышечных тканях. В них и раньше обнаруживали незначительные количества дикарбоновых кислот (янтарной, фумаровой, яблочной, щавелевоуксусной), а также трикарбоновых кислот (лимонной, *цис*-аконитовой, изолимонной). Добавки этих кислот к клеткам мышечной ткани вызывали заметное увеличение потребления ими кислорода, а малоновая кислота останавливала течение аэробных обменных процессов, вызывая в клетках накопление лимонной, кетоглутаро-

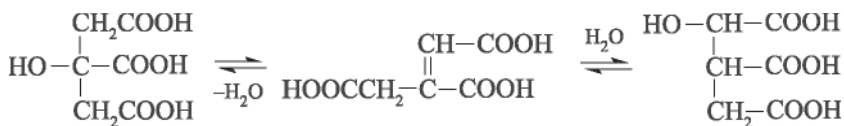
вой и янтарной кислот. Кребс установил также, что инкубация мышечных клеток с пировиноградной и щавелевоуксусной кислотами приводит к росту концентрации в них лимонной кислоты. Эти наблюдения легли в основу представлений о циклическом пути превращений, в ходе которых на начальном этапе из щавелевоуксусной кислоты (анион оксалоацетат) образуется лимонная кислота, а конечным продуктом превращений лимонной кислоты является щавелевоуксусная кислота, с которой этот процесс начинался.

На первой стадии цикла Кребса фермент цитратсинтаза катализирует образование лимонной кислоты (анион цитрат) из ацетилкофермента А и оксалоацетата по схеме:



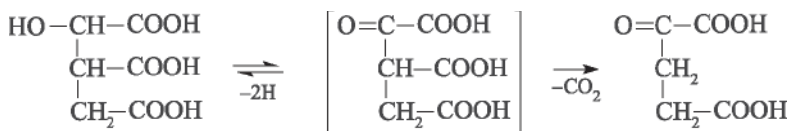
В учебниках по биохимии принято представлять и называть кислоты как анионы, акцентируя этим внимание на том, что в живых клетках поддерживается слабощелочная среда, но для лучшего понимания химизма процессов здесь и далее будут использоваться традиционные для химиков уравнения реакций. Суть представленной реакции состоит в том, что в тиоэфирах карбоновых кислот атомы водорода в α -положении к карбонильной группе соответствуют по реакционной способности аналогичным атомам водорода в карбонильных соединениях. В соответствии с этим реакция образования лимонной кислоты подобна реакции альдольной конденсации. Первичным продуктом этой реакции является, конечно, цитроилкофермент А, но скорость его гидролиза выше скорости образования и поэтому обнаружить его в клетках не удастся.

После этого лимонная кислота при катализе *цис*-аконитазой превращается в изолимонную кислоту в результате обратимого отщепления и присоединения молекулы воды с образованием в качестве промежуточного продукта *цис*-аконитовой кислоты:

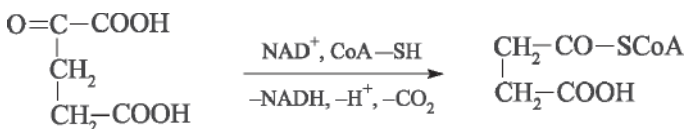


Цис-аконитаза — это металлопротеин с ионом железа Fe^{2+} . Превращение *цис*-аконитовой кислоты в изолимонную идет против правила Марковникова, и действительно в равновесном состоянии концентрация лимонной кислоты примерно на порядок превышает концентрацию изолимонной, однако в дальнейшем превращении участвует только изолимонная кислота.

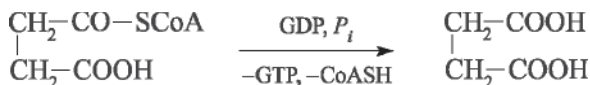
При дегидрировании изолимонной кислоты образуется трикарбоновая кетокислота, которая сразу декарбоксилируется и превращается в кетоглутаровую кислоту:



Далее ферментная система, аналогичная пируватдегидрогеназному мультиферментному комплексу, превращает кетоглутаровую кислоту в сукцинилкофермент А:

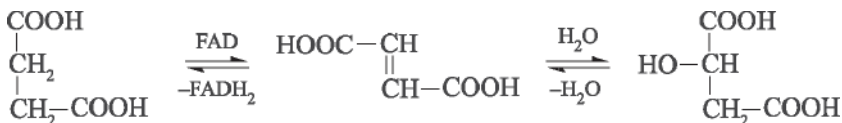


Тиоэфирная связь в этом соединении делает его макроэргическим, поэтому превращение сукцинилкофермента А в анион янтарной кислоты (сукцинат)

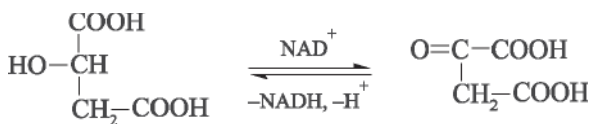


сопровождается образованием другого макроэргического вещества, аналога аденозинтрифосфата — гуанозинтрифосфата (ГТФ, GTP).

Янтарная кислота дегидрируется FAD-зависимым ферментом с образованием фумаровой кислоты, которая превращается в *L*-яблочную кислоту (анион малат) в результате гидратации фумаразой (см. стр. 104):



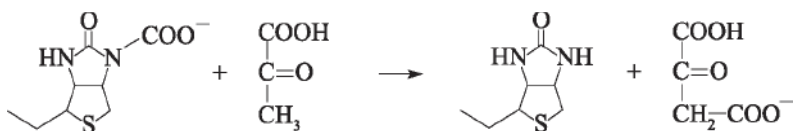
И, наконец, NAD^+ -зависимый фермент *L*-малатдегидрогеназа переводит яблочную кислоту в оксалоацетат, с реакции которого с ацетилкоферментом А начиналась эта цепочка превращений:



Роль щавелевоуксусной кислоты в биохимии не ограничивается участием в цикле Кребса. Она может быть предшественником аспарагиновой кислоты и аспарагина (правда, она может быть также получена из этих аминокислот). Для иных обменных процессов из цикла Кребса могут изыматься и другие его участники, например, кетоглутаровая кислота для образования глутаминовой кислоты и глутамина. Кроме того, щавелевоуксусная кислота — это исходный продукт для образования глюкозы при недостатке ее в пище. Не исключены также сбои в системе транспорта и превращений участвующих в цикле Кребса веществ, которые приводят к потере оксалоацетата. Поэтому должен существовать автономный механизм образования оксалоацетата. Этот биохимический процесс относится к анаболическим, но он является неотъемлемой частью цикла Кребса, и поэтому есть смысл рассмотреть его в этом разделе.

Процессы, в которых образуются промежуточные продукты многостадийных биохимических превращений, в общем случае называют *анаплерозом*. Исходным продуктом для образования оксалоацетата является пируват, который карбоксилируется бикарбонатным анионом с участием аденозинтрифосфата в каталитическом центре соответствующей карбоксилазы. Положительным эффектом этого фермента служит ацетилкофермент А, то есть в отсутствии в клетках свободного ацетилкофермента А биосинтез оксалоацетата из пирувата не идет. Механизм карбоксилирования биотин-зависимыми ферментами рассматривался выше (см. стр. 96).

В данном случае гетероциклический структурный элемент биотина, несущий карбоксилатную группу, перемещается в другой участок каталитического центра и там отдает ее пирувату с образованием оксалоацетата:



7.4. Катаболизм жирных кислот

Важным источником энергии в живой природе являются триглицериды жирных кислот, при биологическом окислении которых генерируется около 9 ккал/г (в среднем человек расходует в сутки около 2800 ккал). Как отмечалось выше, возможность накопления источника энергии в виде гликогена ограничена, тогда как жиры могут накапливаться многоклеточными организмами в количествах, обеспечивающих, например, зимнюю спячку грызунов и медведей или тысячекилометровые перелеты птиц. Жиры запасаются в специализированных клетках (адипоцитах) и транспортируются жидкими средами организма с помощью транспортных белков альбуминов в гидрофобных «карманах» или же с помощью различных биогенных поверхностно-активных веществ.

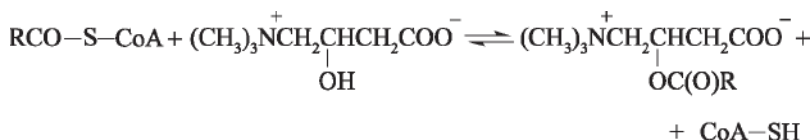
В желудочно-кишечном тракте животных жиры эмульгируются желчными кислотами и гидролизуются секретлируемыми поджелудочной железой липазами на жирные кислоты, диацилглицерины и моноацилглицерины, которые всасываются стенками тонкого кишечника (плазма крови человека после сытной трапезы похожа на молоко). Отделившиеся от альбуминов жирные кислоты проходят через клеточные мембраны и попадают в цитозоль, где с участием аденозинтрифосфата ацилируют кофермент А по обычной схеме в присутствии ацил-СоА-синтетаз:



В обычных условиях равновесие этой реакции сдвинуто влево, например, такие макроэргические соединения, как тиоэфиры карбоновых кислот, используются клетками для биосинтеза АТФ и ГТФ (см. на стр. 126 превращение сукцинил-СоА), но пиррофосфатаза гидролизует пиррофосфат на две молекулы фосфорной кислоты и реакция становится необратимой.

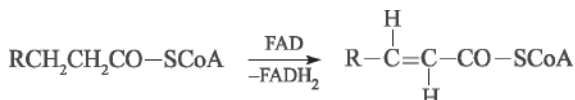
Катаболические превращения жирных кислот протекают во внутренней среде (матриксе) митохондрий — клеточных органелл с двумя мембранами. Ацилированные жирными кислотами молекулы кофермента А проходят через внешнюю мембрану в межмембранное пространство с помощью простой диффузии, тогда как для преодоления внутренней мембраны митохондрий подключается дополнительное вещество — «челнок» — карнитин, образующийся из аминокислоты лизина по многостадийной схеме, включающей реакцию метилирования концевой аминокислотной группы, гидроксирования

и укорочения углеродной цепи. В результате генетических нарушений может быть нарушен механизм образования карнитина или транспорт ацилкарнитина в митохондрии. У людей с таким нарушением в обмене веществ происходит ожирение мышечной ткани, сопровождающееся болевыми ощущениями в мышцах. Фермент карнитинацилтрансфераза I на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий осуществляет реакцию:

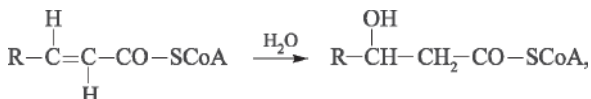


После этого ацилированный карнитин соответствующей транслоказой перемещается в матрикс митохондрий, где другой фермент карнитинацилтрансфераза II переносит ацильный остаток в обращение предыдущей реакции на внутримитохондриальный кофермент А, а карнитин снова выводится в межмембранное пространство митохондрий. Такой усложненный транспорт нужен для того, чтобы разделить кофермент А внутри и вне митохондрий, поскольку иначе живой природе пришлось бы находить возможность определения уровня кофермента А по разные стороны мембраны и выведения из митохондрий только тех его молекул, которые поступили в виде тиоэфиров с жирной кислотой.

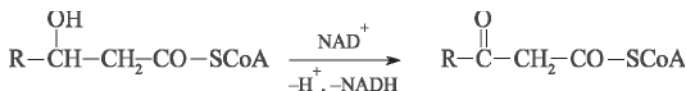
Окисление жирных кислот начинается с реакции дегидрирования ацилкофермента А ацил-СoА-дегидрогеназой по схеме:



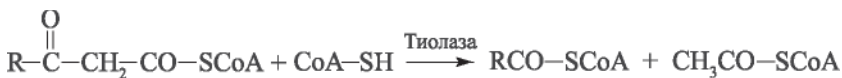
Затем еноил-СoА-гидратаза превращает тиоэфир *транс*-изомера α,β -ненасыщенной кислоты в *L*-3-гидроксиацил-СoА:



а 3-гидроксиацил-СoА-дегидрогеназа превращает его в 3-кетоацил-СoА:



Образовавшееся β -дикарбонильное соединение расщепляется по C—C-связи коферментом А. Поскольку эта реакция представляет собой тиолиз (разрыв связи сульфгидрильной группой), катализирующий ее фермент называется *тиолазой*:



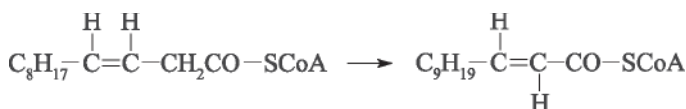
В результате этих превращений молекула жирной кислоты становится короче на два атома углерода, то есть это превращение соответствует β -окислению. Повторение представленных выше ферментативных реакций на жирной кислоте с четным числом атомов углерода (основные кислотные компоненты жиров) приведет в конце концов к ацетоацетил-СоА, который расщепляется коферментом А в присутствии тиолазы на две молекулы ацетил-СоА, встраивающиеся, как и полученные на предыдущих стадиях, в цикл Кребса.

Если учесть все протекающие биохимические реакции, включая участие ацетильных остатков в цикле Кребса и окислительное фосфорилирование (см. гл. 8.) генерируемого в β -окислении и в цикле Кребса восстановительного потенциала, то катаболизм одной молекулы пальмитиновой кислоты приведет к образованию 106 молекул аденозинтрифосфата (АТФ), при этом суммарный КПД будет равен 33%. Или иначе: при окислении одного моля (256 г) пальмитиновой кислоты образуется 45000 г АТФ.

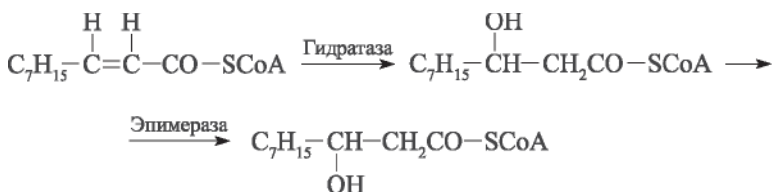
В живой природе реализуется также механизм α -окисления. В частности, в состав липидов клеток мозга входят α -гидроксизамещенные жирные кислоты, образующиеся при окислении жирных кислот монооксигеназами. При их дегидрировании получают высшие α -кетокислоты, которые подвергаются окислительному декарбоксилированию кислородом в присутствии ионов Fe^{2+} и аскорбиновой кислоты, то есть по механизму, который отличается от описанного выше превращения пирувата и кетоглутарата. Образовавшиеся при этом кислоты с нечетным числом атомов углерода в цепи в результате β -окисления превращаются в пропионил-СоА, который карбоксилируется биотинзависимым ферментом в метилмалонил-СоА, изомеризующийся кобаламинзависимым ферментом с образованием участвующего в цикле Кребса сукцинил-СоА (см. стр. 90 и 96).

Для катаболического превращения ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав жиров и липидов мембран, нужны дополнительные ферменты. Дело в том, что последовательное β -окисление (например олеилкофермента А) приводит к соответствующему тио-

эфиру *цис*-додец-3-еновой кислоты (*цис*- Δ^3 -C₁₂-кислоты), тогда как субстратом еноил-СоА-гидратазы являются соответствующие эфиры *транс*- Δ^2 -ненасыщенных кислот. Далее следует очередь первого дополнительного фермента — енолил-СоА-изомеразы, катализирующей превращение по схеме:



Образовавшийся тиоэфир *транс*- Δ^2 -C₁₂-кислоты представляет собой обычный субстрат гидратазы. Если же катаболическому превращению подвергаются полиненасыщенные кислоты, то β -окисление может привести к тиоэфирам *цис*-2-еновых кислот, которые гидратируются еноил-СоА-гидратазой. Продуктом реакции становится тиоэфир *D*-изомера 3-гидроксизамещенной кислоты, и для перевода его в субстрат 3-гидроксиацил-СоА-дегидрогеназы служит 3-гидроксиацил-СоА-эпимераза. Так, например, катаболизм линоленовой кислоты в результате представленных выше превращений завершается образованием тиоэфира *цис*- Δ^2 -C₁₂-кислоты, из которой *L*-3-гидроксидеканоилкофермент А образуется по схеме, асимметрия в которой представлена условно:

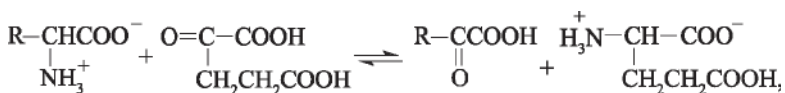


7.5. Катаболические превращения аминокислот

Даже при хорошо сбалансированном питании от 15 до 10% энергии организм человека получает из аминокислот. Это связано в основном с тем, что поступающие пищевые белки не соответствуют по аминокислотному составу синтезируемым в организме в разное время белкам, поэтому «лишние» аминокислоты включаются в катаболические превращения. Кроме того, в организме постоянно идет процесс обновления собственных белков. Так, например, многие ферменты имеют время полупревращения, равное нескольким часам, хотя, конечно, структурные белки более долговечны. Процесс сборки-разборки белков (а в него включается до нескольких сот граммов

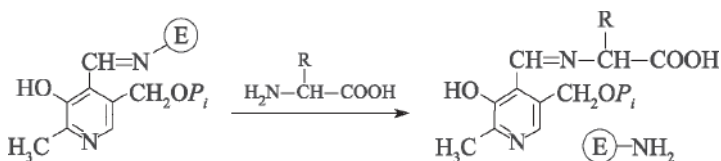
белков в день) не идеален, и часть образовавшихся при этом аминокислот также включается в катаболические превращения.

На начальной стадии катаболического превращения аминокислот при катализе трансаминазами (пиридоксальфосфатзависимые ферменты) образуются α -кетокислоты. В общем виде эта реакция представляется как обмен аминогруппами и кетогруппами между аминокислотами и кетоглутаровой кислотой:

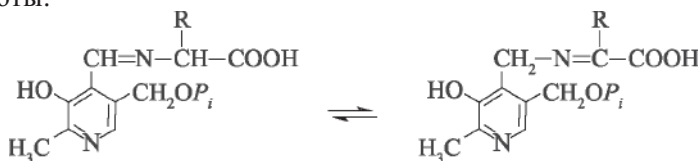


то есть аминокислота превращается в α -кетокислоту, а α -кетоглутаровая кислота превращается в глутаминовую кислоту.

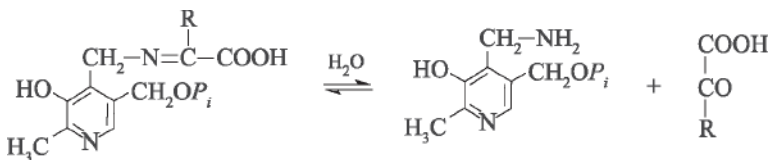
Химизм этого процесса представляется следующим образом: сначала пиридоксальфосфат, связанный с белковой частью фермента (E) взаимодействием его альдегидной группы с аминогруппой лизинового фрагмента белка, образует такую же связь с аминогруппой дезаминируемой аминокислоты. При этом ковалентная связь кофермента с белком разрывается и образуется комплекс белка с альдиминном, образованным пиридоксальфосфатом и аминокислотой:



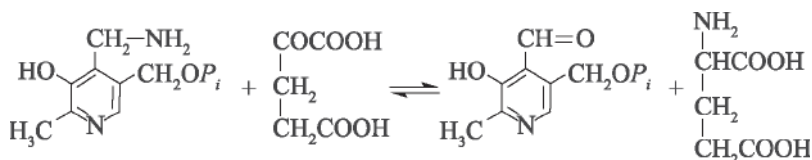
После этого альдимин изомеризуется с миграцией двойной связи и с образованием кетимина из пиридоксаминфосфата и α -кетокислоты:



На следующей стадии превращения протекает гидролиз кетимина с образованием α -кетокислоты и пиридоксаминфосфата:



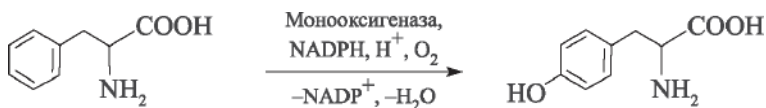
Для дезаминирования другой молекулы аминокислоты пиридоксаминфосфат должен снова превратиться в пиридоксальфосфат. Этот процесс сопровождается переносом аминогруппы с пиридоксаминфосфата на другую кетокислоту (чаще всего при этом α -кетоглутаровая кислота превращается в глютаминовую кислоту):



Образовавшая в этой реакции глютаминовая кислота снова превращается в α -кетоглутаровую по механизму дезаминирования, который будет рассмотрен ниже (стр. 135) при изучении биосинтеза мочевины.

Полученные в результате дезаминирования аминокислот кетокислоты разными путями превращаются в ацетилкофермент А или в молекулы глюкозы. Так, аланин превращается в пируват, глютаминовая кислота и глютамин превращаются в кетоглутарат, аспарагиновая кислота и аспарагин — в оксалоацетат (эти кетокислоты участвуют в цикле Кребса) и т. д.

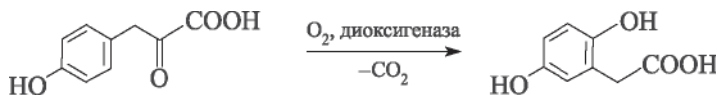
При катаболическом превращении фенилаланина и тирозина дезаминирование должно быть дополнено превращениями ароматического остатка с образованием молекул, включающихся в цикл Кребса. Эта схема унифицирована для двух аминокислот и поэтому «лишний» фенилаланин сначала превращается в тирозин в результате окисления кислородом в присутствии фенилаланинмонооксигеназы:



Затем тирозин по представленной выше схеме (см. стр. 132) дезаминируется соответствующей трансаминазой и превращается в гидроксифенилпировиноградную кислоту:

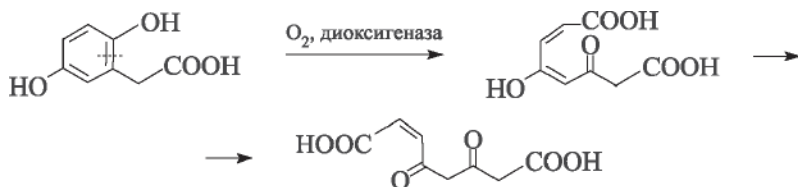


которая действием кислорода в присутствии соответствующей диоксигеназы превращается в гомогентизиновую кислоту:



В результате этой реакции происходит окисление (гидроксилирование) ароматического цикла, окислительное декарбоксилирование боковой цепи и ее миграция в соседнее положение ароматического цикла.

На следующем этапе гомогентизат-1,2-диоксигеназа окисляет гомогентизиновую кислоту с раскрытием ароматического цикла (показана связь, раскрываемая молекулой кислорода):



Образовавшаяся малеилацетоуксусная кислота ацилирует кофермент А с участием АТФ и при катализе тиолазой последовательно взаимодействует с коферментом А с разрывом С–С-связей по β-дикарбонильным участкам, расщепляясь на малеилкофермент А и две молекулы ацетил-кофермента А, включающиеся в цикл Кребса (малеилкофермент А для этого гидролизуются и изомеризуются в фумаровую кислоту).

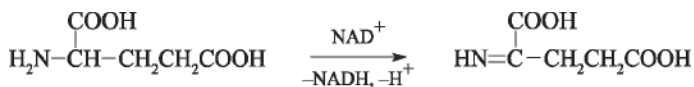
Этот нормальный метаболизм фенилаланина может быть нарушен из-за дефектов генов, кодирующих участвующие в превращении ферменты. При пониженной активности фенилаланинмонооксигеназы избыток поступающего с пищей фенилаланина (а это одна из незаменимых аминокислот) превращается в фенилпировиноградную кислоту. Она выводится из организма через почки (фенилкетонурия), но часть ее реагирует с некоторыми важными биомолекулами нервной ткани (такие реакции, протекающие без участия ферментов, называют иногда *параметаболическими*). Эти превращения приводят к повреждению клеток центральной нервной системы.

Наследственная болезнь фенилкетонурия, приводящая в детском возрасте к слабоумию, должна быть диагностирована на самом раннем этапе развития новорожденного. Среди белокожего

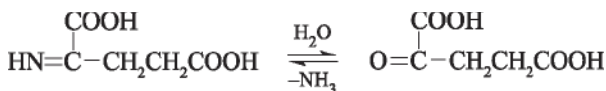
населения США ее частота составляет около одного случая на двадцать тысяч (среди афроамериканцев болезнь встречается реже). Это означает, например, что в США рождается в год около 3000 детей с фенилкетонурией. Если с первых дней жизни ребенка перевести его на специальную диету с пониженным содержанием фенилаланина, то развитие будет нормальным. Поэтому всем новорожденным надо сразу после рождения класть в пеленки индикаторную бумагу, реагирующую на бензилкетоны. В возрасте 12–14 лет можно уже переходить на обычную диету, но если женщина с фенилкетонурией собирается стать матерью, то ей снова надо выдерживать специальную диету еще до зачатия ребенка.

При пониженной активности гомогентизиндиоксигеназы непревращенная гомогентизиновая кислота выводится через почки и, окисляясь на воздухе, окрашивает мочу в черный цвет, однако, особых последствий для организма при этом не наблюдается. Гомогентизиновая кислота и в норме является исходным продуктом для образования меланина — вещества, окрашивающего кожу при загаре и волосы.

При рассмотрении механизма дезаминирования аминокислот пиридоксальфосфатзависимыми трансаминазами говорилось о том, что для регенерации пиридоксальфосфата из пиридоксаминфосфата живая природа использует кетоглутаровую кислоту — один из метаболитов цикла Кребса. Понятно, что образующаяся при этом глутаминовая кислота должна быть снова превращена в кетоглутарат. Для этого предназначена дегидрогеназа, осуществляющая реакцию:

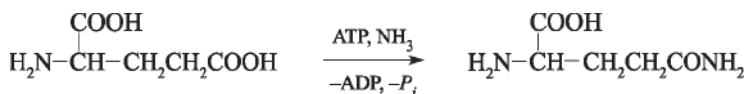


L-Глутаматдегидрогеназа — это регуляторный фермент с молекулярной массой около 300 кДа, состоящий из шести идентичных субъединиц. Его активность возрастает в присутствии аденозиндифосфата, а отрицательным эффектором является ГТФ, образующийся в цикле Кребса. Иминопроизводное кетоглутаровой кислоты гидролизуетс водой с образованием кетоглутаровой кислоты и аммиака:



Обратный путь превращения кетоглутарата в глутамат также существует, но на стадии восстановления иминопроизводного участвует не *L*-глутаматдегидрогеназа, а другой NADP^+ -зависящий фермент.

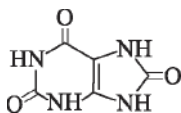
Аммиак образует в водной среде сильное основание, и поэтому он токсичен для всего живого. Буферные системы жидких сред организма справляются с небольшими концентрациями аммиака, но, тем не менее, он как можно скорее должен быть переведен в нетоксичное производное. Один из путей детоксикации аммиака представлен превращением пирувата в аланин по схеме, аналогичной обратному процессу превращения глутаминовой кислоты в кетоглутаровую. По другому пути аммиак ацилируется глутаминовой кислотой с образованием глутамина:



Этот путь играет важную роль в детоксикации аммиака в ЦНС, где глутаминовая кислота содержится в большом количестве, участвуя в передаче нервных импульсов. Аланин снова превращается в пируват с участием трансаминаз, а глутамин гидролизует и снова превращается в глутаминовую кислоту и аммиак. В организме теплокровных этот процесс протекает в клетках печени, но другие виды живого используют иные пути. Проще всего проблеме вывода аммиака решают водные животные: они просто выделяют его в воду. В жабрах рыб, личинок амфибий находится фермент глутаминаза, и образовавшийся в результате гидролиза глутамина аммиак просто диффундирует из крови в омывающую жабры воду (рыба тухнет с головы).

