



ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Специальность «ФАРМАЦИЯ»

учебное пособие



**А.Д. ТАГАНОВИЧ
Е.А. ДЕВИНА
Э.И. ОЛЕЦКИЙ**

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

*Допущено
Министерством образования Республики Беларусь
в качестве учебного пособия
для студентов учреждений высшего образования
по специальности «Фармация»*

Под общей редакцией А.Д. Тагановича



Минск
«Новое знание»
2019

УДК 577.1:615.1(075.8)
ББК 28.072я73
Т13

Рецензенты:

каф. общей, биоорганической и биологической химии УО «Гомельский государственный медицинский университет» (зав. каф. — д-р мед. наук, профессор *А.И. Грицук*);
проректор по учебной работе УО «Витебский государственный имени Дружбы народов медицинский университет», д-р биол. наук, профессор *Н.Ю. Коневалова*.

Таганович, А.Д.

Т13 Фармацевтическая биохимия : учеб. пособие / А.Д. Таганович, Е.А. Девина, Э.И. Олецкий ; под общ. ред. А.Д. Тагановича. — Минск : Новое знание, 2019. — 663 [1] с. : ил.

ISBN 978-985-475-975-3.

Биологическая химия изучает молекулярные основы процессов жизнедеятельности, без которых невозможно создание, внедрение и распространение лекарственных препаратов, и является фундаментальной дисциплиной при подготовке специалистов любой отрасли современной медицины.

Учебное пособие включает основные разделы курса по общей биохимии клетки и особенностям метаболизма клеток специализированных тканей. Рассматриваются принципы методов исследования, применяемые в современной молекулярной биологии, а также механизмы фотосинтеза и особенности метаболизма лекарственных препаратов.

Для студентов медицинских специальностей, биологов, педагогов. Будет полезно на этапах последиplomного образования для магистрантов, аспирантов и клинических ординаторов, а также для практикующих фармацевтов и врачей всех специальностей.

УДК 577.1:615.1(075.8)
ББК 28.072я73

ISBN 978-985-475-975-3

© Таганович А.Д., Девина Е.А., Олецкий Э.И., 2019
© Оформление. ООО «Новое знание», 2019

Оглавление

Предисловие.....	13
Введение	14
1. Структурная организация и принципы функционирования белков	22
1.1. Биологические функции белков.....	22
1.2. Аминокислоты — главные составные части белков	23
1.2.1. Классификация аминокислот	24
1.2.2. Свойства аминокислот — основа свойств белков	28
1.2.3. Применение аминокислот в качестве лекарственных препаратов...30	
1.2.4. Получение аминокислот.....	30
1.3. Пептиды	31
1.3.1. Функции пептидов	31
1.3.2. Применение пептидов в качестве лекарственных препаратов	33
1.4. Уровни структурной организации белковых молекул	34
1.4.1. Первичная структура белка	34
1.4.2. Вторичная структура белка	36
1.4.3. Третичная структура белка	39
1.4.4. Конформационные изменения как основа функционирования белков. Лекарственные средства как лиганды для белков	40
1.4.5. Четвертичная структура белков	42
1.5. Сложные белки	45
1.6. Физико-химические свойства белков.....	46
1.7. Денатурация белков	49
2. Методы разделения, очистки и обнаружения белков, пептидов и аминокислот.....	51
2.1. Ультрацентрифугирование	52
2.2. Хроматография	53
2.3. Электрофорез.....	58
2.3.1. Факторы, влияющие на электрофорез.....	58
2.3.2. Изоэлектрофокусирование (ИЭФ)	61
2.3.3. Двумерный электрофорез.....	61
2.4. Иммунный анализ	62
2.4.1. Иммуноферментный анализ (ИФА)	62
2.4.2. Иммуноэлектрофорез (вестерн-блоттинг).....	63
2.4.3. Иммунохроматографический анализ (ИХА) и системы сухой химии (экспресс-тесты)	65
2.5. Кристаллизация	67
2.6. Определение аминокислотного состава белка.....	67
2.6.1. Идентификация N-концевой аминокислоты	68
2.6.2. Идентификация C-концевой аминокислоты.....	70
2.6.3. Определение аминокислотной последовательности.....	70
2.7. Способы получения белковых препаратов	71

3. Ферменты (энзимы) — биологические катализаторы	74
3.1. Номенклатура и классификация ферментов.....	74
3.2. Характеристика отдельных классов ферментов.....	76
3.3. Структурно-функциональная организация ферментов.....	79
3.4. Коферменты: их строение и функции	81
3.5. Общее представление о катализе.....	85
3.5.1. Механизм ферментативного катализа.....	85
3.5.2. Свойства ферментов	86
3.5.3. Основы кинетики ферментативного катализа	87
3.5.4. Факторы, определяющие активность ферментов	88
3.6. Активаторы и ингибиторы активности ферментов.....	94
3.7. Регуляция скорости ферментативных реакций	99
3.7.1. Аллостерическая регуляция.....	100
3.7.2. Регуляция активности ферментов с помощью белок-белковых взаимодействий.....	103
3.7.3. Обратимая ковалентная модификация структуры ферментов	104
3.7.4. Необратимая ковалентная модификация структуры ферментов	104
3.8. Изоферменты.....	105
3.9. Медицинские аспекты энзимологии.....	106
3.9.1. Энзимопатии и энзимодиагностика	106
3.9.2. Ферменты как аналитические реагенты.....	109
3.9.3. Иммуобилизованные ферменты	110
3.9.4. Источники и способы получения ферментов. Применение ферментов в качестве лекарственных препаратов.....	111
4. Обмен веществ и энергии. Введение в метаболизм	113
4.1. Свободная энергия в клетках.....	113
4.2. Хемотрофы и фототрофы.....	114
4.3. Организация химических реакций в метаболические пути.....	115
4.4. Понятие о метаболизме	116
4.5. Катаболизм и анаболизм — две стороны метаболизма	117
4.6. Этапы катаболизма	121
4.7. Основа катаболизма — окислительно-восстановительные реакции.....	122
4.7.1. Понятие о биологическом окислении.....	123
4.7.2. Дегидрогеназные реакции — основной источник энергии в клетке. Виды дегидрогеназ	124
4.7.3. Лекарственные препараты — ингибиторы дегидрогеназ	126
4.8. Общие пути катаболизма.....	127
4.8.1. Окислительное декарбоксилирование пирувата.....	127
4.8.2. Цикл трикарбоновых кислот — центральный путь обмена веществ.....	129

5. Биоэнергетика	134
5.1. АТФ — универсальный макроэрг в клетках.....	134
5.2. Тканевое дыхание.....	139
5.3. Дыхательная цепь переноса электронов.....	139
5.3.1. Компоненты дыхательной цепи.....	140
5.3.2. Структурная организация цепи переноса электронов.....	143
5.3.3. Функционирование дыхательной цепи	145
5.3.4. Сопряжение тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования	147
5.3.5. Окислительное фосфорилирование — основной механизм синтеза АТФ в клетке	148
5.3.6. Теория окислительного фосфорилирования	149
5.3.7. Коэффициент фосфорилирования и расчет энергетической ценности окисления различных субстратов	149
5.3.8. Регуляция процесса окислительного фосфорилирования.....	150
5.3.9. Разобщение окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания	151
5.3.10. Ингибиторы переноса электронов в дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования	152
5.4. Гипоэнергетические состояния	154
5.5. Лекарственные средства — субстраты и компоненты дыхательной цепи.....	154
5.6. Пути использования кислорода при биологическом окислении.....	155
5.6.1. Оксидазный путь использования кислорода	155
5.6.2. Оксигеназный путь использования кислорода.....	155
5.6.3. Образование активных форм кислорода и их роль в организме. Свободнорадикальное окисление.....	157
5.6.4. Антиоксидантная система	160
5.6.5. Антиоксиданты и антигипоксанты.....	162
5.6.6. Подходы к созданию комплексных антиоксидантных препаратов	162
5.7. Фотосинтез.....	163
5.7.1. Фотосинтетические пигменты	164
5.7.2. Фотосинтезирующие структуры	166
5.8. Стадии фотосинтеза	167
5.8.1. Механизм световой стадии фотосинтеза	168
5.8.2. Переносчики электронов от фотосистемы I к НАДФ ⁺	170
5.8.3. Переносчики электронов от фотосистемы II к фотосистеме I	171
5.8.4. Фотосинтетическое фосфорилирование	172
5.8.5. Фотосинтетическое и окислительное фосфорилирование: сходство и различие	174
5.8.6. Циклический поток электронов	175
5.8.7. Темновая стадия фотосинтеза.....	175

6. Химия и обмен углеводов	178
6.1. Биологическая роль углеводов	178
6.2. Классификация углеводов	179
6.2.1. Моносахариды	179
6.2.2. Олигосахариды	181
6.2.3. Полисахариды.....	183
6.2.4. Применение углеводов в медицине и фармации	189
6.3. Обмен углеводов	191
6.3.1. Переваривание углеводов.....	191
6.3.2. Патология переваривания углеводов.....	193
6.3.3. Другие функции углеводов.....	193
6.4. Всасывание глюкозы.....	193
6.5. Превращение углеводов в тканях	195
6.6. Гликоген — резервный полисахарид	197
6.6.1. Синтез гликогена (гликогенез).....	198
6.6.2. Распад гликогена (гликогенолиз)	200
6.7. Дихотомический распад глюкозы — основной путь получения энергии в клетке	203
6.7.1. Анаэробный гликолиз.....	203
6.7.2. Аэробное окисление глюкозы	208
6.7.3. Челночные механизмы переноса восстановительных эквивалентов через митохондриальные мембраны.....	209
6.8. Глюконеогенез.....	210
6.9. Глюкозо-лактатный цикл (цикл Кори)	215
6.10. Спиртовое брожение глюкозы.....	216
6.11. Восстановительный путь обмена глюкозы	217
6.12. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы.....	217
6.13. Глюкуроновый путь обмена глюкозы	221
6.14. Регуляция углеводного обмена	223
6.15. Нарушения обмена углеводов.....	224
7. Химия и обмен липидов	226
7.1. Классификация липидов	226
7.1.1. Жирные кислоты.....	227
7.1.2. Нейтральные жиры (ацилглицеролы)	229
7.1.3. Воски	232
7.1.4. Фосфолипиды	233
7.1.5. Гликолипиды	237
7.1.6. Неомыляемые липиды	239
7.1.7. Терпены (изопрены)	240
7.2. Переваривание и всасывание липидов.....	242
7.2.1. Эмульгирование липидов пищи, роль желчных кислот	242
7.2.2. Ферментативный гидролиз липидов в кишечнике	245

7.2.3. Мицеллообразование и всасывание продуктов гидролиза липидов в желудочно-кишечном тракте.....	246
7.3. Синтез липидов в стенке кишечника.....	248
7.4. Транспорт липидов.....	251
7.4.1. Структура липопротеинов.....	251
7.4.2. Номенклатура и характеристика липопротеинов.....	252
7.4.3. Транспортная форма экзогенных липидов (хиломикроны).....	253
7.4.4. Транспортные формы эндогенных липидов (ЛПОНП, ЛППП, ЛПНП, ЛПВП).....	255
7.4.5. Обратный транспорт холестерина из периферических тканей к печени (ЛПВП).....	258
7.4.6. Роль липопротеинов в развитии атеросклероза.....	261
7.4.7. Лекарственная коррекция нарушений обмена липидов при атеросклерозе.....	262
7.5. Ацетил-КоА — центральный метаболит в обмене липидов.....	264
7.5.1. Биосинтез холестерина.....	265
7.5.2. Регуляция биосинтеза холестерина.....	269
7.5.3. Биосинтез жирных кислот.....	270
7.5.4. Синтез ненасыщенных жирных кислот.....	276
7.5.5. Эйкозаноиды.....	277
7.5.6. Ингибиторы синтеза эйкозаноидов.....	282
7.5.7. Образование кетонных тел (кетогенез).....	283
7.6. Внутриклеточный метаболизм триацилглицеролов.....	285
7.6.1. Синтез триацилглицеролов.....	286
7.6.2. Ожирение.....	288
7.6.3. Использование жиров в качестве источника энергии.....	288
7.6.4. Транспорт свободных жирных кислот в плазме крови.....	289
7.7. Пути использования жирных кислот в клетках.....	290
7.7.1. Окисление жирных кислот.....	290
7.7.2. Особенности β -окисления ненасыщенных жирных кислот и жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов.....	293
7.7.3. Окисление жирных кислот в пероксисомах.....	294
8. Биомембраны и транспорт веществ.....	296
8.1. Строение, свойства и функции биомембран.....	296
8.2. Виды транспортного процесса.....	300
8.3. Антибиотики, нарушающие ионную проницаемость мембран.....	305
8.4. Липосомы как системы транспорта лекарственных веществ.....	307
9. Обмен простых белков.....	309
9.1. Азотистый баланс и оценка обеспеченности организма белками.....	309
9.2. Классификация протеаз.....	312
9.3. Переваривание (гидролиз) белков в желудочно-кишечном тракте.....	313

9.4. Внутриклеточный протеолиз	318
9.5. Ингибиторы протеолиза	319
9.6. Метаболизм аминокислот	320
9.6.1. Окислительное дезаминирование	321
9.6.2. Непрямое дезаминирование	323
9.7. Обмен аммиака	327
9.8. Синтез мочевины	330
9.9. Остаточный азот крови	332
9.10. Метаболизм безазотистого остатка аминокислот	334
9.11. Синтез аминокислот	335
9.12. Декарбоксилирование аминокислот	335
9.13. Распад биогенных аминов и катехоламинов	342
10. Химия и обмен нуклеопротеинов	345
10.1. Мономеры нуклеиновых кислот	345
10.2. Структура нуклеиновых кислот	349
10.2.1. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)	350
10.2.2. Рибонуклеиновые кислоты (РНК), их типы	354
10.3. Переваривание нуклеиновых кислот	356
10.4. Катаболизм пуриновых нуклеотидов	357
10.5. Катаболизм пиримидиновых нуклеотидов	359
10.6. Биосинтез нуклеотидов	360
10.6.1. Пути повторного использования азотистых оснований и нуклеозидов	360
10.6.2. Синтез пуриновых нуклеотидов <i>de novo</i>	362
10.6.3. Синтез пиримидиновых нуклеотидов	365
10.6.4. Биосинтез дезоксирибонуклеотидов	366
10.6.5. Азотистые основания, нуклеозиды и их производные как лекарственные средства	368
11. Биосинтез ДНК, РНК и белков. Механизмы регуляции	369
11.1. Репликация ДНК	369
11.2. Процессинг ДНК	372
11.3. Репарация ДНК	374
11.4. Транскрипция ДНК	377
11.4.1. Участники процесса транскрипции	378
11.4.2. Инициация транскрипции	380
11.4.3. Элонгация транскрипции	382
11.4.4. Процессинг	384
11.4.5. Обратная транскриптаза	387
11.5. Трансляция	388
11.5.1. Генетический код и его свойства	389
11.5.2. Активирование аминокислоты (рекогниция)	391
11.5.3. Инициация трансляции	392

11.5.4. Элонгация.....	393
11.5.5. Терминация.....	394
11.5.6. Посттрансляционный процессинг	395
11.5.7. Модификация белковых молекул после трансляции	396
11.6. Механизмы регуляции количества белков в клетке	396
11.7. Яды и лекарственные вещества, действующие на синтез нуклеиновых кислот и белков	400
11.8. Вирусы и противовирусная активность интерферонов	401
12. Методы молекулярной биологии	403
12.1. Ферменты — инструменты молекулярного биолога.....	403
12.2. Библиотеки комплементарных ДНК (кДНК)	406
12.2.1. Получение геномных библиотек.....	409
12.2.2. Синтез ДНК-зондов	410
12.3. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)	411
12.4. Геномная дактилоскопия	413
12.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	414
12.6. Обратнотранскриптазная ПЦР.....	416
12.7. Количественная ПЦР, или ПЦР в реальном времени.....	416
12.8. Секвенирование ДНК.....	417
12.9. Трансгенез.....	420
12.10. Генная терапия	422
12.11. Микрочипы.....	424
13. Гормоны. Механизмы передачи гормональных сигналов	426
13.1. Гормоны — молекулы, действующие на расстоянии.....	426
13.2. Сигнальный путь	427
13.3. Классификация гормонов по химической природе.....	428
13.4. Особенности биологического действия гормонов	428
13.5. Биосинтез гормонов	429
13.5.1. Синтез стероидных гормонов.....	430
13.5.2. Синтез гормонов, производных аминокислот.....	435
13.5.3. Вещества и лекарственные средства, влияющие на синтез йодтиронинов	439
13.5.4. Синтез гормонов белково-пептидной природы.....	439
13.6. Транспорт гормонов в кровотоке.....	442
13.7. Рецепторы и их классификация.....	443
13.7.1. 7-ТМС-рецепторы.....	444
13.7.2. 1-ТМС-рецепторы.....	444
13.7.3. Адгезионные рецепторы	445
13.7.4. Лигандзависимые ионные каналы плазматической мембраны.....	446
13.7.5. Внутриклеточные рецепторы	447
13.8. Проведение сигнала в клетке.....	449
13.9. G-белки	450

13.10. Вторичные посредники	453
13.11. Протеинкиназы	454
13.12. Механизмы проведения гормонального сигнала в клетке	456
13.12.1. Рецепторы, сопряженные с тримерными $G\alpha_s$ -белками	456
13.12.2. Рецепторы, сопряженные с тримерными $G\alpha_i$ -белками	458
13.12.3. Рецепторы, сопряженные с тримерными $G\alpha_q$ -белками	459
13.12.4. Рецепторы, обладающие тирозинкиназной активностью	461
13.12.5. Рецепторы, взаимодействующие с тирозинкиназами цитозоля	463
13.12.6. Мембранные рецепторы с гуанилатциклазной активностью	464
13.12.7. Внутриклеточные рецепторы, расположенные в цитозоле	466
13.12.8. Ядерные рецепторы	474
14. Биохимия питания. Витамины	478
14.1. Незаменимые факторы питания	478
14.2. Гормоны, контролирующие пищевое поведение	482
14.3. Лекарственные препараты, влияющие на пищевое поведение	485
14.4. Витамины — незаменимые факторы питания	485
14.5. Классификация и номенклатура витаминов	487
14.6. Жирорастворимые витамины	487
14.6.1. Витамин А (ретинол)	488
14.6.2. Витамин Е (токоферол)	493
14.6.3. Витамин К (нафтохинон)	496
14.6.4. Витамин D (кальциферол)	498
14.7. Водорастворимые витамины	500
14.7.1. Витамин B ₁ (тиамин)	501
14.7.2. Витамин B ₂ (рибофлавин)	504
14.7.3. Витамин PP (никотиновая кислота, ниацин, никотинамид) ...	505
14.7.4. Витамин B ₅ (пантотеновая кислота)	507
14.7.5. Витамин B ₆ (пиридоксин)	510
14.7.6. Витамин B ₉ (фолиевая кислота)	512
14.7.7. Витамин B ₁₂ (кобаламин)	515
14.7.8. Витамин H (биотин)	518
14.7.9. Витамин C (аскорбиновая кислота)	520
14.8. Межвитаминные взаимодействия	523
14.9. Витаминоподобные вещества	524
15. Водно-минеральный обмен	526
15.1. Роль воды в клетке	526
15.2. Обмен воды	530
15.3. Регуляция водно-минерального обмена	532

15.4. Минеральные вещества клетки. Макроэлементы	535
15.4.1. Натрий	535
15.4.2. Калий	537
15.4.3. Хлориды	540
15.4.4. Магний	541
15.4.5. Кальций	543
15.4.6. Фосфор	545
15.5. Микроэлементы	547
15.5.1. Железо	547
15.5.2. Медь	551
15.5.3. Цинк	552
15.5.4. Селен	553
15.5.5. Марганец	554
15.5.6. Йод	555
15.5.7. Кобальт	556
15.5.8. Фтор	556
16. Биохимия крови	558
16.1. Физико-химические свойства крови	558
16.1.1. Химический состав крови	559
16.1.2. Белки плазмы крови и их функции	560
16.2. Клетки крови и их биохимические особенности	566
16.3. Система гемостаза	567
16.3.1. Компоненты системы гемостаза	568
16.3.2. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз	569
16.3.3. Коагуляционный гемостаз	571
16.4. Антикоагулянтная система	577
16.5. Фибринолитическая система	579
16.6. Кислотно-основное состояние и буферные системы крови	583
16.6.1. Буферные системы крови	583
16.6.2. Нарушения кислотно-основного равновесия	585
16.7. Транспорт кислорода и углекислого газа кровью	587
16.8. Синтез гемоглобина	591
16.9. Распад гемоглобина	594
16.10. Кровь как источник лекарственных препаратов	596
17. Интеграция метаболизма	598
17.1. Условия, обеспечивающие возможность интеграции метаболизма	598
17.2. Источники АТФ	603
17.3. Контроль липолиза в адипоцитах и внутриклеточного катаболизма жирных кислот	606
17.3.1. Контроль поглощения и окисления жирных кислот	606
17.3.2. Сберегающее влияние окисления жирных кислот на углеводы	607

17.4. Центральная роль АМФК в поддержании энергетического баланса	608
17.5. Гормональная регуляция энергетического метаболизма.....	609
17.6. Особенности метаболических путей в отдельных органах и системах	611
17.6.1. Мозг	611
17.6.2. Мышцы.....	612
17.6.3. Сердце.....	614
17.6.4. Жировая ткань	614
17.6.5. Печень	616
17.7. Межорганный метаболизм после приема пищи	618
17.8. Межорганный метаболизм натошак	620
17.9. Межорганный метаболизм при голодании	621
18. Заключение. Биологическая трансформация лекарственных веществ и других ксенобиотиков	622
18.1. Биохимические методы, используемые в стандартизации и контроле качества лекарственных средств.....	623
18.2. Пути введения лекарственных средств. Всасывание	624
18.3. Транспорт лекарственных веществ в кровотоке	626
18.4. Распределение лекарственных веществ в органах и тканях	628
18.5. Взаимодействие лекарственных веществ с клеточными рецепторами.....	629
18.6. Метаболизм лекарственных веществ в организме.....	630
18.6.1. Первая фаза метаболизма лекарственных веществ	631
18.6.2. Изоферменты цитохрома P ₄₅₀ , осуществляющие биологическую трансформацию лекарственных веществ.....	634
18.6.3. Окисление лекарственных веществ немикросомными ферментами	635
18.6.4. Восстановление лекарственных веществ.....	636
18.6.5. Гидролиз лекарственных веществ	636
18.6.6. Изменение фармакологической активности лекарственных веществ в результате метаболизма	637
18.6.7. Вторая фаза метаболизма лекарственных веществ.....	637
18.7. Индивидуальные особенности биотрансформации лекарственных веществ.....	642
18.8. Влияние факторов внешней среды	643
18.9. Выведение лекарственных веществ из организма.....	644
18.10. Биофармацевтический анализ и методы изучения метаболизма лекарственных веществ.....	645
Рекомендуемая литература	649
Предметный указатель	650

Предисловие

Для медицины и фармации XXI столетия характерно значительное расширение перечня лекарственных средств и возрастающая роль лекарственной терапии в комплексе лечебных мероприятий. Это требует подготовки высококвалифицированных фармацевтических кадров, хорошо владеющих теоретическими основами биологической химии, фармакологии, фармакогнозии, технологии лекарственных форм и освоивших необходимые для работы практические навыки.

Для подготовки специалистов по специальности «Фармация» биологическая химия является базовой дисциплиной, тесно связанной с проблемами химии, биологии, медицины.

Эффективное изучение биохимических закономерностей позволит будущему провизору легко усваивать последующие дисциплины и в процессе профессиональной деятельности ориентироваться в особенностях обмена веществ у здорового и больного человека, понимать механизм действия различных лекарственных веществ и их превращения в организме. Эти знания призваны обеспечить понимание молекулярных механизмов возникновения лекарственной устойчивости, создать мотивацию к поиску новых лекарственных средств и расшифровке механизма их действия.

На понимании биохимических механизмов жизнедеятельности здорового и больного организма основываются современные принципы поиска и создания лекарственных средств.

Создание лекарств — это сложный и важный процесс, а новые технологии, основанные на знании биологической химии, помогают снизить временные и материальные затраты на их разработку. За этими технологиями будущее.

Приведенные аргументы свидетельствуют о том, что поле деятельности будущих специалистов в области фармации достаточно широко, но успешно его освоить можно только с глубокими знаниями биологической химии. Поэтому авторский коллектив создал это пособие, куда вошло большинство традиционных разделов биохимии. Материал излагается с учетом связи с созданием лекарственных препаратов. Введены специальные разделы, предназначенные для освоения студентами специальности «Фармация» (в частности, биохимическая трансформация лекарственных веществ, фотосинтез). Объем материала оптимизирован в соответствии с содержанием типовой программы по биологической химии для этой специальности и удобством его усвоения. Авторы надеются на его полезность и востребованность. Они также будут глубоко признательны за сделанные замечания и пожелания.

ВВЕДЕНИЕ

Значение биологической химии для фармации

Биологическая химия как самостоятельная наука возникла на стыке смежных дисциплин, таких как химия, биология, физиология, и сохраняет с ними тесную связь. Ее отличительная особенность — изучение живого организма как системы взаимосвязанных и взаиморегулируемых химических процессов, исходя из представлений о структуре входящих в него компонентов. Иными словами, *биологическая химия* — это наука о химическом составе живых клеток и организмов и о химических процессах, лежащих в основе их жизнедеятельности. Главная ее задача — достижение полного понимания на молекулярном уровне всех химических процессов, связанных с жизнедеятельностью клеток.

Биологическую химию подразделяют на две основные части: *статическую биохимию*, занимающуюся преимущественно анализом химического состава организма, и *динамическую биохимию*, изучающую всю совокупность превращений веществ в организме. В силу того что биохимия призвана выяснить связь химических превращений в организме с деятельностью органов и тканей, выделяют *функциональную биохимию*, исследующую химические процессы, лежащие в основе функциональной активности физиологических систем организма.

Важнейший вклад в современную биохимию вносит биоорганическая химия. То же самое относится к физиологии, поскольку биохимические сведения лежат в основе познания функций организма: пищеварения, дыхания, мышечного сокращения, деятельности нервной системы, гормональной и др.

Биохимия тесно связана с фармакологией. Современная фармакология, изучающая влияние биогенных и чужеродных для организма веществ, по существу является прикладной физиологией и биохимией, направленной на лечебные цели. При изучении свойств любого препарата, рекомендованного в клиническую практику, особое внимание уделяют путям его распределения в организме и биотрансформации с выявлением ферментных систем, ответственных за модификацию его химических и биологических свойств. Знание специфики ферментативной реакции в каждом конкретном случае помогает направленно регулировать длительность действия, токсичность лекарственных веществ, и таким образом увеличивать широту терапевтического действия.

Фармация в настоящее время располагает большим количеством препаратов животного и растительного происхождения: витамины, гормоны, их синтетические заменители, ферменты, антибиотики, различные метаболиты (АТФ, глутаминовая кислота и др.), а также антиметаболиты, различные препараты, получаемые из крови и плазмы животных, биогенные стимуляторы и многие другие, которые обладают широким диапазоном действия. Изучение химической природы и физико-химических свойств препаратов животного и растительного происхождения, их превращений в организме необходимо не только

для понимания характера их действия, но и для оценки назначаемых дозировок, учета возможной несовместимости лекарственных веществ, для сохранения активности отдельных лекарственных форм при их приготовлении, перевозке и хранении.

Развитие фармации тесно связано с познанием фундаментальных биохимических процессов в организме и разработкой биохимических методов изучения его жизнедеятельности и реакций на воздействие лекарственных средств. Фармация активно использует достижения и методологию современной биохимии. Биохимические исследования используются при биологическом обосновании эффективности различных лекарственных форм лекарственного средства или комбинации средств, при разработке биохимических методов анализа, поиске новых лекарственных средств, оценке эффективности и токсичности лекарственных препаратов и ядов, изучении механизма их действия на основе исследования их превращения и влияния на биохимические процессы в организме.

Биохимические исследования широко используются при контроле качества лекарств для оценки специфической активности, побочного действия и клинической эффективности аутобиоогенных лекарственных средств, относящихся к группе природных биорегуляторов (гормоны, витамины, ферменты, биогенные амины и т.д.). Биологические и биохимические методы используются, если физико-химические анализы оказываются недостаточно точными.

Для ряда препаратов, например белково-пептидных гормонов, ферментов, приемлема только биологическая стандартизация, поскольку содержание этих белков в образцах препаратов, определенное любыми химическими методами анализа, не позволяет оценить их биологическую активность. Это объясняется тем, что активны только нативные белки, а при выделении, приготовлении, длительном хранении лекарственных препаратов нативность может быть утрачена, что приводит к потере биологической активности при том же содержании белка. В связи с этим стандартизация, к примеру, инсулина проводится по снижению им содержания в крови глюкозы, кальцитонина — по снижению кальция, а паратгормона — по повышению содержания в крови кальция и т.д.

Вся эта совокупность биохимических знаний, необходимых для решения фармацевтических задач, рассматривается специальной областью биохимии — *фармацевтической биохимией*.

Фармацевтическая биохимия основана на применении биохимических закономерностей и методов исследования в практической фармации. Она объединяет сведения о молекулярных механизмах действия и способах обезвреживания чужеродных для организма соединений, в том числе лекарственных препаратов.

В настоящее время усилия ученых сосредоточены на внедрении новых биотехнологических методов создания и получения лекарственных препаратов, таких как гормоны, вакцины, ферменты, факторы свертывания крови, моноклональные антитела, биоактивные пептиды, интерфероны и др. Важным

аспектом современной фармацевтической биохимии остается изучение распределения лекарственных веществ в тканях организма с целью создания препаратов, имеющих избирательную тропность к патологическому очагу. Особенно перспективно это направление для противоопухолевых средств. Ведется поиск новых молекулярных мишеней, конструирование наносистем лекарственных препаратов и исследование их фармакологической и биологической активности. Создаются системы транспорта лекарственных веществ на основе природных соединений. Изучаются биохимические механизмы несовместимости лекарственных веществ.

Использование знаний биологической химии в современных условиях для создания лекарственных препаратов (драг-дизайн)

Развитие заболевания сопровождается нарушением биохимических процессов в организме. В каскадах реакций есть ключевые участники (некоторые молекулы, чаще белки), которые в большей мере, чем остальные, ответственны за происходящее. Для них, собственно, разрабатываются лекарственные препараты, т.е. они являются мишенями.

Белки — это большие молекулы. Поэтому мало просто вычислить белок как мишень среди каскадов и сетей, нужно еще и определить на этой мишени конкретное место. Его называют активным сайтом. Взаимодействие лекарственного вещества с этим самым местом и должно приводить к желаемому результату — улучшению самочувствия или выздоровлению.

Чтобы лекарственная молекула могла взаимодействовать с необходимым центром белка, она должна соответствовать множеству физических, химических и даже геометрических требований. Замок должен подходить к ключу (взаимодействие лекарственного вещества с белком-мишенью подобно закрытию или открыванию замка ключом). Эти параметры могут быть довольно точно рассчитаны с помощью компьютерных методов. В последующих главах настоящего пособия читатель увидит, что взаимодействие белка с лигандом, в том числе с лекарственным веществом, сложнее представления о ключе и замочной скважине. Белок и лиганд взаимодействуют друг с другом в ходе связывания, при этом пространственные структуры того и другого претерпевают небольшие, но значимые изменения, которые влияют на функцию как белковой молекулы, так и лиганда.

Молекула, которая обладает лекарственной активностью, связывается с определенным сайтом белка-мишени и модулирует его активность. Очень часто это модулирование заключается в ингибировании (подавлении) его взаимодействия с другими молекулами. Таким образом, исправляются ошибки, т.е. вылечивается заболевание.

Фарминдустрия и разработка лекарств. В среднем на разработку одного лекарственного препарата тратится от 1 до 2,5 млрд долларов и около 10–15 лет. Если мы уже знаем белок-мишень и тем более его активный сайт, то для первичного отбора молекул — кандидатов в лекарства можно провести высоко-

производительный экспериментальный скрининг или компьютерный виртуальный скрининг. Последнее значительно дешевле.

При проведении высокопроизводительного скрининга используются роботизированные системы. Они позволяют добавлять сотни тысяч исследуемых веществ в лунки панелей со специальным образом подготовленной тестовой системой. Разнообразные детекторы регистрируют сигналы о взаимодействии исследуемого вещества в каждой лунке с белком-мишенью тестовой системы.

Компьютерный виртуальный скрининг включает моделирование того, что происходит в каждой лунке панели высокопроизводительного скрининга, т.е. взаимодействия исследуемых молекул (среди которых мы хотим найти обладающие лекарственной активностью) с белком-мишенью. Это позволяет заменить дорогую роботизированную систему компьютерными программами, а вещества и белки — описанием их структур в определенном формате. С помощью компьютерных методов можно исключить вещества, которые плохо взаимодействуют с белком-мишенью, уменьшив количество веществ для экспериментальной проверки, что снизит затраты и увеличит шансы на успех.

Для виртуального скрининга активно используется молекулярный докинг («стыковка»). Его суть заключается в моделировании взаимного расположения малой исследуемой молекулы и белка мишени. С помощью специальной скоринговой функции, приближенно описывающей энергию взаимодействия малой молекулы с белком-мишенью, программа докинга ранжирует исследуемые вещества. Используя ее результаты, можно исключить из дальнейшего рассмотрения вещества, для которых скоринговая функция превышает некоторое пороговое значение.

Для виртуального скрининга можно взять наборы (библиотеки) химических соединений большего размера, чем для высокопроизводительного скрининга. Так как соединения уже прошли отбор на этапе виртуального скрининга, в экспериментальную проверку попадет уже «обогащенный» набор соединений, которые с большей вероятностью будут иметь лекарственную активность.

Таким образом, современный рациональный дизайн лекарств начинается со знания и понимания биохимических закономерностей структуры и функционирования молекул в живых клетках. Далее, для выхода на рынок лекарственный препарат должен пройти множество преклинических и клинических испытаний. Но даже когда препарат уже применяется на практике, исследования не прекращаются — ведь нужно проверить, нет ли у него побочных эффектов, которые могут проявляться спустя годы. Так, из 10 000–1 000 000 кандидатных молекул лишь одна обычно становится настоящим лекарственным препаратом. Шансы на успех, как мы видим, крайне малы.

Вместе с тем одно и то же лекарственное средство может помогать одному человеку, быть бесполезным для другого, а у третьего вызывать нежелательные последствия. Как мы уже говорили, взаимодействие лекарственного вещества с белком-мишенью обуславливается множеством физико-химических и пространственных параметров их обоих.

А теперь представим, что в участке ДНК, кодирующем белок-мишень пациента N, есть отличие в одном-двух нуклеотидах (составных частей ДНК) от ДНК большинства людей. То есть белок пациента N отличается от белка большинства людей. Конечно, не каждая замена в ДНК приводит к изменениям в белке и далеко не все изменения являются критическими, но лекарственное средство А может не только оказаться бесполезным для пациента N, но и вызвать серьезные побочные эффекты. Однако зная подробности замены в гене белка-мишени у пациента N (определяется с помощью генотипирования, т.е. определения нуклеотидной последовательности в том или ином гене), можно построить модель структуры измененного белка. А, зная новую структуру, можно провести скрининг и найти индивидуальный лекарственный препарат, который поможет именно пациенту N.

В других случаях изменения нуклеотидной последовательности в составе гена просто требуется замена дозировки лекарственного препарата. Это относится в первую очередь к тем генам, которые кодируют ферменты, принимающие участие в катаболизме лекарственных препаратов. Здесь также помогает генотипирование. Информацию о взаимосвязи конкретных генетических вариантов с дозировкой лекарственных веществ сегодня можно найти в специальной глобальной базе данных, чем и занимаются в передовых клиниках и, можно надеяться, будут заниматься повсеместно. Подбор лекарственных препаратов с учетом индивидуальных особенностей ДНК пациентов, которым проводится лекарственная терапия, повысит успешность лечения.

Клетка — элементарная ячейка жизни

Главным объектом исследования биохимика и основным материалом для исследования является клетка (рис. В.1) как элементарная ячейка жизни.

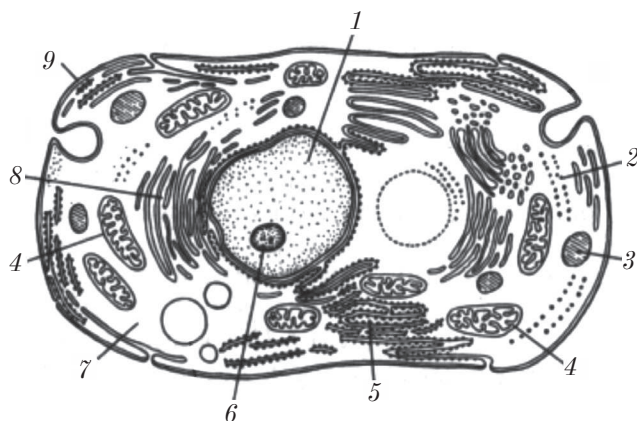


Рис. В.1. Схематическое строение клетки:

1 — ядро; 2 — рибосомы; 3 — лизосома; 4 — митохондрия; 5 — эндоплазматическая сеть шероховатая; 6 — ядрышко; 7 — гиалоплазма; 8 — эндоплазматическая сеть гладкая; 9 — плазматическая мембрана

Плазматическая мембрана является внешней мембраной клетки, которая отделяет внутриклеточную среду от внеклеточного пространства, обеспечивая целостность клетки. Клеточные мембраны обладают избирательной проницаемостью и регулируют транспорт веществ между внутренней и внешней средой.

Клеточное ядро отличается от других органелл своими размерами. Оно окружено мембраной с многочисленными порами. Ядро содержит небольших размеров образование — *ядрышко* (иногда даже несколько). Внутри ядра находится ДНК, организованная в хромосомы и содержащая генетический материал клетки. При делении клеток в ядре происходит репликация ДНК.

Митохондрии часто называют энергетическими станциями клетки. Они представляют собой сферические органеллы размером от 1 до 70 мкм, специализирующиеся на окислении органических соединений и использовании высвобождающейся энергии для генерации электрического потенциала, синтеза АТФ и термогенеза (выработки тепла). Количество митохондрий в клетках различных организмов существенно различается, составляя от нескольких десятков (сперматозоиды) до нескольких тысяч (гепатоциты, кардиомиоциты).

Каждая митохондрия состоит из наружной мембраны, внутренней мембраны, межмембранного пространства (рис. В.2).

Наружная мембрана отделяет митохондрию от цитоплазмы клетки и состоит из белков и липидов в соотношении 2:1. Особую роль играет каналаобразующий белок порин. Он формирует в наружной мембране отверстия диаметром 2–3 нм, через которые могут проникать небольшие молекулы молекулярной массой до 5000 а.е.м. и ионы. Крупные молекулы могут пересекать наружную мембрану только посредством активного транспорта с помощью транспортных белков митохондриальных мембран. Для наружной мембраны характерно присутствие ферментов, окисляющих биогенные амины (монооксигеназ), фосфолипаз A2 и гидроксилаз, катализирующих реакции окисления с участием цитохрома b_5 .



Рис. В.2. Схема строения митохондрии

Наружную мембрану от внутренней отделяет межмембранное пространство шириной около 10–20 нм.

Внутренняя мембрана ограничивает собственно внутреннее содержимое митохондрии, ее матрикс. Она состоит в основном из белковых комплексов (соотношение белок:липид составляет 3:1), представленных транспортными белками, ферментами дыхательной цепи, а также крупными АТФ-синтазными комплексами, катализирующими синтез АТФ путем конверсии энергии трансмембранного электрохимического градиента ионов водорода в энергию макроэргической связи молекулы АТФ.

Наружная и внутренняя митохондриальные мембраны имеют толщину около 7 нм.

Внутренняя мембрана образует многочисленные гребневидные складки — кристы, существенно увеличивающие площадь ее поверхности (например, в клетках печени они составляют около трети всей поверхности клеточных мембран). Особенностью состава внутренней мембраны митохондрий является присутствие в ней особого фосфолипида — кардиолипина, делающего мембрану абсолютно непроницаемой для протонов. Через мембрану их переносят специальные насосы, использующие энергию электрохимического потенциала. Внутренняя мембрана митохондрии проницаема для незаряженных простых молекул O_2 , H_2O , CO_2 , NH_3 , а также для монокарбоновых кислот. Эти вещества проходят мембрану самостоятельно по градиенту концентрации.

В матриксе митохондрий находятся ферментные системы окисления пирувата, жирных кислот, а также ферменты цикла трикарбоновых кислот. Кроме того, здесь же находится митохондриальная ДНК, РНК и собственный белок-синтезирующий аппарат митохондрии.

Лизосомы — пузырьковые образования, содержимое которых состоит из ферментов, катализирующих распад клеточных составных частей. Неконтролируемое действие этих ферментов после разрушения первичных лизосом может привести к растворению клетки, из-за чего эти органеллы получили название «самоубийцы». В нормальных условиях действие лизосомных ферментов контролируется. Лизосомы используются для растворения веществ, поступающих в клетки путем эндоцитоза. При повреждении клеток и после их гибели ферменты выходят из первичных лизосом и вызывают растворение клетки (*аутоцитоз*).

Эндоплазматическая сеть представляет собой сеть внутренних клеточных мембран, разделяющих клетку на множество цистерн и пузырьков, тесно связанных с внешней мембраной. Большая часть цистерн обладает хорошо различимыми под электронным микроскопом частичками, которые называются *рибосомами*. Каждая клетка содержит их более одного миллиона. Рибосомы представляют собой рибонуклеопротеины и являются местом синтеза белков. Мембраны эндоплазматической сети содержат ферменты для синтеза триацилглицеролов и сложных липидов. В печеночных клетках эндоплазматическая сеть служит дополнительно местом обезвреживания чужеродных веществ.

Цитозоль (гиалоплазма) — неструктурированное жидкое содержимое клетки, которое омывает все их составные части (органеллы) и заключено в мембрану. Там происходят синтез и распад углеводов, синтез жирных кислот и ряд подготовительных реакций (например, дегидрирование) для получения энергии в митохондриях.

Фракции отдельных клеточных органелл тесно связаны друг с другом. Их специфические функции подчинены выполнению общей функции клетки и тесно взаимосвязаны.

Структурная организация и принципы функционирования белков

Белки — главная составляющая часть живых организмов и материальная основа процессов жизнедеятельности. Они представляют собой высокомолекулярные природные полимерные соединения, построенные из аминокислотных остатков, соединенных посредством пептидной связи. Молекулярная масса белков колеблется в широких пределах — от нескольких тысяч до миллионов атомных единиц массы (а.е.м.).

Необходимость изучения строения, свойств и видов белков объясняется многообразием их функций. Кроме того, белки (альбумины, иммуноглобулины, плазмин, пепсин, инсулин и др.) нашли широкое применение в качестве лекарственных средств.

1.1. Биологические функции белков

Многие белки выполняют *каталитическую* функцию. К настоящему времени выделено более 5000 белков-ферментов (биологических катализаторов). Все химические реакции, лежащие в основе процессов жизнедеятельности, катализируются ферментами, а каждый фермент служит катализатором определенной химической реакции. Так, пепсин расщепляет внутренние пептидные связи в молекулах белков и пептидов, РНК-полимераза осуществляет синтез молекул РНК.

Структурную (опорную) функцию выполняют белки соединительной ткани — коллаген и эластин. Из структурного белка кератина состоят волосы и ногти. Структурные белки цитоскелета, как своего рода арматура, придают форму клеткам и органеллам.

Сократительную функцию выполняет целый класс моторных белков. В сокращении мышц участвуют белки актин и миозин. Сократительные белки обеспечивают перемещение клеток по организму, движение ресничек, жгутиков, а также активный и направленный внутриклеточный транспорт.

Белки обладают исключительными возможностями по специфическому связыванию различных соединений, что позволяет им выполнять *транспортную* функцию, связывая и перенося вещества и ионы через мембраны и между

тканями. Транспортный белок гемоглобин переносит кислород из лёгких к тканям и углекислый газ от тканей к лёгким, транскортин переносит кортикостероиды (гормоны коры надпочечников), альбумины транспортируют жирные кислоты, лекарственные вещества по крови. Некоторые мембранные белки участвуют в транспорте малых молекул через мембрану клетки, т.е. являются ионными каналами и переносчиками.

Белки системы комплемента и антитела (иммуноглобулины) выполняют *защитную* функцию, обеспечивая иммунную защиту организма от чужеродных антигенов и клеток.

Гемостатическую функцию выполняют фибриноген, тромбин и другие белки, участвующие в свертывании крови.

Многие процессы внутри клеток регулируются белковыми молекулами — это *регуляторная* функция белков. Белки регулируют клеточный цикл, транскрипцию, трансляцию, сплайсинг, активность других белков; участвуют в регуляции важных констант крови: осмотическое давление, pH и т.д.

Сигнальная функция белков — способность служить сигнальными веществами, передавая сигналы между клетками, тканями, органами. Эту функцию выполняют белки-гормоны (инсулин, тироксин, цитокины, факторы роста). Часто сигнальную функцию объединяют с регуляторной, так как многие внутриклеточные регуляторные белки тоже осуществляют передачу сигналов.

Рецепторная функция белков заключается в избирательном связывании различных регуляторов (медиаторов, гормонов) на поверхности клеточных мембран, в цитоплазме и участии в передаче гормональных сигналов в клетке.

Резервная функция белков подразумевает их использование как запасного материала для питания развивающихся клеток. К резервным относятся белки, которые запасаются в семенах растений, яйцеклетках животных. В экстремальных условиях (голодание, тяжелая интоксикация и др.) белки печени, мышц и плазмы крови могут служить «резервными белками» как источники аминокислот.

Важно понимать, что в организме один и тот же белок может выполнять несколько функций. Примером такой многофункциональности является лизил-тРНК-синтаза — фермент, который не только катализирует присоединение остатка лизина к тРНК, но и регулирует транскрипцию нескольких генов.

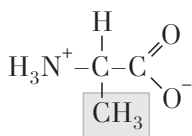
1.2. Аминокислоты — главные составные части белков

Природа, комбинируя разную последовательность аминокислот в полипептидной цепи, способна создавать бесчисленное множество белковых молекул. Например, цепочка из 100 аминокислотных остатков (небольшой белок)

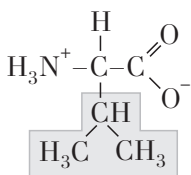
Непротеиногенные аминокислоты, которые содержатся в высших растениях и грибах, могут быть токсичными для организма другого вида. Так, β -циано-аланин и канаванин ядовиты для человека (канаванин препятствует проникновению аргинина через клеточные мембраны и может встраиваться в белки вместо аргинина). Большинство непротеиногенных аминокислот обнаружено в составе природных антибиотиков.

Современная рациональная классификация аминокислот основана на полярности радикалов, т.е. способности их взаимодействовать с водой при физиологических значениях pH. По полярности радикала различают аминокислоты:

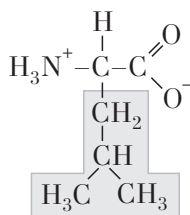
• **неполярные (гидрофобные):** аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин;



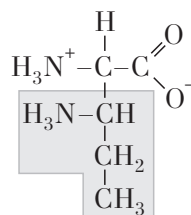
аланин



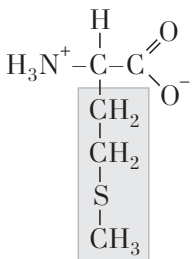
валин



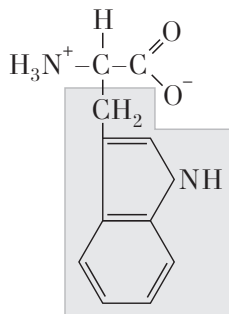
лейцин



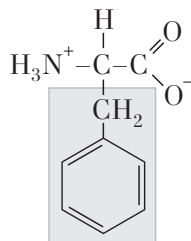
изолейцин



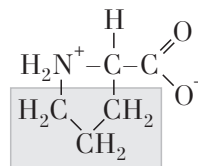
метионин



триптофан

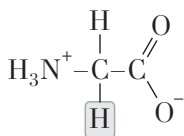


фенилаланин

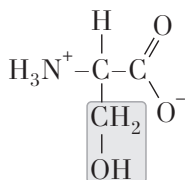


пролин

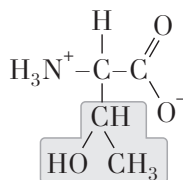
• **полярные (гидрофильные) незаряженные** при pH 7: глицин, серин, треонин, цистеин, аспарагин, глутамин, тирозин;



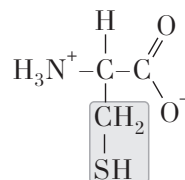
глицин



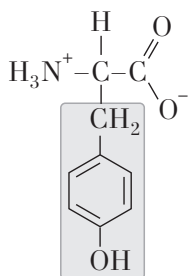
серин



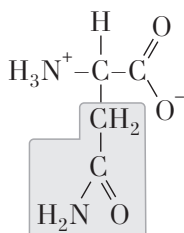
треонин



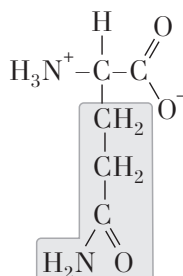
цистеин



тирозин

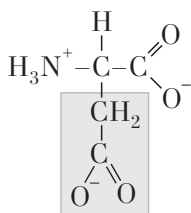
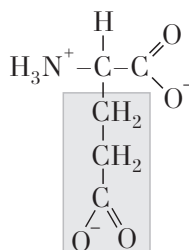


аспарагин

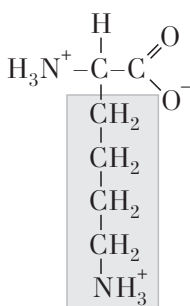


глутамин

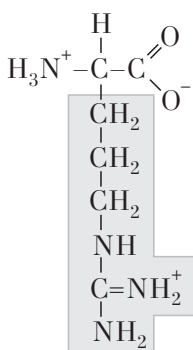
• **полярные отрицательно заряженные** при pH 7: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота;

аспарагиновая
кислотаглутаминовая
кислота

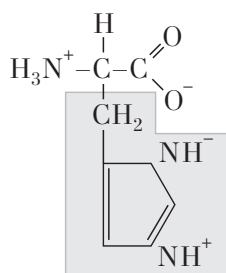
• **полярные положительно заряженные** при pH 7: лизин, аргинин, гистидин.



лизин



аргинин



гистидин

Аминокислоты по их свойствам можно разделить на основные, нейтральные и кислые. **Нейтральные** содержат одну амино- и одну карбоксильную группу, **кислые** — две карбоксильные и одну аминогруппу (за счет второй карбоксильной группы обладают в растворе отрицательным зарядом), **основные** —

две аминогруппы и одну карбоксильную (за счет второй NH_2 -группы обладают в растворе положительным зарядом).

Другая классификация использует химические особенности строения радикала.

Алифатические аминокислоты. Собственно алифатическими можно назвать 5 аминокислот: *глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин*. Атомы глицина входят в состав нуклеотидов, гема и в состав трипептида глутатиона. Аланин используется в организме для синтеза глюкозы и транспорта аммиака. Валин, лейцин, изолейцин, обладая выраженными гидрофобными свойствами, играют важную роль в формировании пространственной структуры белковой молекулы.

Гидроксиаминокислоты — *серин, треонин, тирозин* — играют важную роль в процессах ковалентной модификации структуры белков. Их гидроксильная группа легко взаимодействует с фосфорной кислотой, что бывает необходимо для изменения функциональной активности белков.

Аминокислоты, содержащие серу: цистеин, метионин. *Цистеин* благодаря активной SH-группе легко вступает в окислительно-восстановительные реакции, защищая клетку от действия окислителей, участвует в образовании дисульфидных мостиков, стабилизирующих структуру белков. *Метионин* выполняет функцию донора подвижной метильной группы, необходимой для синтеза биологически активных соединений (холина, нуклеотидов и т.д.).

Дикарбоновые аминокислоты — глутаминовая и аспарагиновая — наиболее распространенные аминокислоты белков животных организмов. Обладая дополнительной карбоксильной группой в радикале, они способствуют ионному взаимодействию, придают заряд белковой молекуле. Такие аминокислоты могут образовывать амиды.

Амиды дикарбоновых аминокислот — глутамин и аспарагин — выполняют важную функцию в обезвреживании и транспорте аммиака в организме.

Циклические аминокислоты имеют в своем радикале ароматическое или гетероциклическое ядро. *Фенилаланин, тирозин* образуют взаимосвязанную пару, выполняющую важные функции в организме (например, участвуют в синтезе гормонов — адреналина и тироксина). *Триптофан* используется для синтеза витамина РР, серотонина, гормонов эпифиза. *Гистидин* участвует в образовании гистамина, регулирующего проницаемость сосудистой стенки и проявляющего свое действие при аллергии.

Диаминомонокарбоновые аминокислоты — *лизин* и *аргинин* — имеют дополнительную аминогруппу, которая придает основные свойства белкам. Образование аргинина является частью метаболического пути обезвреживания аммиака (синтез мочевины).

Иминокислота — *пролин*. Ей отводится особое место в структуре коллагена, где пролин в процессе синтеза коллагена может превращаться в гидроксипролин.

1.2.2. Свойства аминокислот — основа свойств белков

Кислотно-основные свойства. Химические и физико-химические свойства аминокислот обусловлены тем, что они имеют две функциональные группы с противоположными свойствами: кислую карбоксильную и основную аминогруппу. Поэтому в водном растворе аминокислоты существуют в виде равновесной смеси биполярного иона, катионной и анионной форм молекулы (рис. 1.2). Равновесие зависит от pH среды.

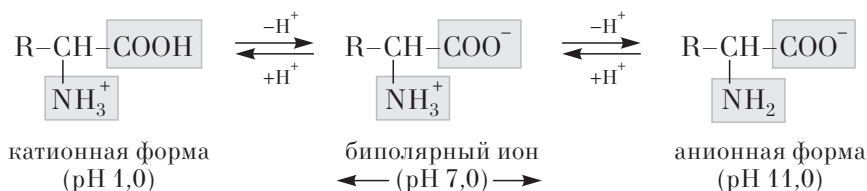


Рис. 1.2. Формы аминокислот в водной среде с различной концентрацией водородных ионов

Нейтральные аминокислоты в воде не имеют заряда.

Иначе ведут себя *дикарбоновые* аминокислоты. Обе их карбоксильные группы диссоциируют, отдавая два протона. Но поскольку у них только одна аминогруппа, принимающая один протон, такие аминокислоты ведут себя как кислоты, и их раствор имеет кислую реакцию. Возникающий при этой диссоциации ион имеет избыток отрицательного заряда.

Основные аминокислоты реагируют в водном растворе как слабые основания. Это связано с тем, что один протон, который освобождается при диссоциации карбоксильной группы таких аминокислот, связывается с одной из аминогрупп, а вторая аминогруппа связывает протон из водного окружения, увеличивая тем самым количество OH-групп и повышая значения pH. Такие аминокислоты в ионизированной форме имеют положительный заряд.

При добавлении в раствор аминокислот дополнительного количества протонов (кислоты) подавляется диссоциация карбоксильных групп и увеличивается количество NH_3^{3+} -групп. Аминокислоты при этом переходят в катионную форму, приобретая положительный заряд. При добавлении щелочи улучшаются условия для диссоциации карбоксильных групп. Тогда аминокислоты переходят в анионную форму, приобретая отрицательный заряд. Таким образом, изменяя pH раствора, можно изменять заряд молекул аминокислот. Однако количество добавляемой кислоты или щелочи для изменения величины заряда будет разным.

При определенном для каждой аминокислоты значении pH раствора наступает такое состояние, при котором заряд аминокислоты становится нейтральным. Такое значение pH получило название *изоэлектрической точки (ИЭТ)*. При значении pH, равном изоэлектрической точке, аминокислоты не переме-

щаются в электрическом поле. Кислые аминокислоты имеют ИЭТ в слабокислой среде, основные — в слабосредней, а нейтральные — в нейтральной. На этих свойствах аминокислот основана возможность разделения их в электрическом поле (электрофорез). При pH ниже ИЭТ катион аминокислоты движется к катоду (-), а при pH выше ИЭТ анион аминокислоты движется к аноду (+).

Аминокислоты, обладая одновременно свойствами слабой кислоты и слабого основания (амфотерные свойства), могут образовывать буферную систему, препятствующую изменению pH окружающего раствора.

Стереои́зомерия. Все входящие в состав живых организмов α -аминокислоты, кроме глицина, содержат асимметричный атом углерода (треонин и изолейцин содержат два асимметричных атома) и обладают *оптической активностью*. По расположению заместителей вокруг асимметричного атома углерода стереоизомеры относят к L- или D-ряду (рис. 1.3).

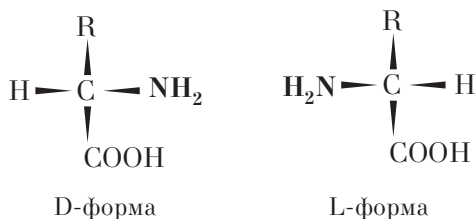


Рис. 1.3. Оптические стереоизомеры аминокислот

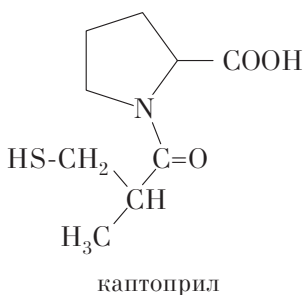
Аминокислоты, входящие в состав белков, относятся к L-ряду. Данную особенность трудно объяснить, так как в реакциях вне организма L- и D-формы образуются в одинаковых количествах. До недавнего времени считалось, что D-формы не встречаются в живой природе. Однако с помощью аминокислотного анализа D-аминокислоты были обнаружены сначала в составе клеточных стенок некоторых бактерий, а затем и в тканях высших организмов.

Установлено, что D-аминокислоты входят в состав антибиотиков, продуцируемых микроорганизмами (D-серин — в состав полимиксина, D-валин — в состав актиномицина). Именно наличие D-аминокислот в составе опиоидных пептидов (дерморфина, дермэнкефалина и делторфинов) определяет высокую биологическую активность этих пептидов как анальгетиков.

Спектральные свойства аминокислот. Все аминокислоты поглощают свет в инфракрасной области спектра. Три циклические аминокислоты (фенилаланин, тирозин и триптофан) поглощают свет в ультрафиолетовой области при $\lambda = 280$ нм.

1.2.3. Применение аминокислот в качестве лекарственных препаратов

Аминокислотам принадлежит большая роль в современной фармакологии. Некоторые аминокислоты нашли самостоятельное применение в качестве лекарственных средств. Глутаминовая кислота применяется главным образом при лечении заболеваний центральной нервной системы: шизофрении, эпилепсии, психозов, реактивных состояний, депрессии. Аспарагиновая кислота в виде калиевых и магниевых солей (Панангин, Аспаркам) используется при сердечной недостаточности. Метионин применяется для предупреждения и лечения заболеваний печени (жировая инфильтрация печени, цирроз, гепатиты). Глицин используют для лечения стрессовых состояний, при психоэмоциональном напряжении, повышенной возбудимости и нарушении сна. Лейцин служит в качестве иммунокорректора, триптофан — антидепрессанта. В медицинской практике широко применяются препараты, в состав которых входят цистеин и тирозин (Вита-йодурол, Тауфон и др.). Остатки аминокислот входят в состав сравнительно недавно созданных других лекарственных препаратов (каптоприл, ацетилцистеин и др.).



Смеси аминокислот используются для парентерального (минуя желудочно-кишечный тракт) питания при непроходимости пищевода, операциях на желудке и кишечнике, тяжелых интоксикациях.

Аминокислоты используются как вкусовые добавки в пищевой промышленности (глутамат натрия, аспарагиновая кислота), в косметической промышленности, а также как исходные вещества для синтеза пептидов и белков.

1.2.4. Получение аминокислот

Различают четыре направления получения аминокислот:

- *химический метод* — органический синтез;
- *химико-энзиматический метод* — энзиматическая трансформация химически синтезированных предшественников аминокислот с образованием биологически активных L-изомеров;

- *микробиологический метод* — синтез аминокислот с помощью бактерий, например синтез аспарагиновой кислоты из фумаровой кислоты (используются клетки *Escherichia coli*) и синтез L-фенилаланина из коричной кислоты (используются клетки дрожжей);
- *биологический метод* — применение гидролиза белоксодержащих субстратов; в настоящее время гидролизаты для парентерального питания получают из белков крови крупного рогатого скота (Гидролизин), белков крови человека (Амикровин), казеина и других белков.

1.3. Пептиды

Пептиды — это молекулы, которые построены из двух и более остатков аминокислот, соединенных в цепь пептидными связями. На сегодняшний день известно более 1500 видов пептидов, определены их свойства и разработаны методы синтеза.

Пептидная (амидная) связь возникает в результате взаимодействия α -аминогруппы ($-\text{NH}_2$) одной аминокислоты с карбоксильной группой ($-\text{COOH}$) другой аминокислоты (рис. 1.4).

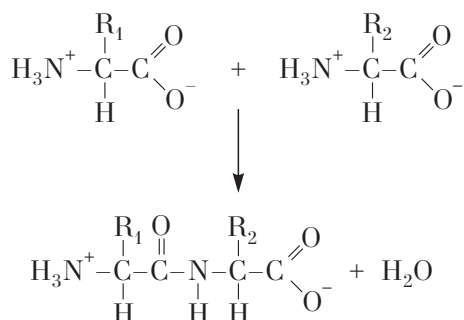


Рис. 1.4. Образование пептидной связи

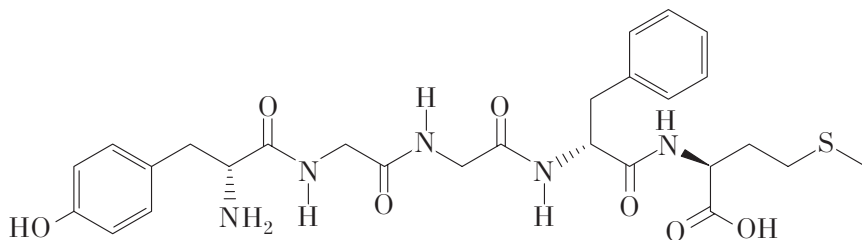
Пептиды, содержащие от 2 до 10 аминокислотных остатков, относят к *олигопептидам*, от 10 до 50 — к *полипептидам*. Полипептиды, содержащие более 50 аминокислотных остатков, принято называть белками.

1.3.1. Функции пептидов

Пептиды постоянно синтезируются во всех живых организмах. В зависимости от выполняемых функций их разделяют на несколько групп.

Нейропептиды образуются в центральной и периферической нервной системе, секретируются нервными клетками. *Эндорфины* и *энкефалины* —

опиоидные пептиды, обладающие морфиноподобным действием. Они оказывают обезболивающий эффект, модулируют поведенческие реакции. *Нейропептид Y* вызывает чувство голода и тем самым стимулирует потребление пищи.



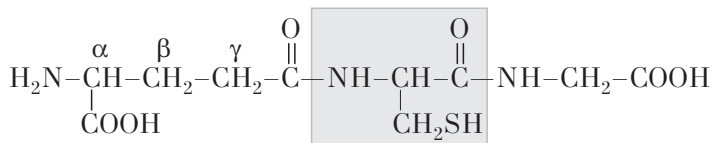
Мет-энкефалин
(Тир-Гли-Гли-Фен-Мет)

Пептиды — регуляторы функций гипофиза: либерины и статины. Они являются посредниками между гипоталамической областью мозга и эндокринной системой.

Пептиды-гормоны: окситоцин, вазопрессин, натрийуретические пептиды, глюкагон, гастрин, лептин и др.

Пептиды-нейромедиаторы связывают между собой группы нейронов (например, субстанция Р отвечает за передачу болевых импульсов).

γ -Глутаминил-пептиды — группа пептидов, содержащих глутаминовую кислоту и образующих пептидную связь своей γ -карбоксильной группой. К ним относится, например, *глутатион* — трипептид (γ -глутамил-цистеинил-глицин), который участвует в окислительно-восстановительных реакциях и является антиоксидантом.



глутатион

Глутатион также участвует в синтезе лейкотриенов, биотрансформации ксенобиотиков и связывании тяжелых металлов.

Пептиды-кинины — брадикинин, ангиотензины I и II — являются регуляторами тонуса сосудов.

Пептиды-антибиотики — группа соединений, которые широко используются в качестве лекарственных препаратов (*пенициллины, цефалоспорины*).

Пептиды-токсины. Среди них наиболее известны токсины ядовитых грибов — циклические пептиды бледной поганки *аманитин* и *фаллоидин*. В яде

пчел содержится линейный пептид *апамин*. Яд скорпионов и змей содержит пептиды-нейротоксины.

В последнее время начала развиваться новая отрасль — «веномика», изучающая белковый состав ядов различных животных и возможности его использования как источника новых фармакологически активных соединений.

1.3.2. Применение пептидов в качестве лекарственных препаратов

Интерес к аминокислотному составу и строению природных пептидов обусловлен их высокой биологической активностью. Они оказывают мощное фармакологическое действие на множество физиологических функций организма. Однако использование пептидов в качестве лекарственных препаратов перорально ограничено из-за их низкой стабильности при физиологических значениях рН и быстрого распада в организме под действием протеолитических ферментов.

Для повышения стабильности пептидов при введении в организм предприняты попытки химического синтеза пептидов с заменой аминокислотных остатков L-ряда на D-аминокислоты, а также использования приемов химической модификации аминокислотных остатков. В качестве примера можно привести лекарственное средство Даларгин — синтетический гептапептид (тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина диацетат), — которое применяется как противоязвенное средство для снижения секреции желудочного сока и сока поджелудочной железы.

На основе конформационных моделей вырабатываются принципы направленного синтеза эффективных аналогов нейропептидов, устойчивых к действию протеаз организма. Некоторые из них нашли применение в медицине (аналоги тиролиберина, кортикотропина и соматостатина). Однако в основном пептиды получают из органов и тканей животных. Так, нейропептиды выделяют из ткани мозга, окситоцин и вазопрессин — из гипоталамуса крупного рогатого скота. Для получения пептидов используется и генно-инженерный синтез.

Многие микроорганизмы являются продуцентами антибиотиков пептидной природы. Так, *Bac. polymyxa* Ross синтезирует полимиксин М, а актиномицеты — антибиотики, составляющие основу ванкомицина. При инфекциях носоглотки и верхних дыхательных путей широко используется пептид-антибиотик фузафунгин (Биопарокс) для местного воздействия. Он продуцируется особым штаммом грибов *Fusarium Lateritium* WR.

В качестве заменителя сахара используется аспартам — искусственно синтезированный дипептид, состоящий из L-аспарагиновой кислоты и метилового эфира фенилаланина.

1.4. Уровни структурной организации белковых молекул

Белки — высокомолекулярные биополимеры, которые имеют довольно сложную пространственную структуру. Датский биохимик К. Линдстрём-Ланг предложил выделять четыре уровня структурной организации белков (рис. 1.5). Первичная структура белка определяется структурой его гена, а структуры более высоких порядков формируются в процессе сворачивания полипептидной цепи или цепей в пространстве.

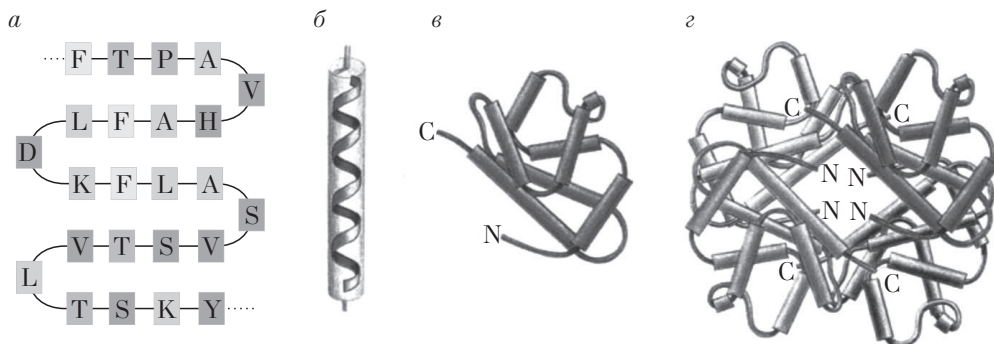


Рис. 1.5. Схематическое изображение структурных организаций белковой молекулы: а — первичная; б — вторичная; в — третичная; г — четвертичная

1.4.1. Первичная структура белка

Под **первичной структурой белка** подразумевают последовательность расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Каждый индивидуальный белок характеризуется уникальной последовательностью аминокислот. Замены аминокислот приводят не только к структурным перестройкам, но и к изменению физико-химических свойств и биологических функций белка.

Важными особенностями первичной структуры являются **консервативные мотивы** — устойчивые сочетания аминокислотных остатков, выполняющие определенную функцию и встречающиеся во многих белках. Консервативные мотивы сохраняются в процессе эволюции видов, по ним часто удается предсказать функцию неизвестного белка.

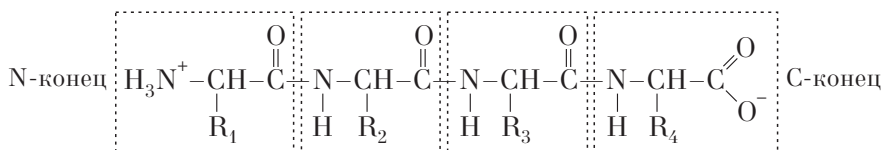


Рис. 1.6. Схематическое изображение первичной структуры белка

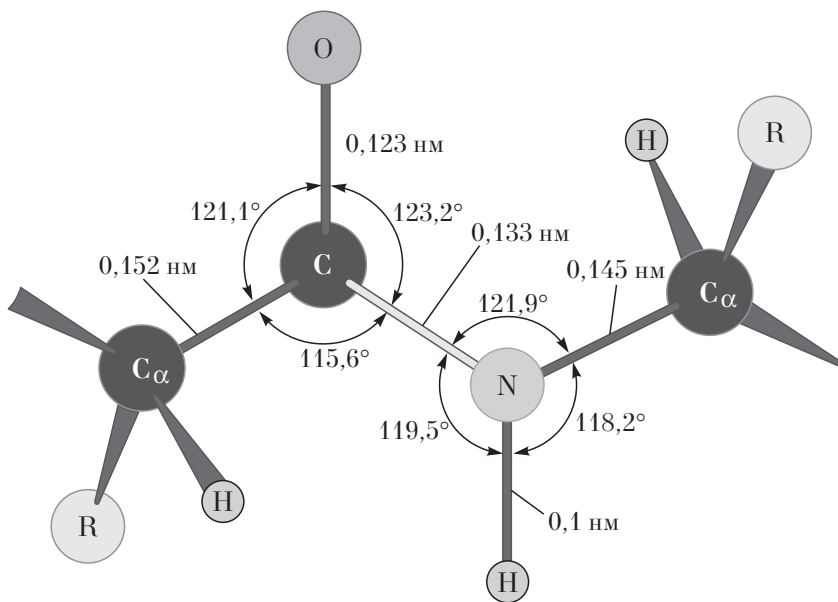


Рис. 1.7. Пептидная связь

Схематически первичную структуру можно изображать как последовательность повторяющихся группировок —NH—CH—CO— (рис. 1.6).

Основной тип связи этого уровня структурной организации — *ковалентная пептидная связь*. В стабильность первичной структуры также могут вносить свой вклад дисульфидные связи, образующиеся между SH-группами цистеина. Характерные для каждой аминокислоты радикалы расположены вне цепи. Именно эти радикалы и несут главную нагрузку при выполнении белками их функций.

Свойства пептидной связи:

- связь C–N между углеродом карбонильной группы и атомом азота имеет характер частично двойной. Это проявляется в уменьшении ее длины, по сравнению с одинарной связью, до 0,133 нм (рис. 1.7);

- атомы, образующие пептидную связь (C, N, O и H) и два α -углерода, расположены в одной плоскости (копланарны); R-аминокислоты и водороды при α -углеродных атомах находятся вне этой плоскости. Вращение вокруг связи C–N затруднено, а вращение вокруг C–C-связи возможно;

- атомы H и O в пептидной связи находятся в транс-положении, что создает условия для образования максимума (двух) водородных связей при формировании вторичной структуры (рис. 1.8) (исключение составляет аминокислота — пролин).

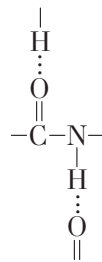


Рис. 1.8. Образование водородных связей (обозначены ...)

Пептидные связи очень прочны и при нормальных условиях, существующих в клетках, самопроизвольно не разрываются. Гидролиз пептидной связи в клетках идет при помощи специальных ферментов — протеаз. При гидролизе белки распадаются на составляющие их аминокислоты. В лабораторных условиях гидролиз пептидных связей белков проводят в запаянной ампуле с концентрированной соляной кислотой (6 моль/л) при температуре более 105 °С, причем полный гидролиз белка до свободных аминокислот проходит за 24 ч.

Каждый белок имеет свою уникальную первичную структуру, которая генетически детерминирована. Она определяет вторичную, третичную, четвертичную структуры и общую пространственную конформацию белковой молекулы.

Первичную структуру белка можно определить методом секвенирования или по первичной структуре его иРНК, используя таблицу генетического кода.

1.4.2. Вторичная структура белка

Вторичная структура белка — локальная конформация, обусловленная вращением атомов или участков полипептидной цепи вокруг одинарных ковалентных связей. Она представляет собой способ укладки полипептидной цепи в упорядоченную структуру благодаря образованию водородных связей между пептидными группами полипептидной цепи. Вторичная структура может быть спиральной и слоисто-складчатой.

α -Спираль (правозакрученная) — самая распространенная в белках вторичная структура (рис. 1.9). Она характеризуется плотными витками вокруг длинной оси молекулы. Один виток составляет 3,6 аминокислотного остатка, шаг спирали — 0,54 нм, так что на один аминокислотный остаток приходится 0,15 нм. Спираль стабилизирована водородными связями между атомами водорода и кислорода пептидных групп. Модель строения α -спирали, учитывающая свойства пептидной связи, была предложена Л. Полингом и Р. Кори.

β -Структура — зигзагообразная полипептидная цепь, в которой водородные связи образуются между относительно удаленными друг от друга в первичной структуре аминокислотами или разными участками полипептидной цепи (рис. 1.10).

Участки полипептидной цепи в составе β -структур могут быть направлены N-концами в противоположные стороны (антипараллельная β -структура) или в одну сторону (параллельная β -структура).

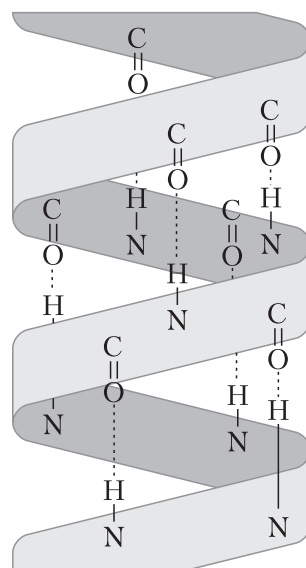


Рис. 1.9. Модель α -спирали

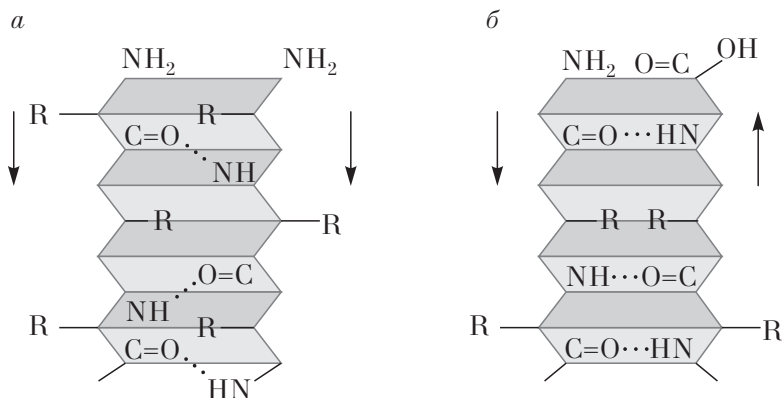


Рис. 1.10. Схематическое изображение β-структуры:
 а — параллельная; б — антипараллельная

Также возможно существование смешанной β-структуры (состоит из параллельной и антипараллельной β-структуры). Для образования β-структур важны небольшие размеры боковых групп аминокислот, среди которых обычно преобладают глицин и аланин.

β-Лист (β-складчатый слой) состоит из β-структур, связанных водородными связями и образующих складчатые листы (рис. 1.11).

В белках также встречаются области с так называемой *нерегулярной вторичной структурой*, к которым относят *изгибы*, *петли* и *повороты*. Они располагаются в местах, где меняется направление пептидной цепи. Повороты (рис. 1.12) обеспечивают изменение ее направления на 180°.

В настоящее время с помощью рентгеноструктурного анализа доказано существование промежуточного уровня структурной организации белковой

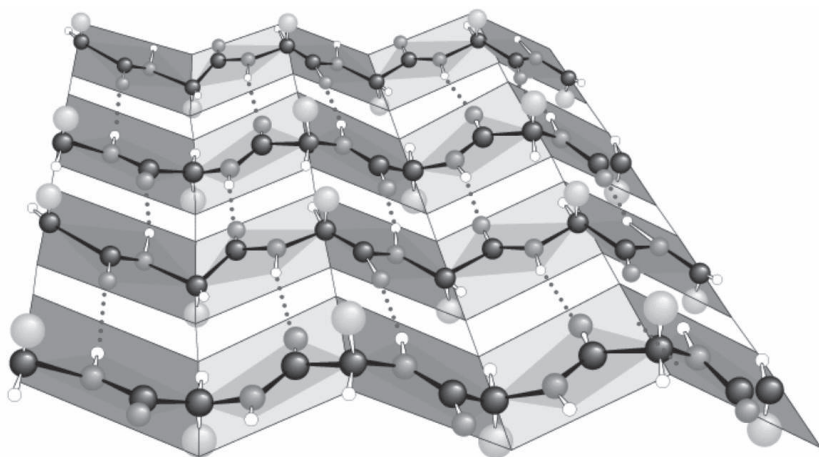


Рис. 1.11. Схематическое изображение β-листа

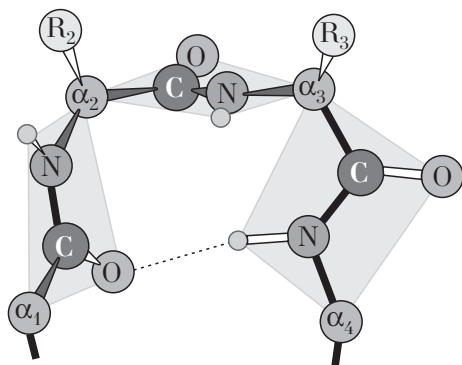


Рис. 1.12. Схематическое изображение β-поворота

молекулы — *надвторичной структуры*. Надвторичная структура формируется за счет объединения нескольких участков полипептидной цепи, организованных в пространстве в форме α-спирали или β-структуры.

В белке может быть несколько организованных таким образом глобулярных участков, которые получили название «домен». *Домен* — это компактная глобулярная структура, выполняющая определенные функции. Домены создаются объединением и чередованием α-спиралей и (или) β-структур (слоев). Открыто много белков (например, иммуноглобулины), состоящих из разных по структуре и функциям доменов.

По особенностям строения надвторичной структуры белки можно разделить на четыре класса:

- белки с преимущественно α-спиральной формой организации вторичной структуры (α/α) (рис. 1.13, а);
- белки с преимущественно β-структурной формой организации вторичной структуры (β/β) (рис. 1.13, б);
- белки со смешанной формой вторичных структур (α/β, α+β) (рис. 1.13, в, г);
- белки, не имеющие ни α-спиралей, ни β-структур.

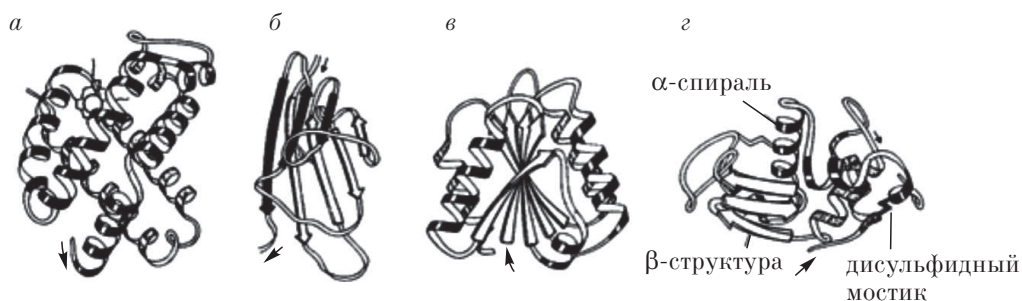


Рис. 1.13. Примеры белков с различной надвторичной структурной организацией: а — α-субъединица гемоглобина; б — константный домен иммуноглобулина; в — флаводоксин; г — лизоцим куриного яйца

1.4.3. Третичная структура белка

Третичная структура белка — это расположение в пространстве всей полипептидной цепи.

Большая часть белков на уровне третичной структуры принимает *глобулярную (шаровидную) форму*. Это связано в первую очередь с тем, что многие неполярные группы радикалов аминокислот под влиянием полярного растворителя (воды) объединяются между собой, сближаясь на расстояния, доступные для электростатического взаимодействия между ними. Это взаимодействие получило название *гидрофобного*. Оно требует небольших усилий для разрыва, тем не менее, оно важно для стабилизации пространственной структуры белка, в которой большая роль принадлежит водородным связям и ионному взаимодействию (рис. 1.14).

Силы гидрофобного взаимодействия успешно обеспечивают сочетание прочности структуры белка и ее довольно значительной подвижности, что чрезвычайно важно для выполнения им своих функций. В ряде белков, которые

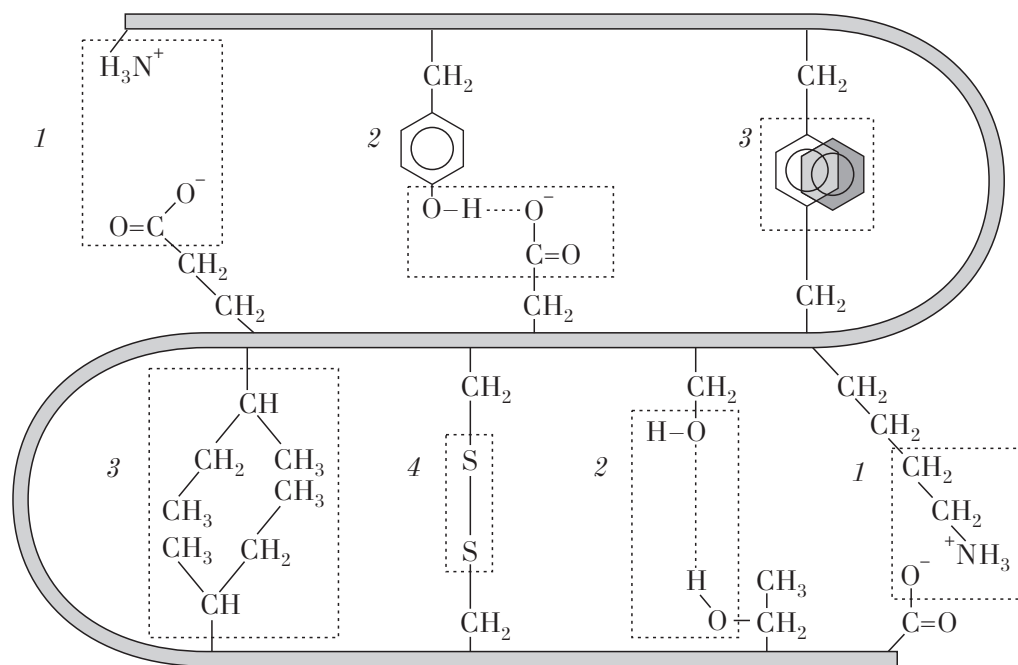


Рис. 1.14. Основные типы связей между радикалами аминокислот полипептидной цепи:

1 — электростатическое взаимодействие между положительно и отрицательно заряженными функциональными группами; 2 — водородные связи между гидрофильной незаряженной и любой другой гидрофильной группой; 3 — гидрофобное взаимодействие между гидрофобными радикалами; 4 — дисульфидные связи (формируются за счет окисления SH-групп остатков цистеина и их взаимодействия друг с другом)

секретируются клеткой, дополнительная прочность структуры достигается *ковалентными дисульфидными связями*. Например, дисульфидные связи имеются в молекулах инсулина и иммуноглобулинов.

В фибриллярных (нитевидных) белках третичная структура формируется или путем многослойной укладки плоских β -структур (например, кератин — белок волос), или параллельной укладкой нескольких спиральных структур. В любом случае возникают ориентированные в длину *волокнистые структуры*. Такие волокна имеют высокую прочность. Пример такого белка — коллаген. Его молекула представляет своеобразную суперспираль, состоящую из трех спирально свернутых полипептидных цепей. Такие суперспирали, в свою очередь, укладываются в форме более толстых *протофибрилл*, объединяющихся затем в *коллагеновое волокно*.

В заключение надо отметить, что для уникального пространственного расположения атомов в молекуле белка, которое «запрограммировано» самой аминокислотной последовательностью полипептидной цепи и поэтому образуется самопроизвольно, тем не менее, нужны помощники. Эти помощники также являются белками и получили название *шапероны*. Впервые они были открыты как «белки теплового шока» (HSP60 и HSP70). Такое название они получили в результате того, что впервые были обнаружены в клетках, подвергшихся воздействию высокой температуры. Функция этих белков заключается в защите складывающейся полипептидной цепи от взаимодействия с другими многочисленными клеточными белками и, возможно, в ускорении этого процесса.

Процесс сворачивания полипептидной цепи в правильную пространственную структуру получил название *фолдинг белков*. С нарушением фолдинга белков связывают болезнь Альцгеймера как наиболее часто отмечаемый β -амилоидоз нервной системы, поражающий лиц преклонного возраста и характеризующийся прогрессирующим расстройством памяти и полной деградацией личности. Причины нарушения фолдинга нативных белков в ткани мозга еще предстоит выяснить. Возможно, с возрастом уменьшается синтез шаперонов, способных участвовать в формировании и поддержании нативной конформации белков, или увеличивается активность протеаз, что приводит к увеличению концентрации белков, склонных изменять конформацию.

1.4.4. Конформационные изменения как основа функционирования белков. Лекарственные средства как лиганды для белков

Под *конформацией* понимают расположение атомов или групп атомов молекулы органического вещества, обусловленное возможностью вращения их вокруг одинарных ковалентных связей. Изменение конформации белковой молекулы лежит в основе ее биологической активности. Уникальная пространственная структура каждой белковой молекулы и возможность изменять

эту структуру придают белкам способность выполнять многочисленные специфические функции.

Главный принцип, лежащий в основе функционирования белков, — способность взаимодействия с другими веществами, которые получили название *лиганды*. Таким образом, любое вещество, которое специфически связывается с белком, является лигандом к этому белку.

Лигандами могут быть самые разные по химической природе вещества: белки, углеводы, липиды, неорганические вещества, металлы и т.д. Лекарственные вещества тоже являются лигандами. Между функциональными группами радикалов, входящих в активный центр, и лигандом образуются химические связи (ионные, водородные и гидрофобное взаимодействие), которые удерживают лиганд в активном центре. Примерами такого специфического белок-лигандного взаимодействия могут быть взаимодействия между ферментом и субстратом, антителом и антигеном, рецептором и его агонистом или антагонистом и т.д.

Взаимодействие между белком и лигандом происходит по механизму комплементарности. **Комплементарность** — это пространственное и химическое соответствие молекул или их фрагментов (взаимодополнение). В процессе формирования третичной структуры на поверхности белковых молекул, обычно в углублении, образуются участки (*центры связывания лиганда*), образованные радикалами аминокислот. Причем аминокислоты, образующие центр связывания, пространственно удалены друг от друга в первичной структуре белка. Их сближение становится возможным только при формировании третичной структуры. Центр связывания лиганда у каждого белка имеет уникальное строение, что обуславливает его специфичность.

Пространственное соответствие лиганда и участка связывания на молекуле белка достигается индуцированно, т.е. при их взаимном сближении возникают кратковременные взаимодействия между функциональными группами обоих участников, которые несколько изменяют их пространственное расположение. Именно благодаря такой «деформации» достигается комплементарность. С другой стороны, изменение, даже небольшое, пространственного расположения функциональных групп в центре связывания кооперативно вызывает небольшие изменения пространственного расположения функциональных групп (следовательно, связей между ними) в других участках полимерной молекулы белка. Здесь в полной мере реализуется принцип кооперативности мономеров в полимере. В результате белок приобретает новые свойства и функции.

На изменение конформации белков, а значит, и на их функциональную активность влияют такие неспецифические факторы, как изменение pH и температуры. К специфическим факторам регуляции функциональной активности белков относятся вещества, взаимодействующие с определенными белками.

Лекарственные средства также являются лигандами для белков-рецепторов, способными изменять их конформацию. Если при взаимодействии со специфическими рецепторами возникает изменение структуры рецептора, приводящее

к биологическому эффекту, такое лекарственное средство относится к *агонистам*. Так, например, для лечения болезни Паркинсона применяется группа лекарственных препаратов — агонистов дофаминовых рецепторов, которые стимулируют дофаминовые рецепторы, воспроизводя эффект дофамина. Вещества, связывающиеся с рецепторами, но не вызывающие их стимуляции, называют *антагонистами* или *блокаторами*. Их фармакологические эффекты обусловлены антагонизмом с эндогенными лигандами (медиаторами, гормонами), а также с экзогенными веществами — агонистами.

1.4.5. Четвертичная структура белков

Под *четвертичной структурой* понимают структуру белков, состоящих из нескольких полипептидных цепей (рис. 1.15). Каждая из этих цепей имеет свою пространственную структуру и называется *субъединицей*. Белок при таком объединении нескольких цепей приобретает новую функцию и называется *олигомерным белком*.

Связи между субъединицами, как правило, *нековалентные* (силы гидрофобного взаимодействия, ионные, водородные), хотя в ряде белков (например, белки плазмы крови) субъединицы соединены ковалентными дисульфидными мостиками.

Появление белков с четвертичной структурной организацией расширило качественное разнообразие белков при незначительном увеличении количества генетического материала. Например, фермент лактатдегидрогеназа (ЛДГ), состоящий из четырех субъединиц, формируется из двух генетически детерминированных полипептидных цепей — Н и М. Их разные комбинации позволяют создать пять ферментов, катализирующих одинаковую реакцию в разных органах и тканях, — 4Н, 3Н1М, 2Н2М, 1Н3М, 4М:



Такие белки с одинаковыми функциями, но с отличающимися физико-химическими свойствами, получили название *изопротеинов*.

У олигомерных белков по сравнению с белками, обладающими тремя уровнями структурной организации, появляются качественно новые функции.

Влияние четвертичной структуры на функциональные свойства белка можно рассмотреть, сравнив два родственных гемсодержащих белка — миоглобин и гемоглобин. Оба белка имеют общее эволюционное происхождение.

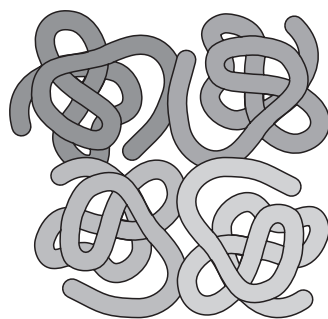


Рис. 1.15. Четвертичная структура гемоглобина

Миоглобин сходен с β -цепью гемоглобина, но гемоглобин — тетрамер, а миоглобин — мономерный белок.

Функция миоглобина заключается в создании в мышцах кислородного резерва, который расходуется по мере необходимости, восполняя временную нехватку кислорода. Миоглобин состоит из 153 аминокислот с общей молекулярной массой 17 тыс. а.е.м. Подобно гемоглобину, его структура включает простетическую группу — *гем*.

Гем состоит из четырех пиррольных колец, соединенных в плоскую молекулу метиленовыми мостиками. Атом железа занимает центральное положение в молекуле гема и может образовывать шесть координационных связей, четыре из которых удерживают Fe^{2+} в центре, соединяя его с атомами азота пиррольных колец, а пятая связь возникает между Fe^{2+} и атомом азота имидазольного кольца гистидина в составе глобиновой полипептидной цепи (рис. 1.16). Присоединяя молекулу кислорода, атом железа как бы погружается в плоскость молекулы гема и изменяет конформацию глобина.

Гемоглобин присутствует в эритроцитах и участвует в транспорте кислорода к тканям. В отличие от миоглобина, гемоглобин обладает четвертичной структурой. Он состоит из четырех полипептидных цепей — двух α - и двух β -цепей. Каждая из них связана с гемом (рис. 1.17). Поэтому 1 молекула гемоглобина связывает 4 молекулы кислорода. Кривая насыщения гемоглобина кислородом, в отличие от миоглобина, имеет S-образный вид. Такой тип кривой показывает *кооперативное взаимодействие* (взаимовлияние протомеров олигомерного белка друг на друга).

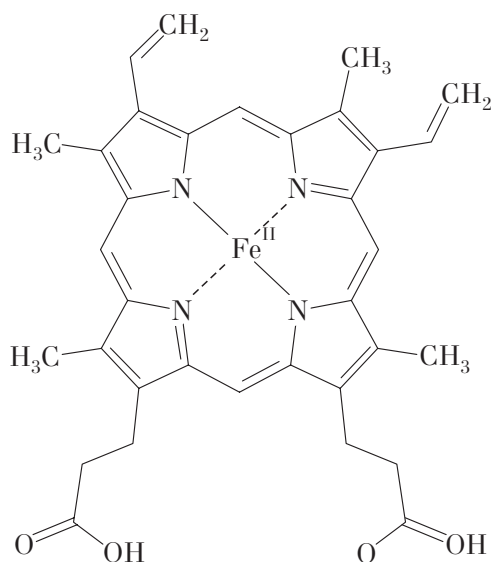


Рис. 1.16. Структурная формула гема

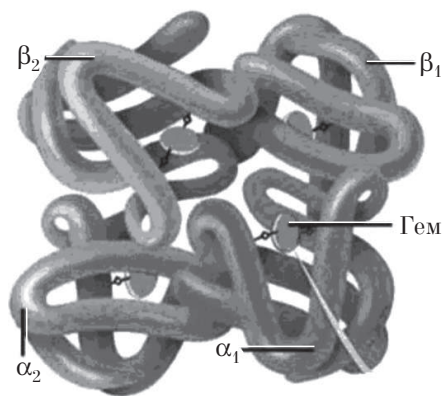


Рис. 1.17. Молекула гемоглобина

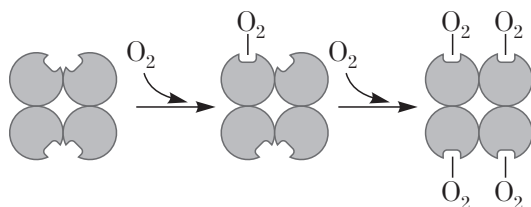


Рис. 1.18. Кооперативные изменения конформации протомеров гемоглобина при присоединении кислорода

Присоединение молекулы кислорода к атому Fe^{2+} одного протомера вызывает переход электронов атома железа из высокоспинового в низкоспиновое состояние и перемещение его в плоскость порфириновых колец. Проксимальный гистидин, будучи связанным с железом, перемещается вслед за атомом Fe^{2+} . Вследствие этого меняется пространственное расположение атомов или конформация полипептидной цепи.

То, что гемоглобин — белок с четвертичной структурой и отдельные его цепи связаны между собой, позволяет передать изменения конформации на область связи между полипептидными цепями. Это в свою очередь изменяет положение субъединиц, что облегчает доступ кислорода к остальным гемам молекулы гемоглобина (рис. 1.18). В результате такое кооперативное взаимодействие субъединиц гемоглобина ускоряет присоединение кислорода в 300 раз.

Кривые насыщения гемоглобина и миоглобина кислородом представлены гиперболой (рис. 1.19). Из рисунка следует, что скорость насыщения миоглобина кислородом намного превышает таковую для гемоглобина. Когда парциальное давление кислорода составляет всего 2,8 мм рт. ст., достигается 50%-е насыщение миоглобина кислородом. Для гемоглобина такое насыщение наступит при парциальном давлении кислорода примерно 26 мм рт. ст. В артериальной крови, вытекающей из легких (парциальное давление кислорода около 100 мм рт. ст.), и миоглобин, и гемоглобин насыщены кислородом более

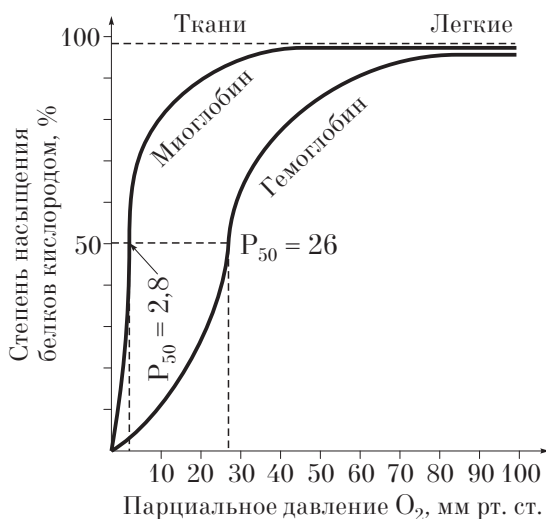


Рис. 1.19. Кривые насыщения кислородом гемоглобина и миоглобина

чем на 95 %. В работающей мышце при парциальном давлении кислорода 10 мм рт. ст. гемоглобин насыщен кислородом только на 10 %, тогда как миоглобин остается насыщенным на 90 %, т.е. миоглобин отдает малую часть связанного с ним кислорода, а гемоглобин, напротив, эффективно отдает кислород в мышцах и других периферических тканях. Это свидетельствует о том, что гемоглобин — хорошее транспортное средство для переноса кислорода и обеспечения им тканей, а миоглобин эффективно связывает и запасает кислород. Таким образом, миоглобин и гемоглобин приспособлены для выполнения различных функций.

1.5. Сложные белки

Некоторые белки состоят только из аминокислот, такие белки называют *простыми*. К группе *сложных белков* относятся соединения, в которых, кроме белковой части, содержатся небелковые компоненты различной химической природы. В зависимости от химической природы небелкового компонента сложные белки разделяют на несколько классов.

Гликопротеины — это белки, содержащие в качестве небелкового компонента ковалентно связанные углеводные остатки. Углеводная часть гликопротеинов представлена моносахаридами или небольшими гетерополисахаридами. Для гликопротеинов характерна гликозидная связь. Если углеводные остатки связаны с амидной группой аспарагина в составе белковой молекулы, образуется *N-гликозидная связь* (в иммуноглобулинах, гормонах, таких как гонадотропин и тиреотропин). Если в образовании связи с углеводными остатками участвуют ОН-группы серина или треонина в составе белковой молекулы либо ОН-группы гидроксилизина или гидроксипролина в коллагене, то образуется *O-гликозидная связь*.

Гликопротеины осуществляют функции транспорта гидрофобных веществ и ионов металлов (церуллоплазмин, трансферрин), участвуют в свертывании крови (фибриноген, протромбин), иммунной защите (иммуноглобулины). Гликопротеины, находящиеся на поверхности мембран клеток, обеспечивают специфичность межклеточных контактов, определяют группы крови и выполняют рецепторную функцию.

Липопотеины — белки, содержащие в качестве небелкового компонента нековалентно связанные липиды. Белковые компоненты липопотеинов — апобелки — отличаются друг от друга по структуре и аминокислотному составу. В клетках липопотеины входят в состав биологических мембран. Липопотеины плазмы крови выполняют функцию транспорта липидов. Липопотеины переносят триацилглицеролы, фосфолипиды, холестерол и его эфиры, жирорастворимые витамины, β -каротины. Между апотеином и липидами образуются ионные связи и гидрофобное взаимодействие.

Нуклеопотеины — белки, содержащие нековалентно связанные ДНК или РНК. Связь между небелковым компонентом и белком — ионная. Нуклеопо-

теинам принадлежит важная роль в сохранении, передаче и реализации генетической информации.

Металлопротеины — белки, содержащие координационно связанные ионы металлов. Среди металлопротеинов есть белки, выполняющие депонирующие и транспортные функции (например, железосодержащие ферритин и трансферрин). Многие ферменты также содержат в своем составе металлы (например, карбоангидраза и супероксиддисмутаза, содержащие в своих активных центрах ионы меди, марганца или железа).

Фосфопротеины — белки, содержащие в качестве небелкового компонента ковалентно связанные остатки фосфорной кислоты. В образовании сложноэфирной связи с фосфатом участвуют гидроксильные группы серина или треонина. Фосфопротеином является, в частности, казеин молока. Фосфопротеины широко распространены в клетке. Процесс фосфорилирования является способом влияния на конформацию белка и используется в системах регуляции процессов жизнедеятельности (например, фосфорилирование ферментов изменяет их активность, а фосфорилирование белков-гистонов снижает их способность связываться с ДНК).

Хромопротеины — это белки, имеющие окраску и содержащие простетические группы различной химической природы. К ним относятся белки с металлсодержащей порфириновой простетической группой (гемоглобин, миоглобин, хлорофиллы), а также ферменты (цитохромы, каталаза, пероксидаза).

Флавопротеины содержат в качестве небелкового компонента группы, представленные изоаллоксазиновыми производными — флавиномононуклеотидом (ФМН) и флавинадениндинуклеотидом (ФАД). Флавопротеинами являются некоторые оксидоредуктазы — ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции в клетке.

1.6. Физико-химические свойства белков

Аминокислотный состав и пространственная организация белка определяют его физико-химические свойства. Белки обладают кислотно-основными, буферными, коллоидными и осмотическими свойствами.

Кисотно-основные свойства. Белки являются амфотерными соединениями. Это их свойство обусловлено амино- и карбоксильными группами боковых радикалов аминокислот, входящих в состав белка. Поскольку большая часть полярных групп находится на поверхности глобулярных белков, то именно они определяют кислотно-основные свойства и заряд белковой молекулы. Чем больше кислых аминокислот (аспарагиновой, глутаминовой) содержится в белке, тем ярче выражены его кислотные свойства. Наоборот, чем больше в состав белка входит основных аминокислот (аргинин, лизин, гистидин), тем сильнее проявляются его основные свойства. Свободные амино- и карбоксильные группы в белке находятся в ионизированном состоянии в зависимо-

сти от рН. Как и аминокислоты, белки при определенном значении рН имеют нейтральный заряд, и такое значение рН называют *изоэлектрической точкой белка (ИЭТ)*. При рН ниже ИЭТ увеличивается положительный заряд и молекула белка становится *катионом*. При рН выше ИЭТ увеличивается отрицательный заряд и белок становится *анионом*. У большинства белков значение ИЭТ колеблется в пределах 2,7–7,9. Знание ИЭТ белка важно для осаждения белков и разделения белков методом электрофореза.

Буферные свойства. Подобно аминокислотам, белки обладают буферными свойствами. Наибольший эффект буфер проявляет при значении рН, равном значениям pK^1 ионизированных групп. Учитывая, что у белков таких групп на поверхности молекулы довольно много, белок как буферная система может перекрыть широкий диапазон значений рН. Поэтому, например, белки плазмы крови проявляют эти свойства в поддержании кислотно-щелочного равновесия крови.

Коллоидные и осмотические свойства белков. Провизору в практической деятельности довольно часто приходится иметь дело с растворами белка. Поведение белков в растворах имеет некоторые особенности. Белки образуют в воде особую форму — *растворы высокомолекулярных соединений*. По механизму их образования они напоминают истинные растворы, однако размеры белковых частиц придают растворам свойства *коллоидных систем*:

- малую скорость диффузии;
- неспособность проникать через полупроницаемые мембраны;
- опалесценцию растворов и рассеивание лучей видимого света;
- высокую вязкость растворов;
- способность к гелеобразованию.

Малая скорость диффузии. Под *диффузией* понимают самопроизвольное перемещение молекул растворенных веществ вследствие градиента концентрации (из зоны с высокой концентрацией в зону с низкой). Белки имеют ограниченную скорость диффузии по сравнению с ионами или обычными молекулами. Внутриклеточное перераспределение белков происходит именно путем диффузии. Скорость диффузии белков больше зависит от их формы, чем от молекулярной массы.

Осмотические свойства. Из-за высокой молекулярной массы белки не способны диффундировать через полупроницаемую мембрану, в то время как низкомолекулярные вещества легко проходят через нее. Это свойство белков используется для очистки их растворов от низкомолекулярных примесей. Называется этот процесс *диализом*. Диализ используется в биохимических исследованиях и в фармации для очистки белков и белковых препаратов. Метод гемодиализа используется в практической медицине для очистки крови от природных низкомолекулярных, токсичных соединений при заболевании почек и отравлениях.

¹ pK — отрицательный десятичный логарифм K_a — константы равновесия реакции диссоциации кислоты на катион водорода и анион кислотного остатка.

Неспособность белков диффундировать через полупроницаемые мембраны приводит к явлению *осмоса*, т.е. перемещению молекул воды через мембрану в раствор белка. Осмотическое давление, обусловленное белком, называют также онкотическим давлением.

Вязкость растворов белка. Для растворов белка характерна высокая вязкость. Повышение его концентрации приводит к увеличению вязкости раствора, поскольку растут силы сцепления между молекулами белка. Вязкость зависит от формы молекул (растворы фибриллярных белков более вязкие, чем глобулярных). На вязкость растворов сильно влияют температура и наличие электролитов (с повышением температуры вязкость снижается). Добавление солей кальция повышает вязкость, способствуя сцеплению молекул с помощью кальциевых мостиков. Иногда вязкость белкового раствора увеличивается настолько, что он теряет текучесть и приобретает гелеобразное состояние.

Гелеобразование. В ряде животных тканей белки находятся не только в виде растворов, но и в виде гелей (в хрусталике глаза, соединительной ткани и т.д.). Гели образуются в результате объединения молекул белка в сетку, внутреннее пространство которой заполнено водой. При этом распределение на твердую и жидкую фазы, как в случае коагуляции, не происходит. Гелеобразование легче протекает в растворах фибриллярных белков. Например, фракция частично гидролизованного фибриллярного белка соединительной ткани коллагена называется *желатином*. Способность желатина к гелеобразованию используется в фармацевтической практике при изготовлении капсул, а водные растворы желатина применяются в качестве плазмозамещающих и кровоостанавливающих средств.

Растворимость белков. Факторы, влияющие на их растворимость. Растворимость белков колеблется в широких пределах. Она определяется аминокислотным составом (полярные аминокислоты придают большую растворимость, чем неполярные), формой молекул (глобулярные белки лучше растворимы, чем фибриллярные) и свойствами растворителя. По растворимости выделяют белки:

- водорастворимые — обычно имеют глобулярную форму, находятся в биологических жидкостях, выполняют транспортные функции или являются *ферментами*;
- солерастворимые — на основании различной растворимости в воде и солевых растворах различают *альбумины* и *глобулины*;
- нерастворимые — имеют фибриллярную структуру; типичным белком этого типа можно считать *коллаген*, его нерастворимость объясняется наличием особых поперечных связей в молекуле.

Растворение связано с гидратацией белков, т.е. связыванием молекул воды с белками. Вокруг каждой молекулы белка образуются *гидратные оболочки*, что связано с наличием заряда у белковых молекул. Между зарядом белка и гидратацией существует тесная связь: чем больше полярных групп, тем больше связывается воды. Гидратная вода может составлять до 1/5 массы белка.

Устойчивость белка в растворе зависит от заряда белка, гидратной оболочки и молекулярной массы.

Все воздействия, которые могут повлиять на заряд и гидратную оболочку, вызывают нарушения растворимости белка в воде; рН среды влияет на заряд, а следовательно, на его растворимость. Менее стабильны белки в изоэлектрической точке, т.е. когда их заряд равен нулю. Снятие заряда позволяет молекулам сближаться, склеиваться и выпадать в осадок. Именно такой прием довольно часто применяется при выделении белков из раствора.

Осаждение белков из водных растворов можно вызвать добавлением солей щелочных и щелочноземельных металлов. Такой процесс называют *высаливанием*. Этот процесс обратимый. Механизм высаливания состоит в том, что анионы и катионы соли конкурируют с белками за воду и «отнимают» у белков гидратную оболочку, являющуюся одним из факторов устойчивости.

Высаливанием белков обычно пользуются в клинической практике при анализе белков сыворотки крови и других биологических жидкостей, а также в препаративной энзимологии для предварительного осаждения и удаления балластных белков или выделения исследуемого фермента. Различные белки высаливаются из растворов при разных концентрациях растворов сульфата аммония. Поэтому метод нашел широкое применение в клинике для разделения глобулинов (выпадают в осадок при 50%-м насыщении) и альбуминов (выпадают при 100%-м насыщении).

Кроме солей, нативные белки осаждают органическими водоотнимающими средствами (этанол, ацетон, метанол). Различные концентрации этанола при температуре от -3 до -5 °C используются для тонкого разделения белков плазмы крови человека на фракции. Указанным методом пользуются для получения отдельных фракций крови, используемых в качестве кровезаменителей.

Высаливание не вызывает нарушений структуры белков, поэтому после удаления высаливающего агента белки сохраняют свое биологическое действие.

1.7. Денатурация белков

Денатурацией называется нарушение пространственной структуры белковых молекул. Денатурация — это необратимое осаждение белка из-за разрыва связей, стабилизирующих четвертичную, третичную и вторичную структуры, сопровождаемое изменением растворимости, вязкости, снижением или полной потерей биологической активности. Денатурация характерна только для молекул, имеющих сложную пространственную организацию. Природные и синтетические пептиды не способны к денатурации.

Факторы, вызывающие денатурацию, делятся на физические и химические. К *физическим* факторам относятся: нагревание, охлаждение, облучение (ультрафиолетовое, рентгеновское, нейтронное и т.д.), механическое встряхивание. В основе действия этих факторов лежит возбуждение колебаний атомов, сопровождающееся разрывом связей.