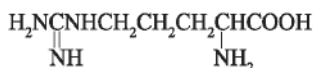
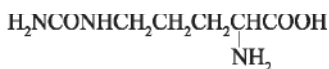
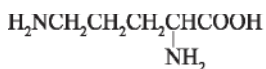
Для животных такой путь выведения аммиака не годится. Свободный аммиак не может поступать в мочу, так как для поддержания допустимой для биологических сред концентрации аммиака потребуется слишком много воды. Эта проблема не может быть решена и за счет образования нейтральных солей аммония, так как органические кислоты на это тратить слишком расточительно, а потеря неорганических анионов нарушит водно-солевой баланс организма. Существует также возможность образования бикарбоната аммония, и не исключено, что на ранних этапах эволюции этот вариант использовался живой природой, но все же бикарбонат аммония слишком нестоек и его растворы имеют сильно ще-

лочную реакцию. Поэтому в процессе эволюции был выработан механизм выведения аммиака в виде нейтрального амида угольной кислоты — мочевины. Правда, и для выведения мочевины надо много воды, поэтому, например, птицы (для них важен вес) и рептилии, живущие часто в зонах с недостатком влаги, выработали иной механизм. Они выделяют избыточный аммиак в виде не-растворимой в воде мочевой кислоты



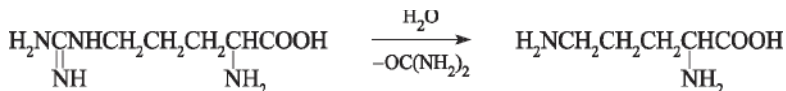
механизм биосинтеза которой здесь не рассматривается.

Оказалось, что мочевина образуется в циклическом процессе, в раскрытии механизма которого активное участие также принимал Кребс. В ходе исследования биохимических процессов, протекающих в тканях печени, было установлено, что в присутствии трех аминокислот: орнитина, цитруллина и аргинина

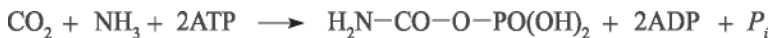


резко возрастает скорость образования мочевины. До этого было известно, что аргинин гидролизуетс водой с образованием мочевины и небелковой аминокислоты орнитина, и можно было предположить, что эти аминокислоты участвуют в образовании мочевины, а связующим между ними служит цитруллин.

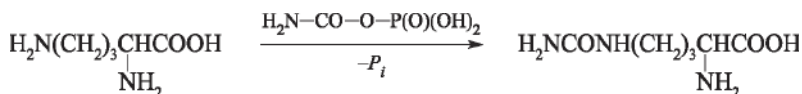
Позже было показано, что аргинин действительно образуется из орнитина через цитруллин и может гидролизоваться далее в присутствии аргиназы по реакции:



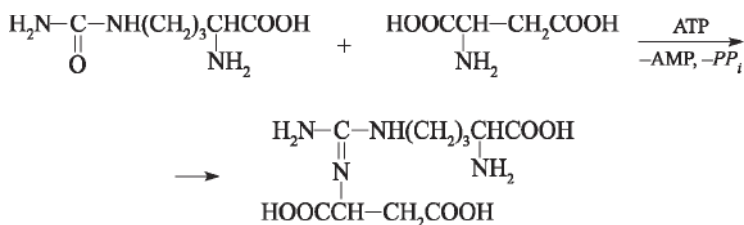
В митохондриях аммиак и диоксид углерода (из цикла Кребса) с участием двух молекул АТФ в присутствии фермента карбамоилфосфатсинтетазы I образуют смешанный ангидрид карбаминовой и фосфорной кислот — карбамоилфосфат:



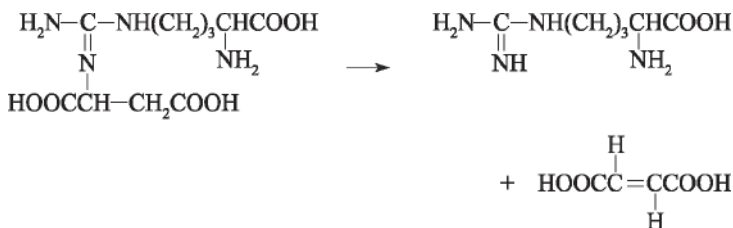
Это соединение ацилирует орнитин по концевой аминогруппе (уходящей группой является фосфатный остаток) с образованием цитруллина:



Далее цитруллин с участием АТФ реагирует с аспарагиновой кислотой с образованием аргининосукцината. Фермент, катализирующий это превращение, называется аргининосукцинатсинтетазой; АТФ при этом распадается на АМФ и пирогосфат, гидролизующийся до фосфата:



Затем аргининосукцинатлиаза расщепляет этот промежуточный продукт на аргинин и фумарат:



Фумарат встраивается в цикл Кребса и через малат и оксалоацетат с участием трансаминаз снова может превратиться в аспарагиновую кислоту. Синтез аргинина един для всего живого, но аргиназа присутствует только в клетках печени животных, выделяющих аммиак в виде мочевины (их называют уротелическими, в отличие от урикотелических, выделяющих аммиак в виде мочевой кислоты).

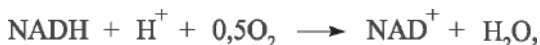
В результате такого циклического процесса (из аргинина образуется орнитин, с которого начиналась представленная выше цепь превращений), а из организма выводятся два конечных продукта

катаболических превращений — аммиак и бикарбонат (из CO_2). Этот процесс участвует в регуляции pH крови, значение которого определяется содержанием бикарбоната. Энергетическая стоимость детоксикации аммиака достаточно высока: на один моль мочевины расходуется четыре эквивалента АТФ: два моля АТФ идут на образование карбамоилфосфата и один моль АТФ используется для синтеза аргининосукцината, но в этом случае аденозинтрифосфат разлагается на пирофосфат и аденозинмонофосфат, для превращения которого в АТФ нужно провести двойное фосфорилирование. Поэтому аминокислоты очень невыгодны в качестве источника энергии: их катаболическое превращение включает образование токсичного аммиака, на связывание которого в мочевину расходуется до 15% всего получаемого из аминокислот АТФ, кроме того, повышается нагрузка на почки.

В организме жвачных животных и верблюдов образовавшаяся в результате катаболических превращений аминокислот мочевина циркулирует в крови, и путем диффузии через ткани и стенки кровеносных сосудов она практически полностью переходит в отделы желудка, в которых живут бактерии, перерабатывающие целлюлозу и использующие мочевину в качестве источника аммиака для синтеза аминокислот.

Окислительное фосфорилирование

Суммарный процесс последовательного катаболического превращения одного моля глюкозы в ходе гликолиза, окислительного декарбоксилирования пирувата и в цикле Кребса приводит к образованию 10 моль NADH (NADPH), 2 моль FADH_2 , 2 моль АТФ и 2 моль ГТФ. Аэробная клетка может использовать энергию, выделяющуюся при окислении восстановительного потенциала NADH (NADPH), для образования максимального количества АТФ. В простейшем виде эта реакция записывается уравнением:



ее энергетический эффект примерно соответствует окислению водорода кислородом (220 кДж/моль). Эта энергия должна оптимальным образом использоваться для образования АТФ, на биосинтез которого из АДФ и фосфата затрачивается 14 ккал/моль (более 60 кДж/моль). Если учесть, что за сутки организм человека потребляет 2800 ккал/моль, то это соответствует образованию примерно 200 моль или 100 кг АТФ, хотя в организме его стационарное содержание составляет около 50 г. Эти цифры показывают с какой эффективностью работает механизм воспроизводства расходуемого АТФ, причем потребность в нем меняется в зависимости от рода деятельности, в каждый отдельный момент (активная работа, отдых, сон и т. д.).

Еще на ранней стадии биохимических исследований было установлено, что энергетическими «фабриками» аэробных эукариотических клеток являются митохондрии, а у прокариот синтез АТФ идет в клеточных мембранах. Митохондрии представляют собой органеллы размером примерно $0,5 \times 1,5$ мкм красновато-коричневого цвета (основной цвет пигментов, входящих в состав мембран), их число в клетках животных колеблется в пределах от нескольких сотен до нескольких тысяч.

Строение митохондрий из разных организмов единообразно; они окружены двойной мембраной (рис. 8.1). Внешняя гладкая мембрана содержит транспортные белки и ферменты, отвечающие за превращения аминокрупп (моноаминоксидазы), а также фер-



Рис. 8.1. Строение митохондрий

менты, участвующие в обмене жирных кислот. Внутренняя мембрана митохондрий для увеличения ее поверхности образует множество впячиваний, называемых кристами. Итак, содержимое митохондрии разделено на два объема: межмембранное и внутреннее пространство (матрикс), отделенное от межмембранного пространства внутренней мембраной. Митохондрии делятся, причем они содержат свою собственную нитевидную ДНК и набор РНК, что позволяет сделать предположение о том, что их присутствие в клетке представляет собой нечто вроде симбиоза: они могли образоваться в результате эндоцитоза аэробных прокариот анаэробными эукариотами и сохраниться в них, получая питательные вещества и снабжая приютившую их клетку аденозинтрифосфатом. Все митохондрии в клетках организмов, размножающихся половым путем, получены от материнской клетки. Это позволяет использовать ДНК митохондрий для установления родства.

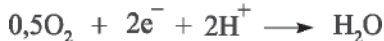
Основные катаболические процессы локализованы в матриксе митохондрий. Сюда соответствующими транспортными системами переносятся субстраты для цикла Кребса и катаболического превращения жирных кислот (пируват, глутамат, аспартат, малат, 2-кетоглутарат, цитрат, жирные кислоты), а также АДФ и фосфат, из которых образуется АТФ. Именно в матриксе митохондрий протекают конечные стадии катаболического превращения углеводов и жирных кислот, сопровождающиеся образованием восстановительного потенциала.

Что же мы знаем о механизме образования АТФ в митохондриях? Субстратный путь образования АТФ, который реализуется живой природой при анаэробном катаболическом превращении глюкозы (перенос макроэргической фосфатной связи на АДФ с 1,3-дифосфоглицерата и с фосфоенолпирувата), очевидно, не может быть достаточно эффективно использован при окислении восстановительного потенциала, заложенного в NADH (NADPH) и в FADH_2 . Поэтому эволюция клеток в кислородсодержащей среде пошла по принципиально иному пути, использующему для синтеза АТФ электрохимический потенциал и градиент концентраций протонов с коэффициентом полезного действия, достигающим 60%. Этот процесс называют *окислительным фосфорилированием*.

Реакция окисления NADH может быть представлена двумя полуреакциями. Сначала NADH отдает пару электронов по схеме:



В стандартных биохимических условиях окислительно-восстановительный потенциал E° этого процесса равен $-0,320$ В. Затем пара электронов переносится на кислород:



Для этой полуреакции $E^\circ = +0,816$ В. Суммарная реакция окисления NADH кислородом характеризуется значением $E^\circ = +1,136$ В, что соответствует ΔG° около 220 кДж/моль, тогда как на образование одного моля АТФ затрачивается более 60 кДж.

Электроны, отданные восстановленными формами никотинамидадениндинуклеотида (NADH) или его фосфата (NADPH) и флавопротеинов, переносятся во внутренней мембране митохондрий в результате окислительно-восстановительных превращений молекул убихинона и атомов железа в железосерных белках и в гемовых структурах в составе цитохромов (обычно их называют пигментами электронпереносящей цепи). Движение электронов по компонентам электронпереносящей цепи сопровождается снижением восстановительного потенциала каждого принявшего электрон участника процесса, что в свою очередь сопровождается выделением энергии, которая может быть использована для синтеза АТФ. При этом исключается образование макроэргических соединений из компонент электронпереносящей цепи и фосфатов, так как при нарушении целостности внутренней мембраны митохондрии она продолжает окислять NADH (NADPH), но перестает гене-

рировать АТФ. Есть даже митохондрии с пористой внутренней мембраной (митохондрии бурого жира), которые предназначены исключительно для генерирования теплоты. Было установлено, что в межмембранном пространстве устанавливается кислая среда, и есть много соединений, которые хорошо растворяются в липидах мембран как в виде аниона, так и в протонированном виде. Оказалось, что в их присутствии даже сплошная мембрана перестает синтезировать АТФ. Такие вещества называют *разобищателями окислительного фосфорилирования*. Классический пример — 2,4-динитрофенол. Некоторое время это соединение даже использовали в качестве медикаментозного средства для снижения веса. Его присутствие в организме приводит к непроизводительному расходованию пищевых веществ, выражающемуся в повышении температуры тела.

Антибиотик валиномицин, структура которого напоминает баранку, составленную из повторяющихся фрагментов валина, гидроксизовалериановой кислоты и молочной кислоты, переносит через мембраны ионы калия, снижая тем самым электрохимический мембранный потенциал. Это вещество послужило отправной точкой для получения циклических краун-эфиров, используемых в качестве катализаторов межфазного переноса. Итак, упомянутые выше косвенные данные говорят о том, что движущей силой в образовании АТФ является разность концентраций протонов по разные стороны внутренней мембраны митохондрий.

Митохондриальная цепь переноса электронов включает:

- никотинамидадениндинуклеотидный акцептор электронов и флавопротеин с флавиномононуклеотидом;
- белки с железосерными кластерами, в которых атомы железа (два и более) связаны с сульфгидрильными группами цистеиновых фрагментов белка с участием неорганических сульфидных структурных элементов;
- убихинон, связанный с мембраной исключительно гидрофобным взаимодействием олигоизопреноидного остатка этого вещества с липидными компонентами мембран;
- цитохромы (cyt **b**, cyt **c**₁, cyt **c**, cyt **a**, cyt **a**₃) — белки с различными гемами.

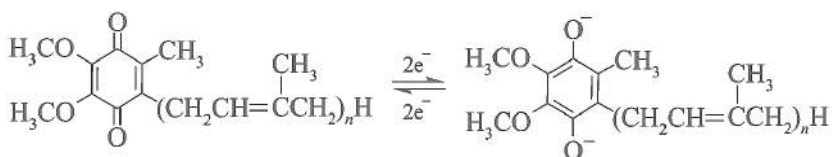
Все компоненты цепи переноса электронов, кроме цитохрома **c** (этот низкомолекулярный белок легко отмывается солевыми растворами), интегрированы в мембрану. В старых учебниках по био-

химии приводится такая последовательность движения электронов по электронпереносящей цепи:



Железосерные белки выполняют роль посредников (накопителей электронов) при контакте FMN с убихиноном и цитохрома **b** с цитохромом **c**₁. В железосерных белках и в цитохромах перенос электронов осуществляется путем окисления и восстановления атомов железа Fe²⁺ и Fe³⁺.

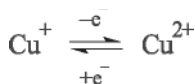
Убихинон (кофермент Q) переносит электроны путем превращения его в гидрохинон:



Понятно, что с помощью убихинона идет не только транспорт электронов, но и перенос протонов, которые при образовании аниона гидрохиноновой формы могут быть приняты в матриксе, а при окислении с образованием хиноновой формы они могут быть отданы уже в межмембранное пространство. У гидрохинонов есть три степени окисления: сами гидрохиноны, свободнорадикальные семихиноны ($-e^-$) и хиноны ($-2e^-$), все они включены в систему транспорта протонов против градиента концентрации.

Перенос протонов возможен также в результате окислительно-восстановительных превращений гемов, так как в максимальной степени окисления атом железа связан с одним анионным остатком, а при переходе железа в двухвалентное состояние этот анион может быть протонирован.

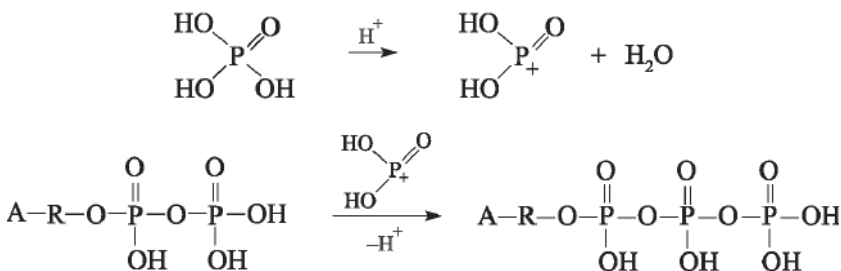
Очень важна роль цитохромов **a** и **a**₃, связанных в прочный комплекс. Эти переносчики электронов имеют две гемовых компоненты и два иона меди, которые также участвуют в переносе электронов за счет перехода



Важность согласованной работы комплекса цитохромов **a** и **a**₃ состоит в том, что они должны одновременно перенести на молекулу кислорода четыре электрона. Любой сбой в этой системе вызовет образование активного окислителя — супероксида (один

электрон), пероксида (два электрона) или гидроксильного радикала (три электрона).

В соответствии с устаревшими представлениями о работе системы окислительного фосфорилирования предполагалось, что перенос электронов от NADPH сопровождается переносом из матрикса в межмембранное пространство шести протонов, в результате чего в нем устанавливается кислая среда с pH около 4,0. Возникший градиент концентраций протонов при обратной диффузии их через АТФ-синтетазный комплекс белков приводит к фосфорилированию АДФ активным фосфатом (в схеме А и R означают, соответственно, адениновый и рибозидный остатки):



Сегодня считается, что интегрированные в мембрану пигменты электронпереносящей цепи скомпонованы в четыре комплекса. В состав первого входит NAD, второй включает FAD, третий — цитохромы **b** и **c**₁, четвертый — цитохромы **a** и **a**₃. Цитохром **c** — это периферический гемопrotein с небольшой молекулярной массой (в его составе кроме гема около ста аминокислот), он растворим в воде и легко перемещается по внешней стороне внутренней мембраны, осуществляя связь между разными комплексами электронпереносящей цепи.

Установлено, что для синтеза одной молекулы АТФ из межмембранного пространства в матрикс входят три протона. Но для этого из матрикса должны выйти четыре протона, так как один протон теряется при обмене молекулы АТФ, образовавшейся в матриксе, на поступающие из межмембранного пространства АДФ и фосфат. Работа электронпереносящей цепи, сопровождающаяся окислением восстановительного потенциала одной молекулы NADH (NADPH), завершается выходом из матрикса в межмембранное пространство десяти протонов. Окисление молекулы FADH₂ с более низким восстановительным потенциалом сопровождается

выходом шести протонов. Из них, очевидно, два протона — это результат образования в матриксе недиссоциирующей молекулы воды из молекулы кислорода (связывание двух протонов в матриксе эквивалентно появлению двух протонов в межмембранном пространстве), а еще восемь (или четыре от FADH_2) — это не установленная во всех деталях работа убихинона и других пигментов электронпереносящей цепи. В соответствии с этим окисление 1 моль NADH (NADPH) завершается образованием 2,5 моль АТФ, а окисление одного моля FADH_2 дает 1,5 моль АТФ.

Внутренняя (обращенная к матриксу) поверхность крист внутренней мембраны плотно покрыта сферическими белковыми структурами, которые прикреплены к погруженному в мембрану комплексу нескольких интегрированных белков. Вместе они образуют ферментную систему АТФ-синтазы (иногда ее называют также АТФ-синтазой), осуществляющей биосинтез АТФ из АДФ и фосфата. В ходе эволюции этот фермент изменялся очень незначительно. Во всяком случае различия между АТФ-синтазами прокариот, одноклеточных организмов, хлоропластов в растениях, митохондрий в клетках растений и животных очень незначительны. Принцип функционирования АТФ-синтаз лежит также в основе биохимических систем, приводящих в движение жгутики однолеточных и сперматозоидов.

Долгое время не удавалось установить механизм работы АТФ-синтазы. Было известно, что она состоит из двух принципиально различных комплексов белков. Один из них с обозначением F_0 (он блокируется олигомицином) интегрирован в мембрану, другой (F_1) связан с первым, но выступает из мембраны. Их можно разделить, поместив мембрану с АТФ-синтазой в солевой раствор, отделяющий растворимую в воде компоненту F_1 от мембраны. Современные достижения в исследовании пространственного строения белков позволили получить достаточно точное представление о функционировании этой системы, похожей на электромотор из белковых молекул (рис. 8.2).

Интегрированная в мембрану компонента F_0 состоит из трех различных типов фиксированных в липидах мембраны гидрофобных белковых субъединиц (a , b и c). Субъединица a является частью системы, преобразующей энергию движущихся по градиенту концентраций протонов во вращательное движение. Образованная двумя пептидными цепями субъединица b связывает с мембраной

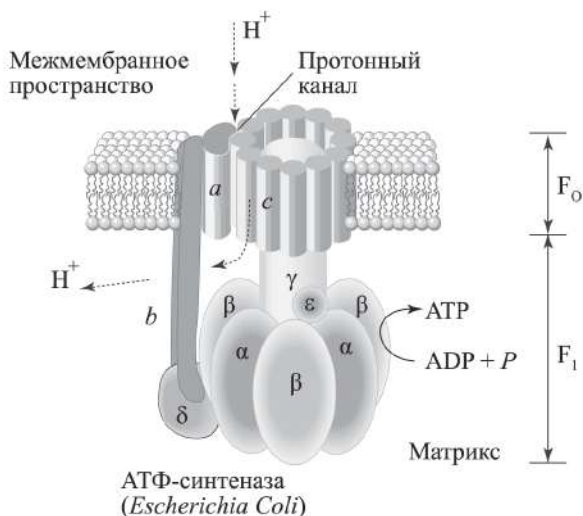


Рис. 8.2. Схематическое изображение АТФ-синтетазы из бактерии *Escherichia coli*

компоненту F_1 , лишая ее возможности вращаться вместе с выполняющей роль ротора субъединицей γ , входящей в состав компонента F_1 . Субъединицы c расположены по кругу. У бактерии *Escherichia coli* он образован двенадцатью пептидными цепями, каждая из которых сложена вдвое с перегибом примерно в середине цепи. Каждая пептидная цепь субъединицы c имеет активный центр, вызывающий перемещение субъединицы c по кругу при прохождении протонов из межмембранного пространства в матрикс митохондрии на границе контакта субъединиц a и c .

Растворимая в воде компонента F_1 находится на обращенной к матриксу стороне внутренней мембраны митохондрии. В ее состав входят пять типов субъединиц — α , β , γ , δ и ϵ . Три пары белков, состоящих из субъединиц α и β , образуют каталитические системы, на которых идет синтез АТФ из АДФ и фосфата. Связанная с субъединицами c вращающаяся ось АТФ-синтазы обозначается как γ . Ее вращение, вызванное движением протонов в компоненте F_0 , вызывает структурные перестройки в субъединицах α и β . Субъединица δ соединяет комплекс трех пар белков α и β с интегрированной в мембрану субъединицей b , и не дает им вращаться вместе с осью γ . Предполагается, что субъединица ϵ связывает с осью γ кольцо из субъединиц c .

Активные центры, отвечающие за биосинтез АТФ, расположены между белками α и β . Структурной перестройкой образующих активный центр аминокислотных фрагментов этих пар белков управляет ротор γ . В одном фиксированном положении активный центр, образованный первой парой белков α и β , открыт, и в него входят и соответственно ориентируются молекулы АДФ и фосфорной кислоты. В другой паре α и β создаются условия для фосфорилирования АДФ фосфорной кислотой и образуется АТФ (по приведенной на стр. 146 реакции активации фосфорной кислоты с образованием фосфорцентрированного катиона). В третьей паре активный центр раскрыт и образовавшаяся молекула АТФ покидает его. В результате диффузии трех протонов через субъединицу F_0 ротор γ и связанный с ним белок ϵ поворачиваются на 120° и вызывают структурную перестройку в создающих активный центр белках α и β , в результате которой в первой паре создаются условия для синтеза АТФ, вторая пара открывает активный центр и освобождается от образовавшей молекулы АТФ, а третья пара принимает АДФ и фосфат. В следующем повороте на 120° роли снова поменяются в этом порядке. Поскольку в состав комплекса F_1 входят три пары катализирующих биосинтез АТФ белков α и β , один полный оборот ротора γ с белком ϵ в самом благоприятном случае приводит к образованию трех молекул АТФ. Работа этой системы носит обратимый характер. В избытке АТФ ротор вращается, вызывая транспорт протонов против градиента концентраций (АТФ при этом гидролизует на АДФ и фосфат). Этот процесс используется некоторыми бактериями для поддержания водно-солевого баланса.

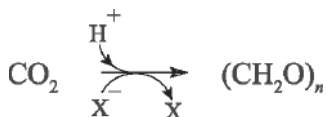
В АТФ-синтетазе природой реализован не имеющий аналогов в органической химии механизм использования энтропийного фактора для образования источника свободной химической энергии.

Для раскрытия деталей этого механизма было использовано много оригинальных методик, включая, например, присоединение к выступающему из F_1 субъединицы концу ротора γ фибриллярного белка актина с молекулами светящегося в УФ-свете люминофора, присоединенного к функциональным группам на поверхности этого фибриллярного белка. С помощью микроскопа можно наблюдать его вращение и даже определять скорость вращения. Весь этот комплекс исследований был отмечен Нобелевской премией 1997 г. (П. Д. Бойер и Дж. Э. Уокер).

Глава 9

Фотосинтез

Фотосинтез — это основной анаболический процесс, основанный на ассимиляции диоксида углерода с образованием углеводов, протекающий на свету во всех содержащих хлорофилл клетках. В катаболических окислительных превращениях и при горении углеводов образуются диоксид углерода и вода, выделяется энергия и потребляется кислород. Из этого следует, что обратный процесс может протекать только с затратой энергии (ее то и поставляет поглощаемый хлорофиллами свет) и с участием восстановительного потенциала. Поскольку в природе водород находится в виде протонов, восстановление диоксида углерода должно сопровождаться переносом электронов от какого-либо донора (X^-):



Интенсивность фотосинтеза зависит от температуры и поэтому все протекающие при этом реакции не могут быть чисто фотохимическими. Это подтверждается и тем, что ассимиляция диоксида углерода некоторое время продолжается и после переноса растения в темноту. Понятно также, что энергия света должна быть трансформирована в обычный для живых клеток источник химической энергии, которым может быть только АТФ. Поскольку окислительно-восстановительный потенциал системы глюкоза–кислород/вода–диоксид углерода равен примерно $-0,4$ В, участвующий в превращении $\text{CO}_2 \rightarrow$ углеводы восстановитель должен иметь более сильный восстановительный потенциал. В этой роли выступает NADPH с восстановительным потенциалом, равным около $-0,45$ В. Эти общие рассуждения приводят к следующим выводам:

1. Превращение диоксида углерода в углеводы требует восстановительного потенциала и АТФ.
2. Свет нужен только для образования в клетке аденозинтрифосфата и NADPH.



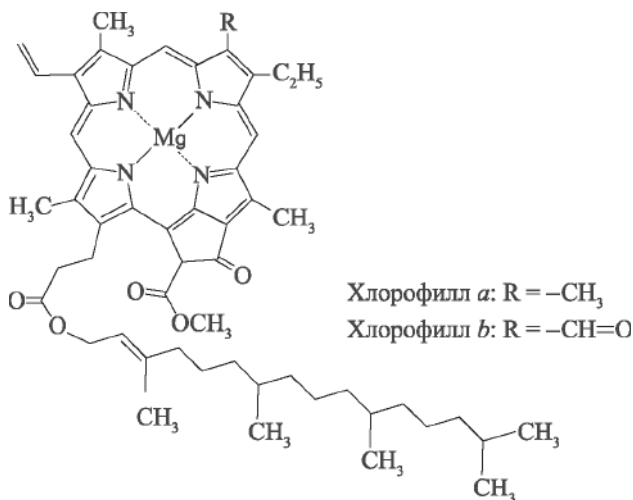
Рис. 9.1. Строение хлоропласта

3. При наличии в клетке АТФ и NADPH превращение диоксида углерода в углеводы может идти и без света (правда это не совсем верно, так как некоторые участвующие в ассимиляции ферменты активируются светом).

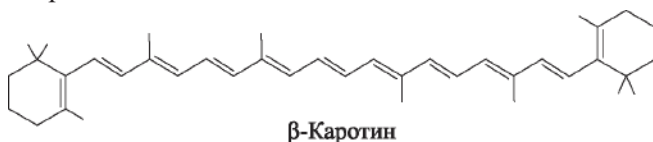
Организмы, использующие в качестве источника энергии свет, очень разнообразны, а масштабы фотосинтеза можно проиллюстрировать тем, что весь кислород атмосферы Земли имеет биогенное происхождение. В настоящее время около половины всего кислорода поступает из воды в результате жизнедеятельности водорослей и фитопланктона. В растительных клетках фотосинтез протекает в органеллах, которые называются *хлоропластами* (рис. 9.1). Во внутренней среде (строме) хлоропластов, отделенной от цитозоля двойной мембраной, находятся плоские тилакоиды, стопки из которых образуют граны, все тилакоиды соединены протоками.

В мембране тилакоидов содержатся ферменты, транспортные белки и электронпереносящие пигменты. Одним из ферментов в мембране тилакоидов является АТФ-синтетаза, она аналогична АТФ-синтетазе митохондрий, работа которой представлена на стр. 146–148. Фиксация диоксида углерода идет в строме с участием соответствующих ферментов. Имеется определенное подобие хлоропластов и митохондрий, но набор транслоказ и ферментов в первых значительно беднее, поскольку в растениях основные катаболические превращения также протекают в митохондриях.

Для поглощения энергии света в фотосинтезирующих клетках содержатся хлорофиллы — магнийпорфирины зеленого цвета:



В число вспомогательных пигментов входят каротиноиды, защищающие молекулы хлорофиллов от повреждения активированным кислородом:



Плоская металлопорфириновая структура хлорофилла фиксирована и определенным образом ориентирована в мембране тилакоида липофильным фрагментом сесквитерпенового спирта фитола, связанного эфирной связью с карбоксильной группой.

Циклическая система сопряженных двойных связей позволяет молекулам хлорофиллов поглощать в видимой области спектра широкие полосы с длинами волн около 450 нм (синий цвет) и около 650–700 нм (красный). Поглощение света сопровождается переходом электронов на орбитали с более высокой энергией. Так, поглощение «красного» фотона соответствует переходу электрона на первый энергетический уровень, «синего» — на второй. При этом составляющие пару электроны находятся в синглетных состояниях S_0 , S_1 и S_2 (нулевой, первый и второй уровни), сохраняя антипараллельность спинов.

В молекулах с большим числом сопряженных двойных связей p -электроны делокализованы, и для них становится возможным нахождение на нескольких подуровнях с энергиями выше и ниже основного p - p^* -перехода изолированной двойной связи. На каждом из возбужденных состояний возможен безизлучательный переход возбужденного электрона (экситона) на более низкие подуровни с потерей энергии в виде теплоты при соударениях с другими молекулами. Этот процесс называется *колебательной релаксацией*. Возможен также безизлучательный переход электрона с орбитали S_2 на орбиталь S_1 в результате *внутренней конверсии*, если у подуровня с низкой энергией орбитали S_2 есть энергетический (частотный) эквивалент на одном из высоких подуровней орбитали S_1 . Возврат на нулевой уровень протекает с излучением кванта света (*флуоресценция*) через несколько нано- или даже микросекунд после его поглощения.

При спонтанных обращениях спинов возбужденных электронов возвращение на нулевой уровень становится невозможным из-за того, что оба электрона пары получают параллельные спины. Такие возбужденные состояния, называемые триплетными (T_1 , T_2), могут обмениваться электронами с молекулой кислорода, оба атома которой находятся в триплетном состоянии, и тогда образуется синглетный кислород, который обладает повышенной реакционной способностью по отношению к органическим веществам. Для нейтрализации (гашения) триплетного состояния хлорофилла и синглетного состояния кислорода в состав пигментов мембран тилакоидов входят каротиноиды, сопряженные двойные связи которых образуют электронное облако, задерживающее электрон с обращенным спином в неактивном состоянии. Излучательный возврат возбужденного триплетного состояния хлорофилла в невозбужденное синглетное возможен только после повторного обращения спина экситона. Это обычно растянуто во времени, и такое свечение называют *фосфоресценцией*. Независимо от длины волны поглощаемого света хлорофилл флуоресцирует и фосфоресцирует только в красном свете.

Цвет листа растения определяется соотношением пигментов в мембранах тилакоидов. Он может меняться от сине-зеленого у ели до темнубурого у некоторых декоративных растений и водорослей, но зеленые хлорофиллы обязательны для всех фотосинтезирующих биохимических систем. Все пигментные молекулы фотосистем поглощают свет и могут обмениваться экситонами, но на группу из примерно 200 молекул хлорофилла и 50 молекул каро-

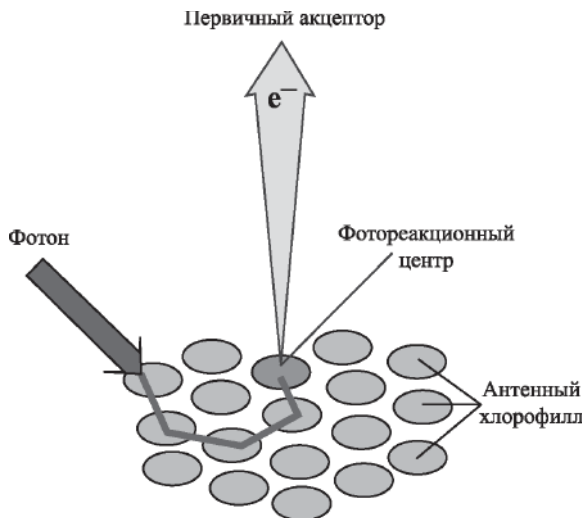


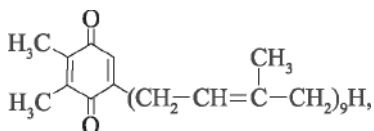
Рис. 9.2. Образование экситона в фотохимическом реакционном центре

тиноидов есть одна пара молекул хлорофилла, связанных в комплекс с белком. Этот хлорофилл лежит в начале электронпереносящей цепи пигментов, превращающих световую энергию в химическую. В отличие от интегрированных в мембрану молекул хлорофилла, называемых *антенными*, комплекс хлорофилла и белка называют *фотохимическим реакционным центром*, или *фотореакционным центром*.

Передача экситона от одной молекулы к другой происходит в области перекрывания электронных облаков молекул: экситон переходит в электронное облако другой молекулы, а его место занимает S_0 -электрон этой молекулы. Возбужденные электроны передаются от одной молекулы антенного хлорофилла к другой до тех пор, пока не оказываются в молекуле хлорофилла фотореакционного центра (рис. 9.2). Отсюда начинается их путь по пигментам мембраны тилакоидов для совершения работы по синтезу АТФ и для превращения NADP^+ в NADPH . Тилакоидные мембраны высших растений содержат фотосистемы двух типов со своим набором антенных молекул и фотохимическими реакционными центрами. Фотосистема I (ФС I) поглощает свет в более длинноволновой области (около 700 нм), и при облучении изолированных хлоропластов монохроматическим светом с этой длиной волны

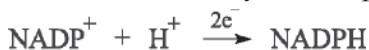
генерируется восстановительный потенциал при невысокой скорости образования кислорода и биосинтеза АТФ. Основная полоса поглощения хлорофиллов фотосистемы II (ФС II) лежит в области 680 нм, и облучение хлоропластов только таким светом приводит к усилению синтеза АТФ с выделением кислорода. Существуют также микроорганизмы, в клетках которых фотосинтез не сопровождается генерированием кислорода. Их мембраны содержат только компоненты фотосистемы I.

Фотосинтезирующие микроорганизмы, обитающие в восстановительных средах, передают электроны возбужденного состояния хлорофилла на NADP^+ , а образовавшийся дефицит электронов восполняет донор, принимающий их от субстратов восстановителей (органические вещества, сероводород или др.). Однако подавляющее большинство растений и использующих энергию света одноклеточных микроорганизмов находятся в условиях, где источники легкодоступных электронов отсутствуют, и они вынуждены с большой затратой энергии отбирать их у воды — вещества, которое в большем или меньшем количестве присутствует повсеместно. В процессе эволюции живого у таких автотрофных клеток возникла дополнительная фотосистема — ФС II, которая за счет лучистой энергии приобретает способность окислять кислород воды. В результате согласованной работы ФС I и ФС II в мембранах хлоропластов возникает ток электронов от воды к NADP^+ через цепь пигментов. В фотосистеме II антенные молекулы хлорофилла передают возбужденные электроны на фотореакционный центр, от которого они поступают на пластохинон (он аналогичен убихинону в мембранах митохондрий):



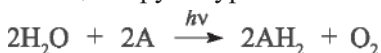
затем на цитохромы **b** и **f** (cyt **b**, cyt **f**) и далее через пластоцианин на фотореакционный центр ФС I. Молекулы хлорофилла в фотохимическом реакционном центре ФС II после передачи возбужденных электронов молекулам пластохинона превращаются в ион-радикалы ($\text{P}_{680}^{+\bullet}$), которые получают электроны от молекул воды через окислительно-восстановительную систему, основанную на металлопротеине, в состав которого входит ион марганца Mn^{2+} . Фотореакционный центр ФС I, представляющий собой белково-хлорофилловый пигмент (P_{700}), отдает электроны ферредоксину — металлопротеину

с атомами железа в окружении сульфидных групп. Эти посредники с помощью фермента ферредоксин-NADP⁺-оксидоредуктазы восстанавливают никотинамидадениндинуклеотидфосфат:



Энергия электронов в ФС II используется также для создания градиента концентраций ионов водорода с подкислением (pH ≈ 4,0) внутренней среды тилакоидов, то есть градиент концентраций создается между внутритилакоидным пространством и стромой. Как и в окислительном фосфорилировании протоны проходят через АТФ-синтазу, но в этом случае ее выступающая из мембраны субъединица F₁ направлена в сторону стромы. Комплекс из ФС I и ФС II работает достаточно гибко. Если нет необходимости в восстановительном потенциале (весь NADP⁺ превратился в NADPH), то электрон от ФС II не поступает в цепь переноса электронов ФС I, а возвращается на пигменты ФС II и в циклическом процессе продолжает участвовать в создании градиента концентрации протонов, обеспечивая работу АТФ-синтазы. Механизм переноса протонов в электрон-переносящей цепи в мембране тилакоида аналогичен тому, который рассматривался при изучении окислительного фосфорилирования (см. стр. 143–144). Здесь также определенную роль играет вода, но если при окислительном фосфорилировании перенос электронов на молекулу кислорода приводил к связыванию четырех протонов с образованием воды, то в фотосинтезе при окислении молекулы воды остаются два протона. В соответствии с этим ферментная система, окисляющая воду и генерирующая кислород, расположена на внутренней стороне мембраны тилакоида и подкисляет его внутреннее пространство.

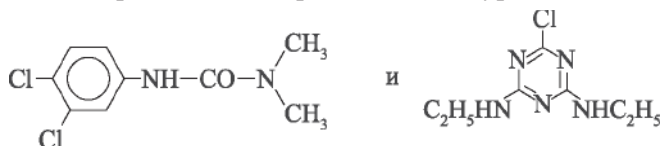
В 1937 г. профессор Кембриджского университета Р. Хилл показал, что выделение кислорода и восстановление диоксида углерода не связаны в единый процесс. Он облучал светом суспензию хлоропластов, выделенных из растительных клеток, в растворе синего красителя, восстановленная форма которого бесцветна. При этом оказалось, что обесцвечивание красителя, сопровождающееся выделением кислорода, идет только на свету, и роль лучистой энергии сводится таким образом к индукции переноса электронов от кислорода воды к акцептору по уравнению:



Это уравнение в общем виде называют *реакцией Хилла*, а А — *реагентом Хилла*. Интенсивность этого упрощенного варианта

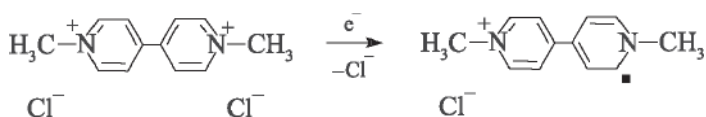
фотосинтеза легко определяется спектрофотометрически по изменению оптической плотности раствора красителя, и поэтому реакцию Хилла часто используют для оценки биологической активности гербицидов, механизм действия которых направлен на ингибирование фотосинтеза. В стандартных условиях можно сравнивать различные фитоактивные вещества без учета факторов детоксикации, активации или транспорта в многоклеточном растении. В хлоропластах роль реагента Хилла выполняет NADP^+ .

Многоступенчатый путь окислительно-восстановительных превращений пигментов в мембранах хлоропластов очень уязвим. Многие вещества могут вмешиваться в этот процесс, блокируя перенос электронов от одного члена цепи к другому. В частности, мочевиновые и триазиновые гербициды — диурон и симазин:

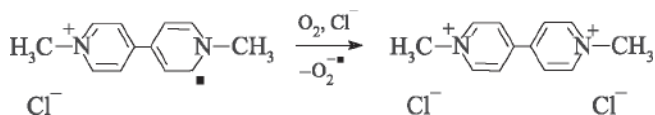


связываются с регуляторным центром белково-хлорофиллового комплекса ФС II и останавливают перенос электронов на пластохинон. Тогда возбужденные электроны переходят на кислород, и превращают его в сильнейший окислитель ион-радикал супероксид — $\text{O}_2^{\bullet-}$, который вызывает окислительную деструкцию липидных составляющих клеточных мембран и гибель растения.

Действие дипиридиллиевых солей основано на вмешательстве в функционирование ФС I. Такие вещества, как паракват, очень близки по потенциалу восстановления к NADP^+ и, конкурируя с ним в активном центре ферредоксин- NADP^+ -оксидоредуктазы, принимают электроны, превращаясь в сравнительно устойчивые окрашенные свободные радикалы (на схеме приведена одна из шести возможных мезомерных структур):

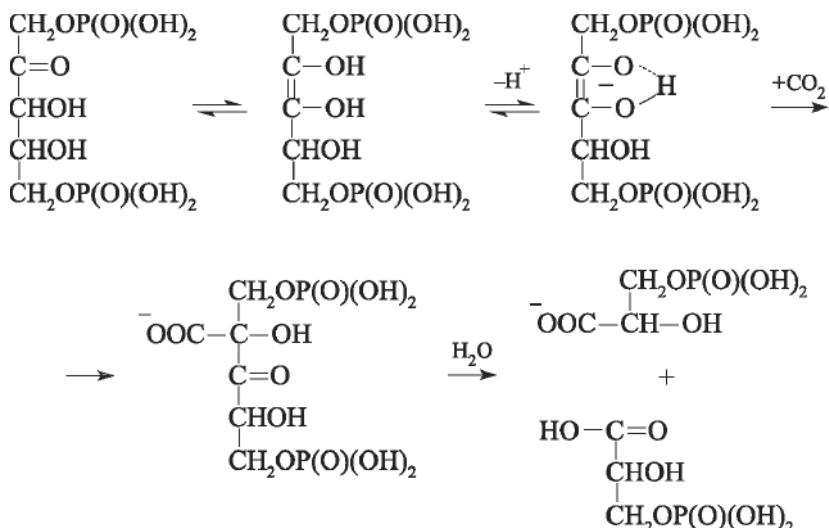


Образовавшийся свободный радикал (у параквата он окрашен в фиолетовый цвет) отдает неспаренный электрон кислороду, возвращается в исходное состояние и может снова принимать электрон в ФС I:



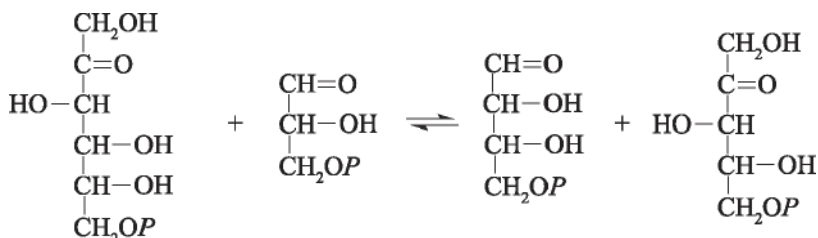
Превратившаяся в супероксид молекула кислорода запускает цепь окислительных превращений в растительных клетках, вызывая их гибель.

Каким же образом идет фиксация диоксида углерода при фотосинтезе? Опыты с меченым по углероду CO_2 показали, что у большинства растений первым соединением с радиоактивной меткой оказывается 3-фосfogлицерат и лишь потом это соединение превращается в другие вещества с бóльшим или меньшим количеством атомов углерода. Было установлено, что образование 3-фосfogлицерата протекает с помощью фермента рибулозодифосфат-карбоксилазы, локализованной на поверхности тилакоидных мембран. Этот самый распространенный фермент биосферы имеет молекулярную массу около 550 кДа, и в его состав входят 8 каталитических и 8 регуляторных субъединиц. Химизм процесса представляется следующим образом: енольная форма 1,5-дифосфорибулозы образует стабильный нуклеофильный анион, который при ферментативном катализе реагирует с диоксидом углерода с образованием аниона фосфорилированной β -кетокислоты, разлагающейся водой с разрывом C—C-связи между вторым и третьим углеродными атомами углеродного скелете рибулозы:

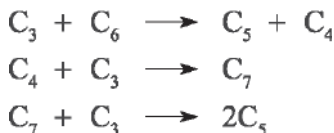


Дальнейшие превращения молекул фосfogлицерата описываются циклом Кальвина. Двенадцать молекул фосfogлицерата, образовавшихся в результате присоединения шести молекул диокси-

да углерода к шести молекулам дифосфорибулозы, фосфорилируются АТФ по карбоксильной группе и восстанавливаются действием NADPH до фосфоглицеринового альдегида. После этого пять молекул фосфоглицеринового альдегида изомеризуются в фосфат диоксиацетона. По реакции, обратной начальному этапу гликолиза, из трех молекул фосфоглицеринового альдегида и трех молекул фосфата диоксиацетона образуются три молекулы 6-фосфофруктозы. Одна молекула 6-фосфофруктозы выводится из цикла и включается в обычные метаболические процессы (например, идет на биосинтез крахмала), а две оставшихся реагируют с двумя молекулами 3-фосфоглицеринового альдегида по схеме



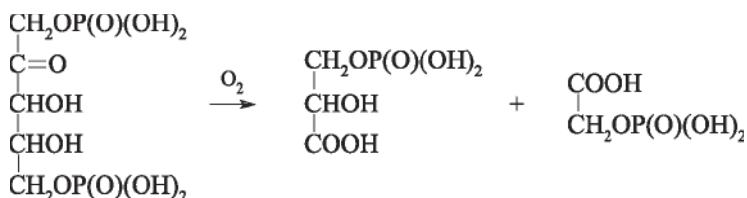
Эта катализируемая транскетолазой реакция приводит к образованию эритрозо-4-фосфата и ксилулозо-5-фосфата. Две молекулы эритрозо-4-фосфата и две молекулы фосфата диоксиацетона при катализе альдолазой реагируют с образованием двух молекул соответствующей дифосфогептулозы, гидролизующейся до 7-фосфоседогептулозы. Затем две молекулы 7-фосфоседогептулозы и две молекулы фосфоглицеринового альдегида при катализе транскетолазой по аналогии с приведенной выше схемой превращаются в две молекулы 5-фосфорибулозы и две молекулы 5-фосфоксилулозы, а четыре молекулы 5-фосфоксилулозы (две из этой и две из предыдущей реакции) при катализе соответствующей эпимеразой также превращаются в 5-фосфорибулозу. В общем виде это представляется схемой:



Все эти превращения относятся к реакциям, для протекания которых свет уже не нужен, их протекание обеспечивается накопленными в процессе фотосинтеза аденозинтрифосфатом и NADPH,

поэтому их называют *темновыми реакциями*. Аллостерическим ферментом в реакции фиксации диоксида углерода является рибулозодифосфаткарбоксилаза. Ее положительными эффекторами являются ионы магния, протоны и NADPH, а это означает, что несмотря на кажущуюся независимость от света процесс фиксации CO_2 с максимальной скоростью идет только на свету, так как повышение кислотности внутритилакоидного пространства и накопление восстановительного потенциала непосредственно связаны с поглощением света пигментами мембраны тилакоида.

К числу темновых реакций относится и дыхание растений — комплекс окислительных превращений образовавшихся в ходе фотосинтеза веществ. Но есть и световое дыхание, при котором образуется фосfogликолят. Оказалось, что рибулозодифосфаткарбоксилаза может катализировать также взаимодействие рибулозодифосфата с кислородом, в ходе которого образуется фосfogлицерат и фосfogликолят:



В солнечный безветренный день концентрация диоксида углерода в припочвенных слоях воздуха резко снижается в результате фиксации его растениями, и тогда с дифосфатом рибулозы вместо диоксида углерода начинает реагировать кислород. Образовавшаяся при этом фосfogликолевая кислота не может ассимилироваться в углеводы, и ее дальнейшее превращение идет по катаболическому пути. В результате светового дыхания при казалось бы благоприятных погодных условиях растения не накапливают биомассу и могут ее даже терять. В условиях жаркого климата очень часто максимальная инсоляция совпадает с безветренной погодой, поэтому многие южные растения используют вспомогательный путь фиксации диоксида углерода, когда первичным продуктом, в который ассимилируется диоксид углерода, является щавелевоуксусная кислота. Осуществляющий этот процесс фермент не переключается на работу с кислородом. После этого в растительных клетках оксалоацетат декарбоксилируется, и выделяющийся

диоксид углерода создает достаточно высокую локальную концентрацию в клетках растения, обеспечивая эффективную работу рибулозодифосфаткарбоксилазы и протекание цикла Кальвина. В отличие от C_3 -растений, у которых первичным продуктом присоединения CO_2 является фосфоглицерат, такие растения называют C_4 -растениями (в молекуле оксалоацетата четыре атома углерода). К ним относятся, например, кукуруза, сахарный тростник и просо.

Основные анаболические процессы

10.1. Глюконеогенез

Главным быстро мобилизуемым источником энергии в клетках является глюкоза, запасы которой находятся в виде крахмала и гликогена. В крови человека поддерживается постоянная концентрация глюкозы (около 5 ммоль/л), но небольшие отклонения от этого нормального уровня возможны при интенсивной работе или после еды. Глюкоза поступает в клетки из-за градиента концентраций через интегрированный в мембрану транспортный белок. Уровень глюкозы в крови поддерживается с помощью гормона поджелудочной железы инсулина и ряда других гормонов.

Инсулин имеет пептидную природу, он состоит из 51 аминокислоты, но секреторные клетки (островки Лангерганса) производят проинсулин, который у разных животных содержит от 78 до 86 аминокислотных составляющих в виде одной цепочки с тремя дисульфидными связями. Активация с образованием самого инсулина происходит путем гидролитического расщепления молекулы проинсулина с элиминированием из нее центрального участка (С-цепь) с сохранением дисульфидных связей в образовавшемся активном двухцепочечном полипептиде (А- и В-цепи).

Инсулин не проходит через клеточную мембрану, но он связывается с белком-переносчиком глюкозы и ускоряет ее диффузию в клетку. При избытке глюкозы она превращается в гликоген, а при интенсивном расходовании глюкозы она образуется из гликогена. При недостатке инсулина или при нарушении механизма поступления глюкозы в клетки организм повышает ее концентрацию в крови для того, чтобы увеличить движущую силу диффузии за счет градиента концентраций. Однако это приводит и к интенсивному выделению глюкозы почками (сахарный диабет). Испытывающие дефицит по глюкозе клетки начинают синтезировать ее из аминокислот сократительных белков, подключая к этому окислительные превращения жирных кислот. В результате этого мышечные ткани диабетиков атрофируются, и разрастается жировая ткань.

Для клеток нервной системы, почек, семенников, тканей эмбриона глюкоза является единственным поставщиком энергии. Важно, что для транспорта глюкозы в нейроны инсулин не нужен, и мозг диабетиков, как и мозг здоровых людей, расходует около 120 г глюкозы в сутки.

Роль глюкозы в метаболизме очевидна, но возможности депонирования ее в виде гликогена ограничены: в организме взрослого человека содержится всего лишь несколько сот граммов этого полисахарида. Поступление глюкозы с пищей (в основном в виде крахмала) не всегда соответствует действительным потребностям и поэтому организм животных в значительной мере зависит от образования глюкозы из поступающих с пищей веществ. У теплокровных избыток пищевых веществ закладывается в жировую ткань, а при недостатке глюкозы в пище на ее биосинтез расходуются белки, поскольку образующийся из жирных кислот ацетил-СоА не может превращаться в глюкозу. Ключевое вещество цикла Кребса — оксалоацетат — также не может быть получен из ацетил-СоА, поэтому правило диетологии гласит: жиры «сгорают в пламени» углеводов.

Напомним три основных положения, относящиеся к течению метаболических процессов:

1. Катаболические и анаболические пути превращения одного и того же вещества различны. Это означает, что есть по крайней мере одна стадия, по которой они не совпадают.
2. Катаболический и анаболический пути превращения одного и того же вещества контролируется различными регуляторными ферментами, но регуляция биосинтеза и биodeградации одного и того же вещества взаимосвязаны.
3. Анаболические процессы расходуют АТФ, поставляемый катаболическими процессами. Поскольку эффективность прямых и обратных превращений всегда менее 100%, на анаболический обратный путь расходуется большее количество АТФ, чем поставляемое прямым катаболическим. Это обеспечивает необратимость метаболических превращений.

При изучении процесса гликолиза было установлено, что конечный продукт анаэробного превращения глюкозы — молочная кислота — может снова превращаться в глюкозу.

В процессе гликолитического превращения глюкозы образованию молочной кислоты предшествует катализируемое пируваткиназой образование пирувата из фосфоенолпирувата с генерированием АТФ (АТР):



Эта реакция необратима по термодинамическим показателям, поскольку прямая реакция сопровождается выделением энергии (около 7,5 ккал/моль). Поэтому для глюконеогенеза образование фосфоенолпирувата из пирувата включает обходной путь. Сначала пируват переносится в матрикс митохондрий и карбоксилируется биотинзависимым ферментом с образованием оксалоацетата. Для его переноса в цитозоль, где идет биосинтез глюкозы, оксалоацетат восстанавливается в малат (анион яблочной кислоты), для которого существует специальная транспортная система, и уже в цитозоле малат дегидрируется с образованием оксалоацетата. Щавелевоуксусная кислота в енольной форме фосфорилируется действием ГТФ в присутствии фосфоенолпируваткарбоксикиназы с одновременным декарбоксилированием:



Хотя изменение стандартной свободной энергии при этом составляет +0,2 ккал/моль, в реальных условиях клетки этот процесс сопровождается выделением энергии (–6 ккал/моль), что делает его необратимым.