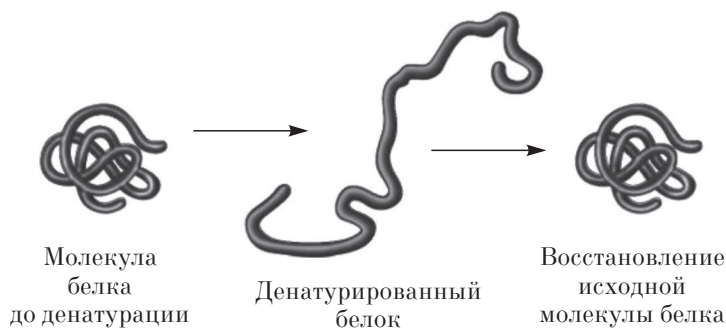


Рис. 1.20. Денатурация и ренатурация белка

Химические факторы, вызывающие денатурацию, называют *денатурирующими агентами*. К ним можно отнести:

- кислоты и щелочи — изменяют диссоциацию групп, уменьшают число ионных связей);
- ионы тяжелых металлов (соли ртути, кадмия, свинца) — образуют комплексные соединения с группами белка, что сопровождается разрывом слабого взаимодействия;
- восстановители — вызывают разрыв дисульфидных мостиков;
- амиды (мочевина, соли гуанидина) — формируют новые водородные связи и разрывают старые;
- алкалоиды — образуют прочные связи с полярными группами белков и разрывают водородные и ионные связи;
- органические растворители — образуют водородные связи и вызывают дегидратацию.

В медицинской практике денатурирующие агенты применяют для стерилизации медицинского инструмента и материала в автоклавах (действие высокой температуры) и в качестве антисептиков (хлорамин, фенол, спирт) для обработки загрязненных поверхностей. В биохимической и фармацевтической практике денатурирующие агенты используются для депротенизации (удаления белка) из биологических жидкостей, растворов, лекарственных препаратов.

Ренатурация — процесс, обратный денатурации, при котором белки возвращают свою природную структуру (рис. 1.20).

Нужно отметить, что не все белки способны ренатурировать. У большинства белков денатурация необратима. Если при денатурации белка физико-химические изменения связаны с переходом полипептидной цепи из плотно упакованного (упорядоченного) состояния в беспорядочное, то при ренатурации проявляется способность белков к самоорганизации, путь которой предопределен последовательностью аминокислот в полипептидной цепи, т.е. ее первичной структурой.

Методы разделения, очистки и обнаружения белков, пептидов и аминокислот

Получение белков, изучение их свойств и структуры невозможно без их выделения из клеток животных и растений и без очистки от других белков и органических молекул. Очищенные индивидуальные белки нужны для изучения их первичной структуры, получения кристаллов с целью исследования их пространственной структуры, установления взаимосвязи между структурой белка и его функцией. Многие очищенные индивидуальные белки используют в медицине как лекарственные препараты (например, инсулин применяют для лечения сахарного диабета, пепсин — в качестве заместительной терапии при нарушениях пищеварения). Очищенные ферменты используют в биохимических исследованиях в качестве химических реагентов.

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

- 1) разрушение биологического материала и клеточных мембран;
- 2) фракционирование органелл, содержащих те или иные белки;
- 3) экстракция белков (перевод их в растворенное состояние);
- 4) разделение смеси белков на индивидуальные белки;
- 5) очистка белков от примесей.

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

Выбор методов разделения и очистки белка основывается на его физико-химических свойствах. Используемые на практике методы можно сгруппировать по признаку (физико-химическому свойству белка), положенному в основу метода (табл. 2.1).

Таблица 2.1

Некоторые методы разделения и очистки белка

Признак, свойство белка, используемые для выделения, разделения, очистки	Методы и приемы
Растворимость белков в воде, органических растворителях, солевых растворах	Экстракция Высаливание Распределительная хроматография

Окончание табл. 2.1

Признак, свойство белка, используемые для выделения, разделения, очистки	Методы и приемы
Знак и величина заряда	Электрофорез Ионообменная хроматография
Изоэлектрические точки белков в градиенте pH	Изоэлектрофокусирование
Размеры (М.М.) белка	Высаливание Диализ Гель-хроматография Ультрацентрифугирование Ультрафильтрация
Величина заряда и молекулярная масса белков	Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия
Специфичность связывания белков с лигандами	Аффинная хроматография Иммуноэлектрофорез (вестерн-блоттинг)
Сродство белков к неполярному адсорбенту	Адсорбционная хроматография

2.1. Ультрацентрифугирование

Ультрацентрифугирование используется для разделения и очистки белков. Метод основан на различной скорости седиментации (осаждения) белковых молекул в растворах с различным градиентом плотности (сахарозный буфер или хлорид цезия). Скорость седиментации является функцией размера и формы молекулы и постоянна для конкретного вещества. Она также зависит от плотности частиц растворенного вещества и растворителя. Ускорение, с которым движется частица при центрифугировании, выражается формулой

$$G = \omega \cdot 2 \cdot r,$$

где ω — угловая скорость; r — расстояние от оси вращения до частицы.

Константа седиментации выражается в единицах Сведберга (S)*, по фамилии шведского ученого — разработчика этого метода.

При центрифугировании в градиенте плотности вначале пробирку заполняют раствором сахарозы, концентрация которого линейно увеличивается от 5 % у верхнего края пробирки до 20 % у ее нижнего края. При центрифугировании частицы оседают с разной скоростью, в результате происходит расслоение смеси белков на отдельные фракции с разной молекулярной массой (рис. 2.1).

* Один сведберг равен скорости седиментации частиц (v) в воде при 20 °C под воздействием единицы центробежной силы (c).

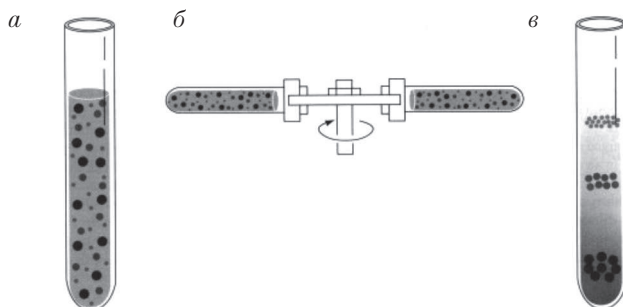


Рис. 2.1. Разделение белков методом ультрацентрифугирования:

а — однородная смесь образца и вещества, формирующего градиент; *б* — центрифугирование; *в* — сформированный градиент и полосы разделенных молекул

В пробирке обычно прокалывают дно и собирают вытекающую по каплям жидкость при помощи коллектора. Полученные фракции можно сразу или после предварительной очистки использовать для дальнейших исследований.

2.2. Хроматография

Хроматография — метод разделения смесей веществ или частиц, основанный на распределении их между двумя фазами — неподвижной (твердая фаза или жидкость, связанная на инертном носителе) и подвижной (газовая или жидкая фаза, *элюент*). Метод хроматографии был впервые применен русским ученым-ботаником М.С. Цветом в 1900 г. В зависимости от природы процесса, обуславливающего распределение веществ между подвижной и неподвижной фазами, различают адсорбционную, распределительную, ионообменную, аффинную хроматографию и др.

Адсорбционная хроматография. Разделение основано на различиях адсорбции разделяемых молекул на поверхности твердой неподвижной фазы. В качестве адсорбирующих веществ используются глинозем, силикаты или силикагель. Колонки заполняют сорбентом; смесь молекул, которые необходимо разделить, растворяют в растворителе и наносят на верхнюю часть адсорбента в колонке. Компоненты разделяемой смеси адсорбируются на неподвижной фазе в зависимости от их сродства. Колонка промывается растворителем и наиболее слабо адсорбируемые вещества движутся по колонке быстрее, чем молекулы с большим сродством к адсорбенту. Элюент из колонки собирают в виде небольших одинаковых порций, и концентрация разделяемых молекул измеряется в каждой порции.

Распределительная хроматография. В распределительной хроматографии компоненты смеси распределяются на твердом носителе (силикагеле, крахмале, оксиде алюминия, фильтровальной бумаге и др.) между подвижной и неподвижной фазами в зависимости от растворимости компонентов в этих фазах.

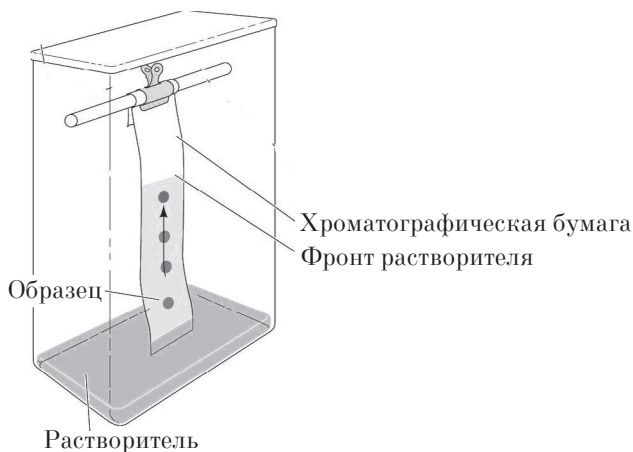


Рис. 2.2. Распределительная хроматография

Неподвижной фазой чаще всего является вода, адсорбируемая из воздуха поверхностью носителя. Подвижная фаза — органические растворители или их смеси — медленно перемещается по поверхности носителя под действием капиллярных сил, силы тяжести либо адсорбционных сил (рис. 2.2). Пятна веществ на хроматограммах обнаруживают при просмотре в видимом или ультрафиолетовом свете.

При необходимости хроматограмму предварительно проявляют (погружением или опрыскиванием) раствором реактива, дающего цветные реакции с разделяемыми веществами.

Для обнаруженных пятен вычисляют коэффициент распределения:

$$R_f = a/b,$$

где a — расстояние от линии старта до центра пятна; b — расстояние от линии старта до фронта подвижной фазы.

Метод применяется для разделения смеси аминокислот и пептидов. В фармацевтическом анализе этот вид хроматографии используется для идентификации лекарственных веществ, определения их чистоты, количественного анализа.

Ионообменная хроматография. В этом методе разделение происходит на основе ионного взаимодействия между заряженными биологическими молекулами и противоположно заряженными группами на ионообменных смолах. Неподвижную фазу при этом типе хроматографии представляют полимеры (смолы), содержащие ионные группы как часть их структуры. Полимер при этом должен быть достаточно прочно сшит поперечно, чтобы иметь низкую растворимость, но сохранять достаточно высокую пористость для свободной диффузии ионов через него (большую емкость). Ионообменная хроматография делится на два типа — катионную и анионную.

При **катионообменной хроматографии** задерживаются положительно заряженные катионы, так как неподвижная фаза содержит отрицательно заряженные функциональные группы (сульфоновые, карбоксильные, фосфатные). Наиболее часто в катионообменниках используют карбоксиметилцеллюлозу. Примерами катионообменников могут служить препараты Амберлит IRC-50 и Dowex-3.

При **анионообменной хроматографии** задерживаются отрицательно заряженные анионы, так как неподвижная фаза содержит положительно заряженные функциональные группы (например, ионы четвертичного азота $N^+(R)_4$). Наиболее часто в анионообменниках используют диэтиламиноэтилцеллюлозу (ДЭАЭ-целлюлозу).

Ионообменная хроматография широко используется для разделения смеси белков и аминокислот (рис. 2.3).

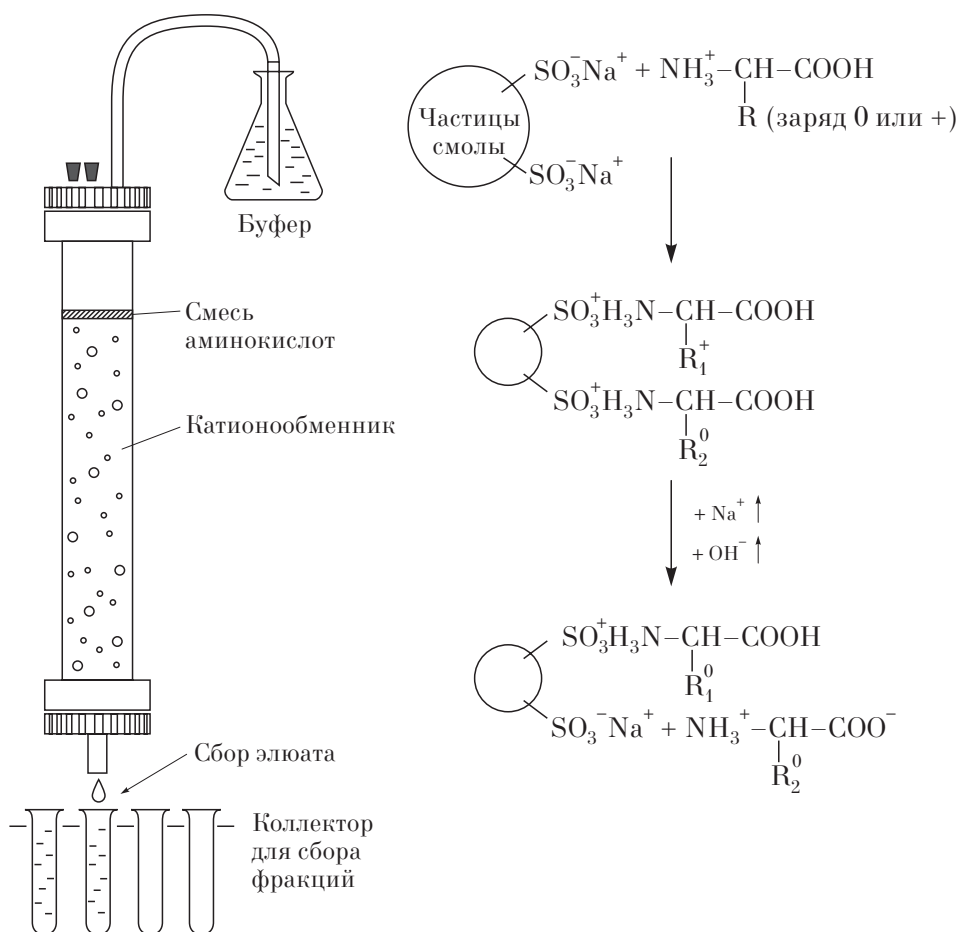


Рис. 2.3. Разделение аминокислот на колонке с катионообменной смолой

Колонку с катионообменной смолой промывают раствором NaCl, «нагружая» анионные группы $-\text{SO}_3^-$ ионами Na^+ . Ионы Na^+ связываются с отрицательно заряженными функциональными группами катионообменника, и гранулы смолы приобретают положительный заряд. Затем на поверхность смолы наносят кислый раствор (pH 3,0) анализируемой смеси аминокислот или белков. При pH 3,0 аминокислоты представляют собой катионы, несущие суммарный положительный заряд. Аминокислоты, имеющие наибольший положительный заряд, вытесняют ионы Na^+ и прочно связываются со смолой. Аминокислоты, несущие наименьший заряд, связываются со смолой в меньшей степени. Прочность связывания белка с катионообменником зависит от количества положительно заряженных аминогрупп в молекуле белка.

Белки или аминокислоты, адсорбированные на катионообменнике, можно элюировать буферными растворами с разными значениями pH и различной концентрацией NaCl. При низких концентрациях ионов Na^+ из колонки выходят аминокислоты, имеющие наименьший заряд и, следовательно, слабее всех связанные с катионообменником. Постепенное увеличение концентрации соли или изменение pH, что меняет заряд молекулы, приводит к выделению более прочно связанных со смолой молекул. В результате аминокислоты продвигаются вниз по колонке с разными скоростями, которые зависят от величины их pK . Выходящий из колонки раствор собирают небольшими порциями и определяют количество содержащихся аминокислот в каждой фракции.

Разделение аминокислот на колонках в настоящее время проводят автоматически в специальных приборах, называемых *анализаторами аминокислот*. Первый такой анализатор разработали в 1958 г. С. Мур и У. Стайн. В настоящее время использование анализаторов аминокислот с применением ионообменников и элюированием буферными растворами с возрастающими значениями pH позволяет в течение часа проводить полный аминокислотный анализ любого белкового гидролизата, а значит, определять качественный и количественный аминокислотный состав пептидов и белков.

Аффинная хроматография. Это наиболее специфичный метод выделения индивидуальных белков, основанный на избирательном взаимодействии белков с лигандами, иммобилизованными (прикрепленными) к твердому носителю. Если выделяют какой-либо фермент, то в качестве лиганда может быть использован субстрат, кофермент. Например, НАД^+ используется для очистки дегидрогеназ, гормоны — для выделения рецепторов, антигены — для выделения антител. С другой стороны, антитела могут быть очищены путем пропускания через колонку, содержащую иммобилизованный антиген. Аффинная хроматография отличается высокой избирательностью и помогает выделять и очищать индивидуальный белок.

Для выделения индивидуального белка через колонку, заполненную иммобилизованным лигандом, пропускают раствор, содержащий смесь белков (рис. 2.4). К лиганду присоединяется только белок, специфично взаимодействующий с ним; все остальные белки выходят с элюатом. Белок, адсорбированный

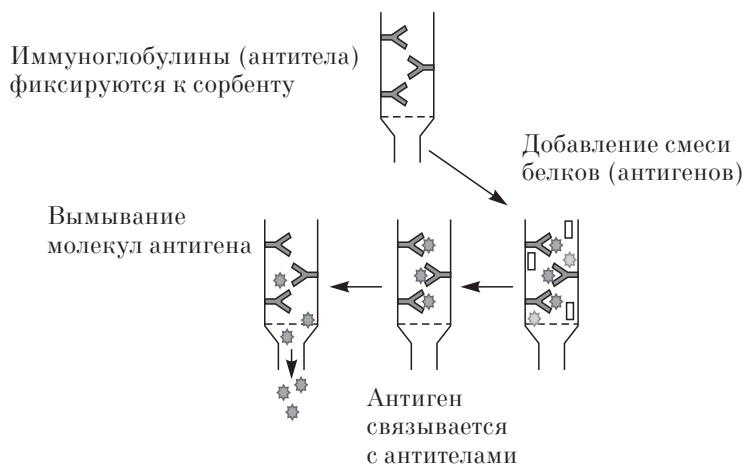


Рис. 2.4. Аффинная хроматография

на колонке, можно снять, промыв ее раствором с измененным значением pH или измененной ионной силой. В некоторых случаях используют раствор детергента, разрывающий гидрофобные связи между белком и лигандом.

Гель-фильтрация (хроматография). Этот метод называют также методом «молекулярных сит». Неподвижная фаза — сшитые поперечно молекулы полимеров агарозы (сефароза), декстринов (сефадекс) или приготовленные путем полимеризации акриламида (сефакрил), которые образуют пористые гели, заполненные подвижной фазой — буферным раствором. Размеры пор неподвижной фазы контролируются при изготовлении; они рассчитаны на определенный диапазон размеров молекул, в соответствии с которым маркируются (например, G-10, G-200). Смесь белков, нанесенную на хроматографическую колонку, вымывают, пропуская через колонку растворитель. Вместе с фронтом растворителя движутся и самые крупные молекулы. Более мелкие молекулы диффундируют внутрь гранул сорбента и на некоторое время попадают в неподвижную фазу, в результате чего их движение задерживается (рис. 2.5). Величина пор определяет размер молекул, способных проникать внутрь гранул.

Таким способом можно легко разделить, например, инсулин (М.М. 5700 а.е.м.) от иммуноглобулина (М.М. 150 тыс. а.е.м.) или соли, используемой для высаливания белков. Пропустив через такую колонку белки с известной молекулярной массой

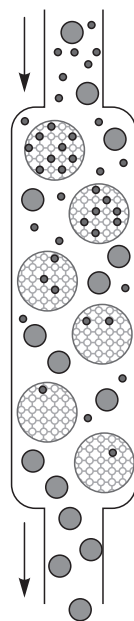


Рис. 2.5. Гель-фильтрация на сефадексе

(т.е. прокалив колонку), можно определить молекулярную массу исследуемого белка.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Метод широко используется для разделения всех типов соединений. В качестве неподвижной фазы выступают несжимаемые микросферы кремнезема или глинозема. Это позволяет создавать высокие скорости потока. Жидкая фаза проходит через такую колонку под высоким давлением (в 1000 раз превышает атмосферное давление). Колонки могут быть упакованы материалами для адсорбции, фильтрации или ионного обмена. Таким образом, метод основан на описанных выше принципах, но благодаря новым материалам и высокому давлению достигается лучшее разделение и хроматография проходит с высокой скоростью в течение нескольких минут.

При ВЭЖХ с обращенной фазой в качестве неподвижной фазы используются гидрофобные полимеры. Это позволяет быстро и эффективно разделять пептиды и белки с гидрофобными свойствами (например, белки мембран).

2.3. Электрофорез

Этот метод впервые предложил шведский ученый А. Тизелиус (Нобелевская премия, 1948). Он основан на движении заряженных частиц через электролит при воздействии электрического поля. Положительно заряженные частицы (катионы) движутся к катоду, отрицательно заряженные частицы (анионы) — к аноду.

2.3.1. Факторы, влияющие на электрофорез

Разделение белков (частиц) при электрофорезе зависит от следующих факторов:

- суммарный заряд частиц (ИЭТ-белков);
- масса и форма частиц;
- pH среды (выбирая pH буферного раствора, можно управлять характером распределения белков в электрическом поле; как правило, pH буферного раствора выбирается так, чтобы разделяемые молекулы несли отрицательный заряд и двигались в электрическом поле слева направо);
- сила электрического поля;
- свойства поддерживающей среды;
- температура.

Вначале разделение белков проводили методом электрофореза в буферном растворе, а затем большее распространение получил электрофорез на носителях. *Носителями* для электрофореза выступают фильтровальная бумага, мембраны из ацетата целлюлозы, агароза, полиакриламидный гель.

Электрофорез на бумаге проводят в течение 16–18 ч при низком напряжении. Диффузия частиц, приводящая к размыванию краев фракций, и длительность проведения являются недостатками этого метода.

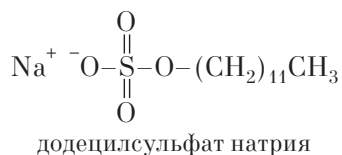
В последнее время предпочтительной твердой поддерживающей средой для электрофореза по горизонтали считаются мембранные *полоски из ацетата целлюлозы*. В этом случае процесс занимает менее 1 ч, при этом достигается хорошее разделение без диффузии. Полоски из ацетата целлюлозы широко используются для разделения и идентификации липопротеинов, изоферментов и гемоглобина.

Агар, или *агароза* — это гетерогенный полисахарид. При нагревании образует вязкую жидкость, затвердевающую в гель при охлаждении. Агаровый гель используется для разделения различных видов белковых смесей, а также нуклеиновых кислот.

Полиакриламидный гель (ПААГ) обладает эффектом молекулярного сита и тем самым делает разделение очень эффективным. Например, если при электрофорезе в геле агарозы белки сыворотки разделяются на 5 фракций, то при разделении тех же белков в ПААГ можно получить более 20 фракций. Поскольку разделяемые молекулы движутся в геле, те из них, которые имеют большие размеры, будут задерживаться при прохождении через его поры. Меньшие молекулы будут встречать меньшее сопротивление и, соответственно, двигаться быстрее. В результате после проведения электрофореза большие молекулы будут находиться ближе к месту нанесения, чем меньшие. Следует иметь в виду, что этот метод позволяет разделять молекулы большей частью по размеру, но необязательно по молекулярной массе.

Вариант электрофореза в *полиакриламидном геле в присутствии додецил (лаурил) сульфата натрия (ДСН-ПААГ)* основан на разделении белков в электрическом поле в зависимости от их молекулярной массы. Обычно скорость миграции анализируемых белков зависит от суммарного заряда, величины и формы молекул. Как известно, все белки обладают вторичной и третичной структурой. При этом их молекулы не всегда несут отрицательный заряд в растворе. Чтобы устранить влияние различий в форме и оставить только различия в молекулярной массе, разделяемые молекулы должны иметь развернутую конформацию. Для разрушения вторичной и третичной структуры и образования на поверхности белков отрицательного заряда их кипятят в течение 5 мин в буферном растворе, содержащем додецилсульфат натрия и β-меркаптоэтанол.

Додецилсульфат натрия (ДСН) является амфифильным веществом (детергентом), содержащим полярную заряженную группу и гидрофобную часть молекулы.



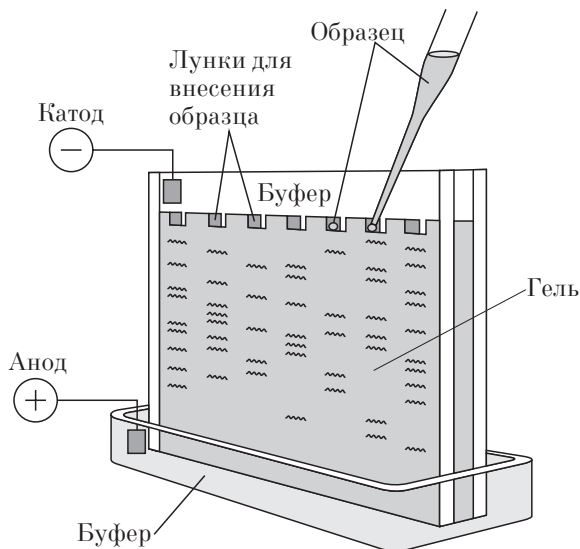


Рис. 2.6. Разделение белков методом электрофореза в геле

Белки с четвертичной структурой при этих условиях распадаются на субъединицы. ДСН прочно связывается с гидрофобными радикалами белка, а меркаптоэтанол восстанавливает дисульфидные связи, стабилизирующие третичную структуру в белках. Таким образом, каждый белок полностью денатурируется и формирует линейную структуру (белки выравниваются по форме) с серией отрицательных зарядов, образуемых при помощи ДСН вдоль полипептидной цепи (белки выравниваются по заряду). Такой отрицательно заряженный комплекс ДСН-белок мигрирует через пористый гель полиакриламида (рис. 2.6).

Поскольку скорость передвижения в этих условиях тем выше, чем меньше размеры полипептида, метод находит широкое применение для определения молекулярной массы белка с помощью калибровочной кривой. Для построения калибровочного графика используют белки-стандарты с известными молекулярными массами. Их наносят рядом с опытными пробами, что позволяет установить графическую зависимость между пробегом молекул на электрофореграмме и их молекулярной массой.

Визуализация белковых полос. После завершения электрофореза белки фиксируются на носителе ацетоном или метанолом и окрашиваются с помощью красителей: амидо черный, нафталин черный, пунцовый S, кумасси синий (рис. 2.7).

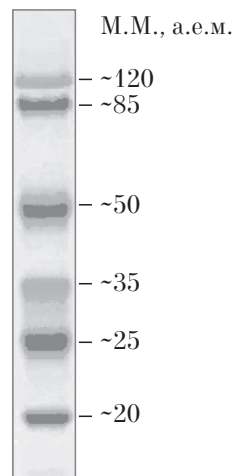


Рис. 2.7. Визуализация белковых полос (окраска кумасси синий)

Электрофореграммы можно затем сканировать с помощью денситометра и каждую полосу оценить количественно. В денситометре свет проходит через пластинку геля, и поглощение света будет пропорционально количеству белка (краски) в этой полоске.

Другой способ оценки предполагает экстракцию (элюцию) красителя из окрашенных полос и измерение плотности окраски экстрактов при помощи колориметра.

2.3.2. Изоэлектрофокусирование (ИЭФ)

Метод основан на различной величине ИЭТ белков. Разделение белков происходит под действием электрического поля в зависимости от их заряда в градиенте pH. Для создания градиента pH используют смеси амфотерных соединений, по-разному обозначаемые фирмами-изготовителями (амфолины, фармалиты, сервалиты и т.д.). Эти соединения получают путем химического синтеза, обычно они имеют небольшую молекулярную массу (400–800 а.е.м.).

Полиакриламидная матрица-пластина (рис. 2.8) или специальная трубка (см. рис. 2.9) заполняется *амфолинами* — полиаминополикарбоновыми кислотами, имеющими как положительные, так и отрицательные заряды, которые формируют градиент pH в диапазоне от 3 до 11.

Затем вносится образец, содержащий белки, и при электрофорезе молекулы образца перемещаются до зон, pH которых соответствует их изоэлектрической точке (ИЭТ). В этой зоне белки теряют свой суммарный заряд и останавливаются.

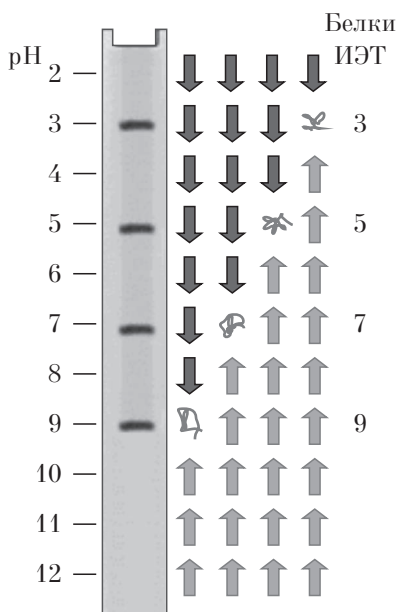


Рис. 2.8. Изоэлектрофокусирование

2.3.3. Двумерный электрофорез

Двумерный электрофорез представляет собой метод разделения смеси белков, основанный на последовательном использовании двух свойств белков: заряда и молекулярной массы. Использование таких не связанных между собой свойств белков необходимо, чтобы разделение смеси было максимальным. Вначале смесь белков разделяют методом изоэлектрофокусирования. Затем

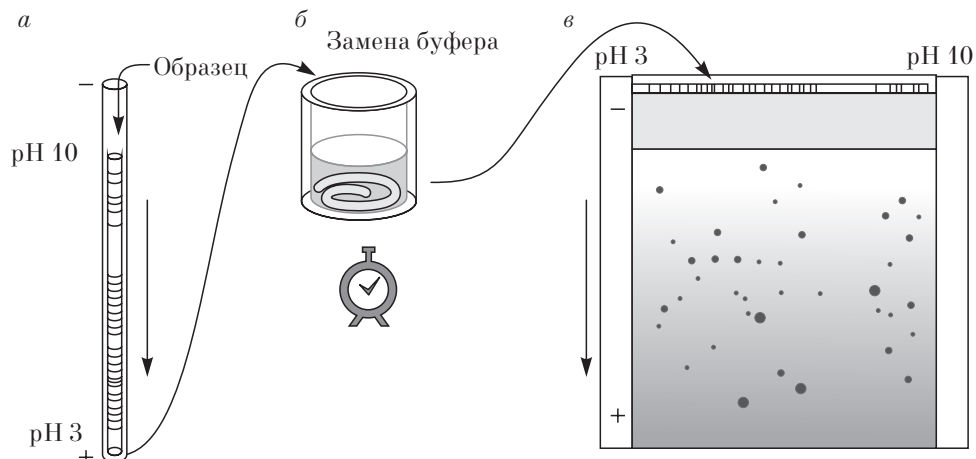


Рис. 2.9. Схема двумерного электрофореза:

а — изоэлектрофокусирование; *б* — замена буфера; *в* — гель-электрофорез

полученный гель помещают горизонтально вдоль края нового геля, содержащего додецилсульфат натрия, и проводят электрофорез во втором направлении, при этом белки разделяются по молекулярной массе (рис. 2.9).

2.4. Иммунный анализ

Иммунный анализ основывается на взаимодействии антигена (АГ) и антитела (АТ) с использованием различных вариантов мечения одного из компонентов (фермент, радионуклид, флуоресцентный краситель и др.). В зависимости от типа используемой метки и условий постановки теста иммунный анализ обозначается как иммуноферментный (ИФА), радиоиммунный (РИА), иммунохроматографический, иммунофлуоресцентный, иммуноэлектрофоретический.

При постановке реакций в один или несколько этапов они обозначаются как *прямые* или *непрямые*. Оценка реакции проводится визуально или автоматически на специальной аппаратуре.

2.4.1. Иммуноферментный анализ (ИФА)

ИФА появился в середине 1960-х годов. В разработке метода принимали участие Е. Энгвалл и Р. Пэлман.

Метод ИФА основан на специфическом связывании антитела с антигеном, при этом один из компонентов конъюгирован с ферментом. В результате реакции, катализируемой этим ферментом, с соответствующим хромогенным субстратом, образуется окрашенный продукт, количество которого можно определить спектрофотометрическим или другим методом (рис. 2.10).

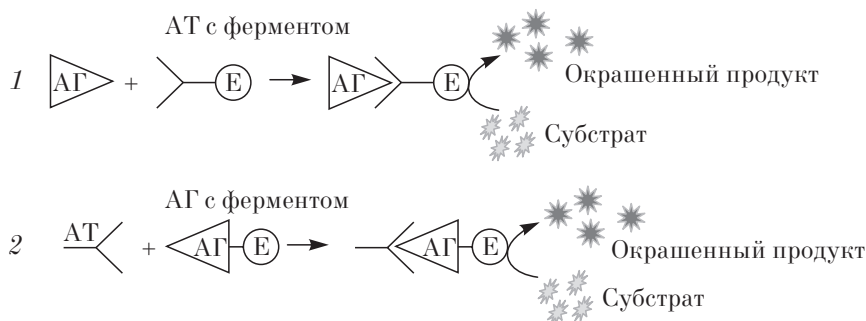


Рис. 2.10. Основной принцип иммуноферментного анализа:
1 — для выявления антигенов; 2 — для выявления антител; АТ — антитело;
АГ — антиген; Е — фермент

Для ферментативной метки могут быть применены разнообразные ферменты: пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, β -D-галактозидаза, глюкозо-оксидаза. В большинстве коммерческих тест-систем используется пероксидаза хрена, выбор которой определяется высокой каталитической активностью, простотой обнаружения, стабильностью и доступностью.

Существует множество вариантов постановки ИФА. Если реакция проводится с реагентами, фиксированными на поверхности, то тест обозначается как твердофазный (ELISA — enzyme linked immunosorbent assay). В настоящее время именно он имеет наибольшее практическое значение. Этот метод позволяет определить антигены или антитела, присутствующие в очень малых количествах в тканях или крови.

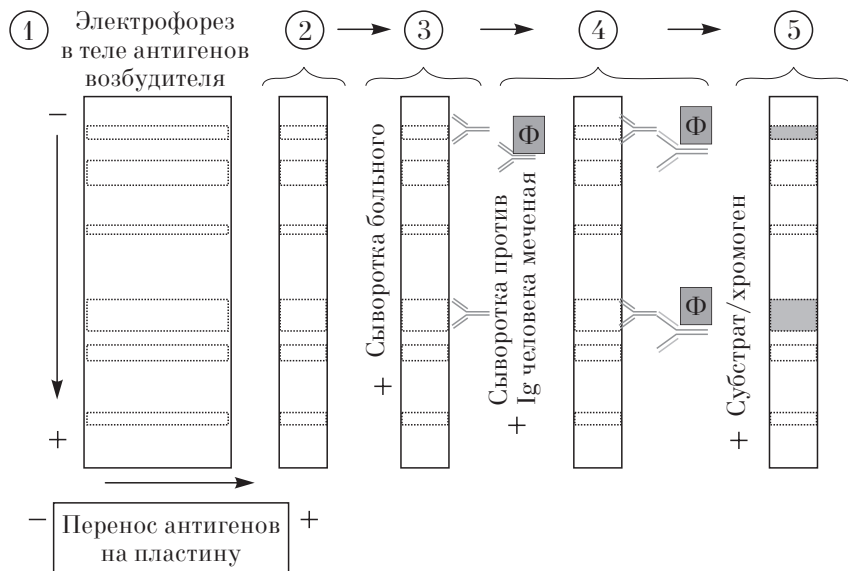
ИФА успешно применяется:

- для массовой диагностики инфекционных заболеваний;
- выявления и определения уровня гормонов и лекарственных препаратов, в том числе наркотических веществ в биологических образцах;
- определения изотипов антител (IgG, IgM) против конкретного антигена;
- выявления онкомаркеров;
- определения белков сыворотки крови (ферритин, фибронектин и др.);
- определения цитокинов в биологических жидкостях.

2.4.2. Иммуноэлектрофорез (вестерн-блоттинг)

Вестерн-блоттинг (иммуноблоттинг) — высокочувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА. Этот метод используется для обнаружения и количественного определения небольших количеств антител и других белков в крови.

Вестерн-блоттинг включает несколько этапов. Рассмотрим его на примере обнаружения антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ) (рис. 2.14). У пациентов, больных СПИДом, вирус иммунодефицита стимулирует образо-



5. *Обнаружение искомого белка.* При использовании радиоактивного фосфора проводится автордиография ферментной метки — обработка пластины раствором субстрата с последующим развитием окраски в месте связывания вторичных антител. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации антител и их количество может быть вычислено.

2.4.3. Иммунохроматографический анализ (ИХА) и системы сухой химии (экспресс-тесты)

Иммунохроматографический анализ основан на принципе тонкослойной хроматографии и включает реакцию между антигеном и соответствующим ему антителом. ИХА позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью обнаруживать антигены (антитела) в концентрациях от 0,5 нг/мл. Данный вид анализа осуществляется при помощи индикаторных полосок, панелей или тест-кассет. ИХА — сравнительно молодой метод анализа, он часто обозначается в литературе также как метод сухой иммунохимии, стрип-тест или экспресс анализ.

Различают две разновидности ИХА: прямой и конкурентный.

Прямой метод (рис. 2.12) используется для выявления высокомолекулярных соединений — вирусов, в том числе ВИЧ, различных гормонов (например, в тестах на беременность), возбудителей инфекционных заболеваний.

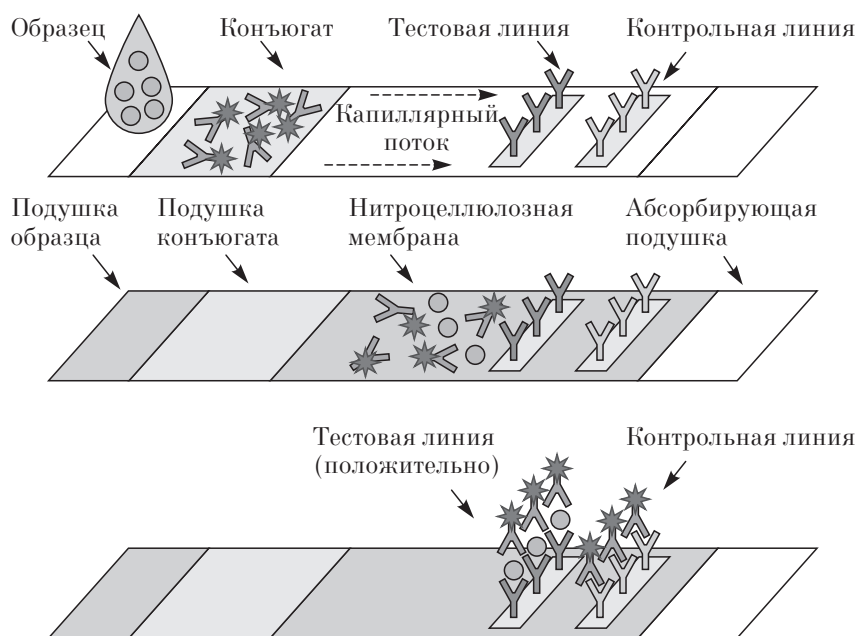


Рис. 2.12. Принцип работы тест-полоски (прямой «сэндвич»-метод ИХА)

Вблизи участка погружения тест-полоски в физиологическую жидкость (мочу, кровь) находятся растворимые конъюгированные, «сшитые» с коллоидным золотом (красителем) моноклональные антитела (АТ*) к исследуемому антигену. На тестовой линии иммобилизованы антитела, специфические к данному анализу, а на контрольной линии — вторичные антитела, специфические к первичным (меченым) антителам (аАТ). При нанесении образца на мембрану происходит связывание анализа с меченым антителом-конъюгатом (АТ+АТ*). Затем иммунный комплекс попадает в тестовую зону, где он связывается со специфическими антителами, образуя «сэндвич» АТ–АГ–АТ*. Избыток несвязавшегося конъюгата (АТ*) связывается с анти-антителами на контрольной линии (аАТ+АТ*). Таким образом, появление двух линий на тест-полоске является положительным результатом теста. При отсутствии анализа в образце конъюгат связывается с анти-антителами только на контрольной линии, образуя одну линию на тест-полоске.

Конкурентный метод лежит в основе экспресс-обнаружения в биологических жидкостях и тканях наркотических веществ (морфин (героин), марихуана, амфетамин, метамфетамин, бензодиазепин, барбитураты, кокаин, фенилциклидин, метадон и др.).

Принцип работы тест-полосок для определения низкомолекулярных соединений (наркотических веществ) заключается в том, что анализируемый образец (моча обследуемого) адсорбируется поглощающими участками полоски. При наличии в образце наркотического вещества или его метаболитов они вступают в реакцию со специфическими антителами, мечеными коллоидным золотом, образуя комплекс «антиген–антитело». Этот комплекс не вступает в реакцию конкурентного связывания с антигеном, иммобилизованным в тестовой зоне (Т), и полоса розового цвета не выявляется, что свидетельствует о наличии наркотического вещества (или его метаболитов) в образце (рис. 2.13).

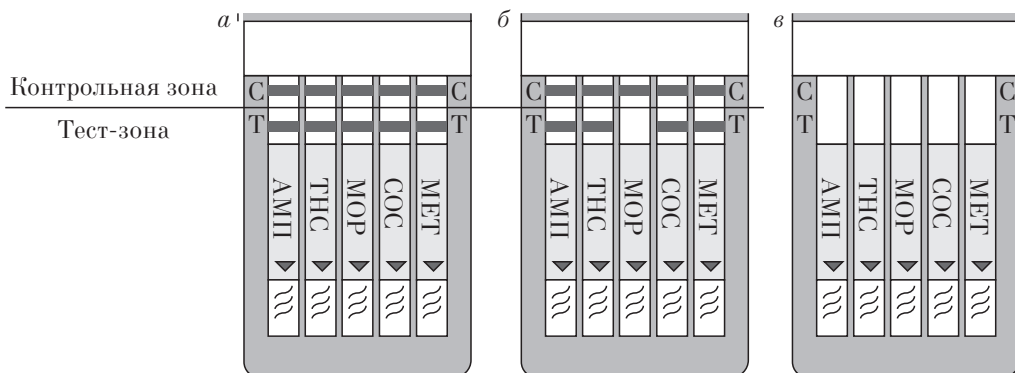


Рис. 2.13. Набор тест-полосок для одновременного выявления амфетамина, марихуаны, морфина, кокаина и метамфетамина:

а — отрицательный результат (наркотик не выявлен); *б* — положительный результат (выявлен морфин); *в* — ошибка тестирования (анализ повторить)

Если наркотик в моче отсутствует или его концентрация ниже порогового уровня, антиген, иммобилизованный в тестовой зоне, вступает в реакцию с мечеными антителами, в результате чего появляется полоса розового цвета, что свидетельствует об отсутствии наркотического вещества в анализируемом образце мочи. Непрореагировавшие компоненты теста связываются в контрольной зоне (контроль), образуя полосу в этой области. Появление двух полос свидетельствует об отсутствии наркотического вещества в исследуемом образце, одной — о его наличии.

В настоящее время в биохимических и клинических лабораториях используют тест-полоски для диагностики более 100 видов заболеваний, включающих такие распространенные болезни, как туберкулез, сифилис, гонорея, хламидиоз, вирусные гепатиты и др.

Являясь эффективным средством диагностирования, экспресс-тесты позволяют визуально в течение нескольких минут определить и оценить содержание антигенов, антител, гормонов и других диагностически важных веществ в организме человека, что играет большую роль в диагностике неотложных состояний и используется для контроля изменений уровня отдельных показателей в домашних условиях. Примером могут служить глюкометры, которые используются больными сахарным диабетом для определения уровня глюкозы в крови.

2.5. Кристаллизация

Кристаллизация белков используется как завершающая стадия их очистки, для доказательства гомогенности белка, а также для стабилизации белков при хранении.

Кристаллизация используется для определения третичной структуры белков методом рентгеноструктурного анализа. В основе метода лежит свойство биомолекул образовывать кристаллы, способные рассеивать рентгеновские лучи. Расстояния между углами и фазами падающих и отраженных волн и между атомами в кристаллической решетке позволяют воссоздать трехмерную кристаллическую структуру по картине дифракции кристаллами рентгеновских лучей.

2.6. Определение аминокислотного состава белка

До определения аминокислотной последовательности выделенного белка желательно иметь представление о его аминокислотном составе, т.е. знать, какие аминокислоты и в каком количестве входят в состав его молекулы. Для этого проводят полный гидролиз белка с последующим количественным анализом высвободившихся аминокислот. Чаще используют кислотный гидролиз.

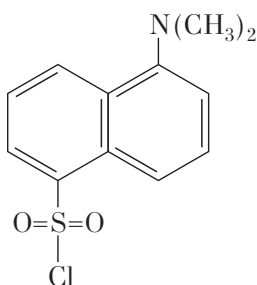
Полипептид растворяют в 6N HCl в отсутствие кислорода, чтобы предотвратить окисление серосодержащих аминокислот. Смесь нагревают до 100–120 °С и выдерживают при этой температуре в течение 10–100 ч. К сожалению, при этом способе гидролиза некоторые аминокислоты (Сер, Три, Тир, Глн, Асн) разрушаются.

Аминокислотный состав полипептидного гидролизата определяют с помощью автоматического аминокислотного анализатора. Прибор разделяет аминокислоты посредством ионообменной хроматографии (см. с. 54–56). Их идентифицируют по элюционному объему и количественно учитывают по интенсивности флуоресценции после проведения реакции с дансилхлоридом. Современные аминокислотные анализаторы проводят анализ гидролизата белка в течение 1 ч с чувствительностью, которая позволяет определить до 1 пмоль аминокислоты.

2.6.1. Идентификация N-концевой аминокислоты

Имеется несколько эффективных подходов, с помощью которых можно определить N-концевую аминокислоту.

Введение метки в аминокислотный остаток с помощью дансилхлорида. В качестве метки служит дансилхлорид, который взаимодействует со свободной α -аминогруппой N-концевой аминокислоты, в результате образуется соединение, обладающее интенсивной желтой флуоресценцией.



дансилхлорид

Дальнейший гидролиз и контроль методом тонкослойной хроматографии в присутствии эталонов позволяют выявить N-концевую аминокислоту.

Метод Сэнджера. Белок обрабатывают динитрофторбензолом (ДНФБ). При этом с данным реагентом взаимодействует только N-концевая аминокислота (рис. 2.14).

Далее проводят полный гидролиз белка и аминокислотную смесь разделяют тонкослойной хроматографией. N-концевая аминокислота, связанная с ДНФБ, на хроматограмме будет окрашена в желтый цвет. Затем проводят идентификацию этой аминокислоты методом тонкослойной хроматографии в присутствии эталонов — ДНФБ-производных аминокислот.

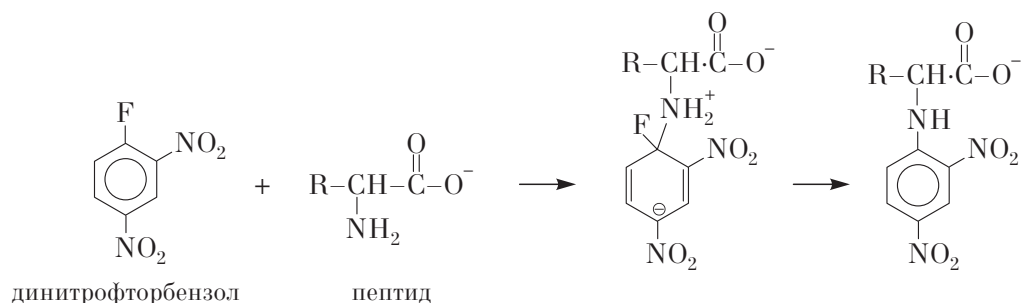


Рис. 12.14. Взаимодействие динитрофторбензола с N-концевой аминокислотой и образование ДНФБ-производного аминокислоты

Метод Эдмана. В данном методе используется фенилизотиоцианат (ФИТЦ), который связывается с N-концевой аминокислотой, в результате образуется фенилтиокарбамильный продукт оранжевого цвета (рис. 2.15). Его обрабатывают трифторуксусной кислотой, при этом отщепляется только тиазolinoевое производное N-концевой аминокислоты, которую далее идентифицируют, в то время как остальные пептидные связи не подвергаются гидролизу. Тем самым

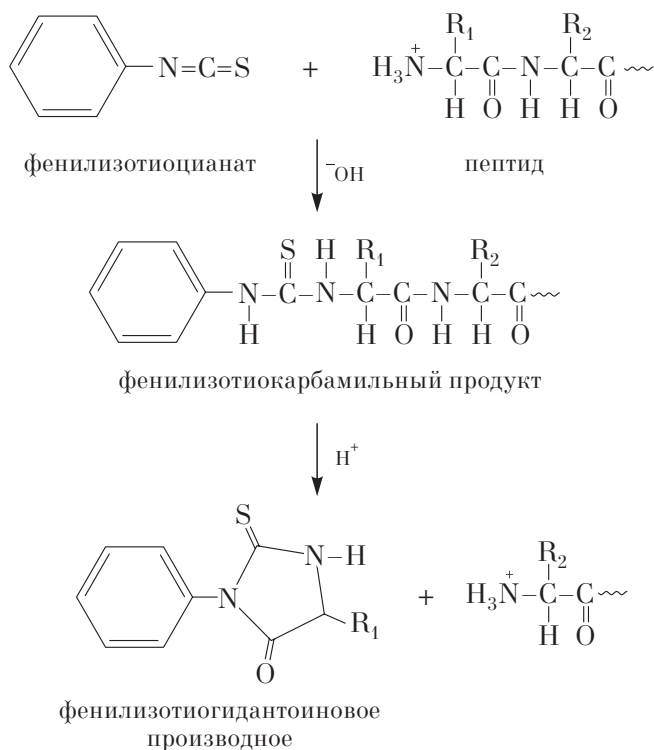


Рис. 2.15. Этапы определения N-концевой аминокислоты методом Эдмана

разрушение по Эдману заключается в отщеплении остатка только N-концевой аминокислоты и сохранении оставшейся части полипептидной цепи.

Наиболее важным преимуществом этого метода по сравнению с другими является то, что, проводя повторно эту процедуру с одним и тем же пептидом, можно каждый раз идентифицировать новую N-концевую аминокислоту, выясняя, таким образом, аминокислотную последовательность полипептидной цепи.

Ферментативный метод с использованием аминопептидаз. Ферменты, например аланиновая или лейциновая аминопептидазы, избирательно отщепляют N-концевые аминокислоты, которые затем идентифицируют хроматографически.

2.6.2. Идентификация С-концевой аминокислоты

Для идентификации С-концевой аминокислоты используются различные методы.

Метод Акабори. В данном методе полипептид обрабатывают безводным гидразином при температуре 90 °С в течение 20–100 ч в присутствии ионообменного сорбента (в качестве катализатора). При этом разрушаются все пептидные связи, а из высвобождающихся аминокислот образуются гидразиды. Но С-концевая аминокислота высвобождается в неизменном виде, поэтому ее можно идентифицировать хроматографически.

Ферментативный метод с использованием карбоксипептидаз. Карбоксипептидазы, подобно другим ферментам, обладают субстратной специфичностью, т.е. они катализируют отщепление определенных аминокислот. Так, карбоксипептидаза А отщепляет ароматические С-концевые аминокислоты, карбоксипептидаза В — основные С-концевые аминокислоты.

2.6.3. Определение аминокислотной последовательности

Установление концевых аминокислот в исследуемом пептиде позволяет в дальнейшем определить всю его аминокислотную последовательность. Для этого обычно проводят разрушение по Эдману (см. с. 69–70) в автоматическом приборе — *секвенаторе*, который был предложен П. Эдманом и Г. Бэгом. Современный секвенатор определяет 1 аминокислотный остаток в час. Таким способом можно установить последовательность расположения 40–60 остатков аминокислот. Затем накапливаются незавершенные реакции и продукты побочных реакций. Чтобы установить последовательность расположения аминокислот в больших полипептидных молекулах, их подвергают расщеплению ферментативным или химическим путем на фрагменты с размерами, достаточными для проведения секвенирования (рис. 2.16).

Аминокислотную последовательность полипептидной цепи определяют, совмещая перекрывающиеся последовательности фрагментов пептида. В данном случае после расщепления исследуемого пептида трипсином (катализирует

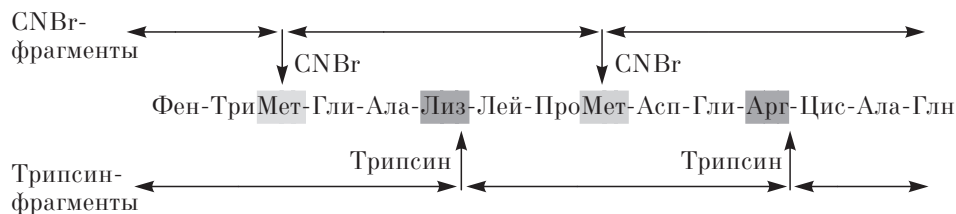


Рис. 2.16. Определение последовательности по перекрывающимся участкам

разрыв пептидных связей, в образовании которых участвуют карбоксильные группы Арг и Лиз), а в другом случае — бромцианом (CNBr) (катализирует разрыв пептидных связей, в образовании которых участвует Мет) были получены два набора пептидных фрагментов. Порядок связывания первых двух фрагментов, образовавшихся в результате действия трипсина, устанавливается на основании того наблюдения, что фрагмент Гли-Ала-Лиз-Лей-Про-Мет (результат расщепления CNBr) имеет последовательность аминокислот на N- и C-концах, включающую N- и C-концы двух трипсиновых фрагментов.

2.7. Способы получения белковых препаратов

Из *органов, тканей, крови животных и человека* получают гормоны, интерфероны, факторы роста клеток. Белково-пептидные препараты животного происхождения иммунологически отличаются от белков человека, поэтому могут вызывать аллергические реакции. Так, гормон инсулин, который получают из поджелудочной железы крупного рогатого скота, и инсулин человека различаются по трем аминокислотным остаткам. Именно этими различиями определяется повышенная иммуногенная активность бычьего инсулина по сравнению с инсулином свиньи, который особенно близок по аминокислотному составу к человеческому (у свиного инсулина C-концевой треонин В-цепи заменен на аланин).

Искусственный (химический) синтез позволяет получать белки, абсолютно идентичные белкам человека и не являющиеся чужеродными в отличие от аналогичных белков, выделенных из органов животных. Кроме того, возможность наработки белков или пептидов в лабораторных или промышленных условиях имеет исключительное значение. Во-первых, это позволяет подтвердить правильность определения их первичной структуры. Во-вторых, синтетическая модификация аминокислотного состава и последовательности пептидных молекул позволяет выяснить механизм их биологического действия, определить функциональную принадлежность отдельных участков пептидных молекул. В настоящее время путем химического синтеза получены некоторые тропные гормоны гипофиза (соматотропин, кортикотропин), гормон поджелудочной железы (инсулин).

Химический синтез полипептидов — очень трудоемкий процесс, в настоящее время он автоматизирован. Синтез полипептидов заключается в последовательном ковалентном связывании аминокислот от С-конца по направлению к N-концу, по одной за каждый цикл реакций. Это означает, что по завершении каждого цикла у растущей полипептидной цепи на N-конце будет свободная аминогруппа. Чтобы образовалась новая пептидная связь между этой группой и карбоксильной группой новой аминокислоты, аминогруппа аминокислоты должна быть заблокирована. В противном случае она будет реагировать с другими группами или с α -аминогруппой N-концевой аминокислоты растущей полипептидной цепи. Как только новая аминокислота присоединится к полипептидной цепи, ее аминогруппа должна быть деблокирована для образования следующей пептидной связи. Если такие превращения проводятся в растворе, выход синтезированного полипептида невелик. Этот недостаток успешно преодолел в 1962 г. Брюс Меррифилд, предложив схему *твердофазного синтеза* (рис. 2.17). В соответствии с этим методом наращивание полипептидной цепи происходит на нерастворимой подложке (частицы полистиреновой смолы), с которой эта цепь ковалентно связана обычно своим С-концом. В зону синтеза последовательно вносят необходимые аминокислоты с заблокированными аминогруппами и другие реагенты. При этом количественный выход и очистку промежуточных продуктов осуществляют простым фильтрованием и промыванием частиц смолы.

Биотехнологический способ получения полипептидов и белков описан в пп. 12.7–12.8. Генно-инженерные гормоны, ферменты, факторы роста тканей и системы свертывания крови, антитела, иммуномодуляторы, белки женского молока — это эффективные лекарственные средства нового поколения.

Ферменты (энзимы) — биологические катализаторы

Ферменты — это белки, образующиеся в тканях животных и растительных организмов и обладающие способностью ускорять химические реакции. В литературе часто для обозначения ферментов используется термин *энзим*, так как впервые ферменты были обнаружены в дрожжевых клетках (греч. *en* — внутри, *zyme* — дрожжи). Слово «фермент» происходит от лат. *fermentatio* — брожение.

Долгое время вполне обоснованно считали, что все ферменты — белковой природы. Однако в начале 1980-х гг. была обнаружена каталитическая активность и у молекул рРНК, т.е. возникло представление о полирибонуклеотидной природе некоторых ферментов, названных *рибозимами*. Томас Чек и Сидни Альтман (США) в 1989 г. получили Нобелевскую премию по химии за обнаружение каталитических свойств РНК.

Ферменты играют важнейшую роль во всех процессах жизнедеятельности. Они выступают в роли катализаторов практически во всех биохимических реакциях, протекающих в живых организмах, в том числе в реакциях биотрансформации лекарственных веществ в организме человека. В настоящее время описано более 5320 различных ферментов. Многие ферменты получены в кристаллическом виде, расшифрованы их аминокислотные последовательности, изучается их структура и роль в метаболических превращениях.

Ферменты применяются в медицине, сельском хозяйстве, пищевой, фармацевтической, текстильной и других отраслях промышленности. В фармацевтической промышленности ферменты используются в биотехнологических процессах получения лекарственных препаратов. В научных исследованиях ферменты используются в качестве специфических аналитических реагентов, в медицине — в диагностике и лечении заболеваний.

3.1. Номенклатура и классификация ферментов

На первых этапах развития энзимологии (науки о ферментах) названия ферментам давали их первооткрыватели по случайным признакам (тривиальная номенклатура). Например, такие названия ферментов, как пепсин, трипсин, химотрипсин, тромбин, используются и до настоящего времени.

Первая попытка по созданию рациональной номенклатуры была предпринята французским физиком, химиком и биологом П.Е. Дюкло в 1898 г. Он предложил правило, согласно которому название фермента образуется прибавлением суффикса **-аза-** к субстрату (веществу, на которое действует фермент), например:

- аргинин + аза = аргиназа;
- протеин + аза = протеиназа (протеаза);
- ДНК + аза = ДНКаза.

Позднее в названии фермента стали использовать не только название субстрата, но и тип катализируемой реакции, получая в результате рабочее название фермента (например, лактатдегидрогеназа).

Систематическое название ферментов образуется сложнее. Оно формируется из названий субстратов химической реакции, которую катализирует фермент, типа катализируемого превращения и суффикса **-аза-**. Так, систематическое название фермента лактатдегидрогеназы имеет вид

L-лактат : НАД⁺-оксидоредуктаза.

Ныне действующая классификация ферментов (КФ, ЕС — Enzyme Comissioncode) была предложена Международным союзом биохимиков и молекулярных биологов в 1961 г. В ее основу положен тип катализируемой ферментом реакции. По типу катализируемых реакций ферменты подразделяются на шесть **классов**:

- **КФ 1. Оксидоредуктазы.** Катализируют окислительно-восстановительные реакции (каталаза, алкогольдегидрогеназа);
- **КФ 2. Трансферазы.** Катализируют перенос химических групп с одной молекулы субстрата на другую (аминотрансферазы, ацилтрансферазы, фосфотрансферазы);
- **КФ 3. Гидролазы.** Катализируют гидролиз химических связей (эстеразы, пепсин, липаза, амилаза);
- **КФ 4. Лиазы.** Катализируют разрыв химических связей без гидролиза с образованием двойной связи в одном из продуктов или присоединение по двойной связи (реакция в обратном направлении) (фумаратгидратаза);
- **КФ 5. Изомеразы.** Катализируют структурные или геометрические изменения в молекуле субстрата (фосфоглюкоизомераза);
- **КФ 6. Лигаза, или синтетаза.** Катализируют образование химических связей между субстратами за счет гидролиза АТФ (ДНК-полимераза).

В каждом классе ферментов имеются **подклассы**. Подкласс характеризует основные виды субстратов, участвующих в данном типе химических реакций. В свою очередь, подклассы разделяются на **подподклассы**, уточняющие природу акцептора или природу атакуемой связи ферментом. За каждым ферментом в подподклассе закреплен свой *порядковый номер*, что позволяет зашифровать каждый фермент.

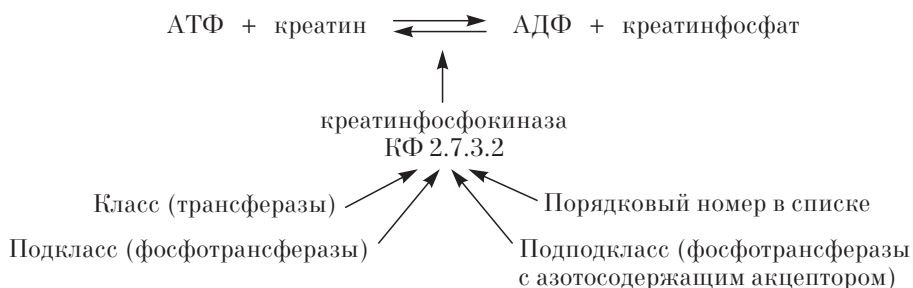


Рис. 3.1. Шифр креатинфосфокиназы и место фермента в классификации

Шифр фермента описывается совокупностью четырех чисел, разделенных точками. Он отражает положение фермента в классификации: первая цифра характеризует класс фермента, вторая — подкласс, третья — подподкласс, четвертая — порядковый номер фермента в списке. Каждый подподкласс представляет собой список ферментов.

На рис. 3.1 показан шифр креатинфосфокиназы — КФ 2.7.3.2. Этот фермент катализирует реакцию фосфорилирования креатина. Систематическое название этого фермента АТФ — креатинфосфотрансфераза, рабочее — креатинкиназа.

3.2. Характеристика отдельных классов ферментов

КФ 1. Оксидоредуктазы. Класс ферментов, катализирующих реакции, которые сопровождаются переносом атомов Н и О или электронов \bar{e} с одного субстрата на другой. Систематические названия ферментов класса образуются по схеме «донор:акцептор + оксидоредуктаза».

Оксидоредуктазы подразделяются на 22 подкласса. Подкласс уточняет, с какой группой доноров протонов и электронов (например, CH-OH , $\text{НАД}+\text{H}^+$, SH или H_2O_2) взаимодействует фермент. Наиболее распространенными в клетках млекопитающих являются дегидрогеназы, оксидазы, оксигеназы, пероксидазы.

Дегидрогеназы (лат. *hydrogenium* — водород, *де* — отрицание) — группа ферментов, катализирующая перенос атомов водорода (двух протонов и пары электронов) от субстрата (органического вещества) к акцептору. В качестве акцептора выступает обычно $\text{НАД}^+/\text{НАДФ}^+$ или флавиновый кофермент, например ФАД или ФМН.

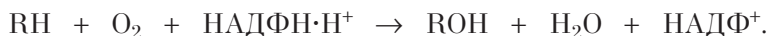


Примеры дегидрогеназ: *пируватдегидрогеназа*, *изоцитратдегидрогеназа*, *алкогольдегидрогеназа*.

Оксидазы — разновидность оксидоредуктаз, которые используют кислород в качестве конечного акцептора протонов. Оксидазы катализируют перенос атомов водорода или электронов непосредственно на кислород. Так, цитохром *c-оксидаза* находится в клетках всех аэробных организмов, где катализирует конечный этап переноса электронов на кислород и является важнейшим компонентом дыхательной цепи. Специфические оксидазы (L- и D-оксидазы аминокислот, моноаминоксидазы (МАО), ксантиноксидазы) окисляют в организме биологически активные соединения, такие как аминокислоты, гистамин, ацетилхолин, адреналин, ксантин и др.

Оксигеназы — группа ферментов, катализирующих присоединение к субстрату двух (диоксигеназы) или одного (монооксигеназы) атома кислорода. Монооксигеназы называют также гидроксилазами. Эти ферменты широко распространены в клетке. Особое значение имеют системы гидроксилаз эндоплазматического ретикулума гепатоцитов (система цитохрома P₄₅₀).

Реакции гидроксилирования с участием микросомальных ферментов — один из ведущих путей превращения гидрофобных эндогенных соединений и лекарственных препаратов в организме человека. Реакция, катализируемая гидроксилазой, имеет вид



Суть реакции заключается в гидроксилировании вещества типа R–H с использованием одного атома молекулы кислорода O₂. Второй атом кислорода соединяется с ионом водорода H⁺ с образованием воды. Донором ионов водорода является восстановленный НАДФН·H⁺.

Пероксидазы — ферменты, катализирующие реакции окисления различных веществ с помощью перекиси водорода. Например, глутатионпероксидазы катализируют восстановление перекисей липидов до соответствующих спиртов и пероксида водорода до воды. Каталаза — фермент, который окисляет в присутствии пероксида водорода низкомолекулярные спирты и нитриты, а также катализирует расщепление пероксида водорода на воду и молекулярный кислород.

КФ 2. Трансферазы. Группа ферментов, катализирующих перенос функциональной группы с одного субстрата на другой. Это один из наиболее обширных классов, он насчитывает около 500 индивидуальных ферментов. Трансферазы подразделяются на 9 подклассов. Назовем наиболее востребованные:

- КФ 2.1 включает ферменты, катализирующие перенос одноуглеродных групп;

- КФ 2.2 — перенос альдегидных и кетогрупп;

- КФ 2.3 — перенос ацильных радикалов (ацилтрансферазы);

- КФ 2.4 — перенос остатков моносахаридов (гликозилтрансферазы);

- КФ 2.7 — перенос фосфатной группы от молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) на различные субстраты (киназы (фосфотрансферазы)).

Трансферазы занимают ведущее место в катаболизме эндогенных и экзогенных веществ. С участием *УДФ-глюкуронилтрансфераз* обезвреживаются билирубин, стероидные гормоны, фенолы, полифенолы, ароматические амины. *Метилтрансферазы* участвуют в многочисленных реакциях метилирования ксенобиотиков типа пиридина, хинолина, тиюрацила и природных соединений, таких как катехоламины. Реакции ацетилирования с участием *ацетилтрансфераз* являются одним из путей обезвреживания биогенных аминов (серотонина, гистамина), а также лекарственных препаратов (сульфаниламидов, гидразидов изоникотиновой кислоты и др.).

КФ 3. Гидролазы. Один из многочисленных классов ферментов, катализирующих гидролиз ковалентной связи. Класс подразделяется на 13 подклассов в зависимости от типа гидролизуемой связи. *Пептидазы* (трипсин, химотрипсин, эластаза, тромбин, ренин и др.) гидролизуют пептидную связь в белках. Представителями *эстераз* — ферментов, гидролизующих сложноэфирную связь, — являются нуклеазы (гидролизуют фосфодиэфирную связь между нуклеотидами в ДНК и РНК) и липазы (катализируют гидролиз эфирной связи в триацилглицеролах). *Гидролазы* участвуют в инактивации лекарственных препаратов (миорелаксантов, местных анестетиков (новокаина, лидокаина, ацетилхолина).

КФ 4. Лиазы. Катализируют реакции негидролитического и неокислительного разрыва C–C-, C–N-, C–O- или C–S-связей в субстрате. Эти ферменты катализируют обратимые реакции образования и разрыва двойных связей, сопровождающиеся отщеплением или присоединением групп атомов по месту двойной связи, включая реакции присоединения воды (гидратация) и отщепление воды от субстрата (дегидратация). В пределах этого класса выделяют 7 подклассов.

Лиазы, по сравнению с другими классами, менее распространены в клетке.

КФ 5. Изомеразы. Группа ферментов, катализирующих внутримолекулярные перестановки, т.е. реакции изомеризации молекулы субстрата. Класс подразделяется на несколько подклассов, которые включают рацемазы, эпимеразы, *цис*-, *транс*-изомеразы, мутазы, топоизомеразы, таутомеразы и др.

КФ 6. Лигазы (синтетазы). Группа ферментов, катализирующих соединение двух молекул в результате синтеза новой C–O-, C–S-, C–N- или C–C-связи, сопряженное с одновременным гидролизом АТФ или иного нуклеозидтрифосфата. Класс подразделяется на 6 подклассов. Так, КФ 6.1 включает лигазы, катализирующие образование связи между кислородом и углеродом, а КФ 6.5 — лигазы, образующие фосфодиэфирные связи. К этому подклассу относятся ДНК-лигазы, катализирующие ковалентное сшивание цепей ДНК.

3.3. Структурно-функциональная организация ферментов

Ферменты в большинстве своем имеют четыре уровня структурной организации, что обусловлено их белковой природой. Они могут быть однокомпонентными, т.е. состоять только из аминокислотных остатков, и двухкомпонентными. Небелковые компоненты, связанные с белковой частью, получили название *коферментов*, а белковая часть — *апофермента*. Кофермент с апоферментом образуют *холофермент*. Если небелковая часть прочно связана с апоферментом (ковалентной связью или другим взаимодействием), она называется *простетической группой*.

В молекуле фермента выделяют **активный центр** — определенный участок белковой молекулы, способный комплементарно связываться с субстратом и обеспечивать его каталитическое превращение. В состав активного центра сложного фермента входят коферменты или простетические группы. В олигомерных белках может быть несколько активных центров.

У регуляторных ферментов, кроме активного центра, имеется **аллостерический (регуляторный) центр**, который пространственно удален от активного центра. Молекула фермента может иметь несколько аллостерических центров. Вещества, связывающиеся с аллостерическим центром, изменяют конформацию молекулы фермента и его активного центра, следовательно, изменяется способность фермента связываться с субстратом и осуществлять катализ.

Структура активного центра формируется радикалами аминокислот. Аминокислоты, формирующие активный центр (обычно это 5–12 аминокислотных остатков), находятся в разных местах полипептидной цепи. При формировании третичной структуры они сближаются и формируют активный центр данного фермента (рис. 3.2).

В активном центре фермента имеются аминокислотные остатки, которые обеспечивают комплементарное связывание субстрата (*контактные группы*), и если фермент работает с коферментом, они связываются и с ним.

Аминокислотные остатки, функциональные группы которых осуществляют химическое превращение субстрата, называются *каталитическими*, а амино-

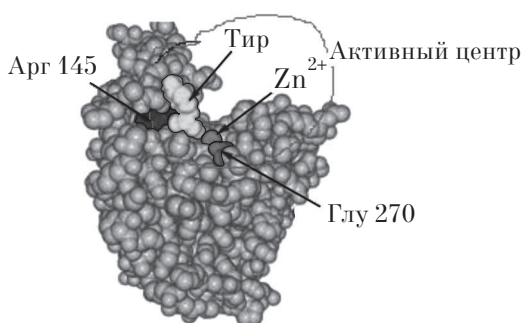


Рис. 3.2. Строение активного центра

кислотные остатки активного центра, которые ориентируют субстрат в пространстве по отношению к контактными и каталитическими, *способствующими группами*. *Вспомогательными* называются аминокислотные остатки, находящиеся рядом с активным центром и влияющие на его реакционную способность.

У простых белков роль функциональных групп контактного и каталитического участка часто выполняют радикалы аминокислот: ОН-группы серина, тирозина и треонина; NH_2 -группы лизина; гуанидиновые группы аргинина; имидазольные — гистидина и индольные — триптофана; гидрофобные радикалы алифатических аминокислот и ароматическое кольцо фенилаланина; COOH -группы дикарбоновых аминокислот; SH-группы цистеина. У сложных или двухкомпонентных ферментов в этих процессах участвуют и простетические группы (коферменты).

Строение активного центра лежит в основе проявления ферментами *специфичности действия*. Под этим термином понимают способность каждого конкретного фермента взаимодействовать с одним или несколькими определенными субстратами. Специфичность может проявляться в разных формах.

Об *абсолютной* субстратной специфичности говорят в том случае, если фермент действует на один субстрат (например, аргиназа действует только на аргинин).

Если фермент действует на один из возможных стереоизомеров субстрата, то он обладает *стереохимической* специфичностью (оксидаза L-аминокислот).

При *относительной* субстратной специфичности фермент катализирует превращение субстратов, относящихся к самым разным группам химических соединений. Так, фермент цитохром P_{450} участвует в реакциях гидроксилирования более чем 7000 соединений, включая эндогенные метаболиты и экзогенные вещества, в том числе лекарственные соединения.

Различают также *групповую* специфичность ферментов. Если фермент действует на ряд субстратов, имеющих одинаковую группу (например, алкогольдегидрогеназа действует на все спирты), то говорят об *абсолютной групповой* специфичности. Если фермент действует на субстраты с *определенным типом связи* (эстеразы гидролизуют эфирные связи, пептидазы — пептидные) — это *относительная групповая* специфичность.

Существует две гипотезы, объясняющие специфичность действия ферментов. Автором одной из гипотез и соответствующей ей модели, получившей название «*ключ — замок*», является знаменитый ученый-химик Эмиль Фишер. Он сравнивал взаимоотношения фермента и субстрата с ключом и замком, когда форма фермента должна точно соответствовать пространственной форме субстрата (рис. 3.3).

Специфическое строение фермента служит гарантией того, что соответствующие группы субстрата вступают в тесный контакт с активным центром фермента. Этим объясняется специфичность действия фермента. Однако гипотезой Фишера трудно объяснить проявление ферментами относительной и групповой



Рис. 3.3. Схематическое представление теории Фишера («ключ – замок»)

субстратной специфичности. Подобные трудности интерпретации преодолеваются с помощью теории Кошланда, получившей название «*теория индуцированного соответствия*». Согласно этой теории активный центр фермента после связывания субстрата изменяет конформацию, и функциональные группы аминокислот активного центра принимают такое положение, которое позволяет ферменту выполнить свою каталитическую функцию (рис. 3.4). Молекула субстрата также меняет конформацию после связывания в активном центре фермента (отсюда второе название модели взаимодействия — «*рука – перчатка*»).



Рис. 3.4. Схематическое представление теории Кошланда («рука – перчатка»)

Эта гипотеза более точно отражает события во время взаимодействия фермента и субстрата. Она получила экспериментальное подтверждение после того, как современными методами исследования было зарегистрировано изменение расположения функциональных групп фермента после присоединения субстрата.

3.4. Коферменты: их строение и функции

Роль коферментов могут выполнять различные соединения. Но в основном исходными веществами для образования коферментов являются водорастворимые витамины.

В большинстве случаев по коферменту можно узнать, какой тип реакций катализирует фермент. Как правило, в одном типе реакций принимает участие

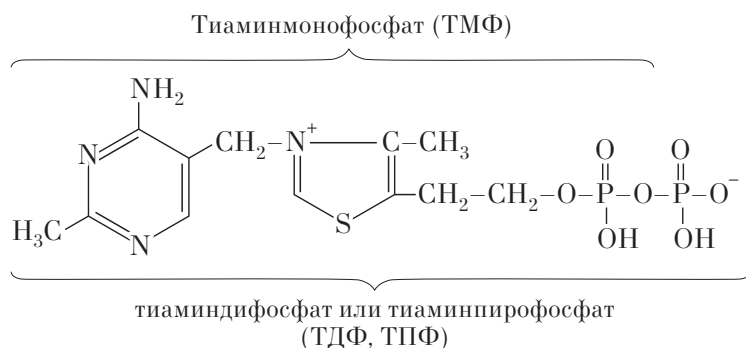
один кофермент или строго ограниченное их количество. Белковая часть двух-компонентного фермента ответственна за его субстратную специфичность.

Коферменты удобно группировать по происхождению:

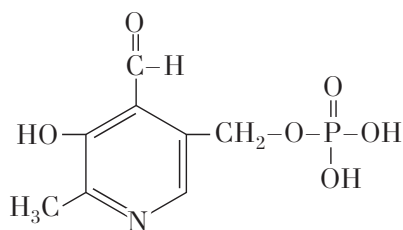
- производные водорастворимых витаминов (тиаминдифосфат (ТДФ), флавиномононуклеотид (ФМН), флавинадениндинуклеотид (ФАД), никотинамид-адениндинуклеотид (НАД⁺), метилкобаламин, карбоксибиотин и др.);
- производные витаминоподобных соединений (липоевая кислота);
- хиноновые коферменты (убихинон; нафтохинон и пластохинон в растительных клетках);
- пептидные коферменты (глутатион);
- коферменты-нуклеотиды (УДФ, ЦДФ);
- коферменты-металлопорфирины (гемы, хлорофиллы);
- коферменты-металлы.

Коферменты — производные водорастворимых витаминов. Существует несколько путей образования коферментов из соответствующих витаминов.

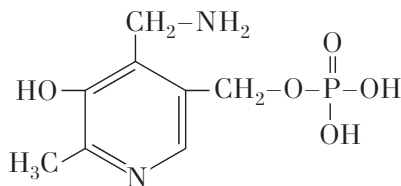
1. *Фосфорилирование.* При этом из тиамина (витамина В₁) могут образовываться формы разной степени фосфорилирования: тиаминмонофосфат (ТМФ), тиаминдифосфат (ТДФ) или тиаминтрифосфат (ТТФ).



Коферменты, содержащие витамин В₆, образуются путем фосфорилирования пиридоксала и пиридоксамина.

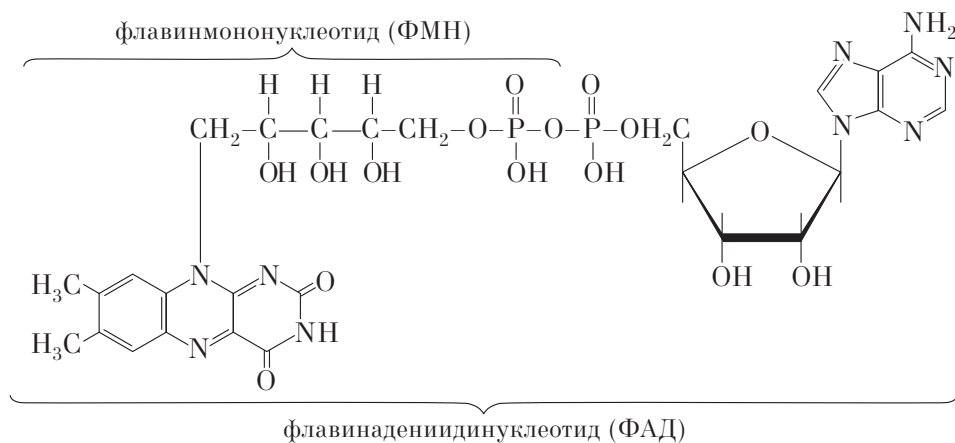
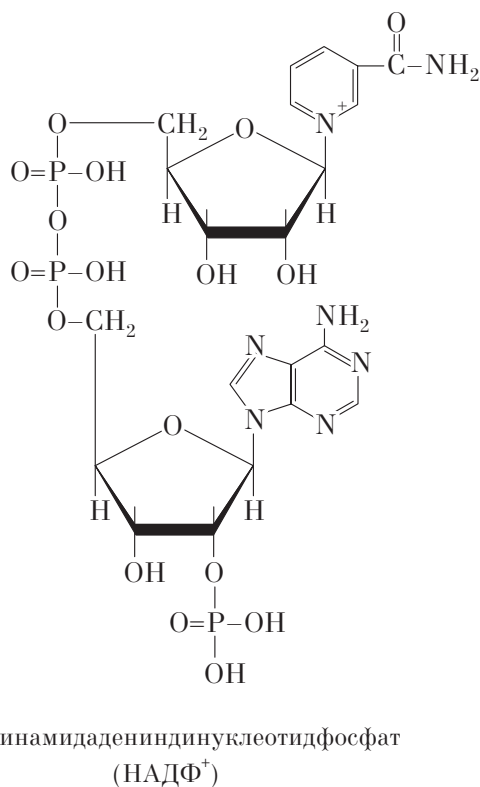
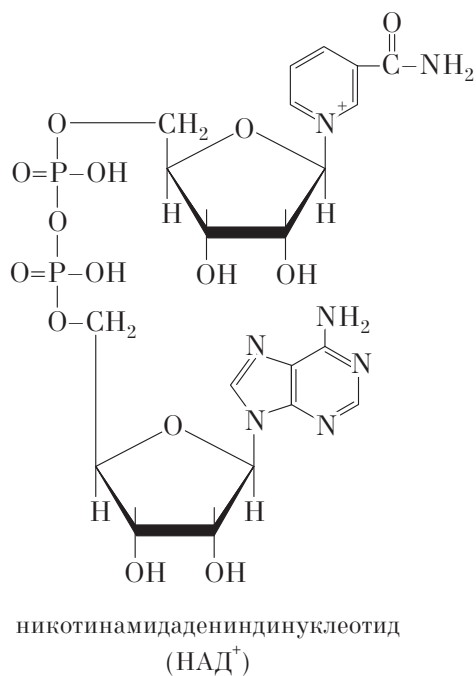


пиридоксальфосфат



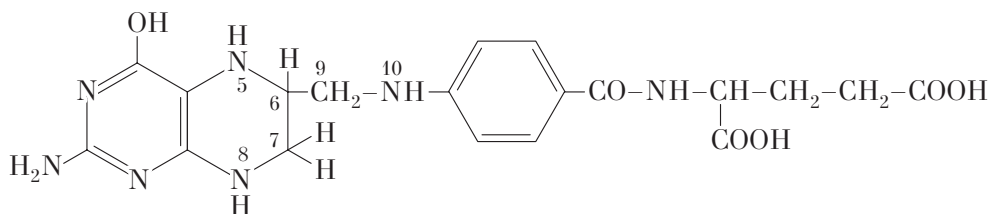
пиридоксаминфосфат

2. *Присоединение нуклеотидов.* Образуются коферментные формы витамина РР (никотиновой кислоты) — НАД⁺ и НАДФ⁺; пантотеновой кислоты — кофермент А; витамина В₂ (рибофлавина) — коферменты ФМН и ФАД.



3. *Метилирование*, или *присоединение нуклеозида (дезоксиаденозила)*. Образуются коферменты витамина В₁₂ (кобаламина).

4. *Восстановление*. Образуются коферментные формы витамина К, фолиевой кислоты (ТГФК), аскорбиновой кислоты (витамина С).



5,6,7,8-тетрагидрофолиевая кислота

Коферменты — производные витаминоподобных соединений. Липоевые коферменты (окисленная и восстановленная форма липоевой кислоты) участвуют в окислительно-восстановительных реакциях.

Хиноновые коферменты. Благодаря окислительно-восстановительным свойствам убихинон участвует в переносе электронов и протонов в дыхательной цепи митохондрий, а его аналог пластихинон выполняет такую же роль в хлоропластах.

Пептидные коферменты. К ним относится глутатион, являющийся коферментом глутатионпероксидазы.

Коферменты-нуклеотиды (ЦДФ, УДФ). Невитаминные нуклеотидные коферменты, которые участвуют в реакциях, либо связаны с превращением субстрата в молекуле кофермента (например, УДФ-глюкоза превращается в УДФ-галактозу), либо выполняют в них функцию доноров субстратов. Этот тип реакций используется в синтезе гликогена (УДФ-глюкоза является донором глюкозы, ЦДФ-холин — донор холина при биосинтезе холинфосфатидов).

Коферменты-металлопорфирины. К ним относятся геммы, которые содержат Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} и входят в состав цитохромов, каталазы, пероксидазы, хлорофиллов. Они участвуют в окислительно-восстановительных процессах.

Коферменты-металлы. Ионы металлов входят в состав различных ферментов: Zn^{2+} — алкогольдегидрогеназы, Mo^{2+} — нитратредуктазы, Zn^{2+} , Co^{2+} в состав металлопротеиназ.

Коферменты выполняют ряд *функций*. Основной является участие в ферментативном катализе. Находясь в активном центре фермента, коферменты принимают непосредственное участие в химических реакциях, выполняя функции промежуточных переносчиков электронов, атомов водорода или различных функциональных групп (аминных, ацильных, карбоксильных). Кроме того, кофермент принимает участие (часто вместе с ионами металлов) в стабилизации апофермента и обеспечивает необходимую конформацию активного центра для катализа.

3.5. Общее представление о катализе

Вероятность протекания химической реакции определяется разницей между свободной энергией исходных веществ и продуктов реакции. Если свободная энергия у исходных веществ выше, чем у продуктов ($\Delta G < 0$), то возможно самопроизвольное протекание реакции (*экзергоническая* реакция). При обратном соотношении свободной энергии самопроизвольное протекание реакции энергетически невозможно (реакция *эндергоническая*).

Энергия, необходимая для начала химической реакции, называется *энергией активации*. Она необходима для того, чтобы молекулы, участвующие в реакции, могли перейти в *реакционноспособное (активное) состояние*. Далее реакция между такими молекулами протекает уже спонтанно. В лабораторных условиях энергию активации, как правило, сообщают системе путем нагревания. При 37 °С органические молекулы, особенно в водной среде, имеют малую реакционную способность. Это связано с тем, что повышение температуры до 37 °С недостаточно для преодоления энергии активации.

Диаграмма изменений свободной энергии в ходе химической реакции представлена на рис. 3.5. Чем выше энергия активации, тем выше энергетический барьер и тем медленнее протекает реакция.

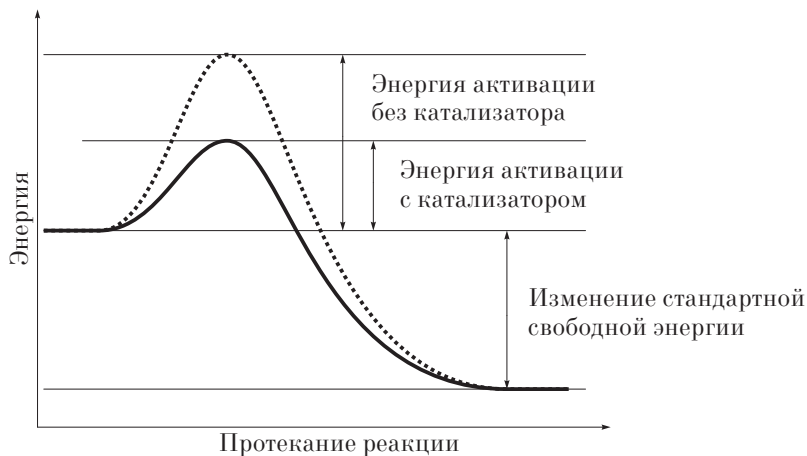


Рис. 3.5. Сравнительное изменение свободной энергии в ходе химической реакции, катализируемой ферментом

3.5.1. Механизм ферментативного катализа

Механизм действия катализатора или фермента направлен на то, чтобы понизить *энергетический барьер*, или энергию активации процесса. Это достигается разделением реакции на отдельные этапы благодаря участию фермента.

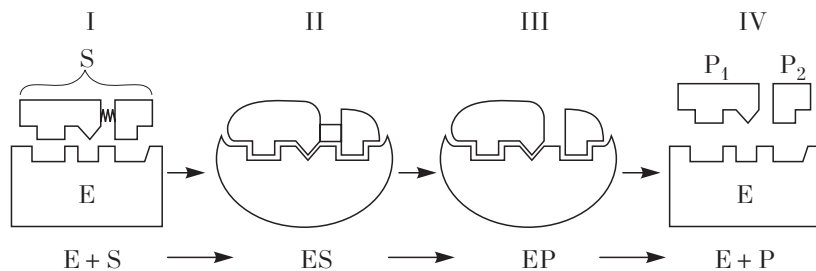


Рис. 3.6. Этапы ферментативного катализа:

E — фермент; S — субстрат; ES — фермент-субстратный комплекс;

EP — комплекс фермент-продукт; P — продукт

Каждый новый этап обладает более низкой энергией активации (рис. 3.6). Реакция идет как бы в обход энергетического барьера, в чем практически и заключается повышение скорости реакции.

На I этапе ферментативного катализа происходит сближение и ориентация субстрата в области активного центра фермента. На II этапе образуется фермент-субстратный комплекс (ES), благодаря изменению конформации субстрата и активного центра фермента. На III этапе происходит дестабилизация связей в субстрате и образуется нестабильный комплекс фермент-продукт (EP). В последующем этот комплекс распадается с высвобождением продуктов (P) реакции из активного центра и неизмененного фермента (E) (IV этап).

3.5.2. Свойства ферментов

Подчиняясь общим законам катализа, ферменты и небиологические катализаторы имеют сходные *признаки*:

- катализируют только самопроизвольно протекающие реакции (энергетически возможные);
- не изменяют направление реакции;
- не изменяют равновесие обратимой реакции, а лишь ускоряют его наступление;
- не расходуются в ходе реакции (фермент работает в клетке до тех пор, пока не разрушится протеазами).

Кроме общих свойств, ферменты обладают *специфическими свойствами*, которые обусловлены белковой природой ферментов.

1. *Высокая молекулярная активность.* Ферменты способны ускорять химическую реакцию в 10^8 и более раз. При этом одна молекула фермента при температуре 37°C может катализировать превращение нескольких тысяч молекул субстрата. Так, каталаза, катализирующая расщепление пероксида водорода, снижает энергию активации более чем в 4 раза и ускоряет реакцию в 10^9 раз. Такая скорость катализа недостижима для небиологических катализаторов.

2. *Высокая специфичность по отношению к своему субстрату или группе субстратов.* Специфичность ферментов обусловлена комплементарностью молекул фермента и субстрата и уникальностью строения активного центра фермента, с которым взаимодействует субстрат.

- *Зависимость активности фермента от условий окружающей среды* (температуры (термолабильность), pH, атмосферного давления). Оптимальными для большинства ферментов являются температура окружающей среды около 37–38 °С, нормальное атмосферное давление и близкое к нейтральному pH.

3. *Регулируемость активности ферментов.* Это свойство ферментов позволяет клеткам приспосабливаться к действию различных факторов за счет изменения скорости превращения веществ в организме. Из большого числа ферментов выделяют особый класс регуляторных ферментов, которые могут воспринимать различные метаболические сигналы и в соответствии с ними изменять свою каталитическую активность. Кроме того, одним из путей приспособления клеток организма является синтез дополнительных молекул ферментов (индукция).

4. *Способность образовывать полиферментные комплексы.* Под термином «полиферментные комплексы» понимают комплексы ферментов, которые включают несколько ферментов в одной структурной единице. Чаще всего это ферменты, которые катализируют последовательные реакции в цепи метаболических превращений, так что каталитическая активность всего процесса заключена в компактную форму. Примерами могут служить пируватдегидрогеназный комплекс; дыхательная цепь ферментов в мембране митохондрий; синтаза жирных кислот в цитозоле; рибосомы, включающие набор ферментов для трансляции.

3.5.3. Основы кинетики ферментативного катализа

Кинетика ферментативных реакций изучает зависимость скорости химических реакций, катализируемых ферментами, от химической природы реагирующих веществ и факторов окружающей среды. Ее изучение дает возможность составить представление о механизмах регуляции физиологических реакций. Кроме того, знание кинетики ферментативных реакций необходимо провизору для проведения ферментативных реакций в химико-аналитической лаборатории, для контроля качества ферментных лекарственных препаратов и их стандартизации. Знания о влиянии факторов окружающей среды на активность ферментов также позволяют провизору технологически грамотно производить, хранить и транспортировать ферментные лекарственные препараты.

О деятельности ферментов судят по их **активности**. Активность ферментов отражает скорость ферментативной реакции. Понятие «активность фермента» идентично понятию «скорость ферментативной реакции».

В общем виде под **активностью** понимают количество фермента, которое при определенных условиях катализирует превращение определенного количества субстрата в единицу времени. Активность фермента или скорость фермен-

тативной реакции определяется уменьшением количества молекул субстрата или увеличением количества молекул продукта за единицу времени. Определение активности ферментов широко используется в любой современной лаборатории.

В соответствии с решением Международного биохимического союза, активность ферментного препарата выражают в микромолях (мкмоль) субстрата, прореагировавшего под действием 1 мл ферментного раствора или 1 г ферментного препарата за 1 мин в оптимальных условиях ($t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH среды реакции индивидуальна для каждого фермента).

На практике пользуются условными величинами, характеризующими активность фермента. Единица активности фермента обозначается символами **U** (unit — единица) или **МЕ** (международная единица).

1 U соответствует такому количеству фермента, который катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при оптимальных условиях проведения реакции (температура $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, оптимальное значение pH раствора). Эта единица активности используется в медицинской и фармацевтической практике.

В системе СИ единицей ферментативной активности является **катал** (кат); 1 кат соответствует такому количеству фермента, который катализирует превращение 1 моль субстрата за 1 с при оптимальных условиях проведения реакции.

В сравнении с международной единицей:

$$1\text{ U} = 16,67\text{ нкат} \quad (1\text{ нкат} = 1 \times 10^{-9}\text{ кат}).$$

В практике клинических и аналитических лабораторий широко пользуются понятием *удельная активность*. При этом число стандартных единиц пересчитывают на какую-либо единицу сравнения. Это может быть количество белка (мг) в пробе (препарате) или объем (мл) исследуемой биологической жидкости (раствора). По удельной активности судят о степени очистки фермента. Чем меньше посторонних белков, тем выше удельная активность. Активность выпускаемого ферментного препарата — важнейший нормируемый показатель его качества.

3.5.4. Факторы, определяющие активность ферментов

На активность ферментов оказывают влияние прежде всего температура, pH среды, концентрация субстратов и специфических регуляторов.

Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры. Ферментные реакции, как и любое химическое превращение, в значительной степени зависят от температурных условий. С увеличением температуры повышается скорость химической реакции (повышение температуры на 10° удваивает скорость химической реакции). Однако скорость ферментативной химической реакции имеет свой *температурный оптимум*, превышение которого сопровождается снижением ферментативной активности. Так как все ферменты являются белками, а белки при температуре выше $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ в большинстве своем

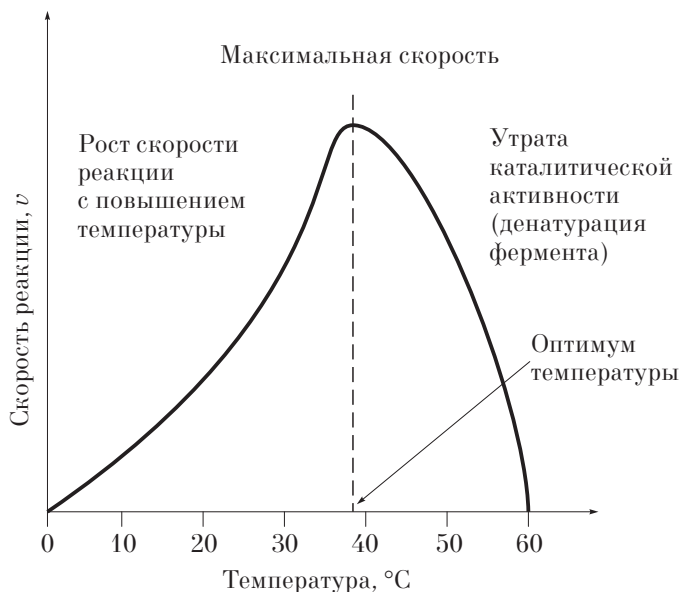


Рис. 3.7. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

необратимо изменяются (денатурируют), для большинства ферментов оптимальной температурой является 37–38 °C (рис. 3.7). Температурный оптимум ферментов термофильных микроорганизмов находится в области более высоких температур.

Влияние температуры на активность ферментов очень важно для понимания процессов жизнедеятельности. Скорость ферментативных реакций при охлаждении тела замедляется; напротив, при повышении температуры биохимические процессы, катализируемые ферментами, ускоряются. В практической медицине это позволяет разрабатывать определенные методы лечения с использованием как высоких, так и низких температур.

Криомедицина, как одно из направлений безмедикаментозного лечения, использует очень низкие температуры (от –60 °C до –180 °C) для локального и общего воздействия на организм. Она находит применение в косметологии, дерматологии и онкологии.

В фармацевтической практике термозависимость ферментов используется при разработке температурных режимов хранения ферментных лекарственных препаратов, аналитических реагентов и микробиологических сред, содержащих ферменты, а также лекарственного растительного сырья и пищевых продуктов.

В лабораторной практике для определения активности фермента обычно подбирают оптимальные температурные условия с учетом его термоллабильности или используют стандартные условия (температура 30 °C).

Зависимость скорости реакции от pH среды. Реакция среды оказывает существенное влияние на активность ферментов. Для проявления их оптималь-

ного действия чаще всего существует узкий диапазон измерения рН среды — **рН-оптимум**. Многие ферменты имеют схожие значения рН-оптимума.

В некоторых случаях сдвиг рН на единицу приводит к изменению активности на 80 %. Например, *пепсин* желудочного сока, который катализирует гидролиз белков, имеет рН-оптимум около 2 (рис. 3.8). При рН ~ 3 он теряет половину активности, а при рН ~ 4 активность пепсина не измеряется. рН-Оптимум *трипсина*, фермента панкреатического сока, который катализирует гидролиз белков, составляет $\sim 7,8$. Относительно редко встречаются случаи, когда рН-оптимум активности ферментов находится в сильноокислой или щелочной среде. Это характерно для таких ферментов, как *пепсин*, *щелочная фосфатаза*, *аргиназа*.

Большинство белков при экстремальных значениях рН неустойчивы, поэтому в экспериментальных условиях работы с ферментом важное значение имеет поддержание рН на постоянном уровне.

Причина влияния рН среды на активность ферментов заключается в том, что изменение этого показателя приводит к изменению степени ионизации аминокрупп (NH_3^+) и карбоксильных групп (COO^-) в молекуле фермента. В результате белковая молекула фермента подвергается конформационной перестройке. Это оказывает влияние на взаимоотношение между ферментом и субстратом.

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата и фермента. Исследование зависимости скорости ферментативных реакций от концентрации реагирующих веществ привело Л. Михаэлиса и М. Ментен в 1913 г. к созданию общей теории действия ферментов и ферментативной кинетики.

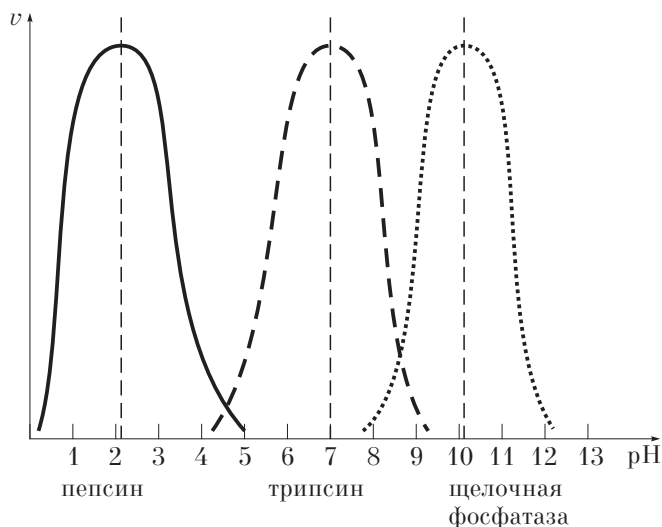


Рис. 3.8. Зависимость скорости ферментативной реакции (v) от рН среды

Любая ферментативная реакция описывается уравнением



где v_1 — скорость прямой реакции первого этапа ферментативного катализа; v_{-1} — скорость обратной реакции первого этапа ферментативного катализа; v_2 — скорость второго этапа ферментативного катализа.

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата описывается уравнением *Михаэлиса – Ментен*:

$$v = \frac{[S]v_{\max}}{[S] + K_M},$$

где v — скорость реакции; $[S]$ — концентрация субстрата; v_{\max} — максимальная скорость реакции; K_M — константа Михаэлиса.

Если исходить из того, что концентрация фермента неизменная величина, а изменяется только количество субстрата, то графическая зависимость скорости ферментативной реакции v от **концентрации субстрата** описывается гиперболой (рис. 3.9). При увеличении количества субстрата и данной (неизменной) концентрации фермента начальная скорость реакции увеличивается. Отмечается прямая зависимость между концентрацией субстрата и активностью фермента (*реакция первого порядка*). При дальнейшем повышении концентрации субстрата имеет место все большее отклонение от прямой зависимости, прирост активности отстает от прироста субстрата (*реакция второго*

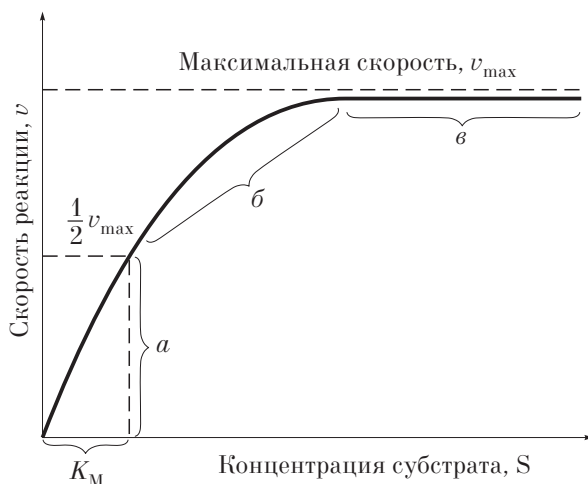


Рис. 3.9. Зависимость скорости ферментативной реакции (v) от концентрации субстрата $[S]$ при постоянной концентрации фермента:

a — реакция первого порядка; b — реакция смешанного порядка; v — реакция нулевого порядка; K_M — константа Михаэлиса; $\frac{1}{2}v_{\max}$ — половина максимальной скорости

порядка). Дальнейшее повышение концентрации субстрата ведет к тому, что скорость реакции достигает максимума v_{\max} , т.е. в данном случае активность фермента уже не зависит от концентрации субстрата (*реакция нулевого порядка*). Это происходит тогда, когда фермент полностью насыщен субстратом, т.е. образовалось максимально возможное количество фермент-субстратных комплексов при данной концентрации фермента.

Данное состояние соответствует максимальной скорости реакции (v_{\max}). Величина v_{\max} характеризует каталитическую активность фермента и означает максимальную возможность образования продукта в условиях избытка субстрата и данной (неизменной) концентрации фермента.

Основной кинетической характеристикой фермента является *константа Михаэлиса* K_M , численно равная концентрации субстрата, при которой достигается половина максимальной скорости химической реакции. Константа Михаэлиса является величиной постоянной для данного фермента и характеризует его сродство к субстрату. Чем больше K_M , тем меньше сродство фермента к субстрату, и наоборот, чем меньше K_M , тем больше сродство фермента к данному субстрату.

Практически рассчитать значения K_M и v_{\max} , пользуясь кривой, описываемой уравнением Михаэлиса – Ментен, сложно. Более удобно оказалось определять эти параметры в координатах «двойных обратных величин». Уравнение Михаэлиса – Ментен в этом случае преобразуется в *уравнение Лайнуивера – Берка*:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{v_{\max} [S]} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}}.$$

а зависимость скорости реакции от концентрации субстрата приобретает вид прямой линии (график Лайнуивера – Берка) (рис. 3.10).

Такой способ выражения позволяет более точно рассчитать значения K_M и скорость реакции. Пересечение линии с осью $\frac{1}{[S]}$ позволяет вычислить значение K_M , а пересечение с осью $\frac{1}{v}$ — значение максимальной скорости.

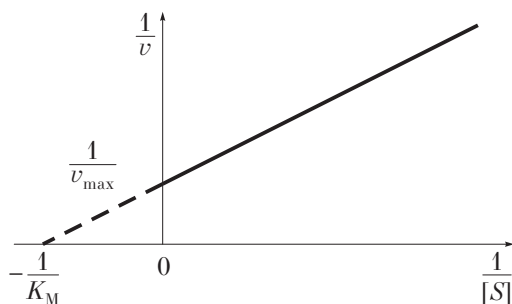


Рис. 3.10. График зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. Метод «двойных обратных величин» (график Лайнуивера – Берка)

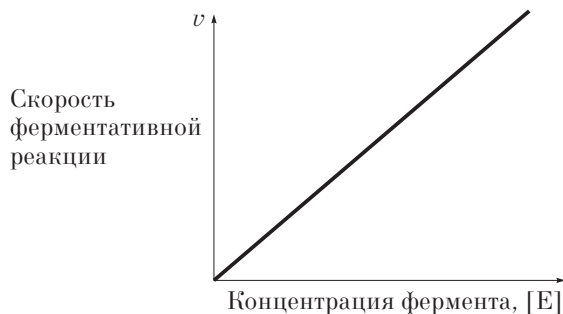


Рис. 3.11. Зависимость скорости ферментативной реакции (v) от концентрации фермента $[E]$

Зависимость скорости реакции от **концентрации фермента** носит линейный характер (рис. 3.11). Так, удвоение количества фермента удваивает его активность, а следовательно, и скорость протекания катализируемой реакции.

Из этого нетрудно заключить, что чем больше молекул фермента находится в какой-то клетке организма, тем выше в ней скорость реакции, катализируемой этим ферментом. И наоборот, если нарушен синтез данного фермента, то скорость катализируемой им реакции ограничивает биохимические процессы. Восстановить нарушенные метаболические процессы можно с помощью лекарственных препаратов (индукторов), стимулирующих синтез молекул фермента. К числу таких индукторов относят барбитураты (фенобарбитал) и некоторые стероиды (кортизол, половые гормоны).

На основе знания кинетики ферментативных реакций разрабатываются **стандартные (оптимальные) условия** проведения ферментативной реакции *in vitro*.

Оптимальные условия проведения ферментативной реакции устанавливаются для каждого конкретного фермента и обязательно должны соблюдаться, так как они обеспечивают нулевой порядок реакции. Именно в зоне реакции нулевого порядка активность фермента пропорциональна его количеству. Поэтому при проведении ферментативных реакций обычно работают именно в этом интервале, так как здесь значительные колебания концентрации субстрата не оказывают влияния на измеряемую активность.

К оптимальным условиям проведения ферментативной реакции относятся:

- установление рН-оптимума путем использования соответствующего буферного раствора и поддержания рН на постоянном уровне во время реакции;
- поддержание постоянной температуры во время проведения реакции;
- добавление в достаточном количестве коферментов, ионов металлов (для сложных ферментов);
- удаление из зоны реакции ингибирующих веществ;
- обеспечение избытка субстрата, что гарантирует измерение максимальной скорости и устраняет падение активности из-за потребления субстрата во время реакции.

3.6. Активаторы и ингибиторы активности ферментов

Скорость ферментативной реакции, как и активность фермента, определяется присутствием в среде специальных веществ — **активаторов** и **ингибиторов**. Первые активируют ферменты и повышают скорость реакции, вторые тормозят (ингибируют) ферменты и снижают скорость химической реакции.

Активирующее влияние на скорость ферментативной реакции оказывают разнообразные вещества органической и неорганической природы. Особенно часто активаторами выступают ионы металлов, макро- и микроэлементы — Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mo, Co, Se. Известны ферменты, действие которых активируется ионами нескольких металлов. Например, енолаза активируется Mg^{2+} , Mn^{2+} и K^+ .

Анионы в физиологических концентрациях не оказывают активирующего влияния на ферменты. Исключение составляет амилаза слюны, активность которой повышается при действии ионов хлора.

Ингибиторы вызывают частичное (обратимое) или полное (необратимое) снижение каталитической активности ферментов. Ингибиторами могут быть нормальные метаболиты, образующиеся в клетках в процессах жизнедеятельности, или искусственно синтезированные молекулы, используемые для исследования механизмов ферментативного катализа и выяснения роли отдельных ферментов в метаболических путях.

Многие токсические вещества являются ингибиторами ферментов, и их токсичность связана с тем, что они замедляют или останавливают катализ реакций метаболизма в клетке. Некоторые из них специфичны для отдельных организмов или групп организмов и могут использоваться как антибиотики, пестициды, гербициды.

Ингибиторы характеризуются таким общим признаком, как прочность связывания с ферментом. По этому признаку ингибиторы подразделяются на обратимые и необратимые (рис. 3.12). **Необратимые** ингибиторы



Рис. 3.12. Классификация ингибиторов ферментов

связываются ковалентной связью с ферментом и формируют стабильный комплекс, вызывая тем самым необратимое торможение активности фермента.

Напротив, **обратимые** ингибиторы связываются с ферментом слабыми нековалентными связями, образуя непрочный комплекс фермент — ингибитор, который при определенных условиях легко диссоциирует, и активность фермента восстанавливается.

По механизму действия обратимые ингибиторы подразделяются на *конкурентные* и *неконкурентные*.

В случае **конкурентного обратимого торможения** ингибитор является структурным аналогом субстрата, в силу чего конкурирует с субстратом за связывание с активным центром фермента. В этом случае с ферментом взаимодействует либо субстрат, либо ингибитор, образуя фермент-субстратный комплекс (ES) или комплекс фермент — ингибитор (EI). При формировании комплекса фермент — ингибитор (EI) продукта реакции не образуется.

Отличительной особенностью конкурентного \ является возможность его устранения повышением концентрации субстрата (избытком субстрата). Поэтому при высоких концентрациях субстрата скорость реакции не отличается от таковой в отсутствие ингибитора, т.е. конкурентный ингибитор не изменяет v_{\max} , но повышает K_M (рис. 3.13). Такой способ торможения активности называют *изостерическим* (от греч. *isos* — похожий).

Классический пример конкурентного ингибирования — ингибирование сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой (малонатом). Сукцинатдегидрогеназа катализирует обратимое окисление янтарной кислоты (сукцината) до фумаровой кислоты в цикле трикарбоновых кислот (рис. 3.14, а). Малоновая кислота является структурным аналогом сукцината. Наличие двух карбоксильных групп позволяет малоновой кислоте взаимодействовать с активным центром

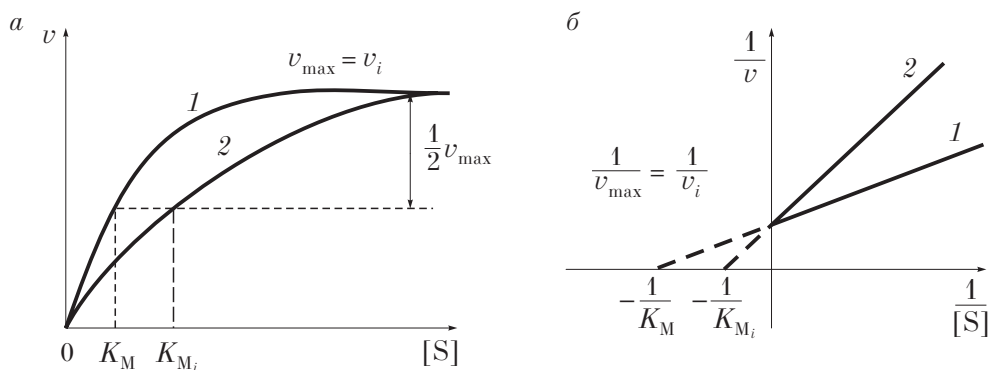


Рис. 3.13. Графики зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии конкурентного ингибитора:

а — в координатах v от $[S]$; б — в координатах $\frac{1}{v}$ от $\frac{1}{[S]}$; v_{\max} и v_i — максимальные скорости реакции; K_M и K_{M_i} — константа Михаэлиса соответственно в отсутствие (1) и в присутствии (2) ингибитора

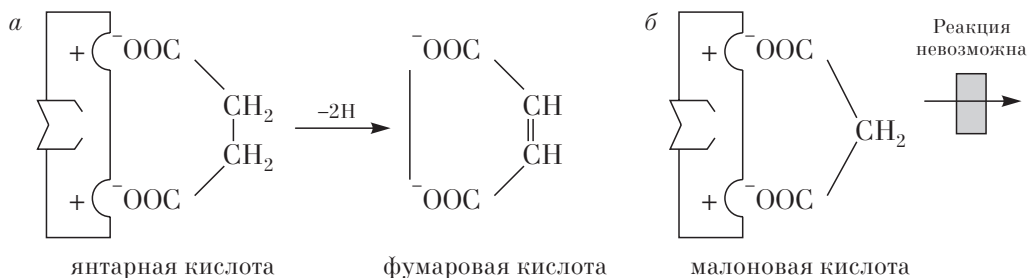


Рис. 3.14. Конкурентное ингибирование сукцинатдегидрогеназы малоновой кислотой: а — окисление янтарной кислоты; б — отсутствие реакции с малоновой кислотой

сукцинатдегидрогеназы. Однако реакция окисления малоновой кислоты невозможна, поэтому продуктов реакции не образуется (рис. 3.14, б).

Многие лекарственные препараты оказывают терапевтическое действие за счет конкурентного ингибирования. Так, фермент ацетилхолинэстераза (АХЭ) катализирует реакцию гидролиза ацетилхолина (нейромедиатор) на холин и уксусную кислоту (рис. 3.15).

Конкурентным ингибитором фермента ацетилхолинэстеразы является прозерин. Ингибирование АХЭ происходит за счет взаимодействия прозерина с теми же участками фермента, с которыми связывается ацетилхолин (рис. 3.16).

Когда прозерин взаимодействует с анионным центром и с каталитическим участком, реакция расщепления АХЭ становится невозможной. Поэтому при использовании прозерина активность холинэстеразы снижается, а количество ацетилхолина возрастает, что вызывает усиление проведения нервного импульса. Прозерин применяют для лечения параличей, мышечных дистрофий и посттравматических нарушений мышечной активности.

В некоторых случаях конкурентные ингибиторы, взаимодействуя с активным центром фермента, могут использоваться им в качестве *псевдосубстрата*, что приводит к образованию продукта с измененной структурой. К таким веществам относится *аллопуринол* — лекарственный препарат, конкурентный ингибитор ксантиноксидазы. Ксантиноксидаза катализирует окисление гипоксантина и ксантина с образованием мочевой кислоты. Аллопуринол — структурный аналог гипоксантина. Под действием ксантиноксидазы он превращается в активный метаболит — оксипуринол, неокисляемый аналог ксантина. Последний является конкурентным ингибитором ксантиноксидазы и считается ответ-

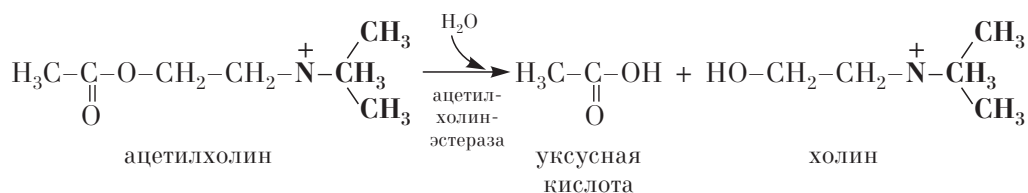


Рис. 3.15. Реакция гидролиза ацетилхолина под действием ацетилхолинэстеразы

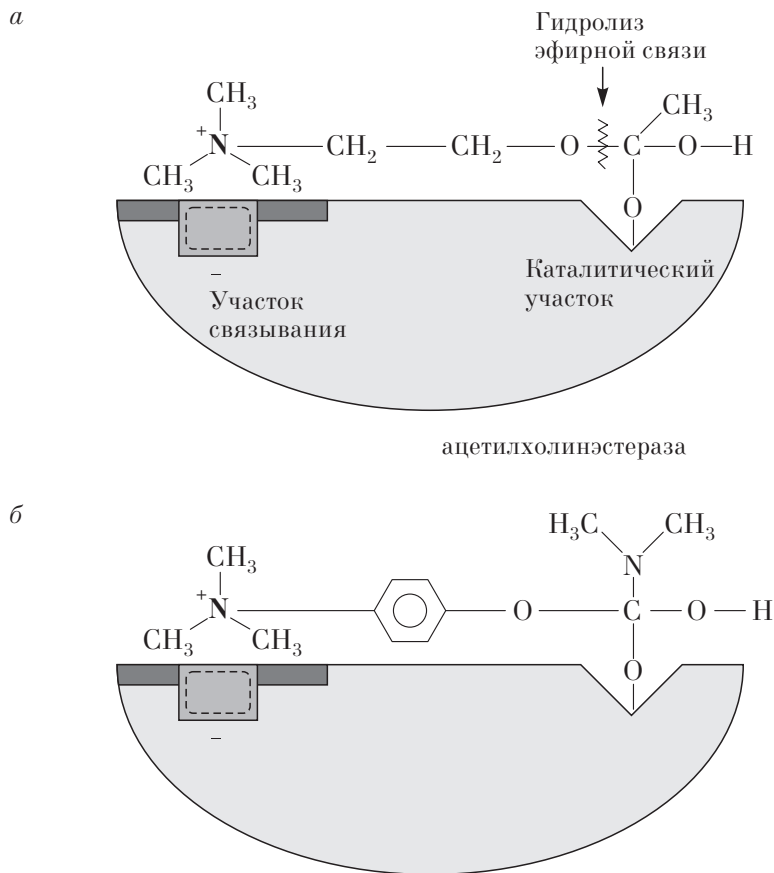


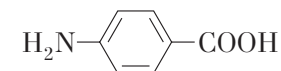
Рис. 3.16. Конкурентное ингибирование ацетилхолинэстеразы:

a — присоединение ацетилхолина (субстрат) в активном центре АХЭ; ацетилхолин связывается в двух участках молекулы фермента — в каталитическом и связывающем (анионном) центре (место гидролиза связи в молекуле ацетилхолина обозначено стрелкой); *б* — присоединение прозерина (конкурентный ингибитор) в активном центре АХЭ

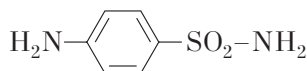
ственным за реализацию фармакологических эффектов аллопуринола. Основное применение аллопуринола — лечение гиперурикемии (повышенное содержание мочевой кислоты в плазме крови) и ее осложнений, таких как подагра.

В медицинской и фармацевтической практике используются *антиметаболиты*. К ним относятся вещества, близкие по химической структуре к эндогенным продуктам метаболизма: структурные аналоги фолиевой кислоты (метотрексат), пуринов (меркаптопурин, тиогуанин и др.), пиримидинов (фторурацил, тегафур, цитарабин и др.). Цитостатическое действие всех этих соединений связано с нарушением синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот вследствие угнетения активности ферментов, катализирующих реакции этих процессов. Поэтому, антиметаболиты также применяются как противоопухолевые средства.

Сульфаниламидные препараты применяются для лечения некоторых заболеваний, вызываемых бактериями. Бактериостатическое действие сульфаниламидов заключается в том, что благодаря структурному сходству с парааминобензойной кислотой (ПАБК) сульфаниламиды замещают ПАБК в активном центре фермента дигидроптеаратсинтазы, который катализирует в составе бактерий синтез фолиевой кислоты, необходимой в качестве кофермента при синтезе нуклеотидов. В результате нарушается образование нуклеиновых кислот и, тем самым, рост и развитие микроорганизмов.



n-аминобензойная кислота



сульфаниламид

В случае *неконкурентного обратимого торможения* ингибитор не является структурным аналогом субстрата и взаимодействует с ферментом не в активном центре, а в ином участке. Ингибитор способен присоединяться как к свободному ферменту, так и к фермент-субстратному комплексу с одинаковой эффективностью. Ингибитор вызывает такие конформационные изменения активного центра, которые не позволяют ферменту превращать субстрат в продукт.

При неконкурентном ингибировании (рис. 3.17) ингибитор снижает величину максимальной скорости реакции.

Наиболее важными неконкурентными ингибиторами являются образующиеся в живой клетке промежуточные продукты метаболизма, способные обратимо связываться с определенными участками ферментов (аллостерическими центрами) и изменять их активность, что является одним из способов регуляции метаболизма. Механизмы аллостерической регуляции будут рассмотрены в п. 3.7.1.

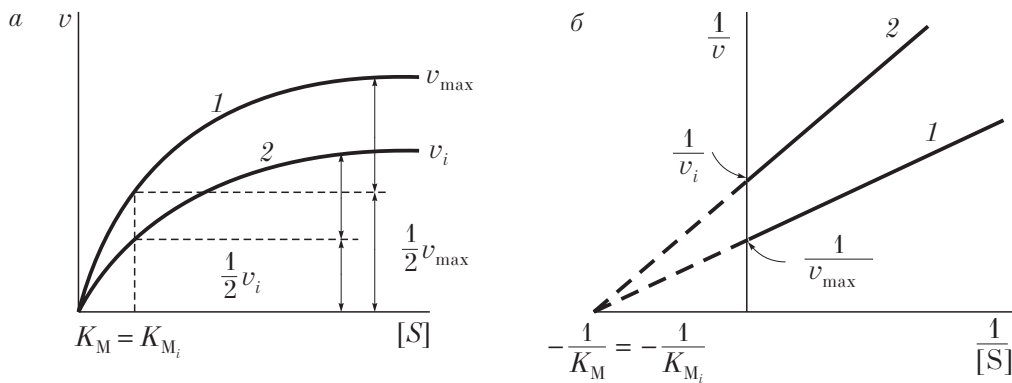


Рис. 3.17. Графики зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии неконкурентного ингибитора:

а — в координатах v от $[S]$; б — в координатах $\frac{1}{v}$ от $\frac{1}{[S]}$

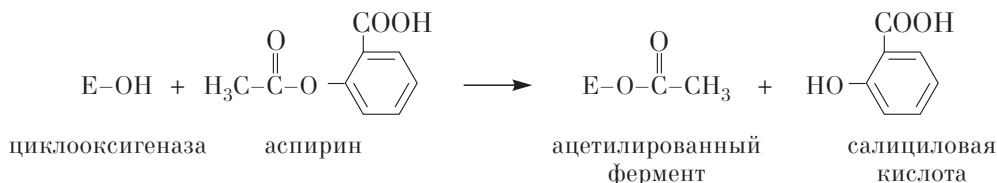


Рис. 3.18. Механизм специфического необратимого ингибирования циклооксигеназы ацетилсалициловой кислотой

Необратимые ингибиторы снижают ферментативную активность в результате образования ковалентных связей с молекулой фермента. Чаще всего необратимые ингибиторы связываются с активным центром фермента, блокируя определенные функциональные группы. Такие ингибиторы называются *специфическими*. Их используют для изучения структуры активного центра ферментов. Так, диизопропилфторфосфат (ДФФ) относится к специфическим ингибиторам сериновых ферментов, так как образует ковалентную связь с ОН-группами серина в активном центре фермента.

Ингибиторы, которые способны образовывать ковалентные связи с определенными группами не только в активном центре, но и в любом участке молекулы фермента, называются *неспецифическими*. Например, йодацетат взаимодействует с сульфгидрильными группами молекул фермента, расположенными в любом участке фермента, что приводит к снижению его каталитической активности.

В качестве необратимых ингибиторов выступают некоторые лекарственные средства. Так, терапевтическое действие аспирина как жаропонижающего и противовоспалительного средства объясняется тем, что он ингибирует фермент циклооксигеназу (ЦОГ). Этот фермент катализирует синтез внутриклеточных гормонов простагландинов, участвующих в развитии воспаления. ОН-Группы серина в активном центре циклооксигеназы взаимодействуют с ацетильным остатком аспирина (рис. 3.18), в результате чего фермент необратимо ингибируется. Ингибированные молекулы фермента разрушаются. Активность восстанавливается только за счет синтеза новых молекул фермента.

3.7. Регуляция скорости ферментативных реакций

Быстрая ответная реакция клетки на постоянно меняющиеся условия внешней среды требует тонкой и согласованной регуляции скоростей химических реакций. Скорость ферментативных реакций регулируется в организме тремя принципиально разными механизмами:

- изменение количества фермента;
- изменение активности имеющегося количества ферментов;
- регуляция количества субстратов и продуктов в данном месте клетки (регуляция проницаемости мембран).

Изменение количества фермента обеспечивается влиянием как на их синтез (регуляция транскрипции, трансляции и посттрансляционной модификации белковой молекулы), так и на механизмы распада молекул ферментов (в цитозоле и лизосомах). Эти механизмы для своего проявления требуют довольно много времени и не могут поддерживать гомеостаз при быстрых изменениях уровня метаболитов в клетке.

Белки-переносчики, встроенные в мембраны, могут регулировать поток субстратов и продуктов через клетку. Многие биологически важные субстраты поступают в клетку при помощи активного транспорта. В этом процессе участвуют специальные белки-переносчики, имеющие, как правило, четвертичную структуру. Работа таких белков во многом напоминает работу ферментов, поэтому регуляция поступления субстратов в клетку основывается на тех же принципах, что и регуляция активности фермента.

Различают следующие основные *механизмы регуляции активности ферментов*:

- изостерическая регуляция;
- аллостерическая регуляция;
- регуляция путем белок-белковых взаимодействий;
- химическая модификация фермента:
 - ▶ обратимая регуляция путем фосфорилирования/дефосфорилирования, ацетилирования/деацетилирования и др.;
 - ▶ необратимая регуляция частичным (ограниченным) протеолизом.

Механизм изостерической регуляции подробно рассмотрен ранее при описании механизма конкурентного ингибирования (см. с. 95–98).

3.7.1. Аллостерическая регуляция

Торможение и активация по аллостерическому механизму имеют большое значение для регуляции обмена веществ.

Аллостерическая регуляция ферментов основана на принципах связывания регулятора или эффектора с *аллостерическим центром фермента*. Связывание с регулятором происходит по принципу комплементарности и индуцированного соответствия. В результате происходит изменение пространственного расположения функциональных групп в аллостерическом центре. Далее реализуется принцип кооперативности мономеров в полимере. Тем самым изменяется пространственное расположение функциональных групп в других участках молекулы белка-фермента. Это приводит к изменению взаимодействия субстрата с ферментом. Фактически такая перегруппировка конформационного состояния молекулы фермента приводит к изменению количества активных или неактивных его форм, т.е., к активации или ингибированию фермента (рис. 3.19). Эффектор присоединяется к аллостерическому центру регуляторной субъединицы аллостерического фермента с последующим изменением конформации

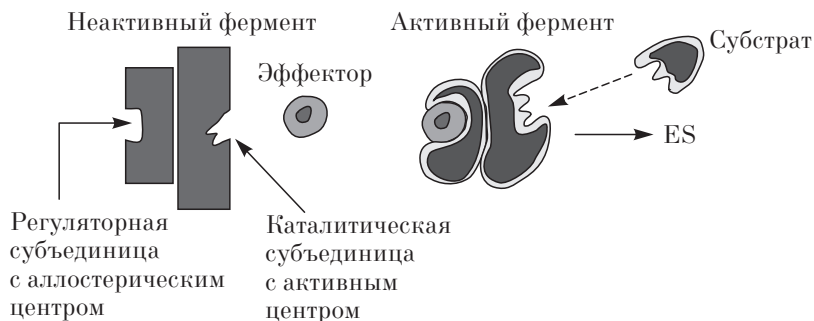


Рис. 3.19. Схема строения и функционирования аллостерического фермента

активного центра. В результате увеличивается способность фермента взаимодействовать с субстратом и образуется фермент-субстратный комплекс.

В роли эффекторов выступают внутриклеточные метаболиты и продукты реакций, такие как пируват, глюкозо-6-фосфат, цитрат, ацетил-КоА, АТФ, АМФ и др. В различных цепях химических превращений возможно разнонаправленное влияние одного и того же эффектора. Так действует, например, цитрат. Он ингибирует окисление глюкозы до ацетил-КоА, одновременно активизирует использование ацетил-КоА для синтеза жирных кислот. Это связано с различной специфичностью аллостерических центров ферментов разных метаболических путей по отношению к регуляторам.

Аллостерический центр может взаимодействовать как с положительными (активаторы), так и с отрицательными (ингибиторы) эффекторами, возможно и одновременное связывание нескольких эффекторов. Ферменты, активность которых регулируется вышеописанным механизмом, называются **аллостерическими**.

Аллостерические ферменты имеют следующие особенности строения и функционирования:

- состоят из нескольких субъединиц, т.е. являются олигомерными белками;
- содержат активный и аллостерический (регуляторный) центры, которые располагаются на разных субъединицах (протомерах). Некоторые ферменты имеют несколько аллостерических центров. Та субъединица, на которой находится активный центр, называется *каталитической*, а та, на которой расположен аллостерический центр, — *регуляторной*;
- при функционировании аллостерических ферментов наблюдается эффект кооперативности. Это означает, что взаимодействие эффектора с аллостерическим центром фермента вызывает конформационное изменение всех субъединиц молекулы фермента, в том числе каталитических, на которых располагается активный центр. В результате изменения его аффинности (сродства) к субстрату увеличивается (в случае присоединения положительного эффектора) или снижается (в случае присоединения отрицательного эффектора) скорость катализируемой этим ферментом реакции;

3.7.2. Регуляция активности ферментов с помощью белок-белковых взаимодействий

Некоторые ферменты изменяют свою каталитическую активность в результате белок-белковых взаимодействий. Например, панкреатическая липаза (катализирует гидролиз нейтральных жиров пищи) секретируется поджелудочной железой в просвет двенадцатиперстной кишки в виде неактивного фермента — пролипазы. В просвете кишечника происходит активация и стабилизация пролипазы путем образования комплекса с низкомолекулярным белком колипазой (10 тыс. а.е.м.).

Активация аденилатциклазы и фосфолипазы C, локализованных в плазматической мембране клеток, происходит путем взаимодействия с α -субъединицей регуляторного G-белка (подробно этот процесс будет рассмотрен при изучении механизмов передачи гормональных сигналов в клетке в п. 13.12.1, 13.12.3).

Примером ингибирования ферментов в результате присоединения регуляторных белков являются *серпины* (англ. Serpins от англ. serine protease inhibitors — ингибиторы сериновых протеаз). Они обладают способностью ингибировать сериновые протеазы (имеющие остаток аминокислоты серина в активном центре). Такие протеазы участвуют в переваривании белков пищи, процессах свертывания крови, фибринолиза.

В ряде случаев в регуляции активности фермента имеет место сочетание аллостерического механизма и белок-белковых взаимодействий. Так, протеинкиназа A состоит из четырех полипептидных цепей (субъединиц), из которых две являются регуляторными и две — каталитическими. Тетрамер не обладает каталитической активностью. Когда четыре молекулы цАМФ присоединяются к регуляторным субъединицам протеинкиназы A, тетрамер диссоциирует на протомеры и высвобождаются каталитические субъединицы (рис. 3.22).

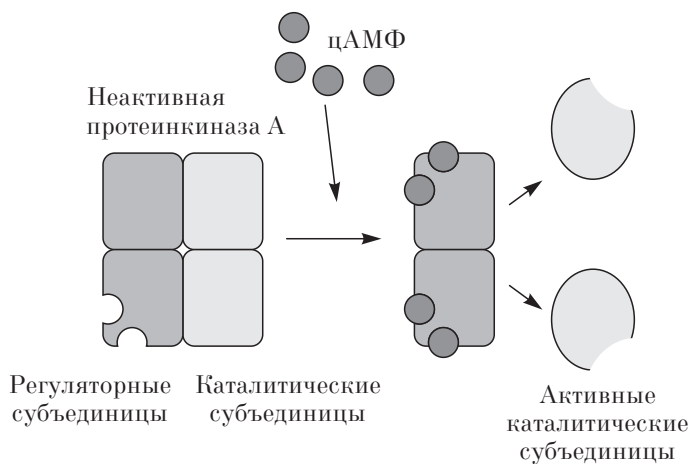


Рис. 3.22. Регуляция активности протеинкиназы A

Активная протеинкиназа катализирует перенос остатка фосфорной кислоты с АТФ на ОН-группы аминокислотных остатков белков (фосфорилирование белков).

Такой механизм регуляции обратим. Отщепление молекул цАМФ от регуляторных субъединиц приведет к объединению регуляторных и каталитических субъединиц протеинкиназы с образованием неактивного комплекса. Аналогичный механизм активации наблюдается у протеинкиназы G (цГМФ-зависимая).

3.7.3. Обратимая ковалентная модификация структуры ферментов

Ферменты, регулируемые при помощи обратимой химической модификации, катализируют реакции важнейших метаболических путей.

Этот тип регуляции активности фермента заключается в присоединении к молекуле фермента или отщеплении от нее небольшой группы атомов. Чаще речь идет об остатке фосфорной кислоты (фосфорилирование или дефосфорилирование ферментов). Фосфорилированию подвергаются ОН-группы фермента при участии протеинкиназ, а дефосфорилирование катализируют фосфопротеинфосфатазы (рис. 3.23).

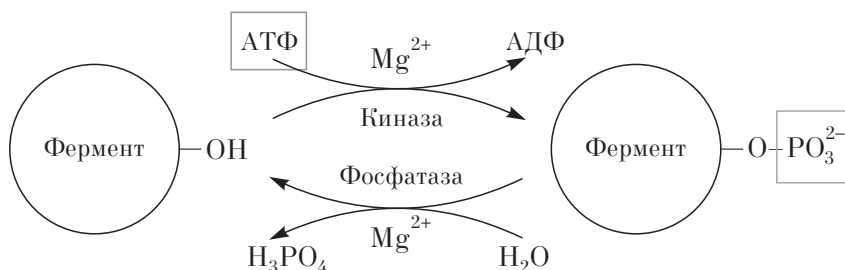


Рис. 3.23. Схема регуляции активности ферментов фосфорилированием/дефосфорилированием

Активность протеинкиназ и фосфопротеинфосфатаз регулируется гормонами, что позволяет быстро изменять активность ключевых ферментов метаболических путей в зависимости от условий внешней среды. Одни ферменты при дефосфорилировании активируются, другие, напротив, становятся менее активными.

3.7.4. Необратимая ковалентная модификация структуры ферментов

Необратимая ковалентная модификация структуры ферментов — это регуляция каталитической активности ферментов ограниченным протеолизом. **Протеолиз** — процесс расщепления белков, который катализируют ферменты-протеазы.

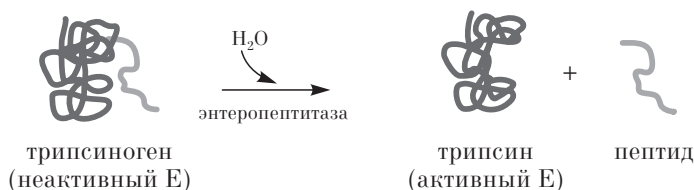


Рис. 3.24. Активация трипсина путем ограниченного протеолиза

Ферменты, функционирующие вне клеток (в желудочно-кишечном тракте или в плазме крови), синтезируются в виде неактивных предшественников и активируются только в результате гидролиза одной или нескольких пептидных связей, что приводит к отщеплению части белковой молекулы предшественника. В результате в оставшейся части белковой молекулы происходит конформационная перестройка и формируется активный центр фермента (например, так активируется фермент — трипсин). Неактивный предшественник трипсина — трипсиноген синтезируется в поджелудочной железе и поступает в двенадцатиперстную кишку, где активируется путем частичного протеолиза под действием фермента кишечника энтеропептидазы (рис. 3.24). В результате отщепления гексапептида с N-конца происходят новые взаимодействия радикалов аминокислот по всей молекуле, приводя к новой конформации, в которой группы активного центра занимают оптимальное положение для катализа.

Частичный протеолиз лежит в основе активации протеолитических ферментов (пепсин, трипсин, эластаза), пептидных гормонов (инсулин, глюкагон), белков свертывающей системы крови (тромбин, фибрин) и фибринолиза (плазмин), а также белков системы комплемента. Как правило, такие ферменты функционируют в течение короткого времени.

Нарушения структуры какого-либо фермента, ведущие к снижению его активности, приводят к нарушению метаболических путей, в которых участвует этот фермент. Такие нарушения почти всегда проявляются как болезни. Повреждения ферментов бывают двух типов: наследственные дефекты строения фермента и повреждения, которые вызваны попадающими в организм токсическими веществами, ингибирующими фермент.

3.8. Изоферменты

Белки, которые катализируют одну и ту же химическую реакцию, но отличаются физико-химическими и биохимическими параметрами (электрофоретическая подвижность, рН-оптимум, чувствительность к регуляторам), называются *изоферментами*. Полагают, что изоферменты позволяют приспосабливаться к действию внутренних и внешних факторов путем изменения метаболизма. Первичная структура изоферментов кодируется разными генами.

Виды изоферментов:

- *органные* — различаются органной локализацией (например, ферменты гликолиза в печени и мышцах);
- *клеточные* — различаются внутриклеточной локализацией (например, малатдегидрогеназа цитоплазмы и митохондрий);
- *гибридные* — образуются в результате нековалентного связывания двух и более субъединиц (лактатдегидрогеназа, креатинкиназа).

Например, окисление молочной кислоты (лактата) в организме катализирует фермент лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Молекула ЛДГ состоит из четырех полипептидных цепей, которые формируют четвертичную структуру фермента. У человека синтезируются две разные по составу ЛДГ-полипептидные цепи: Н-типа (от англ. heart — сердце) и М-типа (от англ. muscle — мышцы), которые позволяют на уровне четвертичной структуры создавать пять различных комбинаций ЛДГ-изоферментов. Так, ЛДГ₁ состоит из Н₄-полипептидных цепей, ЛДГ₂ — Н₃М-, ЛДГ₃ — Н₂М₂-, ЛДГ₄ — М₃Н- и ЛДГ₅ — из М₄-полипептидных цепей. Все эти пять форм функционируют в организме, однако соотношение их в разных органах различно. Так, в сердце преобладают ЛДГ₁ и ЛДГ₂, а в мышцах — ЛДГ₄ и ЛДГ₅. Такая органоспецифичность изоферментов используется в диагностике для выяснения локализации патологического процесса.

Примером другой множественной формы ферментов может быть цитохром Р₄₅₀. На данный момент выделено более 1000 его изоформ, имеющих различную тканевую локализацию и субстратную специфичность. Наибольшее количество цитохрома Р₄₅₀ находится в гепатоцитах. Однако его обнаруживают в кишечнике, коже, почках, легких, надпочечниках, головном мозге, плаценте. Цитохром Р₄₅₀ участвует в метаболизме лекарственных средств, синтезе холестерина, стероидных гормонов, желчных кислот и прогестерона.

Изоферменты СYP1A1, СYP1A2, СYP2A6, СYP2B6, СYP2D6, СYP2C9, СYP2C19, СYP2E1, СYP3A4 — наиболее важные и хорошо изученные изоформы цитохрома Р₄₅₀, участвующие в метаболизме лекарственных средств (ЛС). Более подробная информация об этих изоферментах представлена в п. 18.6.2.

3.9. Медицинские аспекты энзимологии

Ферменты находят самое широкое применение в медицинской практике. Изменение их функционирования является причиной возникновения патологии. Они используются как маркёры различных заболеваний, а также как лекарственные препараты.

3.9.1. Энзимопатии и энзимодиагностика

Энзимопатии. Под *энзимопатиями* понимают заболевания, которые возникают при отсутствии фермента или нарушении его активности. Различают энзимопатии первичные (наследственные) и вторичные (приобретенные).

При *первичных* энзимопатиях аномальные ферменты наследуются в основном по рецессивно-аутосомному типу. Ряд наследственных энзимопатий (цистинурия, пентозурия, альбинизм) протекают без заметного нарушения общего состояния здоровья. Однако чаще из-за блока в ферментных системах энзимопатии характеризуются нарушением обмена веществ.

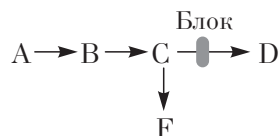


Рис. 3.25. Метаболический блок при ферментопатии

Если фермент отсутствует полностью, то нарушается цепь соответствующих химических реакций. Следствием этого является нарушение образования конечных продуктов, накопление промежуточных продуктов А и В и повышение их концентрация в крови (рис. 3.25), образование необычного вещества F в побочном метаболическом пути из избытка вещества С. Такое положение создается при наследственном заболевании фенилкетонурии, для которого характерно образование фенилпировиноградной кислоты.

Накопленные продукты могут выделяться из организма. Но если выделение невозможно, то они накапливаются в органах и тканях (болезни накопления). Так, при алкаптонурии накапливается промежуточный метаболит — гомогентизиновая кислота, которая откладывается в суставах, вызывая в них воспалительный процесс.

К проявлениям энзимопатий относится патологическая непереносимость молока, связанная с врожденным или приобретенным дефицитом в слизистой оболочке тонкого кишечника фермента лактазы, расщепляющего гликозидную связь в лактозе (дисахарид, содержащийся в молоке).

Многие болезни крови относятся к проявлениям наследственных энзимопатий. Эти заболевания являются результатом нарушенного биосинтеза одного из ферментов, участвующих в свертывании крови: дефицит фактора Хагемана (фактор XII), дефицит фактора Стюарта (фактор X), гемофилия В (фактор IX).

Индивидуальные (генетические) особенности активности ферментных систем играют существенную роль в метаболизме лекарственных веществ, а значит, и в эффективности лекарственной терапии. У лиц со сниженной скоростью метаболизма лекарственных веществ возможно развитие токсических эффектов. Так, у европейцев и у людей с черным цветом кожи из-за низкой активности фермента N-ацетилтрансферазы может нарушаться метаболизм изониазида (средство для лечения туберкулеза), что резко повышает вероятность развития токсических эффектов при терапии. Напротив, у лиц с повышенной скоростью метаболизма наблюдается резистентность (устойчивость) к лекарственной терапии.

У людей с генетическими энзимопатиями возможно развитие атипических реакций (идиосинкрозия). Например, при дефиците в организме фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы противомаларийное средство (примахин) способно вызвать гемолиз эритроцитов.

Энзимодиагностика. Она заключается в постановке диагноза заболевания на основе определения активности ферментов в биологической жидкости. Наиболее часто активность ферментов определяют в плазме крови. В норме ферменты, которые обнаруживаются в крови, условно можно разделить на секреторные, клеточные (индикаторные) и экскреторные. Важными с точки зрения диагностики заболеваний являются секреторные и клеточные ферменты.

Секреторные ферменты образуются в клетках внутренних органов и тканей и затем выделяются в кровь, где выполняют свои функции. Типичным примером являются образуемые в клетках печени ферменты, катализирующие процессы свертывания крови. Например, **экскреторные ферменты**, принимающие участие в переваривании пищи (липаза, амилаза), образуются в поджелудочной железе и экскретируются в просвет кишечника. Острое воспаление поджелудочной железы может привести к тому, что ферменты, катализирующие в норме переваривание компонентов пищи, через поврежденные воспалением капилляры могут попасть в кровь. В крови они, будучи активными, способны катализировать расщепление соединений, необходимых для выполнения конкретных функций. Учитывая органную специфичность секретируемых ферментов, определение их активности в ряде случаев помогает в диагностике органной локализации заболеваний.

Клеточные (индикаторные) ферменты попадают в кровь из тканей, где они катализируют реакции в составе тех или иных метаболических путей. Одни ферменты локализуются в цитоплазме клеток (альдолаза, ЛДГ), другие — в митохондриях (глутаматдегидрогеназа). Большая часть индикаторных ферментов в крови определяется в норме в следовых количествах. Если заболевание ведет к повреждению клеток (некроз), то из клеток и поврежденных органелл специфические ферменты поступают в кровоток. Тогда их активность в сыворотке крови резко возрастает и является показателем (индикатором) степени и глубины повреждения этих тканей (табл. 3.1). Повторное исследование активности в процессе болезни позволяет следить за ходом патологического процесса и прогнозировать исход заболевания.

Таблица 3.1

Ферменты, используемые для диагностики заболеваний

Фермент	Клиническое приложение
Аланинаминотрансфераза, глутаматдегидрогеназа	Болезни печени
Амилаза	Заболевания поджелудочной железы
Аспартатаминотрансфераза	Инфаркт миокарда, болезни печеночной паренхимы, болезни мышц
γ-Глутамилтранспептидаза	Гепатобилиарные болезни, алкоголизм
Кислая фосфатаза	Рак предстательной железы
Креатинкиназа	Инфаркт миокарда, болезни мышц

Окончание табл. 3.1

Фермент	Клиническое приложение
Сорбитдегидрогеназа	Болезни паренхимы печени
Щелочная фосфатаза	Болезни костной ткани, болезни печени
Холинэстераза	Отравление фосфорорганическими инсектицидами, болезни печени

3.9.2. Ферменты как аналитические реагенты

Изолированные ферменты используются в качестве специфических реактивов для количественного определения различных метаболитов и продуктов обмена. Субстраты, концентрацию которых определяют с помощью ферментов, приведены в табл. 3.2.

В качестве примера можно привести определение концентрации глюкозы. Использование фермента (глюкозооксидазы) в реакциях превращения глюкозы основано на свойстве субстратной специфичности и исключает участие других углеводов в химической реакции. Глюкозооксидаза окисляет D-глюкозу до глюкуроновой кислоты с образованием перекиси водорода. Последняя под действием пероксидазы реагирует с 4-аминоантипирином и фенолом с образованием соединения розового цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации глюкозы в анализируемом образце и измеряется фотометрически. Кроме высокой специфичности, ферментативные методы исследования просты и удобны для проведения.

Таблица 3.2

Ферменты, используемые в качестве аналитических реагентов

Фермент	Определяемое вещество
Глюкозооксидаза и гексокиназа	Глюкоза
Липаза	Триацилглицеролы
Пероксидаза	В иммуноферментном анализе
Тақ-полимераза	Для проведения полимеразной цепной реакции
Уреаза	Мочевина
Уриказа	Мочевая кислота
Холестеролоксидаза	Холестерол
Щелочная фосфатаза	В иммуноферментном анализе

Ферменты широко используются в качестве инструментария в технологии получения рекомбинантных ДНК, в полимеразной цепной реакции (ПЦР) и в других современных методах молекулярной биологии и генной инженерии (рестриктазы, Тақ-полимеразы, ДНК-лигазы и др.).

3.9.3. Имобилизованные ферменты

Имобилизация ферментов (от лат. *immobilis* — неподвижный) — это перевод ферментов в нерастворимое состояние с сохранением (частичным или полным) каталитической активности. К преимуществам иммобилизации ферментов относятся многократность их использования, устойчивость к внешним воздействиям, возможность направленного транспорта к органам и тканям, простота удаления из реакционной смеси и отделение от субстратов и продуктов реакции.

Для иммобилизации ферментов обычно применяют физические и химические методы (рис. 3.26):

- адсорбция фермента на водонерастворимых носителях (часто на ионитах);
- захват фермента в сетку геля или полимера;
- инкапсулирование (включение в полупроницаемые капсулы размером 5–300 нм);
- включение фермента в липосомы;
- ковалентное присоединение молекул ферментов к водонерастворимому носителю, в качестве которого используют как органические полимеры (природные и синтетические), так и неорганические материалы. К природным материалам относятся целлюлоза, хитин, агароза, декстраны, бумага, ткани, полистирол, ионообменные смолы;
- ковалентное «сшивание» молекул фермента друг с другом или с инертными белками при помощи би- или полифункционального реагента.

В промышленности иммобилизованные ферменты используются для получения полусинтетических антибиотиков группы цефалоспоринов (цефалотин, цефазолин и др.), пенициллинов, для трансформации стероидов (например, гидрокортизона в преднизолон).

Иммобилизованные ферменты можно использовать в лабораторной практике как реагенты для анализа. Например, полоска бумаги с иммобилизованной

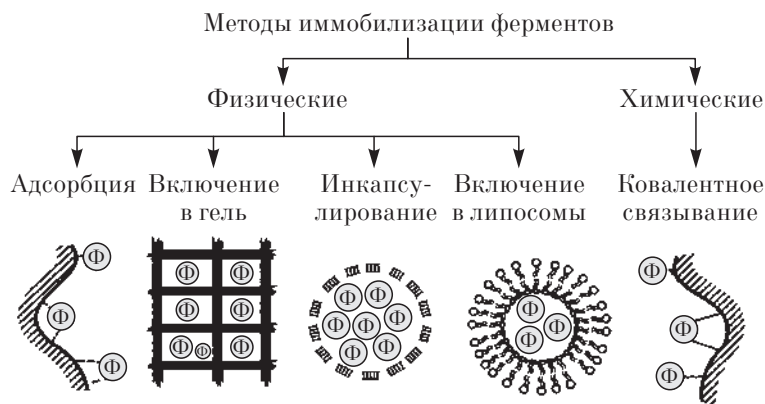


Рис. 3.26. Методы иммобилизации ферментов

глюкозооксидазой и пероксидазой используется для обнаружения глюкозы в моче. Аналогично используются иммобилизованные уреаза, гексокиназа, амилаза. Если фермент ковалентно «пришить» к антителу, специфически взаимодействующему с искомым антигеном, то это позволит значительно повысить чувствительность и специфичность исследования.

Эффективно использование иммобилизованных ферментов в лечебной практике, например, марлевых повязок с трипсином для лечения ожогов, гнойных ран.

3.9.4. Источники и способы получения ферментов.

Применение ферментов в качестве лекарственных препаратов

К настоящему времени осуществлен лабораторный синтез ряда ферментов: рибонуклеазы, лизоцима, ферредоксина, цитохрома *c*. Обычно для получения ферментов используют микробиологический синтез, методы генной инженерии и выделение ферментов из биологических объектов. Источниками получения ферментов являются растения, микроорганизмы, органы и ткани животных.

Путем микробиологического синтеза для медицинских целей получают *солизим* (липолитический фермент, гидролизующий жиры; применяется при желудочно-кишечных заболеваниях); α -*амилазу* (фермент, гидролизующий крахмал; входит в состав препарата Фестал, используется при недостаточной функции поджелудочной железы), *террилитин* (протеолитический фермент, рекомендуется при лечении гнойных ран, ожогов, трофических язв), *стрептокиназу* (из культуры штаммов *Streptococcus haemolyticus*; способна лизировать внутрисосудистые тромбы), *аспарагиназу* (продуцируется штаммами *E. coli*; используется в качестве противоопухолевого, цитостатического средства). Лактазу получают экстракцией из дрожжей *Kluyveromyces lactis* и из гриба *Aspergillus niger*.

Кроме того, методы молекулярной инженерии позволяют конструировать новые ферменты.

Молекулярная инженерия — раздел молекулярной биологии, занимающийся конструированием молекул с заранее заданными структурными параметрами. По отношению к ферментам это означает получение их с измененной структурой с целью исследования механизма действия фермента. Ниже приводятся некоторые методические подходы молекулярной инженерии.

Точечный направленный мутагенез. В этом случае целенаправленно изменяется последовательность нуклеотидов в структуре гена, кодирующего данный фермент. После экспрессии измененного таким образом гена проводится тщательное исследование кинетических характеристик полученного фермента. Заменяя аминокислоты в активном центре, можно получить информацию о механизме катализа.

Образование гибридных ферментов. Методы белковой химии позволяют исследователям соединить две различные молекулы для получения единой

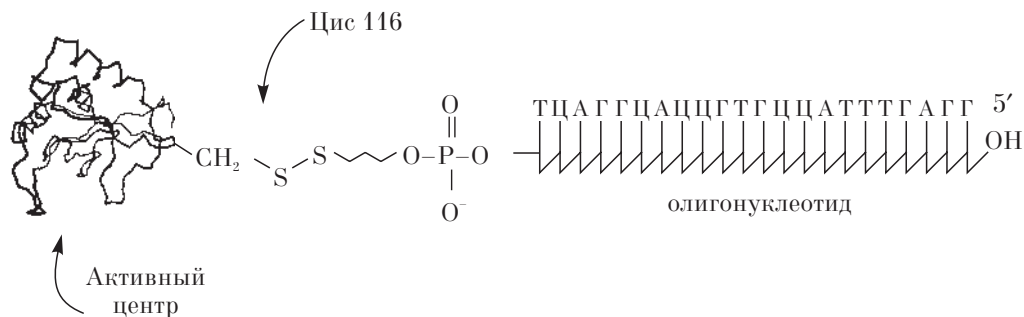


Рис. 3.27. Строение гибридного фермента

молекулы с новыми, полезными свойствами. На рис. 3.27 показан пример строения такого гибридного фермента. К нуклеазе, выделенной у стафилококка, присоединен олигонуклеотид со специфической последовательностью нуклеотидов. Он позволяет гибриднему ферменту связаться с комплементарной последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени и в строго определенном месте оказывать свое действие. Нативный фермент не обладает такой специфичностью.

Использование каталитических антител. Эти белки обладают очень специфическим центром связывания субстрата ферментативной реакции. Они получили название *абзимы*. В них сочетается высокая специфичность антител с возможностью ускорять химические реакции (до 10^7 раз) по сравнению с некатализируемой реакцией. Высокая стереоспецифичность ферментов (включая абзимы) может оказать огромную помощь в синтезе стереоспецифических соединений в органической химии.

Обмен веществ и энергии. Введение в метаболизм

Живая клетка — открытая система. В нее поступают питательные вещества, которые подвергаются превращениям и используются в качестве строительного и энергетического материала, а конечные продукты выводятся из нее. Совокупность этих химических процессов, обеспечивающих жизнедеятельность организма, называется *метаболизмом* или *обменом веществ*.

Метаболизм выполняет несколько функций:

- извлечение энергии из поступающих в организм пищевых веществ и снабжение ею клеток организма;
- превращение молекул пищевых веществ в простые низкомолекулярные вещества, выступающие строительными блоками для построения биомолекул, присущих организму;
- сборка из этих блоков компонентов клетки (полисахаридов, белков, липидов, нуклеиновых кислот и др.);
- синтез и распад специфических биологических молекул (гема, коферментов, нуклеотидов и др.), необходимых для выполнения различных функций.

4.1. Свободная энергия в клетках

Чтобы понять сущность процессов обмена веществ и энергии, нужно помнить некоторые общие положения термодинамики и ее законы. Первый закон утверждает, что энергия не исчезает и не возникает из ничего, она может лишь переходить из одной формы в другую.

Любое органическое соединение, поступающее в организм извне или входящее в состав живой материи, обладает определенным запасом внутренней энергии. Часть внутренней энергии молекулы может быть использована для совершения полезной работы. Эту энергию называют *свободной энергией* (G), это та форма энергии, которую используют клетки.

Свободная энергия ΔG количественно характеризует потенциальную способность вещества претерпевать химические и физические превращения. Химическая реакция протекает лишь в том случае, если $\Delta G < 0$, т.е. в условиях, когда свободная энергия продуктов реакции меньше, чем свободная энергия исходных веществ. Если реакция происходит самопроизвольно и сопровождается

уменьшением свободной энергии ($\Delta G < 0$), то этот процесс энергодающий (*экзергонический*). Если реакция не может протекать самопроизвольно, требует поступления энергии извне и сопровождается увеличением свободной энергии ($\Delta G > 0$), то этот процесс энергопоглощающий (*эндергонический*).

Любая химическая реакция характеризуется определенным изменением *стандартной свободной энергии* (ΔG^0), т.е. энергии химических реакций, определенной в стандартных условиях (температура 25 °С, рН 7, концентрация исходных веществ 1,0 моль/л). Следует помнить, что истинное изменение свободной энергии ΔG для данной реакции зависит от условий, в которых она протекает. В клетках нашего организма эти условия не совпадают со стандартными, поэтому реальная, в физиологических условиях протекающая химическая реакция характеризуется величиной ΔG , отличающейся от стандартной величины (ΔG^0).

В клетке две или несколько реакций могут быть сопряжены таким образом, что общее изменение суммы их свободных энергий способно обеспечить проведение процесса в термодинамически благоприятном направлении. В таком случае изменение общей свободной энергии процесса будет равно сумме индивидуальных изменений свободной энергии каждой реакции. В качестве примера рассмотрим ключевую реакцию использования глюкозы клеткой:



Казалось бы, остаток фосфорной кислоты не может непосредственно присоединиться к глюкозе, так как это эндергонический процесс. Однако реакцию можно представить в виде двух последовательных стадий:

- 1) Глюкоза + Φ_{H} \rightarrow Глюкозо-6-фосфат + H_2O , $\Delta G^0 = 13,8$ кДж/моль;
- 2) АТФ + H_2O \rightarrow АДФ + Φ_{H} , $\Delta G^0 = -30,5$ кДж/моль.

Вторая реакция носит выраженный экзергонический характер. При суммировании двух уравнений получим $\Delta G^0 = -16,7$ кДж/моль, что указывает на термодинамически благоприятное протекание реакции.

4.2. Хемотрофы и фототрофы

В зависимости от формы потребляемой энергии клетки могут быть *хемотрофами* — живущими за счет химической энергии, освобождающейся преимущественно в ходе окислительно-восстановительных реакций, и *фототрофами* — непосредственно использующими энергию солнечного света. К фототрофам относятся зеленые клетки высших растений, синезеленые водоросли, фотосинтезирующие бактерии. Все животные, большая часть микроорганизмов, нефотосинтезирующие клетки растений чаще являются хемотрофами.

По форме получаемого углерода клетки делят на *аутотрофные* («сами себя питающие»), использующие в качестве единственного источника углерода углекислый газ (CO_2), из которого они способны строить все нужные им

углеродсодержащие соединения, и *гетеротрофные* («питающиеся за счет других»), не способные усваивать CO_2 и получающие углерод в форме сложных органических соединений (например, глюкозы). Фототрофы и гетеротрофы взаимно питают друг друга. Фотосинтезирующие организмы улавливают солнечную энергию и образуют из содержащегося в атмосфере CO_2 богатые энергией органические вещества (глюкозу, аминокислоты) и выделяют в атмосферу кислород. Гетеротрофные организмы используют кислород для окисления органических веществ, а CO_2 в качестве конечного продукта обмена возвращают в атмосферу.

Организм человека получает энергию за счет окисления органических питательных веществ (аминокислот, углеводов и липидов). **Питательное вещество** — компонент пищи, который обеспечивает организм энергией и структурно-функциональными элементами). Как это происходит, будет рассмотрено в главе 14.

4.3. Организация химических реакций в метаболические пути

Последовательность химических реакций, в ходе которых происходит превращение вещества, называют **метаболическим путем**. Напомним, что каждую стадию метаболического пути катализируют ферменты. Вещества, образующиеся в этих последовательных превращениях, называются **промежуточными продуктами (метаболитами)**, а последнее соединение метаболического пути — **конечным продуктом**.

Метаболические пути характеризуют клетку как сложную систему с большим числом взаимосвязанных процессов, аналогичных стадиям крупного технологического производства.

Различают центральные и специальные метаболические пути. **Центральные метаболические пути** — общие пути превращения основных пищевых веществ (углеводов, жиров, белков) в клетке. Эти пути характеризуются большими потоками субстратов. Например, в организме взрослого человека ежедневно окисляется 300–350 г глюкозы до CO_2 и воды. Последовательности химических превращений в каждом из центральных метаболических путей у всех живых форм в принципе едины. Так, например, белки, жиры и углеводы на пути своего катаболизма превращаются в пировиноградную кислоту, которая, в свою очередь, подвергается окислительному декарбоксилированию (центральный метаболический путь), в результате образуется ацетил-КоА. Последний включается в цикл Кребса (центральный метаболический путь) и расщепляется до углекислого газа и воды.

Специальные (вторичные) метаболические пути включают превращение какого-то одного конкретного вещества или группы соединений до образования общего для углеводов, белков и жиров метаболита (центрального метаболита)

или веществ, требующихся клеткам в малых количествах. Сотни различных высокоспециализированных биомолекул, в том числе нуклеотиды, пигменты, токсины, антибиотики и алкалоиды, продуцируются у разных форм жизни на вторичных метаболических путях.

Метаболические пути по структуре весьма разнообразны (табл. 4.1). Если субстрат в результате ряда ферментативных процессов превращается в один продукт, метаболический путь носит название *линейного*. Встречаются *разветвленные* метаболические пути, приводящие к образованию различных конечных продуктов в зависимости от потребности клетки в них. Выделяют также *циклические* и *спиральные* метаболические пути.

Таблица 4.1

Виды метаболических путей

Название	Схема	Метаболический путь
Линейный	$A \xrightarrow{E_1} B \xrightarrow{E_2} C \xrightarrow{E_3} D \xrightarrow{E_4} E$	Гликолиз, глюконеогенез, распад и синтез гликогена
Разветвленный	$ \begin{array}{c} & & E_3 & D \xrightarrow{E_4} E \\ & & \swarrow & \\ A \xrightarrow{E_1} B & \xrightarrow{E_2} & C & \\ & & \searrow & \\ & & E & F \xrightarrow{E_6} G \end{array} $	Синтез нуклеотидов
Циклический		Орнитиновый цикл, цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса), пентозофосфатный цикл, цикл Кальвина (в растительных клетках)
Спиральный		Синтез и окисление жирных кислот

4.4. Понятие о метаболомике

Метаболомика — это научное направление, в рамках которого с помощью аналитических методов изучаются и количественно определяются низкомолекулярные метаболиты, присутствующие в клетке или биологической жидкости.

Метаболом — совокупность всех метаболитов в клетке, ткани, органе или организме. Предполагается, что общее число метаболитов в типичной клетке находится в пределах 1000–5000.

В метаболомике человека метаболиты делят на *эндогенные* (произведенные самим организмом) и метаболиты чужеродных субстанций (например, лекарственных веществ), называемые *ксенометаболитами*. В рамках программы «Метаболом человека» (Канада, 2007) была составлена первая версия базы данных о метаболоме человека, содержащая информацию примерно о 2500 метаболитах, 1200 лекарственных веществах и 3500 пищевых компонентах.

Информация о содержании внутриклеточных метаболитов совместно со структурой метаболических путей очень важна для понимания процессов, происходящих на молекулярном уровне, и может дать ключ к возможности управления этими процессами. Так, при изучении заболеваний выявляемые изменения в метаболизме ложатся в основу новых идей о том, на какие молекулярные процессы можно воздействовать с помощью лекарственных препаратов, чтобы вылечить заболевание.

В метаболомике растений выделяют первичные и вторичные метаболиты. К настоящему времени охарактеризовано более 50 000 метаболитов растений. *Первичные* метаболиты принимают непосредственное участие в нормальном росте и развитии растений. *Вторичные* метаболиты являются биологически активными веществами: одни из них обладают антимикробной активностью, другие являются специфическими ингибиторами ферментов, третьи — ростовыми факторами, многие обладают фармакологической активностью. К вторичным метаболитам относят токсины, антибиотики, алкалоиды, флавоноиды, гормоны роста и др.

Одной из задач фармации является разработка методов скрининга (массовой проверки) лекарственных растений, а также микроорганизмов на способность продуцировать ценные вторичные метаболиты.

4.5. Катаболизм и анаболизм — две стороны метаболизма

В метаболизме можно выделить пути, которые предназначены для биосинтеза — пути анаболизма, и пути катаболизма, которые ведут к расщеплению сложных молекул.

Катаболизм (диссимиляция) — ферментативный процесс расщепления сложных органических молекул до более простых. Катаболические процессы сопровождаются высвобождением свободной энергии, заключенной в структуре сложных органических соединений. В ходе реакций катаболизма значительная часть свободной энергии запасается благодаря сопряженным ферментативным реакциям в форме высокоэнергетического соединения (АТФ) и восстановленных коферментов ($\text{НАДН(Ф)}\cdot\text{H}^+$ и ФАДН_2).

Анаболизм (ассимиляция) — это ферментативный синтез сложных веществ и молекул (белков, полинуклеотидов, полисахаридов и других макромолекулярных клеточных компонентов) из простых молекул-предшественников,

связанный с потреблением энергии фосфоангидридных связей АТФ. Часто анаболические пути характеризуются как восстановительные биосинтезы, для которых требуются водородные атомы, донором которых является НАДФН·Н⁺.

По существу, катаболизм и анаболизм следует рассматривать не как два отдельных процесса, а как две стороны одного общего процесса — метаболизма.

Катаболический путь и соответствующий ему, но противоположный по направлению анаболический путь обычно не совпадают и отличаются, как правило, локализацией в клетке. Например, окисление жирных кислот осуществляется с помощью набора митохондриальных ферментов, тогда как синтез жирных кислот катализирует система ферментов, находящихся в цитозоле. Именно благодаря разной локализации катаболические и анаболические процессы в клетке могут протекать одновременно.

Важно отметить, что катаболические пути сходятся, образуя небольшое число конечных продуктов (рис. 4.1, а). Множество различных белков расщепляются до аминокислот, часть из которых превращается в ацетил-КоА. Точно так же многие полисахариды и дисахариды расщепляются до глюкозы, которая превращается в конечном счете в ацетил-КоА, а он вливается в общий путь катаболизма — цикл лимонной кислоты (цикл Кребса).

Для анаболизма, в отличие от катаболизма, характерно расхождение метаболических путей (рис. 4.1, б). Так, из небольшого числа молекул-предшественников в результате синтетических реакций образуются разнообразные макромолекулы, а роль цикла Кребса (рис. 4.1, в) заключается в поставке молекул-предшественников для биосинтеза аминокислот, углеводов и других соединений.

Катаболизм и анаболизм — это сопряженные, взаимодополняющие друг друга процессы. Катаболические и анаболические пути тесно связаны друг с другом с помощью промежуточных метаболитов, таких как пируват, ацетил-КоА, оксалоацетат, α-кетоглутарат и др. Эти соединения являются продуктами катаболических путей и субстратами для синтеза новых соединений в анаболических реакциях.

Существуют и энергетические взаимосвязи между катаболизмом и анаболизмом. Катаболические пути поставляют химическую энергию в форме АТФ, которая используется для анаболических реакций. Существует и другой путь передачи энергии — через водородные атомы или электроны на особые кофакторы, окисленную форму НАДФ⁺. И уже восстановленный кофактор НАДФН·Н⁺ является донором водородных атомов для биосинтеза некоторых клеточных компонентов (жирных кислот, холестерина, стероидных гормонов и др.).

Катаболизм и анаболизм связаны и на уровне регуляторов обмена. Процессы синтеза гликогена (анаболизм) и его распада (катаболизм) находятся под контролем гормонов — инсулина и глюкагона. Эти процессы регулируются реципрочно, т.е. прямо противоположно.

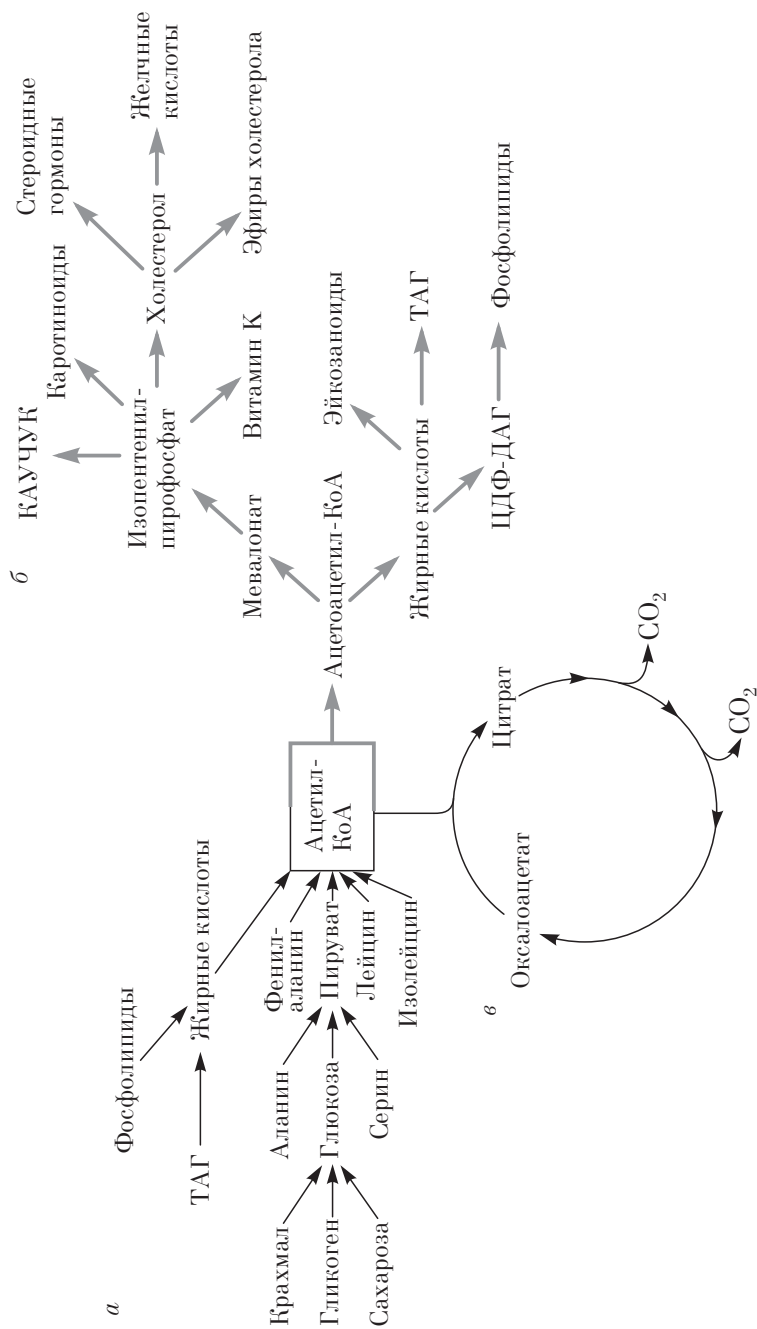


Рис. 4.1. Типы нелинейных метаболических путей:

a — сходящиеся пути катаболизма; *б* — расходящиеся пути анаболизма; *в* — циклический путь (цикл Кребса)

Интенсивность метаболизма определяется потребностью клетки в тех или иных веществах или энергии. Так, клетка синтезирует аминокислоты именно с такой скоростью, которая достаточна, чтобы обеспечить возможность образования необходимого ей количества белка. Подобная экономичность и гибкость метаболизма возможны лишь при наличии достаточно тонких механизмов его регуляции, осуществляемых на разных уровнях.

1. Скорость реакций определенного метаболического пути определяется *активностью регуляторных (аллостерических) ферментов*, которые обычно катализируют начальные этапы метаболических путей. Большинство из них ингибируется конечным продуктом данного пути. Наличие кофакторов, коферментов, активаторов или ингибиторов также оказывает влияние на каталитическую активность аллостерических ферментов.

2. Регуляция *на уровне гена* способна привести к увеличению или уменьшению концентрации тех или иных ферментных белков, изменению относительного содержания в клетке множественных форм фермента. Генетическая регуляция отличается высокой специфичностью, экономичностью и обеспечивает широкие возможности для контроля метаболизма. Наглядный пример — появление в клетке индуцибельных ферментов в ответ на поступление соответствующего субстрата (субстратная индукция). Например, если в рационе увеличивается содержание белков, то уже через сутки в печени увеличивается синтез специфических ферментов, участвующих в обмене аминокислот. Однако активация генов является медленным процессом, поэтому данная форма регуляции непригодна для тех случаев, когда необходимо быстрое изменение метаболизма.

3. *Гормональная регуляция*. Нервная система, в частности ее центральные отделы, выполняет в организме высшие интегративные функции. Получая сигналы из окружающей среды и от внутренних органов, центральная нервная система преобразует их в нервные импульсы и направляет их к тем органам, изменение скорости метаболизма в которых необходимо в данный момент для выполнения определенной функции. Чаще всего регулирующую роль нервная система осуществляет через железы внутренней секреции, усиливая или подавляя поступление гормонов в кровь. Гормоны способны активировать или ингибировать многие ферменты метаболических путей. Например, глюкагон (гормон поджелудочной железы) стимулирует распад гликогена в печени до глюкозы, что вызывает повышение уровня глюкозы в крови. Регулирующее действие нервной системы на обмен веществ и энергии всегда целесообразно и направлено на наиболее эффективное приспособление организма к изменившимся условиям.

4.6. Этапы катаболизма

Расщепление основных пищевых веществ представляет собой ряд последовательных ферментативных реакций, составляющих три этапа катаболизма (рис. 4.2).

I этап катаболизма происходит в *пищеварительном тракте*, где питательные вещества подвергаются гидролизу ферментами желудочно-кишечного тракта (пищеварение). *Полостное пищеварение* осуществляется за счет пищеварительных секретов и их ферментов, поступивших в полость желудка, тонкой кишки. В результате полостного пищеварения гидролизуются крупномолекулярные вещества и образуются в основном олигомеры. Гидролиз оставшихся связей обеспечивает *пристеночное (мембранное) пищеварение*. Оно осуществляется ферментами, адсорбированными на мембранах энтероцитов.

Таким образом, на I этапе катаболизма крупные органические молекулы распадаются на составляющие их специфические структурные блоки. Так, полисахариды расщепляются до глюкозы, белки — до аминокислот, нуклеиновые кислоты — до нуклеотидов и нуклеозидов, триацилглицеролы — до жирных кислот и глицерола. Количество энергии, освобождающейся в виде тепла на этой стадии, очень невелико.

II этап катаболизма (внутриклеточный катаболизм) происходит в *цитоплазме и митохондриях*. Он включает *специфические* пути превращения веществ,

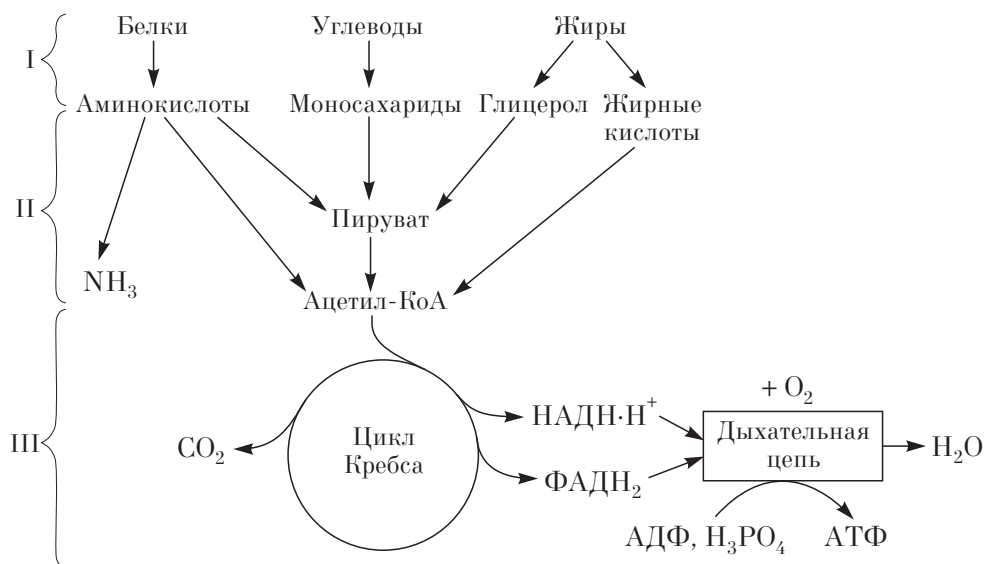


Рис. 4.2. Стадии катаболизма основных пищевых веществ:

I — расщепление в пищеварительном тракте; II — специфичные пути катаболизма и общий путь катаболизма — окислительное декарбоксилирование пирувата; III — общий путь катаболизма (цитратный цикл и дыхательная цепь)

образовавшихся на I этапе. В специфических путях катаболизма из аминокислот могут образоваться α -кетоглутаровая кислота, оксалоацетат, фумарат, сукцинат, т.е. соединения, которые непосредственно включаются в цитратный цикл. Из глюкозы, пентоз, глицерола и аминокислот образуется пируват.

Начиная со стадии образования пирувата происходит унификация путей катаболизма. Из пирувата в реакции *окислительного декарбоксилирования* образуется ацетил-КоА. Окисление жирных кислот и превращения углеродных скелетов некоторых аминокислот также завершаются образованием ацетил-КоА. Таким образом, ацетил-КоА является конечным продуктом II этапа, который объединяет катаболизм белков, углеводов и липидов. На этом этапе химическая энергия частично рассеивается в виде тепла, частично накапливается в виде восстановленных коферментных форм, частично запасается в макроэргических связях АТФ.

III этап — *цитратный цикл* (цикл Кребса) и *дыхательная цепь*. На завершающем этапе катаболизма ацетильная группа кофермента А окисляется до воды и углекислого газа в цитратном цикле, а водород с НАДН·Н⁺ и ФАДН₂ поступает в дыхательную цепь митохондрий, высвобождая при этом энергию, которая запасается в форме АТФ.

4.7. Основа катаболизма — окислительно-восстановительные реакции

Окислительно-восстановительные процессы стали ведущими в механизмах обеспечения энергией жизни на Земле.

Процессы катаболизма в клетках животных сопровождаются потреблением кислорода, который необходим для реакций окисления. Под *окислением* понимают процесс отдачи электронов атомами вещества, под *восстановлением* — процесс присоединения электронов атомами вещества. В ходе реакций окисления электроны, находящиеся на высокоэнергетическом уровне в молекуле восстановителя (водорода), переходят на низкоэнергетическую орбиталь в молекуле окислителя, где они сильнее притягиваются ядрами атомов. Восстановитель отдает электроны, т.е. *окисляется*; окислитель присоединяет электроны, т.е. *восстанавливается*. Окислитель и восстановитель всегда образуют сопряженную пару.

Количественной оценкой способности вещества принимать или отдавать электроны является *стандартный окислительно-восстановительный потенциал*, или *редокс-потенциал* (E^0). Редокс-потенциал выражается значением электродвижущей силы (в вольтах, В), которая возникает в растворе между окислителем и восстановителем, присутствующими в концентрации 1,0 моль/л при 25 °С (при рН 7,0 оба находятся в равновесии с электродом, который может обратимо принимать электроны от восстановителя). Его величина может быть положительной или отрицательной. Знак «—» означает, что данная

редокс-пара легко отдает электроны, т.е. играет роль *восстановителя*, знак «+» указывает на способность редокс-пары принимать электроны, т.е. играть роль *окислителя*.

При pH 7,0 редокс-потенциал системы $\text{H}_2/2\text{H}^+ + 2\bar{e}$ равен $-0,42$ В, а для пары $\text{НАДН}\cdot\text{H}^+/\text{НАД}^+$ он составляет $-0,32$ В, что говорит о ее высокой способности отдавать электроны. В то же время окислительно-восстановительная пара $\frac{1}{2}\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ имеет наибольшую положительную величину редокс-потенциала $+0,81$ В, т.е. кислород обладает наивысшей способностью принимать электроны.

В процессе окисления перенос электронов происходит по направлению от более отрицательного к более положительному потенциалу. Кроме того, при отрицательном значении потенциала электроны являются «высокоэнергетическими», при переходе к системе с более высоким значением потенциала они теряют часть энергии и способны произвести работу.

Знание величин E^0 позволяет рассчитать изменение свободной энергии реакции переноса электронов между окислительно-восстановительными парами:

$$\Delta G^0 = -nF\Delta E^0,$$

где ΔG^0 — изменение стандартной свободной энергии, кал; n — число переносимых электронов; F — число Фарадея (константа, равная $96\,485$ Кл/моль); ΔE^0 — разность стандартных потенциалов донорной и акцепторной пар.

4.7.1. Понятие о биологическом окислении

Биологическое окисление — совокупность реакций окисления субстратов в живых клетках с участием ферментов оксидоредуктаз. Оно происходит как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Реакции биологического окисления необходимы для получения энергии, теплопродукции, синтеза новых веществ и разрушения (биотрансформации) эндогенных и чужеродных веществ.

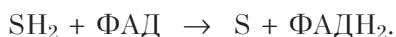
При биологическом окислении перенос электронов может осуществляться различными путями.

1. *От окисляемого вещества на кислород*, который ковалентно связывается с окисляемым веществом. Ферменты, катализирующие этот тип окислительных реакций, называются **оксидазами**.

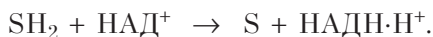
2. *Прямой перенос электронов* происходит, например, при переходе одной ионной формы (Fe^{2+} , Cu^{2+}) в другую (Fe^{3+} , Cu^+):



3. *Перенос электронов в составе атомов водорода* (атом водорода состоит из протона и электрона): так протекают, например, реакции дегидрирования, связанные с отщеплением водорода от молекулы биоорганического субстрата (S):



4. *Перенос электронов в составе гидрид-иона (H^-), который состоит из двух электронов и одного протона:*

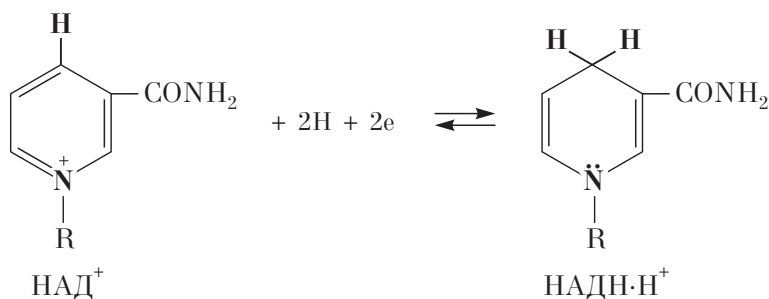


4.7.2. Дегидрогеназные реакции — основной источник энергии в клетке. Виды дегидрогеназ

В главе 3 уже упоминалось, что ферменты, катализирующие реакции дегидрирования, называются *дегидрогеназами*. В зависимости от используемого кофермента дегидрогеназы делятся на две группы: пиридинзависимые и флавинзависимые.

Пиридинзависимые дегидрогеназы в качестве кофермента используют НАД⁺ (никотинамидадениндинуклеотид) или НАДФ⁺ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат), являющиеся производными витамина РР (структурные формулы см. на с. 83).

В реакциях дегидрирования, которые катализируют данные пиридинзависимые дегидрогеназы, два атома водорода отщепляются от молекулы субстрата: один атом водорода и один электрон переносятся на никотинамидное кольцо НАД⁺ или НАДФ⁺ с образованием восстановленной формы коферментов НАДН·Н⁺ или НАДФН·Н⁺, а другой атом водорода, потерявший электрон ($[\text{H}^+]$), освобождается в окружающую среду.



В окисленной форме никотинамид находится в форме пиридиниевого катиона (НАД⁺). Пиридиниевый катион способен обратимо присоединять к себе гидрид-ион (H^-), переходя в восстановленную форму — НАДН·Н⁺.

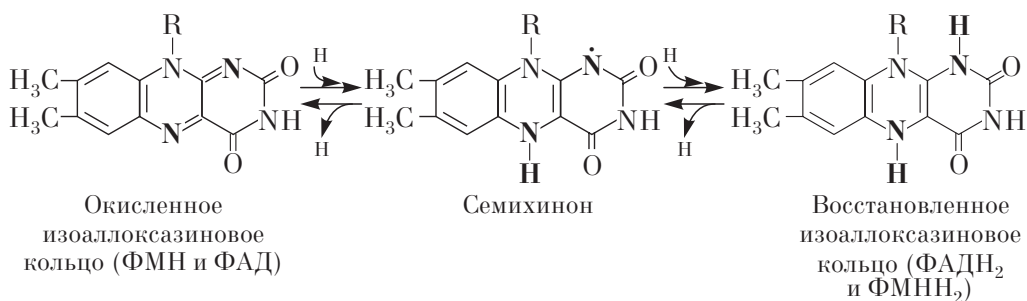
Дегидрогеназные реакции с участием коферментов НАД⁺ или НАДФ⁺ имеют ряд уникальных свойств, которые обуславливают их ключевую роль в процессах биологического окисления. Во-первых, они легкообратимы при небольших изменениях свободной энергии, что позволяет коферментам участвовать как в окислении субстрата, так и в восстановлении продуктов реакции (в зависимости от потребностей клетки). Во-вторых, этим коферментам (как в окисленной, так и в восстановленной форме) присуща высокая мобильность,

т.е. способность легко отделяться от белка-фермента, что облегчает обмен атомами водорода и электронами между различными дегидрогеназными системами, расположенными в разных частях клетки.

Коферменты НАД⁺ и НАДФ⁺ способны акцептировать водород от большого числа субстратов, окислительно-восстановительный потенциал которых ниже $-0,3$ В. К числу таких субстратов относятся продукты расщепления углеводов, жиров и различных аминокислот.

Флавинзависимые дегидрогеназы в качестве кофермента используют ФМН (флавиномононуклеотид) или ФАД (флавинадениндинуклеотид), производные витамина В₂ (структурные формулы см. на с. 83).

Флавиновые коферменты ФМН и ФАД выполняют роль простетической группы в составе специфических дегидрогеназ (флавиновых ферментов или флавопротеинов). Активной частью молекулы ФАД или ФМН служит изоаллоксазиновое кольцо рибофлавина (витамина В₂), к атомам азота которого могут присоединяться два атома водорода (т.е. два протона и два электрона) за счет внутримолекулярной перегруппировки двойных связей.



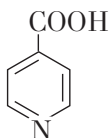
ФМН и ФАД прочно связаны с соответствующими дегидрогеназами и не могут свободно переносить восстановительные эквиваленты к другим дегидрогеназным системам путем диффузии. Реакции, катализируемые флавинзависимыми дегидрогеназами, трудно обратимы, и, следовательно, восстановленные ФМН₂ и ФАДН₂ не могут служить источником водородных эквивалентов в процессах восстановительного биосинтеза. В соответствии с относительно низкими окислительно-восстановительными потенциалами ($E^0 = -0,12$ В) флавопротеины могут акцептировать водород от НАДН·Н⁺. При окислении янтарной кислоты, α-глицерофосфата и ацил-КоА флавинзависимые ферменты могут играть роль первичных дегидрогеназ и непосредственно принимать электроны и протоны от окисляемых субстратов.

И пиридиновые, и флавиновые коферменты принимают водород от различных соединений, образующихся при распаде глюкозы, жирных кислот, аминокислот. Связанный с коферментами водород затем может переноситься на какой-либо субстрат. Такие реакции называются реакциями *анаэробного окисления*. Если конечным акцептором водорода служит кислород и образуется

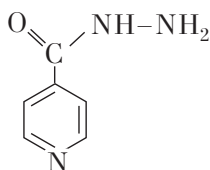
вода, говорят о реакциях *тканевого дыхания*. Кислород играет в этом случае роль восстанавливающегося соединения (окислителя). Восстановление атома кислорода при взаимодействии с парой протонов и электронов приводит к образованию молекулы воды, а высвобождаемая при этом энергия используется для синтеза АТФ.

4.7.3. Лекарственные препараты — ингибиторы дегидрогеназ

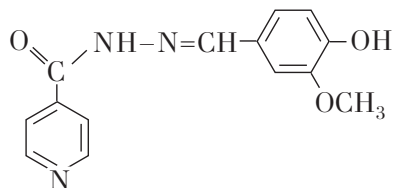
Ингибиторы дегидрогеназ тормозят процесс дегидрирования отдельных субстратов, снижая поступление атомов водорода (протонов и электронов) в дыхательную цепь. К ним относятся, например, противотуберкулезные средства — производные изоникотиновой кислоты (*фтивазид*, *изониазид*).



изоникотиновая
кислота



изониазид
(тубазид)



фтивазид

Эти препараты, имея структурное сходство с амидом никотиновой кислоты (в молекуле НАД⁺ содержится амид никотиновой кислоты), являются конкурентными ингибиторами пиридинзависимых дегидрогеназ. Это нарушает механизм клеточного дыхания у микроорганизмов, что ведет к их гибели.

Другим примером является *дисульфирам (тетурам)*. Он ингибирует фермент ацетальдегиддегидрогеназу и применяется для лечения алкоголизма. Ингибирование данного фермента в печени останавливает процесс окисления этилового спирта до углекислого газа и воды на стадии образования уксусного альдегида. В результате накопления ацетальдегида в организме человека, употребившего спиртное на фоне приема дисульфирама, возникает острая интоксикация, которая сопровождается характерными ощущениями.

Противомикробное действие производных нитрофурана (Фурацилин, Фурадонин, Фурагин) тесно связано с их способностью угнетать дегидрогеназную активность ферментов бактерий. Под влиянием нитрофуранов блокируется цикл трикарбоновых кислот в микробной клетке, тормозится клеточное дыхание, рост и размножение микроорганизмов.

Препараты ртути и мышьяка(III) неспецифически блокируют SH-группы многих дегидрогеназ. В результате эти ферменты теряют способность катализировать химические реакции.

4.8. Общие пути катаболизма

Как уже упоминалось, к общим, или центральным, путям катаболизма относятся окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты, цикл трикарбоновых кислот (цикл лимонной кислоты, цикл Кребса), тканевое дыхание (о нем подробнее см. главу 5).

4.8.1. Окислительное декарбоксилирование пирувата

В окислительном декарбоксилировании пировиноградной кислоты (рис. 4.3) участвует **пируватдегидрогеназный комплекс**, который прикреплен к внутренней мембране митохондрий. Пируватдегидрогеназный комплекс (ПДГК) состоит из трех ферментов: пируватдегидрогеназы (E_1), дигидролипоилацетилтрансферазы (E_2) и дигидролипоилдегидрогеназы (E_3) — и 5 коферментов: тиаминпирозфосфата (ТПФ), липоевой кислоты, НАД^+ , ФАД и коэнзима А.

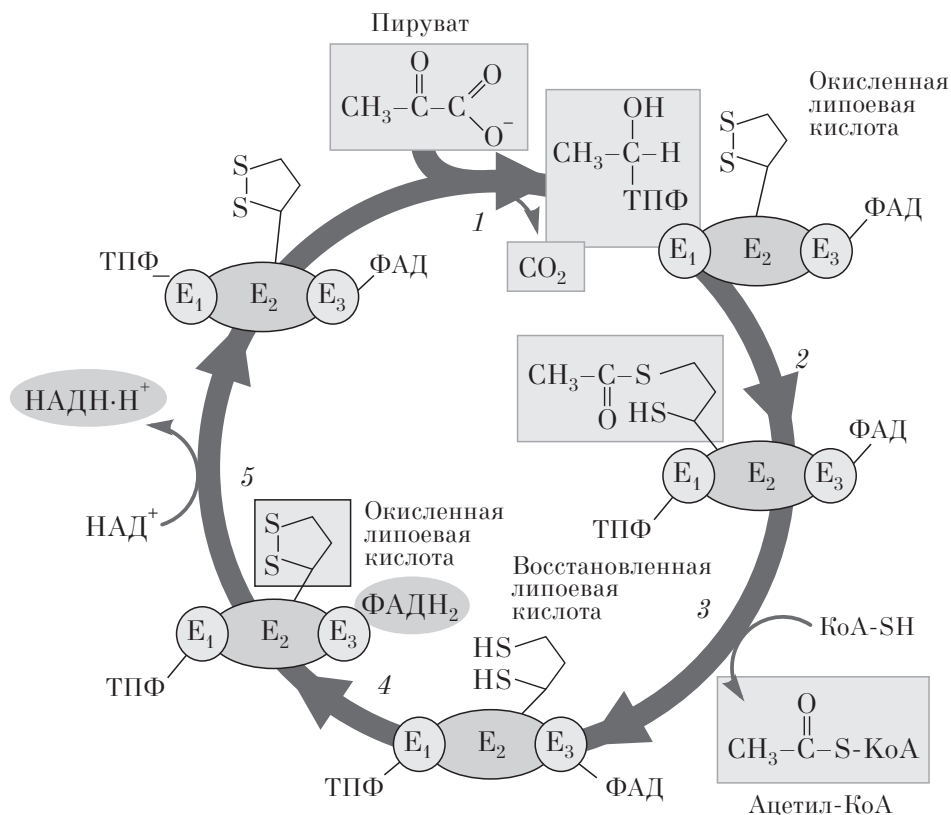


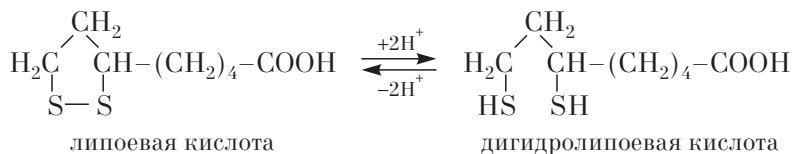
Рис. 4.3. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты: ТПФ — тиаминпирозфат; ЛК — липоевая кислота; E_1 , E_2 , E_3 — ферменты пируватдегидрогеназного комплекса; ПВК — пировиноградная кислота; 1–5 — стадии процесса

Четыре из них являются производными витаминов: тиамина, или витамина В₁ (ТПФ); рибофлавина, или витамина В₂ (ФАД); ниацина, или витамина РР (НАД⁺), пантотеновой кислоты (НС-КоА). Три кофермента (ТПФ, липоевая кислота* и ФАД) ковалентно связаны в активных центрах ферментов Е₁, Е₂ и Е₃ соответственно, а НАД⁺ и КоА выполняют роль вторых субстратов в химических реакциях (мигрирующие коферменты) (рис. 4.3).

Также в состав ПДГК входят два регуляторных белка — протеинкиназа и протеинфосфатаза.

У человека фермент Е₁ (пируватдегидрогеназа) представляет собой тетрамер, состоящий из двух α- и двух β-субъединиц. Е₁ катализирует декарбоксилирование пировиноградной кислоты с участием кофермента тиаминпирозинфосфата (ТПФ). Продукт реакции (гидроксиэтильное производное ТПФ) под действием дигидролипоилацетилтрансферазы реагирует с окисленной липоевой кислотой, при этом образуется ацетиллипоевая кислота. Липоевая кислота (липоат) — кофермент Е₂. Она прочно соединена амидной связью через ε-аминогруппу остатка лизина, входящего в состав этого фермента. При прикреплении липоата к лизину образуется своеобразный «длинный рукав», который может перемещаться из активного центра Е₁ в активные центры Е₂ и Е₃.

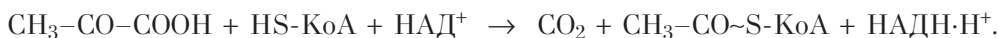
Сама липоевая кислота — это низкомолекулярное соединение, имеющее в своем составе дисульфидную группу, способную восстанавливаться. Липоевая кислота выполняет роль переносчика электронов, протонов и ацильных групп.



Образовавшаяся ацетиллипоевая кислота далее реагирует с коэнзимом А, при этом образуются восстановленная форма липоевой кислоты и ацетил-КоА.

Следующий этап катализирует дигидролипоилдегидрогеназа. Коферментом Е₃ фермента является ФАД. С участием ФАД дигидролипоевая кислота окисляется, а ФАД переходит в восстановленную форму. Два атома водорода с ФАДН₂ переносятся на митохондриальный НАД⁺, последний при этом восстанавливается до НАДН·Н⁺.

Таким образом, суммарное уравнение окислительного декарбоксилирования пирувата имеет вид



* Липоевая кислота (тиоктовая кислота) как лекарственное средство группы витаминоподобных веществ оказывает *липотропное* и *гепатопротекторное* действие. Обладает антиоксидантными свойствами. Входит в состав поливитаминового препарата «Компливит».

Этот процесс сопровождается значительным уменьшением стандартной свободной энергии ($\Delta G^{0'} = -8$ кДж/моль), что указывает на его необратимость в физиологических условиях. Образующийся ацетил-КоА затем окисляется в цитратном цикле, а водород с НАДН·Н⁺ поступает в дыхательную цепь митохондрий.

Регуляция активности пируватдегидрогеназного комплекса. Активность ПДГК регулируется различными способами: доступностью субстратов, ингибированием продуктами реакции, путем ковалентной модификации, соотношением НАД⁺/НАДН·Н⁺ и АДФ/АТФ.

Фосфорилирование — дефосфорилирование является основным механизмом, контролирующим активность пируватдегидрогеназного комплекса у млекопитающих путем *ковалентной модификации*. ПДГК может существовать в активной и неактивной формах. Переход одной формы в другую осуществляется путем обратимого фосфорилирования (с участием киназы ПДГК), и дефосфорилирования (с участием фосфатазы ПДГК). При этом фосфорилированная форма является неактивной, а дефосфорилированная — активной. Активация ПДГК происходит под влиянием инсулина.

При низкой концентрации инсулина и высоком уровне энергообеспеченности клетки (высокое содержание АТФ, ацетил-КоА и НАДН·Н⁺) ПДГК находится в неактивном состоянии. Активирование комплекса осуществляется HS-КоА, пируватом, АДФ и ионами магния.

При недостаточном содержании в диете витамина В₁, В₂, РР активность пируватдегидрогеназного комплекса снижается.

4.8.2. Цикл трикарбоновых кислот — центральный путь обмена веществ

Образовавшийся в результате окислительного декарбоксилирования пирувата ацетил-КоА в матриксе митохондрий включается в циклический процесс — *цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса, цикл лимонной кислоты, ЦТК)*, в ходе которого ацетильные остатки окисляются до СО₂. Свое название этот метаболический путь получил по имени немецкого биохимика Г. Кребса, открывшего и изучившего его.

Всего в ЦТК входит восемь реакций (рис. 4.4). Четыре из них представляют собой окислительные процессы, и выделяющаяся в этих процессах энергия окисления эффективно запасается в виде восстановленных коферментов НАДН·Н⁺ и ФАДН₂.

Рассмотрим подробнее реакции (этапы) цикла Кребса.

1. *Образование лимонной кислоты.* Цикл Кребса начинается с конденсации ацетильного остатка ацетил-КоА с оксалоацетатом. Реакция катализируется *цитратсинтазой* с участием воды. Поскольку при этом распадается богатая энергией тиоэфирная связь ацетил-КоА, реакция становится практически необратимой.

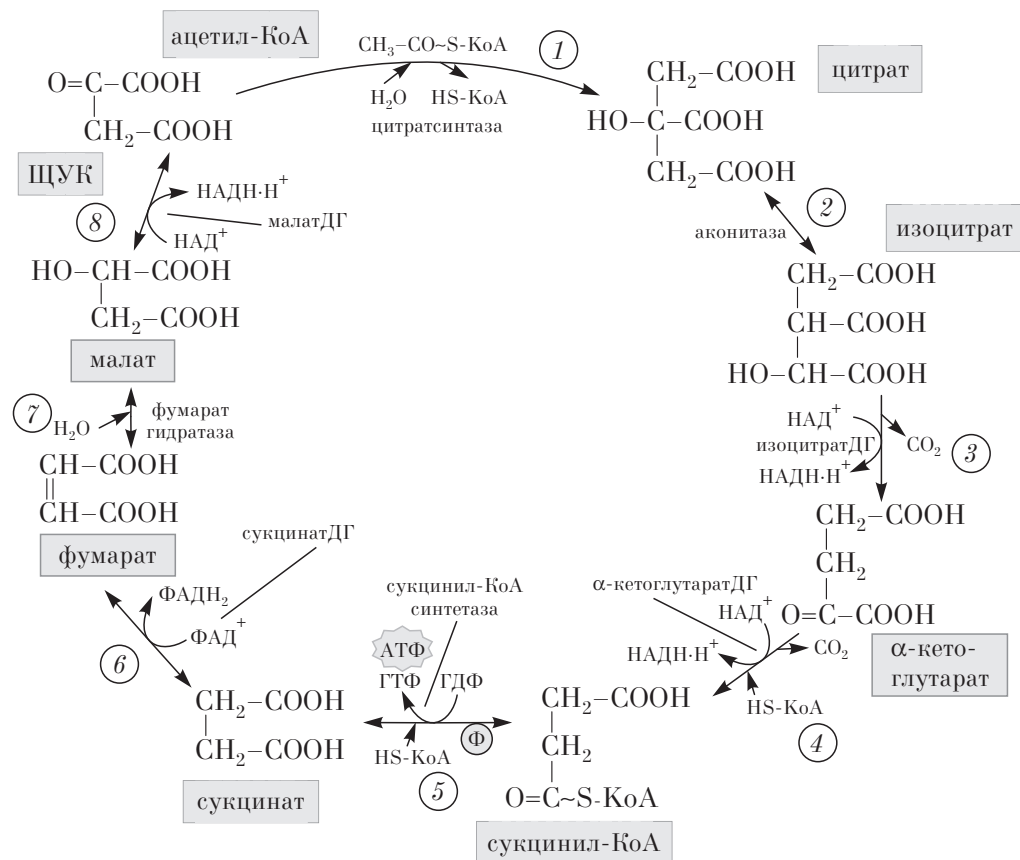


Рис. 4.4. Цикл трикарбоновых кислот (1–8 — номера реакций)

2. *Образование изоцитрата ферментом аконитазой, содержащей железо* (через стадию образования *цис*-аконитовой кислоты). Это реакция изомеризации, она обратима, однако в физиологических условиях ее равновесие смещено в сторону образования изоцитрата, поскольку он расходуется в последующих реакциях.

3. *Дегидрирование и декарбоксилирование изоцитрата* при участии НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы. Фермент для проявления своей активности нуждается в ионах Mg^{2+} или Mn^{2+} .

4. *Окислительное декарбоксилирование α -кетоглутарата*. Процесс катализируется α -кетоглутаратдегидрогеназным комплексом, который по структуре и механизму действия очень похож на пируватдегидрогеназный комплекс (функционирует с теми же коферментами: ТПФ, липоевой кислотой, CoA-SH , ФАД и NAD^+).

В результате реакции образуется аналог ацетил-КоА — *сукцинил-КоА*. Этот субстрат цикла Кребса содержит макроэргическую связь. Равновесие

реакции сильно сдвинуто в сторону образования сукцинил-КоА, т.е. ее можно считать необратимой.

5. *Субстратное фосфорилирование* — перенос богатой энергией связи сукцинил-КоА осуществляется на гуанозиндифосфате (ГДФ). Процесс субстратного фосфорилирования катализирует сукцинил-КоА-синтетаза. Образовавшийся ГТФ вступает в реакцию перефосфорилирования с АДФ, при этом образуется АТФ.

6. *Дегидрирование сукцината* при помощи ФАД-зависимого фермента — сукцинатдегидрогеназы. В этой реакции осуществляется прямой перенос водорода с субстрата (сукцината) на 2-й комплекс дыхательной цепи митохондрий. В результате дегидрирования образуется фумарат.

7. *Образование яблочной кислоты*. Фумараза катализирует присоединение молекулы воды по месту нахождения двойной связи фумарата.

8. *Образование оксалоацетата*. Это завершающая стадия цикла Кребса, в которой происходит регенерация оксалоацетата (щавелевоуксусной кислоты, ЩУК) путем окисления малата. Реакция катализируется НАД⁺-зависимым ферментом — малатдегидрогеназой.

Последние три реакции *обратимы*, однако поскольку НАДН·Н⁺ окисляется ферментным комплексом дыхательной цепи, равновесие реакции сдвигается вправо, т.е. в сторону образования оксалоацетата.

В результате полного оборота цикла одна молекула ацетил-КоА окисляется до двух молекул СО₂. Молекула оксалоацетата регенерируется, а электроны от восстановленных коферментов НАДН·Н⁺ и ФАДН₂ поступают в дыхательную цепь, где происходит их окисление. Высвобождающаяся при этом энергия используется для образования АТФ путем окислительного фосфорилирования. Еще одна молекула АТФ синтезируется в цикле в результате субстратного фосфорилирования.

Регуляция скорости реакций цикла Кребса. В большинстве случаев скорость функционирования метаболических циклов определяется их начальными реакциями. Регуляция цикла Кребса осуществляется на уровне цитратсинтазы, изоцитратдегидрогеназы и α-кетоглутаратдегидрогеназного комплекса. Важнейшая регуляторная реакция ЦТК — образование цитрата из оксалоацетата и ацетил-КоА, катализируемая *цитратсинтазой*. Эта реакция ускоряется при повышении концентрации оксалоацетата — субстрата реакции — и тормозится продуктом реакции — цитратом. Когда отношение НАДН·Н⁺/НАД⁺ снижается, скорость окисления малата в оксалоацетат возрастает. Скорость реакции снижается при повышении концентрации АТФ, сукцинил-КоА (сукцинил-КоА понижает сродство цитратсинтазы к ацетил-КоА).

Изоцитратдегидрогеназа аллостерически активируется АДФ и Са²⁺, которые присоединяются к ферменту в разных аллостерических центрах. В присутствии АДФ конформация всех субъединиц меняется таким образом, что связывание изоцитрата происходит значительно быстрее. При повышении концентрации НАДН·Н⁺ активность фермента снижается.

α -Кетоглутаратдегидрогеназный комплекс ингибируется АТФ, НАДН·Н⁺ и сукцинил-КоА и, как изоцитратдегидрогеназа, активируется Са²⁺.

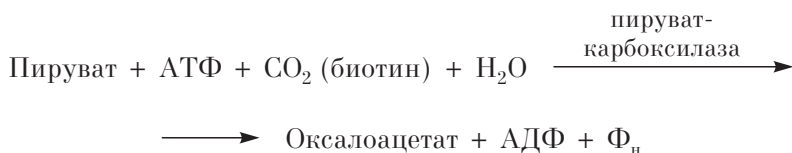
Кроме описанных механизмов, в регуляции цитратного цикла существует множество других, обеспечивающих необходимый уровень метаболитов. Скорость гликолиза в нормальных условиях согласована со скоростью функционирования цикла лимонной кислоты. В клетке до пирувата расщепляется ровно столько глюкозы, сколько необходимо для того, чтобы обеспечить цикл лимонной кислоты исходным субстратом, т.е. ацетил-КоА.

Функции цикла трикарбоновых кислот. Цикл лимонной кислоты — это один из амфиболических путей. *Амфиболическими* (от греч. amfi — оба) называют пути, сопрягающие процессы анаболизма и катаболизма, поскольку они выполняют двойную функцию.

В цикле трикарбоновых кислот завершают свой путь продукты распада глюкозы, жирных кислот, кетогенных аминокислот. Все они превращаются в ацетил-КоА, α -кетоглутаровую кислоту и оксалоацетат (*катаболическая функция*).

Некоторые промежуточные продукты цикла лимонной кислоты, такие как α -кетоглутарат, сукцинат, оксалоацетат, в качестве молекул-предшественников могут использоваться для синтеза других соединений: оксалоацетат — глюкозы, аспарагиновой кислоты и аспарагина; сукцинил-КоА — порфиринов и гема; α -кетоглутарат — глутаминовой кислоты, глутамина, аргинина и пролина; ацетил-КоА — жирных кислот, холестерина, стероидных гормонов, кетоновых тел. В этом состоит *анаболическая функция* цикла трикарбоновых кислот. Убыль промежуточных продуктов цикла на биосинтетические процессы восполняется благодаря анаплеротическим реакциям.

Анаплеротические (пополняющие) реакции — специальные ферментативные реакции, обеспечивающие пополнение пула промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты. Этот цикл начинается с реакции конденсации ацетил-КоА с оксалоацетатом. Клетка не страдает от недостатка ацетил-КоА, а вот количество оксалоацетата в клетке ограничено. Наиболее важная анаплеротическая реакция в животных тканях — ферментативное карбоксилирование пирувата за счет СО₂ с образованием оксалоацетата. Катализирует эту реакцию биотинзависимый фермент пируваткарбоксилаза:



Пируваткарбоксилаза принадлежит к регуляторным ферментам. В отсутствие ацетил-КоА, который служит для нее активатором, скорость катализируемой ею прямой реакции образования оксалоацетата очень невелика. Избыток же ацетил-КоА, поставляющего «топливо» для цикла лимонной кислоты,

стимулирует пируваткарбоксилазную реакцию. В результате образуется больше оксалоацетата и цикл использует больше ацетил-КоА в цитратсинтазной реакции.

Цикл Кребса выполняет собственно *энергетическую функцию*. Распад сукцинил-КоА до сукцината является реакцией субстратного фосфорилирования. В ходе этой реакции образуется одна молекула ГТФ (реакция перефосфорилирования ГТФ с АДФ приводит к образованию АТФ).

Водороддонорная функция заключается в том, что в цитратном цикле в результате окисления НАД⁺-зависимых (изоцитрат, α-кетоглутарат и малат) и ФАД-зависимого (сукцинат) субстратов образуется три молекулы НАДН·Н⁺ и одна молекула ФАДН₂, которые являются основными донорами водорода для дыхательной цепи. Энергия переноса водорода используется для синтеза АТФ (см. главу 5). При этом за счет окисления трех молекул НАДН·Н⁺ способно синтезироваться $2,5\text{АТФ} \cdot 3 = 7,5$ моль АТФ, за счет окисления одной молекулы ФАДН₂ — 1,5 моль АТФ. Следовательно, водороддонорная функция цикла Кребса обеспечивает 9 молекул АТФ, а с учетом субстратного фосфорилирования — 10 молекул АТФ (9 + 1).

Биоэнергетика

Биоэнергетика — раздел биохимии, изучающий биохимические механизмы, приводящие к генерации различных форм биологической энергии, процессы превращения и запасаения энергии в живых системах.

Многие лекарственные вещества, влияя на образование энергии, способны изменять биоэнергетику клеток, что обуславливает их применение в лечебных целях.

5.1. АТФ — универсальный макроэрг в клетках

Биологические молекулы, которые способны накапливать и передавать энергию в ходе реакции, называются *высокоэнергетическими* или *макроэргами*.

Участвующее в реакции вещество считают богатым энергией, если убыль свободной энергии составляет величину, превышающую 5 ккал/моль ($\Delta G^{0'} = -25$ кДж/моль). В природе встречается много различных макроэргических соединений. По химическому строению это чаще всего ангидриды фосфорной кислоты и карбоновых кислот, а также тиоэфиры: креатинфосфат, фосфоенолпируват, 1,3-дифосфоглицерат, нуклеозиддифосфорные и нуклеозидтрифосфорные кислоты (АТФ, АДФ, ГТФ, ГДФ и др.), ацетил-КоА и сукцинил-КоА (табл. 5.1).

Таблица 5.1

Стандартная свободная энергия некоторых фосфорилированных соединений и тиоэфира (ацетил-КоА)

Соединение	$\Delta G^{0'}$ (ккал/моль)	$\Delta G^{0'}$ (кДж/моль)
Фосфоенолпируват	-14,8	-61,9
1,3-Дифосфоглицерат	-11,8	-49,3
Креатинфосфат	-10,3	-43,0
АТФ \rightarrow АМФ + Φ_{Π}	-10,9	-45,6
АДФ \rightarrow АМФ + Φ_{Π}	-7,8	-32,8
Ацетил-КоА	-7,5	-31,4
АТФ \rightarrow АДФ + Φ_{Π}	-7,3	-30,5
Глюкозо-1-фосфат	-5,0	-20,9

Окончание табл. 5.1

Соединение	$\Delta G^{0'}$ (ккал/моль)	$\Delta G^{0'}$ (кДж/моль)
Пирофосфат (ФФ_n)	-4,0	-19,2
Фруктозо-6-фосфат	-3,8	-15,9
Глюкозо-6-фосфат	-3,3	-13,8

Аденозинтрифосфат (АТФ) в термодинамической шкале занимает промежуточное положение, но именно этот нуклеотид присутствует во всех живых клетках, является универсальным носителем химической энергии, запасенной в макроэргических связях (в молекуле АТФ их две, и обе — фосфоангидридные), и используется для ее передачи между различными химическими реакциями (рис. 5.1).

АТФ обладает высоким потенциалом переноса фосфатных групп на низкоэнергетические вещества (глюкоза, глицерол, аминокислоты). Получая фосфатную группу от АТФ, эти молекулы увеличивают уровень своей свободной энергии, что обеспечивает течение ряда ферментативных реакций и клеточных процессов. С другой стороны, макроэрги, которые имеют больший энергетический потенциал, чем АТФ (например, фосфоенолпируват, креатинфосфат, 1,3-дифосфоглицерат), могут переносить свою фосфатную группу на АДФ с образованием АТФ (рис. 5.2).

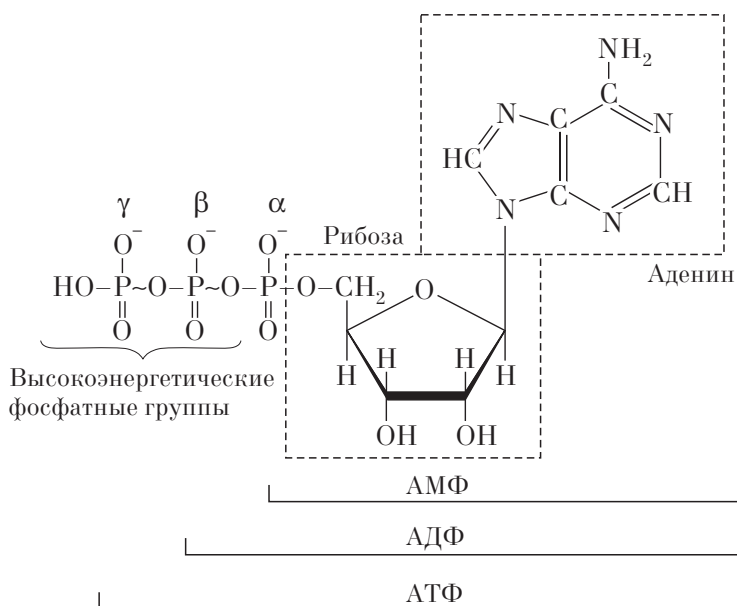


Рис. 5.1. Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ).

Две макроэргические связи (β и γ) обозначены на рисунке знаком ~

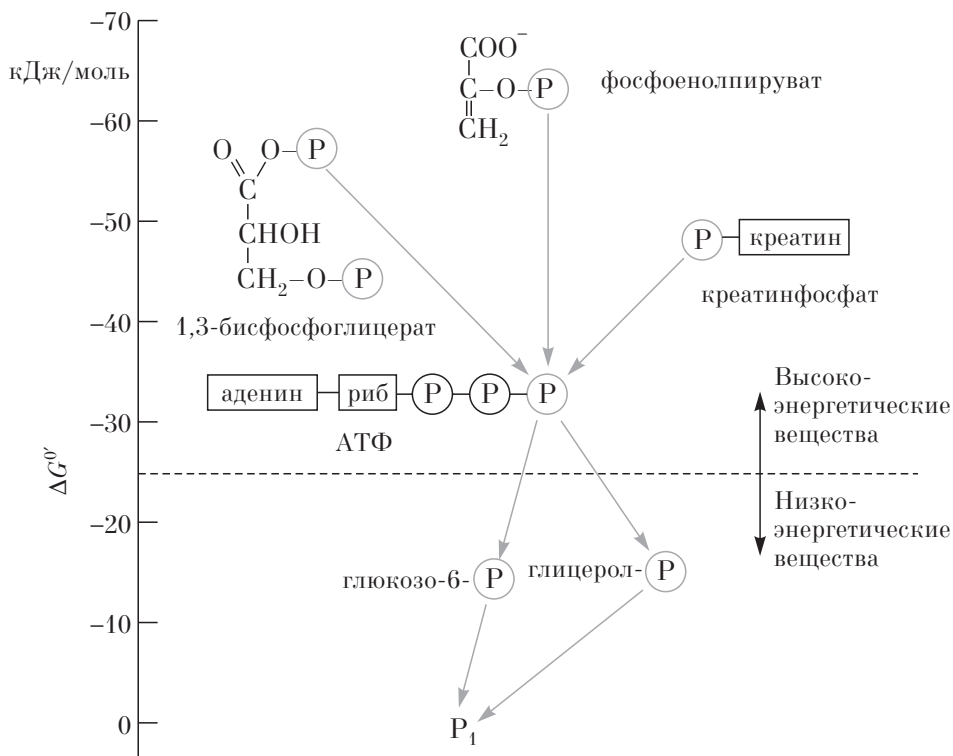


Рис. 5.2. Перенос фосфатных групп от высокоэнергетических соединений через АТФ к соединениям-акцепторам с образованием низкоэнергетических фосфорилированных продуктов

Этим объясняется уникальность молекулы АТФ и ее биологическая роль посредника при переносе фосфатных групп от высокоэнергетических фосфорилированных соединений к акцепторным молекулам. Однако в АТФ следует видеть только носителя энергии, а не ее депо. Для длительного хранения энергии служат такие вещества, как нейтральные жиры или гликоген.

Практически все живые существа на планете для получения энергии приспособились подвергать гидролизу одну из макроэргических связей АТФ. Этот процесс может происходить двумя способами.

Наиболее частый — *отщепление концевой фосфата* от молекулы АТФ:



Процесс происходит при участии аденозинтрифосфатаз (АТФаз) — ферментов класса гидролаз, широко распространенных в клетках всех организмов. Отщепившаяся фосфатная группа остается в клетке в виде неорганического фосфата. Выход свободной энергии при этой реакции составляет 7,3 ккал на 1 моль АТФ.

Второй способ освобождения энергии фосфатной связи — пирофосфатный, когда от АТФ отщепляется не одна концевая фосфатная группа, а две последние, в виде пирофосфата:



Образующийся пирофосфат тоже содержит запас свободной энергии ($\Delta G^{0'} = -4,0$ ккал/моль) и быстро гидролизуется пирофосфатазами до ортофосфата. Энергия, высвобождающаяся при его гидролизе, рассеивается в виде тепла. Этот способ используется реже.

Количество АТФ в клетке в любой данный момент очень невелико и может обеспечить энергией работу клетки лишь на несколько секунд, но АТФ постоянно регенерируется из АДФ и неорганического фосфата. Благодаря этому производится такое количество АТФ, которое было израсходовано клеткой. Клетки весьма чувствительны к уровню АТФ. Как только скорость его использования возрастает, увеличивается и скорость процессов, поддерживающих уровень АТФ.

Содержание АТФ в клетке непосредственно связано с содержанием других адениловых нуклеотидов — АМФ, АДФ, а также пирофосфата ($\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$) и неорганического фосфата (H_3PO_4), образующих адениловую систему клетки. Роль адениловой системы сводится к поддержанию необходимого количества АТФ в клетках за счет процессов его распада и синтеза. В течение суток одна молекула АТФ проходит в среднем 2500 циклов ресинтеза.

Образование АТФ из АДФ и неорганического фосфата называют реакцией *фосфорилирования*:



Эта реакция происходит при условии обеспечения ее энергией в количестве не менее 30–35 кДж/моль. Если для фосфорилирования используется энергия транспорта электронов по дыхательной цепи, то говорят об *окислительном фосфорилировании*. Процесс называют *фотосинтетическим фосфорилированием*, если для синтеза АТФ используется световая энергия (имеет место при фотосинтезе у фотосинтезирующих организмов). *Субстратное фосфорилирование* происходит за счет гидролиза связи макроэргических соединений (субстратов).

Реакции субстратного фосфорилирования являются важным источником получения АТФ, особенно в анаэробных условиях. Например, к таким реакциям относятся реакции гликолиза, когда из молекулы 1,3-дифосфоглицерата, содержащей макроэргическую связь в 1-м положении, на молекулу АДФ переносится остаток фосфорной кислоты и образуется молекула АТФ (рис. 5.3, а).

Еще одна реакция субстратного фосфорилирования активно протекает в мышцах в процессе мышечного сокращения и катализируется креатинфосфокиназой (рис. 5.3, б).

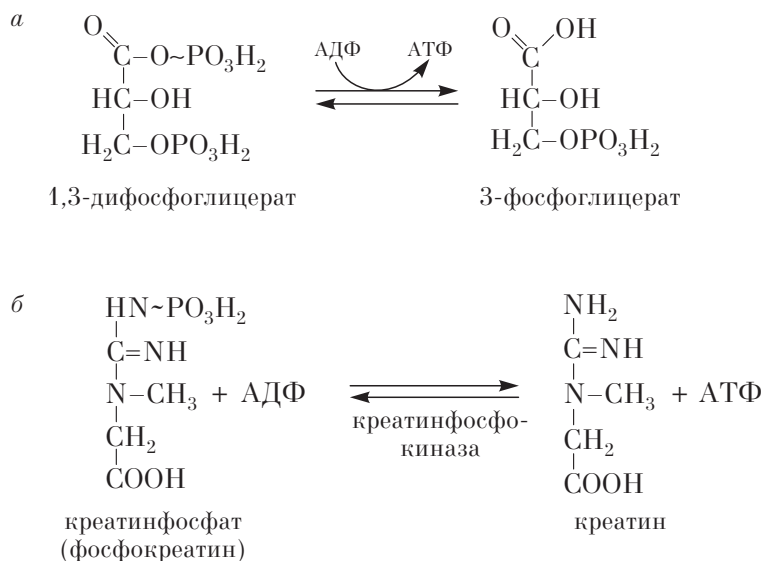


Рис. 5.3. Реакции субстратного фосфорилирования:

а — гликолиз; *б* — гидролиз креатинфосфата

Эта реакция обратима. В покое идет образование креатинфосфата из АТФ и креатина, а в процессе мышечной работы накопленный креатинфосфат отдает остаток фосфорной кислоты на АДФ с образованием АТФ, необходимого для процессов мышечного сокращения.

Однако основная масса АТФ в клетке образуется в ходе окислительного фосфорилирования в митохондриях за счет функционирования H^+ -АТФ-синтазы, использующей энергию переноса электронов по дыхательной цепи, которая освобождается при дегидрировании субстратов.