В обращении процессов гликолиза фосфоенолпируват гидратируется, образовавшаяся 2-фосфоглицериновая кислота изомеризуется с переносом фосфатного остатка на концевую гидроксильную группу и восстанавливается до 3-фосфоглицеринового альдегида, половина которого изомеризуется в фосфат диоксиацетона, после чего под действием альдолазы из фосфоглицеринового альдегида и фосфата диоксиацетона образуется 1,6-дифосфат фруктозы. При катаболическом гликолизе идет фосфорилирование глюкозы и фосфотриозы аденозинтрифосфатом, но обратный процесс образования АТФ из дифосфата фруктозы или фосфоглюкозы и АДФ невозможен по термодинамическим причинам, поэтому при глюконеогенезе фосфатные группы отщепляются гидролитически.

Если суммарный процесс гликолиза представляется схемой:



то на обратный процесс затрачивается уже втрое больше АТФ, чем образуется в прямом процессе (поэтому около 15% образовавшейся в результате гликолиза молочной кислоты идет на энергетическое обеспечение ее превращения в глюкозу):

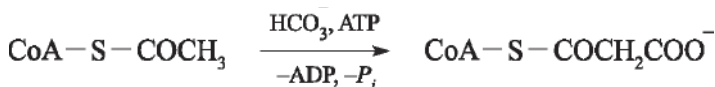


Процесс глюконеогенеза начинается с превращения пирувата в оскалоацетат, катализируемого пируваткарбоксилазой — аллостерическим ферментом, активируемым ацетилкоферментом А. Это означает, что при накоплении в клетке неиспользуемого ацетилкофермента А процесс биосинтеза глюкозы из пирувата интенсифицируется.

В глюкозу и далее в гликоген могут превращаться все промежуточные продукты цикла Кребса. Исходными соединениями для образования глюкозы могут быть и многие аминокислоты. К глюконеогенным аминокислотам относятся аланин, глютаминовая, аспарагиновая кислота и их амиды, превращающиеся (амиды после гидролиза) трансаминазами в пировиноградную, кетоглутаровую и щавелевоуксусную кислоты. Кроме того, эти кетокислоты образуются и из других аминокислот. Особенно интенсивно идет превращение аминокислот в глюкозу при недостатке инсулина.

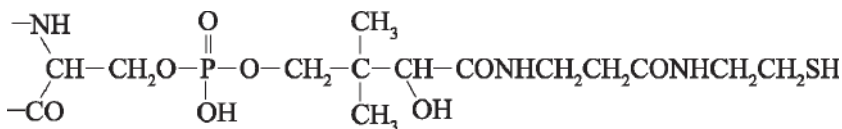
10.2. Биосинтез жирных кислот

Биодеградация (β-окисление) и биосинтез жирных кислот протекают с участием двухуглеродных ацетильных фрагментов. На начальном этапе биосинтеза жирных кислот идет катализируемое ацетил-СоА-карбоксилазой карбоксилирование ацетил-СоА с образованием малонил-СоА:

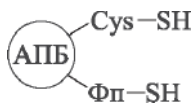


Биотинзависимый фермент ацетил-СоА-карбоксилаза — это регуляторный фермент, определяющий скорость образования высших кислот. Положительным эффектором ацетил-СоА-карбоксилазы служит цитрат. Смысл этой стартовой реакции заключается в том, чтобы повысить СН-кислотность исходного продукта и облегчить реакцию наращивания углеродной цепи в последующей реакции С-ацилирования, протекающей по типу реакции сложноэфирной конденсации.

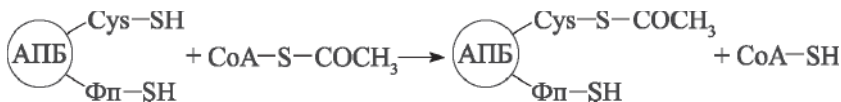
Биосинтез жирных кислот осуществляется в мультиферментной системе (она включает семь ферментов). Растущая ацильная цепь связана ковалентной связью с ацилпереносящим белком (АПБ), занимающим центральное положение в этой системе. Реакционный центр АПБ, как и в коферменте А, представлен сульфгидрильной группой цистеина, который образует амидную связь с пантотеновой кислотой, но в отличие от кофермента А этот фрагмент АПБ (Фп-SH, Фп — фосфопантетеил) связан фосфатной группой не с аденозиновой составляющей, а с гидроксиметильной группой серинового фрагмента в молекуле АПБ:



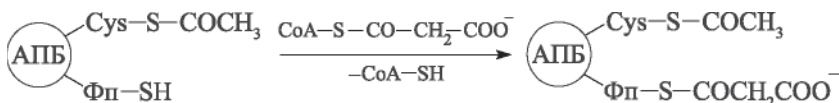
В синтезе жирных кислот принимает участие еще одна сульфгидрильная группа молекулы АПБ (Cys-SH), но она принадлежит цистеиновому фрагменту белковой цепи. Этот фермент вместе с участвующими в биосинтезе жирной кислоты функциональными группами может быть схематически изображен следующим образом:



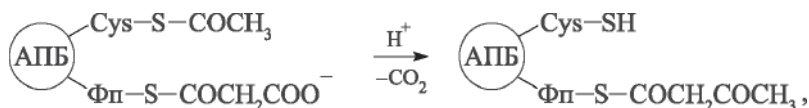
Синтез жирной кислоты на мультиферментном комплексе начинается с переноса ацетильной группы с ацетилкофермента А на цистеиновую тиольную группу АПБ при катализе АПБ-ацетилтрансферазой:



Затем АПБ-малонилтрансфераза переносит на вторую тиольную группу остаток малоновой кислоты от малонил-CoA:

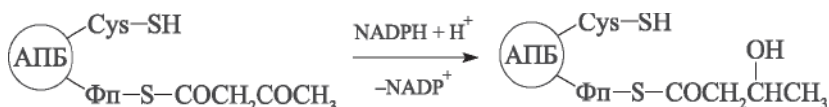


После этого ацетильная группа по схеме внутримолекулярной сложноэфирной конденсации переносится с цистеинового остатка на фрагмент малоновой кислоты с декарбоксилированием. Этот процесс катализируется 3-кетоацил-АПБ-синтазой:

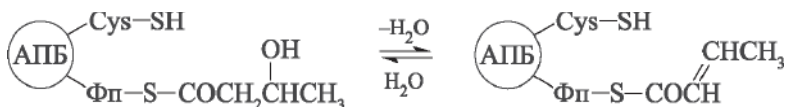


то есть трехуглеродный остаток малоновой кислоты не полностью участвует в биосинтезе жирных кислот. Он теряет карбоксилатную группу, превращающуюся в диоксид углерода, который снова включается в процесс для активации другой молекулы ацетилкофермента А.

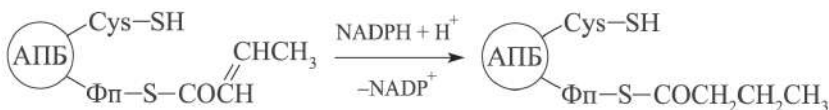
В последующих превращениях происходит восстановление ацетоацетильного остатка. Сначала NADPH восстанавливает кетогруппу до гидроксильной группы с образованием *D*-3-гидроксибутирилзамещенного АПБ:



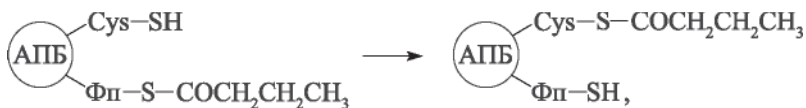
Интересно, что при β -окислении жирных кислот гидроксиацил-кофермент А образуется в результате гидратации двойной связи, при этом асимметричный атом углерода с гидроксильной группой имеет *L*-конфигурацию, а при биосинтезе жирных кислот в результате восстановления кетогруппы образуется *D*-3-гидроксибутирилзамещенный АПБ, который дегидратируется с образованием *транс*- Δ^2 -бутеноил-АПБ:



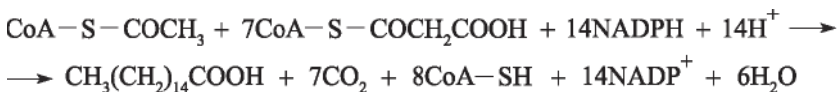
Из этого можно сделать вывод о том, что гидратазы катаболического и анаболического путей превращения жирных кислот различны даже с учетом обратимости реакций гидратации или дегидратации, так как они различаются по одному из субстратов. При восстановлении двойной связи *транс*- Δ^2 -бутеноил-АПБ образуется бутирил-АПБ:



После этого образовавшийся остаток масляной кислоты переносится на цистеиновую тиольную группу



а на фосфопантетеиновую тиольную группу переносится новый малонильный остаток, и приведенный выше цикл превращений повторяется с ацилированием малонильного остатка уже не ацетильным, а бутирильным фрагментом. Этот процесс повторяется до тех пор, пока в ацильном остатке не окажется шестнадцать атомов углерода, то есть наращивание цепи идет до образования остатка пальмитиновой кислоты, который отщепляется гидролитически. Пальмитиновая кислота представляет собой конечный продукт биосинтеза в этом комплексе ферментов. Суммарно образование пальмитиновой кислоты выражается уравнением:

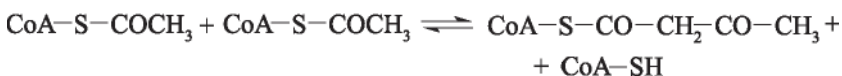


В состав мультиферментного комплекса, на котором протекают реакции биосинтеза пальмитиновой кислоты, входят следующие ферменты: E1 — ацилпереносящий белок (АПБ), E2 — ацетилтрансфераза, E3 — малонилтрансфераза, E4 — 3-кетоацил-АПБ-синтаза, E5 — 3-кетоацил-АПБ-редуктаза, E6 — 3-гидроксиацил-АПБ-дегидратаза, E7 — еноил-АПБ-редуктаза.

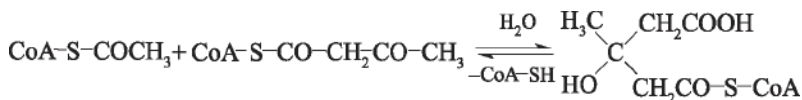
Другие жирные кислоты образуются в результате наращивания или укорочения цепи пальмитиновой кислоты и реакций дегидрирования. В частности, находящаяся в клетках печени дегидрогеназа вызывает превращение стеариновой кислоты в олеиновую. Полиненасыщенные жирные кислоты синтезируются в основном клетками растений. В организм животных многие из них должны поступать с пищей.

10.3. Биосинтез терпеноидов

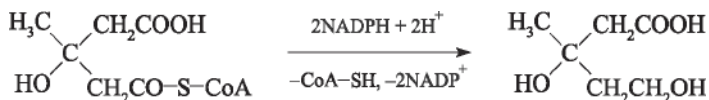
Еще один анаболический путь превращения ацетил-КоА представлен биосинтезом терпеноидов. Он начинается с образования ацетоацетил-КоА по схеме сложноэфирной конденсации, катализируемой тиолазой:



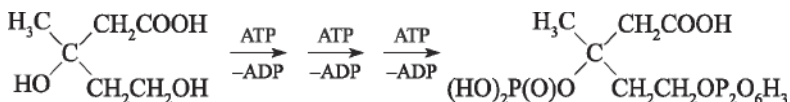
Затем другая молекула ацетил-СoА реагирует с ацетоацетил-СoА по схеме альдольной конденсации с образованием 3-гидрокси-3-метилглутарил-СoА при катализе соответствующей синтазой:



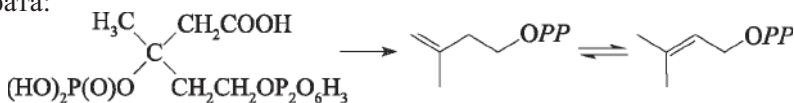
После этого гидроксиметилглутарил-СoА-редуктаза переводит этот тиоэфир дикарбоновой кислоты в дигидроксикарбоновую кислоту, называемую мевалоновой кислотой:



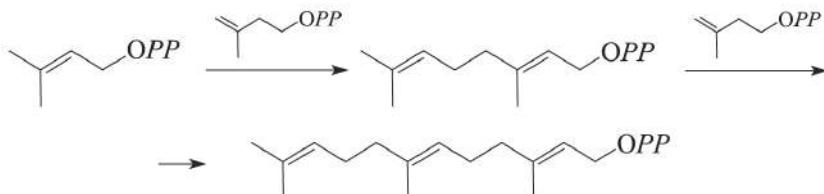
Соответствующие киназы переносят на гидроксильные группы этого вещества один фосфатный и один пиррофосфатный фрагмент от трех молекул АТФ:



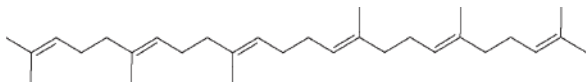
Эта фосфорилированная мевалоновая кислота отщепляет фосфат и декарбоксилируется с образованием изопентенилпиррофосфата:



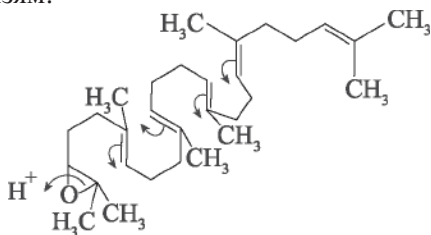
который по схеме гидрирования-дегидрирования может превращаться в диметилаллилпиррофосфат. Затем идет последовательное алкилирование изопентенилпиррофосфата: сначала из изопентенилпиррофосфата и диметилаллилпиррофосфата образуется геранилпиррофосфат, далее изопентенилпиррофосфат алкилируется геранилпиррофосфатом с образованием фарнезилпиррофосфата:



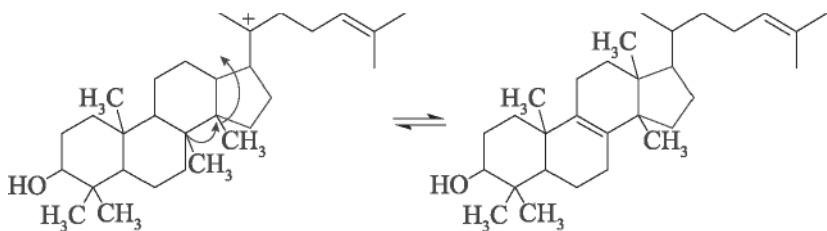
При биосинтезе стероидов две молекулы фарнезилпирофосфата соединяются по атомам углерода, несущим пирофосфатные остатки (промежуточным продуктом является прескваленпирофосфат с циклопропановым фрагментом), и образуется сквален:



Сквален окисляется скваленэпоксидазой с образованием 2,3-эпоксида, который в активном центре скваленоксидциклазы сворачивается в структуру, обеспечивающую образование тетрациклического ланостерина в результате протонирования, раскрытия эпоксидного цикла и следующих за этим атак карбокатионов по двойным связям:



Образовавшийся в результате циклизации карбокатион стабилизируется, отщепляя протон, и превращается в ланостерин с одновременной миграцией двух метильных групп:



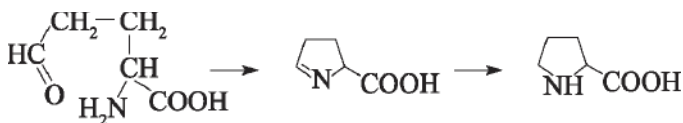
Далее идут окислительные превращения с отщеплением метильных групп, гидрированием двойных связей, дегидрированием с образованием двойных связей и другие реакции, приводящие к образованию холестерина, эргостерина и других стероидных липидов, витамина D, стероидных гормонов, желчных кислот.

Изопентенилпирофосфат и диметилаллилпирофосфат являются также исходными продуктами для образования изопреноидных заместителей в витаминах E и K, в убихиноне; из них образу-

ются витамин А, каротиноиды, каучук и другие полиизопрены, фитольная компонента хлорофилла и другие полипренольные остатки.

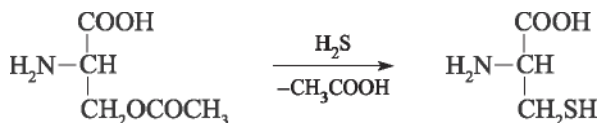
10.4. Биосинтез аминокислот

Растения и микроорганизмы синтезируют все белковые (протеиногенные) аминокислоты и большое число небелковых аминокислот, участвующих в биосинтезе самых разных биогенных соединений, включая, антибиотики, токсины и другие защитные молекулы. При изучении метаболизма выше уже рассматривалось образование аминокислот из α -кетокислот в результате действия трансаминаз. Так, например, биосинтезы аланина из пирувата, а также глутаминовой кислоты, глутамина, аспарагиновой кислоты и аспарагина из кетоглутарата и, соответственно, оксалоацетата протекают по схеме, представленной на стр. 133, на примере превращения кетоглутаровой кислоты в глутаминовую. Достаточно простая схема реализуется при образовании пролина из глутаминовой кислоты через ее γ -полуальдегид с циклизацией в карбоксизамещенный пирролин и с восстановлением C=N-связи:



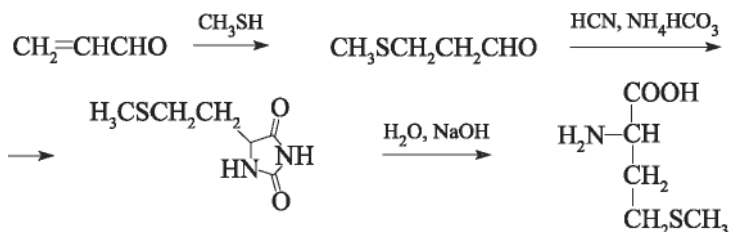
Так же легко прослеживается путь от глицеринового альдегида к серину, а глицин образуется из серина в результате отщепления концевой гидроксиметильной группы в виде формильного фрагмента под действием тетрагидрофолатзависимого фермента (см. стр. 94).

В растениях из серина образуется также цистеин в результате алкилирования сероводорода О-ацетилсерином в присутствии цистеинсинтазы:



В свою очередь цистеин в растениях служит источником серы для образования метионина, а у животных источником серосодержащих соединений служит уже эта незаменимая аминокислота. Для

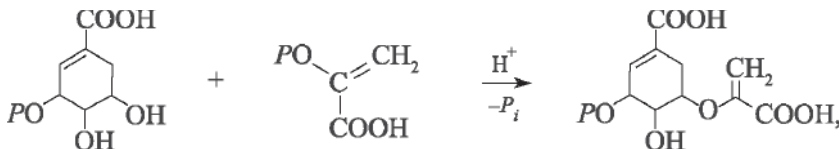
получения сбалансированных по аминокислотному составу кормов метионин производят в промышленном масштабе по схеме:



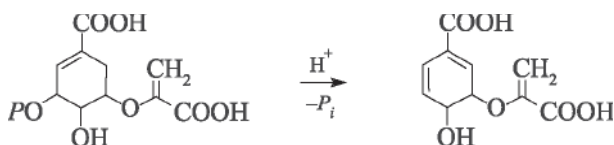
Окислением пропилена кислородом воздуха в присутствии катализатора на основе оксида ванадия получают акролеин, который присоединяет метилмеркаптан по олефиновой двойной связи с образованием β-метилмеркаптопропионового альдегида. Этот альдегид вступает в реакцию Бухерера–Бергса и превращается в 5-(2-метилмеркаптоэтил)гидантоин, который гидролизуется в присутствии щелочи при нагревании под давлением и превращается в *D,L*-метионин. Рацемический метионин можно разделить на стереоизомеры способом Гринштейна (ацелирование по аминогруппе и ферментативный гидролиз ацетилазой, избирательно гидролизующей ацелированный *L*-метионин), но для метионина эта операция не является обязательной, поскольку его *D*-изомер нетоксичен.

Рассмотрение синтетических путей, ведущих ко всему разнообразию протеиногенных и небелковых аминокислот, можно ограничить схематическим представлением образования в растениях фенилаланина и аминокислот с алифатическими заместителями (валина, лейцина, изолейцина), поскольку на блокировке их биосинтеза основано гербицидное действие самых распространенных средств борьбы с сорной растительностью — глифосата и сульфонилгетерилмочевин.

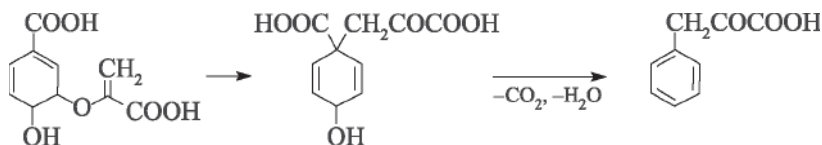
Образование всех ароматических соединений в растениях начинается с шикимовой кислоты, образующейся в ряде последовательных реакций из *D*-эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата. 5-Фосфошикимовая кислота реагирует с фосфоенолпируватом при катализе 3-еноилпирувил-5-фосфошикиматсинтазой с образованием 3-еноилпирувил-5-фосфошикимовой кислоты:



которая отщепляет фосфат и превращается в хоризмовую кислоту:

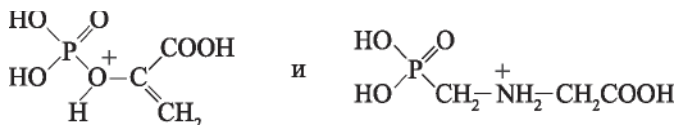


В результате внутримолекулярного алкилирования хоризмовая кислота превращается в префеновую кислоту, которая после декарбоксилирования и дегидратации превращается в фенилпировиноградную кислоту:



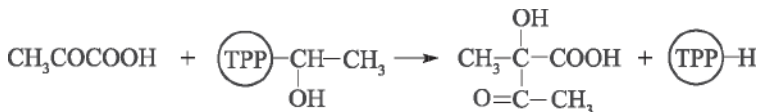
Декарбоксилирование и дегидрирование префеновой кислоты приводит к 4-гидроксифенилпировиноградной кислоте. Затем фенилпировиноградная кислота действием трансаминаз превращается в фенилаланин, а 4-гидроксифенилпировиноградная кислота — в тирозин. Из хоризмовой кислоты через стадию образования анраниловой кислоты в клетках растений образуется триптофан.

Взаимодействие фосфошикимовой кислоты с фосфоенолпируватом — одна из немногих биохимических реакций, где фосфоенолпируват реагирует в протонированном виде. Предполагалось, что используемый в качестве средства борьбы с сорной растительностью (гербицида) фосфонометилглицин (глифосат) является антиметаболитом протонированного фосфоенолпирувата:

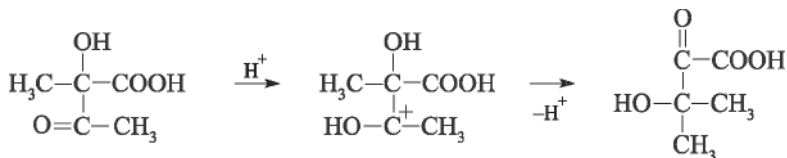


Однако более детальные исследования показали, что сайты связывания этих веществ различны, то есть речь идет о неконкурентном ингибировании 3-еноилпирувил-5-фосфошикиматсинтазы фосфонометилглицином. Обработка растений этим веществом приводит к их гибели в течение нескольких часов из-за нарушения биосинтеза ароматических кислот.

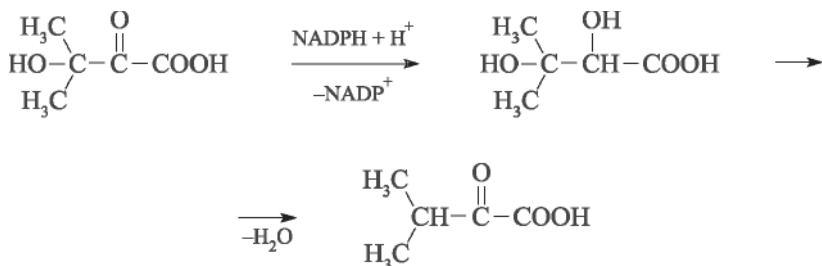
Биосинтез валина основан на реакции алкилирования пирувата по карбонильному атому углерода гидроксиэтильным остатком, образующимся при декарбоксилировании другой молекулы пирувата на тиаминпирофосфате (TPP), в активном центре ацетолактатсинтазы:



Молекула ацетолактата претерпевает внутримолекулярную перегруппировку: после протонирования атома кислорода карбонильной группы происходит миграция метильной группы в виде карбаниона на карбонильный атом углерода, а протон отходит от гидроксильной группы. Продуктом этой реакции становится 2-кето-3-гидроксиизовалериановая кислота:

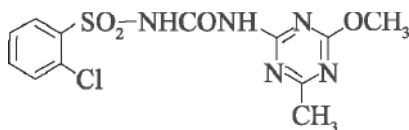


Образовавшаяся гидроксикетокислота в результате восстановления NADPH-зависимым ферментом превращается в 2,3-дигидроксиизовалериановую кислоту, которая дегидратируется и превращается в α -кетоизовалериановую кислоту. Трансаминаза переводит ее в валин:



α -Кетоизовалериановая кислота является также исходным продуктом для биосинтеза лейцина. По аналогии с образованием валина, но с α -кетобутиратом, образующимся из треонина, идет биосинтез изолейцина.

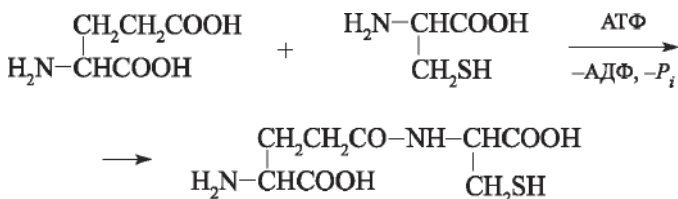
Ключевой фермент в биосинтезе алифатических аминокислот — ацетолактатсинтаза — блокируется сульфонилгетерилмочевинами, например хлорсульфуроном (гербицид Глин):



Это средство борьбы с сорной растительностью, относящееся к третьему поколению агрохимических препаратов, имеет нормы расхода около 5 г/га. Получено также большое число его структурных аналогов, которые более избирательны и более легко подвергаются метаболической деградации в растениях и в почве.