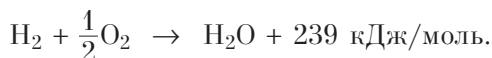
В клетках АТФ служит непосредственным источником энергии для множества энергозатратных биохимических и физиологических процессов, таких как синтез веществ, активный перенос молекул через биологические мембраны (транспортные АТФазы) и создание трансмембранного электрического потенциала, мышечное сокращение, активация молекул, передача наследственной информации и превращение в другие виды энергии (электрическая, люминесценция). В состоянии покоя 36 % образовавшегося АТФ расходуется на ферментативные реакции, 22 % — на работу Na^+/K^+ -АТФазы, 21 % — на биосинтез белка, 11 % — на мышечное сокращение и 10 % — на перенос ионов кальция через биологические мембраны.

Аденозинтрифосфат натрия используется в медицинской практике в качестве лекарственного препарата, улучшающего энергообеспечение тканей при мышечной дистрофии, атонии, а также при заболеваниях периферических и коронарных сосудов.

5.2. Тканевое дыхание

Тканевое дыхание — это последовательность окислительно-восстановительных реакций, протекающих во внутренней митохондриальной мембране с участием ферментов дыхательной цепи.

Реакции прямого взаимодействия между кислородом и водородом в небиологических условиях (*in vitro*) сопровождаются взрывообразным выделением энергии в виде тепла и света:



В клетке реакция в таком виде невозможна.

В живом организме реакция окисления водорода кислородом с образованием воды протекает в митохондриях клеток. Она начинается с отрыва атомов водорода от субстрата и заканчивается переносом электронов на кислород, поступающий с вдыхаемым воздухом. Выделяющаяся при этом энергия рассеивается в виде тепла и запасается в макроэргических связях молекулы АТФ.

Отличиями реакции биологического окисления, т.е. протекающей в живом организме, от реакции окисления в неживой природе (*in vitro*) являются:

- постепенное или поэтапное выделение энергии (это достигается за счет дробления процесса окисления на ряд промежуточных стадий);
- окисление в дыхательной цепи не молекулярного водорода, а водорода, включенного в состав субстратов;
- энергия не только выделяется в виде тепла, но и запасается в макроэргических связях молекулы АТФ и аккумулируется в виде электрохимического потенциала;
- участие в реакциях тканевого дыхания ферментов оксидоредуктаз.

5.3. Дыхательная цепь переноса электронов

Дыхательная цепь переноса электронов представляет собой систему структурно и функционально связанных белков и переносчиков электронов, объединенных в дыхательные комплексы, которые встроены во внутреннюю мембрану митохондрий (рис. 5.4). Принцип ее работы состоит в следующем:

1) восстановленные в реакциях катаболизма коферменты НАДН·Н⁺ и ФАДН₂ окисляются, передавая атомы водорода (протоны и электроны) в цепь переноса электронов митохондрий;

2) перенос электронов сопровождается высвобождением энергии, которая используется для выхода ионов Н⁺ из матрикса в межмембранное пространство. Тем самым создается протонный градиент (ΔμН⁺);

3) электроны переносятся с помощью компонентов ферментативных комплексов тканевого дыхания на кислород и восстанавливают его до воды;

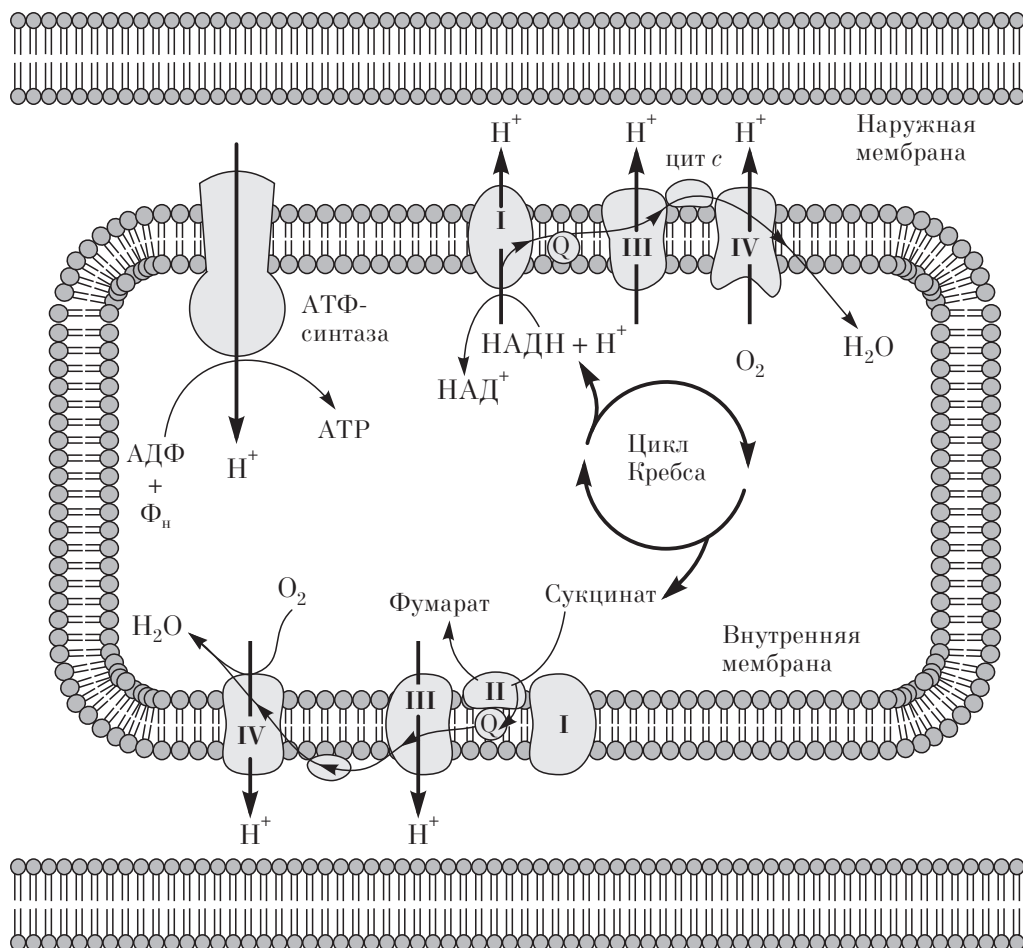


Рис. 5.4. Ферментативные комплексы тканевого дыхания во внутренней мембране митохондрий (I–IV — мультиферментные комплексы, подробнее см. на с. 143–144)

4) ионы H^+ возвращаются обратно в матрикс через протонный канал АТФ-синтазы. За счет этого фермент катализирует синтез АТФ.

5.3.1. Компоненты дыхательной цепи

В переносе электронов и водорода принимают участие ферменты, кофакторы, простетические группы и транспортные системы, которые погружены в двойной липидный слой митохондриальной мембраны. Различают четыре основных типа переносчиков электронов в дыхательной цепи, каждый из которых способен претерпевать обратимое окисление и восстановление в результате потери и присоединения электронов при взаимодействии с другим переносчиком.

Первый тип переносчиков представлен *флавиновыми коферментами* ФМН и ФАД, которые участвуют в передаче электронов и протонов.

Второй тип — *железосерные белки* (*FeS-белки*), переносящие только электроны (80 % железа в цепи тканевого дыхания содержится в FeS-белках и только 20 % — в цитохромах). Отличительной особенностью FeS-белков является сложноорганизованное строение их активного центра, который содержит негемовое железо, нековалентно связанное с атомом серы в составе аминокислоты белкового компонента цистеина и еще с одним атомом серы вне структуры цистеина. Известны Fe_2S_2 -центры, Fe_3S_3 - и Fe_4S_4 -центры (рис. 5.5).

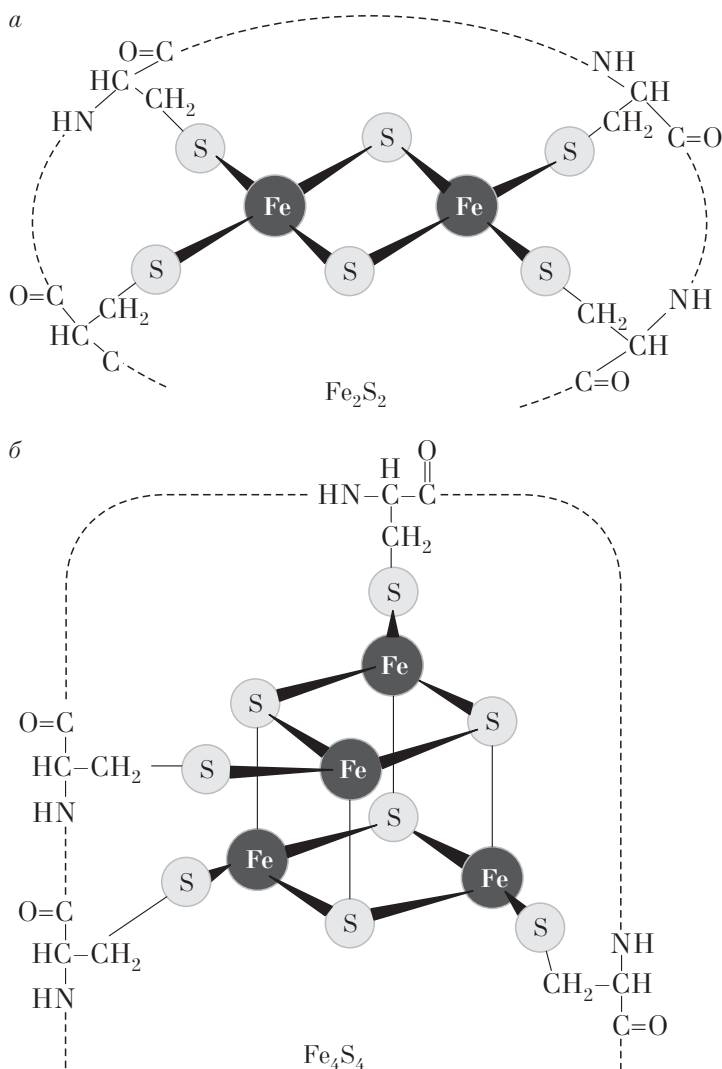


Рис. 5.5. Строение железосерных центров в цепи ферментов тканевого дыхания

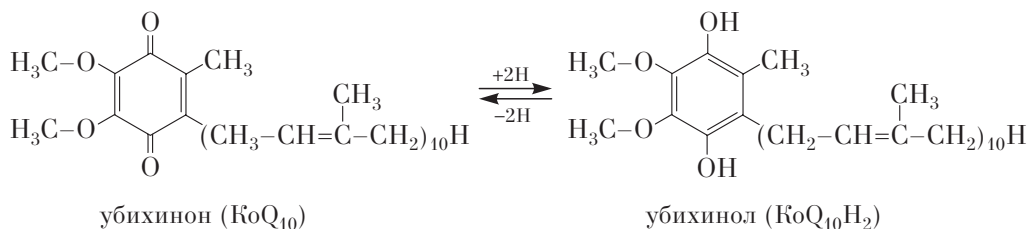


Рис. 5.6. Схема реакции полного восстановления убихинона

В составе Fe_4S_4 -центра имеются четыре атома железа, которые связаны с четырьмя атомами серы и четырьмя остатками цистеина. В составе Fe_2S_2 -центров каждый из двух атомов железа связан координационными связями с двумя атомами «неорганической» серы и двумя остатками цистеина.

Белки, имеющие Fe_2S_2 -центры, содержатся в нескольких ферментных комплексах дыхательной цепи. Атомы железа в FeS -центрах могут находиться в окисленном (Fe^{3+}) или восстановленном (Fe^{2+}) состоянии. В зависимости от особенностей строения FeS -центров железосерные белки могут одновременно переносить один или несколько электронов.

Третий тип переносчиков представлен *убихиноном* — небелковым переносчиком электронов и протонов. Убихинон (коэнзим Q, KoQ) представляет собой небольшую молекулу (производное бензохинона) с длинной боковой цепью связанных между собой изопrenoидных группировок. У млекопитающих их

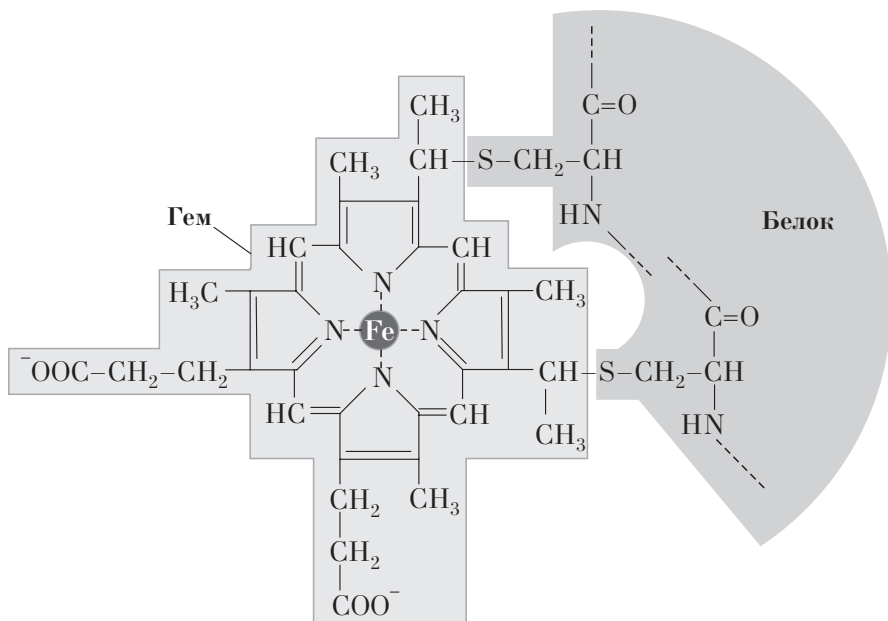


Рис. 5.7. Простетическая группа цитохромов c_1 и c

десять, поэтому используется обозначение KoQ_{10} . При одноэлектронном восстановлении он превращается в семихинон (органический свободный радикал), при полном восстановлении присоединяет два электрона и два протона, образуя гидрохиноновую форму KoQH_2 (рис. 5.6).

Хорошая растворимость в липидной фазе и относительно небольшой молекулярный вес придают KoQ свойство подвижного переносчика, способного легко перемещаться в неполярном слое внутренней митохондриальной мембраны и взаимодействовать с фиксированными электронпереносящими белками.

Четвертый тип представлен группой различных гемсодержащих белков (гемопротеинов), называемых *цитохромами*. Они переносят только электроны.

Цитохромы представлены пятью основными группами: b , c_1 , c , a , a_3 , которые различаются не только белковой частью, но и особенностями своих простетических групп, близких по строению к гему гемоглобина (рис. 5.7).

5.3.2. Структурная организация цепи переноса электронов

Все переносчики протонов и электронов структурно объединены в четыре мультиферментных комплекса дыхательной цепи. Название комплекса, переносящего электроны, складывается из названия *донора* протонов и электронов и названия *акцептора*.

- I комплекс — НАДН· H^+ -убихинон-оксидоредуктаза (КФ 1.6.5.3);
- II комплекс — сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза (КФ 1.3.5.1);
- III комплекс — убихинол-цитохром c -оксидоредуктаза (КФ 1.10.2.2);
- IV комплекс — цитохром c - O_2 -оксидаза (КФ 1.9.3.1).

I комплекс дыхательной цепи (НАДН· H^+ -убихинон-оксидоредуктаза) представляет собой сложный полиферментный комплекс с молекулярной массой 850 тыс. а.е.м. Он содержит более 20 различных белков. В его состав входят кофермент ФМН и железосерные белки ($2\text{Fe}_2\text{S}_2$ и $4\text{Fe}_4\text{S}_4$).

II комплекс дыхательной цепи (сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза) отличается меньшей молекулярной массой (125 тыс. а.е.м.). Коферментом комплекса является ФАД. Комплекс содержит железосерные белки (Fe_2S_2 , Fe_3S_4 , Fe_4S_4).

Небелковый переносчик KoQ представляет собой «узловой пункт», куда стекаются атомы водорода, поступающие в дыхательную цепь от различных субстратов. Возможно, поэтому его концентрация в дыхательной цепи выше, чем других переносчиков электронов.

III комплекс дыхательной цепи (убихинол-цитохром c -оксидоредуктаза). Молекулярная масса комплекса составляет 400 кДа. Он содержит железосерные белки ($2\text{Fe}_2\text{S}_2$) и цитохромы b и c_1 .

IV комплекс дыхательной цепи (цитохромоксидаза) способен непосредственно реагировать с кислородом. Это сложный гемопrotein с молекулярной массой 200 кДа, состоящий из 7 полипептидных цепей и двух различных гемов a -типа (цитохромы a и a_3). Гем ковалентно связан с апобелком (через SH-группы цис-14, цис-17). В отличие от других комплексов, цитохромоксидаза,

помимо железа, содержит два атома меди. Медь при транспорте электронов также попеременно переходит в окисленное (Cu^{2+}) и восстановленное (Cu^+) состояние.

Коэнзим Q и цитохром *c* — мобильные переносчики электронов дыхательной цепи. Все другие белковые переносчики — интегральные белки — занимают в мембране строго фиксированное положение и ориентированы определенным образом: цитохром c_1 расположен в липидном слое ближе к наружной поверхности внутренней мембраны, а активный центр цитохрома a_3 обращен в матрикс. Такое расположение цитохромов позволяет направить поток электронов от наружной поверхности внутренней мембраны митохондрий к ее внутренней поверхности.

Цитохромы переносят электроны последовательно от убихинола на конечный акцептор — кислород.

Порядок расположения комплексов зависит от величины их редокс-потенциала. Каждый из этих комплексов осуществляет перенос электронов от донора к акцептору по градиенту редокс-потенциала, так как система с более низким окислительно-восстановительным потенциалом обладает большей способностью отдавать электроны системе с более высоким потенциалом. Таким образом, все реакции в дыхательной цепи направлены по своеобразной термодинамической лестнице (рис. 5.8) от компонента с наименьшим редокс-потенциалом ($\text{НАДН} \cdot \text{H}^+$, $-0,4$ В) к кислороду, имеющему наибольший редокс-потенциал ($+0,82$ В).

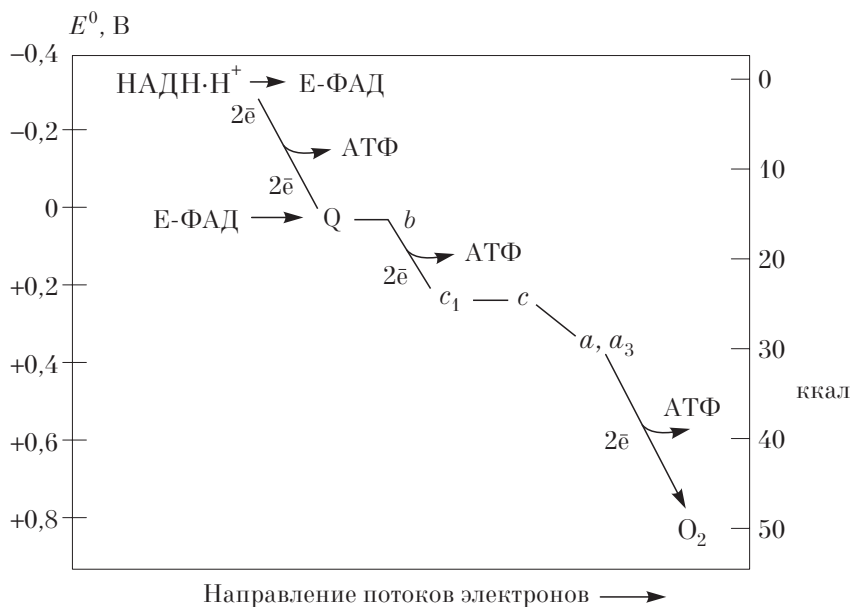


Рис. 5.8. Направление потока электронов в цепи тканевого дыхания по градиенту окислительно-восстановительного потенциала

5.3.3. Функционирование дыхательной цепи

Комплекс I катализирует окисление НАДН·Н⁺. Донорами водорода для этого комплекса дыхательной цепи являются пировиноградная кислота, субстраты цикла Кребса (изоцитрат, α-кетоглутарат, малат), оксипроизводные жирных кислот, глутаминовая и некоторые другие аминокислоты.

Комплекс I принимает электроны и протоны от НАДН·Н⁺. Далее водород (два электрона и два протона) присоединяется к атомам азота изоаллоксазинового кольца ФМН. В ходе последующего окисления восстановленной формы флавиномононуклеотида эти протоны перемещаются на железосерные белки. FeS-белки в составе I комплекса разделяют поток протонов и электронов: протоны перемещаются в межмембранное пространство, электроны передаются на КоQ. Благодаря I комплексу на каждые 2 переносимых электрона в межмембранное пространство перемещается 4 протона (рис. 5.9).

Энергетический потенциал (запас энергии) в молекуле убихинола существенно ниже, чем в молекуле НАДН·Н⁺ (разность редокс-потенциала составляет 0,38 В). Выделяющаяся в результате изменения потенциала энергия временно запасается в виде электрохимического протонного градиента.

Комплекс II принимает электроны и протоны от субстратов и передает их на убихинон. С комплексом II взаимодействует сукцинат, поступающий из матрикса митохондрий, а также находящиеся в матриксе активированные

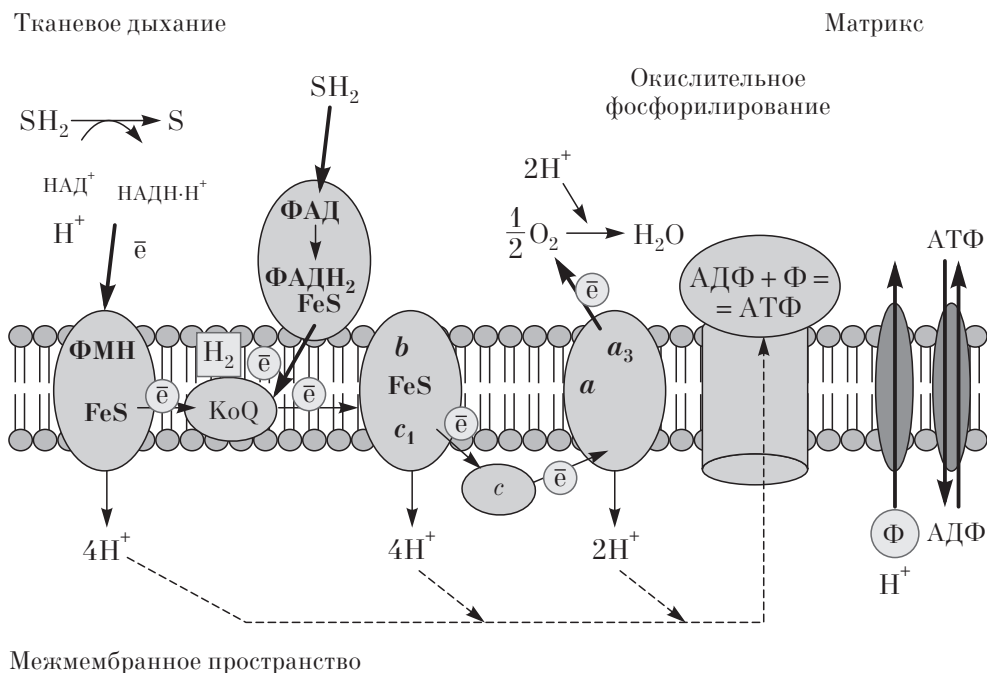
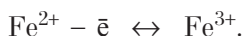


Рис. 5.9. Схема дыхательной цепи

жирные кислоты (ацил-КоА). В результате включения водорода, находившегося в составе субстратов, во II комплекс (ФАД-зависимые дегидрогеназы) энергия в основном рассеивается в виде тепла, так как падение редокс-потенциала на этом участке дыхательной цепи незначительно (около 0,05 В).

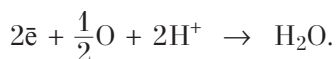
Липофильный характер молекулы убихинона обуславливает его способность свободно перемещаться в липидной фазе митохондриальной мембраны, перехватывая не только протоны и электроны от I и II комплексов дыхательной цепи, но и протоны из матрикса. Восстановленная форма (убихинол, CoQH_2), в свою очередь, передает два электрона III комплексу дыхательной цепи, а протоны при этом высвобождаются в межмембранное пространство.

Работа *III комплекса* заключается в транспорте электронов от убинола на цитохром *c*. Этот процесс осуществляется следующим образом. Вначале электроны поступают на окисленную форму цитохрома *b* (Fe^{3+}), который при этом восстанавливается (Fe^{2+}). Затем восстановленный цитохром *b* передает электроны на FeS-центры, откуда они поступают на цитохром *c*₁, а затем на цитохром *c*. Если на участке НАДН·Н⁺ и КоQ осуществляется двухэлектронный перенос, то цитохромы переносят по одному электрону. Следовательно, на данном участке цепи должны действовать две молекулы цитохромов. При этом происходит обратимое окисление-восстановление атома железа простетической группы:



Ферменты III комплекса способны захватывать из матрикса протоны и переносить их в межмембранное пространство. Подобно комплексу I, на каждые два переносимых электрона в межмембранное пространство перемещаются четыре протона. При этом существенно падает окислительно-восстановительный потенциал (от -0,04 В у цитохрома *b* до +0,25 В у цитохрома *c*).

От III комплекса электроны переносятся на *IV комплекс* при помощи очень подвижного белка — цитохрома *c*. Эта небольшая молекула (масса 12500 а.е.м., содержит 104 аминокислотных остатка) способна активно перемещаться, совершая челночные движения вдоль внешней поверхности мембраны от III к IV комплексу. Цитохром *c* переносит только электроны, попеременно восстанавливаясь и окисляясь. Электроны от цитохрома *c* последовательно переносятся на цитохром *a*, а затем на цитохром *a*₃. Конечным акцептором электронов является молекулярный кислород воздуха. Следует заметить, что эта реакция весьма сложна и протекает через промежуточные стадии образования свободных радикалов кислорода. Четыре электрона от четырех молекул цитохрома *c* используются для восстановления кислорода. Непосредственное восстановление кислорода происходит на цитохроме *a*₃, обращенном к матриксу. Кислород присоединяет два протона из матрикса митохондрий, образуя воду:



В этой реакции кислород, как наиболее сильный окислитель, акцептируя электроны, создает основную движущую силу для переноса электронов по дыхательной цепи, в результате чего переносчики поддерживаются в окисленном состоянии и оказываются способными принимать электроны, поставляемые от окисляемых субстратов.

Энергия, полученная в этом процессе (редокс-потенциал IV комплекса составляет +0,57 В), используется для создания трансмембранного протонного градиента. Из матрикса в межмембранное пространство митохондрий выходят два протона на каждые два переносимых электрона.

5.3.4. Сопряжение тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования

Три комплекса дыхательной цепи (I, III и IV) функционируют как *протонные помпы*, т.е. используют энергию электронов. Они обеспечивают перенос H^+ из матрикса в межмембранное пространство. В результате возникает протонный электрохимический потенциал ($\Delta\mu H^+$). Это происходит на участках дыхательной цепи, где изменение окислительно-восстановительного потенциала ($\Delta E \approx 0,25$ В) достаточно для обеспечения необходимой протондвижущей силы и образования одной макроэргической связи АТФ (эквивалентно затрате энергии 42 кДж/моль). Таким образом, *пункты сопряжения окисления и фосфорилирования* (синтеза АТФ) располагаются между НАДН· H^+ и КоQ ($\Delta E^0 \approx 0,3$ В), между КоQH₂ и цитохромом c_1 ($\Delta E^0 \approx 0,21$ В) и между цитохромом a и цитохромом a_3 ($\Delta E^0 \approx 0,53$ В).

Следует отметить, что синтез АТФ непосредственно в этих комплексах не осуществляется. АТФ синтезируется при участии протонной АТФ-синтазы за счет энергии градиента электрохимического потенциала (μH^+).

Протонный градиент $\Delta\mu H^+$ складывается из $\Delta\Psi$ (электрического потенциала, обусловленного разными зарядами по обе стороны мембраны; на наружной стороне мембраны заряд более положительный, связанный с положительным зарядом протонов) и $\Delta p H^+$ (химического потенциала, обусловленного различной концентрацией протонов по обе стороны мембраны):

$$\Delta\mu H^+ = \Delta\Psi + \Delta p H^+.$$

Энергия электрохимического потенциала используется митохондриями для синтеза АТФ, транспорта субстратов тканевого дыхания и ионов; 30–35 % энергии электрохимического потенциала рассеивается в виде теплоты и используется теплокровными животными на поддержание температуры тела.

5.3.5. Окислительное фосфорилирование — основной механизм синтеза АТФ в клетке

Окислительное фосфорилирование — это механизм синтеза АТФ за счет энергии переноса электронов в дыхательной цепи от субстрата на кислород.

Реакция протекает по уравнению, приведенному на с. 137.

Чтобы понять связь между транспортом электронов по дыхательной цепи и синтезом АТФ, познакомимся с ферментным комплексом, осуществляющим реакцию синтеза АТФ и называемым *протонной АТФ-синтазой* (рис. 5.10).

АТФ-синтаза (протонный насос, АТФаза) является самым крупным структурным компонентом внутренней митохондриальной мембраны, по форме напоминает гриб. Она представлена двумя большими полиферментными белками F_o и F_1 , каждый из которых, в свою очередь, состоит из нескольких неоднородных полипептидов. Белок F_o (нижний индекс «о» происходит от слова «олигомицин») представляет собой протонный канал, пронизывающий толщу внутренней мембраны насквозь. Шаровидная головка на рисунке — F_1 (фактор 1). Он обращен в сторону матрикса митохондрии и заметно выступает из мембраны. Фактор F_1 состоит из 9 субъединиц, представленных пятью типами белков. Полипептидные цепи трех α -субъединиц и трех β -субъединиц уложены в похожие по строению белковые глобулы, которые вместе образуют гексамер, в центре которого находится γ -субъединица, образованная двумя полипептидными цепями, напоминающими стержень длиной около 9 нм. Синтез АТФ из АДФ и фосфата катализирует β -субъединица белка F_1 .

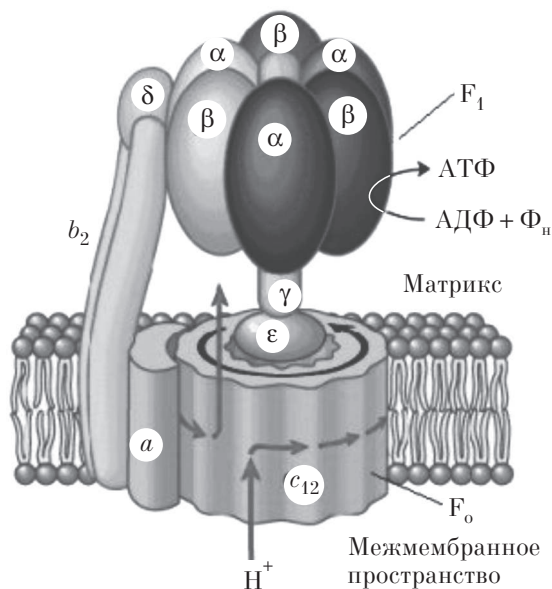


Рис. 5.10. Строение протонной АТФ-синтазы

Поток протонов заставляет вращаться кольцо из c -субъединиц фермента и вызывает вращение γ -субъединицы на 120° против часовой стрелки. При вращении γ -субъединицы происходят конформационные изменения α -, β -протомеров, в результате чего осуществляется синтез АТФ и последующее его высвобождение. В изолированном виде F_1 не может синтезировать АТФ, но может проводить его гидролиз до АДФ и фосфата.

5.3.6. Теория окислительного фосфорилирования

Для объяснения механизма окислительного фосфорилирования английский биохимик П. Митчелл в 1961 г. сформулировал хемиосмотическую теорию, или *теорию окислительного фосфорилирования* (Нобелевская премия, 1978):

1) внутренняя митохондриальная мембрана (ВММ) непроницаема для ионов, в частности для H^+ и OH^- ;

2) за счет энергии транспорта электронов через I, III и IV комплексы дыхательной цепи из матрикса «выкачиваются» протоны;

3) на мембране при «перекачке» протонов создается разница концентрации ионов водорода и возникает электрохимический градиент ($\Delta\mu H^+$), который и есть промежуточная форма запасаания энергии;

4) возвращение (транслокация) протонов в матрикс митохондрии через протонный канал АТФ-синтазы за счет электрохимического градиента ($\Delta\mu H^+$) является движущей силой синтеза АТФ.

Дальнейшие исследования (Дж. Уокер, П. Бойер, Нобелевская премия, 1997) подтвердили предположения Митчелла. Они показали, что энергия движения протонов используется на изменение конформации активного центра АТФ-синтазы, что сопровождается синтезом АТФ, а затем ее высвобождением. Всего на процесс синтеза, высвобождения и выброса в цитозоль АТФ расходуется четыре протона. Роль протонов сводится к подавлению диссоциации фосфата, образованию активной формы фосфорной кислоты, которая реагирует с АДФ, смещая, таким образом, равновесие реакции вправо, т.е. в сторону образования АТФ. Часть протонов расходуется на транспорт синтезированной АТФ из матрикса через митохондриальные мембраны в цитоплазму клетки с помощью транслоказы, а АДФ и фосфата — в обратном направлении. Обычно такой антипорт сопровождается переносом одного протона из межмембранного пространства в матрикс.

5.3.7. Коэффициент фосфорилирования и расчет энергетической ценности окисления различных субстратов

Мерой эффективности дыхания как поставщика энергии для синтеза АТФ, предложенной в 1939 г. В.А. Белицером и Е.Т. Цыбаковой, может служить отношение количества синтезированного АТФ к количеству потребляемого кислорода — коэффициент фосфорилирования.

Коэффициент фосфорилирования (P/O) — это отношение количества неорганического фосфата, включенного в молекулу АДФ, к количеству атомов кислорода, включенных в молекулу H_2O , при переносе одной пары электронов по дыхательной цепи.

Экспериментально установлено, что при окислении НАД-зависимых субстратов из матрикса в межмембранное пространство (ММП) перемещается 10 протонов (см. рис. 5.9). Всего на процесс синтеза и высвобождения в цитозоль АТФ расходуется четыре протона. В таком случае может быть синтезировано 2,5 моль АТФ (10:4), т.е. коэффициент фосфорилирования $P/O = 2,5$.

При окислении *ФАД-зависимых субстратов* в ММП выходит шесть протонов в III и IV пунктах сопряжения. В таком случае может быть синтезировано 1,5 моль АТФ (6:4), т.е. коэффициент фосфорилирования $P/O = 1,5$.

Теперь вернемся к пониманию *энергетической функции цикла Кребса*. В нем происходят четыре реакции дегидрирования, причем три дегидрогеназы цикла Кребса являются НАД⁺-зависимыми и одна — ФАД-зависимой. При окислении трех молекул НАДН·Н⁺ в дыхательной цепи синтезируется 7,5 моль АТФ. Окисление 1 ФАДН₂ ведет к синтезу 1,5 моль АТФ. Помимо этого, в ЦТК имеет место одна реакция субстратного фосфорилирования. Таким образом, энергетический выход окисления ацетил-КоА в цикле Кребса равен 10 моль АТФ (7,5 + 1,5 + 1).

При расчете энергетической ценности окисления, т.е. количества АТФ или коэффициента P/O , необходимо представлять себе весь путь окисления вещества до H_2O и превращения его углеродных атомов в CO_2 . При этом необходимо учитывать число атомов углерода в молекуле. Например, оксалоацетат содержит четыре атома углерода и поэтому его остатку необходимо дважды пройти реакции ЦТК, прежде чем они выделятся в виде CO_2 . Подсчитывая число восстановленных коферментов (НАДН·Н⁺, ФАДН₂) и ГТФ, образуемых в двух «оборотах» ЦТК, определяем количество АТФ — 20 молекул.

5.3.8. Регуляция процесса окислительного фосфорилирования

Скорость работы дыхательной цепи регулируется соотношением АТФ/АДФ, т.е. *энергетическим зарядом клетки*. Стимулятором дыхательной цепи является АДФ. Это имеет большое физиологическое значение, так как увеличение концентрации АДФ в клетке является свидетельством низкой концентрации АТФ (соотношение адениловых нуклеотидов в клетке постоянно), следовательно, указывает на гипозоэнергетическое состояние. Отсюда вытекает и необходимость большего потребления субстратов. Напротив, АТФ — аллостерический ингибитор ферментов тканевого дыхания.

5.3.9. Разобщение окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания

Свободный от синтеза АТФ путь окисления субстратов тканевого дыхания называется *нефосфорилирующим (свободным) окислением*, а сам процесс — *разобщением окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания*. При свободном окислении высвобождающаяся энергия переходит в тепловую и рассеивается.

Разобщение процессов окисления и фосфорилирования может быть вызвано действием ряда веществ, как природных, так и синтетических.

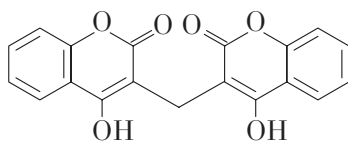
Разобщители — это липофильные вещества, способные связывать и переносить протоны в матрикс митохондрий, минуя протонный канал H^+ -АТФ-синтазы и нарушающие систему сопряжения процессов окисления в дыхательной цепи и синтеза АТФ. Они подавляют окислительное фосфорилирование, но усиливают перенос электронов дыхательной цепью. Выделяющаяся при переносе электронов энергия рассеивается в виде тепла.

Естественные (природные) разобщители: продукты перекисного окисления липидов, жирные кислоты с длинной цепью, белки-термогенины бурой жировой ткани, большие дозы йодсодержащих гормонов щитовидной железы.

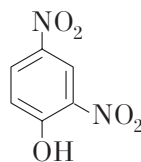
Искусственные разобщители: 2,4-динитрофенол, производные витамина К, антибиотики валиномицин, грамицидин, диэтиловый эфир для наркоза.

По механизму действия разобщители можно разделить на две группы.

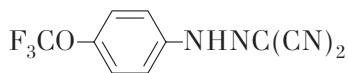
Протонофоры представляют собой слабые гидрофобные органические кислоты, которые связывают протоны и переносят их через митохондриальную мембрану, снижая тем самым трансмембранный градиент ионов водорода и синтез АТФ. К этой группе относятся как естественные разобщители (например, свободные жирные кислоты, продукты перекисного окисления липидов, гормоны щитовидной железы), так и искусственные — салицилаты, дикумарол, 2,4-динитрофенол, пентахлорфенол.



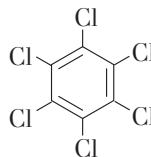
дикумарол



динитрофенол



трифторкарбонилцианид
фенилгидразон



пентахлорфенол

Ионофоры (валиномицин, нигерицин, грамицидин) способны встраиваться в мембрану, образуя канал, по которому могут перемещаться протоны и другие одновалентные катионы — Na^+ или K^+ . В результате также исчезает протонный потенциал ($\Delta\mu\text{H}$) и нарушается синтез АТФ.

В физиологических условиях разобщение может служить одним из механизмов терморегуляции. В организме человека имеется особая ткань — *бурый жир*. Он содержит много митохондрий с большим количеством дыхательных ферментов и разобщающего белка термогенина, который действует подобно ионному каналу, контролирующему проводимость протонов во внутренней митохондриальной мембране. Разобщение окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания в бурой жировой ткани позволяет генерировать тепло для поддержания температуры тела у новорожденных, у животных во время зимней спячки и у всех млекопитающих в процессе адаптации к холоду.

Частичное разобщение окисления и фосфорилирования наблюдается при многих заболеваниях. Так, при гиперфункции щитовидной железы у людей усиливается продукция тироксина. Тироксин уменьшает образование АТФ, одновременно усиливая окисление субстратов в дыхательной цепи и продукцию тепла (в результате повышается температура тела).

5.3.10. Ингибиторы переноса электронов в дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования

Ингибиторы *тканевого дыхания* блокируют комплексы дыхательной цепи, преграждая поток электронов на определенных ее участках (рис. 5.11).

Первая группа препаратов действует на уровне флавопротеинов, переносящих электроны от НАДН· H^+ на КоQ: *ротенон* и барбитураты (*веронал*, *гексенал*, *амитал*, *барбамил* и др.). Ротенон обнаружен во многих видах растений семейства бобовых. Он применяется в сельском хозяйстве в качестве инсек-

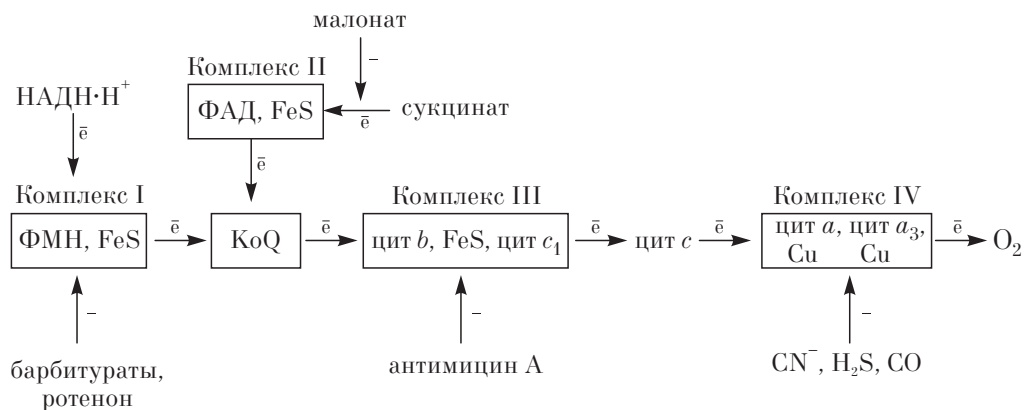


Рис. 5.11. Ингибиторы переноса электронов в дыхательной цепи

тицида. Блокируя комплекс I, барбитураты и ротенон не мешают использованию субстратов (сукцината, ацил-КоА), окисляющихся ФАД-зависимыми дегидрогеназами.

Конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы, которая катализирует отщепление атомов водорода от янтарной кислоты ($\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$), является *малонат* ($\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$). Это соединение присутствует в соке корнеплодов (например, репы, свеклы). В организме человека остаток малоновой кислоты, связанный с коферментом А, является естественным промежуточным продуктом синтеза жирных кислот.

Противогрибковый антибиотик *антимицин а* оказывает токсическое действие на клетки млекопитающих, блокируя перенос электронов между цитохромами *b* и c_1 (III комплекс). В результате такой блокады переносчики, расположенные в дыхательной цепи до цитохрома c_1 , останутся в восстановленном состоянии, тогда как цитохромы c_1 , *a*, a_3 окажутся окисленными. В этих условиях дыхание возможно только в случае поступления электронов и протонов непосредственно на участок цепи после блока. Например, аскорбиновая кислота может окисляться цитохромом *c*.

Цианиды (NaCN , KCN), *азиды* (NaN_3), *угарный газ* блокируют цитохром-оксидазу (IV комплекс) и делают невозможным сам процесс дыхания, т.е. перенос электронов на кислород. Эти вещества вызывают кислородное голодание, хотя кислород присутствует в большом количестве. Ингибиторы цитохром-оксидазы являются сильнейшими ядами, вдыхание HCN или попадание в организм через желудочно-кишечный тракт солей NaCN или KCN вызывает быструю гибель организма в результате связывания цианидным анионом CN^- атома железа в цитохроме a_3 . Монооксид углерода (CO), связываясь с гемом цитохрома a_3 , нарушает его взаимодействие с кислородом.

Ингибиторами **фосфорилирования** являются макролидные антибиотики *олигомицин* и *вентурицидин В* (*аабомицин А2*). Последний обладает противогрибковой активностью. Оба антибиотика не действуют непосредственно на дыхательные комплексы, они ингибируют F_0 -компонент мембранно-связанной АТФ-синтазы, подавляя процесс синтеза АТФ.

Еще одним механизмом нарушения энергообеспечения клетки может быть угнетение митохондриальной транслоказы, обеспечивающей перенос синтезированной АТФ из митохондрий в цитоплазму и АДФ из цитоплазмы в митохондрии по механизму антипорта. Так действует *атрактилозид* — гликозид, выделенный из растения *Distel Atractylis gummifera*, произрастающего в Средиземноморье.

5.4. Гипоэнергетические состояния

Состояния, при которых снижается синтез АТФ, называются *гипоэнергетическими*. При этом страдают все процессы жизнедеятельности, которые протекают с использованием энергии, запасенной в виде макроэргических связей АТФ.

Наиболее распространенная причина гипоэнергетических состояний — *гипоксия тканей*, связанная со снижением концентрации кислорода в воздухе или с нарушением его доставки в клетки, анемиями различного происхождения, нарушением работы сердечно-сосудистой и дыхательной системы. Кроме того, причиной гипоэнергетических состояний могут быть *гиповитаминозы*, связанные с нарушением структурного и функционального состояния ферментных систем биологического окисления, а также *голодание*, которое приводит к резкому снижению содержания субстратов тканевого дыхания.

Ингибиторы, в том числе так называемые дыхательные яды, блокируют перенос электронов через I, II, III, IV комплексы цепи тканевого дыхания. За счет этого они, как и разобщители окислительного фосфорилирования, способствуют развитию гипоэнергетического состояния.

5.5. Лекарственные средства — субстраты и компоненты дыхательной цепи

Многие вещества, в том числе лекарственные средства, могут изменять энергетику клеток, влияя на образование энергии в ходе катаболизма основных питательных веществ. Эти вещества можно разделить на *активаторы* и *ингибиторы* энергетического обмена. Ингибиторы были рассмотрены нами в п. 5.3.10 (ингибиторы дегидрогеназ, ингибиторы переноса электронов, разобщители окислительного фосфорилирования).

К активаторам относятся собственно субстраты биологического окисления: глюкоза, аминокислоты, жирные кислоты, лимонная, яблочная, янтарная кислоты. Их введение в организм в качестве источников атомов водорода в случае нехватки эндогенных субстратов благотворно влияет на процессы окисления и энергопродукции.

При нарушениях биологического окисления положительное влияние оказывает применение составных компонентов дыхательной цепи, например витаминов, в частности никотинамида (витамин РР), рибофлавина (витамин В₂), а также их коферментных форм. Широкое использование получил лекарственный препарат Флавинат, действующим веществом которого является флавинадениндинуклеотид.

Для повышения использования кислорода в тканях при асфиксии новорожденных, астматических состояниях, хронической пневмонии, сердечной

недостаточности, анемиях применяют Убинон (убихинон) и его структурные аналоги (Нобен и др.), а также цитохром *c*, который получают путем экстракции из ткани сердца крупного рогатого скота.

5.6. Пути использования кислорода при биологическом окислении

Организм существует в аэробных условиях, и кислород является одним из активных метаболических соединений в тканях. Существует несколько путей использования кислорода в клетках: оксидазный, оксигеназный и пероксидазный, или путь образования активных форм кислорода.

5.6.1. Оксидазный путь использования кислорода

Этот путь является основным источником АТФ в аэробных тканях: 80 % потребляемого O_2 вовлекается в реакции тканевого дыхания, обеспечивая организм энергией. Известно, что за сутки митохондрии взрослого человека поглощают 400 л O_2 , превращая его в воду с участием цитохромоксидазы. Восстановление кислорода, как рассматривалось выше, протекает по четырехэлектронному пути с образованием H_2O :



5.6.2. Оксигеназный путь использования кислорода

Оксигеназный путь не является источником энергии для клетки. Оксигеназы катализируют реакцию внедрения одного или двух атомов кислорода в субстрат. Вклад этих реакций в общее использование кислорода невелик по сравнению с дыхательными ферментами митохондрий. Оксигеназы участвуют в синтезе новых веществ (стероидных гормонов, желчных кислот, простагландинов), обезвреживании ксенобиотиков и токсических продуктов обмена. Эти ферменты работают в составе мультиферментных комплексов, встроенных в мембрану. По способу включения кислорода в молекулу субстрата их делят на монооксигеназы и диоксигеназы.

Монооксигеназы включают в субстрат один атом кислорода, второй атом кислорода восстанавливается до воды с участием НАДФН· H^+ , НАДН· H^+ , реже витамина С. Монооксигеназные реакции (их называют *микросомальным окислением*) протекают на цитоплазматической поверхности гладкого эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и на внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрии. Монооксигеназы функционируют в комплексе с различными цепями переноса электронов.

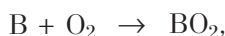
Цепь $\text{НАДФН} \cdot \text{H}^+$ — цитохром P_{450} — оксидоредуктаза катализирует перенос двух электронов с $\text{НАДФН} \cdot \text{H}^+$ на цитохром P_{450} . Этим путем (механизм описан в главе 18) обезвреживаются ксенобиотики, в том числе лекарственные вещества, яды, косметические средства.

Цепь $\text{НАДН} \cdot \text{H}^+$ — цитохром b_5 — стеароил-КоА-десатураза катализирует перенос двух электронов с $\text{НАДН} \cdot \text{H}^+$ на цитохром b_5 . Последний может передавать свои электроны на различные ферменты (цитохром P_{450} , стеароил-КоА-десатуразу и т.д.). При этом он участвует в десатурации и элонгации жирных кислот, в синтезе холестерина, плазминогенов и церамида.

Митохондриальные монооксигеназные системы состоят из нескольких компонентов, локализованных на внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрий. Компонентами этих систем могут быть $\text{НАДН} \cdot \text{H}^+$ -зависимая ФАД-содержащая редуктаза, Fe_2S_2 -белки, цитохромы P_{450} , b_5 , элонгазы.

Эти системы находятся в коре надпочечников, в семенниках, яичниках и плаценте. Там они участвуют в биосинтезе стероидных гормонов. В почках монооксигеназные системы катализируют гидроксилирование 25-гидроксихолекальциферола, образуя 1,25-дигидроксихолекальциферол (активная форма витамина D). В печени с помощью монооксигеназ происходит гидроксилирование холестерина при биосинтезе желчных кислот. Пролингидроксилазы включают гидроксильные группы в аминокислотные остатки пролина в молекуле проколлагена (донором протонов и электронов для реакции является витамин C). Благодаря гидроксилированию пролина образуется зрелый коллаген, который приобретает большую механическую прочность.

Диоксигеназы катализируют включение в субстрат двух атомов кислорода:



где В — вещество.

Диоксигеназные реакции протекают на поверхности гладкого ЭПР. Таким путем окисляются циклические структуры, что сопровождается разрывом цикла. Например, L-триптофандиоксигеназа печени участвует в катаболизме триптофана (рис. 5.12).

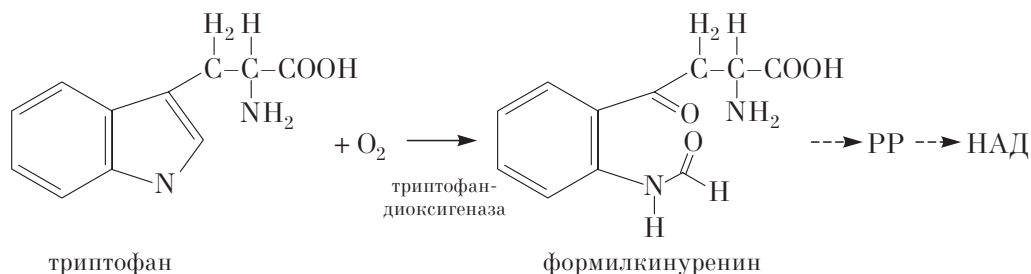


Рис. 5.12. Схема реакции катаболизма триптофана

5.6.3. Образование активных форм кислорода и их роль в организме. Свободнорадикальное окисление

От 1 до 10 % поступающего с дыханием кислорода переходит в активные формы. Химические соединения, в составе которых кислород имеет промежуточную степень окисления и высокую реакционную способность, называют **активными формами кислорода** (АФК). К ним относятся свободные радикалы кислорода и перекиси: супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (OH^{\bullet}), синглетный кислород (1O_2), алкоксильный радикал (RO^{\bullet}), пероксильный радикал (RO_2^{\bullet}), оксид азота (NO^{\bullet}), пероксинитрит ($ONOO^-$).

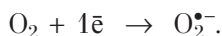
Свободные радикалы — это молекулярные частицы, которые имеют неспаренный электрон на внешней электронной оболочке.

Все радикалы, образующиеся в нашем организме, можно разделить на три вида:

- *первичные* — образуются в организме в результате ферментативных реакций (радикалы убихинона, супероксидный анион-радикал и оксид азота);
- *вторичные* — как правило, образуются из первичных в результате неферментативных реакций (гидроксильный радикал (OH^{\bullet}) и липидные радикалы, участвующие в реакциях цепного окисления ненасыщенных жирных кислот липидов биологических мембран и липопротеинов плазмы крови);
- *третичные* — образуются при действии вторичных радикалов на молекулы антиоксидантов и других легкоокисляющихся соединений.

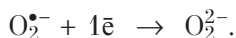
Активные формы кислорода во многих клетках образуются в основном в результате последовательного присоединения электронов к молекуле кислорода.

1. Одноэлектронное восстановление кислорода приводит к образованию супероксидного анион-радикала:

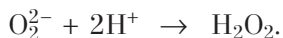


Время его жизни составляет 10^{-6} с. Супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$) обладает амфотерными окислительно-восстановительными свойствами. Он может выступать в качестве донора электронов, участвуя в реакциях восстановления ряда соединений.

2. Одноэлектронное восстановление $O_2^{\bullet-}$ приводит к образованию гидродиоксид-иона:



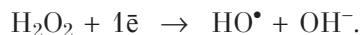
3. Гидродиоксид-ион быстро протонируется с образованием перекиси водорода:



Образование H_2O_2 может осуществляться за счет непосредственного двух-электронного восстановления кислорода.

Перекись водорода относится к окислителям средней силы, способным взаимодействовать с веществами радикальной и нерадикальной природы.

4. В результате реакции одноэлектронного восстановления H_2O_2 может происходить генерация гидроксильного радикала:



Далее гидроксильный радикал восстанавливается до воды:



или протонируется с образованием воды:



АФК являются продуктами ферментативных и неферментативных метаболических процессов. Генерация АФК происходит по ходу окислительно-восстановительных реакций с участием кислорода в различных субклеточных структурах клетки. Основным источником активных форм кислорода в большинстве клеток является митохондриальная цепь переноса электронов, особенно в случаях, когда снижена активность цитохромоксидазы.

АФК могут образовываться в ЭПР и ядерной мембране с участием цитохрома P_{450} и цитохрома b_5 . Кроме того, АФК могут образовываться в плазматической мембране и пероксисомах при функционировании флавопротеинов (аэробных дегидрогеназ); в оксидазных реакциях с участием ксантиноксидазы, НАДФ-оксидазы, аминоксидазы; при метаболизме эйкозаноидов (липооксигеназа, простагландинсинтетаза); перекисном окислении липидов (ПОЛ).

Реакции образования свободных радикалов многократно ускоряются в присутствии металлов переменной валентности (железо, медь и др.) и при закислении среды. Например, в эритроцитах окисление иона железа гемоглобина способствует образованию супероксидного анион-радикала:

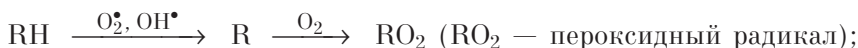


АФК, обмениваясь электроном, легко переходят друг в друга:



Перекисное окисление липидов (ПОЛ). Радикалы кислорода активируют процесс свободнорадикального окисления ненасыщенных липидов клеточных мембран. Реакции ПОЛ являются цепными. Если жирную кислоту обозначить RH , то процесс ПОЛ можно представить следующей схемой:

- I этап — зарождение цепи:



- II этап — продолжение цепи:



- III этап — разветвление цепи:



В процессе ПОЛ образуются гидроперекиси липидов. Подвергаясь дальнейшим превращениям, особенно в присутствии Fe^{2+} , они могут способствовать образованию альдегидов, кетонов, эпоксидов и других высокореакционных соединений, которые способны, реагируя с биомолекулами, привести к полному распаду клеточных мембран и клетки в целом.

Биологическая роль активных форм кислорода. Свободные радикалы кислорода и продукты ПОЛ являются нормальными метаболитами клетки и выполняют определенные функции. Например, супероксидный анион-радикал, образующийся ферментным комплексом НАДФН-Н⁺-оксидазой, используется фагоцитарными клетками (тканевыми макрофагами, моноцитами и гранулоцитами крови) для разрушения бактерий, вирусов и опухолевых клеток. Врожденный дефект НАДФН-Н⁺-оксидазы (хронический гранулематоз) проявляется частыми бактериальными и грибковыми инфекциями, поражающими кожу, желудочно-кишечный тракт, легкие, и образованием множественных гранулём, так как при этом заболевании нарушается синтез O_2^- и не происходит внутриклеточное уничтожение микроорганизмов.

В норме АФК участвуют в синтезе биогенных аминов, эйкозаноидов (лейкотриенов, простагландинов, тромбоксанов); обезвреживании ксенобиотиков; метаболизме белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот; регуляции физико-химического состояния мембраны. В настоящее время известно, что АФК, в частности H_2O_2 , $\text{HO}\cdot$ и продукты ПОЛ, выполняют роль сигнальных молекул, так как участвуют в запрограммированной смерти клеток (апоптоз), индуцируют и подавляют экспрессию многих генов, осуществляют регулируемую роль в процессах роста клеток и их дифференцировки, клеточной адгезии.

Повреждающее действие активных форм кислорода на организм. Активация процессов образования АФК наблюдается при воздействии на организм ионизирующего излучения, ультразвука, сигаретного дыма, продуктов загрязнения окружающей среды, гипоксии и гипероксии. Химические соединения, которые усиливают процессы свободнорадикального окисления в организме, называются **прооксидантами**. К ним относят самоокисляющиеся соединения, в том числе металлы с переменной валентностью, свободнорадикальные метаболиты, витамины А, D, хиноны.

АФК стимулируют разрывы в молекулах ДНК и РНК, повреждая генетический аппарат клетки (мутации); окисляют аминокислотные остатки гистидина, цистеина, триптофана в белках и нарушают их функциональную активность; вызывают деполимеризацию гликопротеинов соединительной ткани. Особенно тяжелые последствия имеют повреждения ненасыщенных жирных кислот клеточных мембран и мембран митохондрий. Как следствие нарушаются физико-химические свойства, проницаемость, рецепторная и транспортная функции. Это приводит к нарушению регуляции внутриклеточных процессов и тяжелым расстройствам клеточных функций.

5.6.4. Антиоксидантная система

В нормальных условиях процесс свободнорадикального окисления находится под строгим контролем ферментативных и неферментативных систем клетки.

Вещества, способные прерывать процессы свободнорадикального окисления, получили название **антиоксиданты**. Различают *природные* (естественные) и *синтетические* (искусственные) антиоксиданты.

Механизмы процессов окисления и его торможения с помощью антиоксидантов в настоящее время хорошо изучены.

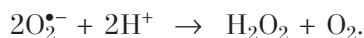
По механизму действия выделяют антиоксиданты:

- доноры протонов (вещества с легкоподвижным атомом водорода): витамины Е, С, глутатион, билирубин, кверцетин, катехины, мочевая кислота, мелатонин и др.;
- полиены (имеют двойные связи, легко окисляются АФК): каротиноиды, ретинол;
- катализаторы (разрушают АФК): супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза;
- хелаторы металлов: трилон Б, трансферрин и другие белки.

Находящиеся в организме антиоксиданты локализуются как в водной, так и в липидной фазе клеточных структур, образуя его ферментативную и неферментативную антиоксидантные системы.

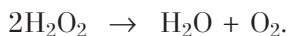
Ферментативная антиоксидантная система (АОС). К ферментам, защищающим клетки от действия АФК, относят супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу.

Супероксиддисмутаза (СОД) катализирует реакцию взаимодействия (дисмутации) двух супероксидных анион-радикалов с образованием молекулы перекиси водорода и молекулы кислорода:



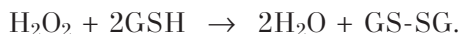
Изоферменты СОД находятся в цитозоле (Cu-зависимая СОД и Zn-зависимая СОД) и в митохондриях (Mn-зависимая СОД). Они являются «первой линией защиты», так как $\text{O}_2^{\bullet-}$ образуется обычно первым из активных форм кислорода. СОД — индуцируемый фермент, его синтез увеличивается, если в клетках активируется свободнорадикальное окисление.

Каталаза — гемсодержащий фермент, состоящий из четырех субъединиц, катализирует реакцию разрушения перекиси водорода. При этом образуется вода и молекулярный кислород:



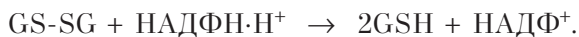
Каталаза присутствует во всех тканях организма. В клетках она находится в пероксисомах (80 %) и цитозоле (20 %).

Глутатионпероксидаза (ГПО) является одним из важнейших ферментов антиоксидантной защиты организма. Она обеспечивает разрушение гидропероксидов липидов при окислении глутатиона (γ -глутамилцистеилглицин):



Глутатионпероксидаза в качестве кофермента содержит микроэлемент селен (Se) (подробнее о нем см. п. 15.5.4).

Этот фермент восстанавливает дисульфидную связь окисленного глутатиона до его сульфгидрильной формы с участием НАДФН·Н⁺, образующегося в пентозофосфатном пути окисления глюкозы:



В таких клетках, как эритроциты, которые подвержены окислительному стрессу, до 10 % потребляемой глюкозы используется на восстановление глутатиона глутатионредуктазой.

Неферментативная антиоксидантная система. *Жирорастворимые антиоксиданты* способны инактивировать свободные радикалы в гидрофобном слое мембран и предотвращать развитие ПОЛ. К ним относится витамин Е (α -токоферол), убихинон (CoQ), тироксин, стероидные гормоны и синтетические соединения, например ионол (бутилированный гидрокситолуол).

Витамин Е (α -токоферол) является самым распространенным липофильным антиоксидантом. Антиоксидантные свойства токоферола обусловлены способностью подвижного гидроксила хроманового ядра его молекулы непосредственно взаимодействовать со свободными радикалами кислорода ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H^{\bullet} , HO_2^{\bullet}), свободными радикалами ненасыщенных жирных кислот (RO^{\bullet} , RO_2^{\bullet}) и перекисями жирных кислот. Он защищает от окисления ненасыщенные жирные кислоты клеточных мембран, SH-группы мембранных белков, двойные связи в молекулах каротинов и витамина А.

Токоферол (совместно с витамином С) способствует включению селена в активный центр глутатионпероксидазы. Витамин Е отдает атом водорода радикалу липида RO^{\bullet} , восстанавливает его до гидропероксида (ROH), прерывает ПОЛ, а сам превращается в свободный радикал. Два таких радикала образуют димер, который становится неактивным и выводится с желчью.

Водорастворимыми антиоксидантами являются белки, пептиды (глутатион, карнозин), витамины С, В₆, РР, биофлавоноиды (кверцетин, рутин, катехины), каротиноиды и другие соединения.

Витамин С (аскорбиновая кислота) ингибирует свободнорадикальное окисление с помощью двух различных механизмов:

1) восстанавливает в мембранах клеток токоферольный радикал до токоферола;

2) взаимодействует с активными формами кислорода ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^-) и инактивирует их.

Хелаторы металлов ингибируют только металлозависимые реакции образования АФК за счет связывания катионов металлов переходной валентности. Например, в организме существует целая система окисления и связывания ионов железа. В плазме крови она представлена ферментом *церрулоплазмином* (*феррооксидазой*), окисляющим Fe^{2+} до Fe^{3+} , белком *трансферрином*. Трансферрин связывает и транспортирует ионы Fe^{3+} , которые затем поступают в клетки. В клетках железо депонируется в окисленной форме внутри белкового комплекса *ферритина*.

5.6.5. Антиоксиданты и антигипоксантаы

Свойства **антиоксидантов** обнаружены у многих лекарственных препаратов, относящихся к разным группам лекарственных средств. Все они могут быть условно разделены на препараты с первичной антиоксидантной активностью (способны непосредственно инактивировать свободные радикалы кислорода, устраняя их действие) и с вторичными антиоксидантными свойствами (повышают устойчивость организма к гипоксии, активируют ферменты АОС).

В последние годы вызывают большой интерес фармакологические средства **антигипоксантаы**, улучшающие утилизацию организмом кислорода и снижающие потребность в нем органов и тканей: мексидол, эмоксипин, милдронат, гипоксен, актовегин и др. Эти препараты оказывают выраженное антигипоксическое действие и являются ингибиторами свободнорадикальных процессов в тканях.

Антиоксиданты в технологии лекарственных форм. Довольно часто физиологически активные вещества, мазевые и суппозиторные основы в составе лекарственных форм окисляются. Особенно чувствительны к окислению ненасыщенные жиры и масла, соединения с альдегидными и фенольными группами, а также полимерные упаковочные материалы. Для предотвращения этого процесса в них добавляют так называемые стабилизаторы — антиоксиданты. В этом качестве используются производные фенола, ароматические амины, производные серы (натрия сульфит и метабисульфит, ронголит, тиомочевина и др.), а также трилон Б, аскорбиновая, лимонная, винная кислоты, токоферол и др.

5.6.6. Подходы к созданию комплексных антиоксидантных препаратов

Эффективность действия витаминов-антиоксидантов зависит от того, применяются они в изолированном виде или в сочетании друг с другом. Следует учитывать также, что процессы свободнорадикального окисления в клетке протекают как в водной, так и в липидной ее фазах. Поэтому для проявления антиоксидантного действия целесообразно использовать совместно водорастворимые витамины и витамины, растворимые в липидах.

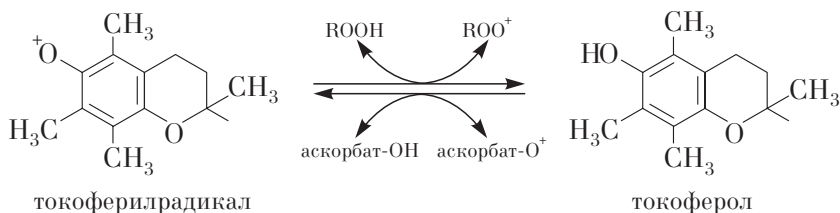


Рис. 5.13. Регенерация α -токоферола аскорбиновой кислотой

Например, выраженный антиоксидантный эффект витамина С проявляется только при его совместном действии с токоферолом, поскольку последний устраняет свободные радикалы жирных кислот и их перекиси, образующиеся в реакциях стимулированного аскорбиновой кислотой перекисного окисления липидов. Антиоксидантное действие витамина Е заключается, кроме того, в защите от окисления двойных связей в молекулах каротинов и витамина А.

С другой стороны, аскорбиновая кислота (АСК) восстанавливает токоферильный радикал в исходный токоферол, что поддерживает его стационарный уровень (рис. 5.13). Сама аскорбиновая кислота окисляется при этом в дегидроаскорбиновую кислоту. При недостатке аскорбиновой кислоты витамин Е быстро разрушается.

Токоферол (совместно с витаминами С и А) способствует включению селена в состав активного центра глутатионпероксидазы. Синергизм настолько высок, что витамин А и Se в отсутствие токоферола окисляются, теряют свои антиоксидантные свойства и витамин А быстро разрушается.

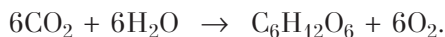
Биофлавоноиды — группа водорастворимых соединений растительного происхождения. К настоящему времени известно около 4000 биофлавоноидов (кверцетин, рутин, гесперидин, цианидины). Благодаря наличию ОН-групп биофлавоноиды являются ловушками для свободных радикалов. Вдобавок они способны связывать ионы металлов, не давая им запустить каскад свободно-радикальных реакций. Биофлавоноиды усиливают антиоксидантное действие витаминов Е и С, что позволяет уменьшить концентрацию каждого компонента в составе комбинированного препарата, а также увеличить время их действия и продлить срок хранения.

5.7. Фотосинтез

Фотосинтез — совокупность физических и химических процессов, в ходе которых происходит преобразование электромагнитной энергии солнечного света в энергию химических связей органических веществ.

Способностью к фотосинтезу обладают зеленые растения и эукариотические организмы, такие как водоросли (эвгленовые, диатомеи и перидинеи), а также прокариоты (цианобактерии, зеленые и пурпурные серные бактерии).

Процесс фотосинтеза включает большое число реакций, однако его суммарный результат выражается простым уравнением:



Еще в 1931 г. К. Ван-Нил высказал предположение, что источником O_2 в описанной реакции является H_2O , т.е. фотосинтез представляет собой реакцию восстановления CO_2 водородом, содержащимся в воде.

Фотоавтотрофные организмы улавливают энергию солнечного света, синтезируют углеводы и другие органические соединения и при этом выделяют в атмосферу кислород.

Аэробные гетеротрофы используют этот кислород для расщепления богатых энергией органических продуктов фотосинтеза до CO_2 и H_2O . Углекислый газ, образующийся при дыхании гетеротрофов, используется *фотосинтезирующими организмами*.

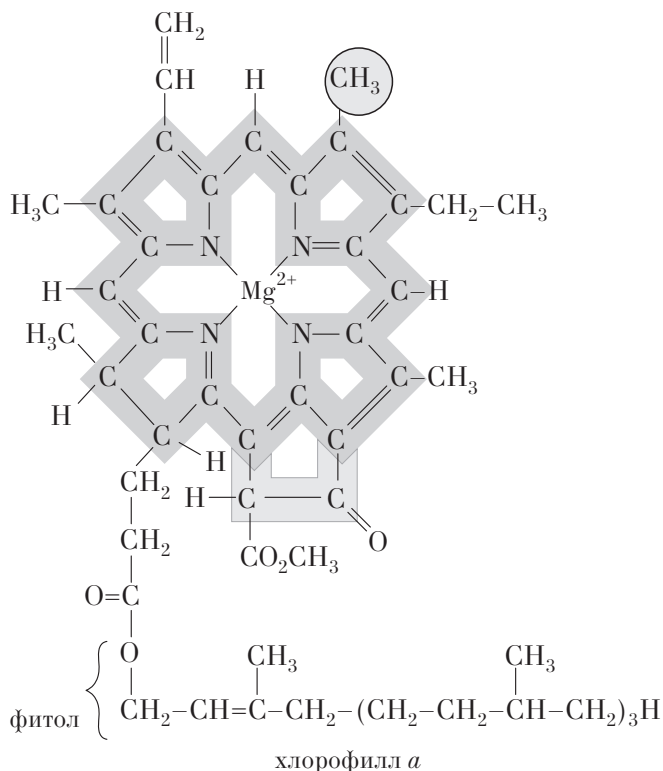
Фотосинтез составляет энергетическую основу всего живого на планете. Возникновение на Земле механизма расщепления молекулы воды с образованием O_2 более 3 млрд лет назад представляет собой важнейшее событие в биологической эволюции. Формирование окислительной атмосферы полностью изменило состояние земной поверхности, сделало возможным появление аэробного дыхания, а в дальнейшем, после образования озонового слоя, позволило жизни существовать на суше. Фотосинтез позволяет включить неорганический углерод (CO_2) в биологический цикл. Зеленые растения и бактерии в процессе фотосинтеза ежегодно поглощают из атмосферы приблизительно 200×10^9 т углекислого газа. При этом происходит высвобождение в атмосферу около 130×10^9 т кислорода и синтезируется 50×10^9 т органических соединений, в основном углеводов.

Полезные ископаемые (уголь, нефть, природный газ, торф) тоже являются продуктами фотосинтеза, только функционировавшего на Земле много лет назад.

Кроме того, фотосинтез обеспечивает образование многочисленных продуктов так называемого «вторичного синтеза», таких как алкалоиды, терпены, полифенолы, стероиды. Они являются ценными лекарственными веществами.

5.7.1. Фотосинтетические пигменты

Все фотосинтезирующие системы содержат ряд пигментов, позволяющих эффективно улавливать солнечную энергию и участвовать в ее преобразовании. Основными из них являются *хлорофиллы*. В растительных клетках обнаружено несколько форм хлорофиллов (*a*, *b*, *c*, *d*), различающихся по химическому строению. Все они содержат Mg-порфириновый комплекс, напоминающий по своей структуре протопорфирин гемоглобина. Хлорофилл *a* является основным пигментом и характерен для всех организмов, осуществляющих фотосинтез с выделением кислорода.



В молекуле хлорофилла *a* содержится четыре замещенных пиррольных кольца, из которых одно (4-е) находится в восстановленной форме. Имеется и 5-е непиррольное кольцо.

Конъюгированные двойные связи в молекуле хлорофилла образуют замкнутую сопряженную систему. Эта система обуславливает высокую стабильность молекулы хлорофилла и интенсивное поглощение света в видимой части спектра. Четыре центральных атома азота координационно связаны с ионом Mg. Длинная изопреноидная боковая цепь в молекуле хлорофилла *a* представляет собой остаток спирта фитола, который обеспечивает закрепление молекулы хлорофилла в тилакоидной мембране.

Хотя все хлорофиллы окрашены в зеленый цвет, их спектры поглощения различаются (рис. 5.14). Спектр поглощения различных форм хлорофиллов охватывает видимую, ближнюю ультрафиолетовую и ближнюю инфракрасную области спектра (у высших растений — 350–700 нм, у бактерий — 350–900 нм), что позволяет эффективно улавливать солнечный свет. Хлорофиллы могут быть выделены из экстрактов листьев в чистом виде хроматографическими методами.

В поглощении световой энергии участвуют и другие пигменты. У высших растений это желтые, красные и пурпурные пигменты полиизопреноидной природы — **каротиноиды** (каротины и ксантофиллы), а у ряда водорослей

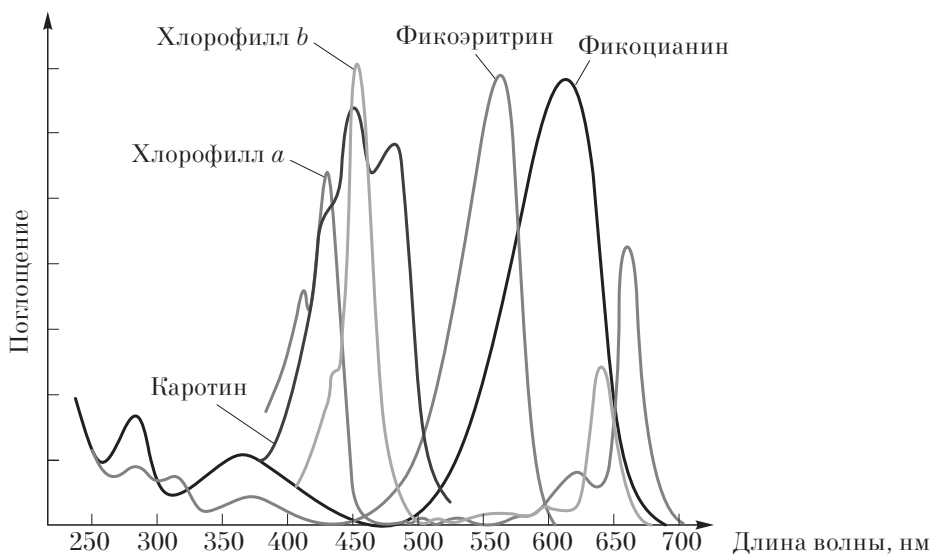


Рис. 5.14. Спектры поглощения света фотосинтезирующими пигментами

и некоторых фотосинтезирующих прокариот — еще и **фикобилины**, которые имеют структурное сходство с желчным пигментом билирубином.

От соотношения пигментов зависит характерная окраска фотосинтезирующих клеток, изменяющаяся от сине-зеленой (хвоя ели) до красной, бурой, пурпурной, как у водорослей и декоративных растений.

5.7.2. Фотосинтезирующие структуры

В эукариотических клетках процесс фотосинтеза протекает в клеточных органеллах, которые называются **хлоропластами** (рис. 5.15). Хлоропласты представляют собой микроструктуры овальной формы диаметром 4–6 мкм и толщиной 2–3 мкм.

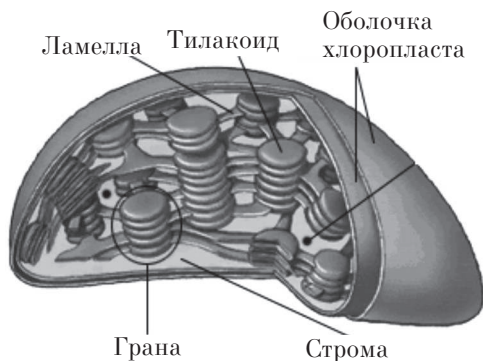


Рис. 5.15. Строение хлоропласта

Внутреннее пространство хлоропласта заполнено гелеобразной массой растворимых белков (*стромой*) и пронизано мембранами (*ламеллами*), которые, соединяясь друг с другом, образуют *тилакоиды*. Последние, в свою очередь, группируются в стопки, называемые *гранами*. Внутритилакоидное пространство отделено и не сообщается с остальной стромой. Мембраны тилакоидов содержат систему фотосинтетического переноса электронов и сопряженную с этим переносом систему фосфорилирования АДФ (фотофосфорилирование). В строме присутствуют ферменты, которые, используя синтезируемые тилакоидами АТФ и НАДФН·Н⁺, осуществляют превращение СО₂ в углеводы.

5.8. Стадии фотосинтеза

Процесс фотосинтеза протекает в две стадии: *световую* (фотофизическую и фотохимическую) и *темновую* (метаболическую). В хлоропласте эти стадии пространственно разобщены — световая осуществляется в мембранах тилакоидов, а темновая — в водной среде стромы. Тем не менее между ними имеется тесная связь (рис. 5.16).

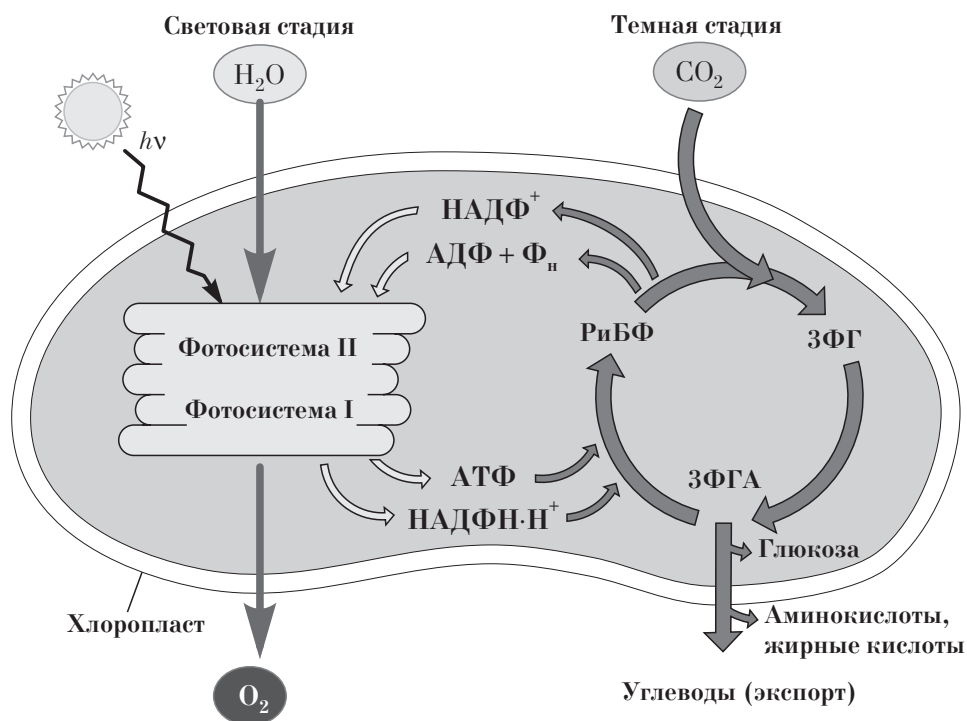


Рис. 5.16. Стадии фотосинтеза:

$h\nu$ — квант света; РибФ — рибулозо-1,5-бисфосфат; 3ФГ — 3-фосфоглицерат;
3ФГА — 3-фосфоглицериновый альдегид

Световая стадия включает: поглощение квантов света пигментами и активацию хлорофилла *a*; фотолиз воды и образование кислорода; синтез АТФ (фотосинтетическое фосфорилирование) и восстановление НАДФ⁺.

Темновая стадия происходит уже без обязательного участия света и включает в себя биохимические реакции синтеза глюкозы и других органических веществ из CO₂ с использованием энергии АТФ и НАДФН·Н⁺, накопленных на световой стадии.

5.8.1. Механизм световой стадии фотосинтеза

Экспериментально установлено, что в мембранах тилакоидов хлоропластов локализованы две фотосистемы: *фотосистема I* (ФСI), или пластоцианиин-ферредоксин-оксидоредуктаза, и *фотосистема II* (ФСII), или H₂O-пластохинон-оксидоредуктаза. Каждая фотосистема содержит светособирающие пигменты, фотохимический реакционный центр и системы транспорта электронов. Свет поглощается двумя фотосистемами раздельно*, и для нормального фотосинтеза требуется их одновременное участие.

В состав фотосистем входят хлорофиллы *a* и *b*, каротиноиды, фикобилины. Они участвуют в процессе поглощения квантов света и передачи энергии, выполняя функцию своеобразных антенн (рис. 5.17).

Компоненты электронтранспортных систем фотосинтеза в хлоропластах подобны компонентам дыхательной цепи митохондрий. В фотосинтетических цепях переноса электронов содержатся цитохромы *b*- и *c*-типа (*b*₅₅₉, *b*₅₆₃, *f*(*c*₅₅₂)), хиноны (филлохинон, пластохинон); медьсодержащий белок пластоцианин; железосерные белки-ферредоксины; флавопротеины (ферредоксин-НАДФ⁺-оксидоредуктаза). Так же, как и в дыхательной цепи митохондрий, в фотосинтетической электронтранспортной цепи переносчики электронов расположены в соответствии со значением их окислительно-восстановительных потенциалов.

В дыхательной цепи электроны переносятся с НАДН·Н⁺ на O₂ с образованием воды и выделением энергии, а при фотосинтезе электроны переносятся с воды на НАДФ⁺ при затрате энергии. Таким образом, фотосинтетический перенос электронов в энергетическом отношении подобен «подъему в гору» (рис. 5.18).

* В фотосистеме I свет поглощает реакционный центр (P₇₀₀) (максимум поглощения при длине волны 700 нм), в фотосистеме II — реакционный центр P₆₈₀ (максимум поглощения при длине волны 680 нм).

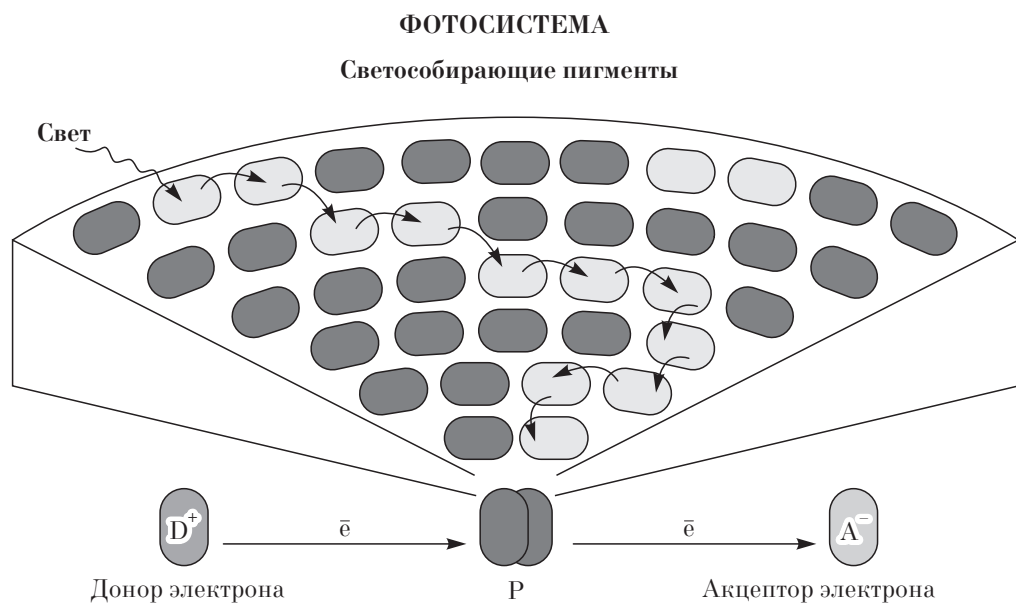


Рис. 5.17. Схема миграции квантов света (энергии) от светособирающего комплекса к реакционному центру (P) фотосистемы:

D^+ — окисленный реакционный центр — первичный донор электрона; A^- — первичный акцептор, принимающий электрон от возбужденного фотохимического реакционного центра

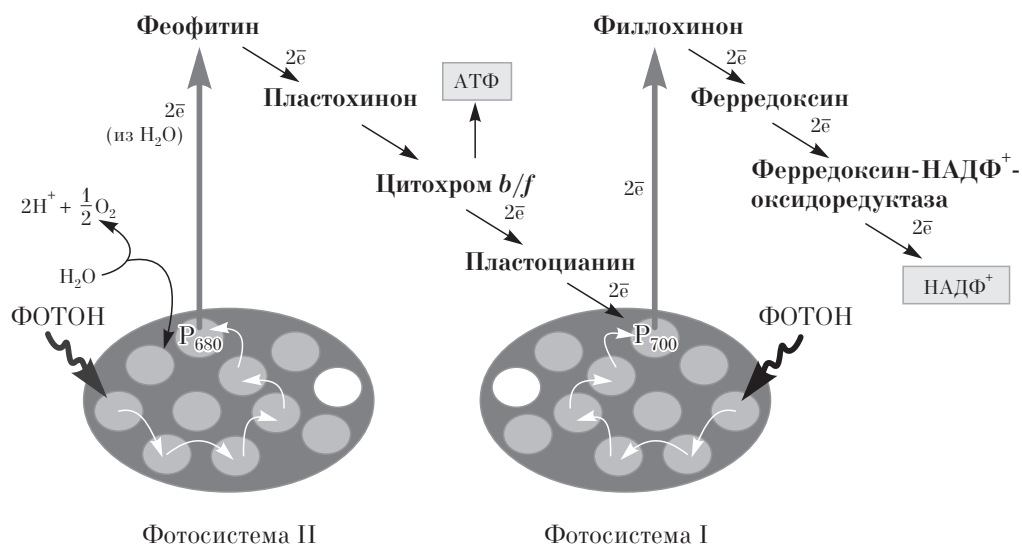


Рис. 5.18. Путь потока электронов от H_2O к $НАДФ^+$ при совместной работе фотосистем I и II

5.8.2. Переносчики электронов от фотосистемы I к НАДФ⁺

Для инициации окислительно-восстановительных реакций в процессе фотосинтеза, в отличие от дыхательной цепи митохондрий, используется не энергия окисления субстратов, а энергия солнечного света. Как и в митохондриях, процесс переноса электронов сопряжен с фосфорилированием АДФ. Кроме того, при функционировании фотосистемы I образуется НАДФН·Н⁺, используемый, как и АТФ, для синтеза гексоз в цикле Кальвина.

Поглощая энергию света, реакционный центр Р₇₀₀ фотосистемы I переходит в возбужденное состояние и отдает один электрон *хлорофиллу a*, далее электрон переходит на *филлохинон*, известный как витамин К₁. Филлохинон передает электроны железосерным белкам-ферредоксинам.



Ферредоксины (от лат. ferrum — железо) — небольшие (9–12 тыс. а.е.м.) растворимые белки, содержащие железосерные кластеры (2Fe–2S) и являющихся подвижными переносчиками электронов (рис. 5.19). Обычно они переносят один или два электрона за счет изменения валентности атомов железа.

У высших растений ферредоксин-НАДФ⁺-оксидоредуктаза переносит один электрон от ферредоксина к НАДФ⁺, восстанавливая его в НАДФН·Н⁺ на последней стадии фотосинтетического транспорта электронов, и также участвует в циклическом транспорте электронов. Ферредоксин-НАДФ⁺-оксидоредуктаза принадлежит к семейству флавопротеинов. В качестве простетической группы содержит прочно связанный ФАД.

Реакционный центр фотосистемы I (Р₇₀₀), отдав электрон, остается в виде ионизированной молекулы. Источником электрона, заполняющего его электронную вакансию, является фотосистема II.

Таким образом, при участии фотосистемы I через цепь переносчиков электронов осуществляется восстановление НАДФ⁺ и образование НАДФН·Н⁺,

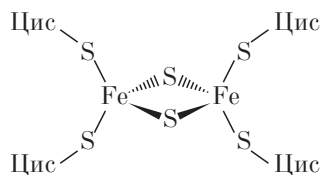


Рис. 5.19. Фрагмент молекулы ферредоксина с четырьмя остатками цистеина, к которым крепится 2Fe–2S кластер

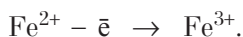
который используется в последующих реакциях восстановления углерода в цикле Кальвина. Кроме того, фотосистема I может осуществлять циклический транспорт электронов (процесс описан в п. 5.8.6).

5.8.3. Переносчики электронов от фотосистемы II к фотосистеме I

Поглощая энергию света, реакционный центр P_{680} фотосистемы II отдает один электрон первичному акцептору — *феофитину* (это молекула хлорофилла с недостающим ионом Mg^{2+}), а сам окисляется и становится сильным окислителем (P_{680}^+) с окислительно-восстановительным потенциалом +1,12 В, что позволяет ему индуцировать процесс окисления воды. Феофитин передает электроны двум молекулам пластохинонов.

Пластохинон — жирорастворимый хинон с длинной изопреноидной боковой цепью. Он подобен убухинону, выполняющему схожие функции в митохондриальной мембране. Пластохиноны транспортируют протоны в полость тилакоида, в то время как электроны передаются по электрон-транспортной цепи к цитохрому *b/f*.

Комплекс *цитохрома b/f* представляет собой интегральный комплекс мембранных белков (цитохром b_{563} , цитохром *f*, FeS-белки), осуществляющих перенос электронов. Цитохром *f* отдает электрон пластоцианину и окисляется:



Пластоцианин, (мономерный медьсодержащий белок) является аналогом цитохрома *c* дыхательной цепи митохондрий. При обратимой смене валентности $Cu^{2+} \leftrightarrow Cu^+$ пластоцианин принимает электрон от цитохрома *f* и передает его непосредственно на окисленный реакционный центр P_{700} фотосистемы I.

Заполнение электронной вакансии в реакционном центре P_{680} в составе фотосистемы II происходит за счет окисления воды.

Способность окислять воду за счет энергии поглощенного света — одно из важнейших эволюционных приобретений живой природы. Реакция фотолиза воды происходит с затратой энергии, полученной фотосистемой II от солнечного света на внутренней стороне тилакоидной мембраны, обращенной к *люмену* (пространство между двумя мембранами тилакоидов толщиной 5–10 нм).

Реакция фотолиза воды поставляет электроны для электрон-транспортной цепи, по которой электроны движутся от возбужденного реакционного центра P_{680} фотосистемы II к ионизированным молекулам реакционного центра P_{700} фотосистемы I, а образовавшиеся в ходе этой реакции протоны, формируют протонный градиент, используемый в дальнейшем для синтеза АТФ. Фотолиз воды происходит с выделением O_2 как побочного продукта. На образование одной молекулы кислорода из двух молекул воды, дающих четыре электрона, требуется 4 кванта света.

В состав фотосистемы II входит водоокисляющий ферментный комплекс (ВОК), содержащий в активном центре марганцевый кластер, состоящий из четырех атомов Mn^{4+} , которые служат донорами электрона для P_{680}^+ . Отдавая электроны окисленному реакционному центру P_{680}^+ , ионы марганца накапливают положительные заряды, которые непосредственно участвуют в реакции окисления воды:



В состав ВОК входят водорастворимые белки, которые формируют внешний домен комплекса фотосистемы II: PbsO, PbsQ и PbsP. Эти белки связываются с внутренней (люменальной) стороной мембраны тилакоида и располагаются вблизи каталитического центра ВОК. В комплекс также входят Ca^{2+} и ионы хлора.

5.8.4. Фотосинтетическое фосфорилирование

Фотосинтетическое фосфорилирование открыто Д. Арноном в 1954 г. Молекулярный механизм синтеза АТФ в хлоропластах похож на аналогичный механизм в митохондриях. Как и механизм окислительного фосфорилирования, он описывается хемиосмотической теорией П. Митчелла.

Основной функцией тилакоидной мембраны и ее интегральных фотосистем является создание трансмембранного протонного градиента. При транспорте электронов от реакционного центра P_{680} фотосистемы II ($E = -0,8$ В) к реакционному центру P_{700} фотосистемы I ($E = +0,4$ В) часть энергии используется для переноса протонов из стромы в просвет тилакоида (люмен) (рис. 5.20). Именно через протонный градиент светозависимые реакции сопряжены с синтезом АТФ.

Протоны в просвет тилакоида поступают в результате протекания трех процессов:

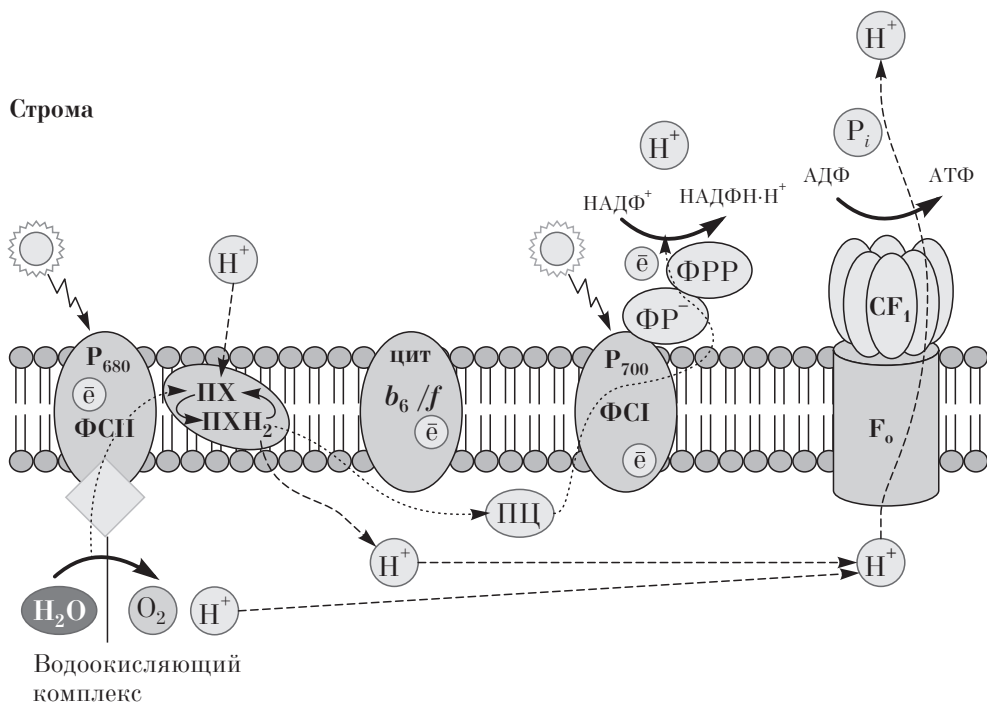
- фотоллиз воды, осуществляемый фотосистемой II, в процессе которого вода окисляется с выходом молекулярного кислорода, протонов и электронов;
- от пластохинона электроны передаются цитохромному комплексу b/f , а протоны выходят из стромы в просвет тилакоида;
- восстановление пластохинона ферредоксином в процессе циклического электронного транспорта вызывает перенос двух протонов из стромы в просвет тилакоида.

В результате на мембране создается градиент протонов, или *трансмембранный протонный градиент* (Δp):

$$\Delta p = \Delta \Psi + \Delta pH,$$

где $\Delta \Psi$ — трансмембранный электрический потенциал; ΔpH — химический потенциал протонов.

Строма



Люмен

Рис. 5.20. Цепь транспорта электронов в тилакоидной мембране:
 ПХ — пластохинон; ПХН_2 — восстановленный пластохинон; ПЦ — пластоцианин;
 ФР — ферредоксин; ФРР — ферредоксин-НАДФ⁺-оксидоредуктаза; F_0 — протонный канал АТФ-синтазы; CF_1 — сопрягающий фактор АТФ-синтазы

Химический потенциал протонов обусловлен градиентом их концентрации, трансмембранный электрический потенциал — распределением зарядов по разные стороны мембраны.

Трансмембранный протонный градиент побуждает протоны возвращаться в строму через протонный канал АТФ-синтазы. Это является движущей силой синтеза АТФ.

АТФ-синтаза (CF_1F_0) интегрирована в мембрану тилакоида. Этот комплекс состоит из двух частей — факторов сопряжения: круглой шляпки F_1 , выступающей в строму хлоропласта (в ней располагается каталитический центр фермента), и ножки F_0 , погруженной в мембрану. Мембранная часть F_0 состоит из полипептидных субъединиц (a , b , c) и формирует в мембране протонный канал, по которому ионы водорода попадают к фактору сопряжения F_1 . Таким образом, способность синтезировать АТФ — это свойство единого комплекса $\text{F}_0\text{--F}_1$, встроенного в мембрану.

5.8.5. Фотосинтетическое и окислительное фосфорилирование: сходство и различие

Сходство фотосинтетического и окислительного фосфорилирования проявляется в следующем:

- тилакоидная мембрана асимметрична по своему строению, как и внутренняя митохондриальная мембрана;
- необходимым условием фотофосфорилирования, как и окислительного фосфорилирования, является целостность мембран;
- митохондриальная и тилакоидная мембраны (на них располагаются переносчики электронов и ферменты, участвующие в образовании АТФ) непроницаемы для ионов H^+ ;
- и то, и другое фосфорилирование можно разобщать с системой переноса электронов при помощи реагентов, увеличивающих способность прохождения протонов через мембрану;
- синтез АТФ осуществляется «грибовидными» ферментными молекулами, встроенными в мембрану. При этом АТФ-синтазу при фотофосфорилировании, как и АТФ-синтазу при окислительном фосфорилировании, можно блокировать олигомицином.

В то же время фотосинтез и тканевое дыхание представляют собой разнонаправленные процессы. При фотосинтезе энергия света является движущей силой синтеза АТФ и органических веществ; при окислительном фосфорилировании, напротив, в митохондриях используется энергия окисления органических веществ для синтеза АТФ:

- фотосинтез:



- тканевое дыхание:



В процессе тканевого дыхания происходит окисление водорода кислородом с образованием эндогенной воды, в то время как в процессе фотосинтеза происходит фотолиз воды, сопровождающийся выделением кислорода и водорода.

В механизмах синтеза АТФ также имеются различия. Направление переноса электронов и протонов через тилакоидную мембрану противоположно направлению их переноса в митохондриальной мембране. Молекулы переносчиков электронов ориентированы в тилакоидной мембране таким образом, что электроны движутся к внешней стороне мембраны тилакоида, а протоны концентрируются внутри тилакоида. Поэтому протонная АТФ-синтаза (CF_1F_o) в хлоропластах ориентирована тоже в противоположном направлении. Головка F_1 находится в строме хлоропласта, и протоны перемещаются из просвета тилакоида в строму. Напротив, в митохондриях протоны переносятся из митохон-

дриального матрикса в межмембранное пространство, а возвращаются протоны по протонному каналу АТФ-синтазы из межмембранного пространства в матрикс.

5.8.6. Циклический поток электронов

Различают два типа потока электронов: циклический и нециклический.

В *циклический* поток электронов вовлекается только фотосистема I. При циклическом потоке электроны от фотосистемы I (P_{700}) направляются по электрон-транспортной цепи, включающей переносчиков, соединяющих фотосистемы I и фотосистемы II, а также участок, сопряженный с фосфорилированием. Но при циклическом потоке ферредоксин вместо НАДФ⁺ восстанавливает пластохинон, который переносит электрон назад на *b/f*-комплекс. При этом образуется большой протонный градиент и больше синтезируется АТФ, но не образуется НАДФН·Н⁺.

Нециклический транспорт электронов сопровождается выделением кислорода, восстановлением НАДФ⁺ и сопряжен с синтезом АТФ.

Соответственно двум потокам различают *циклическое* и *нециклическое фотифосфорилирование*. Полагают, что циклический поток электронов и циклическое фосфорилирование «включаются», когда растительные клетки испытывают дополнительную потребность в АТФ.

5.8.7. Темновая стадия фотосинтеза

В темновой стадии с участием АТФ и НАДФН·Н⁺ происходит восстановление CO₂, который поступает из атмосферного воздуха, до глюкозы и других органических веществ. Для протекания этих реакций не нужна энергия света, поэтому они происходят и в темноте. Эта фаза фотосинтеза протекает в строме хлоропласта.

На синтез каждой молекулы глюкозы из шести молекул CO₂ расходуется 18 молекул АТФ и 12 молекул НАДФН·Н⁺. Этот процесс получил название *цикл Кальвина* или *восстановительный пентозофосфатный цикл* (рис. 5.21).

Цикл Кальвина состоит из трех стадий:

- 1) карбоксилирование рибулозо-1,5-дифосфата;
- 2) восстановление 1,3-дифосфоглицерата;
- 3) регенерация акцептора CO₂ (рибулозо-1,5-дифосфата).

В цикле Кальвина на каждую фиксированную молекулу CO₂ потребляется одна молекула рибулозо-1,5-дифосфата, которая регенерирует в конце цикла, чтобы смог начаться новый оборот цикла.

На первой стадии к рибулозо-1,5-дифосфату (6 молекул) присоединяется 6 молекул CO₂ под действием фермента *рибулозодифосфаткарбоксилазы* (КФ 4.1.1.39). Этот белок составляет основную фракцию белков хлоропласта

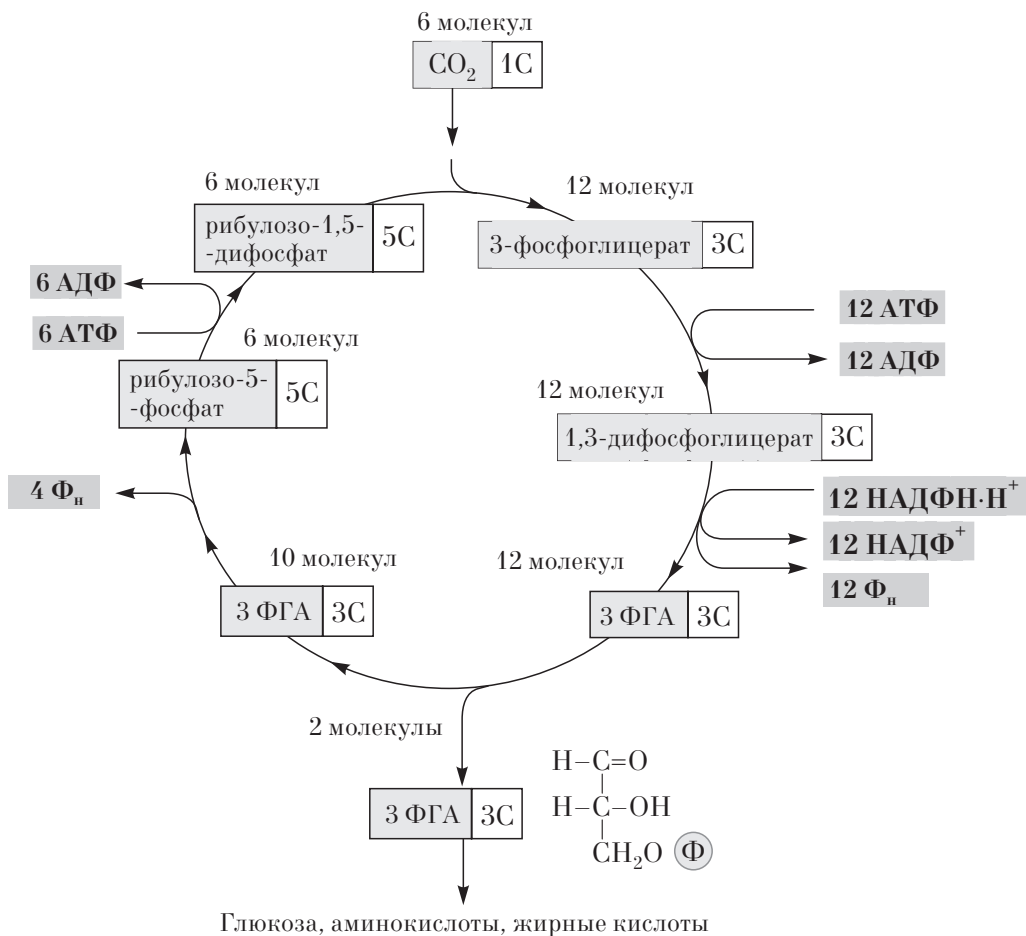


Рис. 5.21. Цикл Кальвина

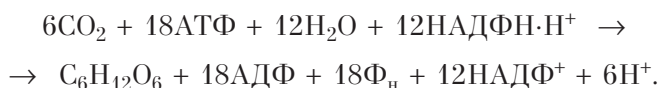
и наиболее распространен в природе (по сравнению с другими ферментами). В результате реакции образуется 6 молекул промежуточного неустойчивого C_6 -соединения, распадающегося на 12 молекул 3-фосфоглицериновой кислоты (ФГК). Растения, в которых CO_2 включается в трехуглеродное соединение, называются C_3 -растениями. Отметим, что из-за отсутствия рибулозодифосфат-карбоксилазы в животных тканях организм животных не способен осуществлять превращение CO_2 в глюкозу.

На второй стадии 3-фосфоглицериновая кислота фосфорилируется при участии АТФ под действием *фосфоглицерокиназы* с образованием 12 молекул 1,3-дифосфоглицериновой кислоты (ДФГК). Затем при воздействии триозофосфатдегидрогеназы и $\text{НАДФН} \cdot \text{H}^+$ ацилфосфатная группа ДФГК дефосфорилируется и восстанавливается до альдегидной с образованием 12 молекул глицеральдегид-3-фосфата.

В третьей стадии участвуют только 10 молекул глицеральдегид-3-фосфата из 12 образовавшихся: 2 молекулы ФГА удаляются из цикла и используются для синтеза глюкозы; 10 молекул ФГА через образование 4-, 5-, 6- и 7-углеродных соединений участвуют в регенерации 6 молекул рибулозо-1,5-дифосфата, для чего необходимо 6 АТФ.

Семь реакций цикла Кальвина совпадают с этапами глюконеогенеза в животных тканях, с той лишь разницей, что в процессе фотосинтеза восстановителем при образовании глицеральдегид-3-фосфата служит не НАДН·Н⁺, а НАДФН·Н⁺, и остальные реакции катализируются дополнительными ферментами.

Суммарное уравнение цикла Кальвина имеет вид:



Образующаяся в процессе фотосинтеза глюкоза является предшественником растительных углеводов (сахарозы, крахмала, целлюлозы), которые в животном организме не синтезируются.

При окислении первичной спиртовой группы глюкозы в растениях образуются *уроновые кислоты* (глюкуроновая, галактуриновая). Эти кислоты входят в состав пектиновых веществ, растительных слизей, сложных полисахаридов.

Из глюкозы образуется *инозитол*, а из него в растениях образуются *хинная кислота* и *галловая кислота*, являющиеся предшественником эпигаллокатехин галлатов.

Фосфоглицериновая кислота (первичный продукт фотосинтеза) является источником органических кислот (пировиноградной, молочной, винной, лимонной).

Образуются и *одноосновные циклические кислоты*: бензойная, салициловая, коричная, кофейная. Бензойная кислота встречается в составе гликозидов, смол, эфирных масел, коричная — в составе смолистых веществ, называемых бальзамами.

Среди продуктов фотосинтеза имеются такие соединения, как *глицин* (участвует в образовании пуриновых оснований и хлорофилла), *β-аланин* (является предшественником пантотеновой кислоты), *триптофан* (из него в растениях образуются ауксины (гормоны роста)). *Фенилаланин* и *тирозин* — исходные вещества для образования многих циклических соединений.

В результате вторичных синтетических реакций образуются витамины, ростовые вещества, алкалоиды, гликозиды, дубильные вещества, пигменты, которые могут использоваться в качестве лекарственных веществ.

Химия и обмен углеводов

Углеводы — это альдегиды (альдозы) и кетоны (кетозы) многоатомных спиртов. Углеводы широко распространены в природе, являются компонентами всех клеток живых организмов и выполняют разнообразные функции. В растениях содержится до 80 % углеводов, в организме млекопитающих на долю углеводов приходится около 1 % массы тела.

6.1. Биологическая роль углеводов

В клетках живых организмов углеводы являются источниками и аккумуляторами энергии (особо отметим, что глюкоза является основным поставщиком энергии для нервной ткани и коркового вещества почек, а для эритроцитов — единственным). На долю углеводов приходится более 50 % суточного количества необходимых организму человека калорий. Углеводы выполняют в организме *пластическую* и *структурную функции*. Они входят в состав гликолипидов и гликопротеинов, межклеточного вещества соединительной ткани, гликокаликса плазматических мембран клеток; используются для синтеза нуклеиновых кислот и входят в состав коферментов.

Анаболическая функция углеводов заключается в том, что они являются основным источником для синтеза липидов, а продукты распада глюкозы (кетокислоты) служат исходным субстратом для синтеза аминокислот. В организме многих животных из углеводов может синтезироваться витамин С.

Обезвреживающая функция углеводов заключается в том, что УДФ-глюкуроновая кислота (активное производное глюкозы) участвует в процессах детоксикации эндогенных токсичных соединений и ксенобиотиков, в том числе лекарственных веществ. Образующиеся при этом глюкурониды являются гидрофильными соединениями, способными выводиться из организма. Липополисахариды бактерий и гликопротеины плазматических мембран животных клеток обеспечивают избирательность межклеточного взаимодействия и иммунологических реакций организма.

Являясь составной частью антител, углеводы обеспечивают «узнавание» антигенов, выполняя *защитную функцию*. Углеводы, входящие в состав мембраны эритроцитов, определяют группы крови, участвуют в свертывании крови (фибриноген, протромбин); углеводные компоненты входят в состав рецепторов, белков-транспортёров и некоторых белковых гормонов (тиреотропин, гонадотропин).

6.2. Классификация углеводов

Класс углеводов включает разнообразные соединения — от низкомолекулярных, содержащих от 3 до 10 атомов углерода, до полимеров с молекулярной массой в несколько миллионов. Классификация углеводов основана на их структуре (рис. 6.1). Согласно ей, углеводы подразделяются на три основные группы: моносахариды, олигосахариды (2–10 моносахаридов), полисахариды (более 10 моносахаридов). Полисахариды бывают двух видов — гомо- и гетерополисахариды.

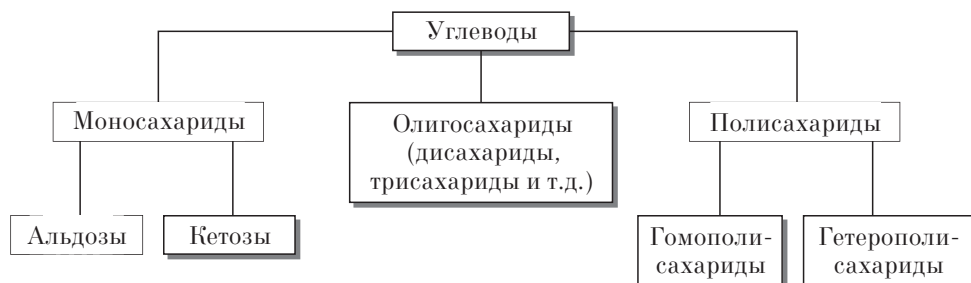


Рис. 6.1. Классификация углеводов

Кроме того, в живых организмах широко распространены соединения углеводов с веществами других классов: аминсахара — соединения углеводов с аминами (например, глюкозамин), гликопротеины и протеогликаны — соединения углеводов с белками, гликолипиды — соединения углеводов с липидами. Наконец, нуклеиновые кислоты ДНК и РНК также представляют собой сложные молекулы, в состав которых входит углеводный компонент.

6.2.1. Моносахариды

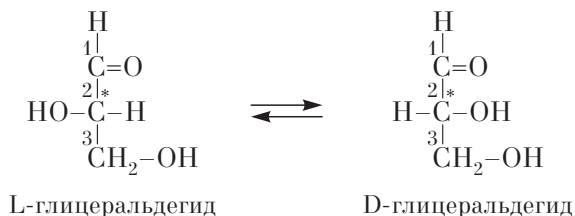
Моносахариды разделяются по числу углеродных атомов: C_3 — триозы, C_4 — тетразы, C_5 — пентозы, C_6 — гексозы, C_7 — гептозы, C_8 — октозы, C_9 — нонозы. Природные моносахариды с углеродной цепью, содержащей более 9 атомов углерода, не обнаружены.

Моносахариды являются обычно твердыми бесцветными веществами, растворимыми в воде.

Тот факт, что существует несколько пентоз или гексоз, которые могут быть описаны общей формулой, указывает на *стереоизомерию* углеводов. Стереоизомеры, в проекционной формуле которых ОН-группы расположены справа, называются *D-формами*, слева — *L-формами*.

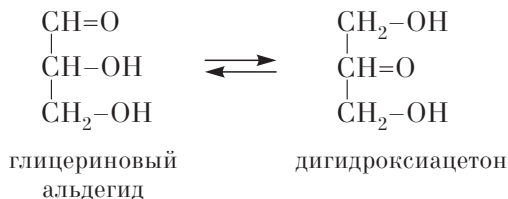
При химическом синтезе моносахаридов в лабораторных условиях *D*- и *L*-формы находятся в соотношении 1:1, так как вероятность образования

каждой из них одинакова. Синтез моносахаридов в организме происходит при участии ферментов, которые строго различают D- и L-формы, поэтому синтезу и распаду в организме подвергаются исключительно D-сахара. Как и в случае аминокислот, химические свойства у D- и L-форм одинаковы, в то время как оптические свойства различаются.



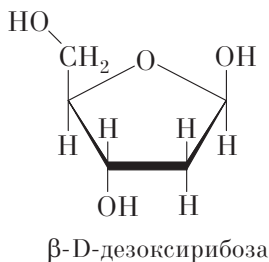
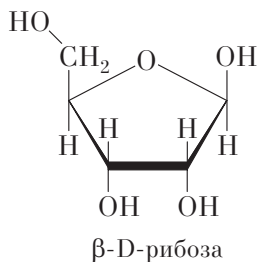
В водном растворе моносахариды существуют в двух таутомерных формах — открытой и циклической. Моносахариды, образующие 5-членный цикл, называются *фуранозами*, 6-членный — *пиранозами*. Гидроксил у C₁ атома циклического моносахарида называют *полуацетальным*. Он определяет восстанавливающие свойства углеводов и обуславливает существование ряда качественных реакций (реакция «серебряного зеркала», Троммера и др.). К восстанавливающим углеводам относятся глюкоза, лактоза, мальтоза. На способности моносахаридов восстанавливать различные соединения основаны методы количественного определения моносахаридов.

Триозы (C₃H₆O₆) являются представителями простейших моносахаридов и образуются в организме человека, животных и растений как промежуточные продукты распада более сложных углеводов. К ним относят *глицериновый альдегид* (альдоза) и *диоксиацетон* (кетоза).



Представителем **тетроз (C₄H₈O₄)** является *эритроза*. Она образуется как промежуточное соединение в пентозофосфатном цикле.

Пентозы (C₅H₁₀O₅) в свободном виде не встречаются, но широко распространены в природе в составе сложных соединений. Представителями пентоз являются арабиноза, ксилоза, рибоза, дезоксирибоза, ксилулоза. *D-рибоза* и *D-дезоксирибоза* входят в состав нуклеиновых кислот, коферментов (НАД, НАДФ, ФАД).



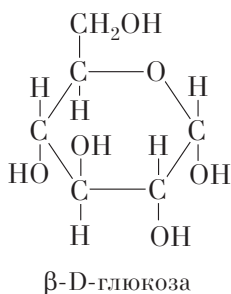
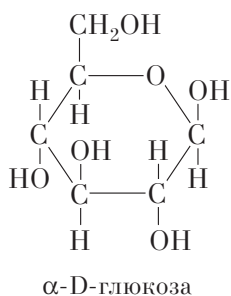
L-арабиноза встречается в составе пектиновых веществ и гемицеллюлозы растений. *Ксилулоза* образуется из рибозы в пентозофосфатном цикле взаимопревращений углеводов.

Гексозы ($C_6H_{12}O_6$). *D-глюкоза* является самым распространенным углеводом. Кристаллическую *D-глюкозу* получают в двух формах: α -*D-глюкоза* и β -*D-глюкоза*.

В природе *D-глюкоза* встречается в свободном виде и в составе олигосахаридов (сахароза, лактоза), полисахаридов (крахмал, гликоген, целлюлоза, декстран), гликозидов и других производных, например *D-глюкозамина*. В свободном виде *D-глюкоза* содержится в плодах растений (особенно много в винограде), а также в животных тканях (крови, мозге и др.). *D-глюкоза* является важнейшим источником энергии в организме животных и микроорганизмов.

β -*D-фруктоза* содержится главным образом в мёде, фруктах и ягодах. У человека фруктоза в свободном, т.е. нефосфорилированном, виде находится только в семенной жидкости. В качестве моносахаридного звена фруктоза входит в состав сахарозы, лактулозы (синтетический дисахарид) и полисахарида — инулина, который является запасным питательным веществом для растений. Продукты, содержащие фруктозу, при определенных условиях могут быть рекомендованы больным сахарным диабетом.

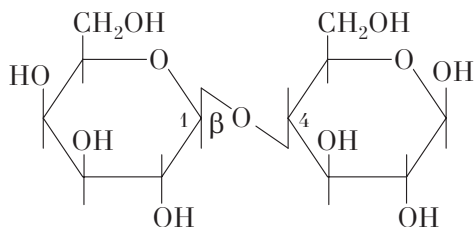
D-галактоза в организме человека встречается в составе сложных липидов — цереброзидов и ганглиозидов мозга. Входит в состав молока в виде молочного сахара.



6.2.2. Олигосахариды

Олигосахаридами называются углеводы, содержащие от 2 до 10 звеньев моносахаридов, соединенных гликозидными связями. Основная масса олигосахаридов содержится в продуктах питания и представлена дисахаридами: сахарозой, мальтозой и лактозой.

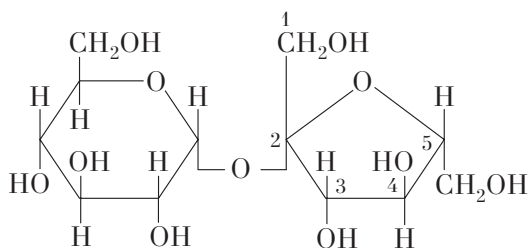
Лактоза (молочный сахар) — основной углевод молока. Имеет важное значение для растущего организма как животных, так и человека. В коровьем молоке содержится до 4,5 % лактозы, в женском молоке — до 7,5 %. Лактоза представляет собой дисахарид, состоящий из α -D-глюкозы и β -D-галактозы.



лактоза

Лактоза обладает восстанавливающими свойствами, так как имеет свободный полуацетальный гидроксил. В фармацевтической промышленности лактоза используется в качестве наполнителей порошков и таблеток.

Сахароза (тростниковый, свекловичный сахар) состоит из α -D-глюкозы и β -D-фруктозы.

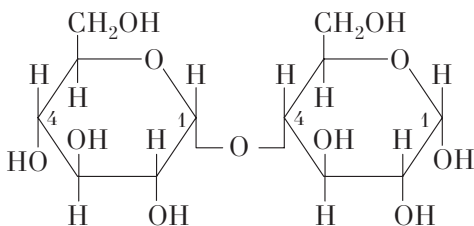


сахароза

Поскольку фруктоза в составе сахарозы представлена 5-членным (фуранозным) кольцом, связанным с альдегидной группой глюкозы, она не проявляет свойств восстановителя.

Сахароза широко распространена в стеблях, клубнях и плодах растений. Она широко используется в пищевом рационе людей в качестве дисахарида. Ее получают из сахарного тростника или сахарной свеклы.

Мальтоза (солодовый сахар) состоит из двух остатков D-глюкозы, соединенных $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидной связью.



мальтоза

Мальтоза в свободном виде не встречается и является промежуточным продуктом распада полисахаридов — крахмала и гликогена. В организм человека поступает с продуктами, содержащими частично гидролизованный крахмал (например, солод, пиво), а также образуется при расщеплении крахмала в кишечнике. Мальтоза обладает восстанавливающими свойствами.

Трегалоза (грибной сахар) найдена в грибах, водорослях, спорынье. Как и мальтоза, состоит из двух молекул D-глюкозы, но связанных между собой за счет полуацетальных гидроксильных $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидной связью, поэтому не обладает восстанавливающими свойствами.

Все моносахариды и дисахариды обладают сладким вкусом, но в разной степени. Если сладость сахарозы условно принять за 100 %, то сладость фруктозы будет равняться 175 %, глюкозы — 74 %, лактозы — 40 %, мальтозы — 32 %.

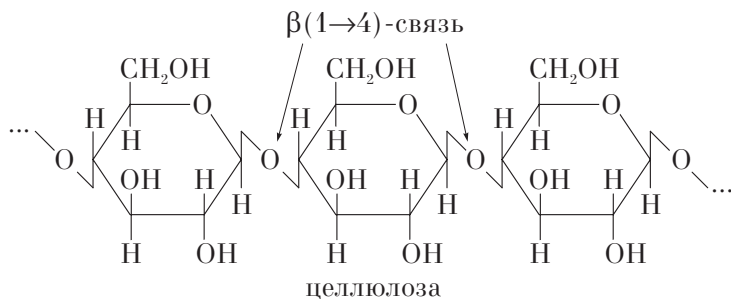
6.2.3. Полисахариды

Полисахариды, встречающиеся в животных и растительных организмах, разделяются на гомо- и гетерополисахариды. При гидролизе гомополисахаридов образуются моносахариды одного типа (например, только глюкоза при распаде крахмала и гликогена или только фруктоза при гидролизе инулина). При гидролизе гетерополисахаридов, наряду с различными моносахаридами, образуются их производные (гексозамины), а также глюкуроновая, уксусная, серная и нейраминная кислоты. По типу строения цепей полисахариды делят на линейные и разветвленные.

Все полисахариды (особенно кислые) образуют вязкие коллоидные растворы, способные к гелеобразованию. Их гели удерживают большое количество молекул воды.

В растительных и животных клетках полисахариды встречаются в виде запасных веществ и структурных компонентов и содержатся как внутри клеток, так и в межклеточном веществе.

Гомополисахариды. *Целлюлоза (клетчатка)* — высокомолекулярный линейный полисахарид, построенный из остатков D-глюкозы, соединенных между собой $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидными связями. Молекулярная масса целлюлозы может составлять 1 млн а.е.м. и более. Природная целлюлоза обладает высокой механической прочностью, устойчива к химическому и ферментативному гидролизу. Эти свойства связаны с конформацией молекул и особенностями надмолекулярной организации. Неразветвленные связи типа $\beta(1\rightarrow4)$ приводят к образованию линейных цепей, которые стабилизированы внутри- и межцепочечными водородными мостиками, образованными гидроксильными группами.

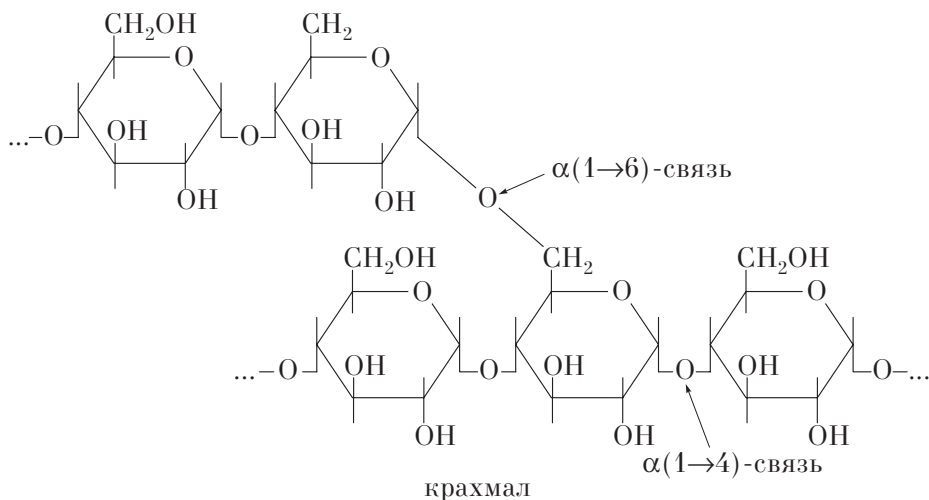


При частичном гидролизе целлюлозы образуется дисахарид — целлобиоза, а при полном — D-глюкоза.

Целлюлоза — самый распространенный биополимер на нашей планете. У всех растений из нее построены клеточные стенки: в среднем 20–40 % материала клеточной стенки составляет именно целлюлоза. Помимо того что целлюлоза является одним из структурных компонентов растительных клеточных стенок, она служит пищей для некоторых животных, бактерий и грибов. Однако большинство животных, в том числе и человек, не могут использовать целлюлозу из-за отсутствия фермента целлюлазы, расщепляющего β -гликозидные связи. У жвачных животных в кишечнике обитают в качестве симбионтов бактерии, которые переваривают целлюлозу.

Крахмал ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$)_n является основным резервным материалом растительных организмов. Он представляет собой смесь двух гомополисахаридов: линейного амилозы и разветвленного амилопектина. Единственным моносахаридом, входящим в состав крахмала, является D-глюкоза.

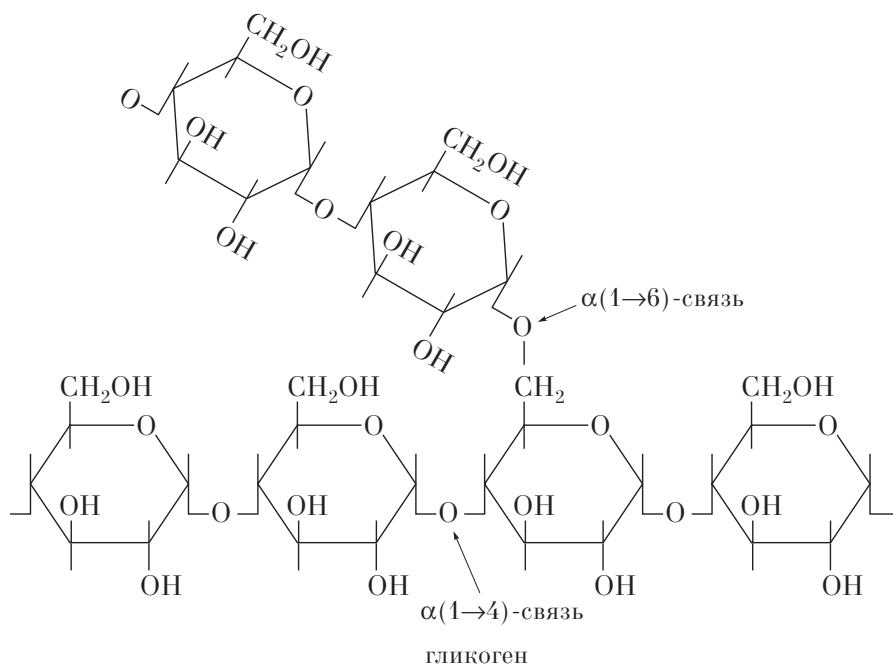
В амилозе и линейных цепях амилопектина остатки D-глюкозы соединены $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -гликозидными связями, а в точках ветвления амилопектина — $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -гликозидными связями.



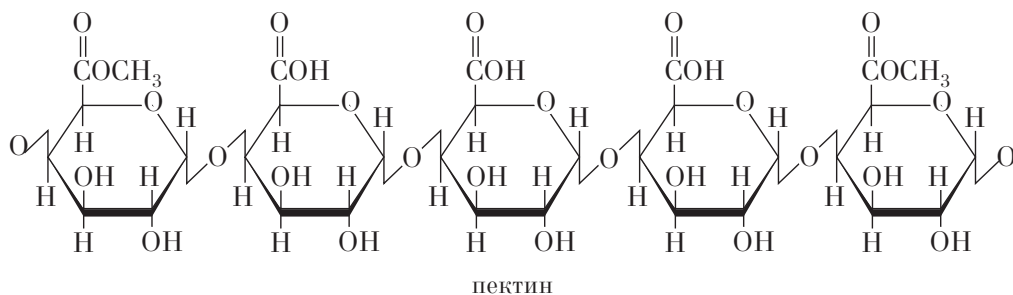
Крахмал, синтезируемый разными растениями, несколько различается по структуре зерен, степени полимеризации молекул, строению полимерных цепей и физико-химическим свойствам. Молекулярная масса крахмала составляет 10^5 – 10^7 а.е.м. Он накапливается в семенах, луковицах, клубнях, в небольших количествах содержится в листьях растений. Для человека крахмал является важным пищевым источником глюкозы.

Инулин ($C_6H_{10}O_5$)_n — полимер D-фруктозы, состоит из 30–35 остатков фруктозы, соединенных за счет полуацетальных гидроксильных групп. У растений инулин, подобно крахмалу, служит запасным углеводом. Много инулина содержится в артишоках, клубнях топинамбура. Он служит исходным материалом для промышленного получения фруктозы. Инулин не переваривается пищеварительными ферментами организма человека и относится к группе пищевых волокон. Применяется в медицине как заменитель сахара при сахарном диабете.

Гликоген ($C_6H_{10}O_5$)_n является важнейшим резервным полисахаридом человека и высших животных, образованным остатками глюкозы, связанными $\alpha(1\rightarrow4)$ -связями ($\alpha(1\rightarrow6)$ в местах разветвления). Это высокомолекулярное соединение с молекулярной массой порядка 10^5 – 10^8 Да. Гликоген откладывается в виде гранул в цитоплазме во многих типах клеток (главным образом печени и мышц) и является основной формой хранения глюкозы. В отличие от крахмала, гликоген имеет более разветвленную и компактную структуру и не дает окраски при взаимодействии с йодом.



У высших растений к кислым полисахаридам относятся *пектины*. Они состоят из остатков галактуроновой кислоты и ее метилированных производных.



В тканях растений пектины выполняют структурную функцию, способствуют поддержанию в них тургора, повышают засухоустойчивость и устойчивость при хранении. Особенно много пектинов во фруктах и в некоторых водорослях. В промышленных масштабах пектиновые вещества получают в основном из яблочных и (или) цитрусовых выжимок, сахарной свеклы, корзинок подсолнечника. У человека пектины практически не расщепляются ферментами ЖКТ, но являются природными гелеобразователями и энтеросорбентами.

Декстран — полисахарид бактериального происхождения. Состоит из остатков D-глюкозы, связанных между собой $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидной связью, а в точках ветвления — $\alpha(1\rightarrow3)$ - или $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидными связями. Декстраны получают при культивировании на искусственной питательной среде микроорганизма рода *Leuconostoc*.

Гетерополисахариды. В органах и тканях животных, человека и растений важнейшими представителями гетерополисахаридов являются гликозаминогликаны (мукополисахариды), которые входят в состав протеогликанов.

Протеогликаны — это высокомолекулярные соединения, состоящие из белка с высокой степенью гликозилирования (рис. 6.2): на долю белковой части у них приходится 5–10 % от общей массы, 90–95 % составляет углеводный компонент. Углеводный компонент представлен длинными неразветвленными полисахаридными цепями — гликозаминогликанами. Они образованы чередующимися остатками гексозамина и уроновой кислоты (глюкуроновой, идуроновой или галактуроновой) либо галактозы. Белковый компонент протеогликанов — это особый коровый белок (англ. core — сердцевина, стержень). К нему при помощи трисахаридов (ксилоза-галактоза-галактоза) ковалентно присоединяются гликозаминогликаны. Одна молекула корового белка может присоединить до 100 полисахаридных цепей гликозаминогликанов. Такое строение протеогликанов обуславливает их высокую молекулярную массу.

Протеогликаны образуют основное вещество соединительной ткани, а также служат смазочным материалом в суставах, играют роль межтканевых прослоек и выполняют функцию связывания экстрацеллюлярной воды и катионов.

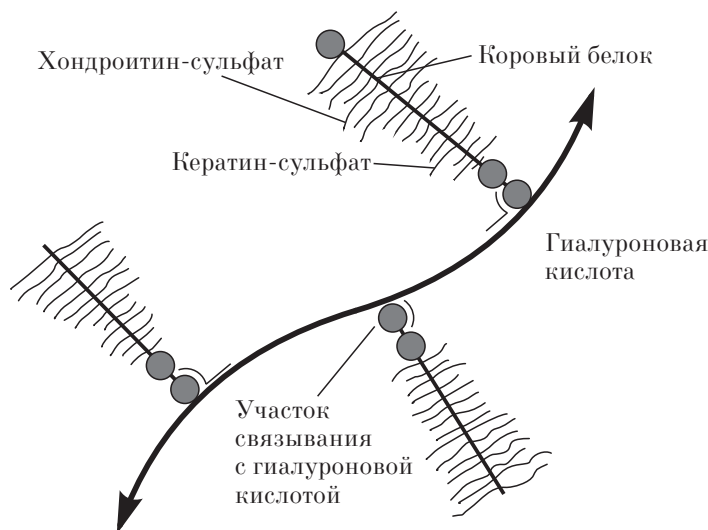


Рис. 6.2. Строение протеогликана

Поскольку водные растворы **гликозаминогликанов** представляют собой гелеподобные вещества, имеющие отрицательный заряд, их также называют **мукополисахаридами** (от лат. *mucus* — слизь).

Различают семь типов гликозаминогликанов: гиалуроновая кислота, хондроитин-4-сульфаты, хондроитин-6-сульфаты, дерматансульфаты, кератансульфаты, гепарансульфаты, гепарины.

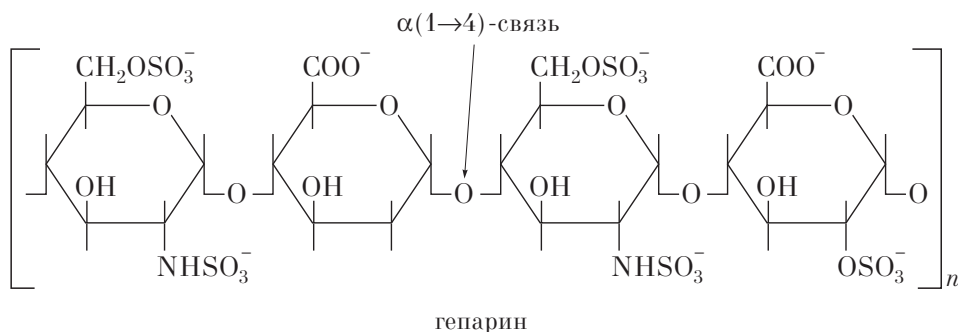
Гиалуроновая кислота представляет собой полимер, состоящий из остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных поочередно $\beta(1\rightarrow4)$ - и $\beta(1\rightarrow3)$ -гликозидными связями. Молекула гиалуроновой кислоты может содержать до 25 тыс. таких дисахаридных звеньев, поэтому ее молекулярная масса может достигать 10 млн Да.

Впервые гиалуроновая кислота была обнаружена в стекловидном теле глаза. Она является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса, содержится во многих биологических жидкостях (слюне, синовиальной жидкости и др.), а также входит в состав кожи, хрящевой ткани, оболочки яйцеклеток и др. Основными функциями гиалуроновой кислоты являются связывание воды, поддержание тургора тканей, участие в гидродинамике тканей, процессах миграции и пролиферации клеток, а также в ряде взаимодействий с поверхностными рецепторами клеток.

Полимерные сульфатированные гликозаминогликаны. *Хондроитин-4-сульфаты* и *хондроитин-6-сульфаты* отличаются не только по локализации сульфатной группы, но и по распределению в различных видах соединительной ткани. Хондроитин-6-сульфаты являются специфическими компонентами хряща, сухожилий, связок, входят в состав сердечных клапанов, стекловидного тела. Хондроитин-4-сульфаты — компоненты роговицы глаза, костной и хрящевой ткани.

При гидролизе хондроитинсульфатов образуются галактозамины, глюкуроновая, уксусная и серная кислоты.

Гепарин — серосодержащий гликозаминогликан, синтезируемый тучными клетками. Особенно много гепарина находится в печени и легких. В основе строения молекулы гепарина лежит полисахаридная цепь из повторяющихся дисахаридов — α -D-глюкозамина и уроновой кислоты, соединенных (1 \rightarrow 4)-гликозидными связями. Большинство остатков α -D-глюкозамина сульфатировано по C₆-гидроксильной группе. Эта полисахаридная цепь связана с белковым ядром.



Благодаря наличию значительного количества отрицательно заряженных сульфатных и карбоксильных групп, молекула гепарина представляет собой сильный природный полианион, способный к образованию комплексов со многими белковыми и синтетическими соединениями поликатионной природы, несущими суммарный положительный заряд.

В зависимости от длины полисахаридных цепей молекулярная масса эндогенного гепарина может быть различной (от 3 до 40 кДа). В качестве лекарственных препаратов используются преимущественно низкомолекулярные гепарины (12–16 кДа), обладающие лучшими фармакологическими характеристиками (высокая биодоступность, продолжительное действие и др.) в сравнении с высокомолекулярными гепаринами.

В клинической практике гепарин известен как *прямой антикоагулянт*, т.е. как вещество, препятствующее свертыванию крови. В крови гепарин связывается с антитромбином III, образуя комплекс, блокирующий IIa, IXa, Xa, XIa и XIIa факторы свертывания крови. Функцией гепарина является также активация фермента липопроteinлипазы, участвующего в метаболизме транспортных форм липидов в крови (хиломикронов и липопротеинов очень низкой плотности), в результате количество липидов в крови снижается (гиполипидемическое действие гепарина).

Полисахаридные цепи разной длины, ковалентно присоединенные к белковой основе, входят также в состав *гликопротеинов*. Они имеют нерегулярное строение, содержат маннозу, галактозу, глюкозу и их аминопроизводные,

а также N-ацетилнейраминовую кислоту. Напомним, что гликопротеины являются важным структурным компонентом клеточных мембран животных и растительных организмов (см. главу 2). К гликопротеинам относятся некоторые гормоны (тиреотропин, лютеинизирующий, фолликулостимулирующий гормоны). Гликопротеины мембран эритроцитов, определяют группу крови у человека. Также гликопротеинами являются все антитела, интерфероны, компоненты комплемента, многие белки плазмы крови, рецепторные белки и др.

6.2.4. Применение углеводов в медицине и фармации

В медицинской практике используются растворы глюкозы (5, 10, 40 %), которые при внутривенном введении пополняют объем циркулирующей крови и являются легкоусвояемым источником питания, повышающим энергетические запасы организма и улучшающим его функции.

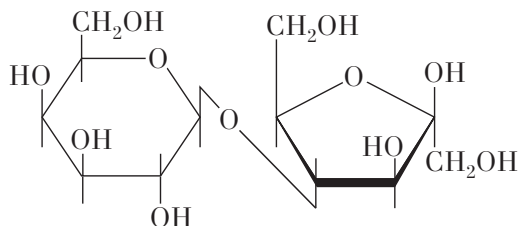
В лечебной практике используются *декстраны* в форме инфузионных растворов (Полиглюкин, Реополиглюкин, Микродез и др.). Высокомолекулярные декстраны (с М.М. около 60 кДа) применяются для восполнения объема циркулирующей крови при кровопотерях. Растворы средномолекулярных декстранов (30–40 кДа) используют в качестве дезинтоксикационных средств.

Синтетические декстраны используются в ряде коммерческих продуктов (например, Сефадекс (Sephadex)), которые применяются в хроматографии для разделения макромолекул (см. главу 2). В таких продуктах декстраны химически модифицированы путем введения поперечных сшивок, делающих их непроницаемыми для молекул определенных размеров.

Гепарин применяется для профилактики и терапии тромбоэмболий, при операциях на сердце и кровеносных сосудах, для поддержания жидкого состояния крови в аппаратах искусственного кровообращения и гемодиализа, а также для предотвращения свертывания крови при лабораторных исследованиях. Для медицинских целей гепарин получают из печени, легких и слизистой оболочки кишечника крупного рогатого скота.

Тот факт, что *гиалуроновая кислота* входит в состав многих тканей (кожа, хрящи, стекловидное тело), обуславливает ее применение в лечении катаракты, остеоартрита и др. Она используется как эндопротез синовиальной жидкости, как хирургическая среда для офтальмологических операций и как составная часть средств ухода за кожей. В косметической хирургии применяется для увеличения тканей и устранения морщин. Комбинированные препараты, содержащие гиалуроновую кислоту, хондроитинсульфат и глюкозамины (Хондроксид, Терафлекс и др.), используются для лечения остеопороза, дегенеративно-дистрофических заболеваний суставов и позвоночника.

При нарушении функции кишечника как стимулятор перистальтики используется *лактолоза* — дисахарид, синтетический стереоизомер молочного сахара (лактозы), состоящий из остатков молекул галактозы и фруктозы.



лактозула

В отличие от лактозы, лактулоза не всасывается в кишечнике человека из-за отсутствия ферментов, способных ее гидролизовать. Лактулоза повышает осмотическое давление в кишечнике, вызывая переход воды в просвет кишечника, разжижение и увеличение объема каловых масс, а также увеличивает секрецию желчи (послабляющий эффект). В толстой кишке продукты бактериального метаболизма лактулозы сдвигают pH среды в кислую сторону, угнетая тем самым рост и размножение патогенных микроорганизмов и создавая более благоприятную среду для размножения «полезных» сапрофитных бактерий. Это широко используется в лечении дисбактериозов. Лактулоза улучшает всасывание фосфатов, солей кальция и магния, способствует выведению ионов аммония. Последний эффект лактулозы нашел использование при острой и хронической печеночной недостаточности, когда нарушена способность печени обезвреживать аммиак.

Гликозиды, содержащиеся в некоторых растениях (наперстянка пурпурная, наперстянка шерстистая, строфант Комбе, ландыш), обладают выраженным стимулирующим воздействием на сердечно-сосудистую систему. Поэтому в медицинской практике их называют *сердечными гликозидами*.

В качестве антибактериальных средств используются *аминогликозидные антибиотики* (например, стрептомицин, гентамицин, эритромицин). Механизм действия аминогликозидов связан с угнетением синтеза белка.

Крахмал, целлюлоза и ее производные (метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза) находят широкое применение в фармацевтической технологии в качестве разрыхлителей, связывающих и других вспомогательных веществ.

Пектины применяются в пищевой промышленности в качестве гелеобразователей и загустителей, в фармацевтической промышленности служат основой для получения пастилок, суппозиториев, являются исходным сырьем в приготовлении гидрогелей, таблеток, мягких желатиновых и ректальных капсул, свечей. Введение пектина может усилить терапевтический эффект или снизить побочное негативное действие лекарственных средств. Так, сочетание флавоноидов с пектинами при разработке комбинированных препаратов Фластахол, Флавоглюцид усиливает их антиоксидантное действие при заболеваниях печени.

Полисахариды из водорослей, например *агароза*, применяются как желирующие вещества, которые используются в микробиологии в качестве основы питательных сред (агар-агар).

6.3. Обмен углеводов

Суточная потребность взрослого человека в углеводах составляет 400–500 г. Источником углеводов для организма человека являются углеводы пищи, из них 80 % приходится на крахмал, остальные 20 % — на сахарозу, лактозу, глюкозу и фруктозу. Грудные дети при естественном вскармливании получают только лактозу, поскольку она является единственным углеводом в составе молока.

6.3.1. Переваривание углеводов

Переваривание углеводов (рис. 6.3) начинается в ротовой полости ферментом слюны α -амилазой*, который расщепляет внутренние $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидные связи в молекуле крахмала и гликогена. При этом образуются продукты неполного гидролиза крахмала и гликогена — декстрины. В небольшом количестве образуется дисахарид — мальтоза. Следует отметить, что амилаза слюны не гидролизует гликозидные связи в дисахаридах.

В желудке переваривание углеводов тормозится, так как α -амилаза в кислой среде желудочного сока инактивируется (оптимум pH α -амилазы лежит в слабощелочной среде).

Главное место переваривания углеводов — двенадцатиперстная кишка, куда в составе панкреатического сока выделяется *панкреатическая α -амилаза*. Этот фермент завершает расщепление крахмала и гликогена, начатое амилазой слюны, до мальтозы. Гидролиз $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидной связи осуществляется ферментами кишечника *амило-1,6-гликозидазой* и *олиго-1,6-гликозидазой*.

Из остатков глюкозы, которые в молекуле крахмала находятся в местах разветвления и соединены $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидной связью, образуется дисахарид изомальтоза. Дальнейшее переваривание олигосахаридов, мальтозы, изомальтозы, сахарозы, лактозы происходит под действием специфических ферментов уже не в полости, а в стенке тонкого кишечника (пристеночное пищеварение).

Сахараза образует чаще всего комплекс с изомальтазой. Такой ферментативный *сахаразо-изомальтазный комплекс* расщепляет сахарозу на глюкозу и фруктозу, а изомальтозу — на две молекулы глюкозы. *Мальтаза* гидролизует мальтозу на две молекулы глюкозы.

Трегалаза расщепляет $\alpha(1\rightarrow1)$ -гликозидные связи в трегалозе с образованием двух молекул глюкозы.

Лактаза осуществляет гидролиз лактозы на молекулу глюкозы и молекулу галактозы.

Активность лактазы колеблется в зависимости от возраста. Так, у плода она особенно активна и сохраняется на высоком уровне до семилетнего возраста. Затем активность фермента снижается, составляя у взрослых 10 % от уровня, характерного для детей.

* α -Амилаза состоит из одной полипептидной цепи, стабилизируется кальцием и активируется ионами хлора.

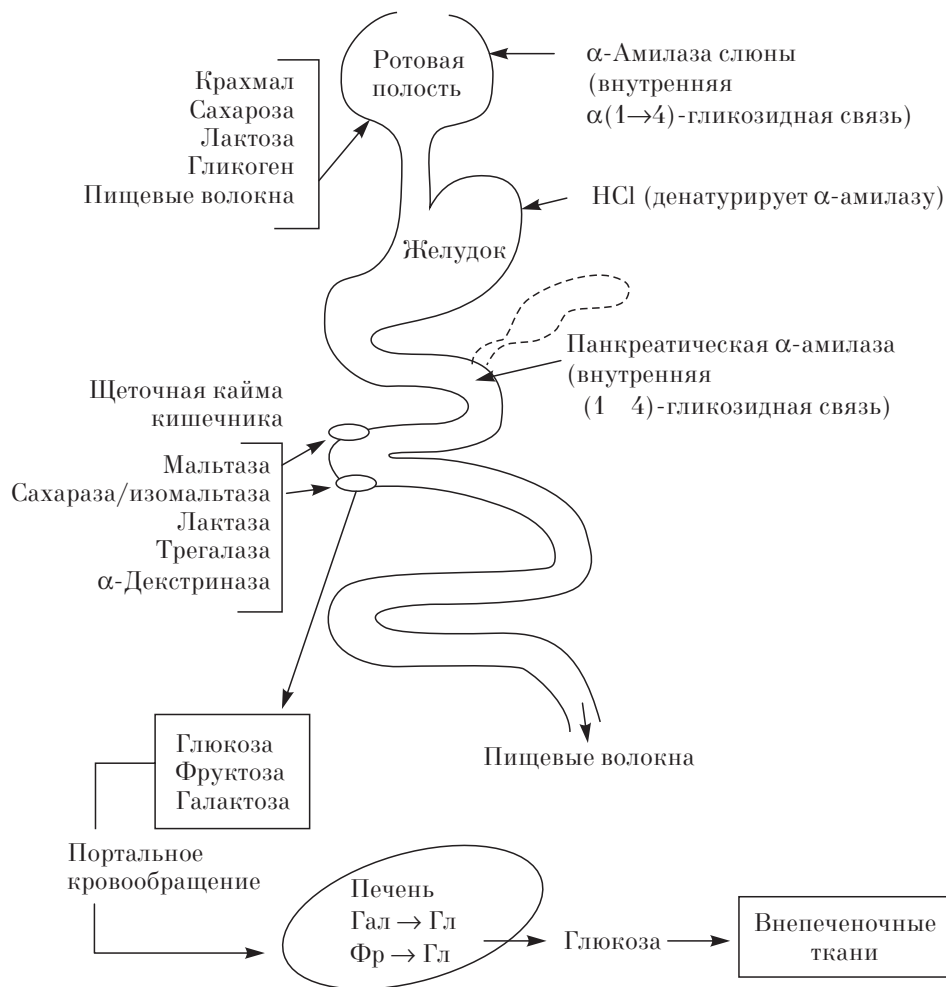


Рис. 6.3. Переваривание углеводов в желудочно-кишечном тракте (Гал — галактоза; Гл — глюкоза; Фр — фруктоза)

Конечными продуктами переваривания углеводов являются моносахариды, преимущественно глюкоза, фруктоза, галактоза. Далее в тонком кишечнике происходит всасывание моносахаридов.

Существуют лекарственные средства, уменьшающие всасывание углеводов: акарбоза и сердечные гликозиды. Акарбоза — это псевдотетрасахарид, который обратимо ингибирует панкреатическую α -амилазу и кишечную мембраносвязанную α -гликозидазу, расщепляющую олиго-, три- и дисахариды до глюкозы и других моносахаров в просвете тонкой кишки. Таким образом, акарбоза нарушает ферментативное превращение ди-, олиго- и полисахаридов в моносахариды, снижает всасывание глюкозы из кишечника. Вследствие этого уменьшается

рост концентрации глюкозы в крови после употребления углеводсодержащей пищи. Снижают абсорбцию глюкозы и сердечные гликозиды, поскольку они транспортируются тем же путем, что и активно всасываемые сахара.

6.3.2. Патология переваривания углеводов

Непереносимость лактозы. Непереносимость некоторыми людьми молока, проявляющаяся болями в животе, его вздутием (метеоризм) и поносом, обусловлена снижением активности *лактазы*. Врожденный генетический дефект отмечается у 15 % детей стран Европы и 80 % детей стран Востока, Азии, Африки, Японии. Поскольку молоко является ценным продуктом питания, а для грудных детей — особо важным, от него не следует отказываться, но необходимо перейти на потребление кисломолочных продуктов (в них под действием лактазы микроорганизмов молочный сахар разрушается).

Недостаточность сахаразы — это наследственная энзимопатия, которая возникает из-за отсутствия сахаразы и изомальтазы (всегда сочетанный дефект, поскольку они представляют собой единый ферментный комплекс). При этом соответствующие дисахариды не расщепляются и не могут быть утилизированы. Они осмотическим путем связывают воду и вызывают диарею, главным образом после приема пищи, содержащей сахар и крахмал.

6.3.3. Другие функции углеводов

Углеводы являются источниками пищевых волокон (клетчатки) — компонентов пищи, которые не перевариваются пищеварительными ферментами организма человека, но способны перерабатываться полезной микрофлорой кишечника и весьма важны в питании человека. Рекомендуется потреблять не менее 25 г пищевых волокон в сутки.

Клетчатка стимулирует перистальтику кишечника и выделение желчи, удерживает воду и увеличивает объем каловых масс, предупреждая тем самым появление запоров (профилактика рака прямой кишки). Она препятствует всасыванию холестерина пищи, адсорбирует желчные кислоты, токсины и нормализует состав микрофлоры кишечника. Пектины, будучи гелеобразователями, способны связывать тяжелые металлы, в том числе и радионуклиды, что уменьшает их поступление в ткани организма.

6.4. Всасывание глюкозы

Транспорт моносахаридов из просвета кишечника в энтероциты и далее в кровь осуществляется двумя способами (рис. 6.4):

1) по градиенту концентрации путем *облегченной диффузии* (Na^+ -независимый транспорт с участием специального, транспортирующего глюкозу, белка — глюкозного транспортера;

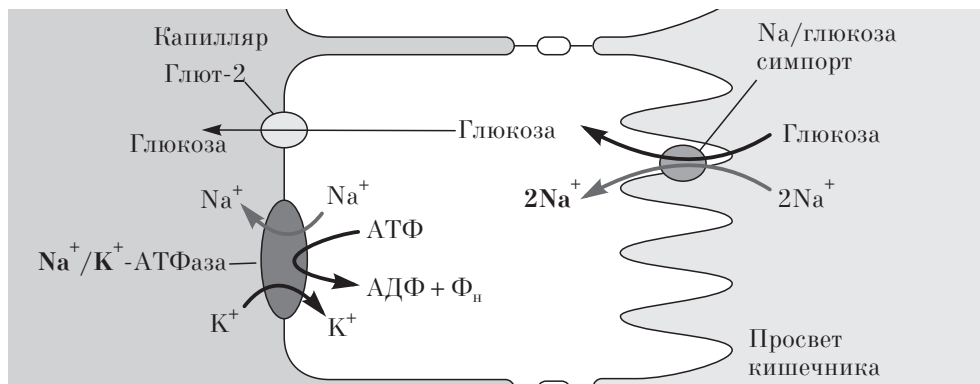


Рис. 6.4. Всасывание глюкозы в кишечнике

2) путем *активного транспорта* с затратой энергии АТФ, используемой натриевым насосом (Na^+/K^+ -АТФаза) при низкой концентрации глюкозы в кишечнике.

Всасывание пентоз происходит путем *простой диффузии*.

Транспортный белок-переносчик имеет два участка связывания на его наружной стороне: один — для натрия и один — для глюкозы. Концентрация ионов натрия очень высокая снаружи клетки и очень низкая внутри, что обеспечивает энергию для транспорта. Транспортный белок обладает специфическим свойством: его конформационное изменение не позволяет натрию двигаться внутрь клетки до тех пор, пока не присоединится молекула глюкозы. Когда прикрепляются оба вещества, происходит конформационное изменение белка-переносчика, в результате натрий и глюкоза одновременно транспортируются внутрь.

Глюкоза из энтероцитов перемещается во внеклеточную жидкость, а далее в кровь с помощью облегченной диффузии при участии *глют-2*.

Выделено пять *молекулярных форм* белка — переносчика глюкозы (глюкозных транспортеров). Они обнаружены в плазматической мембране различных тканей.

Глюкозные транспортеры имеют следующую органную локализацию:

- глют-1 — эритроциты, мозг, плацента, почки;
- глют-2 — кишечник, печень, β -клетки pancreas;
- глют-3 — в клетках многих органов и тканей, включая мозг, плаценту, почки;
- глют-4 — мышцы, сердце, жировая ткань (инсулинзависимый переносчик);
- глют-5 — тонкий кишечник (переносчик фруктозы).

В клетках всегда поддерживается резерв белков — переносчиков глюкозы. Под влиянием инсулина в миоцитах и в адипоцитах глют-4 из цитоплазматических везикул встраивается в плазматическую мембрану (рис. 6.5),

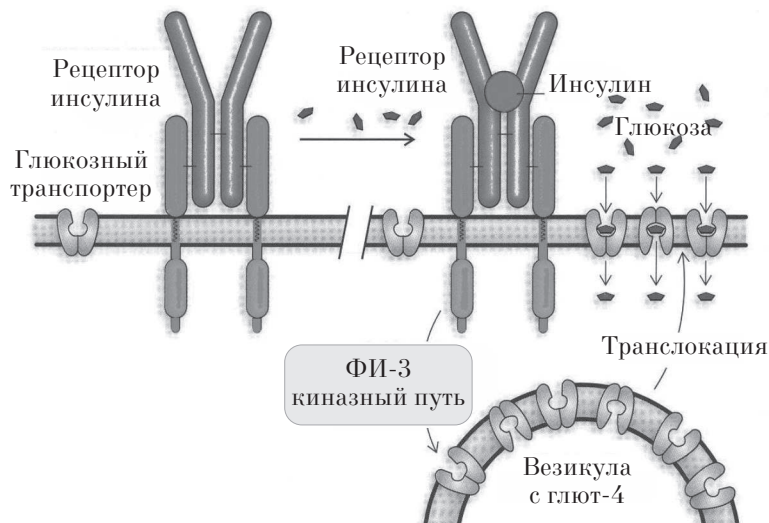


Рис. 6.5. Поступление глюкозы в инсулинзависимые ткани: ФИ-3 киназный путь — проведение в клетку сигнала посредством образования вторичного посредника инозитолтрифосфата

увеличивая, таким образом, количество поступающей в клетку глюкозы. Затем, когда содержание глюкозы в крови падает и секреция инсулина ослабляется, эти молекулы возвращаются к месту исходной локализации.

6.5. Превращение углеводов в тканях

Первой химической реакцией, которой подвергается глюкоза в клетке, является ее фосфорилирование (рис. 6.6). В отличие от свободной глюкозы, глюкозо-6-фосфат не может проходить через клеточные мембраны. Таким образом, в результате фосфорилирования глюкоза оказывается в «ловушке» и остается в клетке.

Реакция катализируется ферментами гексокиназой и глюкокиназой.

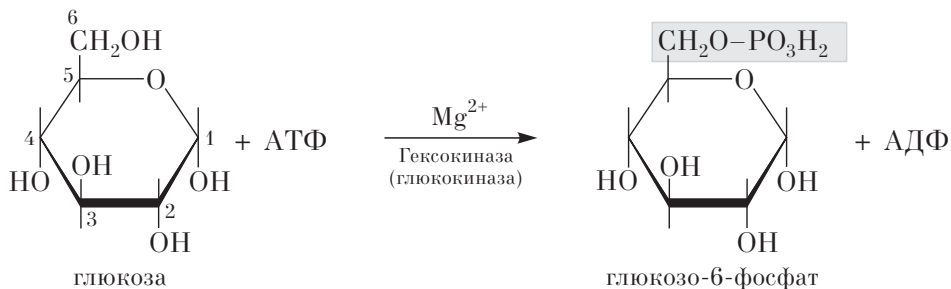


Рис. 6.6. Схема реакции фосфорилирования глюкозы $\Delta G^{\circ} = -16,7$ кДж/моль

Гексокиназа имеет высокое сродство к своему субстрату — глюкозе ($K_M < 0,1$ ммоль/л). Ее функция состоит в том, чтобы обеспечить захват тканью глюкозы даже при низких концентрациях последней в крови. Гексокиназа, фосфорилируя практически всю поступающую в клетку глюкозу, поддерживает значительный градиент концентрации глюкозы между кровью и внутриклеточной средой. Кроме того, этот фермент действует и на другие гексозы (D-фруктозу, D-маннозу, D-галактозу и т.д.), но со значительно меньшей скоростью. Наиболее важным свойством гексокиназы является ее ингибирование глюкозо-6-фосфатом, который служит одновременно и продуктом реакции, и аллостерическим ингибитором.

Глюкокиназа (изофермент гексокиназы) обнаружена только в печени и катализирует фосфорилирование только D-глюкозы. Функция глюкокиназы состоит в «захватывании» глюкозы из кровотока после приема пищи (когда концентрация глюкозы в крови повышается). В отличие от гексокиназы, она имеет высокое значение K_M (около 10 ммоль/л) для глюкозы и эффективно функционирует при концентрации глюкозы в крови выше 100 мг/100 мл.

На высоте пищеварения активирование глюкокиназы препятствует резкому увеличению концентрации глюкозы в кровотоке. В перерывах между приемами пищи для включения глюкозы в обменные процессы вполне достаточно гексокиназной активности. При сахарном диабете из-за низкой активности глюкокиназы, синтез и активность которой зависит от инсулина, глюкоза эффективно не фосфорилируется, поэтому не задерживается в печени после приема пищи и вызывает гипергликемию.

Глюкозо-6-фосфат занимает важное положение в интеграции ряда метаболических путей. С образования глюкозо-6-фосфата начинаются синтез гликогена и все пути окисления глюкозы (гликолиз, глюконеогенез, пентозофосфатный путь и гликогенолиз) (рис. 6.7).

Глюкоза может окисляться различными путями:

- окисление глюкозы в *дихотомическом пути*, протекающее как в анаэробных (гликолиз), так и в аэробных условиях. Первоначально термином «гликолиз» обозначали только анаэробное брожение, завершающееся образованием молочной кислоты (лактата). В настоящее время понятие «гликолиз» используется более широко для описания распада глюкозы как в отсутствие, так и в присутствии кислорода. Аэробный гликолиз завершается образованием конечных продуктов обмена (CO_2 и H_2O);
- окисление глюкозы и последующее отщепление 1-го углеродного атома глюкозы в *апотомическом пути* (лат. *арех* — верхушка); этот путь называется также *пентозофосфатным*;
- окисление 6-го углеродного атома глюкозы и образование глюкуроновой кислоты — *глюкуроновый путь*.

Образование глюкозы из пирувата, лактата, глицерола, аминокислот (глюконеогенез) необходимо для поддержания уровня глюкозы в крови.

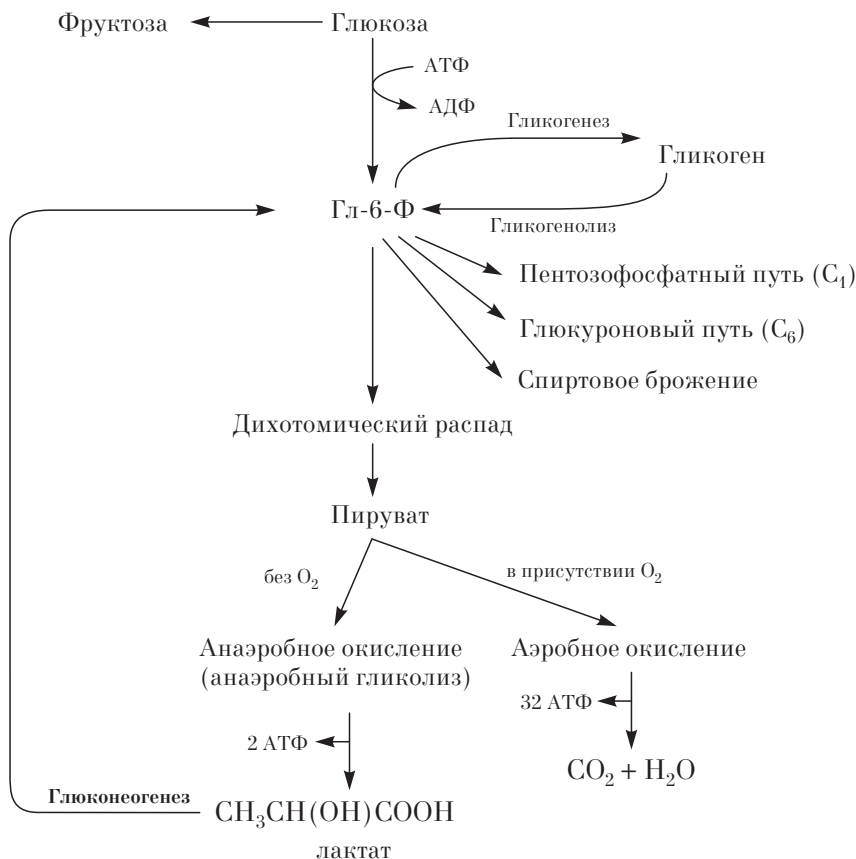


Рис. 6.7. Общая схема превращения глюкозы в клетках

Нефосфорилированная глюкоза используется некоторыми клетками в восстановительном пути ее обмена. Данный путь характерен для интимы сосудистой стенки, хрусталика глаза, шванновских клеток нервной ткани. В этом процессе из глюкозы образуется сорбитол и фруктоза.

В тканях может происходить изомеризация фосфорных эфиров, при этом глюкозо-6-фосфат переходит во фруктозо-6-фосфат и галактозо-6-фосфат.

6.6. Гликоген — резервный полисахарид

Глюкоза запасается в клетках в форме гликогена. *Гликоген* — большая ветвистая молекула, построенная из остатков α -D-глюкозы, с молекулярной массой 10^6 – 10^7 а.е.м. Линейные участки молекулы гликогена связаны $\alpha(1\rightarrow4)$ -связью, точки ветвления представлены $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидной связью. Точки ветвления приходятся в среднем на каждые 8–12 остатков глюкозы.

Разветвленная структура гликогена обеспечивает появление большого количества концевых участков. Это способствует работе ферментов, отщепляющих или присоединяющих мономеры при распаде или синтезе гликогена, так как молекулы ферментов могут одновременно работать на нескольких ветвях полисахарида. Гликоген депонируется главным образом в печени и скелетных мышцах.

Для чего организм сохраняет глюкозу в форме гликогена? Рассчитано, что если бы в печени находилось такое же количество глюкозы в свободной форме, как в форме гликогена, концентрация глюкозы в клетке составила бы 0,4 моль. Такое количество глюкозы обусловило бы очень высокое осмотическое давление среды, при котором клетка не смогла бы существовать. Если принять во внимание, что концентрация глюкозы в крови составляет около 5 ммоль, между кровью и цитоплазмой гепатоцитов возникнет высокий градиент концентрации глюкозы, и вода из крови устремится в клетки, что неизбежно приведет их к гибели. Таким образом, синтез гликогена обеспечивает неизменность осмотических свойств клетки при хранении значительных количеств глюкозы.

6.6.1. Синтез гликогена (гликогенез)

Синтез гликогена осуществляется почти во всех клетках, но депо гликогена — печень. Запас гликогена в печени может составлять примерно 10 % от ее массы (около 150 г). Мышцы могут запасать до 1 % гликогена, но так как масса мышечной ткани значительно больше массы печени, это составляет до 300 г гликогена.

Синтез гликогена (рис. 6.8) начинается с фосфорилирования глюкозы *гексокиназой* либо *глюкокиназой*.

Далее глюкозо-6-фосфат под действием *фосфоглюкомутазы* превращается в глюкозо-1-фосфат, который реагирует с УТФ, в результате чего образуется

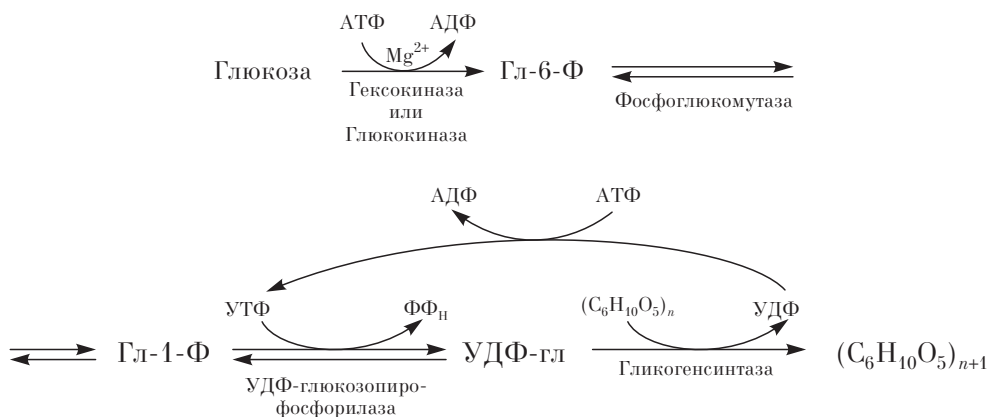


Рис. 6.8. Синтез гликогена

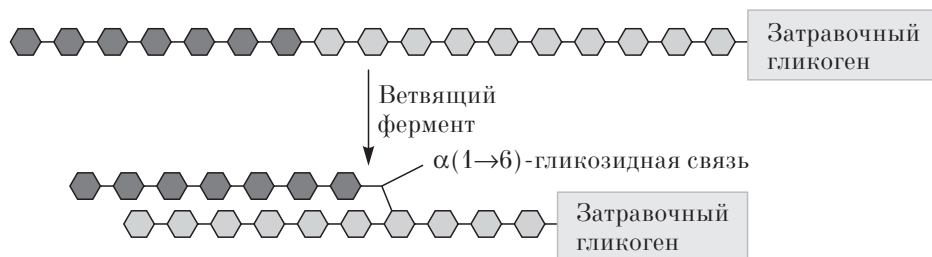


Рис. 6.9. Функционирование фермента ветвления

активная форма глюкозы — УДФ-глюкоза. Реакция катализируется ферментом *УДФ-глюкозопирофосфорилазой*. Наконец, с помощью *гликогенсинтазы* УДФ-глюкоза присоединяется к молекуле «затравочного гликогена», содержащего четыре остатка глюкозы. «Затравочным гликогеном» называется остаток внутриклеточного гликогена, связанного с белком гликогенином, который не исчезает даже при длительном голодании. Гликогенсинтаза образует $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидные связи.

Так как молекула гликогена является ветвистой, то в реакции синтеза гликогена участвует фермент ветвления — амило-(1,4 \rightarrow 1,6)-трансглюкозидаза: фермент образует (1 \rightarrow 6)-гликозидную связь, перенося 7 остатков глюкозы с одной из длинных боковых цепей гликогена, и формирует новую ветвь (рис. 6.9). Ветвление повышает гидрофильность молекулы гликогена.

Регуляция синтеза гликогена. В регуляции синтеза гликогена ключевую роль играет *гликогенсинтаза*. Фермент находится в клетке в неактивном, фосфорилированном состоянии и называется *гликогенсинтаза D* (от англ. dependent — зависимый), т.е. активность его зависит от глюкозо-6-фосфата (аллостерический активатор) и гормона инсулина.

Инсулин связывается со своим рецептором (см. главу 13) и опосредованно активирует протеинкиназу В. Протеинкиназа В, в свою очередь, фосфорилирует и активирует протеинфосфатазу, которая катализирует дефосфорилирование гликогенсинтазы D и таким образом делает ее активным ферментом (*гликогенсинтаза I*) (от англ. independent — независимый) (рис. 6.10).

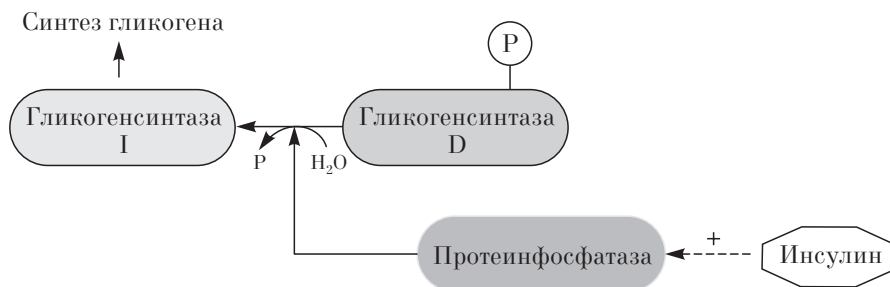


Рис. 6.10. Активирование гликогенсинтазы

Кроме того, гликогенсинтаза поддерживается в дефосфорилированном (активном) состоянии вследствие потери активности фермента, способного катализировать фосфорилирование гликогенсинтазы, — *киназы гликогенсинтазы*. Он теряет активность вследствие фосфорилирования его молекулы с помощью вышеупомянутой протеинкиназы В. Вполне возможно, что инсулин путем активации протеинфосфатаз стимулирует поддержание структуры гликогенфосфорилазы (ключевой фермент распада гликогена, см. п. 6.6.2) в дефосфорилированном, т.е. неактивном состоянии. На этом примере регуляторного воздействия инсулина нетрудно убедиться, какое всеобъемлющее значение в достижении метаболического эффекта в клетке (в данном случае — активации синтеза гликогена) принадлежит ковалентной модификации структуры ферментов путем фосфорилирования/дефосфорилирования.

6.6.2. Распад гликогена (гликогенолиз)

Пусковым механизмом гликогенолиза является снижение концентрации глюкозы в крови. Распад гликогена в мышцах происходит при мышечных сокращениях, а в печени — в перерывах между приемами пищи. Из печени глюкоза поступает в кровоток и используется для нужд нервной и других тканей организма. Функция мышечного гликогена заключается в высвобождении глюкозо-6-фосфата, потребляемого в самой мышце для окисления и получения энергии.

Расщепление гликогена начинается с конца полисахаридной цепи. При этом наличие разветвленной структуры гликогена облегчает быстрое высвобождение глюкозных остатков, так как чем больше концов имеет молекула гликогена, тем больше молекул фермента могут действовать одновременно. Распад гликогена в клетках осуществляется двумя путями:

- 1) гидролитически с участием γ -амилазы — *гидролиз*;
- 2) фосфоролитически с участием гликогенфосфорилазы — *фосфоролиз*.

Основной механизм фосфоролиза — расщепление $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидных связей с участием фосфорной кислоты и гликогенфосфорилазы (рис. 6.11). При этом высвобождается глюкозо-1-фосфат.

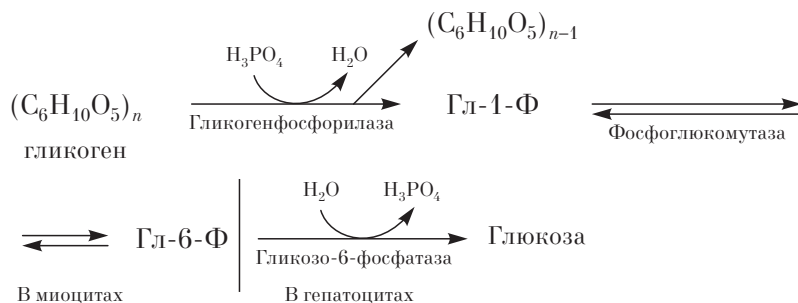


Рис. 6.11. Фосфоролиз гликогена

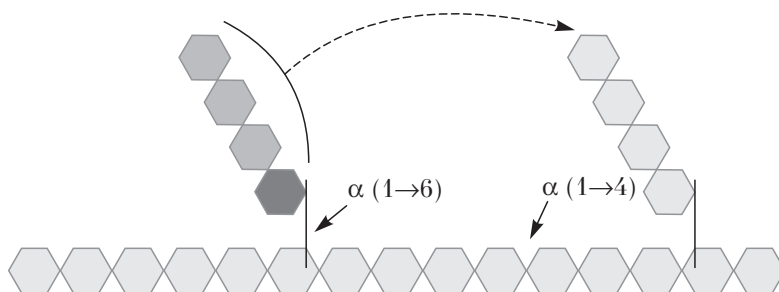


Рис. 6.12. Функционирование девящего фермента

Последовательное отщепление глюкозных остатков прекращается, когда до точки ветвления остается четыре мономера. Подобная особенность в действии гликогенфосфорилазы обусловлена размером и строением ее активного центра.

Места ветвления разъединяет *девящий фермент* — амило-(1→6)-гликозидаза (рис. 6.12). Вначале амило-(1→6)-гликозидаза переносит три остатка глюкозы на другую ветвь гликогена (трансферазная активность фермента), а затем у точки ветвления гидролизует $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидную связь и освобождает молекулу глюкозы (гликозидазная активность фермента).

Глюкозо-1-фосфат затем изомеризуется в глюкозо-6-фосфат (фермент — фосфоглюкомутаза), который затем включается в процесс катаболизма или другие метаболические пути.

В мышцах глюкозо-6-фосфат не превращается в свободную глюкозу, так как в миоцитах отсутствует фермент глюкозо-6-фосфатаза. В печени (а также в почках) под действием этого фермента образуется глюкоза. Только свободная глюкоза, в отличие от глюкозо-6-фосфата, способна проходить через плазматическую мембрану клеток в межклеточное пространство. Таким образом, печень является органом, поддерживающим нормальный уровень глюкозы в крови. В этом заключается ее огромная роль в поддержании жизнедеятельности организма.

Регуляция распада гликогена. Главным регулируемым ферментом гликогенолиза является *гликогенфосфорилаза*. Активность гликогенфосфорилазы также изменяется в результате фосфорилирования и дефосфорилирования. Фосфорилаза может находиться либо в неактивном (дефосфорилированном) состоянии — фосфорилаза *b*, либо в активном (фосфорилированном) — фосфорилаза *a*. Неактивная форма фермента превращается в активную с помощью киназы фосфорилазы *b*.

Киназа фосфорилазы *b* также может находиться в активной и неактивной формах. Активирование осуществляется цАМФ-зависимым ферментом — *протеинкиназой А*. цАМФ является внутриклеточным посредником при действии большого числа гормонов белково-пептидной природы. цАМФ образуется из АТФ под действием фермента *аденилатциклазы*, находящегося на внутренней

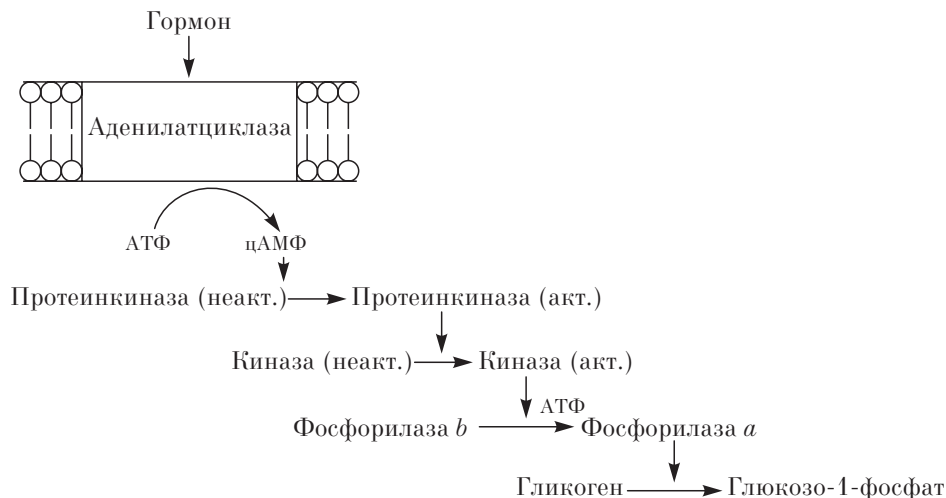


Рис. 6.13. Регуляция распада гликогена адреналином в мышцах и глюкагоном в печени

поверхности цитоплазматической мембраны клетки. Аденилатциклаза печени активируется гормоном поджелудочной железы *глюкагоном*, а аденилатциклаза мышц — адреналином (рис. 6.13). Адреналин стимулирует активность аденилатциклазы и в печени, однако это осуществляется цАМФ-независимым путем (мобилизация ионов Ca^{2+}).

Синтез и распад гликогена подчиняются сочетанному гормональному контролю, в котором принимают участие инсулин, адреналин и глюкагон (рис. 6.14). Адреналин и глюкагон, активируя аденилатциклазу, способствуют

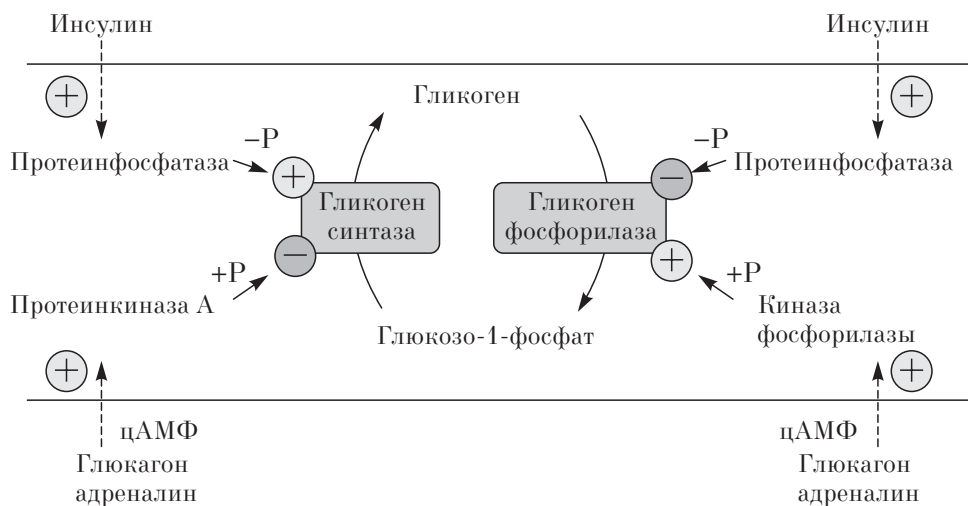


Рис. 6.14. Гормональный контроль гликогенолиза и гликогеноза

образованию цАМФ, который запускает каскадный механизм фосфорилирования ферментов распада и синтеза гликогена. В результате фосфорилирования образуется фосфорилированная (активная) гликогенфосфорилаза и фосфорилированная (неактивная) гликогенсинтаза. В этих условиях будет осуществляться *распад гликогена*.

Напротив, под действием инсулина, включающего механизм дефосфорилирования ключевых ферментов, появляется дефосфорилированная (неактивная) гликогенфосфорилаза, и дефосфорилированная (активная) гликогенсинтаза. В этих условиях будет происходить *синтез гликогена*.

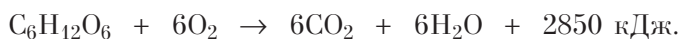
6.7. Дихотомический распад глюкозы — основной путь получения энергии в клетке

Дихотомический путь — это окислительный распад молекулы глюкозы, при котором ее углеродный скелет делится пополам с образованием двух триоз. В реакциях этого пути энергию можно получить двумя путями:

- путем *анаэробного* (при отсутствии кислорода) *распада* глюкозы до молочной кислоты. Этот процесс называется *гликолизом*. Суммарное уравнение гликолиза:



- путем *аэробного распада* глюкозы до углекислого газа и воды (аэробный распад глюкозы осуществляется подавляющим большинством тканей нашего организма). Суммарное уравнение:



При этом 60 % образующейся энергии депонируется в виде АТФ, что в 15 раз больше, чем в анаэробных условиях. Поэтому аэробный путь имеет несомненное экономическое превосходство перед анаэробным гликолизом.

6.7.1. Анаэробный гликолиз

Гликолиз (от гр. *glycys* — сладкий + *lysis* — растворение, распад) — последовательность ферментативных реакций, приводящих к превращению глюкозы в пируват с одновременным образованием АТФ. Если содержания кислорода недостаточно, как, например, в активно сокращающейся мышце, то пируват восстанавливается в лактат. Этот процесс протекает без использования кислорода и поэтому не зависит от работы митохондриальной дыхательной цепи. В аэробных условиях пируват проникает в митохондрии, где полностью окисляется до CO_2 и H_2O .

Процесс гликолиза протекает в цитоплазме клеток и катализируется одиннадцатью ферментами, большинство из которых выделено в гомогенном виде. Анаэробный гликолиз осуществляется в два этапа.

I. Подготовительный этап — дихотомический распад глюкозы на две молекулы глицеральдегид-3-фосфата (триозы) (рис. 6.15). Превращения сопровождаются затратой двух молекул АТФ. Этот этап включает следующие реакции.

1. Первой регулируемой ферментативной реакцией гликолиза является фосфорилирование, т.е. перенос остатка ортофосфата на глюкозу за счет АТФ. Реакция катализируется гексокиназой и глюкокиназой. Образование глюкозо-6-фосфата в гексокиназной реакции сопровождается освобождением значительного количества свободной энергии системы и может считаться практически необратимым процессом.

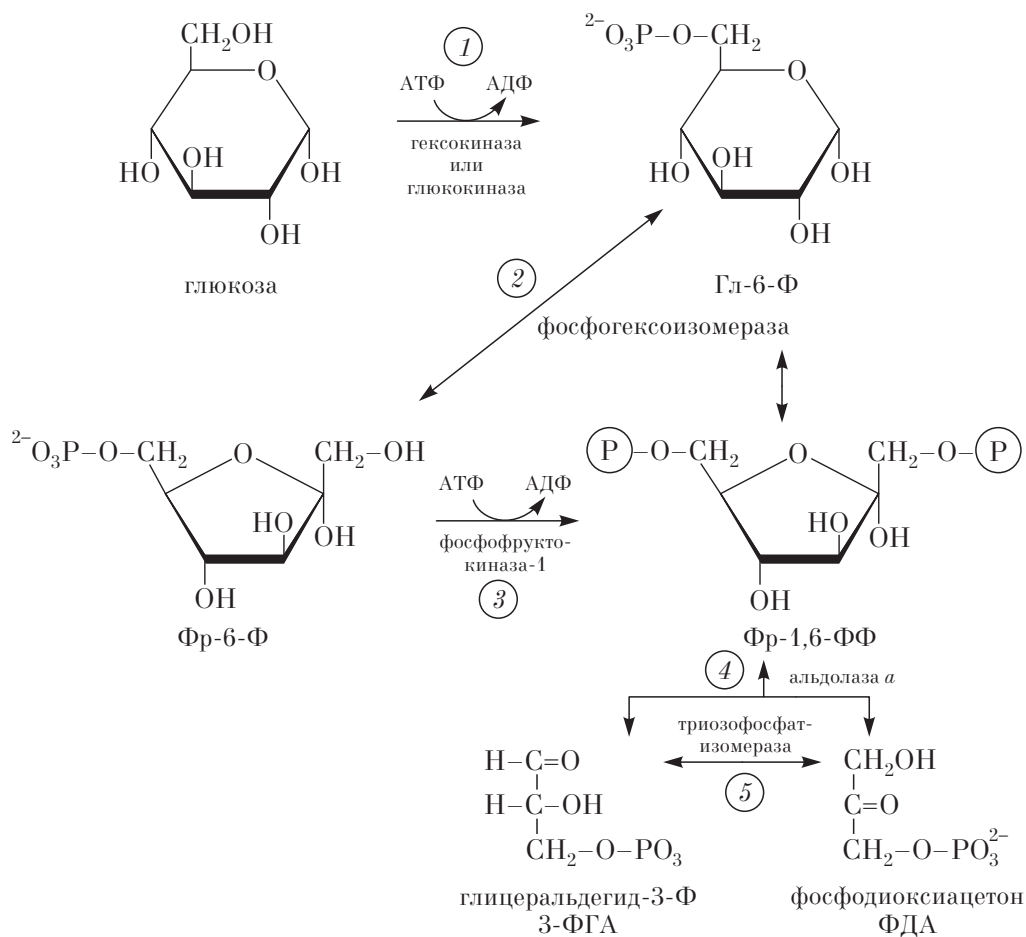


Рис. 6.15. Гликолиз (I этап — подготовительный) (1–5 — реакции)

2. Глюкозо-6-фосфат обратимо изомеризуется во фруктозо-6-фосфат ферментом фосфогексоизомеразой.

3. Образовавшийся фруктозо-6-фосфат фосфорилируется за счет второй молекулы АТФ. Аналогично гексокиназой данная реакция практически необратима, протекает в присутствии ионов магния и является самой медленной реакцией гликолиза. Фактически эта реакция определяет скорость гликолиза в целом.

Эта реакция катализируется аллостерическим ферментом *фосфофруктокиназой-1*, имеющим сложную четвертичную структуру. Аллостерическими активаторами фосфофруктокиназы-1 служат АМФ, АДФ, фруктозо-6-фосфат; аллостерическими ингибиторами — АТФ и цитрат.

Следует отметить двоякую роль АТФ: вначале эта молекула используется как субстрат реакции, а затем, связываясь с аллостерическим центром фермента, как аллостерический ингибитор. Увеличение соотношения АТФ/АМФ приводит к угнетению активности фосфофруктокиназы-1. Так, в неработающей мышце концентрация АТФ относительно высока и гликолиз заторможен. Во время работы АТФ расходуется и активность фосфофруктокиназы-1 повышается, следовательно, процесс гликолиза активизируется.

Важнейшим аллостерическим регулятором фосфофруктокиназы является фруктозо-2,6-дифосфат.

4. Обратимая реакция распада фруктозо-1,6-дифосфата на две фосфотриозы. Катализирующий ее фермент называется *альдолазой а*.

5. Изомеризация триозофосфатов, которая катализируется ферментом триозофосфатизомеразой. В последующую реакцию гликолиза непосредственно включается только один из двух образующихся триозофосфатов, поэтому равновесие реакции смещается в сторону образования глицеральдегид-3-фосфата (3-ФГА). Таким образом, первая стадия гликолиза завершается образованием двух молекул 3-ФГА.

II. *Гликолитическая оксидоредукция* включает окислительно-восстановительные реакции и реакции, сопровождающиеся синтезом АТФ путем субстратного фосфорилирования (рис. 6.16). На этом этапе окисляются две молекулы 3-ФГА, поэтому в реакциях впереди формулы субстрата следует ставить коэффициент 2. Образуются четыре молекулы АТФ — в фосфоглицераткиназной и пируваткиназной реакциях.

6. В этой реакции 3-ФГА окисляется *дегидрогеназой 3-фосфоглицеринового альдегида*. Фермент состоит из четырех одинаковых субъединиц, в состав его активного центра входит SH-группа. Дегидрогеназа 3-ФГА нуждается также в коферменте НАД⁺. Реакция обратима.

Фермент окисляет свой субстрат (3-ФГА), перенося водород альдегидной группы 3-фосфоглицеринового альдегида на кофермент НАД⁺, который при этом восстанавливается в НАДН·Н⁺ в присутствии неорганического фосфата. Выделяющейся при окислении 3-ФГА энергии достаточно для образования

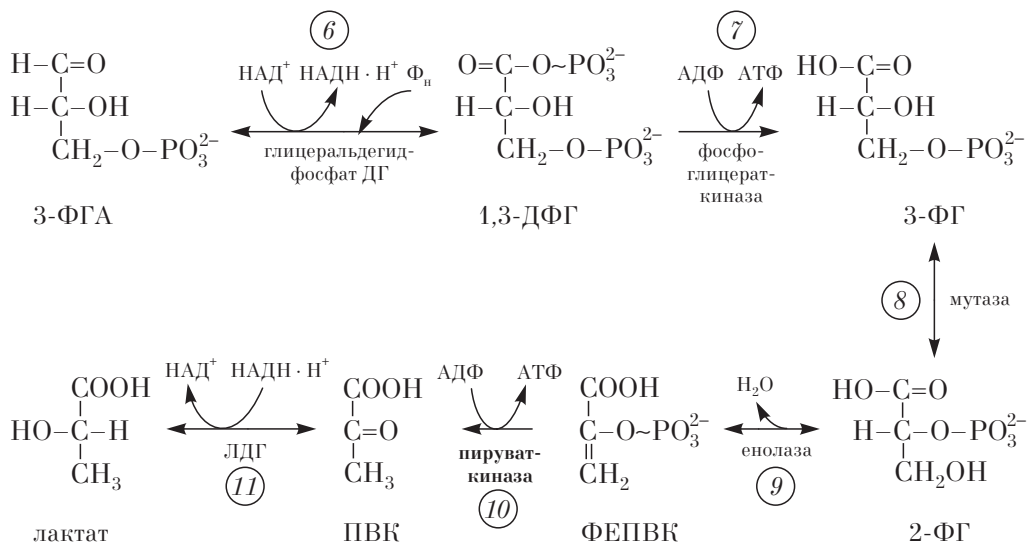


Рис. 6.16. Гликолиз (II этап — гликолитическая оксидоредукция) (6–11 реакции)

высокоэнергетического (т.е. заключающего в себе макроэнергетическую связь) соединения — 1,3-дифосфоглицериновой кислоты (1,3-ДФГК).

Образование НАДН·Н⁺ из окисленной формы этого кофермента осуществляется в ходе реакции связывания 3-ФГА с SH-группой активного центра фермента — дегидрогеназы 3-фосфоглицеринового альдегида.

7. Фосфорилирование АДФ за счет энергии макроэнергетического субстрата. Эта реакция получила название реакции *субстратного фосфорилирования*. Реакция сопровождается выделением значительного количества свободной энергии, поэтому ее равновесие сдвинуто вправо. Она может стать обратимой при избытке 3-фосфоглицерата.

8. В результате внутримолекулярного переноса фосфатной группы 3-фосфоглицерат превращается в 2-фосфоглицерат (2-ФГ). Реакция легко обратима, протекает в присутствии ионов Mg²⁺.

9. Образование макроэнергетического субстрата — фосфоенолпирувата (фосфоенолПВК). Реакция катализируется *енолазой*. Фермент активируется двухвалентными катионами Mg²⁺ или Mn²⁺ и ингибируется фторидом. Енолаза катализирует отщепление молекулы воды от 2-фосфоглицерата. В результате внутримолекулярная энергия субстрата перераспределяется таким образом, что фосфат во втором положении переходит в макроэнергетическое состояние.

10. Реакция субстратного фосфорилирования аналогична 7-й реакции: осуществляется фосфорилирование АДФ за счет энергии макроэнергетического субстрата фосфоенолпирувата. Реакция образования ПВК (пировиноградной кислоты) необратима, так как протекает со значительным падением свободной энергии. Эта реакция является регулируемой реакцией гликолиза. Фермент пируваткиназа активен в нефосфорилированной форме.

Глюкагон (в гепатоцитах) и адреналин (в миоцитах) стимулируют фосфорилирование фермента, а значит, инактивируют его. Инсулин, наоборот, стимулирует дефосфорилирование фермента, а значит, активирует его. Аллостерическим активатором этого фермента является фруктозо-1,6-дифосфат, а аллостерическими ингибиторами — АТФ и ацетил-КоА. Синтез фермента индуцирует инсулин.

11. Заключительная реакция гликолиза — образование лактата. Реакция обратима. Молочная кислота образуется при восстановлении пирувата ферментом лактатдегидрогеназой (ЛДГ), коферментом которого является НАДН·Н⁺ (образуется в ходе 6-й реакции).

Итак, гликолиз завершается образованием лактата. В мышцах молочная кислота не используется — она поступает с током крови в печень, где вновь превращается в пируват благодаря обратимости лактатдегидрогеназной реакции. Изоферменты лактатдегидрогеназы принимают участие в контроле гликолиза. Так, в сердечной мышце преобладает ЛДГ₁, который ингибируется даже небольшими концентрациями пирувата, что затрудняет образование молочной кислоты в кардиомиоцитах и способствует дальнейшему окислению (а не восстановлению) пирувата. В скелетных мышцах преобладает изофермент ЛДГ₅, активно превращающий ПВК в лактат в анаэробных условиях.

Гликолиз протекает в цитоплазме клетки, он не нуждается в участии кислорода для получения клеткой энергии. В ходе гликолиза в двух реакциях субстратного фосфорилирования (реакции 7 и 10) образуется четыре молекулы АТФ (в реакцию вступают две триозы), при этом в подготовительной стадии две молекулы АТФ расходуются (реакции 1 и 3). Таким образом, полезный энергетический выход гликолиза составляет две молекулы АТФ.

Биологическая роль гликолиза. В анаэробных условиях гликолиз — единственный процесс в животном организме, поставляющий *энергию*. Именно благодаря гликолизу в организме человека и животных в течение некоторого времени может осуществляться ряд физиологических функций в условиях недостаточности кислорода. Так, мышцы используют гликолиз в случаях, когда потребление ими кислорода при нагрузках превышает его поступление.

Для метаболизма опухолевых клеток характерно ускорение гликолиза. Объясняется это тем, что находящиеся в условиях крайне низкого снабжения кислородом злокачественные клетки вынуждены усиленно потреблять глюкозу, чтобы выработать необходимое для их бурной жизнедеятельности количество энергии.

Особое значение гликолиз имеет для эритроцитов. Эти клетки крови не имеют митохондрий и генерируют АТФ только в ходе гликолиза. Важной отличительной особенностью гликолиза в эритроцитах является то, что 1,3-бисфосфоглицерат может превращаться в 2,3-дифосфоглицерат (2,3-ДФГ), который является аллостерическим эффектором, понижающим сродство гемоглобина к кислороду. При дефиците кислорода синтез 2,3-бисфосфоглицерата усиливается. Эффектор связывается с четырьмя субъединицами гемоглобина

и уменьшает сродство к O_2 в результате стабилизации дезоксиформы. Это, в свою очередь, приводит к увеличению выхода кислорода из эритроцитов в ткани.

Нарушение гликолиза в эритроцитах может оказывать влияние на транспорт кислорода. Так, при снижении активности гексокиназы наблюдается понижение уровня 2,3-ДФГ и ненормально высокое сродство гемоглобина к кислороду, что затрудняет его отщепление при диссоциации оксигемоглобина и нарушает снабжение тканей кислородом.

Кроме энергетической функции, гликолиз может выполнять и *анаболические функции*. Метаболиты гликолиза используются для синтеза новых соединений. Так, фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат участвуют в образовании рибозо-5-фосфата — структурного компонента нуклеотидов; 3-фосфоглицерат может включаться в синтез аминокислот (серина, глицина, цистеина), а ФЕПВК — аспартата и сиаловых кислот. В печени и жировой ткани фосфодиоксиацетон (ФДА) используется как субстрат для синтеза глицерол-3-фосфата, триацилглицеролов, фосфолипидов.

6.7.2. Аэробное окисление глюкозы

Большинство животных и растительных клеток в норме находится в аэробных условиях, и глюкоза (внутриклеточное «топливо») окисляется до CO_2 и H_2O . Процесс осуществляется в три этапа (рис. 6.17).

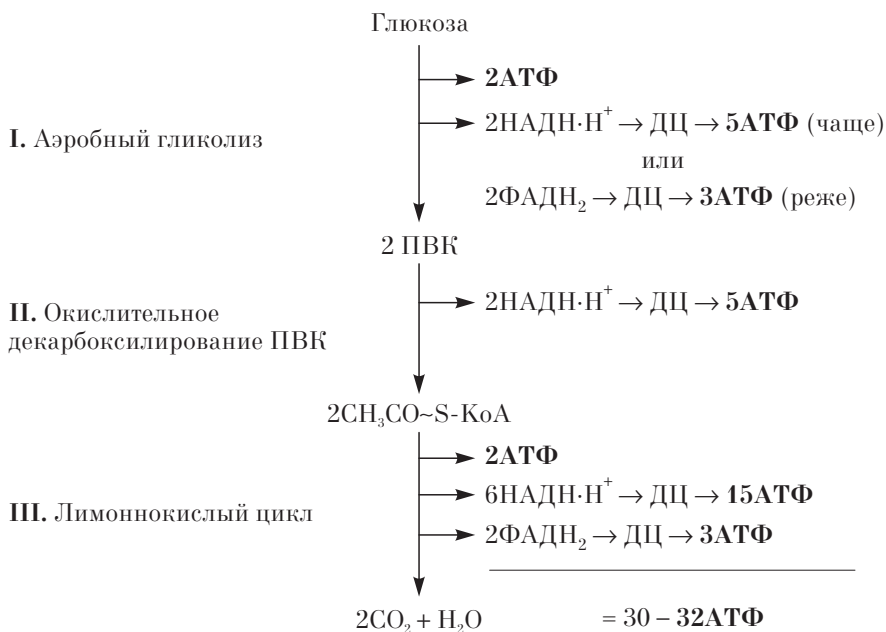
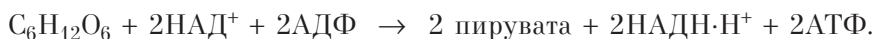


Рис. 6.17. Этапы аэробного окисления глюкозы

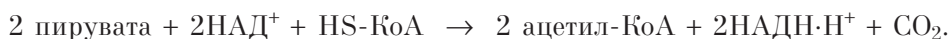
I. Аэробный гликолиз. На этом этапе происходит окисление молекулы глюкозы до двух молекул пирувата (первые 10 реакций гликолиза).

Суммарная реакция I этапа:



II. Окислительное декарбоксилирование ПВК. Образовавшийся при расщеплении глюкозы пируват не восстанавливается до лактата, а постепенно окисляется до CO_2 и H_2O в аэробной стадии катаболизма. Первоначально в матриксе митохондрий происходит окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием ацетил-КоА, которое осуществляется мультиферментным комплексом. В дальнейшем ацетил-КоА вступает в цикл Кребса.

Суммарная реакция II этапа:



Каждый восстановленный $\text{НАДН} \cdot \text{Н}^+$ в митохондриях отдает протоны и электроны в дыхательную цепь, в результате чего образуется 5 молекул АТФ ($2 \cdot 2,5$ АТФ). Эти реакции происходят только в аэробных условиях.

III. Реакции цикла Кребса. В них каждая молекула ацетил-КоА прекращает свое существование с образованием 10 АТФ. Следовательно, энергетический выход III этапа в расчете на молекулу глюкозы — 20 АТФ ($2 \cdot 10$ АТФ).

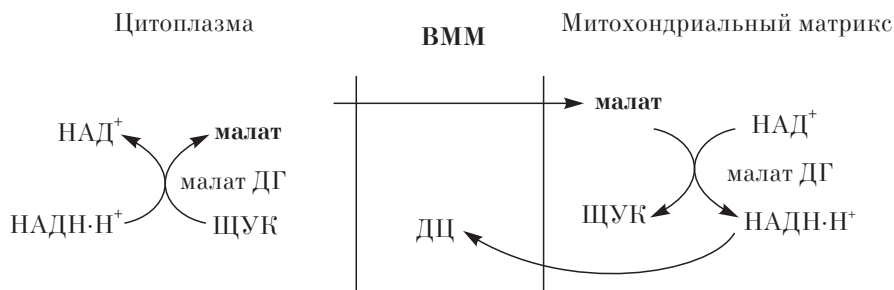
6.7.3. Челночные механизмы переноса восстановительных эквивалентов через митохондриальные мембраны

В аэробных условиях окисление восстановленного $\text{НАДН} \cdot \text{Н}^+$ происходит в митохондриях в ходе тканевого дыхания. Восстановление же НАД^+ в ходе гликолиза происходит в цитозоле. Цитозольный $\text{НАДН} \cdot \text{Н}^+$ не может передавать водород непосредственно на дыхательную цепь, поскольку внутренняя мембрана митохондрий для него непроницаема. Он отдает протоны и электроны в митохондриальную цепь переноса электронов с помощью челночных механизмов: малат-аспартатного и глицеролфосфатного (рис. 6.18). Суть этих механизмов состоит в том, что $\text{НАДН} \cdot \text{Н}^+$ в цитозоле восстанавливает соединение, способное проникать в митохондрию. В митохондриях это соединение окисляется, восстанавливая при этом внутримитохондриальный НАД^+ (*малатный челночный механизм*) или ФАД (*глицеролфосфатный челночный механизм*).

При работе малат-аспартатного челночного механизма в результате окислительного фосфорилирования, сопряженного с цепью переноса электронов, образуется 2,5 АТФ, а в случае глицеролфосфатного челночного механизма — 1,5 АТФ.

Энергетическая ценность аэробного окисления глюкозы: I этап — 5 (7) АТФ, II этап — 5 АТФ, III этап — 20 АТФ. Итого: 32 (30) АТФ (разница в 2 АТФ на I этапе зависит от челнока, который переносит протоны и электроны от $\text{НАДН} \cdot \text{Н}^+$ из цитозоля в митохондрию).

Малатный челночный механизм



Глицеролфосфатный челночный механизм

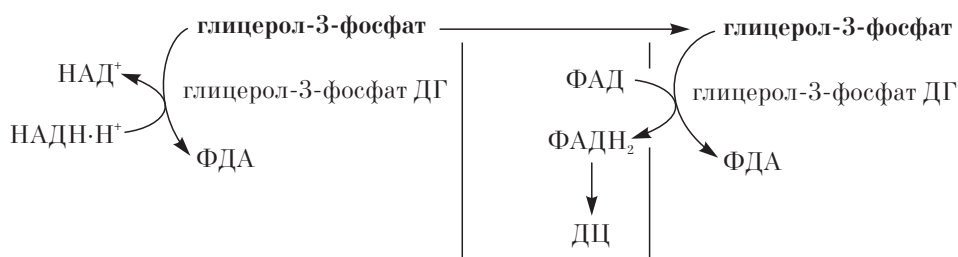


Рис. 6.18. Челночные механизмы транспорта водорода

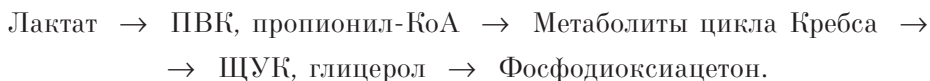
6.8. Глюконеогенез

Глюконеогенез — процесс синтеза глюкозы *de novo* из неуглеводных предшественников. В организме взрослого человека за сутки может синтезироваться до 250 г глюкозы.

Наиболее активно процесс глюконеогенеза протекает в печени (90 %), менее интенсивно — в корковом слое почек и слизистой кишечника.

Недостаток глюкозы в крови прежде всего ощущает головной мозг, который не может удовлетворить потребность в энергии за счет метаболизма других энергоемких веществ (например, жирных кислот). Главная функция глюконеогенеза заключается в поддержании уровня глюкозы в крови во время голодания, в период восстановления после мышечной нагрузки, у новорожденных в первые часы после рождения.

Субстратами глюконеогенеза являются *пируват, оксалоацетат, фосфодиоксиацетон*, которые непосредственно включаются в этот процесс, а также все вещества неуглеводной природы, дающие эти метаболиты:



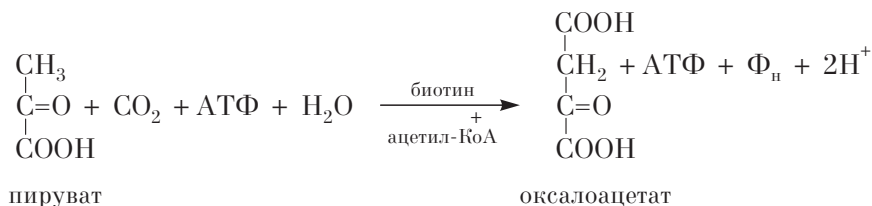
Некоторые протеиногенные аминокислоты, которые при катаболизме превращаются в пируват или метаболиты цитратного цикла, также могут рассматриваться как потенциальные предшественники глюкозы и гликогена. Поэтому они получили название **гликогенные аминокислоты**.

Включение субстратов в глюконеогенез зависит от физиологического состояния организма. Так, лактат и пируват (продукты гликолиза) постоянно используются в процессе глюконеогенеза. В период голодания или при длительной физической нагрузке используется глицерол, который высвобождается при гидролизе триацилглицеролов в жировой ткани. При длительном голодании и продолжительной мышечной работе в процесс глюконеогенеза включаются аминокислоты, образующиеся при распаде мышечных белков.

Большинство реакций глюконеогенеза совпадают с реакциями гликолиза, но протекают в обратном направлении. Однако три реакции в гликолизе, катализируемые гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой, необратимы. Соответственно, при глюконеогенезе эти барьеры обходятся с помощью четырех ферментов: пируваткарбоксилазы, фосфоенолпируваткарбоксикиназы, фруктозо-1,6-дифосфатазы и глюкозо-6-фосфатазы. Эти ферменты являются ключевыми для глюконеогенеза.

Начальный этап глюконеогенеза, идущий в обход пируваткиназной реакции гликолиза, включает две реакции, катализируемые ферментами глюконеогенеза пируваткарбоксилазой и фосфоенолпируваткарбоксикиназой.

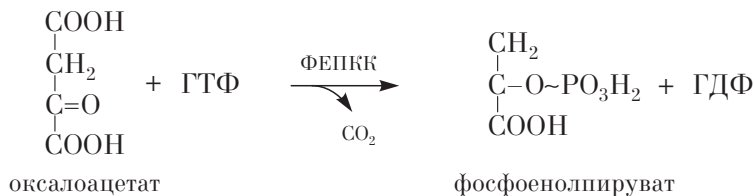
Первый фермент — *пируваткарбоксилаза* — локализуется в митохондриях. Он является биотинзависимым. Витамин Н (биотин) является коферментом этого фермента. Пируваткарбоксилаза активируется ацетил-КоА по аллостерическому механизму.



Оксалоацетат не способен проникать через митохондриальную мембрану в цитозоль, где протекают последующие реакции. При участии митохондриальной НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы он превращается в малат (яблочную кислоту), который легко покидает митохондрию и в цитозоле клетки

окисляется в оксалоацетат при участии цитоплазматической НАД⁺-зависимой малатдегидрогеназы.

Дальнейшее превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват происходит в цитозоле клетки в ходе реакции, катализируемой *фосфоенолпируваткарбоксикиназой*. Источником энергии для протекания этой реакции и фосфатной группы служит молекула ГТФ.



Далее следуют реакции гликолиза в обратном направлении до стадии образования фруктозо-1,6-дифосфата. Обход необратимой фосфофруктокиназной реакции осуществляется *фруктозо-1,6-дифосфатазой*:



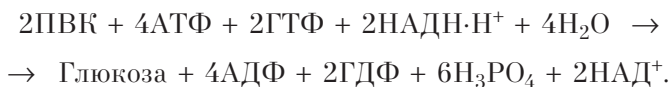
Затем следует реакция, обратная гликолизу. Наконец, в последней реакции глюконеогенеза глюкозо-6-фосфат гидролизруется до глюкозы ферментом *глюкозо-6-фосфатазой*:



Глюкозо-6-фосфатаза — важнейший фермент, ответственный за образование глюкозы из глюкозо-6-фосфата в печени и почках. Именно эти органы являются основными поставщиками глюкозы для тканей организма. Глюкозо-6-фосфатаза отсутствует в клетках мышц. Миоциты получают глюкозу из крови.

Энергетический баланс глюконеогенеза из пирувата. В ходе этого процесса расходуется 6 моль АТФ: 4 моль АТФ расходуется на стадии синтеза фосфоенолпирувата из оксалоацетата (фактически, 2 моль АТФ и 2 моль ГТФ, что равноценно 4 моль АТФ), еще 2 моль АТФ расходуется при образовании 1,3-дифосфоглицерата из 3-фосфоглицерата. В результате из 2 моль пирувата синтезируется 1 моль глюкозы.

Суммарное уравнение глюконеогенеза:



Регуляция глюконеогенеза и гликолиза осуществляется координированно. Регуляторные воздействия направлены на ферменты, катализирующие необратимые стадии гликолиза и глюконеогенеза. Они включают аллостерическую регуляцию активности ферментов, ковалентную модификацию ферментов путем фосфорилирования/дефосфорилирования, индукцию репрессии синтеза ключевых ферментов и регуляцию количества субстратов.

Аллостерическими эффекторами гликолитических ферментов и ферментов глюконеогенеза являются АТФ, АДФ и АМФ. АМФ активирует фосфофруктокиназу и ингибирует фруктозо-1,6-дифосфатазу. АТФ ингибирует пируваткиназу, а АДФ активирует пируваткарбоксилазу. Следовательно, при усилении расходования АТФ и снижении его концентрации с одновременным увеличением концентрации АМФ активируется гликолиз и образование АТФ, а глюконеогенез при этом замедляется (рис. 6.19).

Активность гексокиназы и глюкозо-6-фосфатазы регулируется уровнем *глюкозо-6-фосфата*: гексокиназа (фермент гликолиза) им ингибируется, а глюкозо-6-фосфатаза (фермент глюконеогенеза) активируется. Для пируваткиназы и пируваткарбоксилазы аллостерическим эффектором является *ацетил-КоА*, однако если для фермента глюконеогенеза он является положительным модулятором, то активность пируваткиназы ацетил-КоА, напротив, ингибирует.

Главным аллостерическим регулятором двух взаимосвязанных путей, гликолиза и глюконеогенеза, является *фруктозо-2,6-дифосфат*. Он образуется из

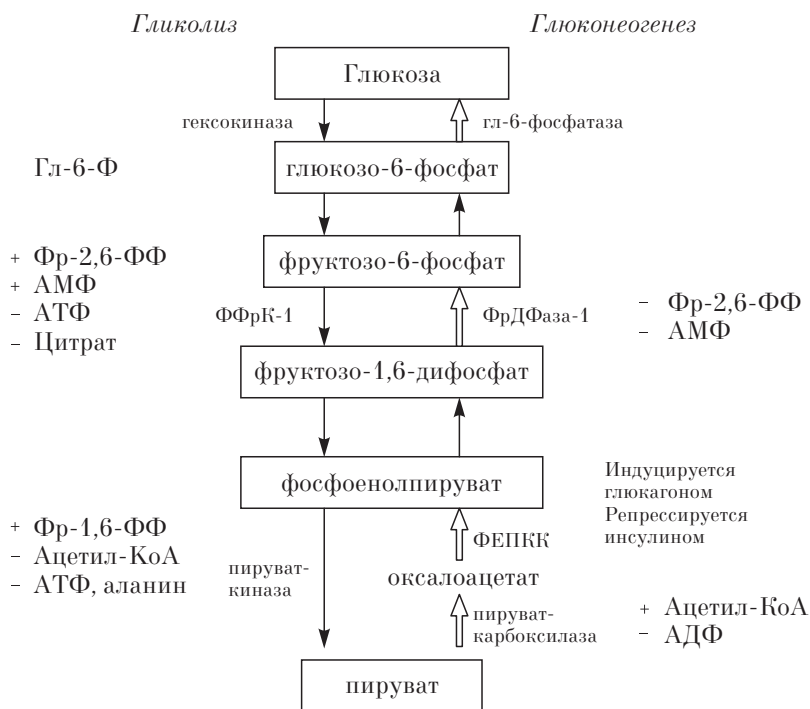


Рис. 6.19. Регуляция глюконеогенеза и гликолиза:

Гл-6-Ф — глюкозо-6-фосфат; Фр-2,6-ФФ — фруктозо-2,6-дифосфат; Фр-1,6-ФФ — фруктозо-1,6-дифосфат; ФФрК-1 — фосфофруктокиназа-1; ФрДФаза-1 — фруктозодифосфатаза-1; ФЕПФК — фосфоенолпируваткарбоксикиназа; «+» — активирование; «-» — ингибирование; толстые стрелки — лимитирующие стадии процессов с соответствующими аллостерическими эффекторами

фруктозо-6-фосфата и выполняет только регуляторные функции. Увеличение его концентрации активирует ключевой фермент гликолиза — фосфофруктокиназу-1. Снижение его концентрации активирует образование фруктозо-6-фосфата из фруктозо-1,6-дифосфата, т.е. приводит к усилению глюконеогенеза.

Образование фруктозо-2,6-дифосфата и обратную реакцию катализирует бифункциональный фермент — *фосфофруктокиназа-2* (ФФК-2). Фермент состоит из двух субъединиц, каждая из которых имеет собственный каталитический центр (рис. 6.20). Фосфорилированный фермент (фосфорилируется цАМФ-зависимой протеинкиназой А) проявляет фосфатазную активность — уменьшается образование фруктозо-2,6-дифосфата; дефосфорилированный, напротив, проявляет киназную активность, и образование фруктозо-2,6-дифосфата увеличивается. Активируемое адреналином и глюкагоном повышение фосфорилирования ФФК-2 уменьшает образование фруктозо-2,6-дифосфата, дефицит которого приводит к угнетению активности ФФК-1 и ингибированию гликолиза. Результатом уменьшения количества фруктозо-2,6-дифосфата будет переключение гликолиза на глюконеогенез. Инсулин, стимулируя синтез фруктозо-2,6-дифосфата, будет активировать ФФК-1 и стимулировать гликолиз. В то же время фруктозо-2,6-дифосфат ингибирует фруктозо-1,6-дифосфатазу (фермент глюконеогенеза).

Важнейшими регуляторами глюконеогенеза являются *глюкокортикоиды*. С одной стороны, они оказывают катаболическое действие на белки мышечной и лимфоидной ткани, что приводит к увеличению поступления аминокислот в кровотоки, с другой — индуцируют биосинтез ферментов глюконеогенеза в печени (анаболический эффект гормонов), благодаря чему поступившие в печень аминокислоты могут использоваться для синтеза глюкозы.

Глюкагон ускоряет глюконеогенез. Это достигается не только путем фосфорилирования пируваткиназы и снижением скорости гликолиза, но и путем индукции синтеза ферментов глюконеогенеза: фосфоенолпируваткарбоксикиназы,

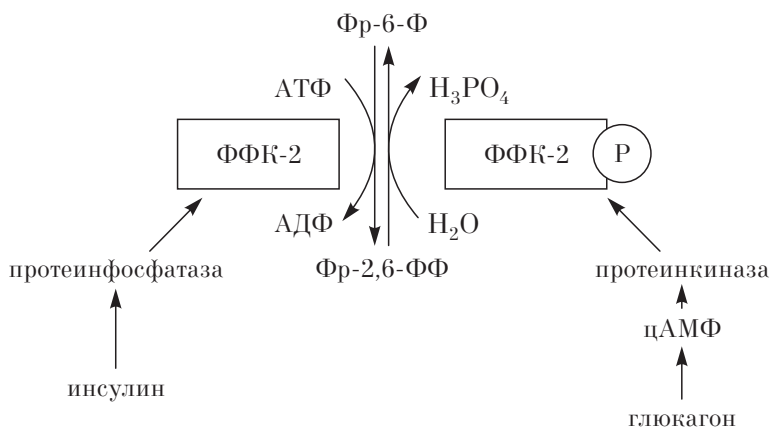


Рис. 6.20. Регуляция образования фруктозо-2,6-дифосфата

фруктозо-1,6-дифосфатазы и глюкозо-6-фосфатазы. Известно, что глюкагон влияет на активность факторов транскрипции и, таким образом, индуцирует синтез ферментов глюконеогенеза. Напротив, *инсулин* является репрессором (подавляет синтез) ключевых ферментов глюконеогенеза и одновременно индуктором синтеза ключевых ферментов гликолиза: глюкокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы.

6.9. Глюкозо-лактатный цикл (цикл Кори)

Между гликолизом, протекающим в мышцах при их интенсивной работе, и глюконеогенезом, осуществляемым печенью, существует тесная взаимосвязь: образующаяся в мышцах молочная кислота (лактат) поступает в общий кровоток, оттуда — в печень, где используется в качестве субстрата глюконеогенеза. Синтезируемая при этом глюкоза поступает в кровоток и используется мышцами для получения энергии (рис. 6.21).

Цикл Кори выполняет важнейшие функции:

- 1) обеспечивает утилизацию лактата, возвращая его в метаболический фонд углеводов (лактат используется для синтеза глюкозы);
- 2) предотвращает накопление лактата, тем самым препятствует снижению pH и развитию ацидоза.

Гиперлактатацидемия — патологическое состояние, развивающееся при увеличении продукции и (или) снижении скорости выведения из крови и тканей (недостаточной утилизацией в печени и почках) молочной кислоты, проявляющееся смещением кислотно-щелочного равновесия организма в сторону увеличения кислотности. В этих условиях равновесие реакции пируват \leftrightarrow лактат сдвинуто в сторону образования лактата.

Гиперлактатацидемия наблюдается при уменьшении доставки кислорода к тканям вследствие снижения кровотока или снижения парциального давления кислорода (тяжелые заболевания легких), при чрезмерной физической нагрузке, дефиците в организме тиамина, алкогольной интоксикации.

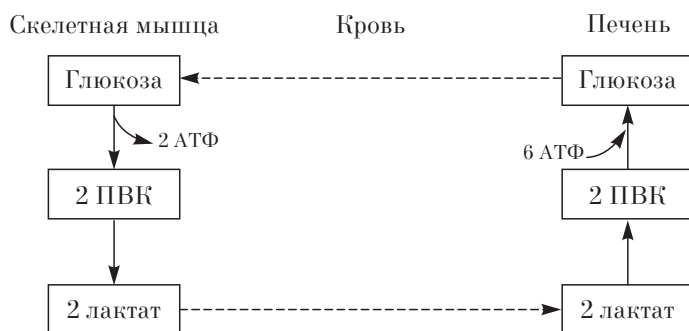


Рис. 6.21. Взаимосвязь между процессами гликолиза и глюконеогенеза (цикл Кори)

К факторам, которые способны вызывать лактатный ацидоз, относятся *бигуаниды* — гипогликемические лекарственные средства, используемые при сахарном диабете. Установлено, что бигуаниды (метформин) угнетают глюконеогенез и активируют гликолиз, что способствует увеличению содержания лактата в тканях и крови. Поэтому при применении бигуанидов существует угроза развития лактатацидоза, особенно у лиц, выполняющих тяжелую физическую работу. Кроме того, известен ряд лекарственных средств (салицилаты, антигистаминные средства, барбитураты, фруктоза, тетурам), прием которых при лечении бигуанидами усугубляет склонность к молочнокислому ацидозу.

6.10. Спиртовое брожение глюкозы

В анаэробных условиях глюкоза может превращаться в этанол. Ранее полагали, что образование этилового спирта — привилегия дрожжей и некоторых плесневых грибов. Однако уже доказано, что в тканях млекопитающих алкоголь также образуется. Он является нормальным метаболитом клеток.

Реакции спиртового брожения подобны гликолизу. Расхождение начинается только после образования пирувата (рис. 6.22). Сначала пируват подвергается прямому декарбоксилированию, продуктом которого является ацетальдегид. Данная реакция происходит при участии пируватдекарбоксилазы, тиаминпирофосфата (ТПФ) и ионов магния. Затем ацетальдегид превращается в этанол. Эту реакцию катализирует *алкогольдегидрогеназа*, коферментом которой является НАДН·Н⁺. Таким образом, продуктами спиртового брожения глюкозы являются этанол и CO₂.

В зависимости от условий процесс спиртового брожения может идти с образованием продуктов, которые в норме не образуются. Если к дрожжам, сбраживающим глюкозу, добавить бисульфит, то основным продуктом брожения будет глицерол. Оказалось, что бисульфит образует комплекс с ацетальдегидом и последний не может больше функционировать как акцептор электронов. Этот прием применяется для промышленного получения глицерола, который широко используется в фармацевтической промышленности.