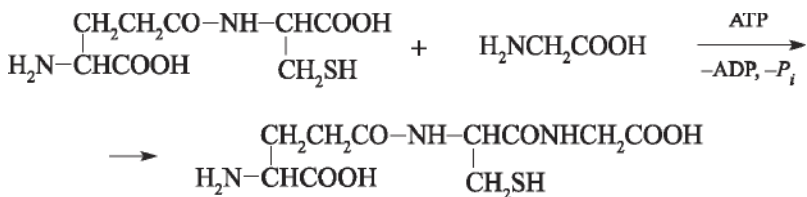
10.5. Биосинтез пептидов и белков

Биоактивные пептиды, выполняющие роль специфических внутриклеточных реагентов (например, глутатион), нейромедиаторов или гормонов, синтезируются различными путями. Если в клетке должен поддерживаться постоянный уровень какого-либо короткоцепочечного пептида, то синтез его идет по обычной схеме ферментативного катализа путем последовательного ацилирования аминокислот с помощью универсального источника свободной химической энергии аденозинтрифосфата. Так, например, глутатион, который содержится во всех живых клетках и является носителем до 90% всех небелковых тиольных групп в клетках млекопитающих, синтезируется в две стадии. Сначала глютаминовая кислота и цистеин при катализе γ -глутамилцистеинсинтетазой в присутствии АТФ реагируют с образованием γ -глутамилцистеина; АТФ при этом разлагается на АДФ и фосфат:



Промежуточным продуктом в этой реакции является смешанный ангидрид глютаминовой кислоты по γ -карбоксильной группе и аденозиндифосфата по концевому фосфатному остатку. На вто-

рой стадии по аналогичной схеме γ -глутамилцистеин и глицин реагируют в присутствии АТФ при катализе глутатионсинтетазой с образованием этого необычного трипептида:



Однако чаще всего небольшие пептидные молекулы образуются путем гидролитического расщепления полипептидов или белков неизбирательными или специфическими ферментами. В качестве примера можно привести образование ангиотензина, октапептида с гормональной активностью, который участвует в регуляции кровяного давления. В печени образуется сывороточный белок ангиотензиноген, из которого под действием фермента ренина в почечной ткани образуется неактивный декапептид ангиотензин I (Асп–Арг–Вал–Тир–Иле–Гис–Про–Фен–Гис–Лей). При появлении необходимости в активном ангиотензине II с С-конца ангиотензина I ангиотензин-I-конвертирующий фермент, относящийся к гидролазам, отщепляет два аминокислотных фрагмента Гис–Лей. На блокировке этого избирательного фермента основано действие современных средств для лечения гипертонии — энала (эналаприла), каптоприла (капотена) и др. Такой путь образования гормонов пептидной природы позволяет ЦНС быстро и эффективно регулировать их содержание в крови. Аналогично поддерживается уровень такого важного пептидного гормона, как инсулин (см. стр. 161).

Еще один пример представлен образованием тетрапептида, стимулирующего высшую нервную деятельность, из адренокортикотропного гормона (АКТГ). Аминокислотная последовательность этого секретируемого гипофизом гормона, состоящего из 39 аминокислот, включает последовательность Мет–Глу–Гис–Фен (от четвертой до седьмой аминокислоты с N-конца). Соответствующий этой последовательности тетрапептид в незначительном количестве образуется при протеолизе АКТГ. На его основе получено одно из немногих лекарств пептидной природы с широким спектром действия — семакс (Мет–Глу–Гис–Фен–Про–Гли–Про).

Принцип последовательного соединения аминокислот в белковые молекулы, включающие чаще всего несколько сотен аминокислот, при катализе избирательными ферментами на каждой стадии невозможен, поскольку число таких ферментов превысит все разумные пределы. Это тем более очевидно, что последовательность аминокислот в белке закодирована в молекуле мРНК, согласование кодонов которой с активными центрами каждого из таких ферментов привело бы к еще большему усложнению задачи. Вот почему для синтеза белков живая природа использует уникальный механизм, реализуемый в рибосомах, состоящих из двух субъединиц, каждая из которых включает несколько десятков белков и одну или две молекулы РНК (так называемые рибосомальные РНК, рРНК); на долю рРНК в рибосомах приходится около 65% их общей массы. Для узнавания аминокислоты комплексом рибосомы и мРНК служат транспортные РНК (тРНК), к которым избирательные ферменты присоединяют соответствующие белковые аминокислоты.

Каждая молекула тРНК состоит из примерно 80 нуклеотидов, многие из которых модифицированы (чаще всего они метилированы). Спаренные основания в молекулах тРНК образуют четыре коротких спирали, три из которых заканчиваются петлями. Если молекулу тРНК расположить в плоскости, то она будет иметь форму клеверного листа, который, правда, больше похож на крест. Начало и конец линейной молекулы тРНК образуют спираль, которой противостоит спираль с петлей, включающей антикодон, предназначенный для связывания с кодоном мРНК. Концевой участок тРНК (чаще всего он состоит из четырех нуклеотидов, где три последних это –ССА) не вовлечен в образование водородных связей с начальным участком тРНК, это так называемый 3'-конец.

Синтез белка начинается с того, что карбоксильная группа аминокислоты ацилирует гидроксильную группу в рибозидном фрагменте тРНК с 3'-конца соответствующей этой аминокислоте тРНК. Активация карбоксильной группы идет по обычному механизму с участием АТФ, превращающегося при этом в АМФ и пирогосфат. Поскольку пирогосфат разлагается пирогосфатазой на две молекулы фосфата, этот процесс эквивалентен расходованию двух молей АТФ. Катализ этой реакции осуществляют аминоацил-тРНК-синтетазы, специфичные по каждой аминокислоте и по каждой соответствующей ей тРНК (для некоторых аминокислот может быть несколько тРНК). После образования аминоацилзамещенной тРНК аминокислота больше не участвует в распознавании, то есть

каталитический центр рибосом, предназначенный для образования пептидных связей, неизбирателен, он универсален для всех связанных с соответствующими тРНК аминокислотных остатков.

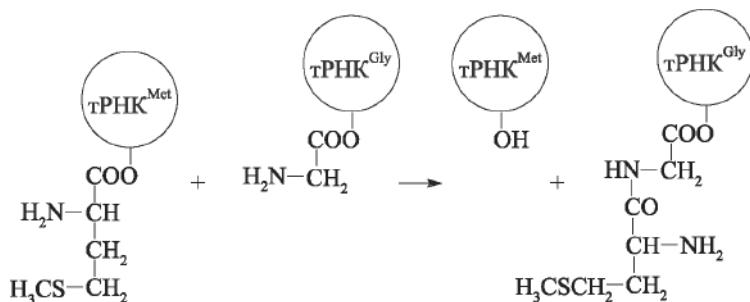
Организуемая поверхность (мРНК) и аминокислотзамещенные тРНК встречаются на рибосомах, где и идет сборка полипептидной цепи. В клетках животных основная масса рибосом связана с эндоплазматическим ретикуломом («шероховатый» ретикулум).

В синтезе белка выделяют три стадии — инициация, элонгация и терминация. Синтез белковой молекулы начинается с иницирующей тРНК, связанной с N-формилметионином в прокариотических клетках и с метионином в эукариотических клетках. Это означает, что в эукариотических клетках кроме тРНК^{Met}, предназначенной для введения в состав белка молекулы метионина в процессе элонгации, есть еще одна тРНК^{Met}, принимающая участие в инициации синтеза белка.

На большой и на малой субъединицах рибосомы есть два центра связывания, обозначаемые буквами Р и А: пептидилсвязывающий центр (Р) и аминокислотсвязывающий центр (А). Для образования синтезирующего белок комплекса от рибосомы отходит малая субъединица и связывается с мРНК. Затем к комплексу мРНК и малой субъединицы рибосомы присоединяется иницирующая метионил-тРНК^{Met} (напомним, что у прокариот это формилметионил-тРНК^{fMet}), то есть специфичность связывания определяется антикодоном на метионил-тРНК^{Met} и соответствием этой иницирующей аминокислотированной тРНК пептидилсвязывающему центру. После этого с участием гуанозинтрифосфата, разлагающегося при этом на гуанозиндифосфат и фосфат, происходит присоединение большой субъединицы рибосомы к комплексу, состоящему из малой субъединицы рибосомы, мРНК и иницирующей метионил-тРНК^{Met}. В этом сложном процессе принимают участие белковые факторы инициации (IF, IF2 и IF3).

Далее идет процесс элонгации, когда к аминокислотсвязывающему центру в соответствии с кодоном на мРНК подходит другая соответствующая ему тРНК, несущая аминокислотный остаток. В этом снова участвуют вспомогательные белки, называемые факторами элонгации, а энергию для связывания снова предоставляет ГТФ. В состав рибосомы входит фермент пептидилтрансфераза, в активном центре которой оказываются ацилированные аминокислотами 3'-концы иницирующей метионил-тРНК^{Met} и второй тРНК. При катализе этим ферментом метионильный остаток ацили-

рует аминогруппу связанной с тРНК аминокислоты, в результате чего в пептидильсвязывающем центре оказывается тРНК^{Met} со свободными гидроксильными группами в 2'- и 3'-положении, а в аминокацилсвязывающем центре тРНК с дипептидильным остатком, например:



Свободная иницирующая тРНК^{Met} покидает пептидильсвязывающий центр, и происходит одновременное смещение мРНК и тРНК с дипептидильным остатком в освободившийся пептидильсвязывающий центр. Энергию для этого снова поставляет ГТФ. В освободившемся аминокацилсвязывающем центре оказывается третий кодон мРНК, после этого сюда подходит третья мРНК с соответствующей аминокислотой, и процесс повторяется уже с переносом на аминокацильный остаток дипептидильного остатка.

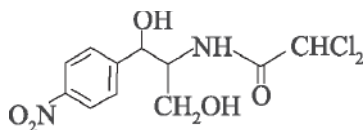
Так наращивание последовательности аминокислот в белке идет до тех пор, пока в аминокацилсвязывающий центр перемещаются соответствующие кодоны мРНК. После окончания синтеза белковой молекулы к работе рибосомы подключаются факторы терминации, вызывающие гидролитическое отщепление белка (полипептида) от последней тРНК, отделение от пептидильсвязывающего центра свободной тРНК и диссоциацию рибосомы на малую и большую субъединицы для того, чтобы можно было начать новый цикл синтеза белка со стадии инициации.

Энергетическая стоимость образования одной пептидной связи на рибосоме эквивалентна расходованию четырех молекул АТФ, что значительно выше, чем при ферментативном катализе образования пептидной связи без участия РНК. Напоминаем, что при образовании аминокацилированной тРНК АТФ разлагается на АМФ и два моля фосфата, а при элонгации расходуется еще два моля ГТФ на связывание аминокацилированной тРНК и на перемещение ее из аминокацилсвязывающего центра в пептидильсвязывающий центр.

Для наработки большого количества белка на одной молекуле мРНК могут одновременно вести его синтез несколько рибосом.

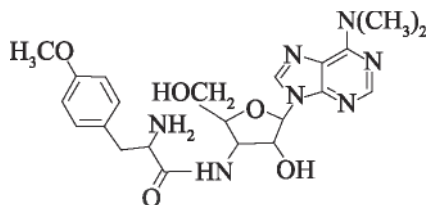
По мере элонгации молекулы белка идет его сворачивание в трехмерную структуру (фолдинг), но синтез молекулы начинался с метионина или, соответственно, формилметионина и далеко не все белки или полипептиды имеют его в качестве N-концевой аминокислоты. Это означает, что после отделения от рибосомы полипептидной молекулы должен пройти гидролиз на ее N-конце с отщеплением остатка метионина (обычно отщепление затрагивает несколько аминокислотных остатков). Кроме того, синтезированные в клетке белки часто должны пройти через клеточные мембраны для того, чтобы проникнуть в какие-либо клеточные органеллы или выйти из клетки. Для этого синтезируемый рибосомой белок содержит в N-концевой области полипептидную последовательность из 15–30 аминокислот с гидрофобными радикалами, ее называют *сигнальной последовательностью*. Она «протаскивает» белковую молекулу через соответствующую мембрану и после этого также отщепляется. Постсинтетическое превращение белка, включающее иногда и химическое превращение в боковых цепях аминокислот в составе полипептидной цепи, называют *процессингом*, он включает также повторный фолдинг трансформированной белковой молекулы.

Синтез белка нарушается многими биологически активными веществами синтетического или природного происхождения. В качестве примера можно привести антибиотик хлорамфеникол



подавляющий синтез белка рибосомами прокариот и митохондрий, но не влияющий на работу внемитохондриальных рибосом эукариот.

Еще один антибиотик пурамицин

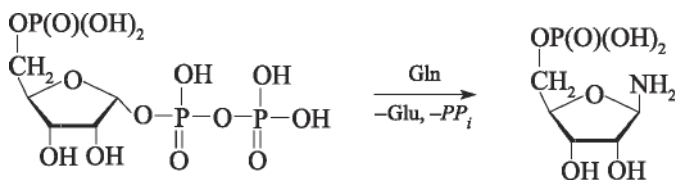


имитирует 3'-конец фенилаланиновой или тирозиновой тРНК с соответствующей аминокислотой; его действие основано на конкурентом встраивании в активный центр пептидилтрансферазы рибосомы, где он ацилируется уже образовавшимся пептидильным остатком на тРНК. Это приводит к образованию укороченных пептидных молекул с пуромидиновым фрагментом на С-конце.

10.6. Образование азотистых оснований и нуклеиновых кислот

В разделе, посвященном нуклеиновым кислотам (см. стр. 54–55), были представлены некоторые антиметаболиты, нарушающие их биосинтез из-за подобия их структур структурам естественных исходных продуктов. Здесь будут рассмотрены отдельные биохимические процессы, которые проясняют механизмы действия этих БАВ. Животные, получающие нуклеиновые кислоты с пищей, менее чувствительны к блокировке их образования, что позволяет синтезировать вещества, которые будут избирательно действовать на растения и на микроорганизмы.

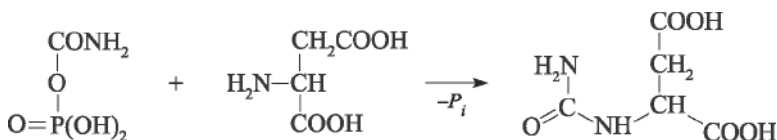
Биосинтез пуриновых оснований начинается с 5-фосфорибозы, которая превращается в 5-фосфорибозил-1-пирофосфат в реакции с АТФ. Если в организм поступает достаточное количество ДНК и РНК, гидролизующихся соответствующими ферментами (в том числе и до азотистых оснований), то активированная форма рибозы по схеме, представленной в гл. 3, взаимодействует с азотистыми основаниями с образованием соответствующих нуклеотидов и пирофосфата (реутилизация пуриновых оснований). Если же пуриновые основания должны образоваться в клетке, то их биосинтез начинается с 5-фосфорибозил-1-пирофосфата, превращающегося в реакции с глутамином в 5-фосфорибозиламин:



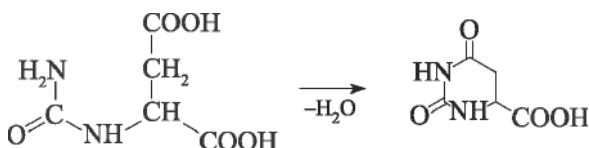
Далее следует многостадийный процесс образования гетероциклической системы, начинающийся с ацилирования аминогруппы фосфорибозиламина глицином. После этого в построении пуриновой основы принимают участие два формильных остатка,

бикарбонат, глутамин и аспартат. Конечным продуктом на этом этапе является инозиновая кислота (инозинат), которая превращается в аденилат и гуанилат уже путем функционализации пуринового остатка.

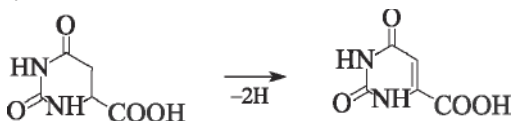
В отличие от пуринов, биосинтез которых начинается с фосφο-рибозы, пиримидиновые основания получают рибозный остаток уже после образования гетероциклической системы. Сначала при катализе аспартат-транскарбамоилазой из карбамоилфосфата (его антиметаболитом может быть карбамоилфосфонат) и аспарагиновой кислоты образуется N-карбамоиласпартат:



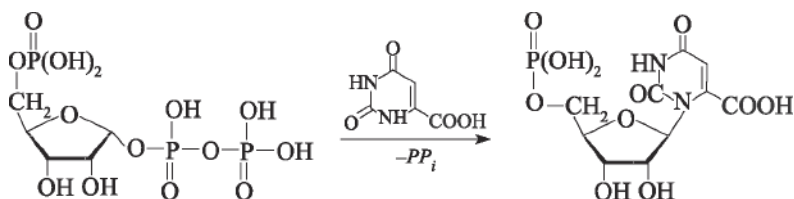
Затем дигидрооротаза катализирует циклизацию этого соединения в дигидрооротовую кислоту:



Дигидрооротовая кислота окисляется с участием кислорода в оротовую кислоту:

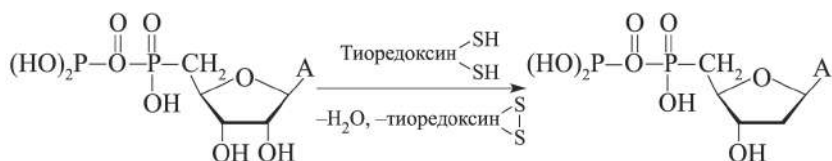


После этого в реакции, катализируемой соответствующей трансферазой, образуется оротидилат по реакции с 5-фосфорибозил-1-пирофосфатом:

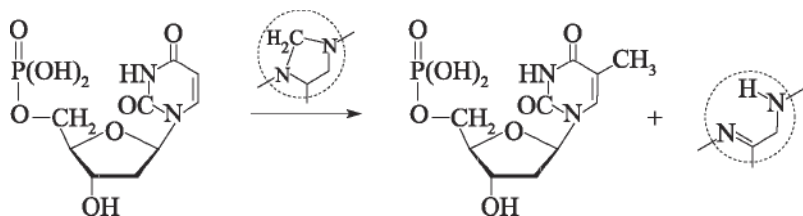


Декарбоксилирование оротидилата приводит к уридилату, который после превращения в уридинтрифосфат при действии АТФ и аминирования по карбонильной группе в 4-положении пиримидинового цикла с участием амидного азота глутамина превращается в цитидин-5'-трифосфат.

Дезоксирибонуклеотиды образуются из соответствующих рибонуклеотидов. Реакция восстановительного отщепления гидроксильной группы в 2-положении рибозного фрагмента идет на рибонуклеозиддифосфатах с участием водородпереносящего белка тиоредоксина при катализе соответствующей редуктазой, например для аденозиндифосфата, по схеме:



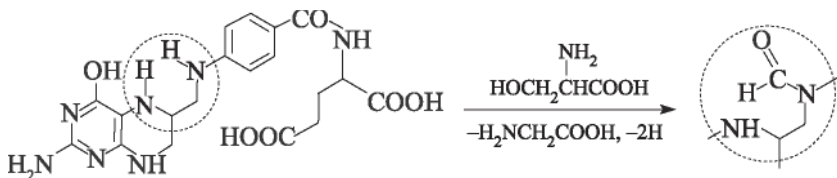
При образовании дезокситимидина из уридина протекает реакция метилирования гетероциклического остатка с участием N^5, N^{10} -метилентетрагидрофолата, который образуется из серина и тетрагидрофолата при катализе серингидроксиметилазой (см. стр. 94). Серин относится к заменимым аминокислотам, поскольку он легко образуется из глицеринового альдегида. При взаимодействии N^5, N^{10} -метилентетрагидрофолата (на схеме показан реагирующий участок его молекулы) с дезоксиуридинмонофосфатом образуются тимидинмонофосфат и дигидрофолат:



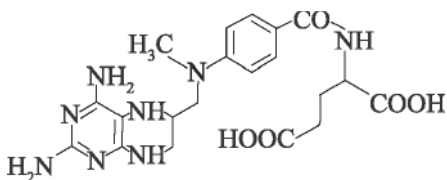
Дигидрофолат снова восстанавливается в тетрагидрофолат с участием фолатредуктазы.

Биосинтез пуриновых оснований, как отмечалось выше, также протекает с участием одноуглеродного, но уже формильного остатка. В этом процессе снова принимают участие тетрагидрофо-

лат и серин, но при катализе формилтрансферазой в этой реакции образуется N¹⁰-формилтетрагидрофолат:

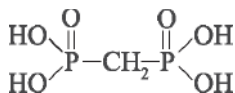


Эти превращения блокируются метотрексатом (аметоптерин), который очень прочно связывается в активном центре тетрагидрофолатредуктазы, вызывая эффект, аналогичный авитаминозу по фолиевой кислоте. Метотрексат

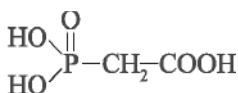
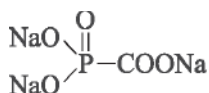


используется в качестве химиотерапевтического средства для лечения некоторых лейкозов и других видов рака.

При биосинтезе как нуклеиновых кислот, так и их структурных элементов образуются различные моно-, ди- и трифосфаты. Это послужило основой для поиска лекарственных средств среди структурных аналогов пирофосфорной кислоты. Первые опыты в этом направлении были малопродуктивны. Так, например, изо-стерная пирофосфорной кислоте метилendifосфоновая кислота

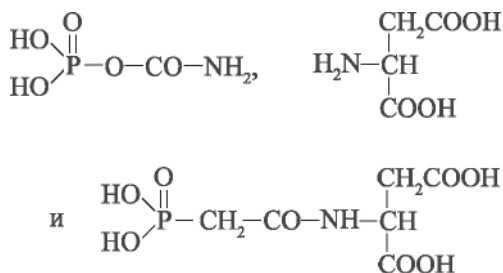


не проявила лекарственных свойств. Более успешными оказались производные фосфорилированных карбоновых кислот, в частности, натриевая соль фосфонмуравьиной кислоты (фоскарнет, стабилен только в виде соли) и фосфонацетат:



Фоскарнет применяется для лечения герпесных и цитомегаловирусных инфекций, а производные фосфонукусной кислоты широ-

ко исследуются в качестве противовирусных и противораковых средств. Одним из интересных соединений в этом ряду стал N-фосфонацетил-*L*-аспарагинат (PALA), который нарушает биосинтез пиримидиновых оснований, занимая, очевидно, в активном центре фермента аспартат-транскарбамоилазы место карбамоилфосфата и *L*-аспарагиновой кислоты:



В модельных опытах PALA проявляет очень интересные виды биологической активности, но ее использованию на практике мешает мутагенный эффект.

Нейрогуморальная регуляция

Многоклеточные организмы, состоящие из огромного числа различных типов тканей и органов, нуждаются в регуляции взаимодействия между ними для нормального функционирования в нестационарных условиях. В основе этой регуляции всегда лежат молекулярные механизмы. Превращения субстратов регулируются ферментами как за счет концентрационных факторов по закону действующих масс, так и с участием регуляторных ферментов, изменяющих каталитическую активность под действием эффекторов (ингибиторов или активаторов), а это уже регуляция по принципу обратной связи. Однако только такими простыми взаимосвязями нельзя обеспечить даже простое существование сформировавшегося многоклеточного организма в постоянно изменяющихся условиях и уж тем более его развитие с дифференциацией эмбриональных клеток в различные органы и ткани.

Более сложная регуляция, которая также основана на обратной связи, осуществляется нервной системой с участием специальных веществ, поскольку иннервация каждой отдельной клетки организма несколькими типами нервных окончаний просто невозможна. В общем случае эти регуляторные молекулы по их функциям можно классифицировать на три группы:

- гормоны;
- факторы роста и цитокины;
- нейромедиаторы.

Более всего известны классические регуляторные молекулы — *гормоны*. Многие из них содержатся в организме в сравнительно больших количествах, и поэтому они были выделены и стали известны уже давно. У животных гормоны образуются в специальных клетках, собранных в железы внутренней секреции (эндокринные железы), которые выделяют их прямо в кровь (у насекомых в гемолимфу). Этим железы внутренней секреции отличаются от других железистых органов, выделяющих свои секреты в протоки, которые так или иначе связаны с внешней средой (поджелудочная же-

леза имеет экзокринную и эндокринную функцию). Разносимые кровью по всему организму гормоны находят свои клетки мишени на значительном удалении от секретирующей их железы.

Факторы роста — это регуляторные молекулы (у животных белковой природы). Они отличаются от гормонов тем, что их выделяют не специализированные клетки желез, а клетки тканей или отдельные самостоятельные клетки (тромбоциты, лейкоциты). Большинство факторов роста паракринны, то есть они предназначены для передачи сигнала на коротком расстоянии в пределах одного органа, но есть и аутокринные факторы роста, которые стимулируют сами выделяющие их клетки. В рамках такой классификации к факторам роста следует, очевидно, относить и фитогормоны, то есть вещества, управляющие ростом и дифференциацией клеток растений. В качестве примера таких регуляторных молекул у теплокровных можно назвать фактор роста из тромбоцитов, который выделяется и из многих других клеток, эпидермальный фактор роста, колонийстимулирующие факторы роста (стимулируют рост колоний некоторых лейкоцитов, поэтому их называют также интерлейкинами). Термин «цитокины» относится к факторам роста, участвующим в иммунных ответах.

Регуляция высвобождения факторов роста протекает по разным механизмам. Они участвуют в процессе развития, репарации поврежденных клеток, в их дифференциации, но точные данные обо всех взаимодействиях на этом уровне пока не получены.

Нейромедиаторы участвуют в работе клеток нервной ткани — нейронов, они передают сигнал от нервного окончания на конце отходящего от нейрона отростка (аксона) на иннервируемую клетку.

Регуляторная система организма находится под иерархическим контролем, где основная роль принадлежит нервной системе, которая таким образом через нервные окончания (с участием нейромедиаторов) и поступающие в жидкие среды организма (по лат. *humor* — жидкость) гормоны управляет всеми функциями организма (отсюда термин «нейрогуморальная регуляция»).

Рецепторные клетки кожи, слизистых оболочек, органов чувств, хеморецепторы внутри организма постоянно сообщают в центральную нервную систему об изменениях в окружающей среде, в составе крови, в работе органов. ЦНС анализирует поступающую информацию обычно на бессознательном уровне и выдает

адекватные команды через нейроны или с помощью регуляторных молекул. В начале гормональной регуляции лежит специализированный отдел головного мозга, называемый *гипоталамусом*. Это одна из первичных и наиболее жизненно важных частей мозга. Гипоталамус (подбугорье) с помощью регуляторных молекул, называемых либериными или рилизинг-факторами, по принципу обратной связи управляет работой гипофиза — дирижера работы всей эндокринной системы организма. Гипофиз человека весит 0,5–0,6 г. Он связан с гипоталамусом короткой ножкой и состоит из трех гистологически различных частей — передней доли, промежуточной и задней доли. Передняя доля состоит из железистых клеток, работой которых управляют либерины, поступающие по кратчайшему пути из гипоталамуса по кровеносным сосудам в ножку. Задняя доля гипофиза состоит из нервных клеток, гормоны гипоталамуса поступают сюда по отросткам нейронов — аксонам.

Гормоны передней доли гипофиза, стимулирующие работу желез внутренней секреции, называются тропинами или тропными гормонами. Принцип обратной связи состоит в том, что выделяемые железами внутренней секреции гормоны тормозят выделение как либеринов, так и тропинов. Правда, здесь нет такой четкой иерархии и не все железы внутренней секреции находятся под контролем гипоталамуса с участием либеринов. Так, например, активность задней доли гипофиза, секретирующей окситоцин и вазопрессин, регулируется по другим механизмам, а передняя доля гипофиза секретирует самостоятельный гормон — соматотропин (его секреция тормозится соматостатином — гормоном из гипоталамуса). В поджелудочной железе секреция инсулина (β -клетки) и глюкагона (α -клетки) напрямую зависит от уровня сахара в крови, но это не значит, что в регуляции уровня глюкозы в крови не участвует ЦНС. Кроме инсулина и глюкагона образование и расходование глюкозы контролируют некоторые другие гормоны. Под прямым контролем со стороны ЦНС находятся клетки мозгового вещества надпочечников, содержащие везикулы (пузырьки) с адреналином и норадреналином (около 20%) и АТФ (около 4%). По команде, поступающей из ЦНС, в течение нескольких секунд происходит выброс адреналина в результате экзоцитоза и его концентрация в крови возрастает на три порядка (от 10^{-10} до 10^{-7} моль/л). Обычная концентрация гормонов в крови составляет от 10^{-12} до 10^{-9} моль/л.

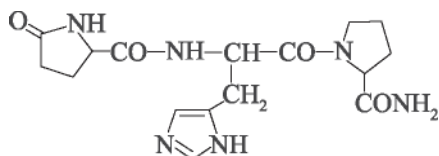
В качестве примера классической регуляции по схеме

Гипоталамус → Гипофиз → Железа внутренней секреции

можно привести цепочку

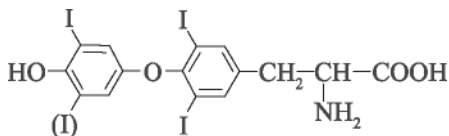
Тиролиберин → Тиреотропин → Тироксин.

Тиролиберин представляет собой трипептид — пироглутамил-гистидинил-пролинамид:



Гормональная активность этого вещества поразительна. Его концентрация в гипоталамусе очень мала: для установления его строения из 4 т гипоталамуса животных был выделен всего лишь 1 мг этого вещества. При введении его в организм в микрограммовых дозах секреция тиротропина, который представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 28 кДа, возрастает уже через несколько минут. Метилирование тиролиберина в положение 1 имидазольного кольца или замена амидной группы в пролиновом фрагменте на карбоксильную снижает активность тиролиберина в несколько тысяч раз, а метилирование имидазольного кольца в положение 3 повышает активность. Интересно, что этот необычный трипептид сравнительно устойчив к действию протеаз пищеварительной системы, поскольку он сохраняет активность и при приеме через рот.

В ответ на секрецию тиротропина гипофизом щитовидная железа выделяет в кровь тироксин и трийодтиронин, образующиеся из тирозиновых фрагментов в специально предназначенной для этого белковой молекуле:



По химической природе гормоны, продуцируемые железами внутренней секреции, относятся к трем типам соединений. Они могут быть пептидами, производными тирозина или стероидами.

Растворимые в воде пептиды и гормоны на основе тирозина не проходят через клеточные мембраны. Их действие опосредовано рецепторными белками на внешней стороне клеток. Они, как в случае инсулина, могут работать в комплексе с транспортными белками или же действовать через специальные внутриклеточные белки (G-белки) на фермент, синтезирующий внутриклеточный регулятор (его называют *мессенджером*). Гормоном, действующим через G-белки, является, например, адреналин. Связываясь с адренорецептором, он запускает механизм образования активного комплекса из ГТФ и G-белка, и уже этот комплекс включает работу аденилатциклазы, катализирующей образование цАМФ (это и есть мессенджер) из АТФ. Действие активированного G-белка ограничено по времени, так как он обладает гидролазной активностью. Вследствие этого связанный с G-белком ГТФ разлагается на ГДФ и фосфат, а комплекс G-белка с ГДФ неактивен.

В отличие от пептидов и производных тирозина стероиды достаточно легко проходят через клеточные мембраны. Их рецепторы представлены растворенными в цитоплазме белками, которые связаны с белками теплового шока (Hsp). Обычно белки Hsp управляют организацией пространственной структуры синтезируемого на рибосоме белка (за это их называют также шаперонами, от франц. *chaperonne* — сопровождающий). Гормон, проникший через мембрану в клетку, связывается с рецепторным белком, который вместе с белком теплового шока или уже без него проникает в ядро и связывается с соответствующим участком ДНК, активируя его. Однако для активации ДНК обязательно надо, чтобы белок теплового шока отошел от комплекса рецептора и гормона. Активация ДНК включает транскрипцию с образованием мРНК, мРНК выходит из ядра и поступает в рибосомы, где начинается синтез белка (трансляция), образование которого и должен был запустить гормон.

Из этого следует, что действие растворимых в воде гормонов проявляется в очень короткие сроки (до нескольких секунд, как у адреналина), тогда как стероидные гормоны проявляют свое действие через достаточно медленно текущие процессы. Нерастворимые в воде гормоны чаще всего регулируют синтез белков (ферментов, транспортных белков, структурных белков), поэтому их эффект может проявиться и через несколько дней.

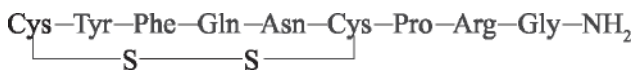
Из пептидных гормонов хорошо изучены вазопрессин, окситоцин, соматотропин, ангиотензин, но более других, конечно, инсулин.

Недостаток инсулина или ослабленная реакция на инсулин со стороны клеток являются причиной сахарного диабета (в США каждый двадцатый имеет нарушения в обмене глюкозы; диабет является третьей по частоте причиной смерти после сердечно-сосудистых заболеваний и рака). При диабете происходит серьезное отклонение от нормы составляющих мочи и крови. Для усиления транспорта глюкозы в клетки у организма остается одна единственная возможность — повышение ее концентрации в крови, но почки не рассчитаны природой на этот вариант, и «лишняя» глюкоза попадает в мочу. Кроме повышенной концентрации глюкозы (в сутки с мочой может уходить до 100 г глюкозы), в моче диабетиков повышена концентрация так называемых кетонных тел (ацетоацетата, ацетона и β -гидроксibuтирата), мочевины, ионов аммония (это все побочные продукты образования глюкозы из аминокислот), натрия (рН мочи у диабетиков понижен). Выделяющийся с выдыхаемым воздухом ацетон имеет характерный органический запах похожий на запах перегара. Диабетики пьют много воды, поскольку для выведения всего набора необычных отходов их жизнедеятельности ее расход увеличивается.

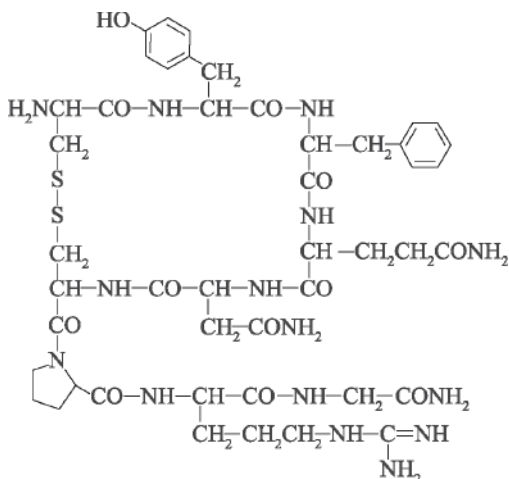
Антагонистом инсулина является *глюкагон* — полипептидный гормон, секретируемый поджелудочной железой, но клетками α -типа. Его эффект аналогичен действию адреналина, однако в отличие от него глюкагон не влияет на частоту сердечных сокращений и на давление крови.

Выделяемый передней долей гипофиза гормон *соматотропин* — белок с молекулярной массой около 21 кДа — регулирует вес и рост тела. Кроме того, соматотропин сложным образом регулирует секрецию инсулина и глюкагона, поэтому его используют для лечения некоторых форм сахарного диабета. Недостаток соматотропина приводит к остановке роста тела (лилипуты), а избыток — к гигантизму. Если усиленное выделение соматотропина происходит во взрослом возрасте — то это вызывает акромегалию, слоновую болезнь.

Вазопрессин повышает кровяное давление, его недостаток вызывает так называемый «несахарный диабет», это нонапептид формулы



или

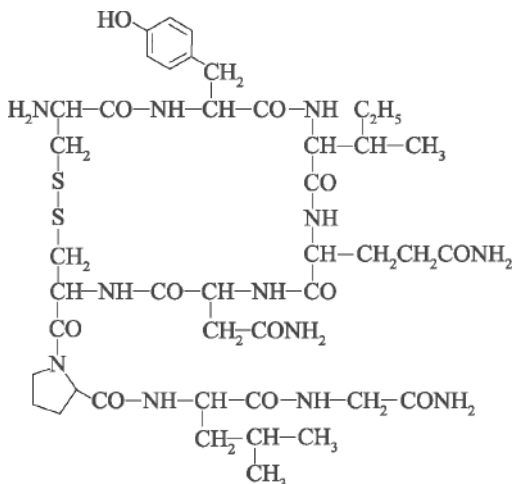


Вазопрессин регулирует работу почек, он управляет обратным всасыванием воды в почках (вместе с необходимыми организму веществами). При недостатке этого гормона почки выделяют до 10 л в день сильно разбавленной мочи.

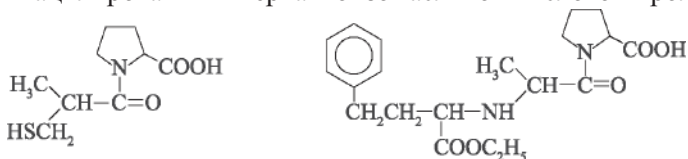
Окситоцин вызывает сокращение гладкой мускулатуры, и его применяют для стимуляции родов, по строению он похож на вазопрессин:



или



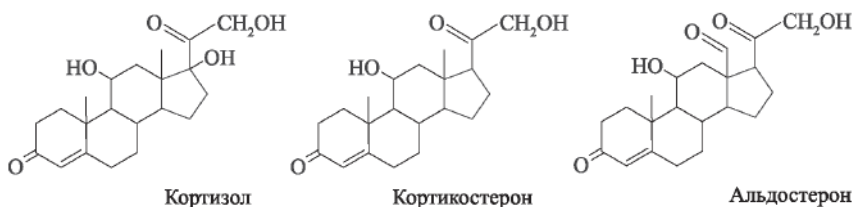
Тонус кровеносных сосудов регулируется *ангиотензином*. Этот гормон также участвует в регуляции работы почек. Аминокислотная последовательность неактивного ангиотензина I и активного ангиотензина II входит в состав белка ангиотензиногена (см. стр. 175). При повышенном давлении (гипертонии) можно получить терапевтический эффект путем снижением уровня активности этого гормона. Во всех клетках содержатся гидролазы, расщепляющие его, но их активация с целью снижения уровня ангиотензина II проблематична. В лекарственных целях блокируют превращение ангиотензина I в ангиотензин II. Для этого используют ингибирующие фермент соединения, похожие по строению на пептиды (пептидомиметики), первым соединением этой группы стал каптоприл — ацилированный меркаптоизомазляной кислотой пролин:



Вторая формула представляет одно из современных лекарственных средств, блокирующих ангиотензинконвертирующий фермент — эналаприл (энап).

Ангиотензин II действует также на надпочечники, стимулируя выделение альдостерона, что приводит к задержке в организме ионов натрия.

Гипоталамус с участием кортиколиберина через аденокортикотропный гормон гипофиза (АКТГ, пептид из 39 аминокислот, период его полупревращения в организме составляет около 10 минут) регулирует работу внешнего (коркового) слоя клеток еще одной важной парной железы — надпочечников. Клетки внутренней (мозговой) части надпочечников секретируют адреналин, а клетки внешнего (коркового) слоя секретируют гормоны стероидной природы, которые участвуют в регуляции углеводного обмена и водно-солевого баланса — глюкокортикоиды и минералокортикоиды:



Кортизол

Кортикостерон

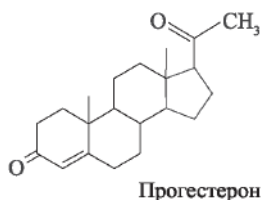
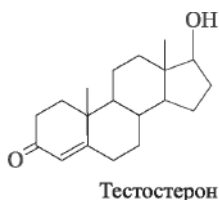
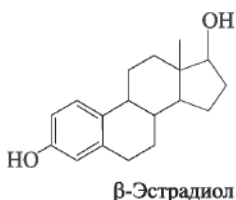
Альдостерон

Здесь приведены три типичных представителя кортикостероидов, всего их известно около 30. Все эти гормоны обладают как глюкокортикоидной, так и минералокортикоидной активностью, но у кортизола более выражена глюкокортикоидная активность, у альдостерона — минералокортикоидная, а кортикостерон в равной мере обладает обеими видами активности. Кортизол стимулирует образование глюкозы из аминокислот (глюконеогенез) и обладает противовоспалительной и противоаллергической активностью. Избыток кортизола в организме приводит к потере мышечной массы, быстрой утомляемости; при общей худобе лицо у человека становится пухлым, круглым (болезнь Кушинга). Минералокортикоиды вызывают задержку ионов натрия в организме и потерю ионов калия с мочой. Недостаточная секреция гормонов коры надпочечников приводит к аддисоновой болезни, характеризующейся слабостью, подверженностью к стрессам и к инфекциям, кожа приобретает характерный смуглый оттенок (бронзовая болезнь).

Лекарственное применение самих кортикостероидов осложнено нарушением гормонального баланса организма из-за реализации принципа обратной связи (их длительное введение в виде лекарства может привести к атрофии надпочечников). Сейчас в основном стараются использовать эти соединения в виде средств местного действия и для этого уменьшают их растворимость и сродство к транспортным белкам введением атомов фтора и гидрофобизацией:



Еще одна группа стероидных гормонов представлена мужскими (андрогены) и женскими (эстрогены и гестагены) половыми гормонами:

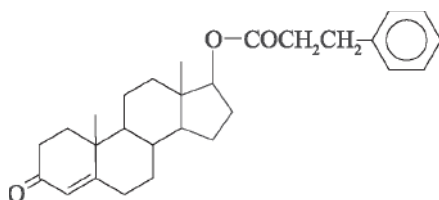


Кора надпочечников, семенники и яичники имеют общее эмбриональное происхождение, поэтому в разных количествах мужские и женские половые гормоны выделяются всеми этими типами тканей, то есть их действие зависит от соотношения между ними.

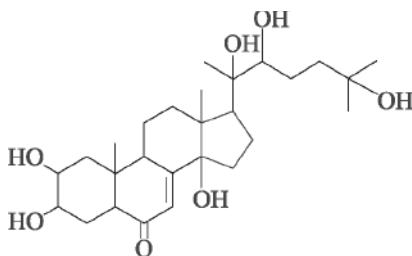
Уровень половых гормонов также контролируется гипоталамусом и гипофизом через лютеинизирующий гормон (в женском организме) и гонадотропины.

Половые гормоны определяют внешние половые признаки — мужские или, соответственно, женские. Они регулируют процессы роста, поддерживают функционирование репродуктивной системы. Андрогены стимулируют рост скелетных мышц, и поэтому их часто называют анаболическими гормонами. Эти свойства привлекают внимание фармакологов, поскольку разделение анаболической и андрогенной активности перспективно не только с целью получения анаболических допингов для спортсменов, но и с фармакологической точки зрения для лечения некоторых видов мышечных слабостей (астенические синдромы).

Эффективным анаболиком оказался, например, 19-нортестостерон, который в виде его эфира с фенилпропионовой кислотой используется на практике под названием феноболин (использование его спортсменами запрещено):

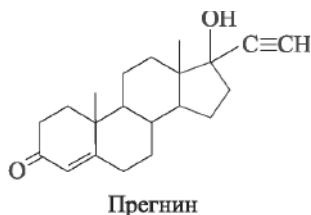
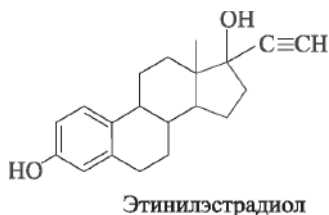


Эффективный стероидный анаболик 20-гидроксиэкдизон содержится в некоторых растениях (левзея сафлоровидная):



Тестостерон и, особенно, метилтестостерон задерживают развитие рака молочных желез, но побочный андрогенный эффект этих гормонов не позволяет использовать их для лечения этого заболевания.

Точно также женский половой гормон эстрадиол был бы неплохим средством для лечения атеросклероза, но связанное с ним появление женских вторичных половых признаков исключает возможность применения его для этих целей. Тем не менее, женские половые гормоны используются в медицинской практике для восполнения их недостатка после удаления яичников или в менопаузе. Однако наиболее широкое применение нашли они в качестве пероральных противозачаточных средств (контрацептивов). В этом случае экзогенные гормоны не вызывают интенсивной перестройки гормональной системы или атрофии генерирующих их тканей (как это было отмечено в случае кортикостероидов), так как периодические колебания их концентрации в крови характерны для женского организма. Наиболее эффективны сочетания эстрогенов и гестагенов (гормонов желтого тела); в поиске оптимальных структур аналогов и их дозировки были приложены колоссальные усилия. В качестве эстрогена в составе этих средств чаще всего используется этинилэстрадиол, а в качестве гестагена — прегнин:

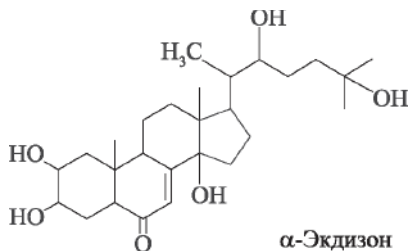


Принцип действия этих противозачаточных средств основан на создании гормональной среды, характерной для состояния беременности, когда овуляция прекращается. Гормональные противозачаточные средства принимаются при врачебном контроле, а современные препараты вообще состоят из двух или трех различных таблеток — эстрогена, гестагена и, желательно, гормонов гипофиза и гипоталамуса. Причем их дозы подбираются наблюдающим врачом с учетом гормонального статуса принимающей их женщины.

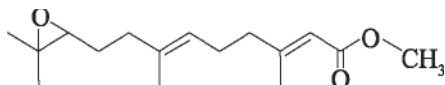
В общем случае надо понимать, что нормальный предусмотренный природой жизненный цикл женского организма представ-

ляет собой чередование периода беременности и кормления ребенка грудью без «простоев». Иначе говоря, как раз менструация — это ненормальность (недаром она так болезненна). Регулирующий лактацию и, как это всегда бывает у гормонов, многие другие функции, включая проявление материнского инстинкта, гипофизарный гормон белковой природы пролактин в период беременности и активного кормления грудью (его концентрация при этом возрастает от 5–10 до 200 нг/мл) препятствует овуляции. Именно поэтому раньше длительное, до двух-трех лет, кормление ребенка грудью было лучшим естественным противозачаточным средством. Однако применение пролактина в качестве лекарственного средства вряд ли возможно из-за проблем, связанных с необходимостью равномерного введения высокомолекулярного белка (23–24 кДа) и с активизацией им процесса лактации.

Гормоны регулируют также рост и развитие насекомых. Лучше всего у этих представителей животного мира изучены гормоны линьки. Рост насекомого с его жестким экзоскелетом (кутикулой) возможен только после освобождения от ставшей тесной старой кутикулы с формированием новой, более просторной. Сам процесс линьки запускается гормоном стероидной природы — экдизоном:



Высшие насекомые, проходящие несколько фаз развития (яйцо, личинка, куколка, имаго), претерпевают так называемый метаморфоз — переход из одной фазы развития в другую. А это уже регулируется ювенильными гормонами: при их присутствии в гемолимфе личинки ее линька не сопровождается метаморфозом. Ниже приведена структура одного из ювенильных гормонов ЮГ-III:

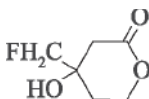


Ювенильные гормоны выделяются специальной железой, которая после прохождения личинкой нескольких линек атрофируется, и тогда в следующей линьке личинка претерпевает метаморфоз. Атрофия клеток железы может быть ускорена веществами, легко образующими реакционноспособные эпоксиды. В этом случае число линек сокращается и личинки превращаются в карликовые формы имаго. Такой эффект проявляют, например, прекоцены (от лат. *precose* — преждевременно), содержащиеся в некоторых растениях. Показано, что ферментные системы насекомых окисляют их с образованием эпоксидов, например:

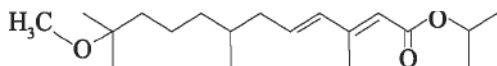


которые, очевидно, и вызывают преждевременную деградацию клеток железы, генерирующей ювенильные гормоны.

Образование ювенильных гормонов блокируется, например, лактоном фтормевалоновой кислоты (их биосинтез, как и других изопреноидов, идет через мевалоновую кислоту, см. стр. 168):



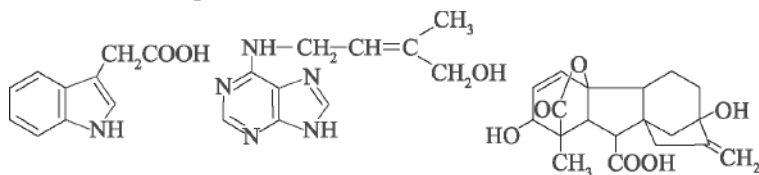
Агонистами ювенильных гормонов (их называют ювеноидами) являются очень многие вещества, например метопрен:



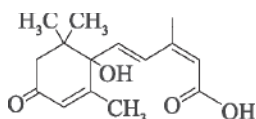
При действии фтормевалоната личинка, как и при действии прекоценов, преждевременно претерпевает метаморфоз и превращается в неполноценную карликовую форму взрослого насекомого, которое не может дать потомства, а действие метопрена приводит к тому, что личинка не превращается в имаго и также не может дать потомства. С точки зрения производителя сельскохозяйственной продукции преждевременный метаморфоз активно питающейся личинки, конечно, предпочтительнее, но фтормевалонат малоактивен, а получить антагонист ювенильных гормонов так и не удалось.

Особого разговора заслуживают *фитогормоны* — вещества, регулирующие рост и развитие растений, однако в приведенной

в начале раздела классификации веществ, участвующих в гуморальной регуляции, растительные гормоны скорее всего надо относить к факторам роста, поскольку их образование идет не в специализированных клетках (клетках желез), а в клетках меристемы (это растительный аналог эмбриональной ткани), в клетках корней, листьев, то есть в обычных тканях растений. Более всего известны стимулирующие рост и клеточное деление ауксины, цитокинины и гиббереллины:



К фитогормонам, регулирующих состояние покоя, относятся этилен и абсцизовая кислота:



В регуляции роста и развития растений очень важную роль играет сочетание различных концентраций гормонов и их взаимное влияние. Так, например, повышенная концентрация стимулятора роста ауксина (индолилуксусная кислота) приводит к образованию ингибитора роста этилена.

Образующийся в меристемной ткани ауксин стимулирует рост корневой системы, а цитокинин (производное аденина), образующийся в корнях, стимулирует клеточное деление. Разные концентрации двух этих гормонов роста — ауксина и цитокинина — определяют рост и дифференциацию клеток меристемной ткани.

Метаболизм ксенобиотиков

Объекты живой природы постоянно вступают в контакт с огромным числом разнообразных химических соединений. Последние входят в состав продуктов питания, содержатся в воде, поступают с вдыхаемым воздухом, и это не только необходимые организму белки, углеводы, жиры, витамины, соли, кислород, но и не представляющие пищевой ценности или даже токсичные компоненты естественного (эфирные масла, окрашенные вещества, алкалоиды, танины, токсины и др.) или искусственного происхождения: консервирующие, вкусовые и ароматизирующие добавки, агрохимические препараты, а также оставшиеся в продуктах питания лекарственные и гормональные препараты, которые добавляли в корм птице или скоту. Независимо от их происхождения не участвующие в нормальном течении обменных процессов вещества, поступающие в организм, называются *ксенобиотиками*. Их отрицательное воздействие особенно сильно проявляется в индустриальных зонах с загрязненной окружающей средой.

Поскольку многие ксенобиотики токсичны, живые системы для выживания должны иметь механизмы для их обезвреживания и выведения из сред, где идут нормальные метаболические процессы. У растений все отходы жизнедеятельности собираются в вакуолях — окруженных мембраной клеточных образованиях. В вакуолях действуют очень эффективные ферменты с гидролазной активностью. Нарушение целостности мембраны вакуоли приводит к гибели растительной клетки, так как содержащиеся в ней ферменты разрушают белки и другие гидролизующиеся компоненты цитозоля. Чем старше растительная клетка или чем более насыщена ксенобиотиками среда, в которой она находится, тем большее пространство клетки занимает вакуоль. У животных есть выделительная система, и ксенобиотики, так или иначе попавшие в кровь, могут быть выведены через почки. Правда, физиология почек такова, что они переводят в мочу только растворимые в воде вещества. Неполарные гидрофобные вещества образуют комплексы с транспортными белками крови и в таком виде почками не выво-

дятся. Из этого следует, что гидрофобные ксенобиотики должны превращаться биохимическими системами в растворимые производные.

Метаболизм ксенобиотиков протекает преимущественно в печени с помощью неселективных ферментов. Низкая селективность ферментов, предназначенных для метаболизма ксенобиотиков, обусловлена тем, что полный набор избирательных ферментов для всех возможных веществ (а их уже синтезировано более 10 млн.) нереализуем. Предназначенные для метаболического превращения ксенобиотиков ферменты должны быть достаточно универсальными для катализа превращений субстратов с широким набором функциональных групп в широком диапазоне молекулярных масс и пространственных особенностей. Низкая избирательность этих ферментов не позволяет им различать ксенобиотики и эндогенные вещества, и поэтому они вызывают превращение и многих необходимых для течения нормальных метаболических процессов субстратов и регуляторов метаболизма. Понятно, что в отсутствии в организме ксенобиотиков содержание этих ферментов должно быть минимальным, а появление ксенобиотиков должно индуцировать биосинтез этих ферментов.

В этом состоит первый серьезный недостаток реализуемой в живой природе системы обезвреживания ксенобиотиков — она атакует любые молекулы, в том числе и такие жизненно важные для организма вещества, как, например, гормоны, нейромедиаторы, субстраты, метаболиты, белки и многие другие участвующие в обеспечении существования организма молекулы. Но несовершенство системы, предназначенной для биотрансформации ксенобиотиков, этим не ограничивается. Введение полярных функциональных групп в инертные и неполярные молекулы чаще всего сопровождается их метаболической активацией с образованием интермедиатов с высокой реакционной способностью. Если эти промежуточные соединения не будут полностью трансформированы в течение кратчайшего времени, то появляется риск химического повреждения ими таких биомолекул, как белки, ДНК и РНК. Наибольшую опасность представляют эпоксиды, карбониевые ионы, ионы нитрония и другие электрофильные продукты превращений. Они взаимодействуют с белковыми молекулами и с нуклеиновыми кислотами, приводя к истощению иммунной системы, к нарушению нормального течения метаболизма и к мутациям в структуре ДНК. Следствием таких превращений, сопровождаю-

щих метаболизм ксенобиотиков, могут быть цирроз печени, раковые заболевания и другие повреждения систем жизнеобеспечения.

В качестве примера можно привести действие неизбирательной монооксигеназы на женский половой гормон эстрадиол. Его ароматический цикл в результате такого ферментативного окисления превращается в соответствующий ареноксид, и следствием этого становится не только снижение концентрации гормона. Гораздо более серьезные последствия связаны с высокой мутагенной и канцерогенной активностью образующегося при этом соединения:



Когда в 40-е гг. XX в. началось интенсивное исследование химического канцерогенеза, появилась надежда, что проблема онкологических заболеваний может быть решена в кратчайшие сроки. В основе идеи лежали представления о возможности выявления канцерогенных функциональных групп в химических соединениях. Предполагалось, что, исключив возможность контакта людей с такими веществами, можно будет избавиться от злокачественных опухолей. Но спектр веществ с канцерогенной активностью постоянно расширяется (канцерогенен даже химически инертный асбест) и, кроме того, химический канцерогенез это всего лишь один из факторов, способствующих возникновению этой болезни. На современном уровне понимания проблемы можно только утверждать, что одной из причин возникновения злокачественных опухолей является метаболическая активация клеточными ферментами поступающих в организм ксенобиотиков с образованием промежуточных продуктов, которые могут взаимодействовать с нуклеофильными центрами в ДНК.