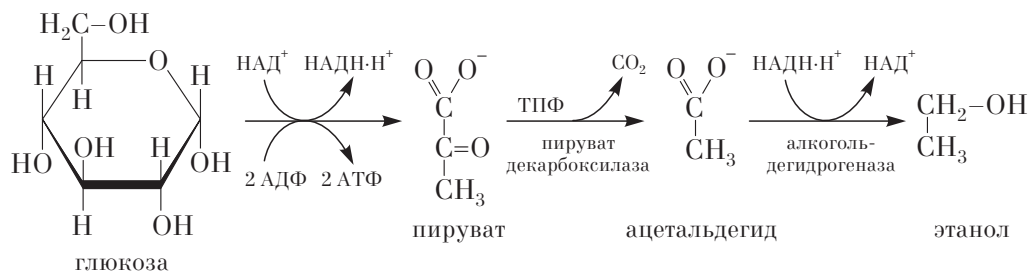


Рис. 6.22. Спиртовое брожение глюкозы

6.11. Восстановительный путь обмена глюкозы

Восстановительный путь обмена глюкозы протекает преимущественно в эндотелии сосудов, эритроцитах, хрусталике глаза и нервной ткани. Значение этого альтернативного пути метаболизма глюкозы определяется тем обстоятельством, что его активность зависит от концентрации глюкозы в крови и не зависит от присутствия инсулина. Он активируется при увеличении концентрации глюкозы в крови. В этом процессе участвуют два фермента. Альдозоредуктаза восстанавливает глюкозу в сорбитол^{*}, который затем окисляется до фруктозы в присутствии НАД⁺ и сорбитолдегидрогеназы (рис. 6.23). Последняя реакция является обратимой. Тот же фермент (сорбитолдегидрогеназа) катализирует обратную реакцию — восстановление фруктозы в сорбитол.

Сорбитол плохо проникает через клеточные мембраны, отличается высокой гидрофильностью и его накопление в клетках может служить причиной повышения в них осмотического давления. Установлено, что длительная гипергликемия, наблюдаемая при сахарном диабете, способствует повышению скорости образования сорбитола и его накоплению в тканях, что вызывает их набухание, нарушение микроциркуляции и трофики. Это одна из причин развития осложнений диабета (нейропатии, ретинопатии, катаракты и др.).

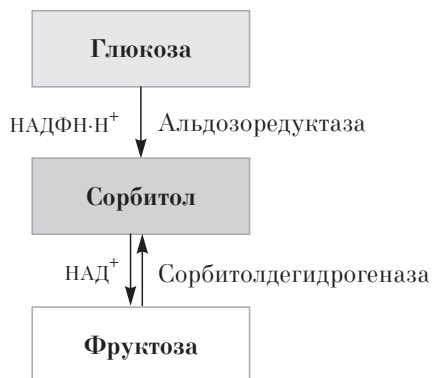


Рис. 6.23. Восстановительный путь обмена глюкозы

Экспериментальные работы по поиску эффективных ингибиторов альдозоредуктазы для лечения диабетической нейропатии и ретинопатии продолжаются.

6.12. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы

Пентозофосфатный путь (ПФП) обмена углеводов нередко называют *апо-томическим путем*, так как обмен глюкозы идет по первому (C₁) атому углерода. Превращение глюкозы по ПФП не требует присутствия кислорода.

^{*} Сорбитол обладает сладким вкусом и используется как заменитель сахара. При приеме внутрь оказывает диуретическое, желчегонное и слабительное действие.

Доля ПФП в количественном превращении глюкозы в клетках обычно невелика (в большинстве клеток не более 10 %) и варьируется в зависимости от типа ткани и ее функционального состояния. Так, в клетках печени по этому пути превращается около 30 % глюкозы, в адипоцитах — 20 %, в эритроцитах — 7 %, в клетках мозга — около 2 %.

Пентозофосфатный путь можно разделить на два этапа: окислительный и неокислительный. Ферменты пентозофосфатного пути локализуются в цитоплазме.

I. Окислительный этап. На этом этапе осуществляется прямое окисление глюкозо-6-фосфата, восстановление двух молекул НАДФ⁺ ($2\text{НАДФ}^+ \rightarrow 2\text{НАДФН}\cdot\text{H}^+$), образование рибулозо-5-фосфата и освобождение CO_2 (рис. 6.24, а).

1. Дегидрирование глюкозо-6-фосфата при участии *глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы* с образованием δ -лактона 6-фосфоглюконовой кислоты и НАДФН \cdot H⁺ (НАДФ⁺ — кофермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы).

2. Гидролиз 6-фосфоглюконолактона *глюконолактонгидролазой*. Продукт реакции — 6-фосфоглюконат.

3. Дегидрирование и декарбоксилирование 6-фосфоглюконолактона ферментом *6-фосфоглюконатдегидрогеназой*, коферментом которого является НАДФ⁺. В ходе реакции восстанавливается кофермент и отщепляется C_1 глюкозы с образованием рибулозо-5-фосфата.

II. Неокислительный этап (этап межмолекулярных перегруппировок). В отличие от первого, окислительного, все реакции этого этапа ПФП обратимы. На этом этапе происходят взаимопревращения сахаров (фосфотриоз, фосфотетроз, фосфопентоз, фосфогексоз, фосфогентулоз, фосфооктулоз), в результате которых регенерирует глюкозо-6-фосфат.

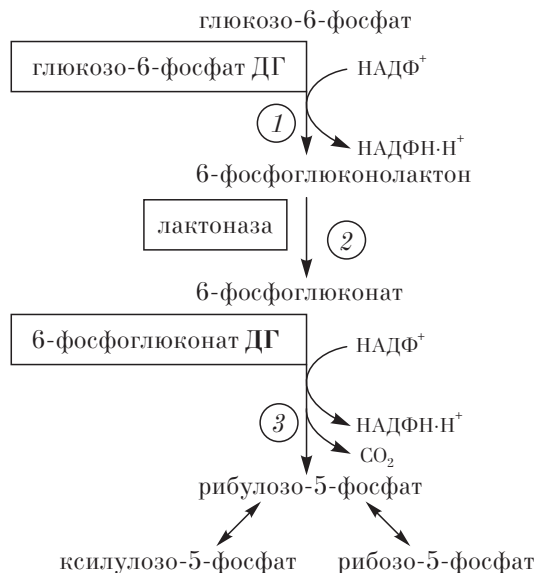


Рис. 6.24. Пентозофосфатный путь (окислительный этап) (1–3 — реакции)

Два основных фермента катализируют превращения на неокислительном этапе: *транскетолаза* катализирует перенос двухуглеродных фрагментов, *трансальдолаза* — перенос трехуглеродных фрагментов.

В реакцию вначале вступают рибозо-5-фосфат и ксилулозо-5-фосфат — *транскетолазная реакция*: транскетолаза (кофермент — тиаминпирофосфат, активная форма витамина В₁) отщепляет 2С-фрагмент от ксилулозо-5-фосфата и переносит на рибозо-5-фосфат. Затем два образовавшихся соединения реагируют друг с другом в *трансальдолазной реакции*. При этом в результате переноса трехуглеродного фрагмента от седогентулозо-7-фосфата на 3-ФГА (3-фосфоглицериновый альдегид) образуются эритрозо-4-фосфат и фруктозо-6-фосфат (рис. 6.25).

Значение пентозофосфатного пути окисления глюкозы. ПФП широко представлен в природе и обнаружен у животных, растений и микроорганизмов. У растений реакции пентозофосфатного пути в обратном направлении составляют основу *темновых реакций фотосинтеза* — цикл Кальвина (образование глюкозы из CO₂ (см. п. 5.8.7).

Интенсивность протекания реакций ПФП зависит от потребности клеток в продуктах реакций и различается в разных тканях. У человека реакции окислительного этапа активно протекают в клетках печени, жировой ткани, эмбриональной ткани, в коре надпочечников, щитовидной железе, половых железах, в клетках молочной железы в период грудного вскармливания, костном мозге, эритроцитах.

ПФП — основной источник НАДФН·H⁺, который используется как донор водорода в реакциях восстановления и гидроксирования. Надо заметить,

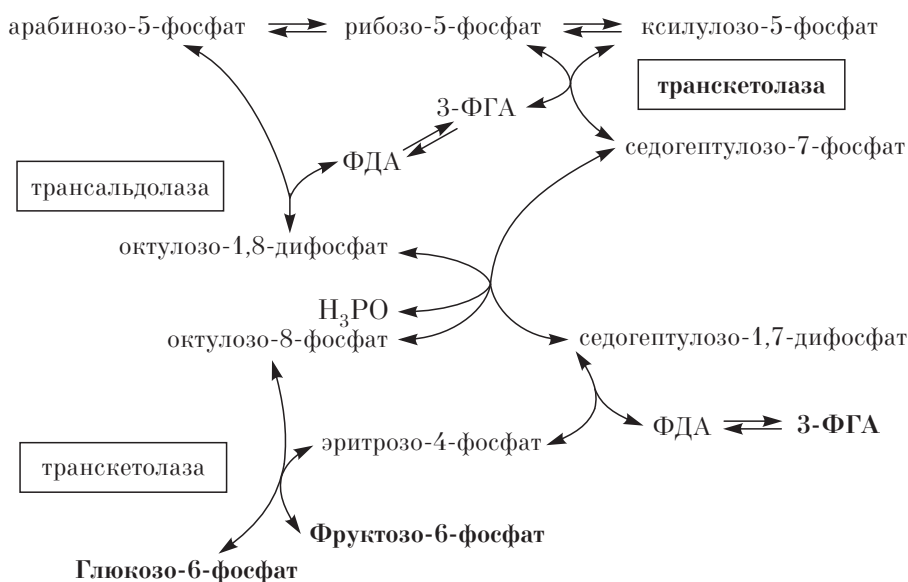


Рис. 6.25. Пентозофосфатный путь (неокислительный этап)

что НАДФН·Н⁺, в отличие от НАДН·Н⁺, не участвует в окислительном фосфорилировании, протекающем в митохондриях и, таким образом, не используется для получения энергии. Этот кофермент используется в клетках как восстановитель в реакциях синтеза жирных кислот, холестерина, стероидных гормонов, желчных кислот; в реакциях восстановительного аминирования α-кетоглутаровой кислоты (НАДФН·Н⁺ как кофермент глутаматдегидрогеназы); в глюкуроновом пути окисления глюкозы и др.

НАДФН·Н⁺ участвует в реакциях гидроксирования при синтезе стероидных гормонов, при обезвреживании ксенобиотиков, лекарственных веществ, этанола и др., которые осуществляются с участием микросомной цитохром Р₄₅₀-зависимой оксигеназой системы окисления.

Фагоциты с использованием НАДФН·Н⁺ генерируют супероксидные анион-радикалы, выполняющие основную роль в разрушении поглощенных бактериальных клеток. Поэтому недостаточная продукция НАДФН·Н⁺ вследствие нарушения ПФП способствует хронизации инфекционных заболеваний.

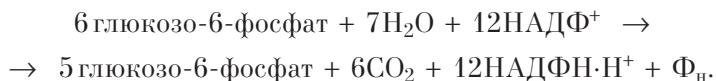
Эритроциты нуждаются в коферменте НАДФН·Н⁺ для восстановления важного антиоксиданта клеток — глутатиона. Совместно с витамином С восстановленный глутатион играет основную роль в предупреждении образования метгемоглобина. Дело в том, что глутатион-SH является активной частью глутатионпероксидазы. Этот фермент способствует устранению токсического влияния пероксида водорода и других перекисей, окисляющих железо гемоглобина и нарушающих его кислородтранспортную функцию.

Велико значение пентозофосфатного пути как *поставщика рибозы-5-фосфата*, необходимого для построения мононуклеотидов (АМФ, АДФ, АТФ, ГМФ и т.д.), олигонуклеотидов, коферментов (ФМН, ФАД, НАД, НАДФ), нуклеиновых кислот.

Пентозофосфатный путь тесно связан с *гликолизмом*, поскольку у них общие метаболиты (глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат, 3-ФГА). Эти процессы способны переключаться друг на друга в зависимости от соотношения концентраций промежуточных продуктов, образовавшихся в клетке. Например, в ПФП регенерируют моносахариды (глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат). С другой стороны, избыток пентоз может быть устранен за счет превращения в гексозы посредством реакций неокислительного этапа ПФП.

Циклический характер ПФП. Окислительный этап образования фосфопентоз и неокислительный этап (путь превращения фосфопентоз в фосфогексозы) вместе составляют циклический процесс.

Общее уравнение окислительной и неокислительной частей пентозофосфатного пути можно представить в следующем виде:



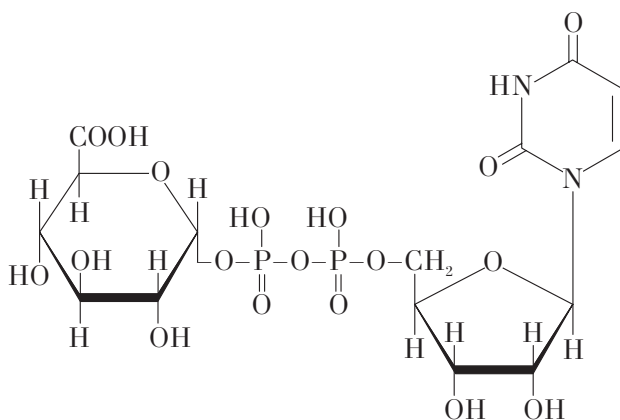
Это означает, что из шести молекул глюкозы образуется шесть молекул рибулозо-5-фосфат (пентозы) и шесть молекул СО₂. Ферменты неокислитель-

ной фазы превращают шесть молекул рибулозо-5-фосфата в 5 молекул глюкозо-6-фосфата (гексозы). При последовательном проведении этих реакций единственным полезным продуктом является НАДФН·Н⁺, образующийся в окислительной фазе пентозофосфатного пути. Такой процесс называют *пентозофосфатным циклом*. Протекание пентозофосфатного цикла позволяет клеткам продуцировать НАДФН·Н⁺, не накапливая пентозы. Пентозофосфатный цикл функционирует главным образом в жировой ткани и печени.

Регуляция пентозофосфатного пути, в основном, осуществляется на уровне дегидрогеназ. Инсулин индуцирует биосинтез глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконат-дегидрогеназы. Активность дегидрогеназ увеличивается при поступлении углеводов в организм и снижается при голодании и диабете. Именно поэтому они считаются адаптивными ферментами. Увеличение уровня НАДФН·Н⁺ аллостерически ингибирует в клетке окисление глюкозы в ПФП.

6.13. Глюкуроновый путь обмена глюкозы

Глюкуроновый путь (или путь уроновых кислот^{*}) является альтернативным путем окисления глюкозы. Он идет без образования АТФ и используется для получения активной формы глюкуроната — *УДФ-глюкуроновой кислоты*. Ее роль связана с обезвреживанием и выведением из организма продуктов метаболизма эндогенных веществ и ксенобиотиков, главным образом лекарственных препаратов.



УДФ-глюкуроновая кислота

* Уроновые кислоты (глюкуроновые кислоты) — монокарбоновые кислоты общей формулы $\text{OHC}_2[\text{CH}(\text{OH})]_n\text{COOH}$, являющиеся продуктами окисления терминальной гидроксиметильной группы альдоз в карбоксильную группу. Уроновые кислоты получают из растительного сырья: D-галактуриновую кислоту — ферментативным гидролизом пектинов, катализируемым полигалактуроназой, L-гулуроновую и D-маннуриновую кислоты — гидролизом альгиновых кислот водорослей. Входят в состав биополимеров как растительного, так и животного происхождения.

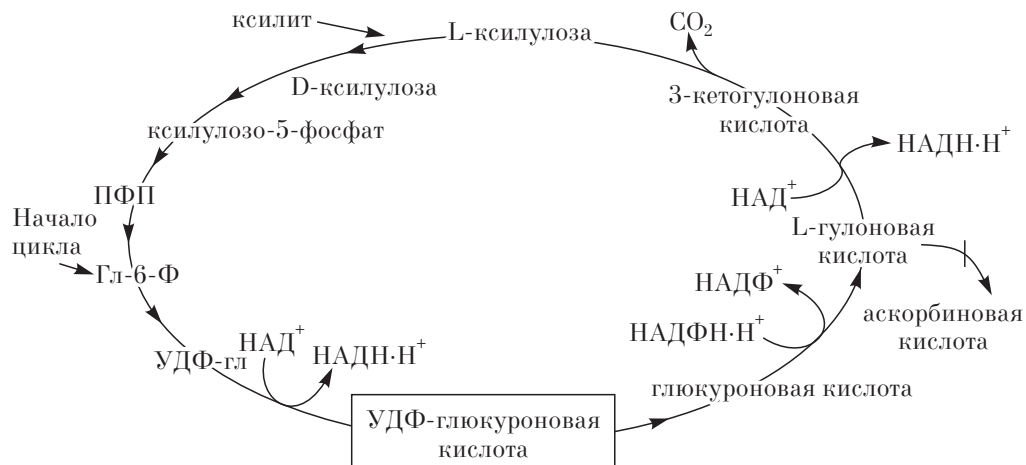


Рис. 6.26. Глюкуроновый путь окисления глюкозы

Глюкуроновый путь (рис. 6.26) осуществляется в печени и в клетках соединительной ткани. Начальный этап пути (образование УДФ-глюкозы) аналогичен реакциям синтеза гликогена. Далее УДФ-глюкоза окисляется дегидрогеназой в УДФ-глюкуроновую кислоту, которая превращается в глюкуроновую кислоту. В следующей реакции глюкуроновая кислота восстанавливается НАДФ-зависимой дегидрогеназой до L-гулоновой кислоты.

Последняя окисляется до 3-кетогулоновой кислоты, которая, декарбоксилируясь, превращается в L-ксилулозу. В организме большинства животных гулоновая кислота служит предшественником витамина С.

Аскорбат синтезируется из гулоновой кислоты с участием двух специфических ферментов. В организме человека, морской свинки, индийской летучей мыши и обезьяны аскорбиновая кислота (витамин С) не синтезируется, потому что у них отсутствует фермент гулонолактоноксидаза. Предполагается, что некогда все организмы располагали набором ферментов, необходимых для синтеза аскорбата, но затем какие-то виды утратили эту способность к синтезу вследствие мутации, которая, однако, не оказалась для них летальной, поскольку обычную пищу данного вида составляли богатые витамином С растения.

Ксилулоза может включаться в пентозофосфатный путь обмена углеводов только в виде D-изомера. Изомеризация L-формы в D-форму осуществляется НАДФ-зависимыми дегидрогеназами через стадию образования спирта ксилита ($\text{ксилит} + \text{НАД}^+ \rightarrow \text{D-ксилулоза} + \text{НАДФН} \cdot \text{H}^+$). Заключительный этап глюкуронового пути (от ксилулозо-5-фосфата до глюкозо-6-фосфата) совпадает с неокислительным этапом ПФП.

Значение глюкуронового пути. Именно этим путем синтезируется аскорбиновая кислота в растениях и у тех животных, которые способны обеспечить себя витамином С.

В гепатоцитах *УДФ-глюкуроновая кислота* участвует в обезвреживании веществ, связывая продукты метаболизма, например стероидные гормоны, билирубин, продукты гниения белков, лекарственные препараты и другие ксенобиотики (амины, тиолы, фенолы, карбоновые кислоты) в виде водорастворимых глюкуронидов, которые легко выводятся с желчью и мочой из организма. В фибробластах *УДФ-глюкуроновая кислота* используется для синтеза гетерополисахаридов (гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфатов, дерматансульфатов, гепарина).

Через глюкуроновый путь происходит включение пищевого ксилита в обмен углеводов. Ксилит ($\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_3\text{CH}_2\text{OH}$) по структуре относится к многоатомным спиртам, имеет сладкий вкус, применяется как заменитель сахара для больных сахарным диабетом и ожирением. При внутривенном введении ксилит быстро оказывается в печени (80 %). Окисляясь до CO_2 (50–68 %), он является эффективным источником энергии (4,0 ккал/г). Ксилит используется при производстве жевательных резинок и в качестве стабилизатора в растворах лекарственных препаратов.

6.14. Регуляция углеводного обмена

Основным показателем состояния углеводного обмена является *содержание глюкозы в крови*.

Глюкоза равномерно распределяется между плазмой и форменными элементами крови, поэтому ее содержание можно определять как в сыворотке, так и в цельной крови. В цельной крови содержание глюкозы составляет 3,9–6,1 ммоль/л, в плазме крови — 3,3–5,5 ммоль/л. Содержание глюкозы в артериальной крови выше, чем в венозной, что объясняется постоянным использованием глюкозы клетками.

Источниками глюкозы крови являются углеводы пищи, гликоген печени и синтез глюкозы из неуглеводных источников.

Постоянство уровня глюкозы в крови — важнейшее условие поддержания нормальной жизнедеятельности организма. Уровень глюкозы в крови регулируется центральной нервной системой, гормонами и печенью.

Печень — единственный орган, депонирующий глюкозу (в виде гликогена) для нужд всего организма. Благодаря активной глюкозо-6-фосфатазе в гепатоцитах из гликогена высвобождается свободная глюкоза, которая, в отличие от ее фосфорилированных форм, проникает через мембрану клеток и поступает в общий круг кровообращения.

Выраженное регуляторное влияние на углеводный обмен оказывает гормон *инсулин*. Это единственный гормон, благодаря которому уровень глюкозы в крови снижается. Во-первых, инсулин ускоряет поступление глюкозы из крови в клетки. Это происходит в результате связывания инсулина со своим рецептором на плазматической мембране и последующего перемещения белков — переносчиков глюкозы (глют 4) из цитозоля в мембрану. В результате глюкоза

эффективно поступает через мембрану в клетки, снабженные таким переносчиком (адипоциты и миоциты).

Во-вторых, инсулин задерживает глюкозу в клетках и активирует ее использование путем:

- индукции синтеза и активирования ключевых ферментов гликолиза (глюкокиназы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы);
- пентозофосфатного пути (дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата);
- усиления синтеза гликогена за счет стимуляции образования глюкозо-6-фосфата и активирования гликогенсинтазы;
- одновременно инсулин ингибирует гликогенфосфорилазу, т.е. тормозит распад гликогена;
- торможения активности ключевых ферментов глюконеогенеза (пируваткарбоксилазы, фосфоенолпируваткарбоксикиназы, фруктозо-1,6-дифосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы) и снижения интенсивности их синтеза.

Глюкагон и *адреналин* приводят к увеличению концентрации глюкозы в крови путем усиления распада гликогена в печени (активирование гликогенфосфорилазы). Особенность глюкагона состоит в том, что в отличие от адреналина он не влияет на гликогенфосфорилазу мышц. Кроме того, глюкагон активирует глюконеогенез в печени, что также способствует увеличению концентрации глюкозы в крови.

Глюкокортикоиды вызывают повышение уровня глюкозы в крови за счет стимуляции глюконеогенеза. Под влиянием этих гормонов ускоряется катаболизм белков в мышечной и лимфоидной тканях, в результате увеличивается поступление аминокислот в кровь, а затем в печень. В печени аминокислоты служат исходным субстратом для глюконеогенеза.

Гормон роста увеличивает концентрацию глюкозы в крови опосредованно. Он стимулирует распад липидов, в результате нарастает уровень жирных кислот в крови и клетках. Тем самым снижается потребность клеток в глюкозе.

Тироксин, особенно при гиперфункции щитовидной железы, способствует повышению уровня глюкозы в крови за счет увеличения распада гликогена.

Направление метаболизма глюкозы в клетке зависит от энергетического потенциала и регулируется отношениями АТФ/АДФ и НАД⁺/НАДН·Н⁺. АДФ является аллостерическим активатором регуляторных ферментов гликолиза и ингибитором ферментов глюконеогенеза. АТФ, напротив, активирует синтез глюкозы и ингибирует гликолиз.

6.15. Нарушения обмена углеводов

Гипергликемия — клинический симптом, обозначающий увеличение содержания глюкозы в крови по сравнению с нормой (выше 6,1 ммоль/л). Наиболее часто гипергликемия развивается у больных сахарным диабетом. Также

гипергликемия наблюдается при гипертиреозе, повышении гормональной активности коры и мозгового слоя надпочечников, гипофиза, сильных эмоциональных и психических возбуждениях, одномоментном приеме легкоусвояемых углеводов.

Гипогликемия — патологическое состояние, характеризующееся снижением концентрации глюкозы в крови ниже 3,3 ммоль/л. Гипогликемию вызывают следующие причины: длительное голодание, нарушение всасывания углеводов, хронические заболевания печени, передозировка инсулином или пероральными сахароснижающими препаратами при лечении сахарного диабета, инсулома (опухоль β -клеток поджелудочной железы), отравление фосфором, хлороформом, злоупотребление алкоголем.

Глюкозурия — появление глюкозы в моче. При нормальном уровне глюкозы в крови почки полностью ее реабсорбируют (возвращают в кровоток). Дело в том, что для реабсорбции глюкозы необходимо связывание каждой ее молекулы с молекулой переносчика. Поэтому транспорт глюкозы является насыщенным, и если содержание глюкозы в крови достигает 10 ммоль/л (почечный порог), переносчики в мембранах клеток, выстилающих проксимальные канальцы, оказываются перегруженными, в результате излишек глюкозы попадает в мочу. Почечный порог индивидуален для каждого человека, но, как правило, укладывается в вышеуказанный диапазон. У детей и беременных женщин он может быть снижен (приблизительно до 7 ммоль/л).

В подавляющем большинстве случаев глюкозурия является симптомом сахарного диабета (как результат патологического увеличения концентрации глюкозы в крови). Редко наблюдается нарушение реабсорбции в самой почке, так называемая *ренальная (почечная) глюкозурия* при заболеваниях почек.

Химия и обмен липидов

Липиды — органические вещества, которые не растворяются или плохо растворяются в воде, но растворяются в органических растворителях (хлороформе, эфире, ацетоне, бензоле и др.). Они являются настоящими или потенциальными эфирами жирных кислот, усваиваются и используются живыми организмами.

Липиды составляют примерно 10–20 % массы тела человека. В тканях человека количество липидов существенно различается: в жировой ткани жиры составляют до 75 % сухого веса, в нервной ткани — до 50 % веса, в печени общее количество липидов в норме не превышает 10–13 %.

Липиды и их компоненты применяются в качестве лекарственных препаратов. Так, жировые эмульсии (Липовеноз, Интралипид, Липофундин) служат источником незаменимых жирных кислот и энергии и используются для парентерального питания тяжелобольных ослабленных людей.

В фармацевтическом производстве используются растительные жиры (масла). Масло какао применяется как жировая основа для приготовления суппозиторий, лечебных мазей и вместе с миндальным, персиковым входит в состав различных косметических средств.

7.1. Классификация липидов

По способности гидролизаться липиды разделяют на две группы (рис. 7.1):

- липиды, не подвергающиеся гидролизу (неомыляемые);
- гидролизуемые (омыляемые).

Омылением называется процесс образования (натриевых или калиевых) солей жирных кислот путем щелочного гидролиза жира* (рис. 7.2).

К *неомыляемым* липидам можно отнести жирные кислоты, высшие спирты, включая стероиды, хиноны (витамины К, плаستيхион, убихинон др.), терпены, например сквален, каротиноиды, ретиноиды.

* Реакция омыления широко используется для производства мыл, выяснения состава ацилглицеролов и контроля за их качеством. С этой целью определяют *число омыления* — количество миллиграммов NaOH, израсходованного на нейтрализацию жирных кислот при омылении 1 г жира.

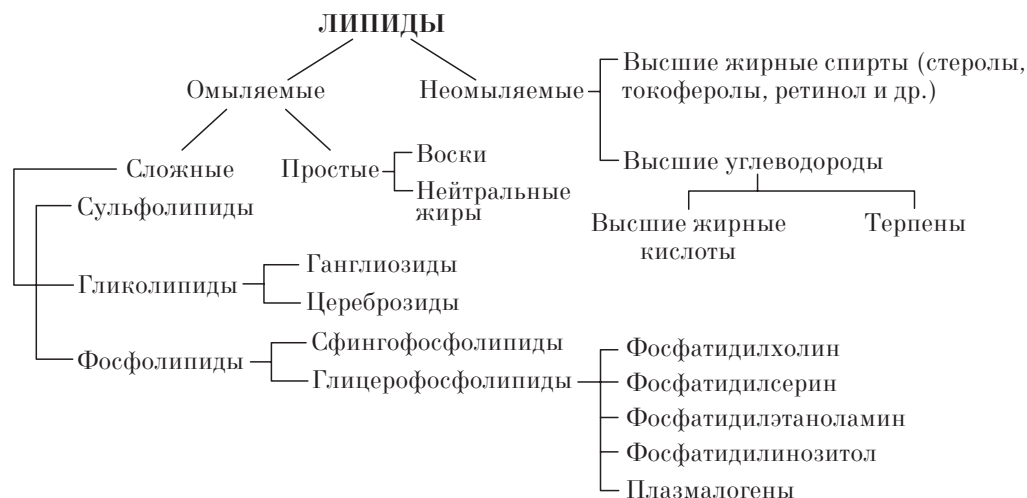


Рис. 7.1. Классификация липидов

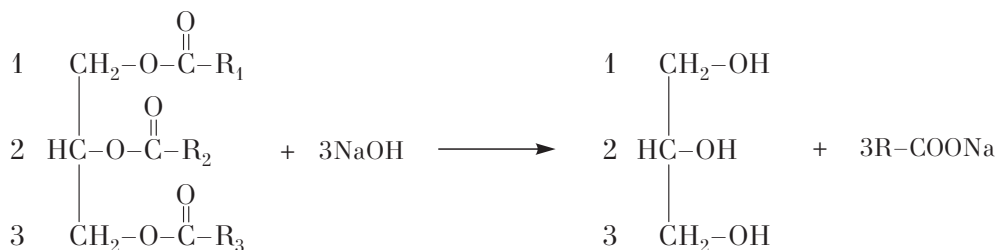


Рис. 7.2. Реакция омыления нейтрального жира

К *омыляемым* относятся липиды, гидролиз которых приводит к высвобождению двух и более индивидуальных соединений. Среди омыляемых липидов различают простые и сложные липиды. Простые липиды представляют собой эфиры жирных кислот и спиртов (нейтральные жиры, воски). Сюда же можно отнести эфиры холестерина. Сложные липиды содержат в своем составе, помимо углерода, водорода и кислорода, атомы фосфора, азота или серы (фосфолипиды, гликолипиды и сульфолипиды).

7.1.1. Жирные кислоты

К этой подгруппе соединений относятся алифатические одноосновные карбоновые кислоты с открытой цепью. Они служат своеобразными строительными компонентами для большинства липидов. В настоящее время из живых организмов выделено свыше 70 жирных кислот.

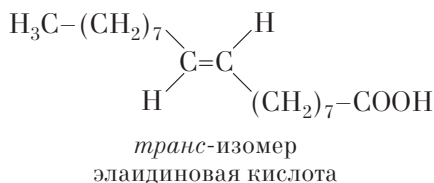
В зависимости от числа углеродных атомов в составе жирной кислоты различают *короткоцепочечные* (2–4 углеродных атома), *среднецепочечные*

(6–12 углеродных атомов), *длинноцепочечные* жирные кислоты (14–22 углеродных атома) и жирные кислоты с *очень длинной цепью* (24–26 углеродных атомов).

В липидах животного происхождения преобладают жирные кислоты с длинной углеродной цепью, содержащей обычно четное число атомов углерода (от 14 до 24), которые также называются *высшие жирные кислоты* (ВЖК). Что касается короткоцепочечных жирных кислот, то они вообще редко встречаются в составе липидов животных.

Жирные кислоты могут быть как насыщенными, так и ненасыщенными. *Насыщенные (предельные)* кислоты не содержат двойных связей. *Ненасыщенные (непредельные)* кислоты содержат одну (*мононенасыщенные*) или несколько двойных связей (*полиненасыщенные*). Двойные связи в природных полиненасыщенных жирных кислотах — изолированные (несопряженные). Как правило, связи имеют *цис*-конфигурацию, что придает таким молекулам дополнительную жесткость. Это имеет биологический смысл, так как такие молекулы входят в состав клеточных мембран.

Наиболее распространенной мононенасыщенной жирной кислотой в клетках человеческого организма является олеиновая кислота.



Для краткой записи жирных кислот обычно вводят следующие символы: C_n — число углеродных атомов, через двоеточие — число двойных связей. Положение двойной связи относительно карбоксильной группы обозначают знаком Δ и числом, показывающим порядковый номер атома углерода, возле которого находится двойная связь (рис. 7.3, а).

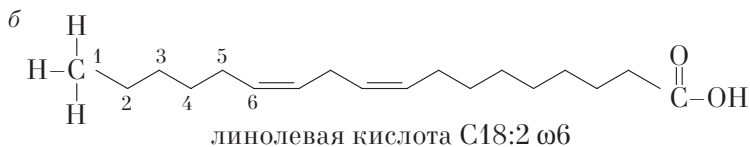
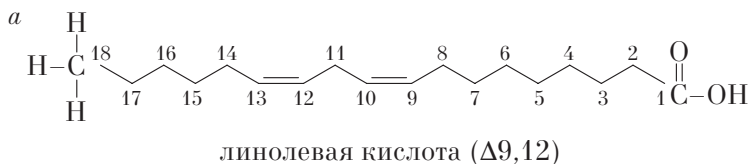
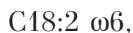


Рис. 7.3. Номенклатура ненасыщенных жирных кислот:
а — Δ -номенклатура; б — ω -номенклатура

Для названия ненасыщенных жирных кислот используется и ω -номенклатура (рис. 7.3, б), в соответствии с которой структура любой ненасыщенной жирной кислоты может быть записана следующим образом (пример для линолевой кислоты):



где C18 — число углеродных атомов; 2 — число двойных связей; $\omega 6$ — положение двойной связи от последней, метильной группы, т.е. ω -углеродного атома.

Насыщенные жирные кислоты. Основными их представителями в липидах животного происхождения являются *пальмитиновая* (C16:0) и *стеариновая* (C18:0) кислоты.

Мононенасыщенные жирные кислоты. Преобладающими жирными кислотами животных липидов являются *олеиновая* (C18:1) и *пальмитолеиновая* (C16:1). В триацилглицеролах человека содержание олеиновой кислоты составляет 20–25 %.

Полиненасыщенные (полиеновые) кислоты. В тканях млекопитающих наиболее часто встречается *линолевая* кислота (C18:2), содержание которой в липидах человека составляет 10–15 %. Содержание *арахидоновой кислоты* (C20:4) составляет около 8 % от количества всех жирных кислот организма.

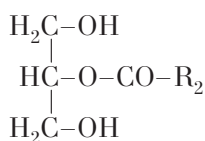
Линолевая и линоленовая (C18:3) кислоты являются **незаменимыми (эссенциальными) пищевыми факторами**, так как **не могут** синтезироваться в организме человека из стеариновой кислоты (C18:0). Арахидоновая кислота является **условно незаменимой**, так как может образовываться из линолевой и линоленовой.

Формулы перечисленных жирных кислот приведены в табл. 7.1 (см. с. 230).

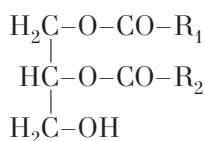
Ненасыщенность жирных кислот существенно влияет на их свойства: с увеличением числа двойных связей снижается температура плавления жирных кислот и возрастает их растворимость в неполярных растворителях. Все ненасыщенные жирные кислоты, встречающиеся в природе, при комнатной температуре — жидкости.

7.1.2. Нейтральные жиры (ацилглицеролы)

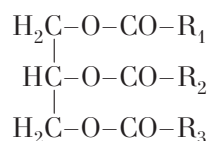
Нейтральные жиры (ацилглицеролы) представляют собой сложные эфиры трехатомного спирта глицерола и высших жирных кислот. В тканях организма встречаются моноацилглицеролы (МАГ), диацилглицеролы (ДАГ) и триацилглицеролы (ТАГ).



2-моноацилглицерол



1,2-диацилглицерол



триацилглицерол

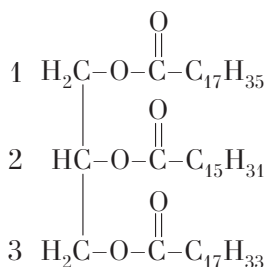
Таблица 7.1

Некоторые природные жирные кислоты, преобладающие в животных жирах

Тривиальное название и brutto-формула	Формула IUPAC		Структурная формула
	CH ₃ -конец	COOH-конец	
Насыщенные жирные кислоты			
Пальмитиновая C ₁₅ H ₃₁ COOH	16:0	16:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
	18:0	18:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
Ненасыщенные жирные кислоты			
Олеиновая C ₁₇ H ₃₃ COOH	18:1 ω9	18:1 Δ9	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
	16:1 ω7	16:1 Δ9	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
Линолевая C ₁₇ H ₃₁ COOH	18:2 ω6	18:2 Δ9,12	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
Линоленовая C ₁₇ H ₂₈ COOH	18:3 ω6	18:3 Δ9,12,15	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
Арахидоновая C ₁₉ H ₃₁ COOH	20:4 ω6	20:4 Δ5,8,11,14	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ COOH

Если во всех трех положениях стоят остатки одной и той же жирной кислоты, то такие триацилглицеролы называются *простыми*. Названия триацилглицеролов образуются путем добавления суффикса *-оил-* к названию соответствующего жирнокислотного остатка. Примерами простых триацилглицеролов могут служить тристеароилглицерол (три остатка стеариновой кислоты в составе), трипальмитоилглицерол.

Триацилглицеролы, в составе которых содержатся остатки двух или трех разных жирных кислот, называются *смешанными*. Примерами смешанных триацилглицеролов могут служить 1-пальмитоилдистеароилглицерол, 3-олеоил-2-пальмитоил-1-стеароилглицерол. Атомы углерода в молекуле глицерола нумеруют в соответствии со стереохимической нумерацией.



3-олеоил-2-пальмитоил-1-стеароилглицерол

Большинство нейтральных жиров в организме животных содержит в своем составе остатки пальмитиновой, стеариновой, олеиновой и линолевой жирных кислот. При этом состав нейтрального жира из различных тканей одного и того же организма может существенно различаться. Так, подкожный жир человека содержит больше насыщенных жирных кислот, чем жир печени, содержащий больше ненасыщенных жирных кислот. Жиры сливочного масла и молока содержат наибольшее количество среднецепочечных жирных кислот (6–12 атомов углерода).

Среди липидов организма именно ацилглицеролы выполняют *энергетическую* функцию. Выделение энергии происходит при внутриклеточном окислении составных компонентов ацилглицеролов: жирных кислот и глицерола.

Триацилглицеролы откладываются про запас и являются формой запасаания энергии в организме, выполняя *резервную* функцию. Это позволяет животным и человеку переносить как кратковременное, так и длительное голодание.

Реализация *терморегуляторной* функции осуществляется благодаря тому, что, во-первых, жир плохо проводит тепло и поэтому является хорошим теплоизолятором; во-вторых, при охлаждении организма на генерирование тепла за счет выделения энергии расходуются все те же ацилглицеролы. Особенно ярко эта функция проявляется у млекопитающих, живущих в полярных зонах (белые медведи, тюлени).

Подкожная жировая клетчатка защищает от механических повреждений, выполняя *защитную* функцию.

Ацилглицеролы являются *источниками эндогенной воды в организме*. При окислении 100 г ацилглицеролов образуется 107 г воды, что вдвое больше чем при окислении белков и углеводов.

Липиды выполняют функцию *естественных растворителей*. В частности, они обеспечивают всасывание в кишечнике незаменимых жирных кислот и жирорастворимых витаминов. Например, всасывание каротина (провитамина А) в отсутствие жира происходит только на 10 %.

Ацилглицеролы являются предшественниками эйкозаноидов: простагландинов, тромбоксанов, простациклинов, лейкотриенов, т.е. липидных гормонов.

7.1.3. Воски

Воски — это сложные эфиры жирных кислот и высших одноатомных или двухатомных спиртов. Природные воски также содержат некоторое количество свободных жирных кислот, спиртов, а также углеводов с нечетным числом атомов углерода, красящих и ароматических веществ. Все воски представляют собой твердые вещества разнообразной окраски, устойчивые к действию света, окислителей, нагреванию. Температура их плавления — от 30 до 90 °С.

Воски широко распространены в природе. **Растительные** воски выполняют защитную роль, покрывая листья и плоды растений, что уменьшает потери влаги, препятствует проникновению микроорганизмов.

К воскам **животного происхождения** относятся *пчелиный воск*, *ланолин* (получают при вываривании овечьей шерсти) и *спермацет* (получают из спермацетового мешка головы кашалота). Пчелиный воск состоит из пальмитиновой кислоты и миристилового спирта ($C_{30}H_{61}OH$).



Состав ланолина сложен, в основном он представляет собой смесь свободных высокомолекулярных спиртов и сложных эфиров холестерина и изохолестерола. По свойствам ланолин близок к кожному жиру человека. Спермацет состоит из цетилового спирта ($C_{16}H_{33}OH$) и пальмитиновой кислоты ($C_{16}H_{31}COOH$).

Ланолин и спермацет используются в фармацевтической практике как основа для изготовления мазей и кремов, так как эти вещества хорошо всасываются через кожу и обладают смягчающим действием. Добавки небольшого

количества ланолина к жирам и углеводородам резко увеличивают их способность смешиваться с водой и водными растворами, что обусловило его широкое применение в составе липофильно-гидрофильных основ.

7.1.4. Фосфолипиды

Фосфолипиды представляют собой сложные эфиры многоатомных спиртов с ВЖК и фосфорной кислотой. В зависимости от того, какой спирт участвует в образовании фосфолипидов (глицерол или сфингозин), их делят на глицерофосфолипиды и сфингофосфолипиды.

Глицерофосфолипиды. Наиболее распространенными в тканях являются глицерофосфолипиды, которые в качестве структурной основы содержат трехатомный спирт глицерол. При гидролизе глицерофосфолипидов, кроме глицерола, обнаруживают две жирные кислоты, фосфорную кислоту и различные заместители. В качестве заместителя в природных глицерофосфолипидах могут находиться аминоспирт холин, азотистое основание этаноламин, остаток аминокислоты серина или шестиатомный спирт инозитол.

Жирные кислоты присоединяются к первому и второму атомам глицерола сложноэфирной связью. При этом, как правило, природные глицерофосфолипиды содержат насыщенную жирную кислоту у первого углеродного атома остатка глицерола, а ненасыщенную (моноеновую или полиеновую) — у второго. У третьего углеродного атома глицерола находится остаток фосфорной кислоты, к которой присоединяются упомянутые выше заместители.

Если в третьем положении имеется только фосфорная кислота, глицерофосфолипид называется *фосфатидной кислотой*. В организме фосфатидная кислота образуется в процессе биосинтеза триацилглицеролов и глицерофосфолипидов как общий промежуточный метаболит.

Остаток фосфатидной кислоты называют *фосфатидил*. Он входит в название других глицерофосфолипидов; после него указывают название заместителя атома водорода в фосфорной кислоте (рис. 7.4). Название глицерофосфолипидов в зависимости от того, какой радикал находится в положении R_3 , приведены в табл. 7.2.

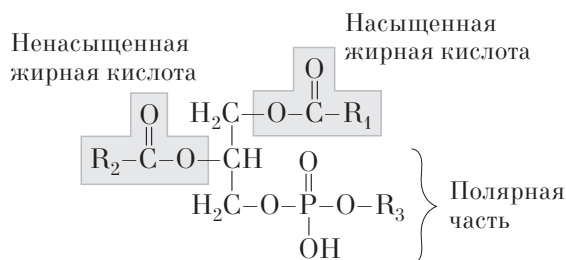
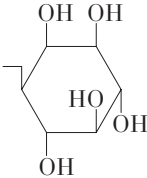


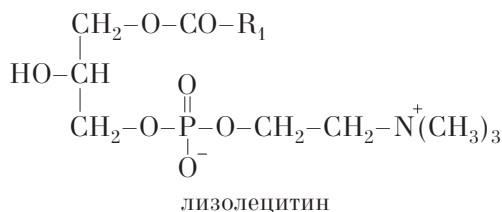
Рис. 7.4. Структура глицерофосфолипидов

Таблица 7.2

К рис. 7.4

Формула R ₃	Название глицерофосфолипида	Формула R ₃	Название глицерофосфолипида
–H	Фосфофатидная кислота	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \end{array}$	Фосфатидилсерин
$\begin{array}{c} -\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Фосфатидилглицерол	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Фосфатидилхолин
–CH ₂ –CH ₂ –NH ₂	Фосфофатидилэтанол- ламин		Фосфатидилинозитол

Фосфатидилхолин (*лецитин*) в своем составе содержит холин. Фосфатидилхолины широко распространены в клетках; особенно их много в мозговой ткани человека и животных. В бактериальных клетках их содержание невелико.



Лизолецитин (*лизолецитофосфатидилхолин*) образуется из лецитина путем отщепления одного остатка жирной кислоты. Лизолецитин регулирует проницаемость стенок сосудов и изменяет проницаемость биологических мембран. Так, например, его накопление в мембране эритроцитов вызывает их лизис. Это наблюдается при укусе змей, так как в змеином яде содержится фосфолипаза А₂. Этот фермент как раз катализирует реакцию отщепления остатка жирной кислоты от второго углеродного атома глицерола.

Фосфатидилэтанолламин (*кефалин*) содержит этаноламин, который присоединяется к остатку фосфорной кислоты эфирной связью. Фосфатидилэтанолламины, как и фосфатидилхолины, являются главными липидными компонентами, формирующими билипидный матрикс биологических мембран. При этом фосфатидилхолины почти полностью располагаются во внешнем монослое билипидного матрикса, а фосфатидилэтанолламин — во внутреннем.

Фосфатидилсерин содержит полярную группу в виде остатка аминокислоты серина. Значение фосфатидилсерина определяется тем, что он является

предшественником синтеза фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов и в значительно меньших количествах входит в состав биологических мембран.

Фосфатидилинозитолы отличаются от других групп глицерофосфолипидов тем, что в их состав входит шестиатомный циклический спирт инозитол. Они присутствуют в клеточных мембранах животных, высших растений, микроорганизмов. Особенно высоко их содержание в миелиновых оболочках нервных волокон. Продукты расщепления фосфатидилинозит-4,5-дифосфата — диацилглицерол и инозитол-1,4,5-трифосфат (ИТФ) — являются внутриклеточными посредниками в реализации действий ряда гормонов.

Фосфатидилглицеролы в качестве заместителя содержат еще одну молекулу глицерола, которая присоединяется к фосфатиду эфирной связью. Фосфатидилглицеролы в значительных количествах обнаруживаются в бактериальных мембранах, а также в хлоропластах растений.

Характерной особенностью фосфолипидов является их *дифильность*, т.е. способность растворяться как в воде, так и в липидах. Это обусловлено наличием у них выраженных полярных свойств. При pH 7,0 их фосфатная группа всегда несет отрицательный заряд. Азотсодержащие группировки в составе фосфатидилхолина (холин) и фосфатидилэтаноламина (этаноламин) при pH 7,0 несут положительный заряд. Таким образом, при pH 7,0 эти глицерофосфолипиды представляют собой биполярные цвиттерионы и их суммарный заряд равен нулю (рис. 7.5).

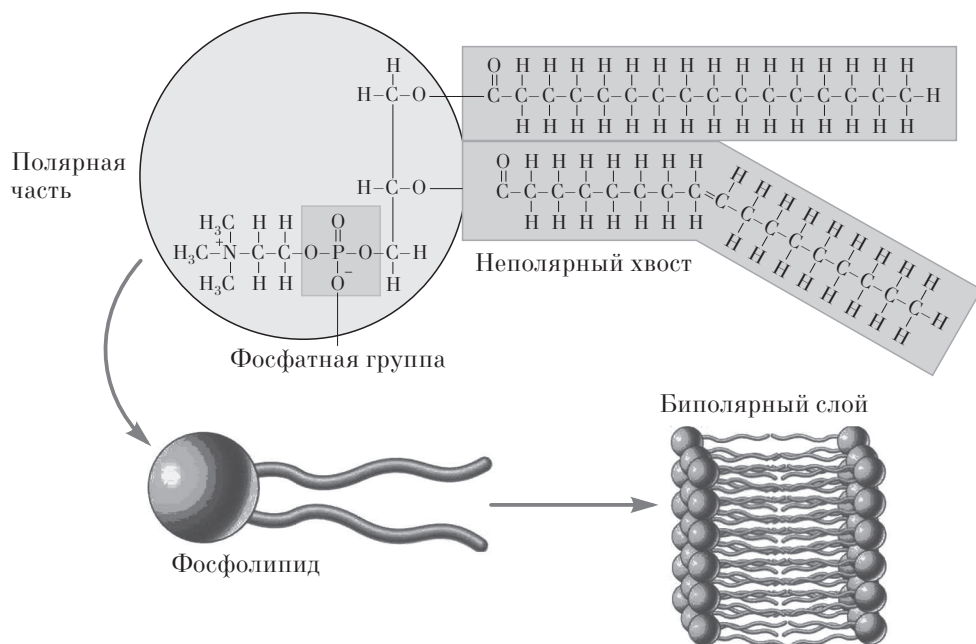


Рис. 7.5. Строение фосфатидилхолина

Остаток серина в молекуле фосфатидилсерина содержит α -аминогруппу и карбоксильную группу. Следовательно, при pH 7,0 молекула фосфатидилсерина имеет две отрицательно и одну положительно заряженные группы и несет суммарный отрицательный заряд. В то же время радикалы жирных кислот в составе фосфолипидов не имеют электрического заряда в водной среде и обуславливают гидрофобность части молекулы фосфолипида.

Поэтому на поверхности раздела масло – вода фосфолипиды располагаются таким образом, чтобы полярные группы находились в водной фазе, а неполярные — в масляной (рис. 7.6). За счет этого в водной среде они образуют бимолекулярный слой, а при достижении некоторой критической концентрации — *мицеллы*. На этом основано участие фосфолипидов в *построении биологических мембран*.

Функциональная роль фосфолипидов не ограничивается их участием в построении биомембран. Они являются *регуляторами активности ферментов*. Например, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин изменяют активность ферментов, катализирующих процессы свертывания крови.

Фосфолипиды выполняют *детергентную функцию* в кишечнике и желчном пузыре.

Они являются *источником арахидоновой кислоты* — предшественника эйкозаноидов, а также *источником вторичных мессенджеров* — диацилглицерола и инозитолтрифосфата.

Некоторые внеклеточные белки *прикрепляются* к внешней стороне плазматической мембраны за счет образования ковалентных связей с фосфатидилинозитолом. Примером таких белков могут служить ферменты: щелочная фосфатаза, липопротеинлипаза, холинэстераза.

Фосфолипиды принимают участие в *формировании транспортных форм* других липидов, а также служат компонентом сурфактанта легких.

В случае отсутствия других источников энергии они могут выполнять *энергетическую функцию*.

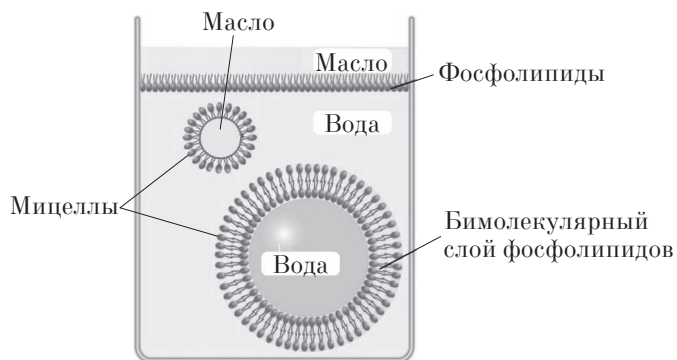
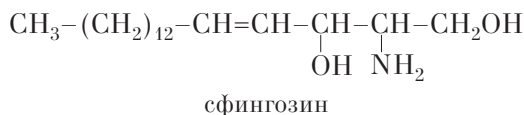


Рис. 7.6. Дисперсии фосфолипидов в водной среде и на поверхности раздела фаз масло – вода

Сфингофосфолипиды. Структурную основу сфингофосфолипидов составляет двухатомный ненасыщенный аминокспирт — *сфингозин*.



Сфингозин, соединенный амидной связью с жирнокислотным остатком, образует церамид. Церамиды в незначительных количествах присутствуют в тканях растений и животных. Гораздо чаще они входят в состав сложных липидов (сфингомиелинов, цереброзидов, ганглиозидов и др.).

Сфингомиелин (рис. 7.7) широко распространен в организме. В состав сфингомиелина входят сфингозин, остаток жирной кислоты, остаток фосфорной кислоты и холин.

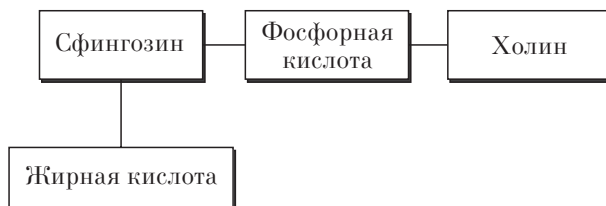


Рис. 7.7. Схема строения сфингомиелина

Сфингомиелин обнаружен в мембранах растительных и животных клеток. Особенно им богаты клетки нервной ткани, в частности мозга.

7.1.5. Гликолипиды

Гликолипиды содержат в своем составе углеводный компонент. Они присутствуют во всех тканях животных, растений, а также в некоторых микроорганизмах. Различают две группы гликолипидов — цереброзиды и ганглиозиды. Они широко представлены в нервной ткани и мозге.

В состав молекулы *цереброзида* входит сфингозин, связанный амидной связью с остатком жирной кислоты (рис. 7.8). Углеводная часть цереброзида представлена D-галактозой, которая присоединена к сфингозину. В состав цереброзидов других тканей (не нервной) вместо галактозы может входить глюкоза. В составе цереброзидов R — H; в составе сульфолпидов R — SO₃⁻.

Обнаруженные в цереброзидах жирные кислоты необычны в том отношении, что они содержат 24 атома углерода. Чаще встречаются нервоновая, цереброновая и лигноцериновая кислоты.

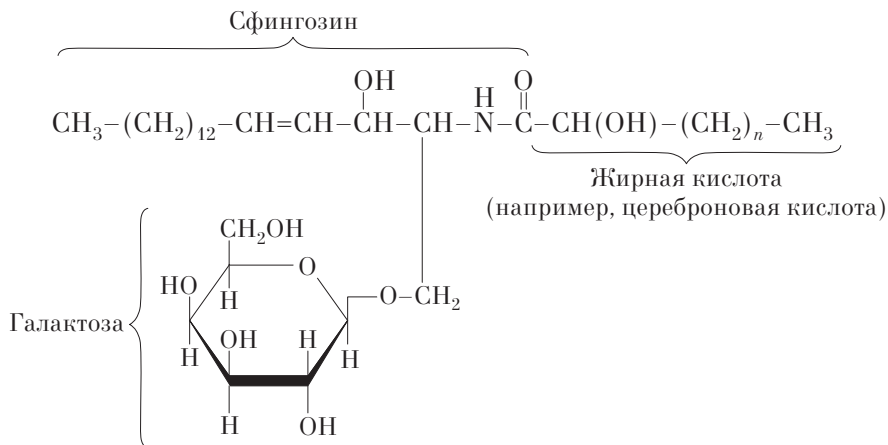


Рис. 7.8. Структура cerebroside

Ганглиозиды имеют более сложное строение (рис. 7.9). В состав молекулы ганглиозидов, помимо церамида, входит олигосахарид, содержащий остатки глюкозы и галактозы, а также одна или несколько молекул *сиаловой кислоты*. Сиаловые кислоты — это производные аminosахаров. Доминирующими в составе ганглиозидов являются N-ацетилглюкозамин и N-ацетилнейраминавая кислота.

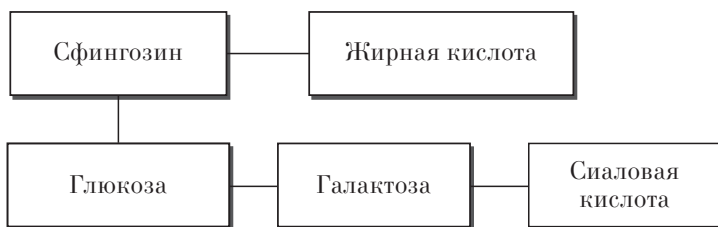


Рис. 7.9. Схема строения ганглиозидов

Размещаются ганглиозиды на наружной поверхности плазматических мембран, при этом олигосахаридные цепи направлены наружу.

Гликолипиды поддерживают структурную прочность мембран и конформацию мембранных белков, опосредуют межклеточное взаимодействие и контакты, взаимодействие клеток с межклеточным матриксом. Например, ганглиозид GM₁ функционирует в качестве рецептора для холерного токсина. Связывание токсина запускает процесс активации аденилатциклазы.

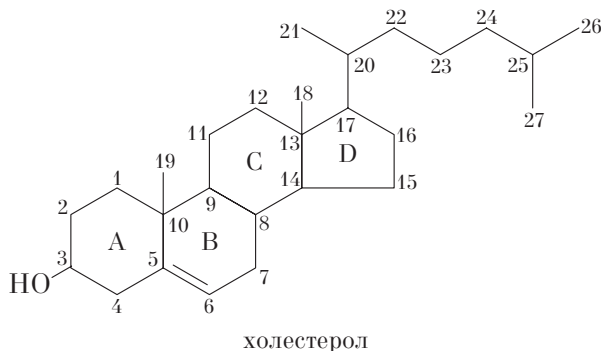
7.1.6. Неомыляемые липиды

Неомыляемыми липиды названы потому, что они не гидролизуются с освобождением жирных кислот. Известны два основных типа неомыляемых липидов — высшие жирные спирты и высшие углеводороды.

Высшие жирные спирты (ВЖС) — одноатомные насыщенные и ненасыщенные спирты, содержащие от 6 до 22 атомов углерода в цепи. К высшим спиртам относятся жирорастворимые витамины (А — ретинол, D — эргокальциферол, Е — токоферол), а также широко распространенные в животном и растительном мире конденсированные тетрациклические спирты, входящие в класс стероидов.

Стероиды — это группа соединений, имеющих в своей структуре ядро, образованное гидрированным фенантреном (кольца А, В, С) и цикlopентаном (кольцо D). Среди стероидов выделяется группа соединений, получивших название *стеролов*. Характерным для них является наличие гидроксильной группы в положении 3, а также боковой цепи в положении 17.

Важнейший представитель стеролов — *холестерол* (ХС). Он имеет двойную связь между 5-м и 6-м углеродными атомами, следовательно, является ненасыщенным циклическим спиртом. Кольцевая структура холестерина отличается значительной жесткостью, а боковая цепь, напротив, относительно подвижна.



Холестерол в чистом виде представляет собой кристаллические пластинки или иглы, воскообразные на ощупь и нерастворимые в воде, но растворимые в органических растворителях. Холестерол (как в свободном состоянии, так и в виде сложных эфиров с жирными кислотами) содержится в животных клетках. У взрослого человека содержание холестерина составляет 150–200 г: около 93 % входит в состав мембран и 7 % находится в жидкостях организма. В крови большая часть холестерина связана с белками.

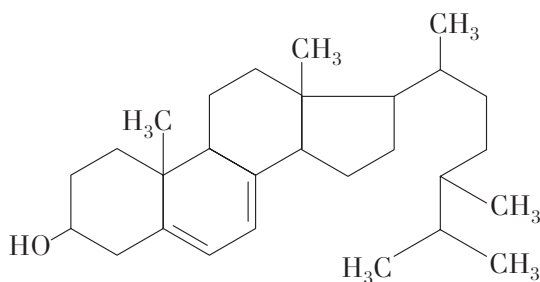
В норме содержание общего холестерина в сыворотке крови 3,6–6,1 ммоль/л.

Неэстерифицированный холестерол вместе с фосфолипидами и белками входит в состав плазматических мембран всех клеток. Он увеличивает микро-

вязкость мембран и снижает их проницаемость для H_2O и водорастворимых веществ, что обеспечивает избирательную проницаемость мембран и влияет на активность связанных с мембранами ферментов.

Холестерол является исходным веществом для образования многих биологически активных соединений — гормонов коры надпочечников, половых гормонов, витаминов группы D. В печени из холестерина образуются желчные кислоты.

В растениях холестерол не обнаружен, но в мембранах растительных клеток содержатся близкие к холестеролу соединения, называемые *фитостеролами*. В дрожжевых клетках находится *эргостерол*, который отличается строением боковой цепи и тем, что содержит двойную связь между 7-м и 8-м атомами углерода в кольце. Эргостерол является биологическим предшественником (про-витамином) витамина D_2 .



эргостерол

Имидазолы и триазолы — класс противогрибковых лекарственных препаратов (миконазол, итраконазол, клотримазол), которые действуют, ингибируя синтез эргостерола из ланостерола. Эти препараты ингибируют фермент, ответственный за деметилирование в биосинтезе эргостерола.

К стероидам относятся также *сердечные гликозиды* — вещества растительного происхождения (из наперстянки, строфанта, ландыша), регулирующие сердечную деятельность.

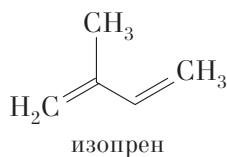
В гликозидах стероидный фрагмент соединен гликозидной связью с олигосахаридом.

7.1.7. Терпены (изопрены)

К числу липидных компонентов, которые встречаются в клетках в сравнительно небольшом количестве, относятся *терпены**.

* Слово «терпены» происходит от латинского названия терпентинного дерева *Pistacia terebinthus* L., растущего в Средиземноморье. Из него еще в древние времена добывали эфирное масло, которое называли «терпентин», впоследствии это стало означать «скипидар».

Молекулы терпенов построены путем объединения нескольких молекул пятиуглеродного углеводорода изопрена.



Состав терпенов соответствует формуле $(C_5H_8)_n$, где $n = 2, 3, 4$ и т.д. В зависимости от количества изопреновых группировок, которые входят в состав терпенов, различают: *семитерпены* (C_5H_8) , *монотерпены* $(C_5H_8)_2$, *сесквитерпены* $(C_5H_8)_3$, *дитерпены* $(C_5H_8)_4$, *тритерпены* $(C_5H_8)_6$ и др.

В растениях обнаружено большое количество моно- и сесквитерпенов. Многие из них придают растениям свойственный им аромат и служат главными компонентами эфирных масел, получаемых из таких растений. Например, сесквитерпеновый спирт *фарнезол* содержится в эфирных маслах цветков ландыша и липы. Кислородсодержащий моноциклический монотерпен *ментол* обладает слабыми местноанестезирующими свойствами, стимулирует холодовые рецепторы кожи и слизистых и является основой сосудорасширяющего средства Валидол. Ментол используется в фармацевтических препаратах, предназначенных для лечения простуды, снятия мышечных болей. Получают ментол из эфирного масла мяты перечной, в котором содержание его составляет 50–70 %.

Тритерпены *скален* и *ланостерол* являются предшественниками холестерина в животных клетках. Кроме того, скален — основной компонент секрета сальных желез.

К тетратерпенам относят каротиноиды и ретиноиды. *Каротиноиды* являются природными пигментами (желтого, оранжевого или красного цвета), синтезируемыми бактериями, водорослями, высшими растениями. Известны три изомера: α -, β - и γ -каротины. Они различаются числом циклов и положением двойных связей. Нециклическим изомером β -каротина является пигмент ликопин, определяющий красный цвет плодов томатов.

Каротиноиды выполняют функцию антиоксидантов в организме человека. β -каротин является предшественником жирорастворимого витамина А.

Информацию о *ретиноидах* можно найти в п. 14.6.1.

К политерпеноидам $(C_5H_8)_n$ относятся *природный каучук*, содержащий от 500 до 5000 изопреновых остатков, и *гутта*, состоящая из 100 остатков изопрена. Гутта накапливается в смеси со смолами, а также с некоторым количеством сахаров, протеинов и минеральных солей в млечниках в виде сока (латекса) в гуттоносных растениях. Латекс широко используется для изготовления изделий медицинского назначения.

7.2. Переваривание и всасывание липидов

С пищей в организм человека ежедневно поступает от 80–100 г липидов животного и растительного происхождения. Из их общего количества 90 % составляют триацилглицеролы, покрывая 30–35 % энерготрат. С липидами в организм поступают жирорастворимые витамины А, D, Е, К и полиеновые жирные кислоты, которые не синтезируются в организме.

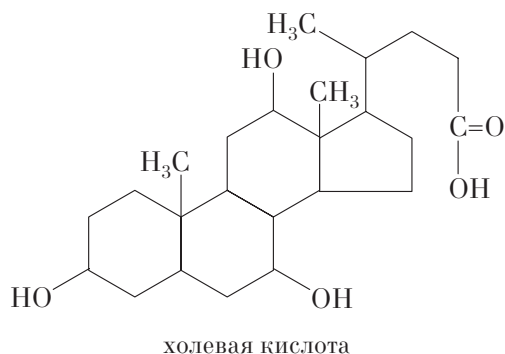
Особенности переваривания липидов связаны с их плохой растворимостью в воде. Обязательным условием переваривания является *эмульгирование*. Оно обеспечивает снижение поверхностного натяжения на границе раздела вода — жир, так как жиры гидрофобны и содержатся в клетках в виде безводных капель. Другим обязательным условием переваривания липидов является наличие липолитических ферментов.

В полости рта липиды не подвергаются никаким изменениям, так как в слюне отсутствуют ферменты, расщепляющие липиды. В желудке с желудочным соком выделяется желудочная липаза, однако ее действие на жиры у взрослого человека незначительно. Во-первых, это обусловлено небольшим количеством этого фермента. Во-вторых, липаза в желудке взрослого человека практически неактивна из-за низких значений pH, которые там имеют место в норме (pH 1,5). Оптимальная среда для действия липазы должна быть близкой к нейтральной. Кроме того, в желудке отсутствуют условия для эмульгирования, а липаза активно действует на эмульгированные триацилглицеролы.

7.2.1. Эмульгирование липидов пищи, роль желчных кислот

У взрослого человека переваривание липидов происходит главным образом в тонком кишечнике. В двенадцатиперстной кишке пища подвергается воздействию желчи и сока поджелудочной железы. Там происходит *эмульгирование жира*, которое заключается в дроблении крупных липидных частиц на более мелкие. Происходит этот процесс благодаря перистальтике кишечника, углекислому газу и желчным кислотам. Перистальтика и углекислый газ способствуют перемешиванию и дроблению жировых капель. Образуется углекислый газ в результате реакции нейтрализации гидрокарбонатов кишечного сока кислым содержимым желудка, поступающим туда с пищей. Соли желчных кислот оказывают эмульгирующее действие за счет свойства дифильности. Как и соли жирных кислот, они растворимы в воде и являются активными детергентами.

Желчные кислоты образуются из холестерина в печени. При этом непосредственно в гепатоцитах синтезируются *первичные желчные кислоты*: холевая (3,7,12-триоксихолановая) и хенодезоксихолевая (3,7-диоксихолановая).



Затем карбоксильная группа боковой цепи этих кислот может образовывать амидные связи с аминокислотами (глицином или таурином). В результате формируются **конъюгированные желчные кислоты**. Это обуславливает их эмульгирующие свойства, так как pK ионной группы боковой цепи ниже (значит, способность к диссоциации выше), чем у исходной карбоксильной группы. Если в качестве исходной желчной кислоты выступает холевая кислота, конъюгированными формами ее являются гликохолевая и таурохолевая кислоты.



В организме 65–80 % всех конъюгированных желчных кислот представлено гликохолевой, гликодезоксихолевой, гликохенодезоксихолевой кислотами. Оставшиеся 35–20 % всех желчных кислот существуют в виде таурохолевой, таурodeзоксихолевой и таурохенодезоксихолевой кислот. Поскольку эти соединения состоят из двух компонентов — желчной кислоты и глицина или таурина, их иногда называют *парными желчными кислотами*.

Образующиеся желчные кислоты поступают из печени в двенадцатиперстную кишку с желчью.

В кишечнике под действием ферментов бактерий, которые катализируют отщепление у C_7 OH-группы и конъюгированной аминокислоты от C_{24} , образуются **вторичные желчные кислоты**. В результате из двух первичных

желчных кислот образуются дезоксихолевая (3,12-диоксихолановая) кислота и литохолевая (3-оксихолановая) кислота.

В нижней части тонкого кишечника желчные кислоты подвергаются реабсорбции в систему воротной вены и поступают в печень. Эти кислоты могут повторно секретироваться с желчью в кишечник и участвовать в процессах переваривания и всасывания. Такая кишечно-печеночная циркуляция желчных кислот может осуществляться до 10 и более раз в сутки. Оказывается, что за сутки в печени образуется 15–30 г желчных кислот и только 0,5 г их выделяется с калом.

Желчные кислоты обладают *амфифильными* свойствами: гидроксильные группы и боковая цепь гидрофильны, а циклическая структура — гидрофобна. Взаимодействуя гидрофобными частями своих молекул с жиром, а гидрофильной (полярной) частью — с водным содержимым кишечника, желчные кислоты снижают поверхностное натяжение на границе раздела липидной и водной фаз, вследствие чего крупные жировые капли разбиваются на более мелкие. Желчные кислоты покрывают поверхность эмульсионной частицы в виде монослоя (рис. 7.10). При этом наружу, к водному содержимому, направлены полярные части молекул желчных кислот. В результате поверхность частицы приобретает суммарный электрический заряд, который будет одноименным у всех других эмульсионных частиц. В силу электростатического взаимодействия между отдельными частицами возникает отталкивание.

Наиболее эффективное эмульгирование жиров происходит при комбинированном действии на капельки жира солей желчных кислот, ненасыщенных жирных кислот и моноацилглицеролов. При таком действии поверхностное натяжение частиц жира на разделе фаз жир–вода резко уменьшается. Мелкодисперсная эмульсия, содержащая указанную комбинацию эмульгаторов, стабилизируется, и укрупнения частичек жира не происходит. Совокупная поверхность капелек жира значительно возрастает. Это обеспечивает большую вероятность взаимодействия с панкреатической липазой и гидролиз жира.

Препараты, содержащие желчные кислоты и желчь (Аллохол, Холензим, дегидрохолевая кислота, урсодезоксихолевая кислота), — это либо лекарственные средства, содержащие сами желчные кислоты, либо комбинированные лекарственные средства, в состав которых, кроме лиофилизированной желчи



Рис. 7.10. Образование оболочки из желчных кислот вокруг эмульсионной или мицеллярной частицы при переваривании липидов

животных, могут входить экстракт ткани печени, тканей поджелудочной железы и слизистых оболочек тонкого кишечника крупного рогатого скота. Эти препараты используются для улучшения пищеварения.

7.2.2. Ферментативный гидролиз липидов в кишечнике

Основная масса пищевых триацилглицеролов расщепляется в тонкой кишке при участии *панкреатической липазы* — гликопротеина, гидролизующего преимущественно эмульгированные триацилглицеролы в щелочной среде (рН 7–8). Она выделяется в двенадцатиперстную кишку в виде неактивного профермента — пролипазы. Активация пролипазы в активную липазу происходит под действием желчных кислот и колипазы, небольшого белка (М.М. ~ 10 тыс. а.е.м.), поступающего в кишечник в составе сока поджелудочной железы. Колипаза связывается с С-концом некаталитического участка молекулы панкреатической липазы и образует с ней комплекс (в молярном соотношении 1:1). Происходящее вслед за этим изменение конформации обуславливает прикрепление ферментативного комплекса к липидной поверхности эмульсионных частиц, и активная липаза гидролизует эфирные связи триацилглицеролов (рис. 7.11).

Гидролиз триацилглицеролов сначала происходит в положении 1 или 3 с образованием диацилглицеролов, которые затем гидролизуются до 2-моноацилглицеролов. Меньшая часть (40 %) моноацилглицеролов подвергается дальнейшему гидролизу до глицерола и ВЖК. Для остальной части процесс ферментативного гидролиза завершается на этапе образования 2-моноацилглицеролов.

Нарушения, вызванные снижением поступления панкреатической липазы (при панкреатите) или желчи при недостаточном желчеобразовании или закупорке желчных протоков (желчнокаменная болезнь), снижают скорость гидролиза липидов и сопровождаются *стеатореей* — появлением нерасщепленных жиров в составе фекалий. При этом снижается всасывание полиеновых жирных кислот и жирорастворимых витаминов, что приводит к развитию гиповитаминозов.

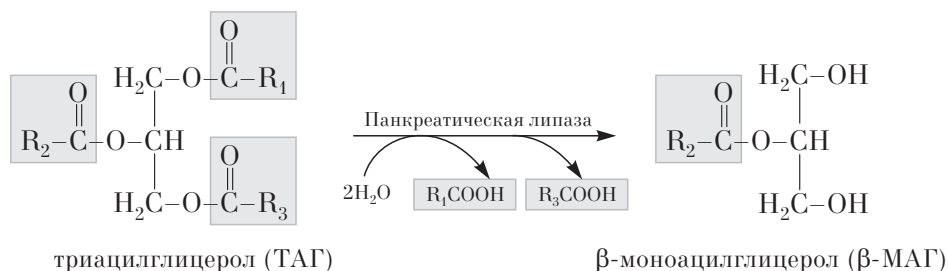


Рис. 7.11. Схема гидролиза жиров

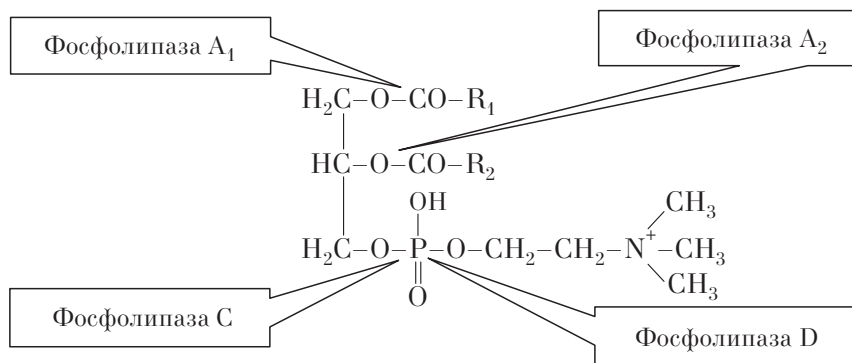


Рис. 7.12. Специфичность действия ферментов, расщепляющих фосфолипиды

Глицерофосфолипиды расщепляются под действием фосфолипаз. В частности, в поджелудочной железе синтезируются *профосфолипазы* A₁, A₂, C и D, которые, активируясь трипсином, катализируют расщепление молекул глицерофосфолипидов. Фосфолипаза A₁ отщепляет остаток жирной кислоты у C₁-атома. Фосфолипаза A₂ расщепляет β-сложноэфирную связь. Фосфолипаза C отщепляет «полярную головку» вместе с остатком фосфорной кислоты. Фосфолипаза D катализирует отщепление от фосфолипида полярной группы (азотистого основания или спирта) с образованием продукта — фосфатидной кислоты. Специфичность действия фосфолипаз показана на рис. 7.12.

Конечными продуктами гидролиза фосфолипидов являются жирные кислоты, глицерол, неорганический фосфат, азотистые основания (холин, этаноламин, серин).

Поступающие с пищей *эфиры холестерина* (сливочное масло, желток яиц, печень, мясо и др.) расщепляются до свободного холестерина и жирных кислот под действием *холестеролэстеразы* — фермента, который синтезируется в поджелудочной железе и секретируется в кишечник. Активируется фермент желчными кислотами.

Липаза в ферментных препаратах. Липаза является активным компонентом многих ферментных препаратов, применяемых для коррекции нарушений процесса пищеварения, а также для регуляции функций поджелудочной железы. Чаще всего это комплексные препараты, содержащие основные ферменты поджелудочной железы животных — Панкреатин, Фестал, Мезим, Креон, Солизим.

7.2.3. Мицелообразование и всасывание продуктов гидролиза липидов в желудочно-кишечном тракте

Всасывание продуктов гидролиза происходит в проксимальной части тонкой кишки. Триацилглицеролы, содержащие коротко- и среднецепочечные жирные кислоты (C₆–C₁₀), могут подвергаться всасыванию без предварительного

расщепления ферментами. Из клеток слизистой тонкого кишечника они попадают сразу в кровоток системы воротной вены. Это позволяет использовать ряд полусинтетических лекарственных препаратов, приготовленных на основе кокосового масла и содержащих смесь триацилглицеролов с коротко- и среднецепочечными жирными кислотами, при лечении заболеваний пищеварительной системы (синдром малабсорбции вследствие недостаточности функции поджелудочной железы, непроходимость желчных путей, резекция тонкого кишечника, хронические заболевания печени).

Механизм всасывания и поступления в кровь основной массы липидов пищи, содержащих жирные кислоты с количеством углеродных атомов более 10, принципиально отличается от описанного (рис. 7.13). Такие жирные кислоты, моноацилглицеролы, холестерол всасываются при участии конъюгированных желчных кислот, формирующих мельчайшие частицы — *мицеллы*. Структура мицелл такова, что их гидрофобное ядро, включающее продукты гидролиза (жирные кислоты, моноглицеролы) и жирорастворимые витамины, оказывается

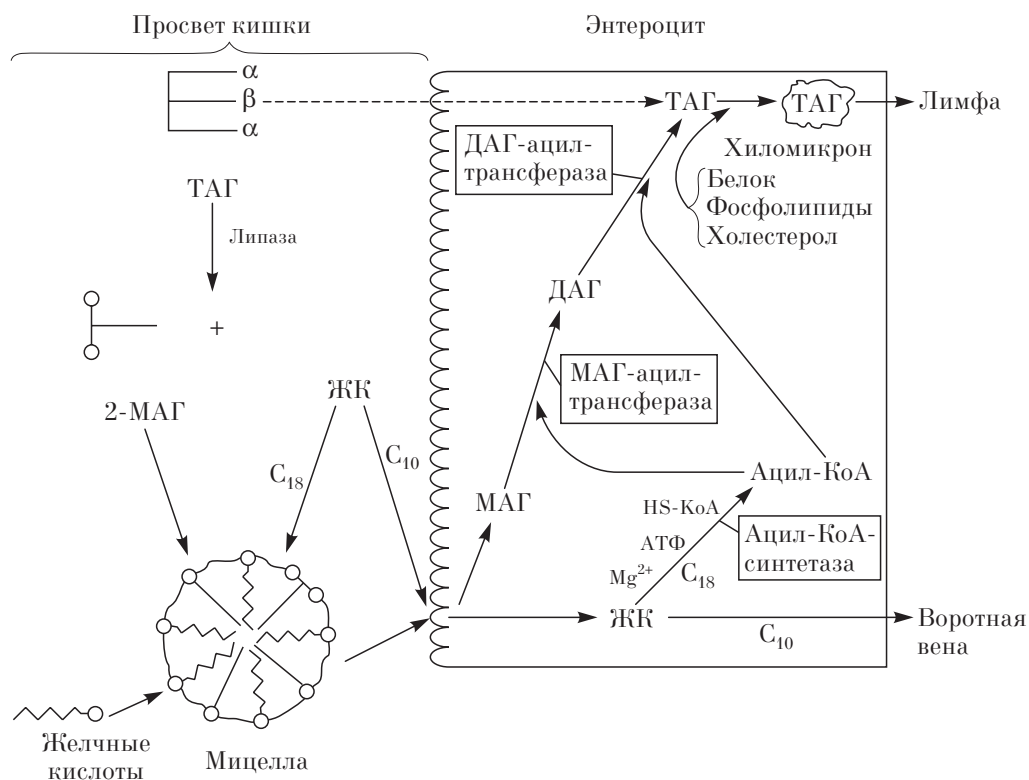


Рис. 7.13. Схема гидролиза, мицеллообразования, всасывания и ресинтеза триацетилглицерола:

ТАГ — триацетилглицерол; МАГ — моноацетилглицерол; ДАГ — диацилглицерол;
 —○— — желчные кислоты; —○— — жирные кислоты (ЖК)

окруженным снаружи гидрофильной оболочкой из желчных кислот и фосфолипидов.

Мицеллы примерно в 100 раз меньше эмульсионных частиц. В составе мицелл ВЖК и моноацилглицеролы переносятся от места гидролиза жиров к всасывающей поверхности кишечного эпителия. Большая часть мицелл путем диффузии и пиноцитоза проникает в эпителиальные клетки, где происходит их распад. При этом желчные кислоты через систему воротной вены попадают сначала в печень, а оттуда вновь в желчь. Меньшая часть мицелл всасывается через стенку тонкого кишечника после предварительного (пристеночного) разрушения.

В кишечник за сутки поступает 2,0–2,5 г экзогенного и эндогенного холестерина. Основная часть холестерина всасывается в тонкой кишке в составе смешанных жировых мицелл. В транспорте холестерина через мембрану энтероцитов принимает участие и специфический белковый транспортер. Около 0,5 г холестерина выделяется с фекалиями в виде восстановленного продукта — копростерола, небольшая часть — в виде окисленных продуктов. И восстановление, и окисление холестерина происходят в толстой кишке под воздействием ферментов микроорганизмов.

Существуют лекарственные средства, уменьшающие всасывание жиров. Например, орлистат (Ксеникал) — ингибитор липаз. Его механизм действия обусловлен образованием ковалентной связи с активным сериновым участком липазы в просвете желудка и тонкой кишки. Фермент при этом теряет способность расщеплять жиры, поступающие с пищей в виде триацилглицеролов, уменьшает всасывание свободных жирных кислот и моноацилглицеролов. Поскольку нерасщепленные триацилглицеролы не всасываются, их депонирование в организме снижается, что приводит к уменьшению массы тела.

7.3. Ресинтез липидов в стенке кишечника

Всосавшиеся продукты расщепления липидов в клетках слизистой оболочки кишечника подвергаются процессам *ресинтеза* — синтеза липидов, специфичных для организма, из продуктов переваривания пищевых липидов.

Ресинтезу липидов предшествует активация жирных кислот, т.е. присоединение к остатку жирной кислоты кофермента А с образованием ацил-КоА. Катализирует реакцию фермент ацил-КоА-синтетаза. Это происходит в гладком эндоплазматическом ретикулуме:



В клетках слизистой тонкого кишечника (энтероцитов) функционируют два пути ресинтеза триацилглицеролов: глицеролфосфатный и моноацилглицерольный (рис. 7.14).

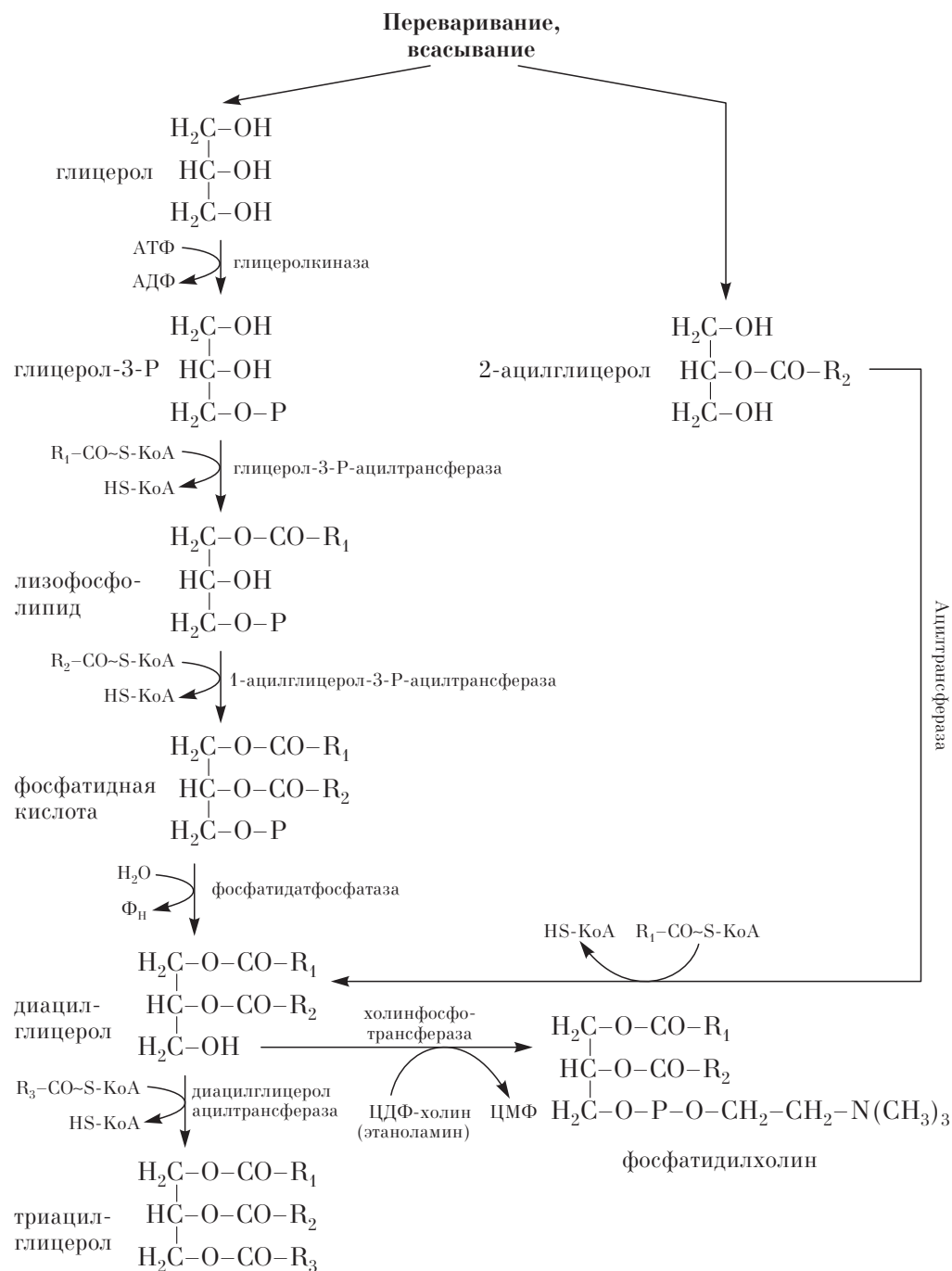


Рис. 7.14. Ресинтез липидов в энтероцитах (слева — глицеролфосфатный путь; справа — моноацилглицерольный)

Глицеролфосфатный путь. Предшественниками для синтеза ТАГ являются глицерол-3-фосфат и активированные жирные кислоты. Глицерол-3-фосфат образуется в результате фосфорилирования глицерола при действии фермента глицеролкиназы. Две реакции ацилирования глицерол-3-фосфата с помощью фермента ацилтрансферазы приводят к образованию фосфатидной кислоты. В результате последующего гидролиза от фосфатидной кислоты отщепляется остаток фосфорной кислоты и образуется диацилглицерол (ДАГ). Третья реакция ацилирования посредством ацилтрансферазы приводит к образованию ТАГ. У первого углеродного атома остатка глицерола, как правило, присоединен остаток насыщенной жирной кислоты (чаще пальмитата), а у 2-го и 3-го углеродных атомов — мононенасыщенных жирных кислот (чаще олеата).

Моноацилглицерольный путь обусловлен поступлением в клетки слизистой тонкого кишечника при всасывании большого количества 2-моноацилглицеролов. Две реакции ацилирования 2-моноацилглицерола с помощью фермента ацилтрансферазы приводят к образованию триацилглицеролов.

Синтез глицерофосфолипидов. Первые стадии синтеза фосфолипидов совпадают с синтезом триацилглицеролов. Эти пути расходятся на уровне фосфатидной кислоты и диацилглицерола. Путь синтеза фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина включает активацию с участием АТФ и последующий перенос, например, фосфохолина на ЦДФ с образованием ЦДФ-холина. Последний участвует в переносе холина на диацилглицерол с образованием фосфатидилхолина.

Синтез эфиров холестерина. В клетках слизистой оболочки тонкой кишки всосавшиеся молекулы холестерина также превращаются в эфиры путем взаимодействия с ацил-КоА. Эту реакцию катализируют *ацил-КоА: холестерол-ацилтрансферазы* (АХАТ) (рис. 7.15).

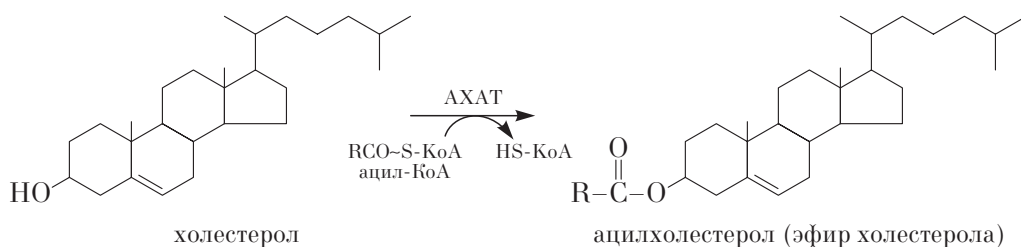


Рис. 7.15. Синтез эфира холестерина

От активности этого фермента зависит скорость поступления экзогенного холестерина в организм. В настоящее время изучаются возможности подавления этой реакции для снижения концентрации холестерина в крови.

7.4. Транспорт липидов

Новосинтезированные триацилглицеролы, фосфолипиды и другие всосавшиеся липиды покидают энтероциты, попадая сначала в лимфу, а потом — в кровь. В связи с тем что большинство липидов, как уже отмечалось, не растворяются в водной среде, транспорт по крови осуществляется в составе специальных частиц — *липопротеинов*.

7.4.1. Структура липопротеинов

Липопротеины представляют собой сферические частицы, диаметр которых уменьшается с увеличением плотности. Они состоят из ядра, включающего гидрофобные липиды (триацилглицеролы и эфиры холестерина), и поверхности, контактирующей с плазмой крови, на которой находятся амфифильные липиды (фосфолипиды, свободный холестерол) и белки (рис. 7.16).



Рис. 7.16. Структура липопротеинов

Белковые компоненты (*апопротеины*) являются важнейшей составной частью липопротеинов. Они необходимы для растворения, стабилизации и транспорта липидов. Апопротеины (табл. 7.3) выполняют структурную функцию, связываются с рецепторами в печени и других тканях, являются кофакторами ферментов, участвующих в метаболизме липопротеинов. Интегральные апопротеины В-100 и В-48 своими гидрофобными участками располагаются во внутренней части липопротеиновых частиц, а гидрофильными — преимущественно на поверхности.

Поверхностные апопротеины в крови могут передаваться от одного липопротеина к другому, определяя их дальнейшее превращение.

Таблица 7.3

Общая характеристика апопротеинов

Апопротеин	Липопротеин	Характеристика
А-I	ЛПВП, хиломикроны	Активатор ЛХАТ
А-II	ЛПВП, хиломикроны	Свойства не определены

Окончание табл. 7.3

Апопротеин	Липопротеин	Характеристика
В-100	ЛПНП, ЛПОНП, ЛППП	Лиганд для рецептора к ЛПНП; секреция ЛПОНП
В-48	Хиломикроны и ремнанты хиломикронов	Секреция хиломикронов
С-I	ЛПОНП, ЛПВП	Возможный активатор ЛХАТ
С-II	ЛПОНП, ЛПНП, хиломикроны	Активатор ЛПЛ
С-III	ЛПОНП, ЛПВП, хиломикроны	Ингибитор ЛПЛ
D	ЛПВП	Белок, переносящий эфиры холестерина
E	ЛПОНП, ЛПВП, хиломикроны, ремнанты хиломикронов	Лиганд для рецепторов В/Е

Примечание. Расшифровку сокращений см. п. 7.4.2.

7.4.2. Номенклатура и характеристика липопротеинов

Различают следующие классы липопротеиновых частиц:

- хиломикроны (ХМ);
- липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП);
- липопротеины промежуточной плотности (ЛППП);
- липопротеины низкой плотности (ЛПНП);
- липопротеины высокой плотности (ЛПВП).

В настоящее время употребляется также старая номенклатура липопротеинов, основанная на их электрофоретической миграции в агарозном геле. Согласно ей, ЛПОНП называются пре- β -липопротеины, ЛППП — β -липопротеины, а ЛПВП — α -липопротеины.

Общая характеристика основных липопротеинов приведена в табл. 7.4.

Таблица 7.4

Общая характеристика липопротеинов плазмы крови

Липопротеины	Источник	Диаметр, нм	Плотность	Процент содержания		Процент от общего количества липидов	
				белка	липидов	ТАГ	эфиры холестерина
Хиломикроны	Кишечник	90–1000	Менее 0,95	1–2	98–99	88	3
ЛПОНП	Печень	30–90	0,95–1,006	7–10	90–93	56	15
ЛППП	ЛПОНП	25–30	1,006–1,009	11	89	29	34
ЛПНП	ЛППП	20–25	1,019–1,063	21	79	13	48
ЛПВП ₂	Печень	10–20	1,063–1,125	33	67	16	31

7.4.3. Транспортная форма экзогенных липидов (хиломикроны)

Хиломикроны (ХМ) являются транспортной формой липидов из кишечника к другим органам и тканям. Максимальная их концентрация в плазме крови отмечается после приема пищи, содержащей липиды; через 4–6 ч они практически исчезают из крови (в крови, взятой натощак, хиломикронов в норме почти нет).

Хиломикроны формируются в клетках слизистой кишечника из ресинтезированных триацилглицеролов, эфиров холестерина и фосфолипидов. Триацилглицеролам принадлежит 95 % всей массы хиломикронов. Важнейшим структурным компонентом хиломикронов является апоВ-48*, аналог апоВ-100. В составе одной частицы хиломикрона находится одна молекула апоВ-48. Этот белок отличается от апоВ-100 тем, что, будучи усеченным, он лишен места связывания для рецептора ЛПНП.

Хиломикроны секретируются с базолатеральной поверхности клеток кишечника в лимфу, а оттуда через грудной лимфатический проток попадают в систему кровообращения. После того как хиломикроны попадают в кровь, они получают от ЛПВП апоС-II, С-III и апоЕ, в то время как небольшое количество триацилглицеролов от хиломикронов перемещаются на ЛПВП (рис. 7.17). Взамен эфиры холестерина с частиц ЛПВП переходят в ядро хиломикронов, частично возмещая убыль гидрофобных триацилглицеролов.

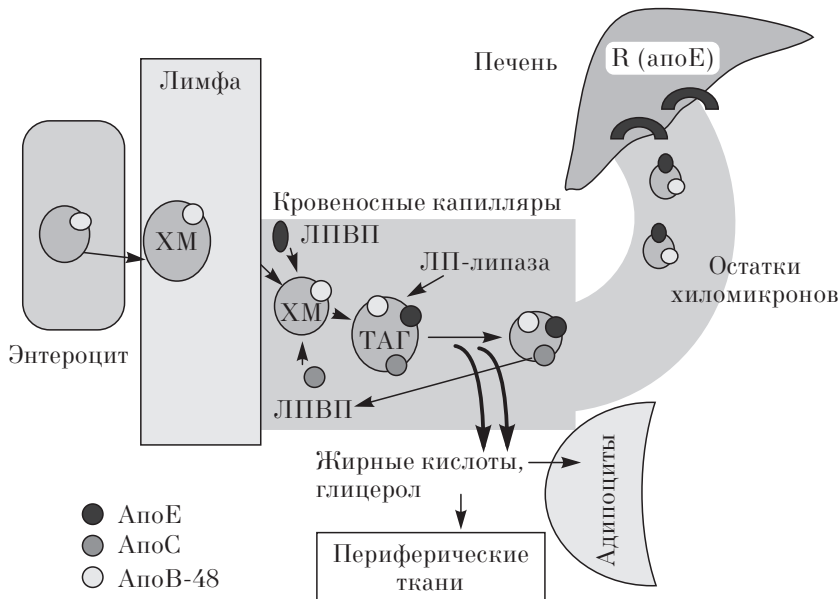


Рис. 7.17. Метаболизм хиломикронов

* АпоВ-48 получил такое название потому, что в его молекуле содержится 48 % аминокислотного состава апоВ-100.

Попадая в систему кровообращения, хиломикроны быстро подвергаются катаболизму под действием *липопротеинлипазы* (ЛП-липаза). Этот фермент образуется в клетках многих тканей, среди которых наибольшее значение имеют жировая ткань, скелетная и сердечная мышцы, молочная железа во время лактации. Однако функционирует ЛП-липаза на наружной поверхности эндотелиальных клеток, выстилающих изнутри стенку сосудов.

Липопротеинлипаза является гликопротеином с молекулярной массой 55 тыс. а.е.м. ЛП-липаза синтезируется в неактивной форме в эндоплазматическом ретикулуме. В аппарате Гольджи происходит гликозилирование фермента и готовая к секреции ЛП-липаза упаковывается в секреторные пузырьки. Активный фермент может секретироваться на поверхность эндотелия в присутствии таких факторов, как гепарин.

Липопротеинлипаза катализирует гидролиз триацилглицеролов в составе хиломикронов до жирных кислот, моноацилглицеролов и глицерола. Фермент проявляет слабую активность по отношению к моноацилглицеролам и фосфолипидам. Высвобождающиеся в процессе расщепления жирные кислоты связываются с альбуминами плазмы крови и транспортируются к клеткам органов и тканей. Клетки поглощают жирные кислоты и используют их в качестве энергетического топлива, строительного материала или для синтеза собственных липидов. Основными потребителями жирных кислот являются жировая и мышечная ткань.

В жировой ткани основным фактором, увеличивающим синтез ЛП-липазы, является *инсулин*. Тем самым обеспечивается поступление жирных кислот для синтеза и хранения в виде триацилглицеролов в жировой ткани. В мышцах ЛП-липаза участвует в поставке жирных кислот для окисления в периоды между приемами пищи, а инсулин подавляет образование этого фермента.

Активность ЛП-липазы регулируется апоС-II, который связывается с ферментом и активирует его. В то же время апоС-III ингибирует активность этого фермента. Увеличение уровня жирных кислот может также ингибировать его активность.

Структуры, которые образуются из хиломикронов после удаления основной части триацилглицеролов, называют *остатками хиломикронов* или *ремнантами*. Последние возвращают апоС-II на ЛПВП и удаляются из кровотока с помощью апоЕ. Рецепторы клеток печени связываются с этим белком и поглощают частицы по механизму эндоцитоза. В клетках печени эндосомы сливаются с лизосомами, и содержимое остатков хиломикронов гидролизуют лизосомальные ферменты.

Таким образом, в процессе катаболизма хиломикроны поставляют жирные кислоты и глицерол клеткам периферических тканей, в то время как холестерол пищи и эфиры холестерина попадают в печень.

7.4.4. Транспортные формы эндогенных липидов (ЛПОНП, ЛППП, ЛНПП, ЛПВП)

В печени интенсивно протекает синтез липидов. Транспорт новосинтезированных липидов из печени в кровь, а оттуда — к органам и тканям осуществляют два других типа липопротеиновых частиц, формирующихся в печени, — липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеины высокой плотности (ЛПВП). Принципы устройства этих частиц аналогичны таковым у хиломикронов. Разница состоит в том, что размеры ЛПОНП и тем более ЛПВП меньше, чем у хиломикронов. Доля белкового компонента в их составе выше (10,4 % и 48,8 % от массы частицы соответственно), а содержание триацилглицеролов — ниже (31,4 % и 1,8 % от массы соответственно). Вследствие этого плотность ЛПОНП и ЛПВП выше, чем у хиломикронов.

Главным липидным компонентом **ЛПОНП** являются триацилглицеролы. Однако, в отличие от хиломикронов, эти триацилглицеролы синтезируются в клетках печени. Поэтому они называются *эндогенными*. Основной интегральный белок — апоВ-100 — большой гидрофобный белок (4536 аминокислотных остатков), который синтезируется в печени. Сборка липопротеинов, содержащих апоВ-100, идет в эндоплазматическом ретикулуме. Каждая частица ЛПОНП содержит один апоВ-100. Важным свойством апоВ-100 является его способность контролировать прохождение частицы ЛПОНП через мембрану эндоплазматического ретикулума. Гидрофобные сегменты, включающие обычно более 16 аминокислотных остатков, образуют трансмембранные «пропускающие» домены.

Функцией липопротеинов, содержащих апоВ-100, является транспорт триацилглицеролов из печени к периферическим тканям, особенно жировой и мышечной.

Для образования ЛПОНП в гепатоцитах требуется апоВ-100, эфиры холестерина, триацилглицеролы, фосфолипиды. Триацилглицеролы для ЛПОНП синтезируются путем эстерификации жирных кислот, поступающих в гепатоциты из плазмы крови (источником их является, например, липолиз в жировой ткани) или синтезирующихся *de novo* в печени. Уровень синтеза ЛПОНП зависит от наличия холестерина, особенно от образования эфиров холестерина под действием АХАТ.

Жирные кислоты, всосавшиеся в кишечнике или синтезированные *de novo*, влияют на скорость образования триацилглицеролов и их использование для сборки липопротеинов. Наряду с ядерной частью липопротеинов, нарастает и поверхностный монослой, так как параллельно триацилглицеролам увеличивается синтез фосфолипидов.

Чрезвычайно важную роль в биосинтезе фосфолипидов, апопротеинов и в формировании ЛПОНП играют следующие *липотропные факторы*:

1. Полиненасыщенные жирные кислоты, инозитол, серин, холин, этаноламин служат структурными компонентами фосфолипидов.

2. Метионин в качестве донора метильных групп необходим для синтеза холина и фосфатидилхолина.

3. Витамин В₆ способствует образованию фосфоэтаноламина из фосфосерина; витамины В₁₂ и фолиевая кислота участвуют в образовании активной формы метионина (S-аденозилметионина) и синтезе фосфатидилхолина.

При недостатке в организме липотропных факторов развивается жировая инфильтрация печени, когда клетки печеночной ткани переполняются триацилглицеролами в результате блокирования секреции ЛПОНП. Дело в том, что при сборке ЛПОНП новосинтезированные триацилглицеролы и фосфолипиды образуют стабильный комплекс с апоВ-100. Если фосфолипидов в составе такого комплекса достаточно, он обладает способностью проходить через мембрану эндоплазматического ретикулума. Если же фосфолипидов образуется недостаточно, формирующаяся частица ЛПОНП не может пройти через мембрану и покинуть клетку. Тогда она подвергается разрушению и триацилглицеролы накапливаются в гепатоцитах. Липотропные факторы препятствуют этому, стимулируя синтез фосфолипидов и образование полноценных ЛПОНП.

Современной фармацевтической индустрией синтезированы препараты, обладающие липотропным эффектом. К ним относятся L-карнитин и его соли, метионин, бетаин (триметилглицин), витамины (пиридоксин, цианкобаламин, фолиевая кислота), Эссенциале форте, Липостабил и др.

ЛПОНП секретируются в просвет капилляров печени. В крови ЛПОНП, подобно хиломикронам, созревают, получая с ЛПВП дополнительные белки: апоС-II, апоС-III и апоЕ. Зрелые ЛПОНП подвергаются в кровотоке действию ЛП-липазы, которая гидролизует содержащиеся в их составе триацилглицеролы до глицерола и ВЖК. В последующем они поступают в клетки органов и тканей. Кофактором ЛП-липазы является апоС-II. По мере того как триацилглицеролы в составе ЛПОНП истощаются, апоD переносит на эти частицы эфиры холестерина от ЛПВП.

Из ЛПОНП образуются *липопротеины промежуточной плотности (ЛППП)*. Обмен ЛППП происходит с помощью другого липолитического фермента, печеночной липазы (ПЛ). Этот фермент синтезируется в гепатоцитах, но активным становится на поверхности эндотелиальных клеток печеночных капилляров, гидролизую триацилглицеролы в составе ЛППП. В отличие от липопротеинлипазы, печеночная липаза нечувствительна к приему пищи и инсулину.

Большая часть ЛППП (около 75 %) поглощается печенью с помощью эндоцитоза, опосредованного рецепторами к апоЕ и апоВ-100. Оставшиеся ЛППП под действием печеночной липазы превращаются в *липопротеины низкой плотности ЛПНП*. Основными компонентами этих частиц являются холестерол и его эфиры (~ 60 %). В процессе превращения ЛППП в ЛПНП вследствие расщепления значительной части триацилглицеролов и снижения доли гидрофобных соединений в их составе липопротеиновые частицы теряют свои белки и единственным белковым компонентом становится апоВ-100. Ему принадлежит важная роль в доставке ЛПНП в клетку путем взаимодействия с рецепторами к апоВ-100. Они находятся в ворсинчатых углублениях на поверхности клеток. В каждой клетке их количество колеблется от 15 тыс. до 70 тыс.

Связанная с рецептором частица ЛПНП подвергается поглощению путем эндоцитоза (рис. 7.18). Внутри образовавшихся эндосом ЛПНП отщепляются от рецепторов. В дальнейшем ЛПНП поступают в лизосомы, где разрушаются. В лизосомах происходит гидролиз эфиров холестерина, находившихся в составе ЛПНП. В результате образуется свободный холестерол или его окисленные формы. Свободный холестерол служит структурным компонентом клеточных мембран, субстратом для синтеза стероидных гормонов, витамина D.

Поступление в клетку холестерола из кровотока оказывает регуляторное влияние, направленное на защиту клетки от чрезмерного накопления холестерола (рис. 7.19).

Во-первых, уменьшается активность 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы (ГМГ-КоА-редуктазы) — ключевого фермента внутриклеточного биосинтеза холестерола (см. п. 7.5.1). Во-вторых, уменьшается синтез новых рецепторов к ЛПНП, что снижает поступление в клетку этих липопротеиновых частиц. В-третьих, стеролы активируют фермент АХАТ, который катализирует этерификацию холестерола (рис. 7.20). Это позволяет клеткам депонировать избыток холестерола в форме его гидрофобных эфиров.

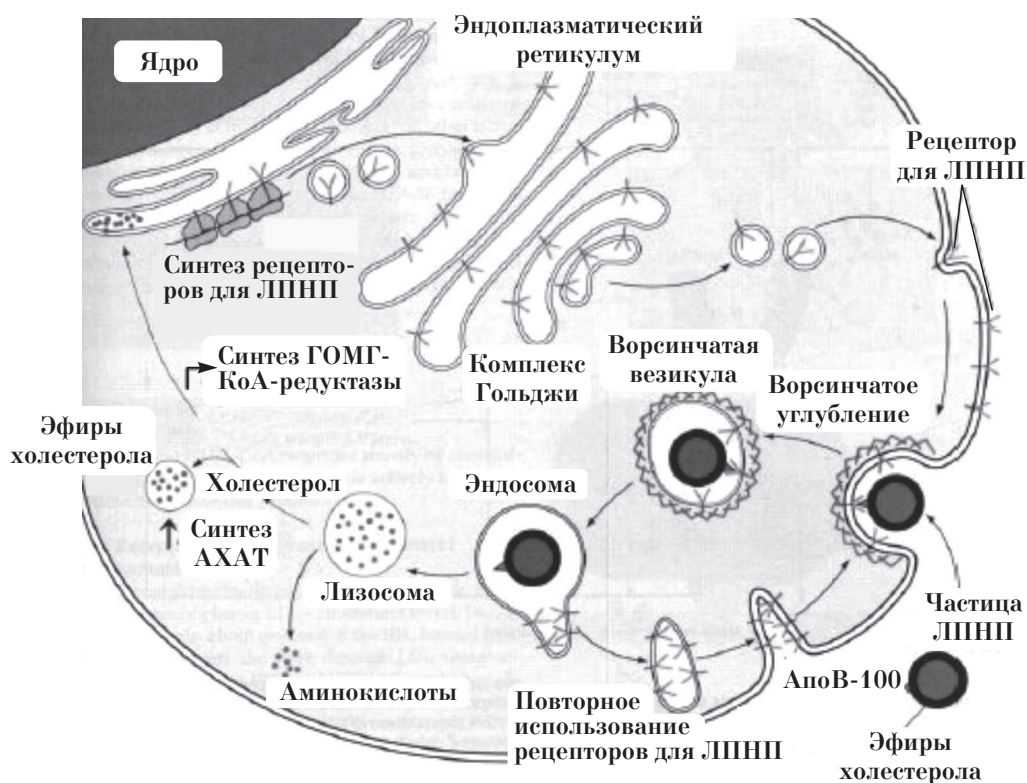


Рис. 7.18. Схема поступления ЛПНП в клетки

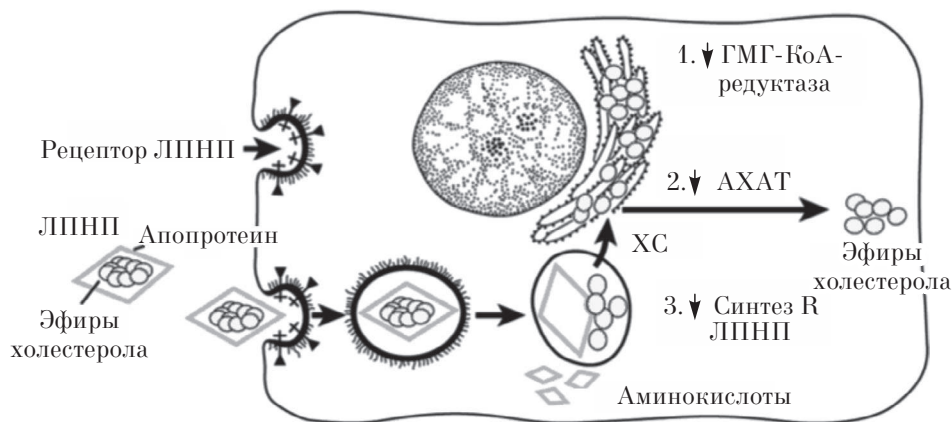


Рис. 7.19. Эффекты холестерина, поступающего в клетку в составе ЛПНП

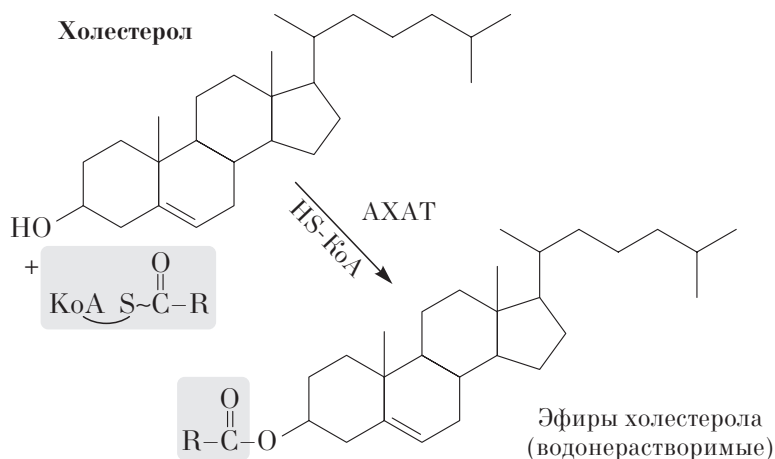


Рис. 7.20. Реакция образования эфиров холестерина, катализируемая АХАТ

Из кровотока посредством рецепторов для апоВ-100 удаляется 75 % ЛПНП. Остальная часть удаляется с помощью рецепторов, имеющих низкую способность связывания с ЛПНП. Этот путь получил образное название «мусорный путь» (см. с. 261).