Мутагенная активность веществ может быть выявлена в достаточно простом опыте на мутантной форме бактерии *Salmonella*, которая нуждается для роста в гистидине. Для проверки такой штамм наносят на питательную среду, лишенную гистидина и прибавляют исследуемое вещество или исследуемое вещество вместе с гомогенизированными клетками печени крысы. Если в присутствии исследуемого вещества появляются колонии бактерий, то это означает,

что прошла обратная мутация и клетки снова могут синтезировать гистидин, то есть мутагеном является само вещество. Если же такие колонии появляются только при совместном действии исследуемого вещества и гомогенизата клеток печени, то это означает, что мутагенная активность является следствием метаболической активации исследуемого вещества. Точность теста (Б. Эймс) достигает 90%.

Большинство наших представлений о реакциях, сопровождающих метаболизм ксенобиотиков, является результатом изучения метаболических превращений лекарственных веществ. Эти ферментативные реакции носят общий характер для всех теплокровных, хотя, конечно, существуют и определенные количественные различия как между видами, так и между отдельными особями одного вида. На уровне отдельных индивидов важную роль в метаболизме ксенобиотиков играют генетические факторы, возраст, пол, гормональный баланс, особенности микрофлоры желудочнокишечного тракта, перенесенные болезни (особенно, если это болезни печени), образ жизни и т. д.

Один из вариантов классификации путей метаболизма ксенобиотиков был предложен Р. Т. Вильямсом (1959 г.). Он выделил две фазы превращений. В первой фазе в молекулу вещества вводятся новые функциональные группы или модифицируются существующие. Во второй фазе происходит присоединение к появившимся в результате первичного превращения функциональным группам высокополярных (часто ионных) структурных элементов, например, остатков глюкуроновой кислоты, серной кислоты, аминокислотных остатков. В результате такого сочетания повышается растворимость трансформированного вещества в воде и становится возможным его выведение через почки. Подавляющее большинство поступающих в организм ксенобиотиков проходит обе фазы метаболического превращения.

Самый распространенный тип реакций первой фазы метаболизма ксенобиотиков представлен реакциями окисления. Они протекают в присутствии монооксигеназ или, иначе, оксидаз смешанных функций, называемых также цитохромами P₄₅₀ (450 нм — это длина волны поглощаемого комплексом цитохрома и монооксида углерода света). Наряду с неизбирательными монооксигеназами, катализирующими окисление ксенобиотиков, в организме есть также избирательные ферменты этого семейства, обеспечивающие, например, превращение фенилаланина в тирозин и далее в адреналин, и участвующие в биосинтезе и в превращениях стероидов (гормоны, компоненты мембран) и т. д.

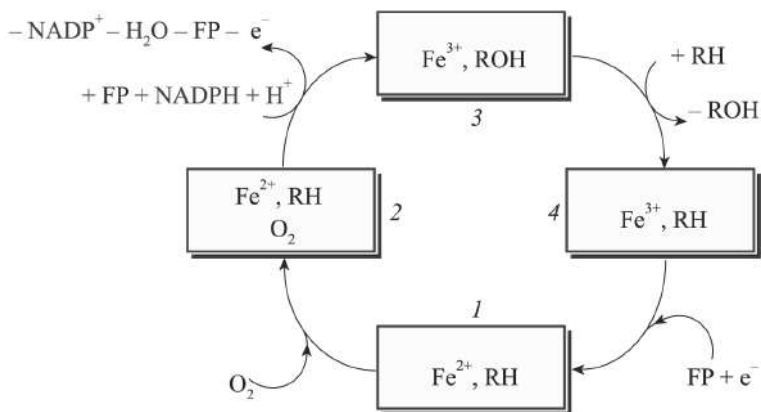


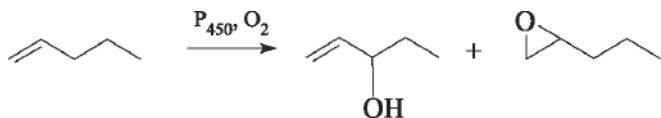
Рис. 12.1. Упрощенная схема механизма действия монооксигеназ

Оксидазами смешанных функций эти ферменты называют потому, что в их работе участвует восстановительный потенциал в виде NADPH. Эти NADPH-зависимые ферменты катализируют большое число реакций гидроксилирования, эпоксилирования и другие превращения, используя в качестве окислителя молекулу кислорода (рис. 12.1). При этом один атом молекулы кислорода встраивается в субстрат, а второй окисляет NADPH с образованием воды. В активном центре фермента молекула кислорода связывается с атомом железа гемового кофермента и активируется для реакции с органическим субстратом. Активированный атом кислорода встраивается по связям C–H, N–H, S–H, C=C и т. д. Монооксигеназа с восстановленным гемом (Fe^{2+}) связывает в активном центре субстрат RH (1) и молекулу кислорода (2). Затем один атом молекулы кислорода при участии флавопротеинового (FP) и никотинамидадениндинуклеотидфосфатного ($\text{NADPH} + \text{H}^+$) комплекса ферментов окисляет субстрат, второй атом кислорода образует воду (железо при этом окисляется и остается один электрон) (3). После этого окисленный субстрат (ROH) отходит от активного центра, его место занимает окисляемый субстрат (RH) (4), а оставшийся на стадии 2 \rightarrow 3 электрон восстанавливает атом железа и система возвращается в исходное состояние (1).

Обеспечивающая окислительную трансформацию ксенобиотиков ферментная система цитохрома P_{450} , как уже отмечалось выше, относится к индуцируемым ферментам. Это означает, что содержание фермента и его активность повышаются в ответ на по-

явление в организме ксенобиотиков. Для этого используется обычный механизм активации генов, отвечающих за биосинтез белков. Прошедший через липидный слой мембраны гидрофобный ксенобиотик связывается с рецепторным белком, в виде такого комплекса проходит в ядро клетки и запускает процесс транскрипции на соответствующем участке хромосомы. Образовавшаяся мРНК покидает ядро и становится матрицей для синтеза белковой составляющей монооксигеназы. Индукторами монооксигеназ являются полициклические ароматические углеводороды, многие лекарственные вещества (например, фенobarбитал), входящие в состав продуктов питания флавоны, производные индола, ксантины и др. Монооксигеназы, предназначенные для биотрансформации ксенобиотиков, локализованы в гладком эндоплазматическом ретикулуле клеток печени. При гомогенизации ткани печени этот ретикулум образует микросомы (отсюда еще одно название таких монооксигеназ — микросомальные оксигеназы).

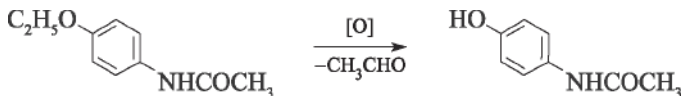
В реакциях биохимического окисления алканов и алкильных остатков сложных молекул гидроксилированию подвергаются концевые группы или предпоследний атом углерода в цепи. Так, например, основным продуктом метаболического превращения гексана является гексан-2-ол. С соединениями, содержащими функциональные группы, реакция идет по функциональной группе или по ближайшему к функциональной группе атому углерода, например:



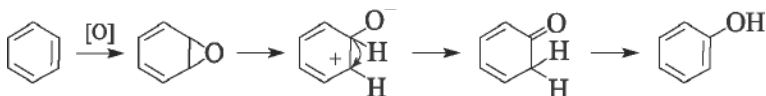
В соответствии с этим олефины окисляются в аллильное положение или эпоксидируются, а анизол окисляется по метильной группе с образованием полуацетала, который распадается на фенол и формальдегид, то есть идет реакция О-деалкилирования:



По аналогичной схеме жаропонижающее средство фенацетин деалкилируется с образованием парацетамола (панадола):

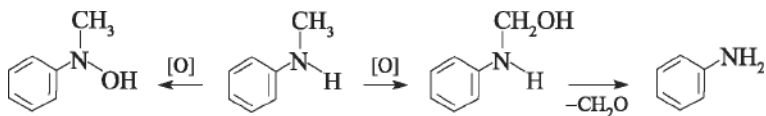


Ароматические углеводороды также окисляются в реакциях с участием цитохромов P₄₅₀. Бензол и многие замещенные бензолы превращаются при этом в фенолы. Сначала предполагалось, что реакция протекает просто путем внедрения атома кислорода по С-Н-связи, но затем было показано, что промежуточными продуктами этой реакции являются ареноксиды. Перегруппировка ареноксидов в фенолы или NIH-сдвиг (NIH-Shift, National Institute of Health, США) протекает без участия ферментов:



Это было доказано элегантными опытами с дейтериевыми метками. NIH-сдвиг включает гетерогенный разрыв одной из связей эпоксида, сдвиг гидрид-иона в соседнее положение и таутомерное превращение образовавшегося ненасыщенного кетона с восстановлением ароматической структуры. Образующийся из бензола ареноксид — сильнейший алкилятор, его токсическое действие особенно ярко проявляется на клетках костного мозга, поэтому везде, где это возможно, бензол надо заменять толуолом. В отличие от бензола толуол окисляется монооксигеназами с образованием гораздо менее токсичного бензилowego спирта.

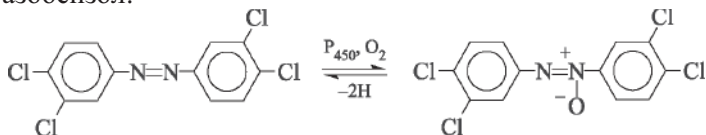
В молекулах с аминогруппами окисление может идти как по атомам углерода, так и по атому азота. В первом случае идет реакция деалкилирования, а во втором образуются токсичные гидроксиламины, например:



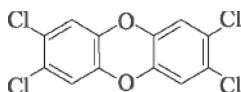
Очевидно, что монооксигеназы могут окислять и атомы азота в пептидных связях белков с образованием токсичных и канцерогенных соединений с CO-N(OH)-группами.

Третичные амины могут быть окислены до N-оксидов. Одним из серьезных экологических загрязнителей является 3,4,3',4'-тетрахлоразобензол, образующийся в природе из агрохимических препаратов на основе 3,4-дихлоранилина. Этот замещенный азобензол является индуктором образования монооксигеназ, но его

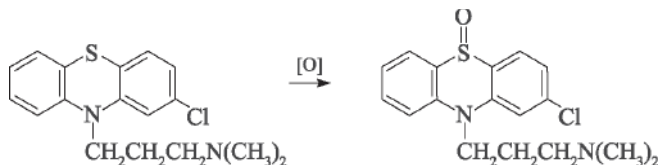
ферментативное окисление по пассивированным заместителями ароматическим С-Н-связям практически не идет. В организме теплокровных он превращается в N-оксид, который снова легко восстанавливается NADH-зависимыми ферментами в соответствующий азобензол:



Из-за этого его превращение в растворимую в воде форму и выведение оказывается невозможным, и он накапливается в организме, создавая при этом повышенный фон монооксигеназ, что, как уже отмечалось выше, приводит к истощению ресурса иммунной системы и ко всему спектру связанных с этим заболеваний, включая злокачественные опухоли. Тяжелая экологическая ситуация в района Арала связана с загрязнением вод 3,4,3',4'-тетрахлоразобензолом. Еще более мощным индуктором биосинтеза монооксигеназ является очень токсичный 2,3,6,7-тетрахлордибенздиоксин, образующийся из хлорфенолов и при сжигании хлорированных органических соединений:

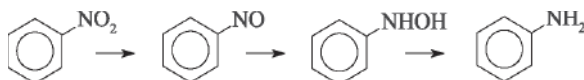


Атомы серы в ксенобиотиках и в различных биохимических структурах легко окисляются монооксигеназами. Лекарственный препарат хлорпромазин (аминазин), используемый для лечения некоторых психических заболеваний, окисляется цитохромами до соответствующего сульфоксида:

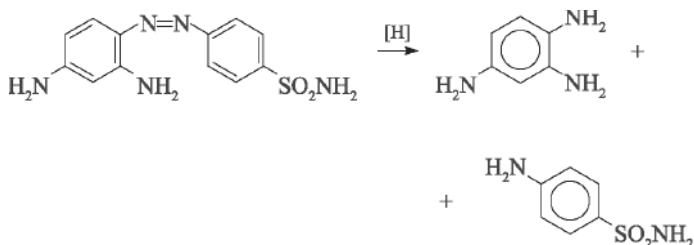


Второй тип реакций первой фазы биотрансформации ксенобиотиков — это восстановление. Реакции восстановления ксенобиотиков встречаются гораздо реже, чем реакции окисления, но этот

механизм превращений важен для перевода в амины нитро- и азо-соединений. Восстановление нитрогрупп катализируется нитроредуктазами и оно также идет с промежуточным образованием токсичных нитрозосоединений и гидроксиламинов.



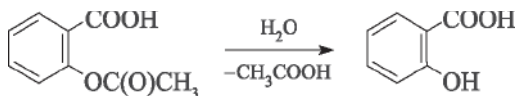
Восстановительное расщепление азогруппы было изучено на примере азокрасителя красного цвета прontosила («красный стрептоцид»), показавшего хорошие бактерицидные свойства. Оказалось, что сам краситель малоактивен, но в бактериях он легко восстанавливается с разрывом связей между атомами азота и превращается в триаминобензол и бактерицидный амид сульфаминовой кислоты («белый стрептоцид»), который представляет собой антиметаболит *n*-аминобензойной кислоты, участвующей в бактериях в биосинтезе фолиевой кислоты:



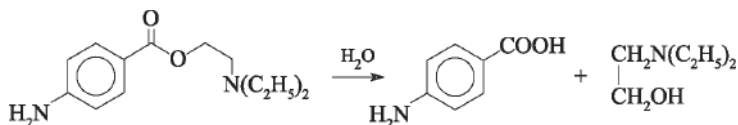
Стрептоцид — один из известнейших соединений-лидеров в синтезе большого числа антибактериальных препаратов из группы сульфамидов.

Третий путь превращений в первой фазе биотрансформации ксенобиотиков представлен реакциями гидролиза. На сложных эфирах они протекают при катализе эстеразами, на амидах — амидазами. Эти ферменты присутствуют в крови, в печени и во многих тканях тела. Скорости гидролиза подчиняются общим химическим закономерностям: эфиры гидролизуются легче, чем амиды, а стерические факторы и в ферментативном гидролизе очень важны. Самый известный пример такого превращения представлен гидролизом ацетилсалициловой кислоты (аспирина) с образованием салициловой кислоты, то есть по современной фармакологической терминологии аспирин представляет собой пролекарство, так

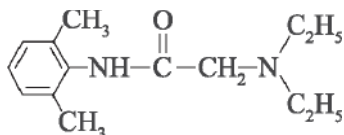
как именно салициловая кислота отвечает за лекарственную активность аспирина:



Известное местное обезболивающее средство — новокаин — гидролизуется с образованием *m*-аминобензойной кислоты и диэтиламиноэтанола:

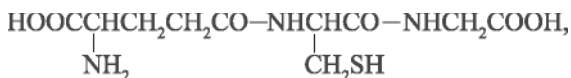


Новокаин блокирует болевые ощущение на один-два часа. Другой гораздо более эффективный местный анестетик лидокаин, амид 2,6-диметиланилина и *N,N*-диэтилглицина, обеспечивает блокаду болевых ощущений на время до шести часов:



Аниlid диэтилглицина без метильных групп, экранирующих амидную связь, тоже проявляет свойства анестетика местного действия, но скорость его гидролиза в 100 раз выше, чем у лидокаина. Высокая скорость такого превращения исключает возможность использования его в качестве лекарственного средства, так как его действие ограничивалось бы минутами.

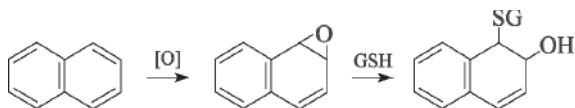
Метаболическая детоксикация электрофильных ксенобиотиков (например алкилгалогенидов и эпоксидов) протекает с участием глутатиона. Этот трипептид — γ -глутамилцистеинилглицин



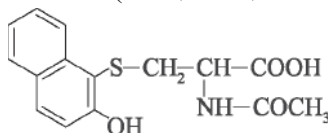
содержит нуклеофильную тиольную группу, которая легко вступает в реакции с алкилаторами и легко окисляется с образованием дисульфидной связи. Глутатион, для которого в биохимии используется обозначение GSH, содержится в тканях печени и почек в концентрации около 10 ммоль/л и он используется клетками не

только для детоксикации электрофильных ксенобиотиков. Судя по всему, глутатион принимает также участие в регуляции окислительно-восстановительного потенциала в клетках организма и в нейтрализации свободных радикалов. На этом основано использование глутатиона в средствах для лечения онкологических заболеваний.

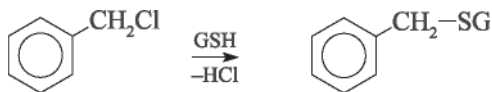
Взаимодействие глутатиона с электрофильными реагентами было показано на примере метаболической трансформации нафталина. В организме нафталин окисляется с образованием соответствующего ареноксида, который реагирует с глутатионом по схеме:



Образующееся производное глутатиона гидролизуется по пептидным связям с отщеплением остатков глутаминовой кислоты и глицина, а связанный с ксенобиотиком остаток цистеина ацетируется по аминогруппе, и из организма выводится уже производное меркаптуровой кислоты (N-ацетилцистеина):



Галогензамещенные соединения с алкилирующей способностью обезвреживаются глутатионом с участием глутатионтрансфераз по обычной схеме с образованием тиоэфиров, например:



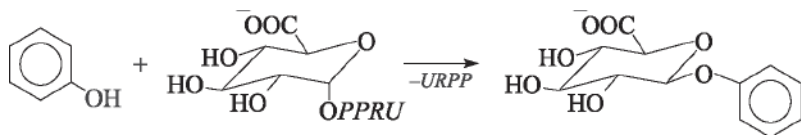
Ксенобиотики с функциональными группами и продукты их превращений в первой фазе метаболизма не всегда имеют достаточную растворимость для выведения их через почки. Для их гидрофилизации используется вторая фаза метаболизма, представляющая собой реакцию конъюгации (сочетания) с сахарами или с их производными или же с аминокислотами и простейшими пептидами. В редких случаях для этого используются также реакции сочетания с неорганическими кислотами, так как концентрация их солей в жидких средах организма поддерживается в очень узких рамках, а потери не так легко восполнить.

Реакции конъюгации протекают с участием гидроксильных, аминных, карбоксилатных или тиольных групп, которые могли при-

существовать в ксенобиотике изначально или образовались на первой фазе метаболизма. У теплокровных вторая фаза метаболизма чаще всего представлена образованием глюкуронидов — производных глюкуроновой кислоты по аномерной гидроксильной группе.

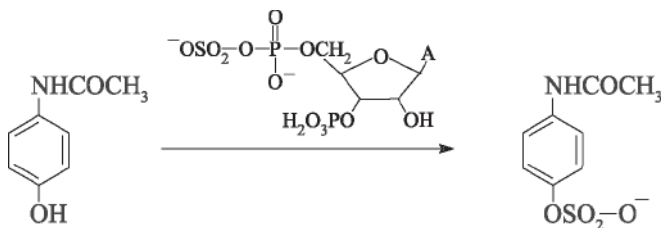
Конъюгация метаболизированного на первой стадии ксенобиотика с остатком глюкуроновой кислоты протекает в результате взаимодействия соответствующей функциональной группы ксенобиотика с уридиндифосфатглюкуроновой кислотой, которая образуется из глюкозо-1-фосфата, АТФ и уридинмонофосфата с последующим окислением концевой гидроксиметильной группы до карбоксилатной.

Так, например, фенол выводится из организма после его превращения в глюкуронид по реакции с уридиндифосфатглюкуроновой кислотой с одновременной защитой токсической гидроксильной группы (*U* — остаток урацила, *R* — остаток рибозы и *PP* — пиррофосфатный остаток):

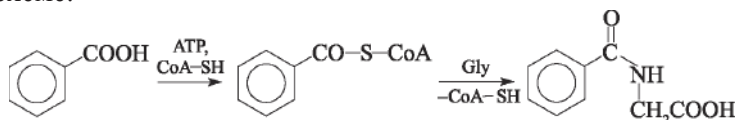


Эта реакция катализируется глюкуронилтрансферазой — ферментом, локализованным в клетках печени.

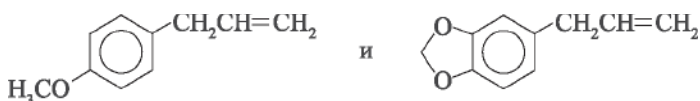
Как уже отмечалось, образование сульфатов используется живой природой реже, чем образование глюкуронидов. И все же сульфатные производные в ограниченном объеме используются для выведения из организма спиртов, фенолов и ароматических аминов. Их образование включает три стадии: из сульфатного аниона и АТФ образуется аденозин-5'-сульфат, который затем фосфорилируется с участием АТФ по 3'-положению, и уже этот смешанный ангидрид (PAPS — 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат) переносит сульфатный остаток на субстрат. Вот так, например, в виде растворимого в воде сульфата выводится из организма активное начало панадола (*A* — остаток аденина):



Ацилирование — обычная реакция второй фазы трансформации ксенобиотиков, используемая для выведения из организма токсичных кислот. В этом случае ацилированию ксенобиотиками с кислотными группами подвергаются полярные аминокислоты (например, глицин или глютаминовая кислота), гораздо реже в этом превращении участвуют серин, аспарагиновая кислота, орнитин или таурин ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$). В отличие от предыдущих реакций глюкуронирования или сульфатирования в этом случае активируется сам ксенобиотик. Его кислотная группа реагирует с АТФ и коферментом А с образованием ацилированного по атому серы кофермента А. Тиоэфиры являются хорошими ацилирующими средствами, тем не менее перенос ацильных остатков на соответствующие аминокислоты катализируется специфичными ацилтрансферазами. Так, например, токсичная бензойная кислота выводится из организма в виде гиппуровой кислоты, образующейся по схеме:



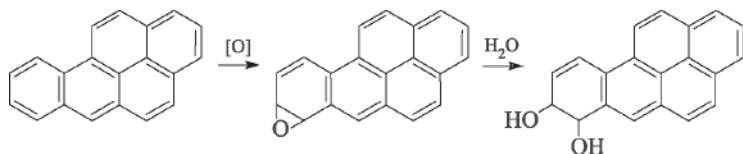
Как отмечалось выше, взаимодействие ксенобиотиков с монооксигеназами может приводить к продуктам, которые опаснее исходных соединений. Так, например, с образованием эпоксидов чаще всего окисляются входящие в состав душистых масел растений замещенные аллилбензолы:



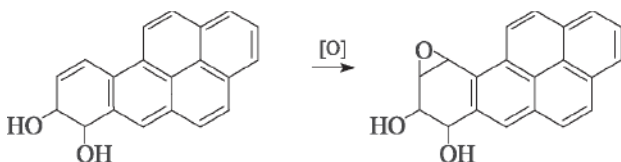
Представленные вещества, эстрагол и сафрол, содержатся в эфирных маслах укропа, сельдерея и других растений с ароматными листьями. Образующиеся из них эпоксиды обезвреживаются глютаатионом, но часть их реагирует с биохимическими мишенями, образуя аллергены и вызывая мутации.

Образование ареноксидов и эпоксидов лежит в основе канцерогенного действия полиядерных ароматических соединений. В продуктах пиролиза органических соединений (табачный дым, выхлопные газы) содержатся значительные количества бензопирена. Это вещество окисляется по 7,8-положению с образованием эпок-

сида, оксирановый цикл которого легко раскрывается эпоксидгидратазой:

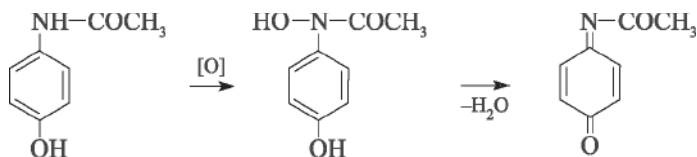


Однако при повторном акте окисления образуется эпексид, который уже не гидролизуется эпексидгидратазами:



Он встраивается по принципу интеркаляции в ДНК и после этого алкилирует азотные функции, вызывая химические превращения этого носителя наследственной информации. До 80% поступившего в организм подопытных животных бензо[а]пирена реагирует по этой схеме.

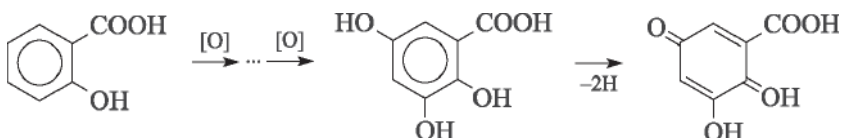
Еще один пример токсического превращения в присутствии монооксигеназ показан на парацетамоле. Этот широко рекламируемый мягкий анальгетик можно купить без рецепта, но в высоких дозах парацетамол вызывает поражения тканей печени и почек. Известны даже случаи летальных исходов от передозировки этого лекарства (вкусный детский панадол!). Как было показано выше (см. стр. 210), это вещество вступает в реакции сочетания с образованием глюкуронида или сульфата, но наряду с этим идет и реакция окисления по атому азота с образованием замещенной ацетгидроксамовой кислоты, которая дегидратируется и превращается в токсичный N-ацетилхинонимин:



N-Ацетилхинонимин легко присоединяется к нуклеофильным центрам с восстановлением ароматической структуры. Понятно,

что его действие на белки приводит к образованию аллергенов, а ДНК подвергается мутациям.

Альтернативный анальгетик аспирин гидролизуется с образованием салициловой кислоты, которая окисляется с образованием полигидроксibenзоатов. Их окисление также может приводить к токсичным хинонам, например:



Такая активация салициловой кислоты может лежать в основе так называемой аспириновой астмы, представляющей собой аллергическую реакцию на аспирин.

Еще один вариант окислительных превращений связан с галогенированными алифатическими соединениями. Известна высокая гепатотоксичность многих хлорированных углеводов. Полного понимания механизма этого эффекта пока нет, но можно предположить, что в его основе лежит образование веществ с ацилирующей способностью и свободных радикалов. В простейшем случае это можно представить на примере окисления хлороформа, который может превращаться в фосген:

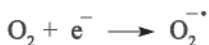


В заключение этого раздела можно сказать, что точного представления обо всех механизмах биохимической трансформации ксенобиотиков пока получить не удалось. И все же приведенные здесь примеры позволяют оценить риск, связанный с работами по синтезу новых химических соединений, и понять необходимость продуманного подхода к проблемам практического использования веществ, которые могут подвергаться биохимически превращениям с образованием токсичных веществ или индуцировать образование неизбирательных монооксигеназ.

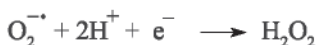
Клетки и активный кислород

Кислород включается в метаболические превращения аэробных организмов по различным механизмам. К ним относятся, например, окислительное фосфорилирование, фотофосфорилирование и окислительные превращения в нормальном метаболизме и в биотрансформации ксенобиотиков. В случае окислительных превращений различные оксигеназы вводят в структуру субстратов один или два атома кислорода. В частности, оксигеназы смешанных функций, представляющие собой гемопротеины, окисляют СН-связи с образованием гидроксильированных производных, а двойные связи могут окисляться с образованием эпоксидов (см. гл. 12). В окислительном фосфорилировании идет перенос электронов от восстановленного никотинамидадениндинуклеотида на молекулы кислорода дискретными этапами с четко фиксированными окислительно-восстановительными потенциалами. В этом процессе, связанном с прямым восстановлением молекулы кислорода четырьмя электронами, образуется вода.

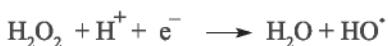
Процессы переноса электронов на кислород находятся под строжайшим ферментативным контролем, обеспечивающим полное восстановление кислорода до воды или его включение в органические молекулы. Электронная конфигурация молекулы кислорода соответствует бирадикалу и поэтому его восстановление до воды гораздо легче протекает по схеме последовательного присоединения, чем при согласованном переносе четырех электронов. Однако последовательное одноэлектронное восстановление приводит к реакционноспособным промежуточным состояниям кислорода, которые в небольшом количестве всегда сопровождают течение нормального метаболизма:



Супероксидный свободный радикал



Пероксид водорода

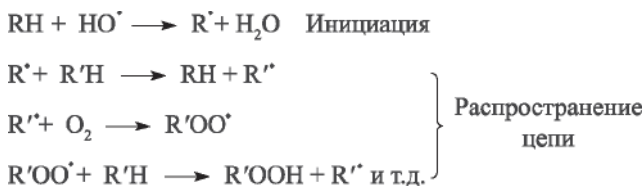


Гидроксильный радикал

При переносе на молекулу кислорода нечетного числа электронов образуются свободные радикалы, из которых самым реакционноспособным является гидроксильный радикал. Он значительно легче реагирует с органическими молекулами, чем менее реакционноспособные пероксид и супероксид, при этом супероксид легко диспропорционирует на пероксид и кислород в присутствии супероксиддисмутазы:

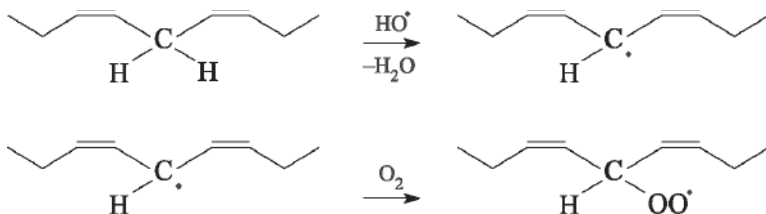


Гидроксильный свободный радикал — это мощный и неизбирательный окислитель, реагирующий с органическими веществами, входящими в состав клеток, с константами скорости порядка $1 \cdot 10^9 \div 1 \cdot 10^{10} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Вызываемое гидроксильным радикалом окисление представляет собой отрыв электрона от органической молекулы с образованием из нее свободного радикала, который с участием кислорода превращается в гидропероксид, генерируя при этом в цепной реакции новые свободные радикалы, то есть идет реакция инициации и распространения цепи:

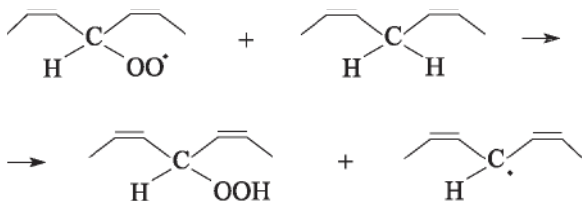


Обрыв цепи происходит в результате рекомбинации различных радикалов, в том числе и с образованием пероксидов, например ROOR' .

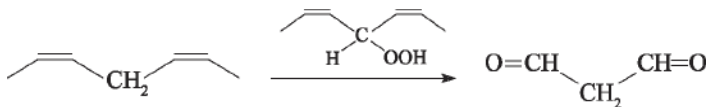
Ярче всего цепные реакции окисления проявляются на липидных компонентах клеточных мембран, где объектом атаки свободных радикалов становятся метиленовые группы между двойными связями в остатках полиненасыщенных кислот:



Затем образовавшийся пероксидный радикал отрывает атом водорода от другой метиленовой группы, превращается в гидропероксид и генерирует новый свободный радикал, который продолжает цепь свободно-радикальных превращений:



Накапливающиеся гидропероксиды окисляют другие ненасыщенные остатки по двойным связям. Одним из продуктов этого окисления становится диальдегид малоновой кислоты, присутствие которого обнаруживается специальной цветной реакцией, позволяющей количественно определять степень окислительного повреждения мембранных липидов:



Укороченные и гидрофилизированные окислительными превращениями остатки жирных кислот в составе мембранных липидов не могут больше участвовать в поддержании структуры двухслойной мембраны и она лизируется, что приводит к гибели клетки.

Свободные радикалы сильно различаются по стабильности и реакционной способности. В частности, витамин Е и многие другие фенольные соединения с объемными заместителями, принимая неспаренный электрон, делокализуют его в ароматической системе. Такие свободные радикалы не принимают участия в инициации и распространении цепи.

Продукты неполного восстановления молекул кислорода, органические пероксидные свободные радикалы и пероксидные соединения часто объединяют названием *активный кислород*. Кроме того, существует еще так называемый *синглетный кислород*. При спонтанных изменениях спина электрона обычный триплетный кислород, который из-за несоответствия электронных характеристик молекул плохо реагирует с синглетными ор-

ганическими молекулами, переходит в синглетное состояние и становится более сильным окислителем. В процессе фотосинтеза образуется также триплетный хлорофилл, а обмен электронами между ним и триплетным кислородом приводит к появлению синглетного кислорода в возбужденном состоянии, что делает его еще более сильным окислителем. Для «гашения» триплетного хлорофилла и синглетного кислорода в состав мембран клеток растений входят каротиноиды, которые принимают в систему сопряженных связей электроны триплетного хлорофилла и синглетного кислорода и удерживают их до нового спонтанного изменения спина.

Объяснение токсичности кислорода образованием свободных радикалов впервые было дано Р. Гершман (Gershman), которая обратила внимание на подобие патологических изменений при гипероксии и рентгеновском облучении. Основываясь на том, что при радиолизе водных растворов образуются свободные радикалы, она в 1954 г. сформулировала гипотезу о том, что кислородное отравление вызывается кислородными свободными радикалами, и дала этому явлению название — *гипероксидный стресс*. Точно так же действие активного кислорода, каким бы ни был его источник, называют *оксидативным стрессом*.

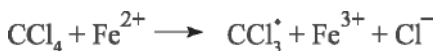
Аэробные клетки подвергаются оксидативному стрессу даже при нормальном течении метаболических процессов. В клетках печени стационарная концентрация пероксида водорода определена равной 10^{-9} моль/л. Внутриклеточный супероксид может быть образован в результате отклонений от нормального транспорта электронов в мембране митохондрий, например, так, как это постоянно идет в эритроцитах при окислении двухвалентного железа в переносящем кислород гемоглобине (Hb), превращающегося при этом в метгемоглобин (metHb):



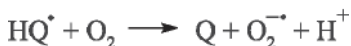
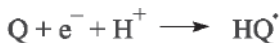
Это обеспечивает низкую, но постоянную скорость окисления некоторых железосодержащих компонент электронпереносящей цепи. Тем не менее, самую высокую склонность к одноэлектронному окислению в этой цепи показывает восстановленный убихинон или пластохинон в клетках растений.

Метаболические или экологические отклонения от нормы могут провоцировать повышенный уровень концентрации активного

кислорода. При метаболических превращениях ксенобиотиков свободные радикалы образуются в качестве основного или побочного продукта. Изучение токсических характеристик четыреххлористого углерода показало, что в основе его разрушительного действия на клетки печени лежит трихлорметильный радикал (CCl_3^\bullet), который образуется при метаболическом окислении четыреххлористого углерода цитохромом P_{450} или гемом с Fe^{2+} :



Известно также, что хиноновые соединения переводят кислород в пероксид водорода. Хорошо известному токсическому действию примахина (противомалярийного средства) на эритроциты предшествует накопление в них пероксида водорода. Флавопротеины с участием NADPH и NADH катализируют восстановление хинонов (Q) в свободнорадикальные семихиноны (HQ^\bullet), а семихиноны окисляются с образованием активного кислорода:



Окисление гидрохинонов (QH_2) также идет с промежуточным образованием семихинонов:



Токсичность хинонов объясняется как возможностью их превращения в органические свободные радикалы, так и окислительным стрессом в результате образования активного кислорода (возможность присоединения биомолекул по двойным связям хинонов здесь не рассматривается). Основной механизм зависит от химической природы хинона и от реакционной способности семихинонов в их реакции с кислородом. Во всяком случае, некоторые хиноидные антибиотики с противораковой активностью проявляют цитотоксичность через генерирование активного кислорода.

Активный кислород лежит в основе гербицидной активности и токсичности параквата и других дипиридилиевых солей (см. стр. 156), которые превращаются в катионоидные свободные радикалы при переносе одного электрона, катализируемом ферредоксинами и NADPH-зависимыми микросомальными флавопротеинами.

Катион-радикал параквата легко переносит свой неспаренный электрон на кислород с образованием супероксида, а сам возвращается в окисленную дикатионную форму.

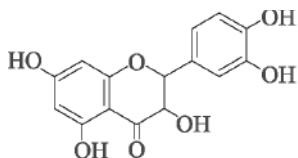
Стимулированные фагоцитные клетки (нейтрофилы) также генерируют значительные количества супероксида в результате переноса одного электрона на кислород, катализируемого NADPH-зависимым ферментным комплексом, локализованным в плазматической мембране этих клеток. Образующиеся при этом супероксид и пероксид, как известно, отвечают за бактерицидное действие нейтрофилов и участвуют в воспалительных процессах.

Многие ткани содержат ксантиндегидрогеназу (XD), которая катализирует превращение гипоксантина в ксантин и мочевую кислоту. Электроны этих субстратов переносятся на NADP^+ с образованием NADPH. Иммуноцитохимический анализ показал, что этот фермент находится в эндотелии сосудистой системы. Когда ток оксигенированной крови в сосудах какого-либо органа блокируется (ишемическая болезнь), XD подвергается частичному протеолизу и превращается в ксантиноксидазу (ХО), после чего, несмотря на накопление субстрата, перенос электронов на NADP^+ становится невозможным, так как ХО этот процесс уже не катализирует. Конечным акцептором становится кислород, и опять образуются супероксид и пероксид. Постишемический поврежденный эндотелий сосудов, омываемый оксигенированной кровью, становится источником активного кислорода и повреждается им еще больше.

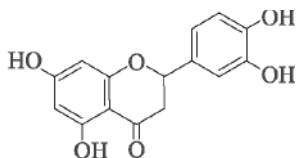
Собственные защитные системы клеток, предназначенные для нейтрализации активного кислорода и включающие такие вещества, как витамин Е, аскорбиновая кислота, глутатион и другие восстановители, достаточно эффективно справляются с образованием свободных радикалов и пероксидов в отсутствии соответствующих стрессов. Однако неблагоприятные условия окружающей среды и многие токсичные соединения вызывают усиленное образование этих окислителей и тогда собственных защитных сил организма может оказаться недостаточно.

В последнее время широкое распространение в качестве пищевых добавок и лекарственных средств получили натуральные вещества, ингибирующие течение свободнорадикальных реакций и окислительных превращений в организме человека. Более всего известны в этой области такие биофлавоноиды раститель-

ного происхождения, как рутин, кверцетин, дигидрокверцетин, эриодиктиол.



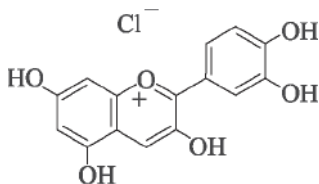
Дигидрокверцетин



Эриодиктиол

В растениях эти вещества содержатся в виде гликозидов, в частности, рутин — это гликозилированный остатками глюкозы и рамнозы по гидросильной группе пиранонового цикла кверцетин. Он относится к группе витаминов Р (от англ. *permeability* — проницаемость). Эти вещества повышают эластичность кровеносных сосудов и снижают их проницаемость. Их рекомендуется принимать при различных заболеваниях, сопровождающихся геморрагическими состояниями. Особенно эффективен рутин в сочетании с аскорбиновой кислотой (витаминный препарат аскорутин). Вместе эти вещества принимают участие в регуляции образования белка соединительной ткани коллагена и в окислительно-восстановительных превращениях.

По биологической активности к этой же группе соединений относятся и антоциановые красители, отвечающие за окраску многих цветов и плодов (шиповник, смородина, черноплодная рябина, черника). В растениях они также находятся в виде различных гликозидов. Соответствующие агликоны называют антоцианинами. В качестве примера приводится формула цианидина:

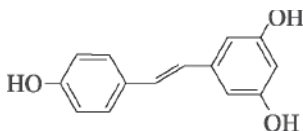


Сравнение структур флавоноидов и антоцианинов показывает, что они способны к взаимопревращениям.

Полифенольные соединения, к которым относятся также представленные выше витамины Р и антоциановые красители, широко распространены в растительном мире. Они обладают дубящим действием, основанным на денатурации белков, и поэтому расте-

ния используют их в качестве средств защиты от травоядных животных, насекомых и патогенных грибов. Вяжущий вкус во рту предупреждает, что денатурации подвергнутся и пищеварительные ферменты, что сделает поедание растений и плодов с дубящими веществами совершенно бесполезным или даже опасным.

Еще одно полифенольное соединение — ресвератрол, или 3,5,4'-тригидрокси-*транс*-стильбен, (на него обратили внимание всего лишь несколько лет тому назад) обнаружено в шкурке виноградных ягод, где он выполняет роль фитоалексина — вещества с фунгицидными свойствами, защищающего ягоды винограда от поражения плесневыми грибами:



Поскольку поражение патогенными грибами протекает обычно на холоду при влажных погодных условиях, виноград, выращиваемый в регионах с более прохладным климатом, обогащен этим биологически активным веществом.

Вероятнее всего именно ресвератрол лежит в основе так называемого «французского парадокса». Он состоит в том, что, несмотря на употребление жирной мясной пищи, французы реже страдают от сердечно-сосудистых заболеваний, чем другие европейцы. Это связывают с тем, что они чаще употребляют красное вино. Дело в том, что ресвератрол плохо растворим в воде и поэтому его очень мало в виноградном соке и в белом вине, которое получают сбраживанием виноградного сока. В отличие от этого технология приготовления красного вина основана на ферментации сока вместе со шкурками и косточками, и образующийся при этом спирт улучшает растворимость ресвератрола, а вместе с ним и придающих окраску вину антоциановых красителей.

Ресвератрол содержится во многих растениях, например, в эвкалипте, ели, в плодах шелковицы, в арахисе, но больше всего его в винных сортах винограда. Исследования показали, что ресвератрол является эффективным антиоксидантом, средством для профилактики раковых заболеваний и соединением с эстрогенной активностью.

Заключение

Проблеме взаимодействия как новых, так и уже известных химических соединений с живой природой уделяется серьезное внимание при разработке процессов химической технологии и новых материалов самого разного назначения, поскольку это связано с безопасностью производств и выпускаемой продукции. Тем более важным представляется изучение биохимии или химии живого для исследователей, специализирующихся в области экологии, токсикологии, а также в области получения косметических средств, в области синтеза лекарственных и агрохимических препаратов. Однако овладение всем богатством знаний, накопленных за многие годы развития биохимии как самостоятельной естественнонаучной дисциплины, не представляется возможным в рамках программ подготовки специалистов по химической технологии и химии биологически активных соединений.

При изучении молекулярных механизмов взаимодействия многих токсичных соединений, агрохимических препаратов и лекарств с объектами живой природы уже получен огромный объем экспериментальных данных, основываясь на которых можно с определенной уверенностью предвидеть последствия воздействия новых химических соединений на различные биохимические системы. Эти данные позволили также отказаться от принятого ранее «химического» подхода к классификации биологически активных соединений, когда, например, вещества с одинаковым механизмом действия, но с разной химической структурой изучались независимо друг от друга, или когда близкие по строению вещества объединялись в одну группу без учета механизмов их биологической активности.

В соответствии с этим представленный специализированный курс биохимии, предназначен в первую очередь для того, чтобы синтетики и разработчики новых химических технологий получили основы для понимания молекулярных механизмов конкуренции и взаимодействия ксенобиотиков с самыми разными составля-

ющими живых клеток, начиная от таких сравнительно простых молекул, как метаболиты, липиды клеточных мембран, нейромедиаторы или гормоны, и кончая белками, нуклеиновыми кислотами и другими сложными биохимическими системами на основе биополимеров. В данном курсе, например, лишь затрагиваются такие современные разделы биохимии, как молекулярная биология, но в то же время в него включены такие важные для химиков вопросы, как метаболизм ксенобиотиков и взаимодействие молекул живого с активированным кислородом, а также химия фотосинтеза, часто отсутствующая в обычных учебниках по биохимии.

Предметный указатель

С

Computer Assisted Molecular Modeling (CAMM) 13

Quantitative Structure-Activity Relationship 11

А

агонист 45, 61

аденилатциклаза 115

аденин 17, 43

S-аденозилметионин 73

аденозин 55

аденозиндифосфат 80

аденозинмонофосфат 80

аденозинтрифосфат 14, 80

адреналин 115

азидотимидин 55

цис-аконитаза 125

активные формы кислорода 214

активный транспорт 52

аланин 72

алкогольдегидрогеназа 64

аллостерические ферменты 91, 114

альдолаза 120

альдольная конденсация 119

амилаза 63

аминокислоты 70–80

– глюкогенные 83, 115

– дезаминирование 132, 135

– заменимые 79

– незаменимые 79

анаболизм 110

анаболические стероиды 194–195

анандамид 61

анаплероз 127

ангиотензин 192

аномерная гидроксильная группа 28

антенный хлорофилл 153

антибиотики 55, 56

антикодон 176

антиоксиданты 221

антоциановые красители 220

апофермент 91

арахидоновая кислота 60–61

– синтез простагландинов, проста-
циклинов и тромбоксанов 61

аргиназа 138

аргинин 76, 138

аргининосукцинат 138

аскорбиновая кислота 40–42

аспирин 207

Na⁺, K⁺-АТФаза 69

АТФ-синтетаза 21, 146–148

ауксин 198

ацетилглюкозамин 38

ацетилсалициловая кислота

См. аспирин

ацетилкофермент А 125

ацетоацетилкофермент А 130

ацикловир 55

ацилпереносящий белок 165–167

Б

белки теплового шока 189

белки 85

– первичная структура 81

– вторичная структура 82

– третичная структура 82

бензпирен в канцерогенезе 212

биотин 95

В

вазопрессин 190
валин 72
везикулы 68
вискоза 37
витамины 91
внутренняя мембрана митохонд-
рий 141
вставки 48

Г

галактоза 26
ганглиозид 64
G-белки 115
гексозофосфатизомеразы 119
гексокиназа 118
гем 93
ген 46
гепарин 39
геранилпирофосфат 168
гиббереллины 198
3-гидрокси-3-метилглутарил-
CoA 168
гидролазы 89–90
гидрофобное взаимодействие 72
гипероксидный стресс 217
гипоксантин 44
гипоталамус 187
гипофиз 187
гистидин 76
гликолиз 118
глицеральдегид-3-фосфат 119
глицеральдегид-3-фосфатдегид-
рогеназа 120
глицин 77
глутаматдегидрогеназа 135
глутамин 75, 136
глутаминаза 136
глутатион 174, 208
глюкагон 187
глюконеогенез 161–164
глюкуроновая кислота 38, 210
гуанин 43
гуанозинтрифосфат 126

Д

дегидрогеназы 92
дезоксирибоза 43
дезоксирибонуклеиновая кислота 43
декарбоксилирование пирувата 122
делеции 48
денатурация белков 84
диабет сахарный 161
дигидрокверцетин 220
дисульфидные связи 77
диурон 156

Е

еноил-CoA-гидратаза 129
енолпируват 121

И

изолимонная кислота 125
изомеразы 90
ингибирование ферментов 104–108
– необратимое 104
– обратимое 105
индуцированное соответствие 100
инсулин 161
интегральные белки 66
интроны 49

К

каптоприл 192
карбамоилфосфат 137
карбоангидраза 90
карнитин 128
 β -каротин 151
катаболизм 110
каталаза 99
 α -кетоглутарат 126
кефалин 62
кодон 48
константа Михаэлиса 98
кортикостероиды 192
кофермент А 95
коферменты 91
крахмал 35
кристы 141
ксенобиотики 199

Л

лактоза 34
лактам-лактимная таутомерия 45
лактатдегидрогеназа 121
лецитин 62
лиазы (синтазы) 90
либерины 187
лигазы (синтеказы) 90
лизин 76

М

макроэргические связи 112
малатдегидрогеназа 127
мальтоза 34
матрикс митохондрий 141
мевалоновая кислота 168
мембраны митохондрий 140–141
метаболизм аминокислот 131
метаболизм жирных кислот 128
метаболизм ксенобиотиков 199
метгемоглобин 217
метионин 72
метопрен 197
метотрексат 106
миоглобин 83
митохондрии 141
молочная кислота 121
монооксигеназы 202
мочевая кислота 45
мутаротация сахаров 27
мутации 52

Н

нафталин, биохимическое окисление 209
нейромедиаторы 186
никотинамидадениндинуклеотид 92
новокаин 208
нуклеиновые кислоты 43

О

β -окисление жирных кислот 129
окислительное фосфорилирование 140
оксалоацетат 125, 127
оксидативный стресс 217
оксидоредуктазы 89
окситоцин 191
орнитин 137
оротовая кислота 181

П

пальмитиновая кислота 167
пантенол 95
пантотеновая кислота 95
паракват 156
парацетамол 210, 212
пероксид водорода 214
пиридоксальфосфат 92, 132
пиридоксамин 132
пируват 121
плазматические (клеточные) мембраны 65
плазмалогены 63
пластохинон 154
подагра 45
половые гормоны 193
прегнин 195
пролактин 196
пролин 77
простагландины 61
простетическая группа 91
протеинкиназа 115
процессинг 179
пурамицин 179

Р

разобщители окислительного фосфорилирования 143
реакция Хилла 155
релизинг-факторы См. либерины

ресвератрол 221
ретинол 97
рибозимы 49
рибонуклеаза 84
рибонуклеиновые кислоты 43
рибосома 177
рибофлавин 92
рибулозо-1,5-дифосфат 157
рубомидин 56

С

салициловая кислота 207
сахароза 35
серин 75
сигнальная последовательность 179
симазин 156
синглетный кислород 152, 216
сквален 169
стероидные гормоны 192
стрептоцид 207
супероксид 156, 214
супероксиддисмутаза 215
сфингозин 63
сфингомиелин 63

Т

темновые реакции 159
2,3,4,6-тетрахлордибенздиоксин 206
тиаминпирофосфат 92
тилакоиды 150
тимин 43
тиолаза 130
тирозин 74, 133
токоферол 98
трансаминазы 132
транслоказы 68
транспортные РНК 176
трансферазы 89
треонин 75
триптофан 73
тропины 187

У

убихинон 93, 144
урацил 43
уридиндифосфатглюкуроновая кислота 210

Ф

факторы роста 186
фарензилпирофосфат 168
фенилаланин 74
фенилпировиноградная кислота 134
фенилкетонурия 134
ферменты 87
ферментативный катализ 98
ферредоксин 154
фитогормоны 197
флавинадениндинуклеотид 92
флавинаденинмоноклеотид 92
фолдинг 179
фолиевая кислота 94
фосфатидилхолин 62
фосфатидная кислота 62
фосфоенолпируват 121, 163, 172
фосфонометилглицин 172
фосфорилаза 54, 116
фотосинтез 149
фотосистема I 153
фотосистема II 154
фруктоза 26
фумараза 12, 104

Х

хинин 56
хлорамфеникол 179
хлоропласты 150
хлорофиллы 151
хлорсульфурон 174
холестерин 64
холофермент 91
хоризмовая кислота 172

Ц

целлюлоза 36
церамид 63
цереброзиды 64
цианкобаламин 97
цикл Кальвина 157
цикл Кребса 124
цикл мочевины 137
циклический аденозинмонофос-
фат, цАМФ 115
циклооксигеназа 60
циклофосфан 54
цистеин 77
цистин 77
цитозин 43, 45
цитокинины 108
цитохром P₄₅₀ 202
цитохромы 93

цитратсинтаза 125

цитруллин 137

Э

экдизон 196
экзоны 49
электронпереносящая цепь 144
элонгация 177
эналаприл 192
энзимы 87
эргостерин 64
эриодиктиол 220
этинилэстрадиол 195

Ю

ювенильный гормон насеко-
мых 197

Литература

1. В. Эллиот, Д. Эллиот. Биохимия и молекулярная биология. М.: Изд-во НИИ Биомедицинской химии РАМН, 2000. 366 с.
2. Ю. Б. Филиппович. Основы биохимии. М.: Изд-во Агар, 1999. 507 с.
3. Я. Кольман, К.-Г. Рём. Наглядная биохимия. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 469 с.
5. Т. Гудвин, Э. Мерсер. Введение в биохимию растений, в 2-х томах. М.: Мир, 1986.
6. А. Альберт. Избирательная токсичность. Физико-химические основы терапии, в 2-х томах. М.: Медицина, 1989.
7. Д. Л. Нельсон, М. М. Кокс. Основы биохимии Ленинджера, в 3-х томах. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. Т. 1. — 2010.
8. А. Уайт и др. Основы биохимии, в 3-х томах. М.: Мир, 1981.

Минимальные системные требования определяются соответствующими требованиями программ Adobe Reader версии не ниже 11-й либо Adobe Digital Editions версии не ниже 4.5 для платформ Windows, Mac OS, Android и iOS; экран 10"

Учебное электронное издание

Серия: «Учебник для высшей школы»

Коваленко Леонид Владимирович

**БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ХИМИИ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

Учебное пособие

Ведущий редактор канд. хим. наук *Д. К. Новикова*

Художник *С. Инфантэ*

Компьютерная верстка: *С. А. Янковая*

Подписано к использованию 11.10.19.

Формат 125×200 мм

Издательство «Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3

Телефон: (499) 157-5272

e-mail: info@pilotLZ.ru, <http://www.pilotLZ.ru>

В этом учебном пособии основное внимание уделяется метаболическим и регуляторным процессам, которые лежат в основе биорационального подхода к поиску новых активных составляющих лекарственных средств и агрохимических препаратов. В отличие от случайного поиска биологически активных соединений в биорациональном синтезе в качестве отправной точки используют представления о биологических мишенях, на которые направлено действие известных природных и синтетических веществ. При этом знание молекулярных механизмов таких взаимодействий позволяет находить пути повышения активности синтезируемых соединений, устранять побочные эффекты и выходить на новые виды биоактивности.

Коваленко Леонид Владимирович – профессор, доктор химических наук, заведующий кафедрой химии и технологии биомедицинских препаратов в Российском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева. Его научные интересы лежат в области синтеза фосфорных аналогов биогенных карбоновых кислот и гетероциклических соединений.