7.4.5. Обратный транспорт холестерина из периферических тканей к печени (ЛПВП)

Роль *липопротеинов высокой плотности (ЛПВП)* в организме определяется их участием в обратном транспорте холестерина. Иначе говоря, эти липопротеиновые частицы удаляют избыток свободного (неэстерифицированного) холестерина с поверхности клеток.

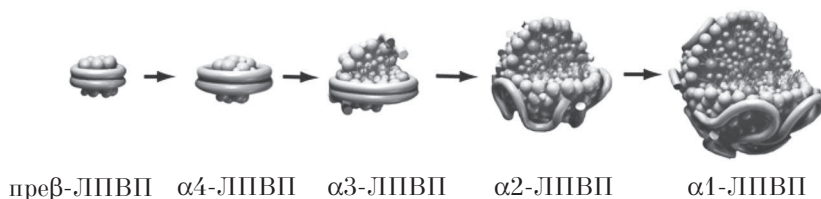


Рис. 7.21. Общий путь превращения ЛПВП

ЛПВП — это целый класс липопротеиновых частиц, которые существенно отличаются друг от друга по липидному и апопротеиновому составу, размерам и функциям.

Захват и транспорт холестерина связан с превращением преβ-ЛПВП в α-ЛПВП, происходящий при участии лецитинхолестероацилтрансферазы (ЛХАТ) и белка, переносящего липиды (ЛПБ) (рис. 7.21). Трансформация обусловлена не только обогащением частиц эфирами холестерина, но и передачей фосфолипидов и белков на другие транспортные формы. В α1-ЛПВП максимально накапливаются эфиры холестерина и апоЕ, что усиливает взаимодействие этих частиц с апоЕ- и апоВ/Е-рецепторами печени и обеспечивает доставку эфиров холестерина в этот орган.

Преβ-ЛПВП образуются в печени. Оттуда они секретируются в кровоток в «незрелом» виде, т.е. имеют дисковидную форму. Такая форма обусловлена очень малым содержанием в ядре нейтральных липидов и эфиров холестерина. Снаружи частицы снабжены мощной оболочкой, состоящей из фосфолипидов, свободного холестерина и апопротеинов (апоЕ, А-I, А-II, С-II, D).

Переход холестерина из клеток на ЛПВП обусловлен разницей его концентрации на поверхности клеточных мембран и липопротеиновых частиц. Следовательно, он продолжается до тех пор, пока не выровняется концентрация холестерина между донором (поверхность мембран) и акцептором (ЛПВП). Поддержание градиента концентрации обеспечивается постоянным превращением свободного холестерина, поступающего на ЛПВП, в эфиры холестерина. Образующиеся эфиры холестерина являются полностью гидрофобными соединениями. Они формируют гидрофобное ядро внутри частиц, благодаря которому ЛПВП приобретают сферическую форму.

Образование эфиров холестерина на ЛПВП является важнейшим компонентом системы разгрузки клеток от избытка холестерина. Этот процесс происходит с помощью фермента ЛХАТ (рис. 7.22). Фермент секретируется в кровь из печени. ЛХАТ — это гликопротеин с М.М. 60 тыс. а.е.м. Фермент связан с поверхностью ЛПВП и катализирует реакцию между фосфатидилхолином (лецитином) и свободным холестерином. Активатором ЛХАТ является апоА-I. При этом образуются эфир холестерина и лизолецитин. Сложноэфирная связь в эфире холестерина образуется за счет присоединения ацильной группы, отщепляемой от 2-го углеродного атома остатка глицерола в составе лецитина, к гидроксильной группе у 3-го углеродного атома холестерина.

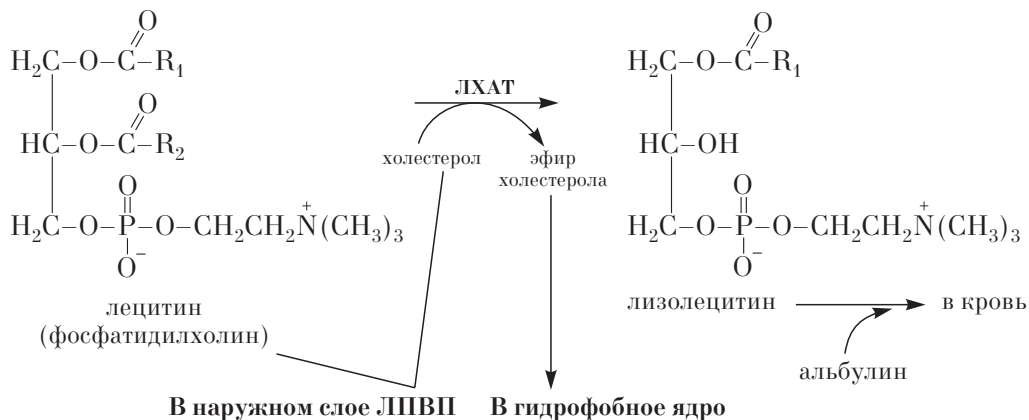


Рис. 7.22. Реакция, катализируемая лецитинхолестеролацилтрансферазой (ЛХАТ)

Образующиеся неполярные эфиры холестерина перемещаются внутрь частицы, освобождая место на поверхности для захвата новых молекул холестерина, и она приобретает сферическую форму (рис. 17.23).

Образовавшиеся эфиры холестерина остаются в плазме крови в составе липопротеинов. Образование эфиров холестерина позволяет липопротеинам переносить значительно больше холестерина, чем если бы он оставался в неэтерифицированной форме.

В кровотоке осуществляется транспорт вновь образованных неполярных эфиров холестерина из ЛПВП на хиломикроны, ЛПОНП, ЛПНП, который осуществляется специальным белком, переносящим липиды (ЛПБ). Он также известен как белок, переносящий эфиры холестерина, или апоD. ЛХАТ и ЛПБ являются основными участниками процесса «обратного транспорта холестерина».

Затем происходит опосредованное рецепторами апоЕ поступление «зрелых» ЛПВП в гепатоциты с последующим их катаболизмом. В частности, высвобождающиеся эфиры холестерина превращаются в желчные кислоты. Часть желчных кислот и холестерина удаляется с калом из организма.

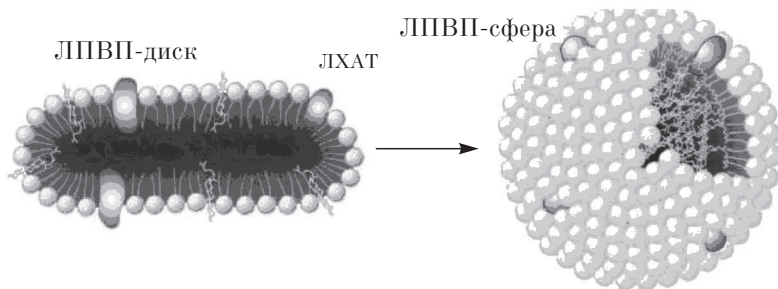


Рис. 17.23. Схематическое изображение процесса «созревания» ЛПВП

7.4.6. Роль липопротеинов в развитии атеросклероза

Атеросклероз — чрезвычайно широко распространенное хроническое заболевание, при котором происходит аккумуляция холестерина в стенках сосудов. В центрах накопления холестерина формируются структуры — атеромы. Это приводит к сужению просвета сосуда и затруднению тока крови.

Накопление холестерина в сосудистой стенке происходит вследствие дисбаланса между его поступлением в интиму сосудов и выходом. Для развития атеросклероза имеет значение появление модифицированных (измененных) ЛПНП (гликозилированных, перекисно-окисленных, образующих комплексы с антителами, с окисленным апоВ и др.). Измененные ЛПНП захватываются специальными «мусорными» рецепторами макрофагов и эндотелиоцитов («мусорный путь»). В результате макрофаги переполняются липидами и превращаются в пенные клетки. Большая часть этих клеток погибает, при этом в интиму поступают накопленные в них эфиры холестерина и свободный холестерол. Это вызывает пролиферативную реакцию, сначала клеточную, а затем фиброзную. Макрофаги, эндотелиоциты и фибробласты начинают секретировать хемотаксические факторы, такие как моноцитарный хемотаксический белок 1 и колониестимулирующий фактор макрофагов, вызывающие миграцию гладкомышечных клеток и моноцитов в интиму. Начинают усиленно синтезироваться соединительнотканые белки (коллаген, эластин), из которых формируется фиброзная ткань и образуется *фиброзная бляшка* — основной элемент атеросклеротического поражения артерий. Фиброзные бляшки изъязвляются и обызвествляются, т.е. происходит отложение фосфата кальция. Здесь образуются тромбы, перекрывающие просвет сосуда, что приводит к острому нарушению кровообращения в данном участке. Осложнением или последствием нарушения кровообращения вследствие атеросклероза являются инфаркт миокарда, инсульт или гангрена.

Низкий уровень ЛПВП способствует развитию атеросклероза, а высокий препятствует его развитию. При этом механизм антиатерогенного действия ЛПВП не ограничивается обратным транспортом холестерина. Он заключается в антиоксидантном эффекте, способности тормозить экспрессию адгезивных молекул на поверхности эндотелия и миграцию моноцитов в интиму сосудов. Кроме того, ЛПВП стимулируют образование простациклина и задерживают агрегацию тромбоцитов; задерживают проникновение ЛПНП в интиму артерий и тормозят пролиферацию гладкомышечных клеток артериальной стенки.

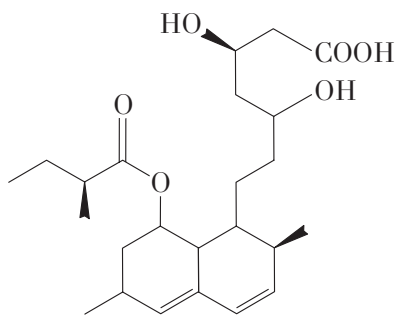
Таким образом, основная задача профилактики и лечения атеросклероза заключается в повышении содержания в плазме крови антиатерогенных ЛПВП и в снижении содержания повышенного уровня атерогенных ЛП.

7.4.7. Лекарственная коррекция нарушений обмена липидов при атеросклерозе

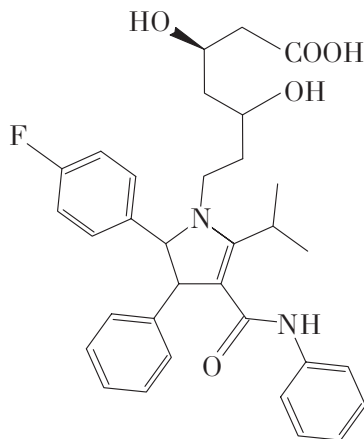
Лекарственная коррекция нарушений обмена липидов при атеросклерозе может быть направлена на ограничение всасывания холестерина в кишечнике и (или) усиление его выведения, подавление биосинтеза холестерина. Кроме того, используются лекарственные средства (фибраты), которые снижают концентрацию холестерина и в плазме крови. Для эффективного лечения применяют, как правило, комбинированное воздействие нескольких лекарственных препаратов.

Лекарственные средства, ингибирующие ключевой фермент биосинтеза холестерина, ГМГ-КоА-редуктазу, называют **статины** (ловастатин, аторвастатин, мевастатин, правастатин, симвастатин, флувастатин и др.)^{*}.

Торможение активности ГМГ-КоА-редуктазы приводит к снижению содержания холестерина в клетках печени (статины преимущественно накапливаются в гепатоцитах) и к синтезу апоЕ/В-рецепторов на плазматических мембранах. В результате увеличивается захват гепатоцитами ЛПНП и ЛППП, а высвобождающийся в результате разрушения ЛПНП и ЛППП холестерол расходуется на образование желчных кислот. Это приводит к снижению концентрации холестерина в составе ЛПНП и за счет этого общего уровня холестерина в крови.



ловастатин

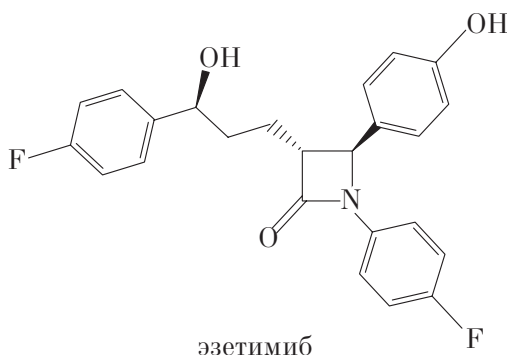


аторвастатин

^{*} Ловастатин вырабатывается как вторичный метаболит гриба *Aspergillus terreus* и *Monascus ruber*. Известны также другие виды грибов, вырабатывающих ловастатин. Мевастатин является метаболитом *Penicillium citricum* и *Penicillium brevicompactum*. Аторвастатин, правастатин, флувастатин получают химическим синтезом, симвастатин — полусинтетическим способом из ловастатина.

Важно заметить, что статины не подавляют полностью активность ГМГ-КоА-редуктазы, сохраняя биологически необходимый уровень мевалоната, и не нарушают функции стероидогенных органов (половых желез, надпочечников).

Средства, угнетающие всасывание холестерина в кишечнике, — группа гиполипидемических средств, представителем которой стал *эзетимиб*. Он избирательно угнетает всасывание холестерина и фитостеролов в кишечнике, при этом не влияет на всасывание других стеролов (желчных кислот, прогестерона, а также жирорастворимых витаминов А и D). Избирательность действия препарата связана с особенностями транспорта холестерина через кишечную стенку.

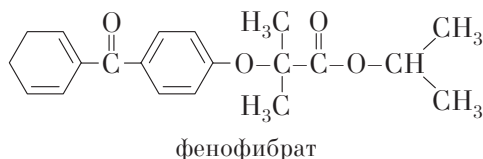
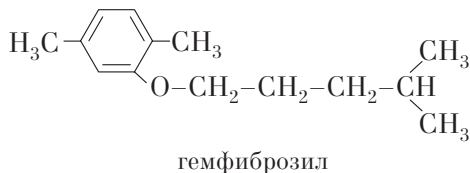
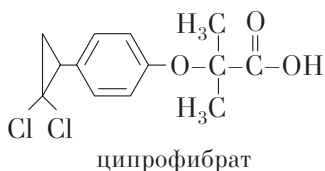


Транспорт холестерина в эпителиоциты осуществляется при участии специфического белка-транспортера Найманна – Пика типа С1 (NPC1L1). Кроме того, в клетках эпителия кишечника существуют АТФ-связывающие кассетные переносчики ABCG5 и ABCG8, которые выводят холестерол из эпителиоцитов в просвет кишечника. Эзетимиб угнетает транспортер NPC1L1 и активирует АТФ-связывающие кассетные транспортеры. В результате всасывание холестерина в кишечнике с последующим его включением в хиломикроны снижается. За счет снижения абсорбции холестерина в кишечнике эзетимиб уменьшает поступление холестерина в печень.

Секвестранты желчных кислот представляют собой синтетические анионообменные смолы. Они не всасываются в желудочно-кишечном тракте и не разрушаются пищеварительными ферментами. Секвестранты желчных кислот связывают холестерол и желчные кислоты в кишечнике (тем самым препятствуя их реабсорбции и повторному использованию) и повышают их выделение с фекалиями. В результате этого поступление их в печень уменьшается, в клетках печени нарастает синтез желчных кислот и начинает больше расходоваться холестерол.

Исторически первым препаратом из секвестрантов является *холестирамин* — сополимер стирола и дивинилбензола, содержащий четвертичные аммониевые группы. В кишечнике холестирамин обменивает ионы хлора на ионы желчной кислоты. Образовавшийся комплекс выводится с экскрементами.

Фибраты представляют собой дериваты изомасляной кислоты, из которых клиническое применение нашли ципрофибрат, гемфиброзил, фенофибрат.



При применении фибратов увеличивается количество липопротеиновых рецепторов в гепатоцитах, снижается уровень ЛПОНП и ЛПНП, а также повышается уровень ЛПВП.

Известно, что фенофибровая кислота (активный метаболит фенофибрата) активирует специфический транскрипционный фактор — ядерный рецептор PPAR α (англ. peroxisome proliferator-activated receptors). Активация PPAR α приводит к усилению синтеза апоА-I, апоА-II и липопротеинлипазы и к торможению синтеза апоС-III, что усиливает гидролиз триацилглицеролов и катаболизм ЛПОНП и ЛПНП. Клофибрат индуцирует синтез ферментов пероксисом, способных окислять жирные кислоты.

В настоящее время одним из направлений научных исследований является поиск *ингибиторов липид-переносящих белков* (ЛПБ) и *белков, переносящих эфиры холестерина* (СЕТР — англ. cholesterol ester transfer protein). Они участвуют в переносе эфиров холестерина с ЛПВП на ЛПНП и ЛПОНП, а триацилглицеролов — в обратном направлении. Липидпереносящие белки принимают участие в реципрокном переносе липидов между ЛПВП и ремнантными частицами хиломикронов. Использование ингибиторов СЕТР (торцетрапиб, далцетрапиб) увеличивает содержание ЛПВП в плазме крови, что препятствует развитию атеросклероза.

7.5. Ацетил-КоА — центральный метаболит в обмене липидов

Одним из ключевых метаболитов липидного обмена является *ацетил-КоА* (рис. 7.24). Это соединение образуется в результате окислительного расщепления высших жирных кислот.

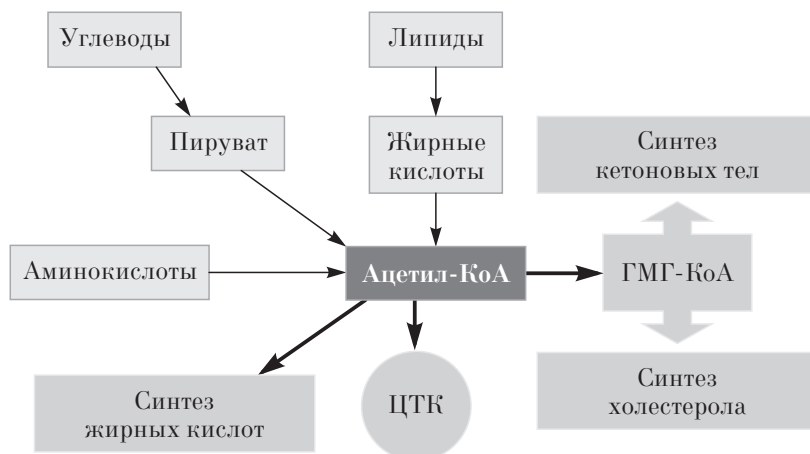


Рис. 7.24. Схема образования и использования ацетил-КоА в клетках (ГМК-КоА — β -гидрокси- β -метилглутарил~КоА)

Посредством ацетил-КоА атомы углерода жирных кислот могут быть использованы для пластических целей — для синтеза холестерина или полиизопrenoидов. В гепатоцитах ацетил-КоА используется в синтезе кетоновых тел — гидрофильных «топливных» молекул, легко транспортируемых в клетки различных органов и тканей. Ацетил-КоА — участник метаболических превращений углеродных скелетов аминокислот и моносахаридов в жирные кислоты, используемые в дальнейшем для синтеза сложных липидов.

Таким образом, обмен липидов оказывается тесно связанным с обменом соединений других классов, а метаболические пути обмена липидов различных классов являются частью метаболической сети, функционирующей в организме.

7.5.1. Биосинтез холестерина

Холестерол — основной стероид организма животных. Общее содержание холестерина в организме составляет около 140 г. Наиболее богаты холестерином мозг, печень, кожа и эндокринные железы животных. В системе кровообращения холестерол представлен смесью, в которой 70 % составляют эфиры холестерина и 30 % — свободный холестерол. Содержание холестерина в организме и его баланс поддерживается благодаря тому, что, с одной стороны, холестерол поступает с животной пищей (яйца, сливочное масло, сыр, мясо, креветки) — около 0,3–0,5 г/сут, а также синтезируется *de novo* — примерно 0,5–1,0 г/сут. С другой стороны, около 1,0 г/сут выводится с калом в виде желчных кислот, холестерола желчи, продуктов катаболизма стероидных гормонов.

Биосинтез холестерина — сложный многостадийный процесс, происходящий во всех клетках, имеющих ядро. В печени синтезируется приблизительно 80 % холестерина, в тонком кишечнике — 15 %, в коже — 5 %.

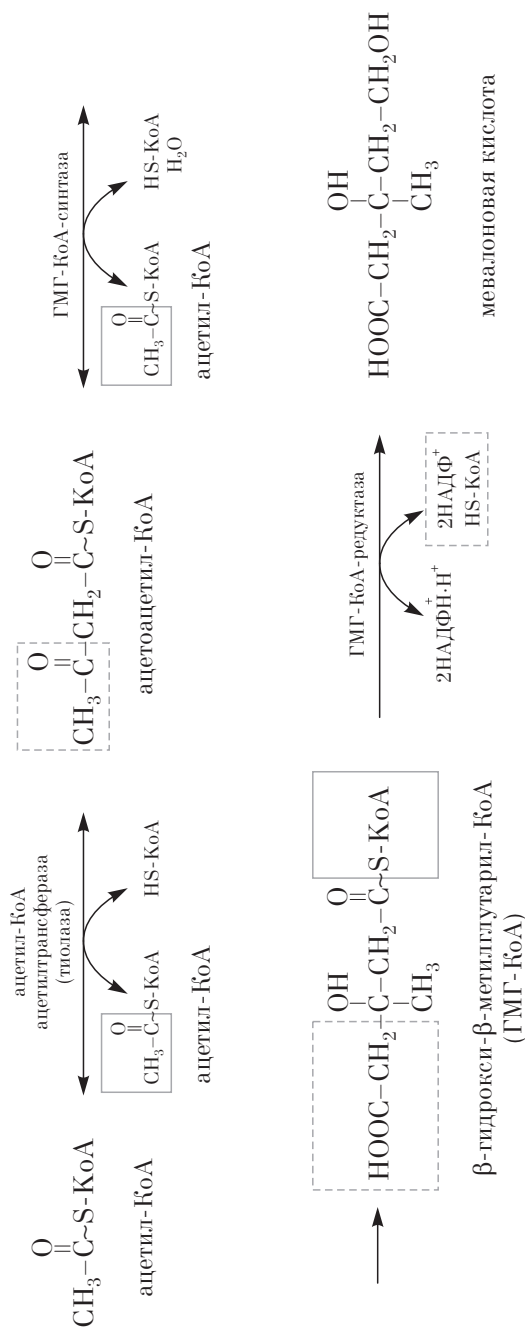


Рис. 7.25. Схема синтеза мевалоната

Биосинтез холестерина был расшифрован с помощью метода меченых атомов. Установлено, что источником всех 27 углеродных атомов молекулы холестерина является ацетил-КоА, а синтез в клетках протекает в цитозоле и эндоплазматическом ретикулуме.

Биосинтез холестерина осуществляется в несколько этапов.

I. Конденсация (рис. 7.25). Включает образование β -гидрокси- β -метилглутарил-КоА (ГМГ-КоА) из ацетил-КоА и превращение ГМГ-КоА в мевалонат.

В результате двух последовательно протекающих реакций (тиолазной и гидроксиметилглутарил-КоА-синтазной) из трех молекул ацетил-КоА образуется одна молекула β -гидрокси- β -метилглутарил-КоА. Реакция превращения ГМГ-КоА в мевалонат катализируется ключевым ферментом ГМГ-КоА-редуктазой. Это первая, практически необратимая реакция в цепи биосинтеза холестерина. Процесс восстановления требует затраты двух молекул НАДФН·Н⁺. Источником НАДФН·Н⁺ является пентозофосфатный путь окисления глюкозы.

II. Образование изопреновых единиц (рис. 7.26). Этот этап включает превращение мевалоната в фарнезилпирофосфат и далее в сквален.

Образовавшийся на первом этапе мевалонат дважды подвергается фосфорилированию по 5-ОН-группе при участии киназ. Донором фосфатных групп в этих реакциях служит АТФ. Пирофосфомевалонат подвергается декарбок-

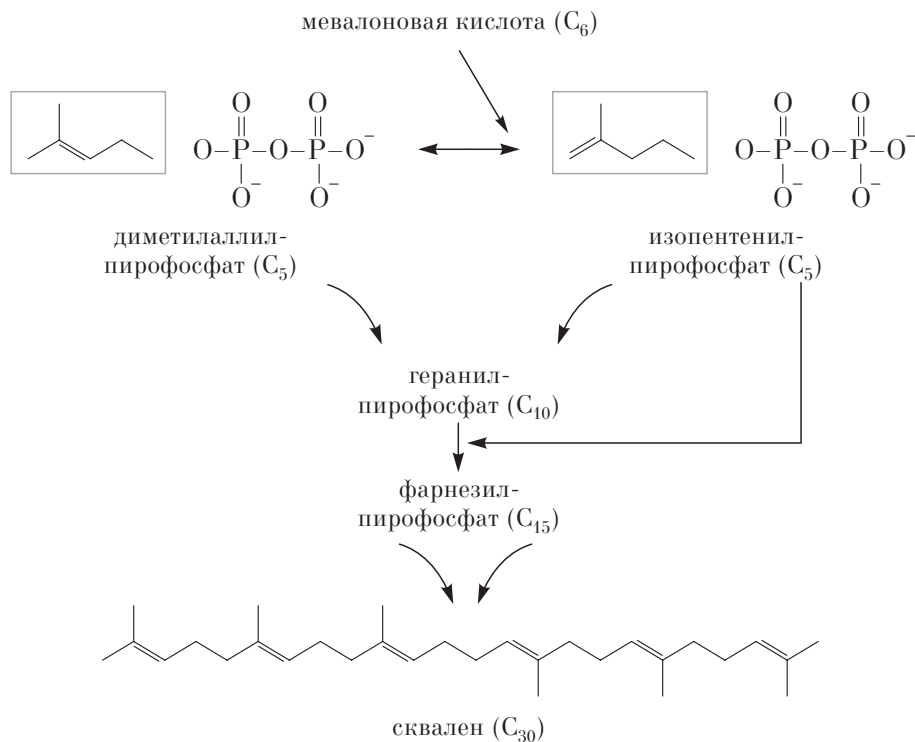


Рис. 7.26. Образование из мевалоната изопреновых соединений

силированию и дегидратации, превращаясь в изопентенилпирофосфат (C_5). Изопентенилпирофосфат (ИППФ) — активная изопреноидная единица, широко распространенная в природе и участвующая в синтезе не только холестерина, но и каротиноидов, боковых цепей убихинонов, витаминов К и Е.

Изопентенилпирофосфат изомеризуется в диметилаллилпирофосфат (C_5). Взаимодействие ИППФ с молекулой диметилаллилпирофосфата приводит к образованию геранилпирофосфата (C_{10}). При этом происходит миграция двойной связи и потеря одной молекулы пирофосфата. К геранилпирофосфату (C_{10}) присоединяется ИППФ (C_5), в результате образуется фарнезилпирофосфат (C_{15}) и освобождается пирофосфат, который гидролизуется пирофосфатазой, что обеспечивает необратимость биосинтетического процесса.

Две молекулы фарнезилпирофосфата, соединяясь и теряя каждая свой пирофосфат, образуют *скавален*, содержащий 30 атомов углерода (C_{30}). Источником атомов водорода в этой реакции является НАДФН·Н⁺, образовавшийся в пентозофосфатном пути обмена глюкозы.

Скавален — непредельный углеводород, состоящий из шести изопреноидных единиц. Молекула скавалена легко принимает пространственную конфигурацию, близкую к пространственной конфигурации стеролов.

На стадии образования скавалена завершается анаэробная фаза биосинтеза холестерина. Последующая фаза биосинтеза является аэробной.

Промежуточные продукты II этапа биосинтеза холестерина (геранилпирофосфат, фарнезилпирофосфат) могут использоваться для синтеза долихола, коэнзима Q, боковой цепи гема *a*, а также для посттрансляционной модификации белков (пренилированные белки).

III. Циклизация скавалена в ланостерол (рис. 7.27). На этом этапе при участии скаваленэпоксидазы, являющейся монооксигеназой, скавален легко окисляется с образованием скавален-2,3-эпоксида.

Ланостеролсинтаза осуществляет замыкание 6- и 5-членных циклов в результате протонирования эпоксидной группы и смещения электронной плотности в системе двойных связей скавалена. По такому пути протекает образование ланостерола в клетках печени. У растений и других организмов в циклизации скавален-2,3-эпоксида принимают участие другие циклизующие ферментные системы с образованием иных продуктов.

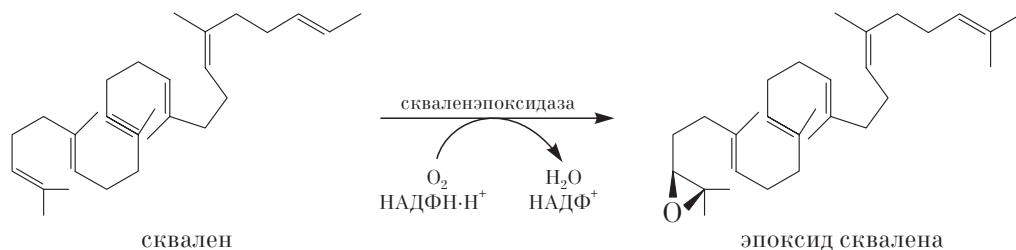
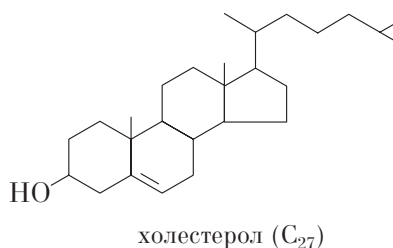
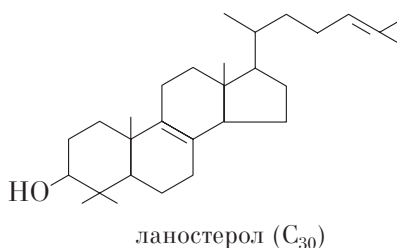


Рис. 7.27. Циклизация скавалена в ланостерол

IV. Превращение ланостерола в холестерол. Ланостерол превращается в мембранах гладкого эндоплазматического ретикулума в холестерол.

Преобразование ланостерола — многоступенчатый процесс, в ходе которого три метильные группы в молекуле ланостерола окисляются до карбоксильных и затем удаляются декарбоксилированием. В результате образуется зимостерол.



Далее дважды происходит перемещение двойной связи и образуется десмо-стерол. После чего в боковой цепи двойная связь восстанавливается и образу-ется холестерол. Восстановителем является НАДФН·Н⁺. Начиная со сквалена все промежуточные продукты биосинтеза холестерола нерастворимы в водной среде, поэтому участвуют в реакциях, будучи связанными со стерин-перено-сящими белками (СПБ). Это обеспечивает их растворимость в цитозоле клетки и протекание соответствующих реакций. СПБ обеспечивают также перемеще-ние холестерола внутри клетки.

В печени из холестерола образуются желчные кислоты, а в эндокринных железах — стероидные гормоны.

7.5.2. Регуляция биосинтеза холестерола

Синтез холестерола регулируется несколькими механизмами. Регуляция осуществляется на этапе превращения β-гидрокси-β-метилглутарил-КоА в ме-валоновую кислоту. Активность фермента ГМГ-КоА-редуктазы, катализирую-щего эту реакцию, ингибируется конечным продуктом — холестеролом. Кроме того, экспрессия иРНК ГМГ-КоА-редуктазы контролируется уровнем холесте-рола. Тем самым, скорость синтеза холестерола регулируется по принципу отрицательной обратной связи. Это помогает поддерживать внутриклеточное содержание холестерола постоянным.

Скорость синтеза ГМГ-КоА-редуктазы в печени подвержена суточным ко-лебаниям (максимум приходится на полночь, минимум — на утренние часы).

Активность ГМГ-КоА-редуктазы регулируется гормонами посредством фос-форилирования и дефосфорилирования (ковалентная модификация структуры фермента).

Инсулин стимулирует дефосфорилирование, а глюкагон — фосфорилиро-вание ГМГ-КоА-редуктазы. Действие инсулина реализуется через фосфатазу

киназы ГМГ-КоА-редуктазы, которая превращает киназу в неактивное дефосфорилированное состояние и фосфатазу ГМГ-КоА-редуктазы путем перевода ее в дефосфорилированное активное состояние. Результатом этих реакций служит образование активной формы ГМГ-КоА-редуктазы и увеличение синтеза холестерина.

Глюкагон тормозит синтез холестерина. Этот гормон посредством аденилат-циклазного механизма активирует протеинкиназу А, которая фосфорилирует ГМГ-КоА-редуктазу и переводит фермент в неактивную форму.

Биосинтез холестерина регулируется также концентрацией специфического стеролпереносящего белка, который связывает нерастворимые в воде промежуточные продукты биосинтеза в клетке и таким образом делает их доступными для последующих ферментативных реакций.

7.5.3. Биосинтез жирных кислот

Наряду с расщеплением жирных кислот в результате их окисления, в клетках функционирует процесс синтеза жирных кислот. Вот его основные *особенности*:

- он происходит в цитоплазме (в отличие от окисления, которое протекает в матриксе митохондрий);
- промежуточные продукты синтеза жирных кислот ковалентно связаны с ацилпереносящим белком (АПБ), тогда как промежуточные продукты β -окисления жирных кислот связаны с коферментом А;
- большинство ферментов синтеза жирных кислот организованы в мультиферментный комплекс, называемый *ацилсинтазным*;
- удлинение цепи синтезируемой жирной кислоты происходит путем последовательного присоединения двууглеродных фрагментов, поставщиком которых служит малонил-АПБ;
- в качестве восстановителя в процессе синтеза жирных кислот выступает НАДФН·Н⁺;
- на этапе образования пальмитата (C₁₆) синтез жирных кислот останавливается. Дальнейшее удлинение, как и введение двойных связей, происходит под действием других ферментных систем.

Синтез жирных кислот *de novo* происходит при наличии достаточного количества глюкозы, когда ацетил-КоА образуется больше, чем требуется для покрытия энергетических нужд. В этих условиях избыток моносахаридов, образовавшийся в результате переваривания углеводов, может запасаться не в форме гликогена, а в виде гидрофобных ТАГ.

Субстраты и ферменты синтеза жирных кислот. Для синтеза пальмитиновой кислоты необходимо 8 молекул ацетил-КоА, 14 НАДФН·Н⁺ (в качестве восстановительных эквивалентов) и 7 АТФ (образование малонил-КоА).

Предшественником углеродных атомов жирных кислот является ацетил-КоА, который образуется из пирувата под действием митохондриального пируват-

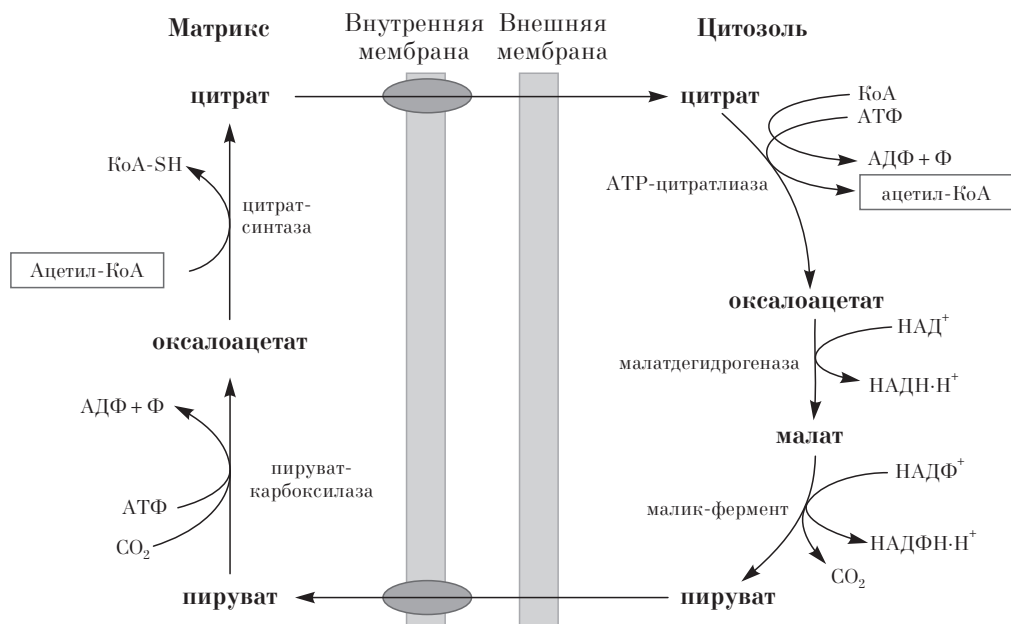
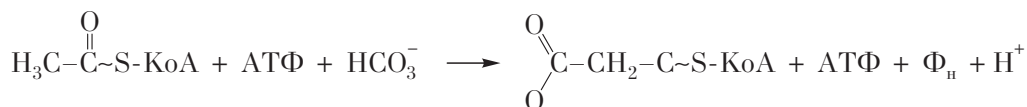


Рис. 7.28. Транспорт ацетил-КоА из матрикса митохондрий в цитоплазму

дегидрогеназного комплекса. Внутренняя митохондриальная мембрана непроницаема для ацетил-КоА. В митохондриях фермент цитратсинтаза катализирует реакцию образования цитрата из ацетил-КоА и ЦУК. Цитрат выходит из митохондрий в цитоплазму, где фермент цитратлиаза расщепляет цитрат до ацетил-КоА и ЦУК. Этот ацетил-КоА и принимает участие в синтезе жирных кислот.

НАДФН·Н⁺, который необходим для восстановительных реакций, протекающих в ходе биосинтеза жирных кислот, поступает в клетки из двух различных источников. В печени НАДФН·Н⁺ образуется, главным образом, в реакциях пентозофосфатного пути, в клетках жировой ткани — преимущественно за счет функционирования челночного механизма, обеспечивающего перенос остатка уксусной кислоты из митохондрий в цитоплазму (рис. 7.28).

Ацетил-КоА-карбоксилаза — сложный фермент, содержащий в качестве простетической группы биотин (витамин Н), — катализирует ключевую реакцию в синтезе жирных кислот. Эта реакция выглядит следующим образом:



На первой стадии происходит АТФ-зависимое присоединение CO₂ к атому азота биотина (рис. 7.29, а). На второй стадии активированный CO₂ переносится с биотина на ацетил-КоА с образованием малонил-КоА (рис. 7.29, б).

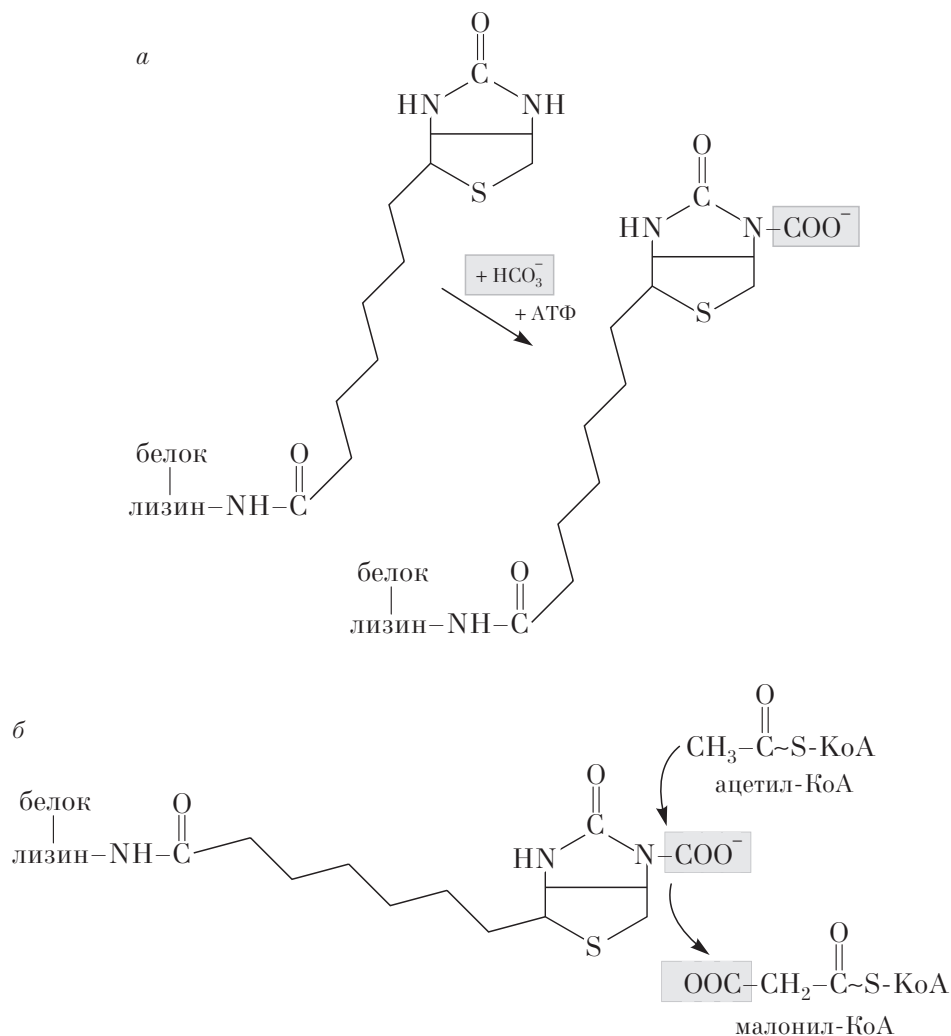


Рис. 7.29. Участие биотина в реакции, катализируемой ацетил-КоА-карбоксилазой

Ацетил-КоА-карбоксилаза — регуляторный фермент. Катализируемая им реакция является лимитирующей для всего процесса биосинтеза жирных кислот в животных тканях. Повышение концентрации малонил-КоА аллостерически увеличивает активность этого фермента, а увеличение концентрации пальмитоил-КоА — снижает.

Гормональная регуляция активности ацетил-КоА-карбоксилазы основана на том, что она подвергается обратимому фосфорилированию/дефосфорилированию: цАМФ-зависимая протеинкиназа ингибирует ферментативную активность, а фосфатаза — активирует. Инсулин стимулирует дефосфорилирование и повышает активность ацетил-КоА-карбоксилазы, а глюкагон и адреналин

стимулируют фосфорилирование и снижают его активность. Под влиянием инсулина происходит также индукция синтеза новых молекул фермента.

Все стадии синтеза жирных кислот представляют собой циклический процесс, протекающий на поверхности *синтазы жирных кислот*. Это мультиферментный комплекс, куда входит ацил-переносящий белок (АПБ) и 7 ферментов: КС — кетоацилсинтаза, МТ — малонилтрансфераза, КР — кетоацилредуктаза, ГД — гидроксиацилдегидратаза, ЕР — еноилредуктаза, АТ — ацетилтрансфераза и тиоэстеразы (рис. 7.30).

У эукариот синтаза состоит из двух одинаково построенных частей — субъединиц, что позволяет ей одновременно синтезировать две жирные кислоты. Суммарная молекулярная масса этого комплекса, находящегося в цитоплазме клеток, составляет около 400 тыс. а.е.м.

В синтазе жирных кислот есть две SH-группы, существенные для катализа, одна из которых принадлежит 4-фосфопантетеину АПБ, входящему также в состав кофермента А, другая — специфическому остатку цистеина в молекуле β -кетоацил-АПБ-синтазы. Фосфопантетеиновая группа АПБ выполняет функцию своеобразного рычага, который переносит в определенной последовательности ковалентно связанные промежуточные субстраты жирных кислот от активного центра одного фермента к активному центру другого фермента.

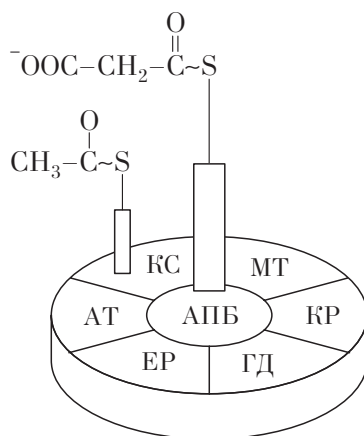
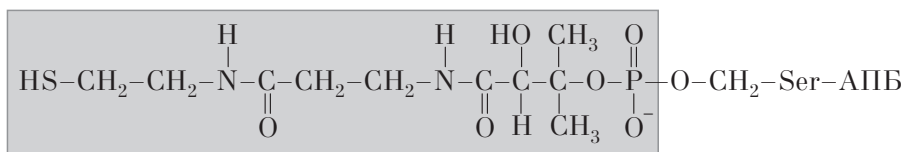


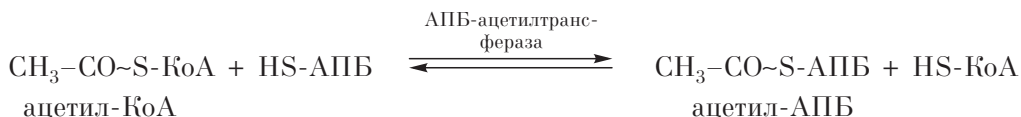
Рис. 7.30. Схематическое изображение субъединицы ацилсинтазного комплекса



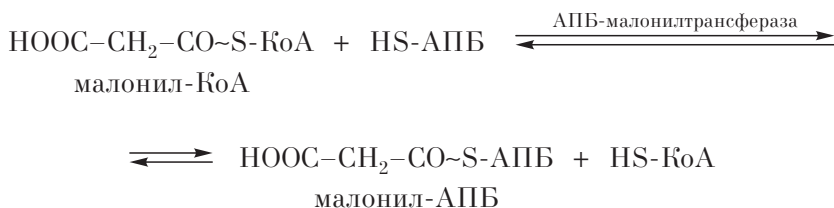
фосфопантетеиновая группа АПБ

Для того чтобы начался синтез жирных кислот, необходимо, чтобы образовались комплексы ацетил-АПБ и малонил-АПБ. Это происходит в результате двух последовательных реакций, катализируемых АПБ-ацетил- и АПБ-малонилтрансферазой.

АПБ-ацетилтрансфераза катализирует реакцию переноса ацетил-КоА на ацилсинтазный комплекс:



Реакцию переноса малонил-КоА на ацилсинтазный комплекс катализирует АПБ-малонилтрансфераза:



После завершения этих реакций с синтазой оказываются ковалентно связанными две ацильные группы: ацетильная, присоединенная к SH-группе цистеина β -кетоацилсинтазы, и малонильная, связанная с SH-группой 4-фосфопантетеина ацилпереносящего белка.

Процесс наращивания цепи происходит в четыре этапа.

I. Конденсация (рис. 7.31). Ацетильная и малонильная группы конденсируются с образованием ацетоацетильной группы, которая связана с SH-группой АПБ. Одновременно с этим происходит отщепление молекулы CO_2 . Катализирует этот процесс β -кетоацил-АПБ-синтаза. Ацетильная группа становится концевым двууглеродным звеном вновь образованной ацетоацетильной группы. Выделившийся CO_2 — та молекула диоксида углерода, которая первоначально включилась в молекулу малонил-КоА. При отщеплении CO_2 от малонильной группы резко возрастает реакционная способность оставшегося двууглеродного фрагмента и благодаря этому он может быстро взаимодействовать с ацетильной группой.

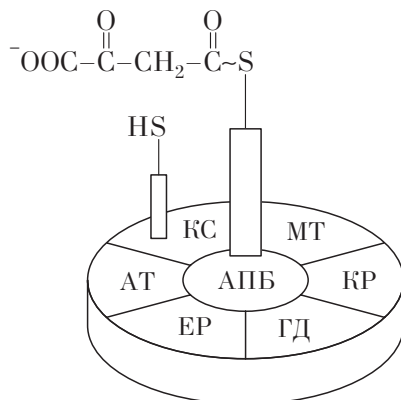


Рис. 7.31. Этап образования ацетоацетил-АПБ в ацилсинтазном комплексе

II. Восстановление (рис. 7.32). Ацетоацетил-АПБ подвергается восстановлению по карбонильной группе с образованием β -гидроксibuтирил-АПБ. Эта реакция катализируется β -кетоацил-АПБ-редуктазой, использующей в качестве восстановителя НАДФН· H^+ .

III. Дегидратация. От β -гидроксibuтирил-АПБ отщепляется молекула воды под действием β -гидроксиацил-АПБ-дегидратазы с образованием кротонил-АПБ.

IV. Восстановление. Этот этап завершает один цикл элонгации, осуществляемой комплексом синтазы жирных кислот. Двойная связь восстанавливается под действием еноил-АПБ-редуктазы. Для этого процесса требуется восстановленный НАДФН· H^+ .

Далее происходит перенос бутирильной группы с HS-АПБ на HS-цистеина.

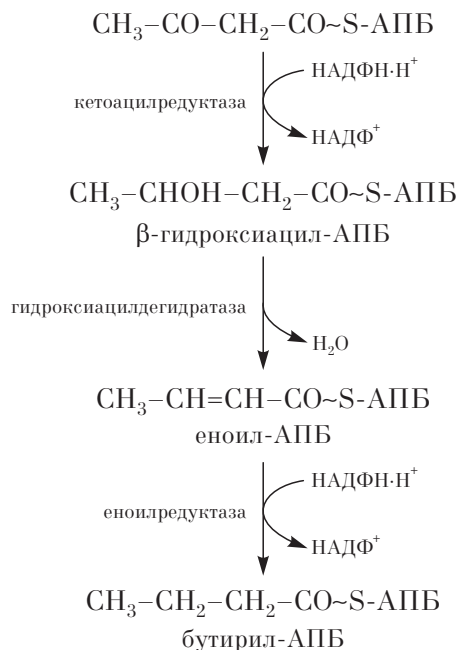
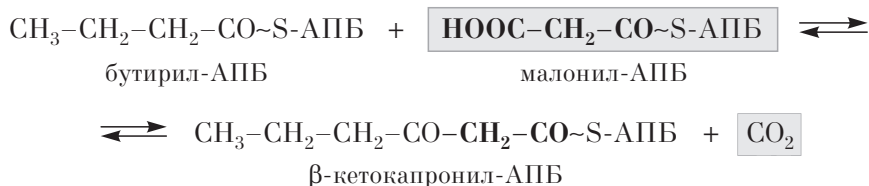


Рис. 7.32. Реакции синтеза жирных кислот на ацилсинтазном комплексе

Затем бутирильная группа покидает группу цистеина и замещает --COOH в малонильной группе на HS-АПБ . В результате образуется 6-углеродная ацильная группа, связанная с HS- группой АПБ.



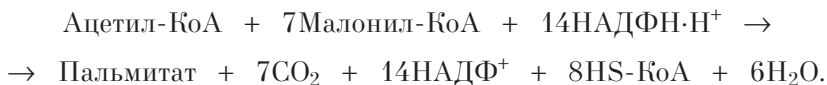
После этого 6-углеродный фрагмент переносится с SH- группы АПБ на SH- группу цистеина. Растущий жирнокислотный остаток поочередно связывается с HS- группой АПБ и SH- группой цистеина в составе β -кетואцил-АПБ-синтазы, ни разу не покидая комплекс, до тех пор, пока не завершится образование пальмитоил-АПБ (C_{16}). Для образования пальмитата необходимо семь таких циклов.

В конечном счете, все углеродные атомы жирной кислоты образуются из ацетил-КоА, так как малонил-КоА образуется из ацетил-КоА.

Завершается синтез жирной кислоты отщеплением HS-АПБ от ацил-АПБ под влиянием фермента деацилазы (тиоэстеразы).



Суммарное уравнение синтеза пальмитата выглядит следующим образом:



Пальмитиновая кислота служит предшественником для синтеза других насыщенных жирных кислот с более длинной цепью в организме животных и человека. *Элонгация* происходит путем добавления двууглеродного фрагмента к карбоксильному концу жирной кислоты при помощи ферментов, имеющих как в цитозоле (микросомальные ферменты), так и в митохондриях.

Имеется две отдельные системы элонгации в микросомах и в митохондриях. В микросомальной системе элонгации в качестве донора двууглеродной группировки используется малонил~КоА, а в митохондриальной системе — ацетил~КоА.

7.5.4. Синтез ненасыщенных жирных кислот

Образование ненасыщенных жирных кислот (*десатурация*) происходит на мембране ЭПР; двойные связи возникают за счет работы микросомального комплекса ферментов, состоящего из трех компонентов белковой природы: цитохрома b_5 , цитохром- b_5 -редуктазы и десатуразы (ацилксигеназы), которые содержат в своем составе негемовое железо (рис. 7.33).

Из этих компонентов образуется короткая цепь переноса электронов, с помощью которой на короткий период в молекулу жирной кислоты включаются гидроксильные группы. Затем они отщепляются в виде воды, в результате в молекуле жирной кислоты формируется двойная связь. Имеется целое семейство десатураз, которые специфичны к определенному месту введения двойной связи. *Стеароил-КоА-десатураза* катализирует образование двойной связи между C_9 и C_{10} в жирных кислотах. Эти процессы требуют участия молекулярного кислорода и НАДФН· H^+ .

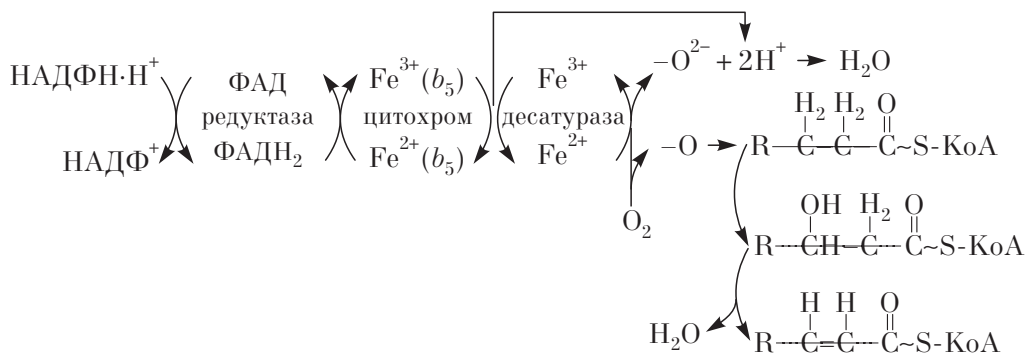


Рис. 7.33. Участие микросомальной системы транспорта электронов в десатурации жирных кислот

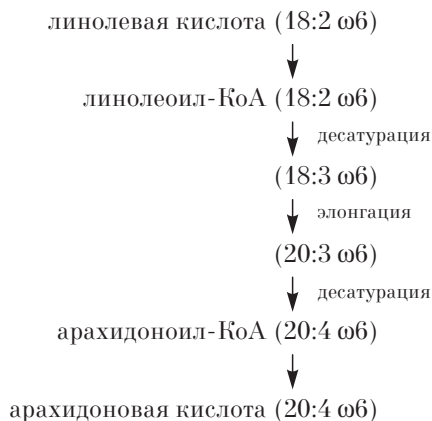


Рис. 7.34. Схема синтеза арахидоновой кислоты из линолевой кислоты

Среди ненасыщенных жирных кислот в организме человека не могут синтезироваться ω3 и ω6 жирные кислоты в связи с отсутствием ферментной системы, которая могла бы катализировать образование двойной связи в положении ω6 или любом другом положении, близко расположенном к ω-концу. К таким жирным кислотам относятся линолевая кислота (18:2 Δ9,12), линоленовая (18:3 Δ9,12,15) и арахидоновая (20:4 Δ5,8,11,14). Эти жирные кислоты относятся к категории незаменимых, или эссенциальных, т.е. должны поступать в организм с пищей.

Арахидоновая кислота является незаменимой только при недостатке линолевой кислоты, поскольку в норме она может синтезироваться из линолевой кислоты (рис. 7.34). В процессе синтеза арахидоновой кислоты у человека участвуют две десатуразы (катализировать образование двойной связи) и одна элонгаза (катализировать присоединение двууглеродного фрагмента к карбоксильному концу жирной кислоты).

Специфическое значение полиненасыщенных жирных кислот для организма заключается в том, что они придают жидкость клеточным мембранам, а также являются предшественниками эйкозаноидов (арахидоновая кислота).

7.5.5. Эйкозаноиды

Эйкозаноиды — это группа биологически активных веществ, содержащих 20 атомов углерода; включает в себя три подгруппы соединений: простагландины, тромбоксаны и лейкотриены. Они обладают многогранной физиологической (фармакологической) активностью. Лекарственные средства, содержащие простагландины и их производные, используют в экспериментальной и клинической медицине.

Эйкозаноиды в организме быстро разрушаются. Их инактивация происходит путем окисления. Конечные продукты — дикарбоновые кислоты — выделяются из организма с мочой.

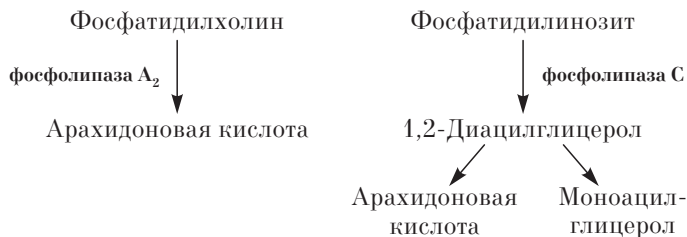


Рис. 7.35. Высвобождение арахидоновой кислоты из мембранных фосфолипидов

Синтез **простагландинов** (ПГ) начинается после высвобождения арахидоновой кислоты из фосфолипидов мембраны под действием фосфолипазы A_2 или фосфолипазы C (рис. 7.35).

В цитоплазме происходит ее превращение в простагландины (циклооксигеназный путь) или лейкотриены (липоксигеназный путь) (рис. 7.36). В циклооксигеназном пути в арахидоновую кислоту включаются четыре атома кислорода и формируется пятичленное кольцо. Липоксигеназный путь начинается с присоединения кислорода к атому углерода у двойной связи с образованием гидропероксидов.

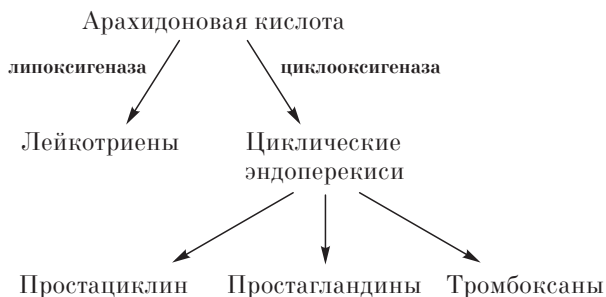
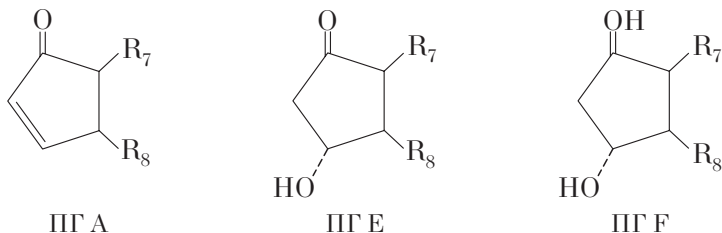


Рис. 7.36. Схема образования эйкозаноидов из арахидоновой кислоты

Молекула простагладина содержит пятичленный цикл и две боковые цепи. Обычно в 15-м положении у них имеется гидроксильная группа. В зависимости от степени окисления цикла и характера боковых цепей простагландины делят на несколько классов, обозначаемых буквами: A, B, C, D, E, F, H, I, J. Основными являются четыре класса этих соединений (A, E, F, I).



Внутри типа простагландины делят на серии (1, 2, 3) в зависимости от числа двойных связей в боковых цепях молекулы. У человека наиболее важной является серия 2. С учетом типа и серии простагландины обозначают как ПГ E₂, ПГ D₁, ПГ H₂ и т.д. (цифра в нижнем индексе у буквенного символа указывает число двойных связей в боковой цепи).

Синтез простагландинов серии 1, 2 и 3 происходит из разных субстратов:

- серия 1 — из эйкозатриеновой кислоты (20:3 Δ 8,11,14; ω6) — ПГ E₁, ПГ F₁, ПГ I₁;
- серия 2 — из арахидоновой кислоты (20:4 Δ 5,8,11,14; ω6) — ПГ E₂, ПГ F₂, ПГ I₂;
- серия 3 — из эйкозапентаеновой кислоты (20:5 Δ 5,8,11,14,17; ω3) — ПГ E₃, ПГ F₃, ПГ I₃.

Превращение арахидоновой кислоты в ПГ H₂ происходит посредством циклоксигеназной и пероксидазной реакций. Дальнейшие превращения ПГ H₂ осуществляют соответствующие изомеразы, набор которых в разных тканях различается, в результате образуется целая группа различных активных эйкозаноидов (рис. 7.37).

Особо следует отметить ПГ I₂. Это соединение имеет другое название — простациклин. В его молекуле между пятичленным циклом и одной из боковых цепочек находится циклическая структура. Простагландин I₂ предотвращает агрегацию тромбоцитов на эндотелии кровеносных сосудов.

К функциям, регулируемым простагландинами, относятся сокращение гладких мышц, липолиз, секреция желудочного сока, проницаемость клеточных мембран, электролитный баланс, свертывание крови. Простагландин E₁ расширяет сосуды. Простагландин E угнетает желудочную секрецию. С образованием простагландинов сопряжено сокращение мускулатуры матки, а ПГ F_{2α} и ПГ E₂ используются для стимуляции родов, проведения аборта на поздних сроках беременности по медицинским показаниям. Простагландин I₂ применяют для снижения

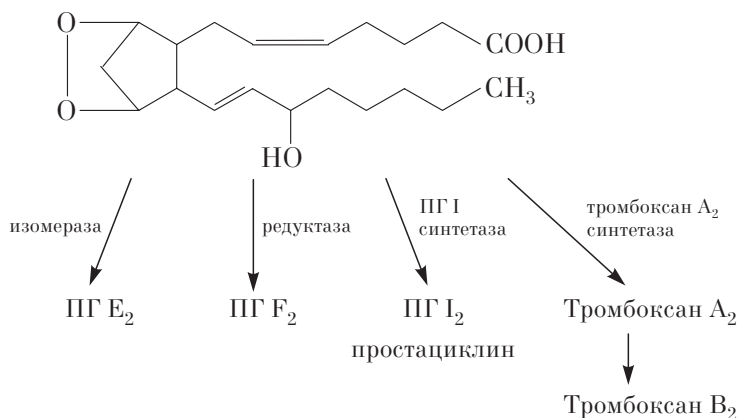


Рис. 7.37. Образование различных групп эйкозаноидов из ПГ H₂

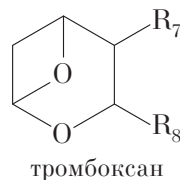
вероятности свертывания крови во время операций с использованием аппарата искусственного кровообращения.

Простагландины взаимодействуют с рецепторами цитоплазматических мембран. Многие их эффекты опосредует цАМФ. Один и тот же простагландин может действовать по паракринному механизму (влияние на ближайшую клетку) и аутокринному, т.е. воздействуя на продуцирующую клетку. Простагландины способны проникать через мембраны, включая гематоэнцефалический барьер, и связываться с внутриклеточными белками, влияя на синтез ДНК.

Для разных групп эйкозаноидов характерна противоположность действия на одни и те же явления (к примеру, действие простаглана и тромбоксана на сердечно-сосудистую систему).

Тромбоксаны отличаются от простагландинов тем, что в циклическую часть их молекулы входит атом кислорода. В результате образуется 6-членный цикл, а не 5-членный, как в простагладинах.

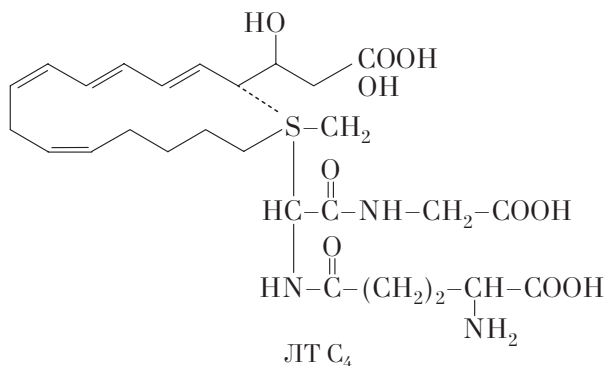
Тромбоксаны, в частности тромбоксан A_2 , вызывают агрегацию тромбоцитов, сужение сосудов и бронхов, пролиферацию лимфоцитов.

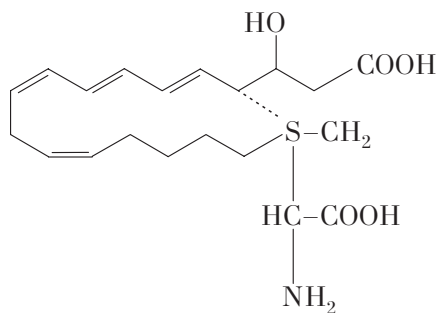


Характерная особенность строения **лейкотриенов** (ЛТ) — отсутствие циклической структуры и наличие четырех двойных связей, три из которых являются сопряженными (триен). В зависимости от количества двойных связей выделяют типы лейкотриенов А, В, С, D и Е. Они образуются из полиненасыщенных жирных кислот посредством липоксигеназного метаболического пути. Например, 5-липоксигеназа, обнаруженная в лейкоцитах, катализирует превращение арахидоновой кислоты в 5-гидроксипероксиэйкозатетраеновую кислоту (5-ГПЭТЕ), которая затем превращается в различные лейкотриены (рис. 7.38).

Функции лейкотриенов:

- ЛТ B_4 вызывает хемотаксис и агрегацию лейкоцитов, усиливает проницаемость сосудистой стенки, пролиферацию Т-клеток, секрецию интерферона- γ , интерлейкина-1 и интерлейкина-2;
- ЛТ C_4 , ЛТ D_4 , ЛТ E_4 расширяют сосуды, увеличивая их проницаемость, вызывают сокращение бронхов;





- ЛТ A₄ активирует хемотаксис и образование супероксидного анион-радикала в лейкоцитах.

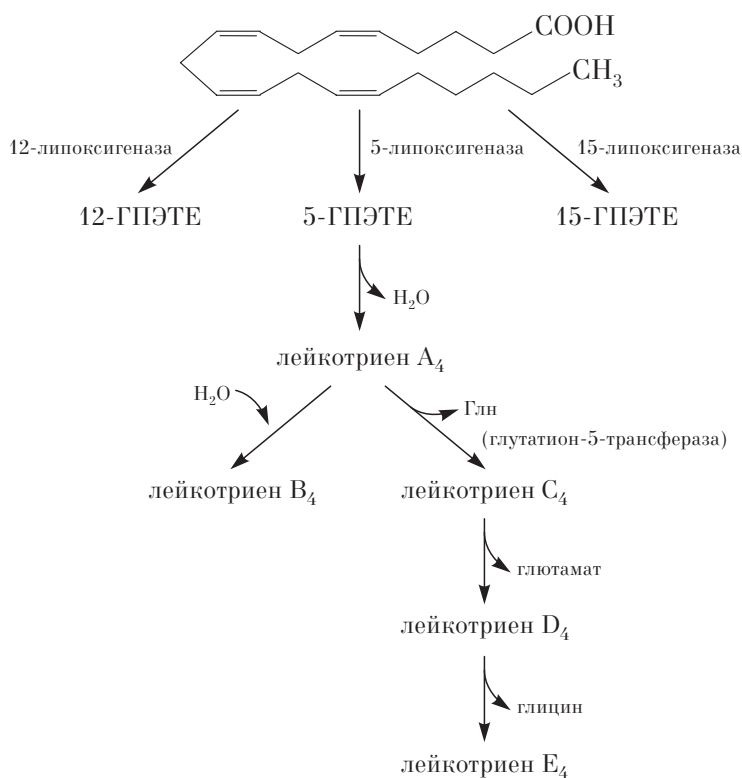


Рис. 7.38. Схема образования лейкотриенов

7.5.6. Ингибиторы синтеза эйкозаноидов

Глюкокортикоиды — гормоны пучкового слоя коры надпочечников — опосредованно, за счет индукции синтеза белков липокортинов*, подавляют активность фосфолипазы A_2 и, следовательно, образование всех типов эйкозаноидов. На этом основано их широкое использование при воспалительных, аутоиммунных и аллергических заболеваниях.

Другие противовоспалительные препараты нестероидной природы (аспирин, индометацин, фенилбутазон) ингибируют циклоксигеназу (ЦОГ**) и снижают выработку простагландинов и тромбоксанов, тем самым уменьшая боль и воспаление. Они нашли применение в кардиологии и как жаропонижающие средства.

Аспирин ингибирует активность ЦОГ-1 и ЦОГ-2 путем ацетилирования остатка серина в их активном центре (неселективный ингибитор). В результате блокируется доступ арахидоната к активному центру фермента. Причем такое действие аспирина является необратимым. Препарат проявляет противовоспалительную и анальгезирующую способность вследствие ингибирования ЦОГ-2. Ингибирование ЦОГ-1 приводит к изъязвлению слизистой желудка и к другим побочным эффектам. Так, развитие бронхоспазма обусловлено тем, что активность фосфолипазы A_2 остается постоянной, простагландины не синтезируются, арахидоновая кислота идет на синтез лейкотриенов, которые и обеспечивают бронхоспазм.

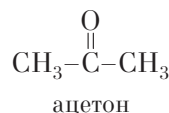
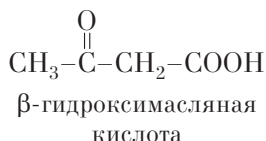
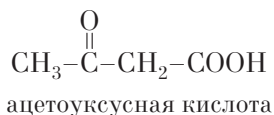
ЦОГ-2 — индуцибельная изоформа. ЦОГ-2 экспрессируется макрофагами, фибробластами, гладкой мускулатурой, хондроцитами и эндотелиальными клетками после активации их цитокинами и факторами роста. *Ибупрофен* и *ацетоминофен* (*парацетамол*) — конкурентные обратимые ингибиторы обеих изоформ ЦОГ. Считают, что терапевтическое действие этих препаратов связано в основном с ингибированием ЦОГ-1.

* Липокортин-1 (аннексин-1) — белок, состоящий из 346 аминокислот. Дополнительно угнетает активность циклооксигеназы, что усиливает ингибиторный эффект на биосинтез простагландинов. Связываясь со специфическими липокортиновыми рецепторами на мембране лейкоцитов, липокортин-1 угнетает активность лейкоцитов: эпителиальную адгезию, миграцию лейкоцитов из сосудистого русла, хемотаксис, фагоцитоз, окислительный метаболизм. Липокортин-1 снижает освобождение различных медиаторов аллергии и воспаления (в частности, лизосомальных ферментов, цитокинов, тканевого активатора плазминогена) из нейтрофилов, макрофагов и тучных клеток.

** У человека есть два гена, кодирующих изоформы ЦОГ: ЦОГ-1 и ЦОГ-2.

7.5.7. Образование кетонowych тел (кетогенез)

Когда происходит интенсивное окисление жирных кислот, в печени образуются значительные количества так называемых *кетонowych тел*: ацетоуксусной кислоты, β -гидроксимасляной кислоты и ацетона.



Все эти продукты берут начало от ацетоацетил-КоА, который образуется при конденсации двух молекул ацетил-КоА (рис. 7.39).

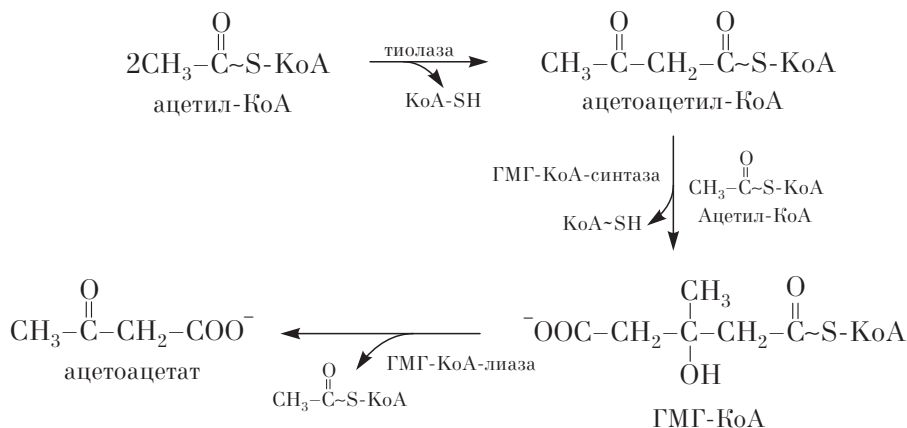


Рис. 7.39. Синтез ацетоацетата в митохондриях гепатоцитов

Реакция конденсации происходит в митохондриях печени. Ацетоацетил-КоА взаимодействует еще с одной молекулой ацетил-КоА и превращается в β -гидрокси- β -метилглутарил-КоА (ГМГ-КоА). Напомним, что в цитоплазме ГМГ-КоА является важным промежуточным соединением, которое образуется при синтезе холестерина.

Расщепление β -гидрокси- β -метилглутарил-КоА ферментом *лиазой* является основным путем образования ацетоуксусной кислоты в печени. В дальнейшем ацетоуксусная кислота восстанавливается под влиянием фермента β -гидроксисутиратдегидрогеназы. В результате образуется β -оксимасляная кислота.



Ацетон образуется из ацетоуксусной кислоты при декарбоксилировании.



Кетоновые тела как источник энергии. Из печени кетоновые тела попадают во внепеченочные ткани. Кетоновые тела — водорастворимые соединения, поэтому они легко транспортируются по крови, проходят через внутреннюю мембрану митохондрий и гемато-энцефалический барьер. В норме они являются источником энергии для мышц, но при продолжительном голодании и сахарном диабете могут использоваться в качестве источника энергии различными тканями, включая ЦНС. Следует отметить, что там они подвергаются окислению предпочтительно по сравнению с глюкозой и жирными кислотами.

Окисление кетоновых тел *не может* проходить в печени! В митохондриях периферических тканей кетоновые тела должны вновь превратиться в ацетил-КоА. Сначала β -гидроксибутиратдегидрогеназа катализирует окисление β -гидроксибутирата до ацетоацетата в НАД⁺-зависимой реакции. Затем с помощью фермента сукцинил-КоА/ацетоацетил-КоА-трансферазы кофермент А перемещается из молекулы сукцинил-КоА на ацетоацетат. Образуется ацетоацетил-КоА, который является промежуточным продуктом последнего витка β -окисления жирных кислот (рис. 7.40).

Тиолаза довершает расщепление ацетоацетил-КоА, встраивая КоА по месту разрыва связи между α - и β -углеродными атомами. В результате образуется две молекулы ацетил-КоА, который окисляется в цикле трикарбоновых кислот.

Сукцинил-КоА/ацетоацетил-КоА-трансфераза в печени не образуется. Именно поэтому там не может происходить окисление кетоновых тел. Зато в клетках мозга спустя несколько суток после начала голодания начинается

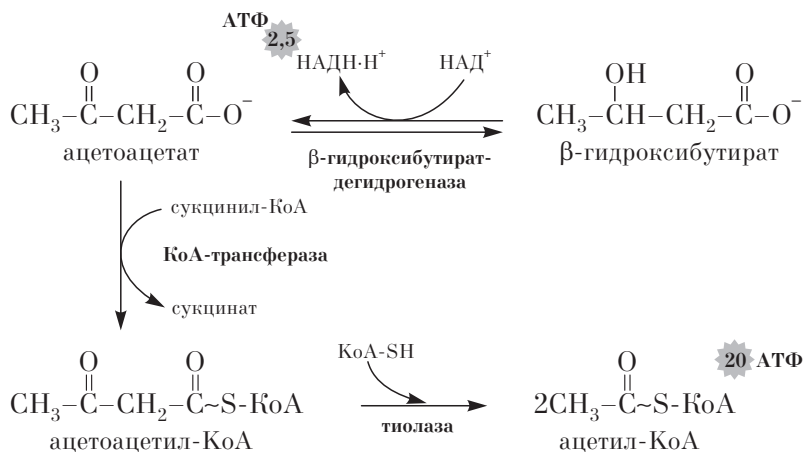


Рис. 7.40. Окисление кетоновых тел в периферических тканях

экспрессия гена, кодирующего этот фермент. Тем самым мозг адаптируется к использованию кетоновых тел в качестве альтернативного источника энергии, снижая свою потребность в глюкозе и белке.

Интенсивность окисления кетоновых тел во внепеченочных тканях пропорциональна их концентрации в крови. В крови здорового человека кетоновые тела содержатся в очень небольших концентрациях 0,01–0,02 ммоль/л (0,15–2 мг%). Средняя ежедневная экскреция с мочой составляет приблизительно от 1 до 20 мг. Однако при голодании, а также у лиц с тяжелой формой сахарного диабета содержание кетоновых тел в крови может повышаться до 15–25 ммоль/л (более 27 мг%). Это состояние носит название *кетонемии*. Оно обычно сопровождается появлением кетоновых тел в моче (*кетонурией*). В тех случаях, когда имеют место выраженные кетонемия и кетонурия, в выдыхаемом воздухе ощущается *запах ацетона*. Эти три симптома (кетонемия, кетонурия и запах ацетона при дыхании) объединяются общим названием — *кетоз*.

Явления кетонемии и кетонурии при голодании и сахарном диабете можно объяснить следующим образом. При голодании углеводов с пищей поступает мало или не поступает совсем, а при сахарном диабете, вследствие недостатка инсулина, углеводы не могут эффективно окисляться в клетках органов и тканей. В результате запасы гликогена в печени резко сокращаются. Многие ткани и органы, в частности мышечная ткань, находятся в состоянии энергетического голода, так как при недостатке инсулина и избытке глюкогона глюкоза не может с достаточной скоростью поступать в клетку.

Как адаптивный процесс, резко усиливаются липолиз и поступление большого количества жирных кислот из жировых депо в печень. В результате их β -окисления образуется много ацетил-КоА, который используется для синтеза кетоновых тел. Ацетоуксусная и β -гидроксимасляная кислоты с током крови транспортируются из печени к периферическим тканям, где они используются в качестве энергетических субстратов.

7.6. Внутриклеточный метаболизм триацилглицеролов

Доля триацилглицеролов составляет 90 % от общего количества липидов, содержащихся в организме. В норме более 95 % триацилглицеролов находится в жировой ткани, оставшиеся 5 % локализованы преимущественно в печени и мышцах. Именно жировая ткань функционально специализируется на хранении (запасании) и мобилизации триацилглицеролов.

7.6.1. Синтез триацилглицеролов

Синтез триацилглицеролов протекает главным образом в печени, жировой ткани, молочной железе в период грудного вскармливания, кишечнике. Процесс синтеза продолжается в течение нескольких часов после приема пищи. В нем принимают участие экзогенные и эндогенные высшие жирные кислоты (преимущественно стеариновая, пальмитиновая и олеиновая), а также глицерол, поступающий в составе триацилглицеролов пищи или образующийся из фосфодиоксиацетона (ФДА) — одного из продуктов катаболизма глюкозы.

Предшественниками для синтеза триацилглицеролов являются глицерол-3-фосфат и активированные жирные кислоты. Активация жирных кислот происходит путем их превращения в ацил-КоА под действием фермента ацил-КоА-синтетазы.

Свободный глицерол фосфорилируется с помощью АТФ в глицерол-3-фосфат только в печени, кишечнике и почках, поскольку только в этих органах имеется фермент *глицеролкиназа*. В жировой ткани этот фермент отсутствует, поэтому единственным источником образования глицерол-3-фосфата является глюкоза.

В печени глицерол-3-фосфат может образовываться или в результате фосфорилирования глицерола, или из фосфодиоксиацетона (ФДА), промежуточного продукта гликолиза.

В печени и адипоцитах ФДА восстанавливается глицерол-3-фосфатдегидрогеназой до глицерол-3-фосфата (рис. 7.41).

Далее глицерол-3-фосфат взаимодействует с активированной формой жирных кислот — ацил-КоА (рис. 7.42). Глицерол-3-фосфат-ацилтрансфераза катализирует образование 1-ацилглицерол-3-фосфата (лизофосфатидата). Затем в результате еще одной ацилтрансферазной реакции образуется фосфатидная кислота (1,2-диацилглицерол-3-фосфат), которая расходуется на синтез триацилглицеролов и образование фосфолипидов. В результате следующей реакции фосфатидная кислота гидролизует до 1,2-диацилглицерола (1,2-ДАГ) и остатка фосфорной кислоты. В заключение 1,2-ДАГ ацилируется третьей молекулой ацил-КоА и превращается в триацилглицерол (ТАГ). Эту реакцию катализирует диацилглицерол-ацилтрансфераза.

В печени триацилглицеролы упаковываются в ЛПОНП и поступают в кровоток, а в жировой ткани депонируются в виде капелек жира.

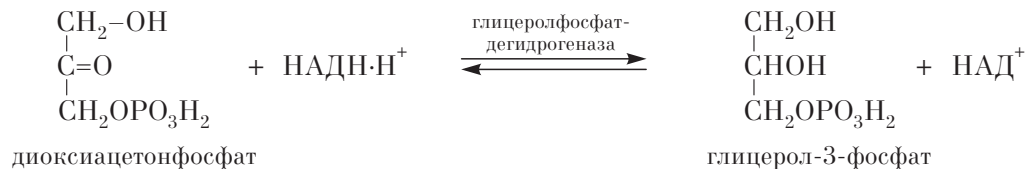


Рис. 7.41. Схема синтеза глицерол-3-фосфата в адипоцитах

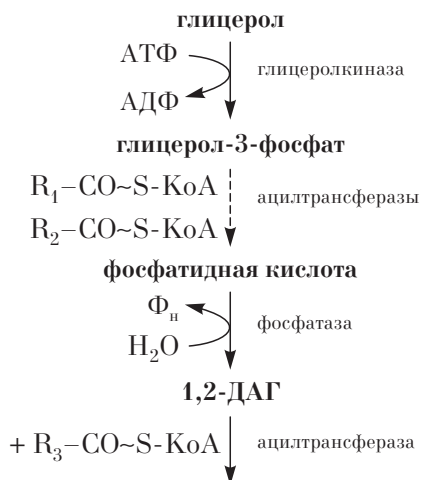


Рис. 7.42. Схема синтеза триацил-глицерола в печени

Депонирование жира в жировой ткани сопряжено с питанием и гормональным статусом. Инсулин оказывает влияние на синтез и депонирование липидов в жировой ткани. Важнейшим эффектом инсулина является увеличение транспорта глюкозы через мембраны жировых и мышечных клеток путем облегченной диффузии по градиенту концентрации с помощью чувствительных к гормону мембранных белковых переносчиков (глют-4). В клетках инсулин активирует гликолиз и пентозофосфатный путь. Эти пути обмена глюкозы поставляют субстраты для синтеза жирных кислот и триацилглицеролов (ацетил-КоА, ФДА, НАДФН·Н⁺). Кроме того, в адипоцитах инсулин индуцирует синтез ЛП-липазы и таким образом увеличивает поток эндо- и экзогенных жирных кислот из кровотока в жировую ткань для синтеза триацилглицеролов (рис. 7.43).

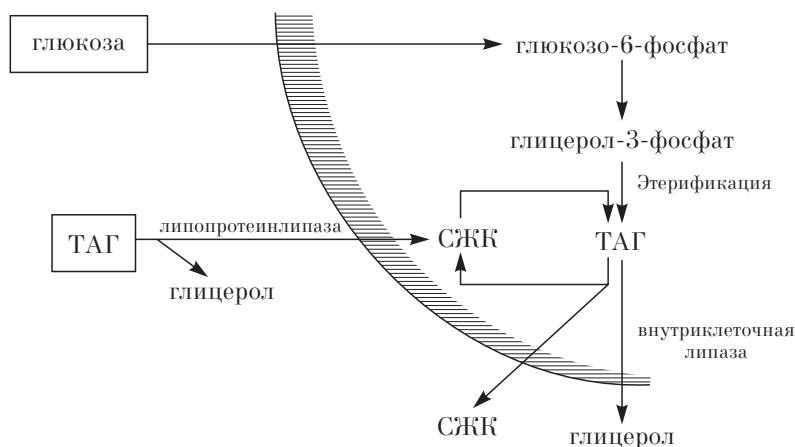


Рис. 7.43. Схема синтеза и гидролиза триацилглицеролов в адипоците (СЖК — свободные жирные кислоты)

7.6.2. Ожирение

Избыточное накопление триацилглицеролов в адипоцитах ведет к **ожирению**. В настоящее время ожирение рассматривается как хроническое заболевание, проявляющееся избыточным увеличением массы тела преимущественно за счет чрезмерного накопления жировой ткани. Оно возникает в любом возрасте и сопровождается увеличением случаев общей заболеваемости и смертности.

Ожирение может развиваться в результате:

- нарушения равновесия между поступлением в организм энергосубстратов (принятой пищей) и потраченной энергией;
- эндокринных нарушений, а также при патологии поджелудочной железы, печени, тонкого и толстого кишечника;
- генетических нарушений.

Предрасполагающими факторами ожирения являются малоподвижный образ жизни (гипокинезия), нарушение пищевого поведения (переедание). Определяют пищевое поведение человека и участвуют в регуляции массы тела некоторые гормоны и белки. Подробнее о регуляторах пищевого поведения см. главу 14.

Для лечения ожирения могут использоваться такие лекарственные препараты, как ингибиторы панкреатической липазы (орлистат), подавляющие активность липазы и замедляющие расщепление поступающих с пищей веществ; агонисты серотониновых рецепторов (5-НТ_{2C}) (лоркасерин) и ингибиторы обратного захвата норадреналина и дофамина (бупропион), подавляющие аппетит; антагонисты опиоидных рецепторов (налтрексон), подавляющие тягу к вкусной пище.

7.6.3. Использование жиров в качестве источника энергии

Натощак или при повышенной потребности в энергии во время физической работы, повышении уровня катехоламинов, гормона роста, адренокортикотропного гормона (АКТГ) и глюкагона в плазме крови, снижении секреции инсулина в жировой ткани усиливается липолиз, высвобождаются жирные кислоты (рис. 7.43). Последние используются в качестве источника энергии. Другой продукт липолиза — *глицерол* — может использоваться как источник энергии или для глюконеогенеза.

Гидролиз триацилглицеролов опосредован липолитическими ферментами — *липазами*. Активность липазы в клетках жировой ткани находится под строгим регуляторным контролем (отсюда название — гормонзависимая липаза). Фермент проявляет субстратную специфичность к триацилглицеролам, 1,2-диацилглицеролам, 2-моноацилглицеролам и эфирам холестерина. Активность гормонзависимой липазы регулируется путем фосфорилирования/дефосфорилирования, которые опосредует цАМФ-зависимая протеинкиназа А. Адреналин, норадреналин, глюкагон и АКТГ активируют гормонзависимую липазу,

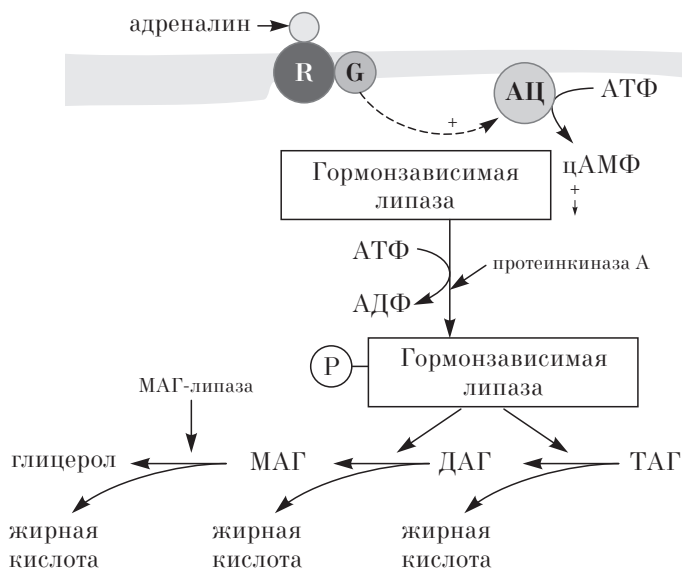


Рис. 7.44. Вызванный гормонами гидролиз триацилглицеролов в адипоцитах:

R — β -адренорецептор; G — белок; АЦ — аденилатциклаза

вызывая ее фосфорилирование, в результате чего ускоряется гидролиз триацилглицеролов. Инсулин вызывает дефосфорилирование этого фермента, тем самым снижая его активность, и липолиз тормозится. Регуляция гидролиза триацилглицеролов адреналином изображена на рис. 7.44.

В результате полного гидролиза молекулы триацилглицерола образуются три молекулы жирных кислот и одна молекула глицерола. Жирные кислоты выходят из адипоцитов в плазму крови. С током крови они попадают в клетки различных тканей. Клетки содержат митохондрии, способные окислять жирные кислоты с выделением энергии.

Другим источником свободных жирных кислот в плазме крови является гидролиз триацилглицеролов в составе липопротеинов под действием липопротеинлипазы.

7.6.4. Транспорт свободных жирных кислот в плазме крови

Жирные кислоты вследствие сильной гидрофобности циркулируют в плазме крови в связанном с альбуминами состоянии. На молекуле альбумина имеется, по меньшей мере, три центра связывания, к которым присоединяется более 10 молекул жирных кислот. В плазме находится небольшое количество жирных кислот, которые не связаны с альбумином. Они могут диффундировать через эндотелий капилляров и поглощаться тканями. Как уже упоминалось, основными потребителями жирных кислот являются клетки сердечной и скелетной мышц, печени.

Считается, что жирные кислоты проходят через клеточную мембрану путем диффузии по концентрационному градиенту и (или) с помощью специального белка — транспортера жирных кислот.

7.7. Пути использования жирных кислот в клетках

В клетках значительная часть жирных кислот используется для этерификации и синтеза ТАГ, эфиров холестерина, фосфолипидов и других сложных липидов, депонирования в виде ТАГ. Другая часть подвергается окислению в митохондриях и пероксисомах с целью получения энергии.

7.7.1. Окисление жирных кислот

Поступающие из крови или высвобождающиеся в результате липолиза внутриклеточных триацилглицеролов жирные кислоты используются для окисления. Первым этапом на пути метаболизма жирных кислот в клетке является их активация, осуществляемая присоединением к жирной кислоте коэнзима А с участием АТФ и образованием ацил-КоА. Эту реакцию катализирует фермент *ацил-КоА-синтетаза*.

β-Окисление. Реакция активации протекает в цитоплазме, в то время как процесс β-окисления жирных кислот происходит в митохондриях. Ацил-КоА не может проникнуть в митохондрию без помощи *карнитина*, который поступает с пищей или синтезируется из незаменимых аминокислот лизина и метионина.

Под действием фермента наружной митохондриальной мембраны (НММ) *карнитинацилтрансферазы I* (КАТ_I) ацильный остаток с ацил-КоА переносится на карнитин с образованием ацилкарнитина (рис. 7.45).

Интенсивность поступления высших жирных кислот в матрикс митохондрий зависит от соотношения количества малонил-КоА/ацил-КоА. Чем выше в клетке концентрация малонил-КоА, тем ниже скорость переноса жирных кислот в матрикс митохондрий, так как малонил-КоА — аллостерический ингибитор КАТ_I, а ацил-КоА — его активатор.

Образовавшийся ацилкарнитин проходит через межмембранное пространство к наружной стороне внутренней митохондриальной мембраны (ВММ) с помощью *транслоказы* (Т). На внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрий *карнитинацилтрансфераза II* (КАТ_{II}) расщепляет ацилкарнитин с помощью митохондриального HS-КоА. Свободный карнитин возвращается на наружную мембрану, а ацил-КоА, высвобождающийся в матрикс, участвует в реакциях β-окисления.

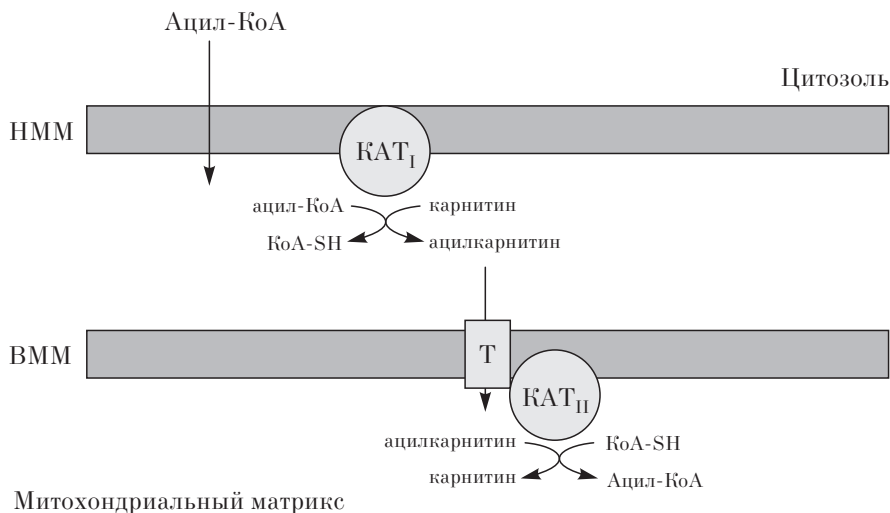


Рис. 7.45. Транспорт ацил-КоА из цитозоля в митохондриальный матрикс

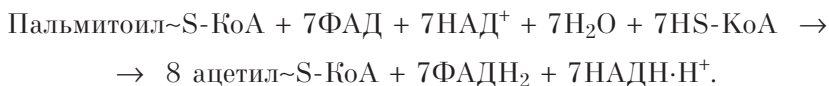
Процесс называется β -окислением в соответствии с тем, что окислению всегда подвергается β -углеродный атом остатка жирной кислоты. Каждый цикл β -окисления включает четыре последовательные реакции:

- 1) окисление с участием (ФАД);
- 2) гидратация;
- 3) окисление с участием НАД⁺;
- 4) тиолиз с участием коэнзима А.

В результате этих реакций жирная кислота укорачивается на два углеродных атома, которые отщепляются в виде ацетил-КоА (рис. 7.46). Укороченный ацильный остаток вовлекается в следующий цикл β -окисления. Ацетил-КоА может вступать в цитратный цикл и окисляться до CO_2 и H_2O .

Таким образом, процесс β -окисления тесно связан с циклом трикарбоновых кислот и дыхательной цепью.

Суммарное уравнение окисления пальмитиновой кислоты выглядит следующим образом:



Энергетический выход β -окисления жирных кислот. Энергетический выход зависит от длины углеводородной цепи. В каждом цикле реакций ацил-КоА укорачивается на два углерода и образуется по одной молекуле ФАДН₂, НАДН·Н⁺ и ацетил-КоА.

Для подсчета энергетического выхода β -окисления конкретной жирной кислоты с четным числом углеродных атомов необходимо знать количество циклов β -окисления (оно составляет $n/2 - 1$, где n — число углеродных атомов

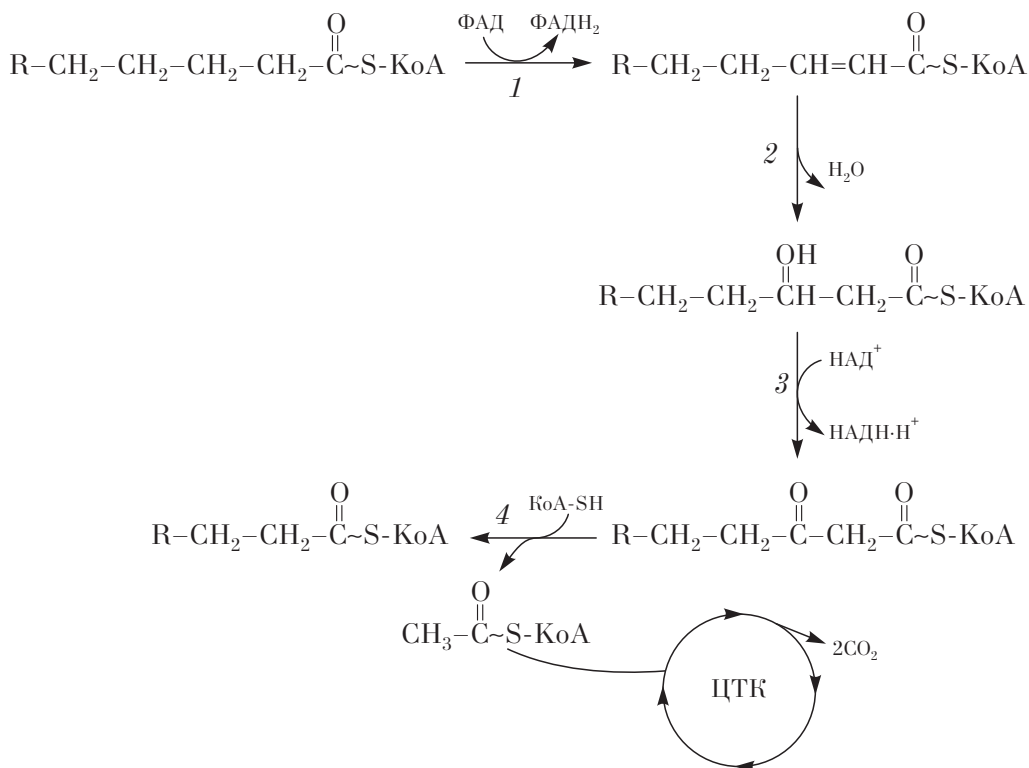


Рис. 7.46. Последовательность реакций β -окисления жирных кислот и ферменты: 1 — ацил-КоА-дегидрогеназа (окисление); 2 — еноил-КоА-гидратаза (гидратация); 3 — β -гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа (окисление); 4 — тиолаза (тиолиз)

в составе жирной кислоты) и молекул образующихся ацетил-КоА (оно составляет $n/2$). При окислении каждого $NADH \cdot H^+$ в дыхательной цепи образуется 2,5 моль АТФ, тогда как при окислении $FADH_2$ — 1,5 АТФ. Напомним, что окисление ацетил-КоА в цикле трикарбоновых кислот дает 10 моль АТФ. Из общей суммы АТФ необходимо вычесть 2 молекулы АТФ, затраченных на активацию жирной кислоты в начале всего процесса. Хотя на активацию ЖК расходуется одна молекула АТФ, она гидролизуется до АМФ, т.е. разрываются две макроэргические связи, что эквивалентно затрате 2 АТФ.

Регуляция β -окисления. Уровень β -окисления может возрастать в следующих случаях: при механической мышечной работе, при уменьшении соотношения ацетил-КоА/ацил-КоА, $NADH \cdot H^+/NAD^+$ и $FADH_2/FAD$.

Активное окисление жирных кислот ингибирует окисление глюкозы в клетках скелетных мышц и сердца за счет ингибирования пируватдегидрогеназы (соотношение ацетил-КоА/ $KoA-SH$). С другой стороны, увеличение окисления глюкозы может ингибировать окисление жирных кислот. Это обусловлено тем, что регуляция поглощения жирных кислот митохондриями преимущественно

осуществляется за счет контроля КАТ_I со стороны малонил-КоА, который выполняет роль аллостерического ингибитора этого фермента. Малонил-КоА — это начальный промежуточный продукт в синтезе жирных кислот, образованный из ацетил-КоА в цитоплазме. Таким образом, условия, которые способствуют липогенезу (наличие большого количества глюкозы), подавляют β -окисление жирных кислот.

7.7.2. Особенности β -окисления ненасыщенных жирных кислот и жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов

β -Окисление *ненасыщенных жирных кислот* во многом подобно окислению насыщенных жирных кислот. Разница заключается в том, что, когда процесс последовательного укорачивания на два углеродных атома доходит до стадии расположения двойной связи в ацил-КоА в положении C₃–C₄, трансфераза катализирует перемещение двойной связи в положение C₂–C₃, а еноил-КоА-изомераза катализирует превращение *цис*-изомера в *транс*-изомер, который является обычным субстратом β -окисления (рис. 7.47). Далее β -окисление продолжается с участием ферментов, описанных ранее.

Жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов в организме животных весьма немногочисленны. Они окисляются таким же образом, как

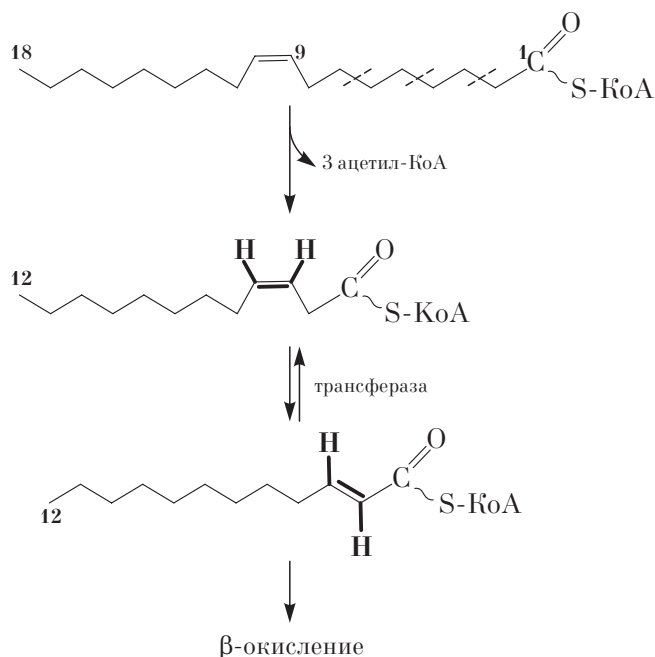


Рис. 7.47. Схема β -окисления ненасыщенных жирных кислот

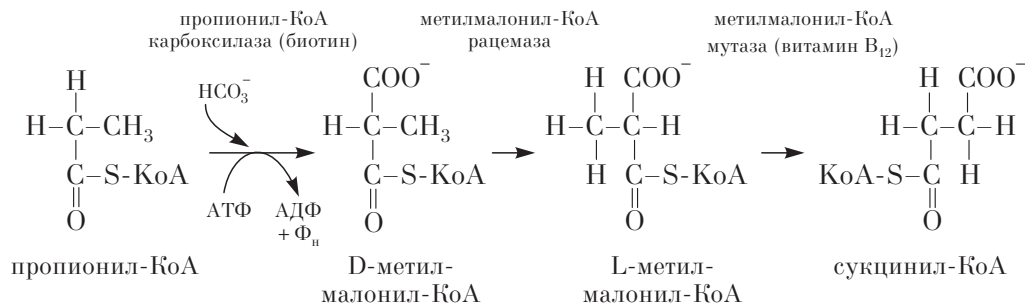


Рис. 7.48. Катаболизм пропионил-КоА до сукцинил-КоА

и жирные кислоты с четным числом атомов. Единственное отличие заключается в том, что на последнем этапе расщепления образуются одна молекула пропионил-КоА и одна молекула ацетил-КоА, а не две молекулы ацетил-КоА.

Далее пропионил-КоА превращается в сукцинил-КоА (рис. 7.48). Это превращение включает биотинзависимое карбоксилирование с образованием метилмалонил-КоА. В результате изомеризации, кофактором которой является производное витамина B_{12} , метилмалонил-КоА превращается в сукцинил-КоА — промежуточный метаболит цикла лимонной кислоты.

7.7.3. Окисление жирных кислот в пероксисомах

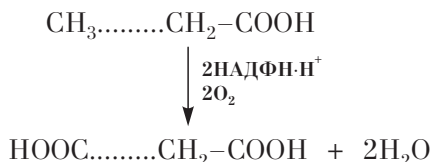
Интерес к окислению жирных кислот в пероксисомах был вызван тем, что некоторые гипополипидемические препараты (фибраты, т.е. производные фибровой кислоты) способствуют пролиферации этих органелл. Впоследствии стало известно, что окисление жирных кислот в пероксисомах составляет около 30 % всего их окисления.

В пероксисомах содержатся ферменты, которые катализируют β -окисление, имеющее некоторое отличие от процесса в митохондриях. Особенностью метаболизма жирных кислот в пероксисомах является расщепление тех из них, которые имеют очень длинную углеводородную цепь или другие необычные радикалы, неспособные подвергаться эффективному окислению в митохондриях. Укорочение алкильной цепи в пероксисомах происходит до тех пор, пока не образуется ацил-КоА. Это обусловлено субстратной специфичностью пероксисомальной ацил-КоА-дегидрогеназы; C_8 ацил-КоА впоследствии подвергается дальнейшему окислению в митохондриях.

В ходе пероксисомального окисления жирных кислот первоначальная стадия дегидрирования протекает с образованием H_2O_2 , а не FADH_2 . Перекись водорода удаляется с помощью каталазы. Все последующие реакции аналогичны происходящим в митохондриях, хотя катализируются они изоферментами пероксисом.

В пероксисомах происходит также окисление дикарбоновых кислот, образующихся в ходе ω -окисления. Само ω -окисление протекает в эндоплазматиче-

ческом ретикулуме и занимает малую долю в окислительных процессах, которым подвергаются жирные кислоты. При ω -окислении гидроксирование происходит на метильном конце жирнокислотной цепи, в результате образуется дикарбоновая кислота:



α -Окисление жирных кислот. В липидах мозга и других отделах нервной ткани преобладают жирные кислоты с очень длинной цепью — более 20 атомов углерода. Они окисляются по типу α -окисления, при котором от жирной кислоты отщепляется по одному атому углерода, выделяющемуся в виде CO_2 .

α -Окислению подвергаются также жирные кислоты с разветвленной углеводородной цепью — например, фитановая. Это жирная кислота, имеющая в своем составе 20 атомов углерода и 4 метильные группы. Она образуется из фитола, который поступает в организм с молочной пищей и с растительной пищей, богатой хлорофиллом. Окисление таких жирных кислот в организме становится возможным благодаря пероксисомальному ферменту — α -гидроксисилазе. В ходе этого процесса фитановая кислота укорачивается на один углеродный атом с образованием пристановой кислоты и CO_2 . Пристановая кислота, подвергаясь β -окислению, расщепляется на три молекулы ацетил-КоА, три молекулы пропионил-КоА и одну молекулу изобутирил-КоА (рис. 7.49).

При редком наследственном заболевании — *болезни Рефзума* — фитановая кислота, поступающая с пищей, не окисляется и накапливается в организме, в основном в нервной ткани. Это приводит к нарушению структуры нервной ткани и нарушению ее функций.

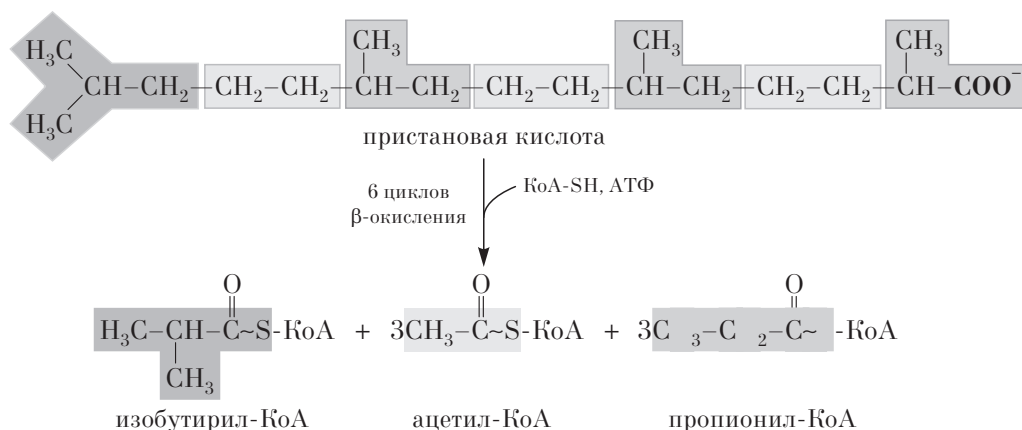


Рис. 7.49. Катаболизм пристановой кислоты в клетках

Биомембраны и транспорт веществ

Биологическими мембранами называют клеточные структуры, отграничивающие цитоплазму клетки от внешней среды, обеспечивая ее целостность, и разделяющие клетку на специализированные замкнутые отсеки — *ком-партменты*, или *органеллы*, в которых поддерживаются определенные условия среды.

8.1. Строение, свойства и функции биомембран

В настоящее время общепризнанной является жидкостно-кристаллическая модель организации мембран, предложенная С. Сингером и Г. Николсоном. С помощью растровой электронной микроскопии ими было показано, что в состав мембран входят глобулярные белки и липиды, связанные друг с другом с помощью нековалентных взаимодействий. Основу любой мембраны составляет *липидный двойной слой (бислой)* (рис. 8.1).

Белки и гликопротеины погружены в двойной слой *липидных молекул*, обращенных своими гидрофильными концами наружу, а гидрофобными — вглубь мембраны. Молекулы липидов мембран имеют гидрофильную («головка») и гидрофобную («хвост») части. При образовании мембран гидрофобные участки молекул оказываются обращенными внутрь, а гидрофильные — наружу.

Среди липидов преобладают *фосфолипиды* (55–57 %), причем на наружной поверхности мембраны находятся преимущественно фосфатидилхолины (лецитины), различающиеся особенностями жирнокислотного состава. На внутренней стороне мембраны преобладают фосфатидилэтаноламины (кефалины). Лецитины имеют положительный заряд, кефалины — отрицательный, таким образом на мембране создается разность электрических потенциалов.

Помимо фосфолипидов, в мембрану включены *сфингомиелины* и *гликолипиды* (см. главу 7). К гликолипидам относятся цереброзиды и сульфатиды (имеют отрицательный заряд), а также ганглиозиды. В клетках белого вещества мозга преобладают галактоцереброзиды. Ганглиозиды характерны для серого вещества мозга, синапсов, гормон-рецепторных и нейромедиаторных участков.

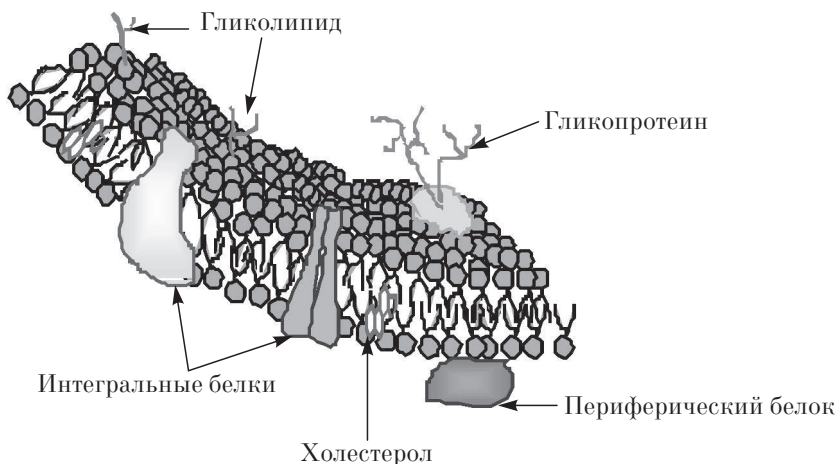


Рис. 8.1. Жидкостно-кристаллическая модель строения клеточной мембраны

Липиды биомембран характеризуются высокой ненасыщенностью (ненасыщенных жирных кислот в два раза больше, чем насыщенных). Особую роль играют $\omega 3$ (линоленовая) и $\omega 6$ (линолевая) ненасыщенные жирные кислоты, находящиеся в *цис*-конформации. *Цис*-конформация обуславливает изгиб цепи: чем больше двойных связей в молекуле жирной кислоты, тем более изогнута ее цепь.

Наиболее важной **стероидной молекулой**, входящей в состав мембран, является **холестерол**. Он легко встраивается в мембрану, увеличивая жидкостность гидрофобных хвостов жирных кислот и уменьшая подвижность головок фосфолипидов (буферная, регуляторная роль этого соединения). Холестерол стабилизирует мембрану, его удаление резко увеличивает ее проницаемость. Вместе с тем увеличение содержания холестерина в мембранах эндотелия кровеносных сосудов является важнейшим фактором развития в них атерогенных изменений.

Мембраны существенно различаются по количественному и качественному составу **белков**. Например, в миелине на долю белков приходится менее 20 %, а во внутренней мембране митохондрий — 75 %. **Белки мембран** — это ферменты, рецепторы гормонов, якорные белки, белки-переносчики, ионные каналы.

По месту в мембране белки делятся на две группы:

- периферические — располагаются на поверхности мембраны или частично погружены в липидный бислой (например, фермент ацетилхолинэстераза);
- интегральные — частично или насквозь пронизывают толщу мембраны.

Периферические белки связаны с липидами мембран с помощью гидрофобных взаимодействий, а в полярных областях образуют электростатические связи с Ca^{2+} , Mg^{2+} и другими заряженными частицами.

Интегральные белки в своем внутримембранном сегменте содержат гидрофобные участки α -спиралей или β -цепей. Эти участки обращены в сторону

липидного бислоя, а гидрофильные, заряженные, группы повернуты внутрь, формируя таким образом гидрофильный канал. Интегральные белки, как правило, содержат над- и подмембранные домены, выполняющие многообразные функции, в частности прием и передачу гормональных сигналов. Порообразующие белки также являются интегральными белками. Они формируют ионные каналы, поддерживающие разность потенциалов между внешней и внутренней сторонами клеточной мембраны всех живых клеток.

Углеводы локализуются на наружной поверхности цитоплазматической мембраны. Простые углеводы (глюкоза, галактоза, нейраминная кислота, фукоза, манноза и др.), как правило, модифицированы — сульфатированы, гликозилированы, ацетилированы и пр. *Гликопротеины* (их доля в мембране составляет около 10 %) связаны с белками, *гликолипиды* (5–25 %) — с липидами. Углеводная часть гликолипидов представлена одной цепью, гликопротеинов — несколькими.

Углеводы обуславливают клеточную специфичность. Их основная роль — рецепция и «узнавание» лигандов и других клеток, а также вирусов (например, специфическое узнавание Т-лимфоцитами вируса иммунодефицита). Кроме того, они участвуют в процессах адгезии клеток (фибронектин и другие лектины) и контактном торможении.

В мембране присутствуют неорганические соли и ионы металлов, а также незначительное количество свободной воды и до 30 % связанной.

Свойства мембран. Текучесть — свойство мембраны находиться в жидкостно-кристаллическом состоянии, т.е. между жидким и твердым. Жидкостность, или текучесть, обусловлена *цис*-конформацией двойных связей ненасыщенных жирных кислот. Она тем выше, чем больше остатков непредельных жирных кислот в составе мембранных липидов. Насыщенные жирные кислоты придают структуре упорядоченность. Фазовый переход от одного состояния к другому зависит от содержания в мембране воды и температуры.

Подвижность радикалов жирных кислот определяется вращением вокруг С–С-связей (конформеры); изменение конформации жирной кислоты за счет поворотов называется *транс-гош-изомеризацией*. При этом мембрана образует складки.

Способность мембранных липидов к диффузии. Возможны *латеральная* диффузия, которая ограничивается белками мембраны и холестерином, и *флип-флоп-переход* — переход фосфолипидов из одного слоя мембраны в другой.

Структурные компоненты мембран характеризуются *подвижностью*. За 1 с периферический белок может «обежать» вокруг клетки. Менее подвижны липиды, связанные с белками. Другим свойством компонентов мембран является их высокая обновляемость. Митохондриальные фосфолипиды обновляются за период от 2 дней (фосфатидилинозитол) до 3 месяцев (цереброзиды). Срок обновления тех же фосфолипидов в нервных клетках — от 2 до 13 месяцев.

Мембрана **асимметрична**: как упоминалось выше, на наружной и внутренней поверхностях мембраны располагаются разные фосфолипиды; различен характер над- и подмембранных белков; углеводы располагаются только на внешней стороне мембраны. Благодаря асимметрии мембрана может образовывать складки и отшнуровываться (эндо- и экзоцитоз).

Интересным свойством мембран является ее **способность к самосборке**: после энергичного встряхивания в воде, спирте, под влиянием ультразвука мембрана разрушается, но в покое происходит самосборка липидных компонентов в виде мицелл (однослойная мембрана) или липосом (двуслойная мембрана).

Функции мембран. Барьерная функция состоит в том, что плазматическая мембрана клетки отграничивает клетку от окружающей среды и одновременно обеспечивает контакт с ней. Мембраны формируют различные цитоплазматические структуры: митохондрии, лизосомы, рибосомы, пероксисомы, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи. Благодаря мембранной **компартиментализации** (наличию отсеков) в клетке удерживается вода. Мембрана обеспечивает регулируемый, избирательный, пассивный и активный обмен веществ с окружающей средой. Избирательная проницаемость означает, что проницаемость мембраны для различных атомов или молекул зависит от их размеров, электрического заряда и химических свойств.

Рецепторная функция: плазматическая мембрана осуществляет восприятие, трансформацию и передачу сигналов из внешней среды внутрь клетки. Плазматической мембране присуще избирательное связывание гормонов, нейромедиаторов, антител, вирусов, токсинов и др. Например, гормоны, циркулирующие в крови, действуют только на такие клетки-мишени, у которых есть соответствующие этим гормонам рецепторы. Нейромедиаторы (химические вещества, обеспечивающие проведение нервных импульсов) тоже связываются с особыми рецепторными белками клеток-мишеней.

Мембраны обеспечивают специфику межклеточных контактов. Мембрана нервных клеток способна, изменяя потенциал покоя, проводить электрический импульс.

На мембране есть антигены (гликопротеины), действующие как маркёры — «ярлыки», позволяющие опознать клетку. С помощью маркёров клетки могут распознавать другие клетки и действовать согласованно с ними, например, при формировании органов и тканей. Это же позволяет иммунной системе распознавать чужеродные антигены.

Многим мембранам присуща **ферментативная функция**. Так, во внутренней мембране митохондрий локализуются ферменты тканевого дыхания, в цитоплазматической мембране — Na^+/K^+ -АТФаза, а плазматические мембраны эпителиальных клеток кишечника содержат пищеварительные ферменты.

Транспортная функция — одна из важнейших функций биологических мембран. Транспорт через мембраны обеспечивает доставку питательных веществ, удаление конечных продуктов обмена, секрецию различных веществ, создание ионных градиентов, поддержание в клетке оптимального pH.

8.2. Виды транспортного процесса

Все транспортные процессы, происходящие с участием клеток, принято разделять на пассивный и активный транспорт.

Пассивный транспорт. Это перенос веществ из области высокой концентрации в область низкой без затрат энергии (например, диффузия).

Диффузия — пассивное перемещение молекул по градиенту их концентрации или электрохимическому градиенту (из участка с большей концентрацией к участку с меньшей). Это АТФ-независимый процесс. Различают простую и облегченную диффузию.

По пути *простой диффузии* частицы вещества перемещаются сквозь липидный слой мембраны. Направление простой диффузии определяется только разностью концентрации вещества по обеим сторонам мембраны. Путем простой диффузии в клетку проникают гидрофобные вещества (O_2 , N_2 , стероиды, тиреоидные гормоны, бензол) и полярные маленькие молекулы (CO_2 , H_2O , мочевины, этанол).

Вещества, которые имеют высокую полярность (аминокислоты, моносахариды), заряженные частицы (ионы) не могут проникать через мембрану путем простой диффузии. Они попадают в клетку путем *облегченной диффузии* с помощью специальных белков-переносчиков по градиенту концентрации.

Белки-переносчики — это трансмембранные белки, которые специфически связывают молекулу транспортируемого вещества и, изменяя свою конформацию, осуществляют перенос молекулы через липидный слой мембраны.

Ионы Na^+ , K^+ , Cl^- и Ca^{2+} перемещаются согласно их электрохимическим градиентам сквозь мембрану по *селективным ионным каналам*, которые благодаря своему диаметру и строению внутренней поверхности переносят только определенные ионы. Например, катионселективные каналы пропускают только катионы, так как содержат много отрицательно заряженных аминокислотных остатков.

Некоторые каналы различают вещества и пропускают по градиенту концентрации и (или) электрическому градиенту зарядов за счет диффузии все молекулы, размеры которых меньше определенной величины. Их называют *неселективными каналами* или *порами*. Такие поры есть в наружной мембране митохондрий, где молекулы белка порина образуют широкие гидрофильные каналы. Через них могут проходить все молекулы с молекулярной массой 10 кДа и меньше, в том числе небольшие белки.

Также различают *потенциалзависимые ионные каналы*, которые открываются и закрываются в ответ на изменение мембранного потенциала. Например, натриевые каналы закрыты и натриевый ток отсутствует, если мембранный потенциал поддерживается на уровне потенциала покоя. Если мембранный потенциал сдвигается в сторону положительного заряда, то натриевые каналы открываются и в клетку начинают входить ионы натрия по градиенту концентрации.

Лигандзависимые ионные каналы — это каналы, которые открываются, когда медиатор, связываясь с их наружными рецепторными участками, меняет их конформацию. Открываясь, они впускают ионы, изменяя этим мембранный потенциал. Так работают рецепторы γ -аминомасляной кислоты (ГАМК-рецепторы), ацетилхолиновые и глициновые рецепторы.

Участие белков-переносчиков в этом виде транспорта обеспечивает более высокую скорость переноса и характеризуется насыщаемостью, регулируемостью, чувствительностью к ингибиторам и активаторам. Явление насыщаемости обусловлено ограниченным количеством белков-переносчиков в мембране и их способностью связываться с переносимым веществом или ионом.

Кроме ионных каналов в мембране существуют и другие транспортные системы для переноса через нее различных веществ. Например, *аквапорины* — специальные водные каналы-белки, пропускающие через себя воду.

Активный транспорт. Под активным транспортом понимается перенос веществ против концентрационного или электрохимического градиента с участием белков-переносчиков, транспортных АТФаз (ионных насосов). Транспортируемые вещества — натрий, калий, кальций, водород, хлор и некоторые другие ионы.

Если при таком транспорте затрачивается энергия АТФ, он называется *первично-активным транспортом*.

Вторично-активный транспорт обеспечивается энергией, накопленной в форме разности концентраций веществ, молекул или ионов по обе стороны клеточной мембраны, созданной первоначально первично-активным транспортом.

В обоих случаях, как и при облегченной диффузии, транспорт зависит от белков-переносчиков, пронизывающих клеточную мембрану. Однако их функции при активном транспорте отличаются от переноса облегченной диффузией, поскольку в первом случае белки способны передавать энергию транспортируемому веществу для его перемещения против электрохимического градиента.

Транспорт веществ через мембраны поглощает основную массу вырабатываемой клеткой энергии. В первую очередь это относится к Na^+/K^+ -АТФазе, которая активно переносит в клетку ионы калия и «выкачивает» из нее ионы натрия (рис. 8.2).

На первой стадии α -субъединица фермента присоединяет с внутренней стороны мембраны три иона Na^+ . Это изменяет конформацию активного центра АТФазы, и фермент приобретает способность гидролизовать одну молекулу АТФ. На второй стадии отщепляется АДФ и α -субъединица фосфорилируется, совершая конформационный переход. В результате этого перехода во внеклеточное пространство высвобождаются ионы натрия (стадия 3). Затем два иона K^+ связываются β -субъединицами (стадия 4). На пятой стадии связывание ионов калия вновь вызывает конформационные изменения α -субъединиц. В результате два иона K^+ попадают внутрь клетки (стадия 6). Затем следует присоединение молекулы АТФ к α -субъединице и цикл повторяется. В итоге во внеклеточной

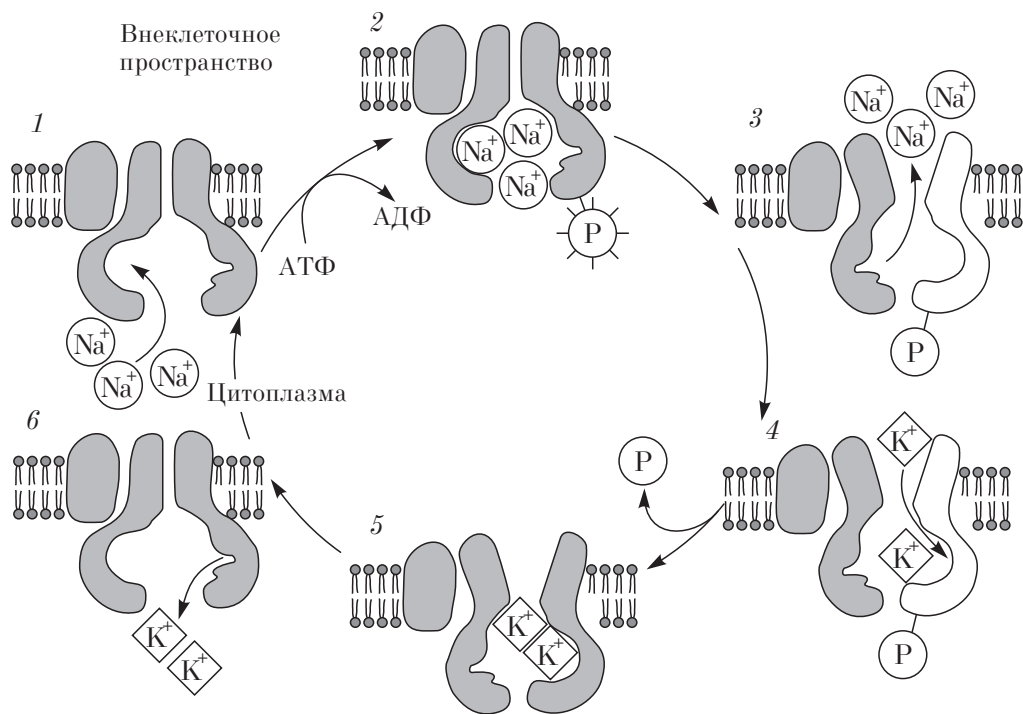


Рис. 8.2. Схема работы Na^+/K^+ -АТФазы (1–6 — стадии процесса)

среде создается высокая концентрация ионов Na^+ , а внутри клетки — высокая концентрация ионов K^+ .

Na^+/K^+ -АТФаза обнаружена во всех клеточных мембранах, за исключением ядерной. Этот фермент является тетрамером, состоящим из двух α - и двух β -субъединиц. α -Субъединица содержит место связывания для АТФ, ионов K^+ и Na^+ . Известны три изофермента Na^+/K^+ -АТФазы, различающиеся своей локализацией в клетках, сродством к ионам калия и натрия и регуляцией активности.

Активный транспорт включает следующие системы (рис. 8.3):

- антипорт — одновременный транспорт одного вещества в клетку, другого — из клетки (например, ионов K^+/Na^+ , $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Na^+/H^+);
- симпорт — взаимосвязанный транспорт двух различных веществ в одном направлении (например, транспорт натрия и глюкозы или натрия и нейтральных аминокислот в клетку);
- унипорт — транспорт одного вещества только в одном направлении (например, поступление Ca^{2+} в саркоплазматический ретикулум миоцитов или митохондрии всех клеток).

Основные виды транспортных АТФаз описаны в табл. 8.1.

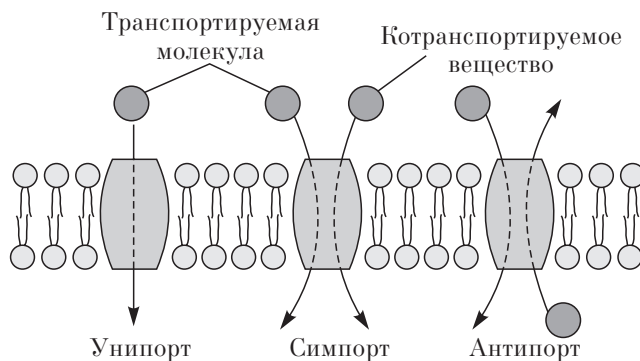


Рис. 8.3. Виды систем активного транспорта

Таблица 8.1

Основные виды транспортных АТФаз в эукариотических клетках

Транспортные АТФазы	Локализация	Субстрат	Функция
Na^+/K^+ -АТФаза	Плазматическая мембрана всех клеток (особенно широко распространена в почках и сердце)	Na^+ , K^+	Создание электрохимического градиента Na^+ и K^+
H^+ -АТФаза	Лизосомы, секреторные гранулы, плазматическая мембрана эпителиальных клеток почек	H^+	Активация лизосомальных ферментов, секреция H^+ в мочу
H^+ -АТФаза	Внутренняя митохондриальная мембрана	H^+	Синтез АТФ, генерация электрохимического градиента H^+
H^+/K^+ -АТФаза	Париетальные клетки желудка	H^+ , K^+	Создание кислой среды в полости желудка
Ca^{2+} -АТФаза	Саркоплазматический ретикулум и эндоплазматический ретикулум	Ca^{2+}	Депонирование Ca^{2+} в саркоплазматическом и эндоплазматическом ретикулуме
Ca^{2+} -АТФаза	Плазматическая мембрана	Ca^{2+}	Выведение Ca^{2+} из клетки
Cu^{2+} -АТФаза	Плазматическая мембрана и цитоплазматические везикулы	Cu^{2+}	Всасывание Cu^{2+} из кишечника и выведение из печени
P-гликопротеин	Плазматическая мембрана	Лекарственные препараты	Выведение токсичных метаболитов и ксенобиотиков
MRP (англ. multi-drug resistance-associated protein) — транспортер органических анионов	Плазматическая мембрана гепатоцитов, апикальная мембрана проксимальных почечных канальцев	Конъюгаты глутатиона	Выведение токсичных метаболитов и ксенобиотиков

Ионные каналы, транслоказы, АТФазы и транспортеры являются мишенями действия лекарственных средств. В табл. 8.2 представлены некоторые блокаторы ионных каналов и АТФаз.

Таблица 8.2

Лекарственные средства — блокаторы ионных каналов и АТФаз

Мишень	Антагонисты (блокаторы)
Na ⁺ -каналы	Антиаритмические (хинидин) Антиконвульсанты (карбамазепин) Местные анестетики (лидокаин)
K ⁺ -каналы	Противодиабетические (бутамид)
Ca ²⁺ -каналы (L-типа)*	Периферические вазодилататоры и гипотензивные (верапамил, амлодипин, дилтиазем)
Ca ²⁺ -каналы (T-типа)	Антиангинальное и гипотензивное действие (милбефрадил)
Na ⁺ /K ⁺ -АТФаза	Сердечные гликозиды (строфантин, дигоксин)
H ⁺ /K ⁺ -АТФаза	Противоязвенные средства (омепразол, лансопразол)

* В настоящее время выделяют несколько типов кальциевых каналов (L, T, N, P, Q, R), обладающих разными свойствами (в том числе проводимость, длительность открытия) и имеющих разную тканевую локализацию. В сосудах находятся кальциевые каналы L- и T-типов. Кальциевые каналы L-типа относят к *высокопороговым* медленным каналам. Каналы T-типа называют *низкопороговыми*. Полагают, что различные типы каналов содержат дискретные рецепторы для разных групп антагонистов ионов кальция, с чем и связаны особенности их действия на физиологические процессы.

Везикулярный перенос: эндоцитоз и экзоцитоз. Макромолекулы (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, липопротеины), в отличие от транспорта ионов и небольших молекул, не проходят через клеточные мембраны. Их транспорт внутрь клетки и из нее осуществляется совершенно иным путем — посредством *везикулярного переноса*. Этот термин означает, что в клетку или из одного мембранного компартмента в другой макромолекулы попадают заключенными внутри вакуолей, или везикул. Такой везикулярный перенос можно разделить на два вида:

- экзоцитоз — вынос из клетки макромолекулярных продуктов;
- эндоцитоз — поглощение клеткой макромолекул (рис. 8.4).

Поглощение клеткой жидкости и растворенных в ней веществ называется *пиноцитоз* (букв. «питье»).

В процессе *пиноцитоза* (*эндоцитоза*) происходит инвагинация клеточной мембраны с последующим образованием вакуоли (пузырька) вокруг транспортируемого вещества и ее «отшнуровывание» в цитозоль. Цикл пиноцитоза начинается в определенных участках плазматической мембраны, называемых «окаймленные ямки». На их долю приходится 1–2 % общей площади мембраны. Окаймленные ямки втягиваются в клетку и отделяются от мембраны, образуя пиноцитозные пузырьки. Вещества в составе пиноцитозных пузырьков не смешиваются с другими макромолекулами клетки и заканчивают свой путь в лизосомах.

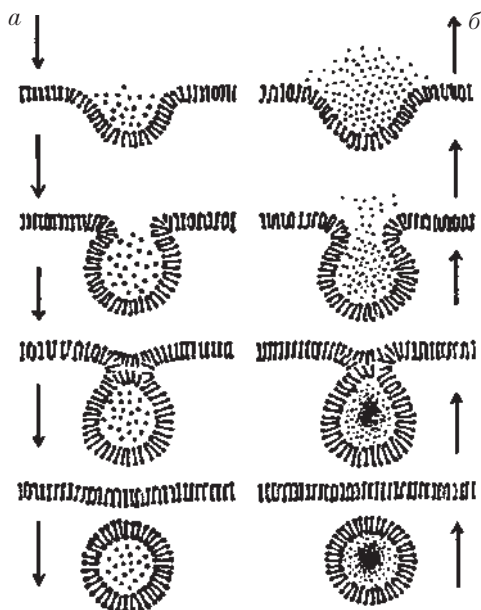


Рис. 8.4. Эндоцитоз (а)
и экзоцитоз (б)

Пиноцитоз характерен для многих животных и растительных клеток. Например, яйцеклетки человека именно таким способом поглощают питательные вещества из окружающих фолликулярных клеток.

Экзоцитоз — процесс, обратный эндоцитозу. В его ходе содержимое секреторных пузырьков и пищеварительных вакуолей выделяется во внеклеточное пространство. Таким способом из клеток выводятся синтезированные белки плазмы крови, пептидные гормоны, пищеварительные ферменты, белки внеклеточного матрикса, липопротеиновые комплексы.

Фильтрация. Вещества, нерастворимые в липидах, плохо диффундируют через биологические мембраны и могут проникать внутрь клетки путем фильтрации через поры клеточных стенок. Диаметр пор в мембранах эпителия кишечника не превышает 0,4 нм, поэтому через них проникает только вода, некоторые ионы (Cl^-), а также мелкие гидрофильные молекулы. Интенсивность фильтрации зависит от гидростатического и осмотического давления.

8.3. Антибиотики, нарушающие ионную проницаемость мембран

Пептидные антибиотики (ионофоры) увеличивают проницаемость мембран для специфических ионов, нарушают транспорт ионов и изменяют их электрохимический градиент. Различают два класса ионофоров: подвижные переносчики ионов и каналообразующие ионофоры.

Типичный пример подвижного переносчика ионов — антибиотик *валиномицин*. Он впервые был выделен из экстракта штамма бактерий *Streptomyces fulvissimus* австрийским исследователем Г. Брокманом в 1955 г. Особенности химического строения валиномицина (это циклический пептид) позволяют ему образовывать комплекс с ионами калия. Наружная липофильная часть молекулы валиномицина состоит из валина и контактирует с липидным бислоем, а внутренняя, полярная, область связывает ион K^+ (рис. 8.5). Ионы калия удерживаются в центре за счет ион-дипольного взаимодействия с участием карбонильных групп пептида.

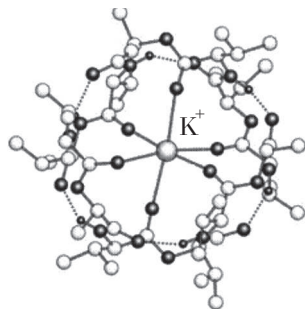


Рис. 8.5. Комплекс молекулы валиномицина с ионом калия

Валиномицин переносит K^+ по электрохимическому градиенту. Он захватывает его с одной стороны мембраны, диффундирует с ним и высвобождает на другой стороне. Такой перенос совершается в обоих направлениях.

Примером каналообразующих ионофоров являются пептидные антибиотики грамицидины А и С. *Грамицидин А* — это линейный полипептид, который формирует путем димеризации трансмембранный канал для перемещения моновалентных катионов H^+ , Na^+ и K^+ . *Грамицидин С* представляет собой циклический декапептид. Он повышает проницаемость мембран микробной клетки для неорганических катионов за счет формирования сети каналов в липидных структурах мембраны, что обуславливает осмотическую неустойчивость клетки. Применяется как местное антибактериальное средство при гнойных ранах, пролежнях, ожогах и инфекционно-воспалительных заболеваниях полости рта и глотки.

Полиеновые антибиотики — это противогрибковые средства природного происхождения, продуцируемые различными микроорганизмами. Специфическая токсичность полиеновых антибиотиков в отношении грибковой, а не бактериальной, инфекции обусловлена более высоким сродством к эргостеролу (одному из компонентов цитоплазматической мембраны клеток грибов), по сравнению с холестеролом, свойственным животным клеткам. Полиеновые антибиотики, такие как амфотерицин В, нистатин, пимафуцин (натамицин), связываясь с эргостеролом, образуют в мембране поры радиусом около 0,4 нм, через которые из клетки свободно выходят ионы одновалентных металлов, некоторые анионы и небольшие нейтральные молекулы, что приводит к гибели клетки.

8.4. Липосомы как системы транспорта лекарственных веществ

Липосомы — это замкнутые, сферические частицы, образованные бимолекулярными фосфолипидными слоями, в пространстве между которыми содержится водная фаза.

В настоящее время разработаны методы, позволяющие создавать однослойные и многослойные липосомы. Диаметр липосом варьирует от 20 нм (моноламеллярные везикулы, стенка состоит из одного бислоя фосфолипидов) до 10–50 мкм (мультиламеллярные везикулы, стенка которых состоит из десятков или сотен бислоев) (рис. 8.6).

В последнее время липосомы находят все большее признание как перспективные носители лекарственных веществ, поскольку согласно результатам клинических испытаний вводимые в составе липосом лекарственные вещества более эффективны и менее токсичны, чем применяемые в свободном виде. При этом они, в отличие от полимерных систем доставки лекарств, полностью биodeградируемы и биосовместимы, не вызывают аллергических реакций. Включенные в липосомы лекарственные вещества более устойчивы в организме, так как они изолированы липидной мембраной.

Имеется возможность для включения в липосомы многих фармакологических агентов, в том числе ферментов, гормонов, витаминов, антибиотиков, иммуномодуляторов и цитостатиков. При этом водорастворимые (гидрофильные) лекарственные вещества могут быть заключены во внутреннее водное пространство липосом, а жирорастворимые (гидрофобные) — в бислойную липидную мембрану.

Способность липосом включать в себя самые разные вещества практически без каких-либо ограничений в отношении их химической природы, свойств

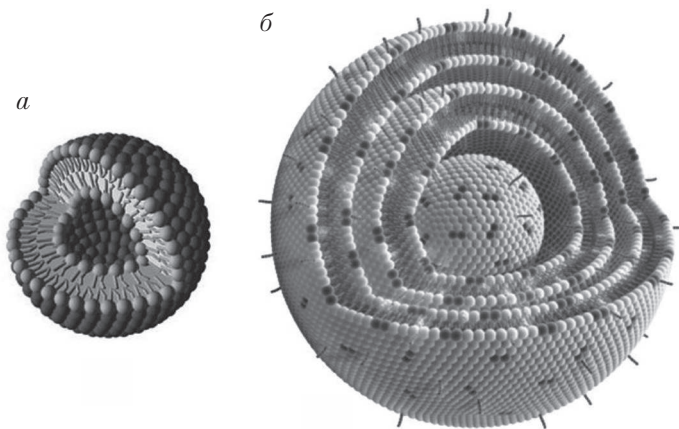


Рис. 8.6. Монослойная (а) и многослойная (б) липосомы

и размера молекул дает поистине уникальные возможности для решения некоторых медицинских проблем.

Включение в мембрану липосом антител и других молекул, обеспечивающих «узнавание» клетки, позволяет осуществлять направленную транспортировку лекарственных веществ. Этим приемом достигается избирательность действия препарата, снижается его побочное влияние на другие ткани, доза действующего вещества, необходимая для достижения лечебного эффекта.

Липосомы можно вводить как перорально, так и парентерально. При парентеральном введении липопротеины в плазме крови обмениваются липидами с липосомами, способствуя их разрушению и выходу их содержимого. При использовании липосом отмечается повышение терапевтического эффекта и пролонгирование действия лекарственных веществ, что частично обусловлено их задержкой в системе циркуляции и замедленным разрушением ферментами плазмы.

В организме липосомы поглощаются клетками ретикуло-эндотелиальной системы, поэтому большее их количество поступает в печень, селезенку, костный мозг, лимфатические узлы.

Липосомы проникают в клетки путем эндоцитоза или слиянием (встраиванием) липидной оболочки липосом с липидным слоем мембран. Если липосомы попадают в клетку путем эндоцитоза, то их липидная оболочка разрушается фосфолипазами и лекарственное вещество высвобождается в цитоплазму. В случае слияния липидный компонент липосом встраивается в мембрану, а содержимое с лекарственным веществом высвобождается в цитоплазму.

Липосомальные транспортные системы широко используются в косметологии. Они обеспечивают быстрый перенос действующих веществ (витаминов, увлажняющих компонентов, противовоспалительных средств) в глубокие слои эпидермиса и дерму, при этом активные вещества доставляются в полном объеме.

Липосомы используют в качестве модельных систем при изучении принципов организации и механизмов функционирования мембран.

Обмен простых белков

Изучение метаболизма белков, пептидов и аминокислот не только продолжает знакомство с молекулярными основами процессов жизнедеятельности, но и позволяет понять особенности катаболических превращений лекарственных средств белковой, пептидной и аминокислотной природы.

9.1. Азотистый баланс и оценка обеспеченности организма белками

Содержание азота в атмосферном воздухе составляет почти 80 %, однако способностью усваивать его обладают лишь некоторые прокариоты (*Rhizobia*), восстанавливающие азот в аммиак. Реакции восстановления катализируются сложным комплексом ферментов — нитрогеназой — и требуют значительных затрат энергии. Аммиак токсичен. Глутаминсинтетаза катализирует присоединение NH_4^+ к глутамату с образованием глутамина — у бактерий это первая реакция включения азота в метаболизм.

Животные получают азот главным образом из белков. Поскольку обязательным элементом белков является азот, содержание которого составляет в среднем 16 %, а белки не депонируются в организме, за состоянием белкового обмена можно проследить по разнице между количеством азота, поступающим с пищей, и количеством азота, выделяющимся почками. Эта разность получила название *азотистый баланс*.

У здорового взрослого человека отмечается *азотистое равновесие* — количество поступившего с пищей азота равняется количеству выделившегося азота.

У детей, у женщин во время беременности, при увеличении мышечной массы при занятии спортом наблюдается *положительный азотистый баланс*. Некоторая часть азота при этом задерживается в организме и используется на рост и развитие органов и тканей.

При голодании, длительных хронических заболеваниях, старении отмечают *отрицательный азотистый баланс*. При этом количество выводимого азота превышает количество поступающего с пищей.

Для количественного определения азота используют минерализацию образца. В методе И. Кьельдаля образец сжигают в песчаной бане в присутствии серной кислоты и образующийся сульфат аммония определяют колориметрически, используя цветные реакции с реактивом Несслера, дифениламино и др.

Каждый белок характеризуется так называемым *временем биологического полураспада* — временем, в течение которого количество этого белка уменьшается наполовину. Быстрее этот процесс происходит с белками печени, плазмы крови, кишечника, медленнее — с белками соединительной ткани, мышц. За сутки у взрослого человека обменивается около 400 г белков.

При безбелковой диете азотистый баланс становится отрицательным. Если удерживать человека на такой диете в течение недели, то количество выделяемого им азота перестает увеличиваться, достигнув величины около 4 г/сут (около 25 г белка). Количество азота, теряемого при белковом голодании, получило название *коэффициента изнашивания*. Во-первых, это связано с тем, что некоторые аминокислоты модифицируются после трансляции и не могут повторно использоваться (например, гистидин превращается в 3-метилгистидин, пролин — в гидроксипролин, которые уже не могут быть использованы для синтеза белков). Во-вторых, часть аминокислот вовлекается в пути катаболизма и прекращает свое существование, выделяясь из организма с калом, мочой, потом и т.д. Если не замещать такие потери внешним поступлением аминокислот, то общий фонд азота в организме снижается, что влечет за собой нарушение функций клеток.

Коэффициент изнашивания служит основой для разработки норм белкового питания. Так, восстановление азотистого равновесия у человека, находившегося на безбелковой диете, достигается при добавлении в рацион питания 40–50 г/сут белков. Взрослый здоровый человек должен получать в среднем 0,8–1,0 г/кг в сутки белка высокого качества. Эта величина зависит от возраста, повышается при беременности, лактации, физической активности и др.

Однако нормальное белковое питание включает в себя не только достаточное количество потребляемого с пищей белка. Оно зависит также от его качества, которое определяется *аминокислотным составом* и *усвояемостью*. Что касается аминокислотного состава, то все протеиногенные аминокислоты, в зависимости от возможностей их образования в организме, разделяются на четыре группы:

- заменимые аминокислоты — Ала, Асп, Глу — синтезируются в необходимых количествах в организме;
- незаменимые аминокислоты — Вал, Лей, Иле, Мет, Фен, Три, Лиз, Тре — не могут синтезироваться в организме и должны поступать с пищей;
- относительно незаменимые аминокислоты — Гис, Арг, Асн, Глн, Про, Гли, Сер — для их синтеза необходимы дополнительные пути, поэтому они синтезируются медленно. Гис и Арг образуются в количествах, не покрывающих потребность в них, особенно в детском возрасте;
- условно заменимые аминокислоты — Тир, Цис — синтезируются из незаменимых аминокислот Фен и Мет соответственно.

У «белка высокого качества», или «идеального белка», число незаменимых аминокислот в белке равняется потребности организма в них в данный промежуток времени. При этом рацион, содержащий «белок высокого качества», может быть составлен путем включения в него двух или более белков невы-

сокого качества, если они дополняют друг друга дефицитными аминокислотами. «Идеальный» белок можно также получить добавлением необходимых индивидуальных аминокислот к пищевому рациону.

Усвояемость белков определяется их доступностью к действию ферментов, катализирующих гидролиз белков в желудочно-кишечном тракте.

Отсутствие депонирования белков для потребностей организма компенсируется созданием аминокислотного фонда, который находится в динамическом состоянии благодаря тесной связи аминокислотных фондов клеток и тканей с аминокислотным фондом крови. Последний пополняется аминокислотами, поступающими из кишечника при переваривании белков и возникающими при гидролизе внутриклеточных белков (рис. 9.1).

Основная масса аминокислот используется для синтеза собственных белков организма. Отсутствие или снижение количества даже одной аминокислоты приводит к нарушению синтеза белков и усиливает процессы распада внутриклеточных белков.

Из аминокислот синтезируются биологически активные молекулы, такие как биогенные амины. Некоторые аминокислоты, например глицин и глутамат, сами обладают регуляторной способностью в клетках, участвуют в проведении

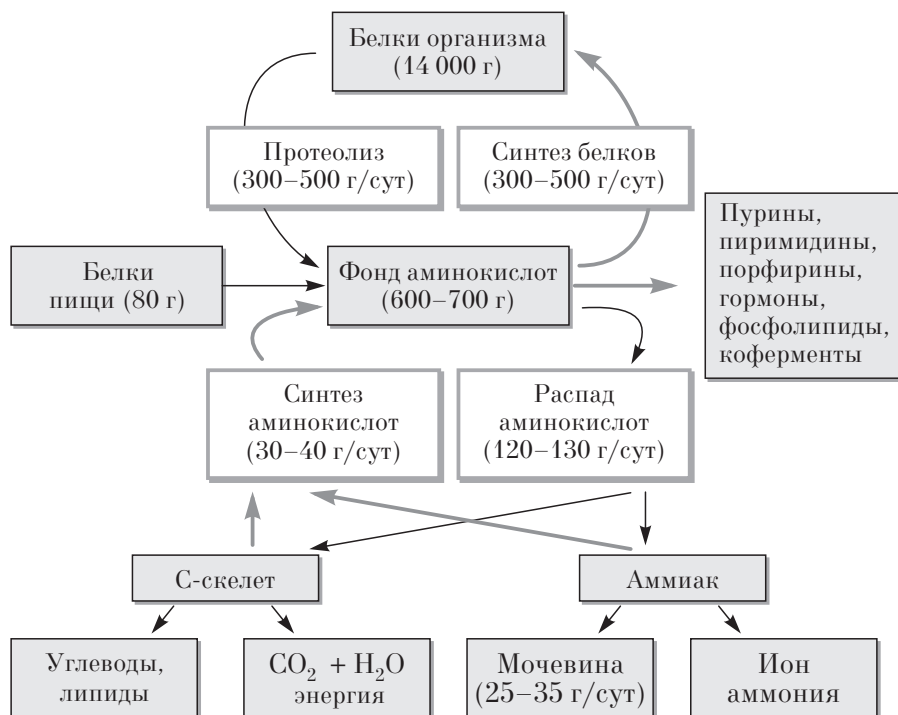


Рис. 9.1. Формирование и использование аминокислотного фонда в организме человека

нервного импульса. Аминокислоты расходуются на образование гормонов белковой и пептидной природы, гема, креатина, карнитина, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, других азотсодержащих соединений. Аминокислоты фонда могут терять аминогруппу (дезаминирование). Образовавшиеся безазотистые остатки используются для синтеза глюкозы, кетонных тел или окисляются до CO_2 и H_2O . Азот аминокислот выводится из организма почками в виде мочевины или солей аммония.

9.2. Классификация протеаз

Международный союз биохимии и молекулярной биологии (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB, 1984) предложил термин **пептидаза** для подкласса ферментов гидролаз, действующих на пептидную связь (подкласс ЕС 3.4). Синонимичным их названием является термин **протеаза**.

В зависимости от места расположения гидролизуемой пептидной связи различают две группы протеолитических ферментов:

- **эндопептидазы** (*протеиназы*) — катализируют расщепление пептидной связи внутри целой молекулы белка (пепсин, трипсин, химотрипсин, эластаза);
- **экзопептидазы** — катализируют гидролиз пептидной связи за счет отщепления С-концевой (карбоксипептидазы) или N-концевой (аминопептидазы) аминокислоты.

Протеолиз может протекать вне клеток и внутриклеточно. Он может быть *ограниченным*, тогда гидролиз пептидной связи в белке-мишени приводит к отщеплению участка полипептидной цепи. В результате изменяется функциональное состояние белка. При *неограниченном*, или *тотальном*, протеолизе белки распадаются до аминокислот. Ограниченный протеолиз широко распространен в клетке и за ее пределами. Он лежит в основе процессинга (созревания) белков. В частности, ограниченный протеолиз лежит в основе активирования ферментов (переваривание белков, системы свертывания крови, фибринолиза, комплемента, кининовая система и т.д.), синтеза гормонов (преобразование проопиомеланокортина, инсулина и др.). Тотальный протеолиз позволяет преодолеть иммуногенность белков, способствует пополнению аминокислотного фонда.

Таблица 9.1

Классификация протеаз

Класс	Примеры
Серин/треониновые	Трипсин, химотрипсин, субтилизин, эластаза, ферменты гемостаза, ферменты протеасом, катепсины А, G
Аспарагиновые	Пепсин, ренин, HIV протеаза, катепсины D, E
Цистеиновые	Бромелаин, папаин, катепсины, каспазы
Металлопротеазы	Термолизин, ангиотензинпревращающий фермент, карбоксипептидазы

Протеазы также классифицируются по компоненту активного центра, который имеет ключевое значение в связывании с субстратом и (или) катализе химической реакции. Это могут быть аминокислота или металл (табл. 9.1).

9.3. Переваривание (гидролиз) белков в желудочно-кишечном тракте

Белки пищи (70–100 г) и секретируемые в ЖКТ белки (20–30 г) перевариваются ферментами желудка и поджелудочной железы (*полостное* пищеварение) и ферментами мембран щеточной каймы (*пристеночное* пищеварение) до аминокислот, ди- и трипептидов. Последние в энтероците перевариваются ди- и трипептидазами до аминокислот.

Ферменты ЖКТ обладают относительной субстратной специфичностью; каждая пептидаза катализирует гидролиз пептидных связей, образованных определенными аминокислотами (рис. 9.2).

Для «сдерживания» активности протеаз в кровотоке в печени синтезируются два ингибитора: α_1 -антитрипсин и α_2 -макроглобулин, которые поступают в кровь и немедленно ингибируют трипсин, покидающий ацинарные клетки или протоки.

Переваривание белков в желудке. Главные клетки желудка секретируют пепсиноген, а обкладочные клетки вырабатывают соляную кислоту. Пепсиноген при поступлении пищи секретируется в полость желудка, где сначала медленно, с помощью HCl, а затем быстро, аутокаталитически, превращается в пепсин. Образовавшийся пепсин в первую очередь гидролизует пептидные связи в белках, образованные ароматическими аминокислотами (Фен, Три, Тир), и несколько медленнее — образованные Лей и дикарбоновыми аминокислотами.

Действие соляной кислоты в просвете желудка не ограничивается превращением пепсиногена в пепсин. Она денатурирует белки химуса, обладает бактерицидным действием, поддерживает pH-оптимум для пепсина, регулирует работу пилорического отдела желудка, а попадая в двенадцатиперстную кишку, инициирует образование углекислого газа.

При различных заболеваниях в желудке нарушается выделение соляной кислоты и пепсиногена, в результате чего заметно снижается эффективность переваривания белков. Чаще встречается изменение кислотности желудочного сока, реже — нарушение образования пепсина. Для диагностики заболеваний желудка проводят анализ желудочного сока.

В норме pH желудочного сока составляет 1,5–2,0. Кислотность желудочного сока определяют титрованием 0,1н. раствором NaOH и выражают в ммоль/л.

Общая кислотность желудочного сока — совокупность всех кислых компонентов: свободной, связанной HCl, кислых фосфатов и органических кислот. В норме она составляет 40–60 ммоль/л.

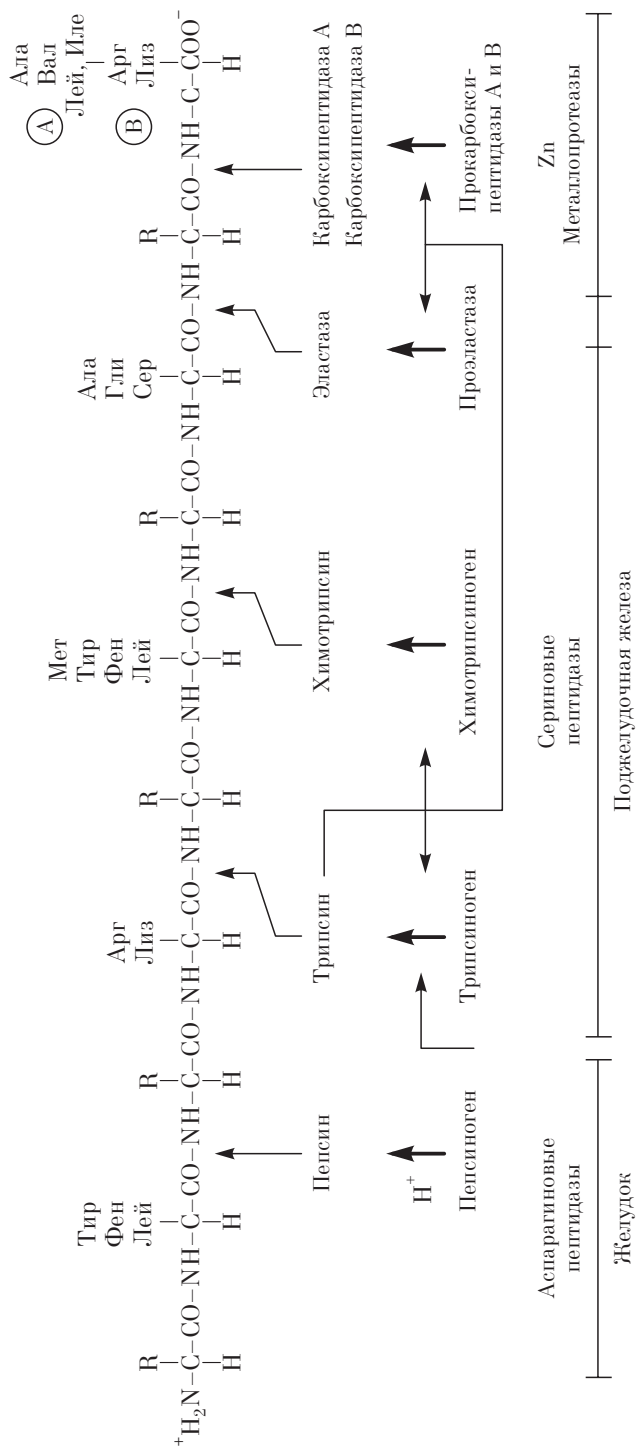


Рис. 9.2. Схема протеолиза пищевых белков в желудочно-кишечном тракте

Связанная соляная кислота — это соляная кислота, связанная с белками и продуктами их переваривания (норма 20–30 ммоль/л).

Свободная соляная кислота — это соляная кислота, не связанная с другими молекулами (норма 20–40 ммоль/л).

Молочная кислота в нормальном желудочном соке не определяется, но ее можно обнаружить в отсутствии соляной кислоты, когда ее количество повышается в результате усиленного размножения молочнокислых бактерий или при злокачественных новообразованиях желудка.

Для лечения заболеваний желудка, сопровождающихся повышением уровня соляной кислоты, используются антациды (от греч. *ἀντι* — против, лат. *acidus* — кислый). Эффект действия таких лекарственных средств заключается в локальной нейтрализации соляной кислоты, входящей в состав желудочного сока. Наиболее известным антацидом является сода.

В настоящее время получены разные антациды, которые не только способны нейтрализовать кислоту, но и выполняют адсорбирующие, цитопротекторные и обволакивающие функции, стимулируют секрецию гидрокарбонатов, увеличивают синтез гликопротеинов желудочной слизи, предохраняют эпителий капилляров от ulcerогенных факторов. Различают растворимые (всасывающиеся) и нерастворимые антациды. Предпочтение отдается нерастворимым. Пользуются, как правило, комбинированными препаратами, полученными на основе солей алюминия, магния, кремния (Алмагель, Алтацид, Алюмаг, Гастрацид, Маалокс, Маалукол и др.).

Переваривание белков в кишечнике. Дальнейшее переваривание белков происходит под действием ферментов поджелудочной железы — трипсина, химотрипсина, эластазы, карбоксипептидаз А и В — и ферментов эпителия тонкой кишки — аминопептидаз, дипептидаз, трипептидаз.

Активная форма трипсина образуется в кишечнике при участии фермента энтеропептидазы, экскретируемого в просвет тонкого кишечника энтероцитами. Энтеропептидаза отщепляет от N-конца трипсиногена гексапептид, что приводит к изменению конформации молекулы и формированию активного центра трипсина. Остальные проферменты панкреатического сока (химотрипсиноген, прокарбоксипептидазы А и В, проэластаза) активируются трипсином.

Имеет место своеобразный каскад превращений. Появление пептидов в кишечнике стимулирует секрецию холецистокинина и секретина (по химической структуре они тоже пептиды), которые, в свою очередь, активируют секрецию энтеропептидазы клетками кишечника и ферментов поджелудочной железы. Трипсин активируется энтеропептидазой, аутокаталитически и одновременно активирует химотрипсиноген, проэластазу, прокарбоксипептидазы (рис. 9.3).

Завершение переваривания небольших пептидов до аминокислот происходит с участием ферментов кишечного сока. На люминальной поверхности клеток кишечного эпителия содержится лейцинаминопептидаза (катализирует отщепление N-концевых основных аминокислот и глицина), пролинаминопептидаза (аминопептидаза Р, удаляет пролин с концевых отделов пептидов), дипептидазы и трипептидазы, которые завершают полное расщепление белков.

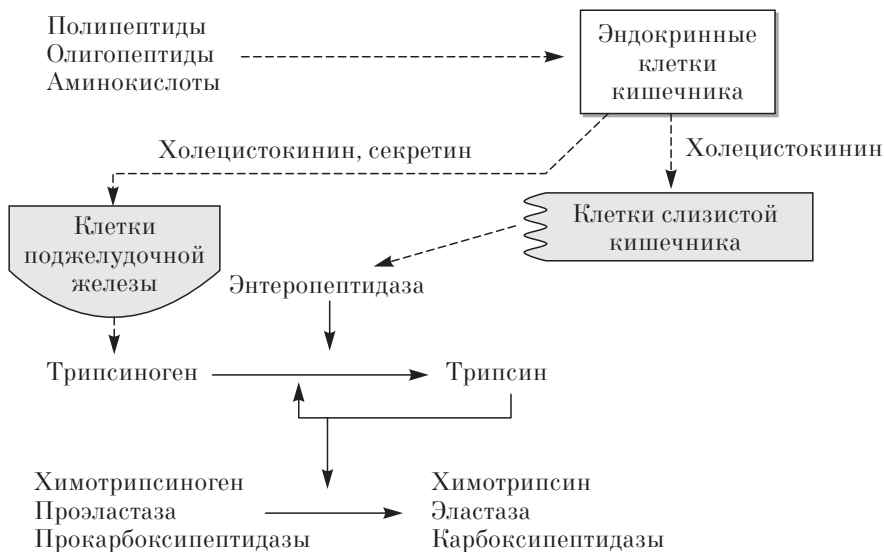


Рис. 9.3. Регуляция процесса переваривания белков в кишечнике

При некоторых заболеваниях может происходить преждевременное активирование ферментов. Например, при язвенной болезни желудка пепсиноген может превратиться в пепсин в клетках слизистой желудка, а при остром панкреатите трипсин активируется в клетках поджелудочной железы.

Существует несколько механизмов, защищающих клетки, в которых синтезируются протеазы, от прямого действия ферментов. Прежде всего, протеазы синтезируются в неактивных (про-) формах, а активаторы пространственно отделены от мест синтеза. Например, трипсиноген синтезируется клетками поджелудочной железы, а энтерокиназа (основной активатор превращения трипсиногена в трипсин) — в кишечнике. В клетках, синтезирующих пептидазы, низкий уровень ионов кальция — важного активатора протеаз. Вдобавок, ацинарные клетки поджелудочной железы синтезируют ингибитор трипсина. Он может инактивировать до 20 % секретируемого фермента при активировании трипсина в ткани поджелудочной железы за счет гидролиза пептидной связи, образованной аргинином.

Всасывание аминокислот. Всасывание аминокислот обеспечивается несколькими белками-переносчиками с относительно специфическим действием для нейтральных аминокислот с короткой цепью, для алифатических гидрофобных аминокислот, для иминокислот, для глутаминовой и аспарагиновой кислот, для лизина и аргинина. Работа некоторых из них зависит от ионов натрия, градиент которого (как и при всасывании глюкозы) обеспечивает перенос аминокислот через мембрану. Наличие общего транспортного механизма может быть причиной конкуренции углеводов и аминокислот при всасывании (рис. 9.4).

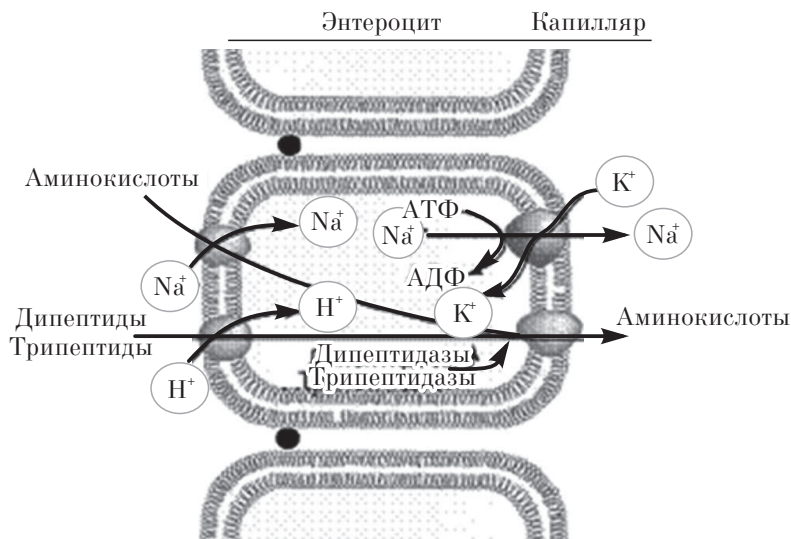


Рис. 9.4. Всасывание продуктов протеолиза в кишечнике

Ди- и трипептиды, которые не подверглись расщеплению мембранными ферментами, также могут всасываться. Их всасывание зависит от H^+ и обеспечивается специальным переносчиком. Помимо пептидов пищи, этот переносчик транспортирует через мембрану клетки ряд антибиотиков (пенициллин, цефалоспорины, β -лактамы, антибиотики и др.).

Нейтральные аминокислоты проникают в клетки почек, поджелудочной железы, печени и селезенки при участии γ -глутамильного цикла. В основе его лежит реакция, катализируемая γ -глутамилтранспептидазой (γ -ГТ) (рис. 9.5). Этот фермент — структурный компонент мембран. Он обеспечивает взаимодействие трипептида глутатиона с поступающей в клетку аминокислотой. Реакция с аминокислотой высвобождает цистеил-глицин из глутатиона, а образующийся комплекс (γ -глутамилтранспортируемая аминокислота) попадает в клетку и гидролизует там с высвобождением переносимой аминокислоты. Глутамат при этом превращается в 5-оксипролин, а цистеил-глицин распадается до аминокислот. Последующие реакции включают энергозависимую регенерацию глутатиона, включающую превращение 5-оксипролина в глутаминовую кислоту (1 моль АТФ) и синтез трипептида (2 моля АТФ). Таким образом, этот процесс требует больших энергетических затрат, но обладает высокой скоростью.

Активность γ -ГТ в сыворотке крови в норме составляет 30–50 МЕ/л (мкмоль/(мин · л)) для мужчин и 25–35 МЕ/л для женщин. Определение активности γ -ГТ в сыворотке крови используется для диагностики заболеваний печени и сердца.

У новорожденных возможно всасывание умеренных количеств непереваренных белков. Антитела материнского молока, представленные секреторными

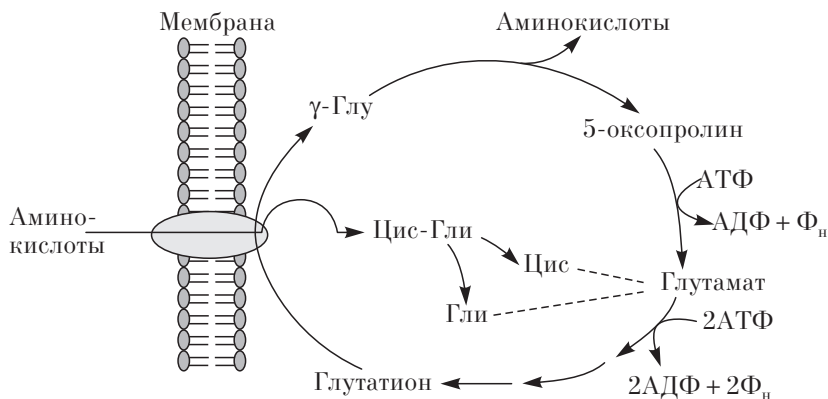


Рис. 9.5. Перенос аминокислот через мембрану с помощью γ -глутамильного цикла

иммуноглобулинами (IgA), поступают в кровь из кишечника при помощи эндоцитоза с последующим экзоцитозом и обеспечивают пассивный иммунитет против инфекций. Этот процесс снижается с возрастом, но взрослые все еще абсорбируют небольшие количества белка. Чужеродные белки, поступающие в кровь, способствуют образованию антител, и реакция на последующее поступление большего количества того же белка может вызвать аллергические симптомы, что объясняет происхождение аллергических реакций после приема некоторых пищевых продуктов.

9.4. Внутриклеточный протеолиз

В клетках широко распространены как ограниченный, так и тотальный протеолиз. Тотальный протеолиз осуществляется несколькими механизмами. Например, при потере нейраминовой кислоты олигосахаридными цепочками гликопротеинов плазмы гликопротеины связываются специфическим рецептором гепатоцитов и поступают в клетку, где после слияния эндосом с лизосомами происходит гидролиз гликопротеинов.

Другой механизм внутриклеточного тотального протеолиза протекает с участием *протеасом* — специальных частиц, которые представляют собой структурно организованные протеазы, обеспечивающие АТФ-зависимое расщепление белков.

Лизосомы — органоиды клетки, которые также содержат ферменты, катализирующие гидролиз полимеров, поступающих в клетку в составе фагосом. Ферменты лизосом, катализирующие гидролиз белков, называются *катепсинами*. Известно около 20 катепсинов. Например, катепсин D действует подобно пепсину (аспарагиновая протеаза) на ряд субстратов (фибронектин, ламинин). Повышение его активности связывают с повышением инвазивности опухолевых клеток.

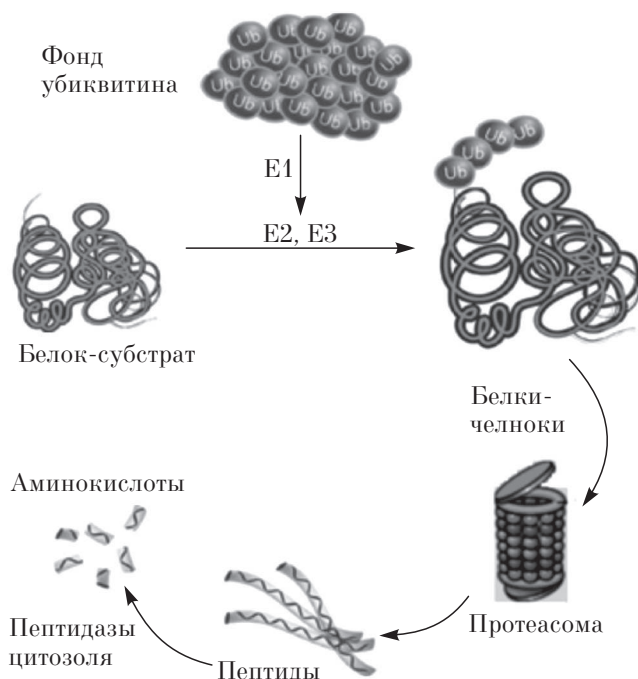


Рис. 9.6. Схема АТФ-зависимого внутриклеточного протеолиза

Основная масса внутриклеточных белков (регуляторные белки с коротким периодом полураспада, anomальные белки или неправильно свернутые белки цитозоля) подвергается протеолизу с затратой АТФ и участием специального белка *убиквитина* (Ub). Этот белок присутствует во всех эукариотических клетках, состоит из 76 аминокислотных остатков (М.М. 8,5 кДа). Три фермента включаются в присоединение убиквитина к белку мишени: Ub-активирующий (E1), Ub-конъюгирующий (E2) и Ub-лигаза (E3) (рис. 9.6). При этом к белку-мишени присоединяется несколько (четыре или больше) молекул Ub, после чего он переносится к протеасоме специальными белками. В протеасоме белки распадаются до пептидов, которые высвобождаются в цитозоль и впоследствии прекращают свое существование под влиянием пептидаз.

9.5. Ингибиторы протеолиза

Ингибиторы протеаз созданы природой с целью ограничения действия протеолитических ферментов внутри и вне клеток. Выше уже приводились примеры такой роли ингибиторов протеолиза. Наиболее широко распространены в организме сериновые протеазы и их ингибиторы. Такие ингибиторы получили название *серпины* — (Serine Protease inhibitor) (табл. 9.2). У человека выделено свыше 30 серпинов.

Таблица 9.2

Примеры ингибиторов сериновых протеаз

Сериновая протеаза	Серпин
Химотрипсин	α_1 -Антихимотрипсин
Фактор комплемента C1s	C1-ингибитор (C1INH)
Эластаза нейтрофилов	α_1 -Антитрипсин
Фактор X, тромбин	Антитромбин
Плазмин	α_2 -Антиплазмин
Трипсин	Ингибитор трипсина из поджелудочной железы

Помимо серпинов известны и другие ингибиторы.

Приведем примеры других ингибиторов протеолиза:

- ингибиторы белков апоптоза (IAPs) — блокируют апоптоз, связываясь и ингибируя каспазы;
- тканевые ингибиторы металлопротеаз (ТИМП) — домен белка ингибитора взаимодействует с ионами Zn^{2+} в активном центре фермента;
- цистатины — ингибиторы лизосомальных катепсинов. Некоторые из них (стефины) найдены в цитозоле и во внеклеточных пространствах. Цистатины защищают клетки от катепсинов, которые могут покинуть лизосомы и вызвать повреждение тканей.

Ингибиторы пептидаз — лекарственные препараты. Серпины *ингитрил*, *контрикал* (получают из ткани легких), *пантрипин*, *гордокс* (из ткани поджелудочной железы) используются для лечения воспалительных и некротических процессов (панкреатиты), нарушений свертывания крови и фибринолиза. В стоматологии эти ингибиторы применяют локально в ротовой полости в иммобилизированной форме.

Синтезированы искусственные *ингибиторы протеазы ВИЧ*, которые вошли в протоколы лечения СПИДа. Протеаза ВИЧ выполняет важные функции в жизненном цикле вируса. Она обладает особым типом специфичности, катализируя гидролиз пептидных связей Фен–Про и Тир–Про, на которые редко действуют протеазы животных и человека.

9.6. Метаболизм аминокислот

Углеводородный безазотистый остаток аминокислот неизбежно вовлекается в центральные метаболические пути. Безазотистым он становится благодаря *дезаминированию*, которое может быть *прямым* — аминокгруппа высвобождается сразу в форме аммиака — и *непрямым* — аминокгруппа аминокислоты переносится вначале на кетокислоту с образованием новой аминокислоты (трансаминирование) с последующим прямым дезаминированием последней (трансдезаминирование).

9.6.1. Окислительное дезаминирование

Основной механизм прямого дезаминирования — окислительное дезаминирование. Оно протекает в митохондриях, где дезаминируется одна аминокислота (глутаминовая) под влиянием глутаматдегидрогеназы, и в пероксисомах, где дезаминированию подвергаются аминокислоты при участии оксидаз аминокислот.

Окислительное дезаминирование глутамата протекает в два этапа. Вначале глутаматдегидрогеназа (ГДГ) катализирует дегидрирование глутаминовой кислоты и образуется промежуточный метаболит — иминоглутаровая кислота. Отщепленные ионы водорода восстанавливают кофермент НАД⁺. На втором этапе происходит спонтанный гидролиз связи в месте присоединения иминогруппы, с образованием аммиака и α-кетоглутаровой кислоты.

Глутаматдегидрогеназная реакция обратима. При повышении концентрации аммиака в клетке она может протекать в обратном направлении, как восстановительное аминирование α-кетоглутарата (рис. 9.7). Но в отличие от дезаминирования для восстановительного аминирования глутаматдегидрогеназа использует другой кофермент — НАДФН·Н⁺.

Глутаматдегидрогеназа очень активна в митохондриях клеток практически всех органов, кроме мышц. Этот фермент — олигомер, состоящий из 6 субъединиц (М.М. 312 тыс. а.е.м.). Глутаматдегидрогеназа играет важную роль, так как является регуляторным ферментом аминокислотного обмена. Аллостерические ингибиторы глутаматдегидрогеназы (АТФ, ГТФ, НАДН·Н⁺) вызывают диссоциацию фермента и потерю глутаматдегидрогеназной активности. Высокая концентрация АДФ активирует фермент. Таким образом, низкий энергетический уровень в клетках стимулирует разрушение аминокислот и образование α-кетоглутарата, поступающего в ЦТК как энергетический субстрат. Синтез

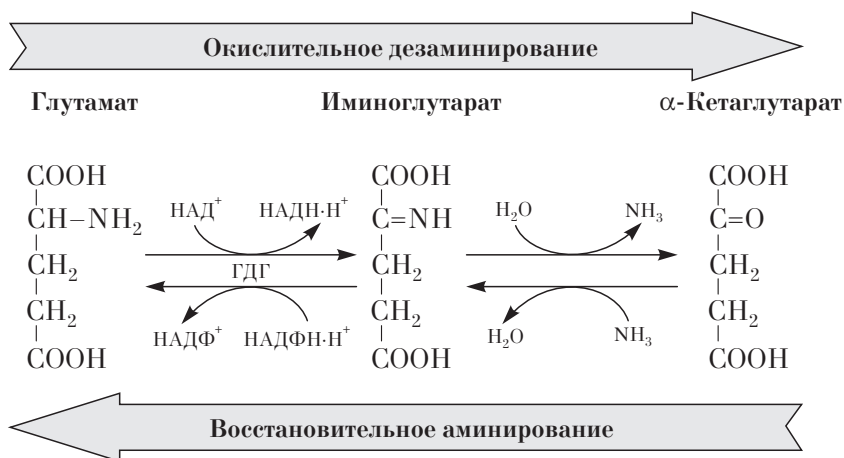


Рис. 9.7. Глутаматдегидрогеназная реакция

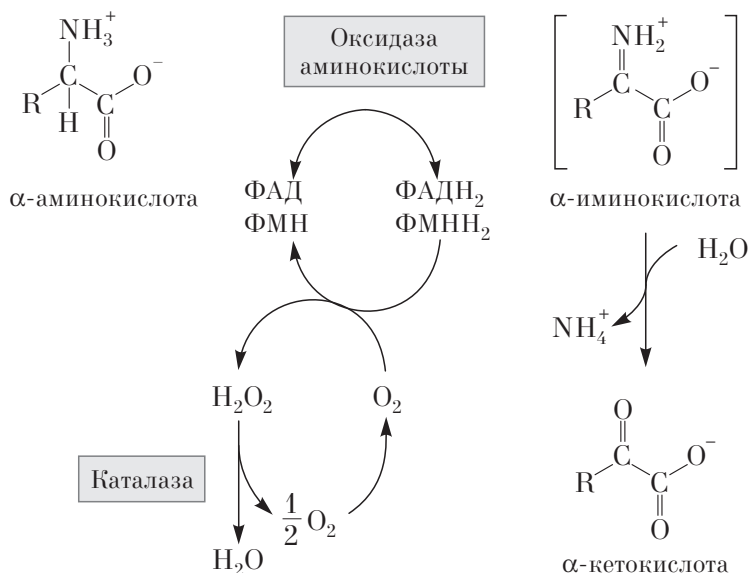


Рис. 9.8. Схема прямого окислительного дезаминирования аминокислот L- и D-оксидазами

глутаматдегидрогеназы может индуцироваться стероидными гормонами (кортизолом).

Окислительное дезаминирование и пероксисомы (рис. 9.8). В печени и почках обнаружен фермент оксидаза L-аминокислот, способный дезаминировать некоторые L-аминокислоты. Коферментом в данной реакции выступает ФМН. Однако роль этого механизма в дезаминировании аминокислот незначительна, поскольку оптимум ее действия лежит в щелочной среде (рН 10,0). В клетках, где рН среды близка к нейтральным значениям, активность таких ферментов очень низкая.

В печени и почках обнаружена и оксидаза D-аминокислот. Это ФАД-зависимый фермент. Несмотря на то что его рН-оптимум лежит в нейтральной среде, его роль в окислительном дезаминировании также невелика, так как количество D-изомеров в организме крайне мало, потому что белки пищи и белки тканей человека и животных содержат в основном L-аминокислоты.

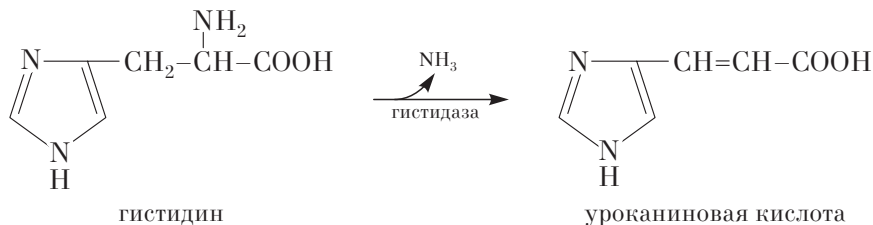


Рис. 9.9. Прямое дезаминирование гистидина

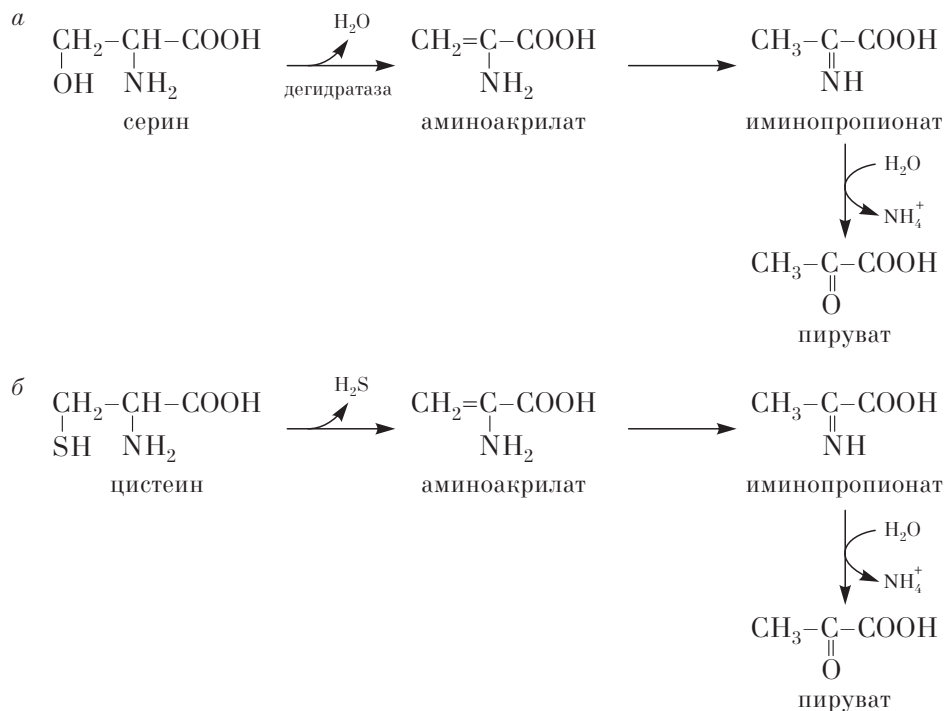


Рис. 9.10. Прямое неокислительное дезаминирование серина (а) и цистеина (б)

Вероятной функцией этого фермента является защита клетки от возможного неблагоприятного действия D-аминокислот на механизмы синтеза белков. Образующийся в этой реакции пероксид водорода разрушается каталазой пероксисом.

Несколько аминокислот участвуют в **прямом неокислительном дезаминировании**. Гистидин подвергается внутримолекулярному дезаминированию с образованием уроканиновой кислоты (рис. 9.9). Эта реакция протекает в печени и коже.

Серин и треонин дезаминируются с участием дегидратаз (фосфопиридоксальзависимые ферменты), цистеин дезаминируется после десульфатирования (рис. 9.10).

9.6.2. Непрямое дезаминирование

Непрямое дезаминирование является основным в дезаминировании аминокислот и включает два этапа: переаминирование и окислительное дезаминирование.

В реакции **переаминирования** (трансаминирования) каждая аминокислота передает свою аминогруппу на α-кетокислоту. Реакция катализируется

трансаминазами. Активная форма витамина В₆ (*фосфопиридоксаль*) является коферментом трансаминаз и выполняет функцию промежуточного переносчика аминокруппы между аминокислотой и кетокислотой (рис. 9.11).

Трансаминазы локализуются в цитозоле и митохондриях клеток всех органов и катализируют переаминирование практически всех аминокислот. Исключение составляют *лизин*, *треонин* и *пролин*. Наиболее популярными акцепторами аминокруппы в таких реакциях выступают α -кетоглутарат, оксалоацетат и реже — пируват. Эти α -кетокислоты — нормальные метаболиты центральных метаболических путей. Множественность аминокислот и ограниченное число акцепторов приводит к повышению роли отдельных аминокислот в обмене азота: Глу, Глн, Асп, Асн, Ала.

Наиболее распространенными аминотрансферазами являются *аспартат-аминотрансфераза* (АсАТ), по обратной реакции — *глутаматоксалоацетат-трансаминаза* (ГОТ), и *аланинаминотрансфераза* (АлАТ), по обратной реакции — *глутаматпируваттрансаминаза* (ГПТ) (рис. 9.12).

Определение активности этих трансаминаз в сыворотке крови нашло широкое применение в клинике. Их активность наиболее высока в клетках печени и сердца.

Изоферментами АсАТ являются *цитозольная* (цАСТ) и *митохондриальная* (мАСТ) формы этого фермента. В печени, миокарде и большинстве других органов мАСТ составляет 80 % массы фермента, в то время как в сыворотке крови — менее 12 %. Повышение активности мАСТ в сыворотке крови

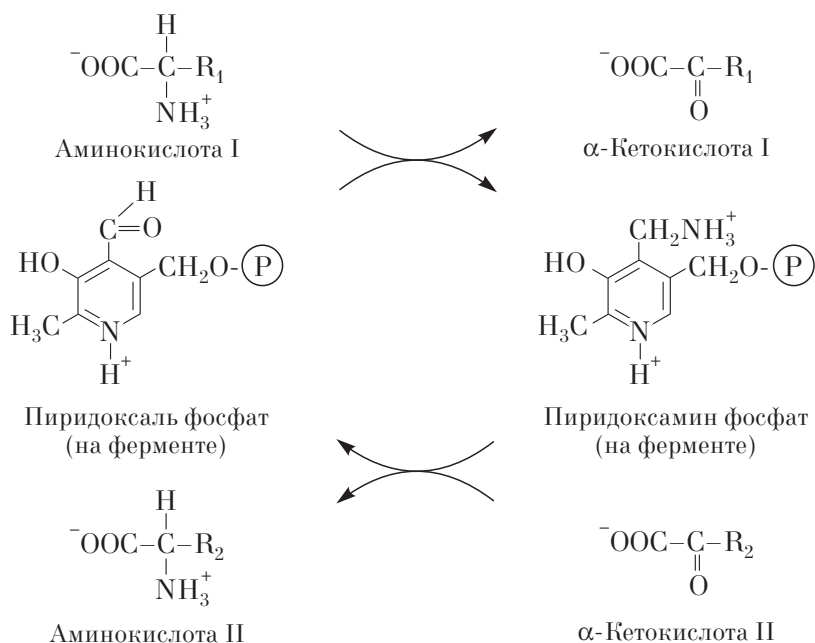


Рис. 9.11. Схема реакции трансаминирования

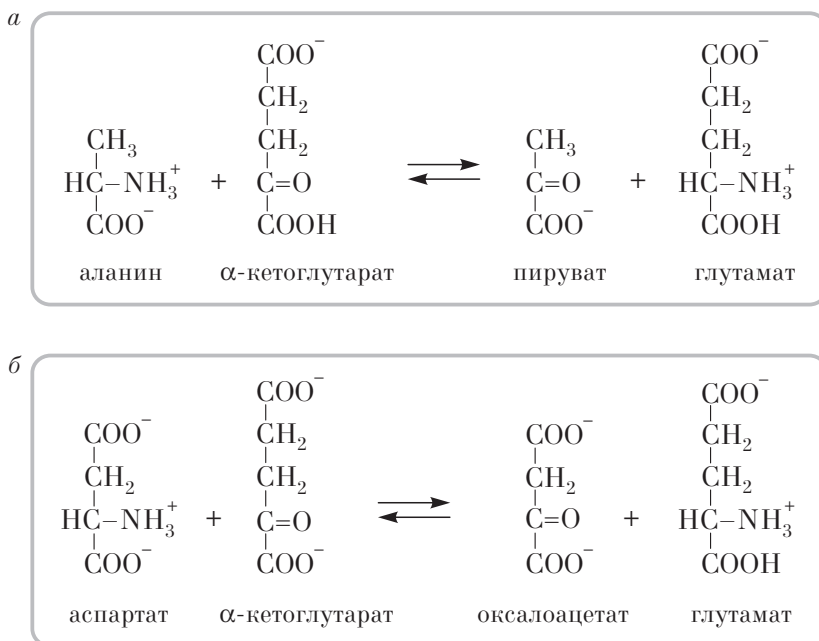


Рис. 9.12. Схема реакций, катализируемых аланиновой трансаминазой (*a*) и аспарагиновой трансаминазой (*б*)

имеет место при острых поражениях печени и инфаркте миокарда, сопровождающихся некрозом тканей и разрушением клеточных мембран. При этом повышение активности АСТ отражает тяжесть заболевания, глубину повреждения клеток и позволяет прогнозировать его течение.

Определение активности АлАТ и АсАТ применяется для диагностики заболеваний миокарда и печени, когда их активность в крови может превышать 400 ЕД/л. Для большей информативности при оценке степени повреждения ткани печени и сердечной мышцы определяют соотношение активности АсАТ/АлАТ в сыворотке крови — *коэффициент де Ритиса*, который в норме составляет $1,33 \pm 0,42$.

Переаминирование играет важную роль в перераспределении аминогрупп между аминокислотами в пределах аминокислотного фонда и обеспечивает синтез нужных для клетки в данный момент аминокислот, используя аминокислоты других аминокислот. Вместе с тем, переаминирование обеспечивает перенос аминогрупп на α-кетокислоты — предшественники аминокислот, способных к активному прямому дезаминированию. Такой аминокислотой является, в первую очередь, α-кетоглутаровая кислота, которая путем переаминирования легко превращается в глутамат (рис. 9.13).

В мышцах, особенно при интенсивной физической нагрузке, когда активность глутаматдегидрогеназы низкая, протекает еще один путь непрямого

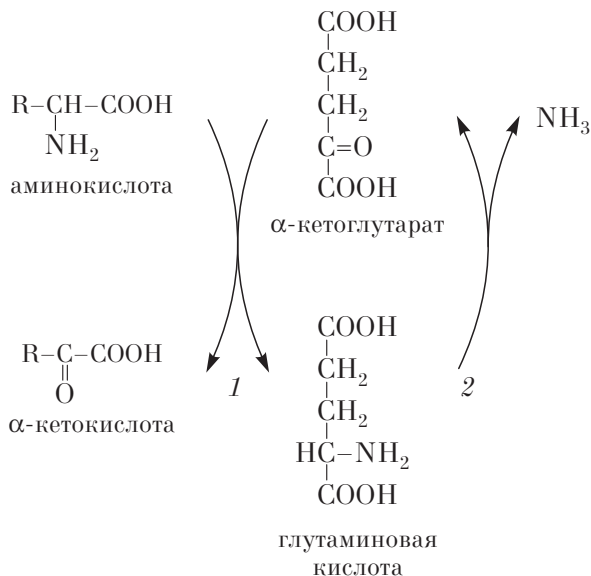


Рис. 9.13. Схема реакций непрямого дезаминирования:

1 — переаминирование (I этап); 2 — окислительное дезаминирование глутамата (II этап)

дезаминирования — с участием цикла ИМФ–АМФ (рис. 9.14). В этом процессе можно выделить четыре этапа:

- 1) трансаминирование с α-кетоглутаратом и образование глутамата;
- 2) трансаминирование глутамата с оксалоацетатом (фермент АсАТ) и образование аспартата;
- 3) реакция переноса аминогруппы от аспартата на ИМФ (инозинмонофосфат) и образование АМФ и фумарата;
- 4) гидролитическое дезаминирование АМФ (происходит под действием фермента АМФ-деаминазы).

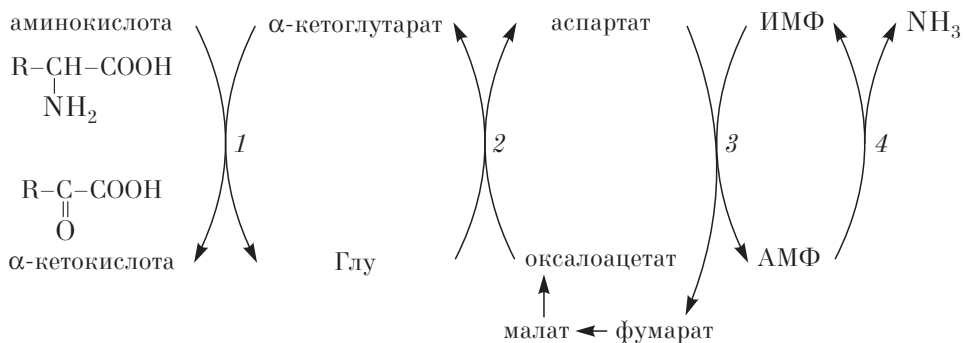


Рис. 9.14. Схема непрямого дезаминирования в работающей мышце (1–4 — этапы)

9.7. Обмен аммиака

Аммиак постоянно образуется во всех органах и тканях организма. Наиболее активными его продуцентами в кровь являются органы с высоким обменом аминокислот и биогенных аминов — нервная ткань, печень, кишечник, мышцы. Помимо реакций прямого и непрямого дезаминирования, источником аммиака могут быть реакции *дезаминирования амидов* глутаминовой и аспарагиновой кислот в печени и почках, *катаболизм биогенных аминов* во всех тканях (в наибольшей степени в нервной ткани), *жизнедеятельность бактерий* толстого кишечника, *распад* пуриновых и пиримидиновых *нуклеотидов* во всех тканях. Однако несмотря на активное образование аммиака большинством клеток, уровень его в крови относительно невысок и составляет 5–50 мкМ/л.

Аммиак — это газ, который легко проходит через мембраны. Вместе с тем, он является активным акцептором протонов, поэтому легко превращается в ион аммония. Последний не проходит через мембраны и подлежит удалению из клеток посредством превращения в транспортные формы.

Основной транспортной формой аммиака является **глутамин**, который может синтезироваться из α -кетоглутарата в два этапа (рис. 9.15). На первом этапе происходит восстановительное аминирование, катализируемое глутаматдегидрогеназой. На втором этапе с помощью глутаминсинтетазы синтезируется глутамин. Глутаминсинтетаза — один из основных регуляторных ферментов обмена аминокислот. Его аллостерическими ингибиторами являются АМФ, глюкозо-6-фосфат, а также аминокислоты (Гли, Ала, Гис).

Глутамин легко транспортируется через клеточные мембраны путем облегченной диффузии (для глутамата возможен только активный транспорт) и таким образом поступает из тканей в кровь. Основными тканями — поставщиками глутамина служат мышцы, мозг и печень. С током крови глутамин транспортируется в кишечник и почки.

В почках при помощи глутаминазы происходит высвобождение аммиака. Здесь он присоединяет к себе протон водорода и становится ионом аммония (NH_4^+). Секреция клетками почечных канальцев образующегося катиона в мочу играет важную роль в регуляции кислотно-щелочного равновесия и защите организма от излишней потери ионов Na^+ и K^+ . В норме выводится около 0,5 г

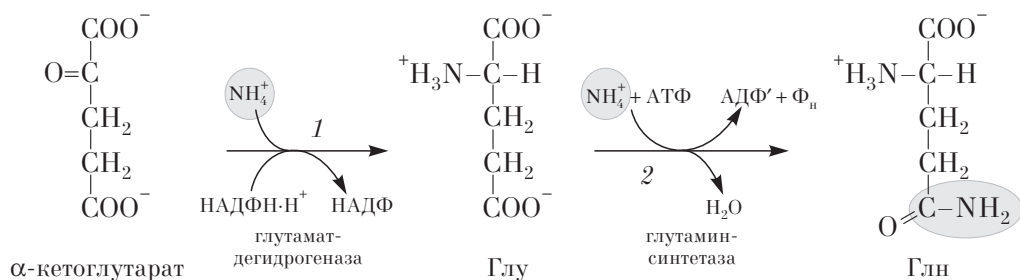


Рис. 9.15. Реакции синтеза глутамина в клетках (1, 2 — этапы)

солей аммония в сутки. При ацидозе количество глутаминазы в почках и количество выводимого аммиака с мочой повышается.

Помимо транспортной формы аммиака, глутамин является донором аминогрупп для синтеза многих азотсодержащих соединений (пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, аспарагина, аминоксахаров и др.).

В отличие от глутамина, образование **аспарагина** занимает в клетках небольшое место. Аспарагинсинтетаза катализирует этот процесс, используя аминогруппу глутамина (рис. 9.16). Фермент обнаружен практически во всех клетках, за исключением клеток лимфоидного ряда. Аспарагин поступает в клетки из плазмы крови. Это обстоятельство позволило использовать препараты аспарагиназы в качестве лекарственного средства при лечении некоторых видов лейкозов. Если имеющийся в плазме аспарагин разрушать введением аспарагиназы, то в лейкозных клетках наступит дефицит аспарагина, результатом чего станет нарушение метаболизма таких клеток.

Из мышц аммиак выводится преимущественно в виде **аланина**. Это связано с низкой активностью глутаматдегидрогеназы в мышцах. Дальнейшую судьбу аланина иллюстрирует так называемый *глюкозо-аланиновый цикл* (рис. 9.17). Из мышц аланин попадает в кровь, откуда поглощается клетками печени. Там посредством трансаминирования и последующего глюконеогенеза из аланина образуется глюкоза, которая через кровоток поступает в мышцы.

Еще один источник аммиака — **микробиом кишечника** (часть микробиома организма, представляющего совокупность микроорганизмов, обитающих в организме человека). Количество микроорганизмов такого микробиома почти в 10 раз превышает число клеток самого организма. Продукты метаболизма микробиома оказывают огромное влияние на их владельца.

Использование микроорганизмами непереваренных в кишечнике белков, продуктов их распада и аминокислот получило название *гниения белков*. Основные процессы, лежащие в основе гниения, — протеолиз, дезаминирование, декарбоксилирование и укорочение боковых цепей у ароматических и гетероциклических аминокислот. Образующиеся метаболиты используются самими микроорганизмами, выделяются из кишечника или поступают в воротную вену.

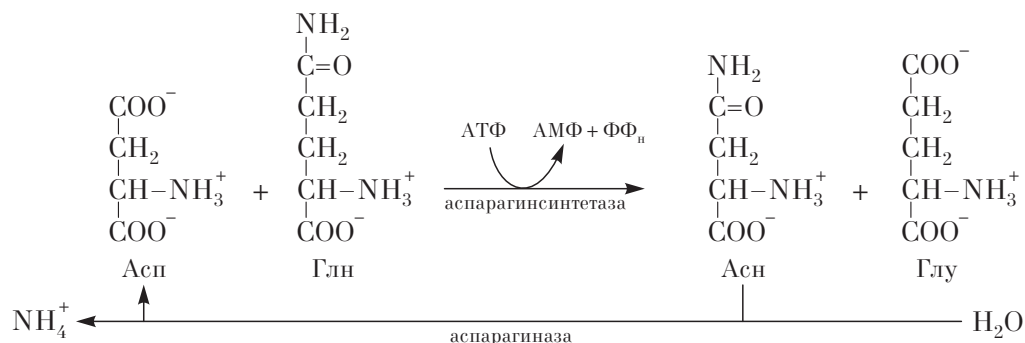


Рис. 9.16. Образование и дезаминирование аспарагина

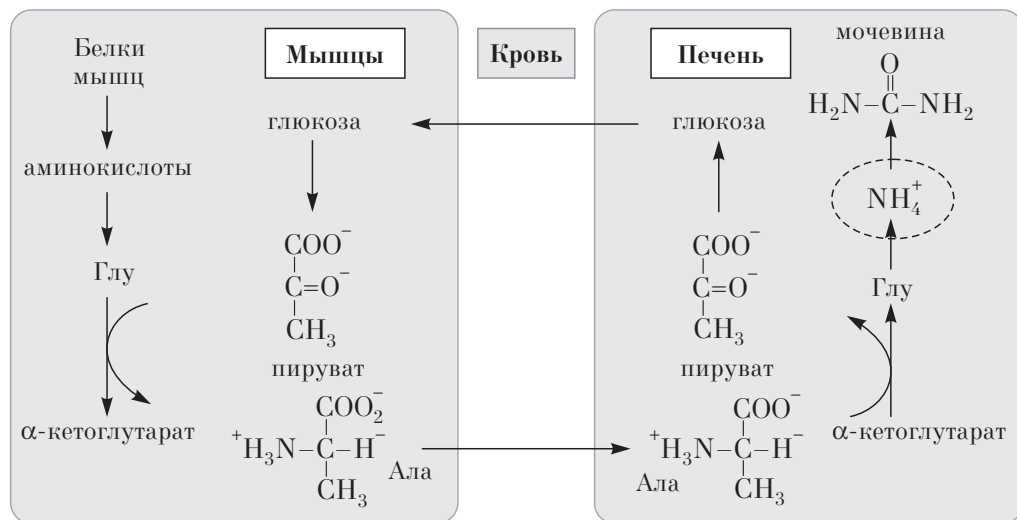


Рис. 9.17. Глюкозо-аланиновый цикл

Использование лекарственных средств, изменение характера питания, заболевания органов ЖКТ могут изменить сложившиеся взаимоотношения между микробиомом и хозяином и оказать неблагоприятное влияние на состояние здоровья человека.

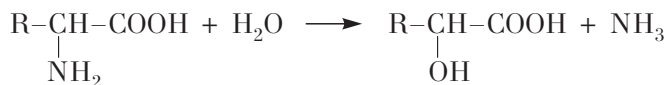
У микроорганизмов различают четыре типа дезаминирования:

1) окислительное (протекает подобно окислительному дезаминированию в животных клетках);

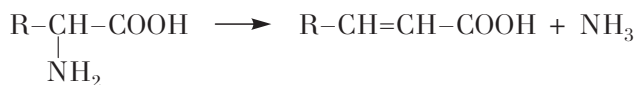
2) восстановительное



3) гидролитическое



4) внутримолекулярное



Часть образующегося аммиака поступает в воротную вену и печень, где обезвреживается, а углеводородные фрагменты используются микроорганизмами как источники энергии. Циклические части радикалов аминокислот (индол, скатол, фенол и др.), поступая в печень, обезвреживаются при участии микросомальных систем ферментов (механизмы обезвреживания описаны в главе 18).

9.8. Синтез мочевины

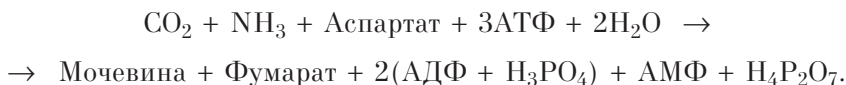
Мочевина (карбамид) — полный амид угольной кислоты — содержит два атома азота. Источником одного из них является аммиак, который в печени связывается с диоксидом углерода с образованием карбамоилфосфата под действием карбамоилфосфатсинтетазы I (рис. 9.18).

Далее под действием орнитинкарбамоилтрансферазы (орнитинтранскарбамоилазы) карбамоильная группа карбамоилфосфата переносится на α -аминокислоту орнитин и образуется другая α -аминокислота — цитруллин. Цитруллин при участии специального переносчика обменивается с орнитином цитозоля и покидает митохондрию.

В цитозоле аргининосукцинатсинтетаза связывает цитруллин с аспаратом и образует аргининосукцинат (аргининянтарную кислоту). Этот фермент нуждается в ионах Mg^{2+} . В реакции затрачивается 1 АТФ, при этом используется энергия двух макроэргических связей. Аспарат — источник второго атома азота мочевины.

На следующем этапе фермент аргининосукцинаталиаза (аргининосукциназа) расщепляет аргининосукцинат на аргинин и фумарат и аминогруппа аспартата оказывается в молекуле аргинина. Аргинин подвергается гидролизу под действием аргиназы, при этом образуются орнитин и мочевина. Кофакторами аргиназы являются ионы Ca^{2+} или Mn^{2+} . Высокая концентрация орнитина и лизина, являющихся структурными аналогами аргинина, подавляет активность этого фермента. Образующийся орнитин возвращается в митохондрию и взаимодействует с новой молекулой карбамоилфосфата, замыкая цикл.

Суммарное уравнение синтеза мочевины:



Аммиак для карбамоилфосфатсинтетазы I поступает в печень с кровотоком через воротную вену. Роль других источников, в том числе окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты в самой печени, существенно меньше.

Аспарагиновая кислота и фумарат являются молекулами, которые связывают орнитиновый цикл с циклом трикарбоновых кислот. Фумарат при участии гидратазы присоединяет молекулу воды и превращается в малат, который в обмен на α -кетоглутарат поступает в митохондрию и окисляется с помощью малатдегидрогеназы до оксалоацетата (см. рис. 9.18). Оксалоацетат получает аминогруппу от глутамата (реакцию катализирует аспаратаминотрансфераза) и превращается в аспарат. Последний, обмениваясь на глутамат, выходит в цитозоль и вновь участвует в образовании мочевины.

Регуляция синтеза мочевины. Различают *быстрый* и *медленный* способы регуляции. Важнейшим аллостерическим регулятором карбамоилфосфатсин-

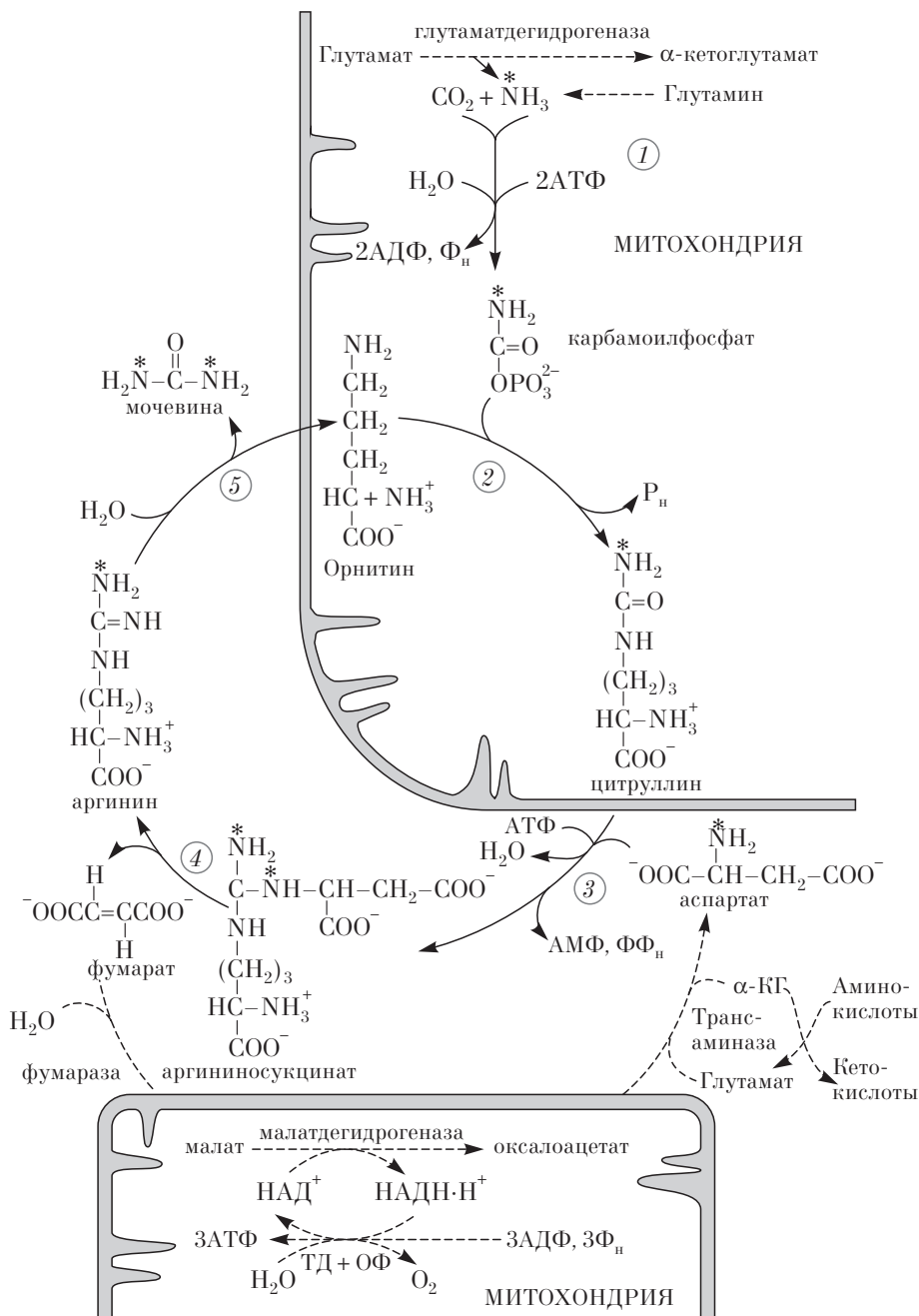


Рис. 9.18. Орнитиновый цикл в образовании мочевины:

1 — карбамоилфосфатсинтетаза I; 2 — орнитинкарбамоилтрансфераза; 3 — аргининосукцинатсинтетаза; 4 — аргининосукцинатлиаза; 5 — аргиназа (ТД + ОФ — тканевое дыхание, сопряженное с окислительным фосфорилированием)

тетазы I является N-ацетилглутаминовая кислота. Практически это соединение определяет работу карбамоилфосфатсинтетазы. Дефект фермента, синтезирующего N-ацетилглутамат, не совместим с жизнью для человека.

Медленная регуляция предполагает усиление синтеза ферментов орнитинового цикла. Это наблюдается при высоком содержании белков в диете, при голодании (усиленный распад белков). Увеличивается и синтез фермента, катализирующего образование N-ацетилглутамата.

Мочевина находит применение как лекарственное средство: 30%-й раствор мочевины в 20%-м растворе глюкозы вводят капельно внутривенно как диуретическое (мочегонное) и дегидратирующее (обезвоживающее) средство для предупреждения и уменьшения отека мозга, токсического отека легких, понижения внутриглазного давления.

Учитывая денатурирующее действие мочевины и ее способность образовывать водородные связи, мочевины используют местно в форме мазей (уродерм) в комплексной терапии заболеваний кожи, сопровождающихся избыточным ороговением.

9.9. Остаточный азот крови

Сумма всех низкомолекулярных азотсодержащих веществ в крови, которые остаются в надосадочной жидкости или фильтрате после удаления белков плазмы, получила название *остаточный азот сыворотки крови*. Он представлен, главным образом, продуктами обмена белков и нуклеиновых кислот. Основным его компонентом является мочевина (около 50 %). Затем следуют аминокислоты (около 25 %), эрготионеин (около 8 %), креатин и креатинин (до 7,5 %), пептиды, нуклеотиды и азотистые основания (около 5 %), мочевая кислота (до 4 %), аммиак и индикан (0,5 %).

Увеличение уровня остаточного азота — *азотемия* — может быть *абсолютным*, связанным с действительным накоплением азотистых компонентов в крови, и *относительным*, связанным с дегидратацией.

В свою очередь, абсолютная азотемия может быть ретенционной и продукционной. Ретенционная возникает в результате задержки выведения азотсодержащих соединений (например, при заболеваниях почек). *Продукционная* азотемия выявляется при всех состояниях, связанных с увеличением распада белка. От ретенционной азотемии ее отличает повышение содержания аминокислот в крови, а также одновременное накопление азотистых компонентов в крови и моче.

Гипераммониемия — повышение содержания аммиака в крови вследствие нарушения процессов его обезвреживания. Причинами гипераммониемии могут быть врожденные дефекты ферментов орнитинового цикла, которые встречаются довольно редко. Значительно чаще гипераммониемия наблюдается при заболеваниях печени (цирроз, гепатит и др.). Для ее диагностики определяют

уровень аммиака в крови, метаболитов орнитинового цикла в крови и моче, активность ферментов в биоптатах печени.

Клинически гипераммониемия сопровождается симптомами, указывающими на преимущественное нарушение функции нейронов: головокружение, судороги, потеря сознания, отек мозга. Это свидетельствует о токсическом действии аммиака преимущественно на нервную систему. Причиной этого могут быть высокая проницаемость гемато-энцефалического барьера для аммиака, усиленное образование глутамина, использование α -кетоглутарата для синтеза глутаминовой кислоты (нарушение обеспечения энергией), изменение соотношения аминокислот и синтеза белков нейронов. Относительное защелачивание крови приводит к повышению сродства гемоглобина к кислороду и способствует развитию гипоксии тканей.

Лечебные мероприятия при гипераммониемиях направлены на снижение концентрации аммиака в крови путем снижения потребления белков, выведения аммиака в обход нарушенных реакций с использованием альтернативных путей. Например, вводимый в качестве пищевой добавки фенилацетат связывает глутамин с образованием фенилацетилглутамина, а бензоат натрия связывает глицин с образованием гиппурата, которые покидают организм с мочой (рис. 9.19).

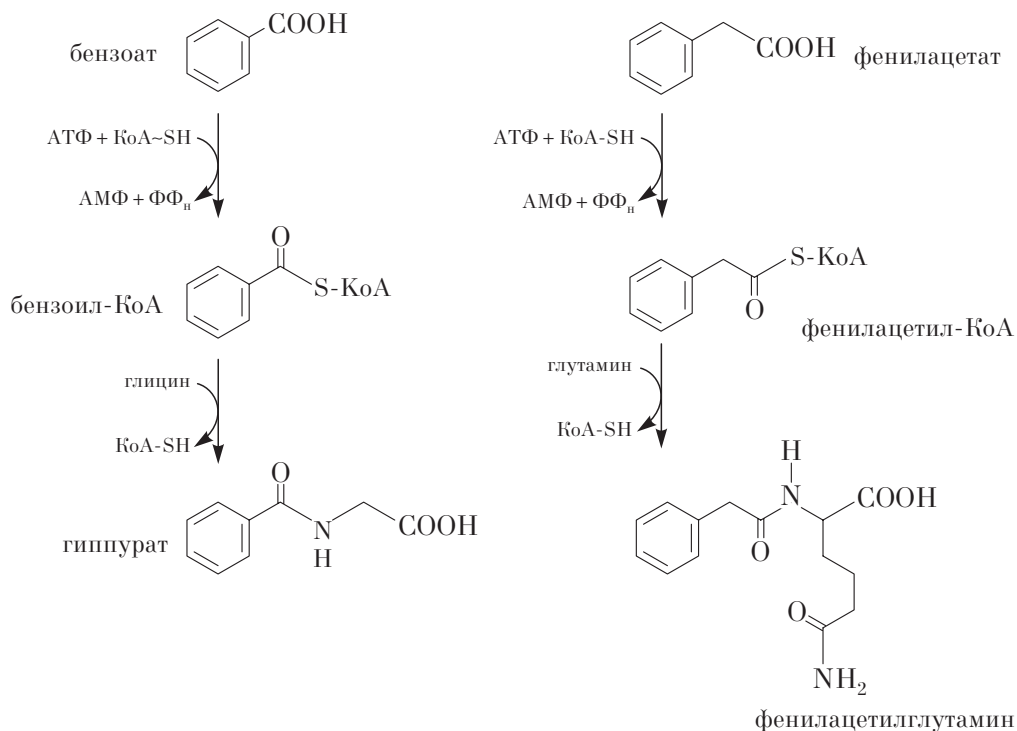


Рис. 9.19. Альтернативные пути выведения аммиака

9.10. Метаболизм безазотистого остатка аминокислот

Потеря аминогруппы протеиногенными аминокислотами и последующий катаболизм безазотистого остатка ведут к образованию пирувата, α -кетоглутарата, сукцинил-КоА, фумарата, оксалоацетата, ацетил-КоА и ацетоацетил-КоА (рис. 9.20). Аминокислоты, которые превращаются в перечисленные продукты, могут использоваться в процессе глюконеогенеза. Такие аминокислоты относят к группе *глюкогенных аминокислот*.

Некоторые аминокислоты в процессе катаболизма превращаются в ацетоацетил-КоА (Лиз, Лей) или ацетил-КоА (Лей) и могут использоваться в синтезе кетонových тел. Такие аминокислоты называют *кетогенными*.

Ряд аминокислот используется и для синтеза глюкозы, и для синтеза кетонových тел, так как в процессе их катаболизма образуются как продукты лимоннокислого цикла, так и ацетоацетил-КоА (Три, Фен, Тир) или ацетил-КоА (Иле). Такие аминокислоты называют *смешанными* или *глюкокетогенными*.

Субстраты амфиболических метаболических путей постоянно расходуются в анаболических реакциях, и безазотистые остатки аминокислот становятся субстратами *анаплеротических реакций*. Например, из обмена углеводов хо-

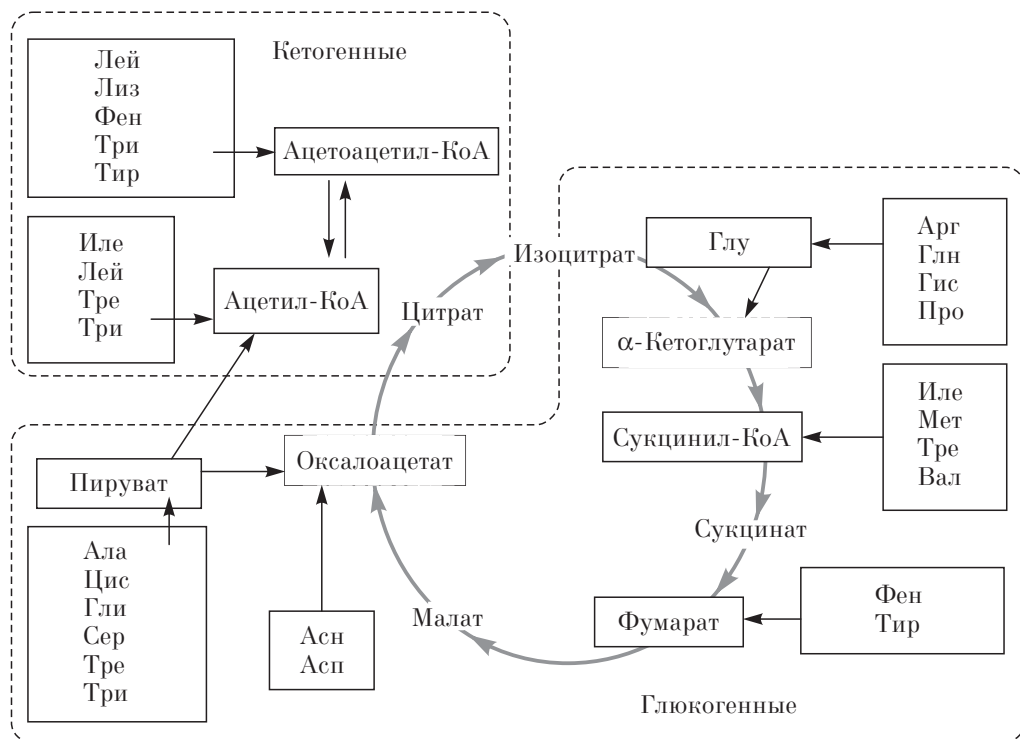


Рис. 9.20. Схема катаболизма безазотистого остатка аминокислот

рошо известна реакция, катализируемая пируваткарбоксилазой, при которой пируват превращается в оксалоацетат. К анаплеротическим можно отнести и другие реакции, при которых аминокислоты превращаются в субстраты цикла Кребса.

Понимание этих метаболических особенностей используется для специфического воздействия. Например, в сердечной мышце относительно низка активность пируваткарбоксилазы при высокой активности аспартатаминотрансферазы. Отсюда становится понятной эффективность действия на сердечную мышцу таких лекарственных средств, как Аспаркам или Панангин, содержащих аспарагиновую кислоту.

9.11. Синтез аминокислот

Основным способом синтеза аминокислот является трансаминирование. К абсолютно заменимым аминокислотам относятся Ала, Асп и Глу. Соответствующие им кетокислоты: пируват, оксалоацетат и α -кетоглутарат — образуются в процессе метаболических превращений глюкозы.

За счет амидирования Асп и Глу превращаются соответственно в аспаргин и глутамин. Пролин синтезируется из глутаминовой кислоты. Для синтеза серина используется продукт гликолиза — 3-фосфоглицерат. О синтезе аргинина уже упоминалось при описании орнитинового цикла, а гистидин образуется из АТФ. Для синтеза Цис и Тир необходимы незаменимые аминокислоты Мет и Фен.

9.12. Декарбоксилирование аминокислот

Если реакции дезаминирования и переаминирования лежат в основе процессов синтеза и распада аминокислот, то декарбоксилирование — пример использования аминокислот для синтеза биологически активных соединений. В тканях млекопитающих декарбоксилированию подвергаются аминокислоты или их производные: Три, Тир, Вал, Гис, Глу, Цис, Арг, орнитин, S-аденозилметионин, дофамин (ДОФА), 5-окситриптофан и др. Продуктами реакции являются CO_2 и амины, некоторые из них получили название биогенных аминов из-за выраженного регуляторного влияния в организме: нейромедиаторы (серотонин, дофамин, ГАМК и др.), гормоны (норадреналин, адреналин), регуляторы местного действия (гистамин, карнозин, спермин и др.).

Реакции декарбоксилирования катализируют декарбоксилазы. Их кофактором является пиридоксальфосфат. Эти ферменты катализируют необратимые реакции. Приведем несколько примеров.

Глутаминовая кислота преобладает в аминокислотном фонде организма. Широко используется в пищевой промышленности для изменения вкуса пищи.

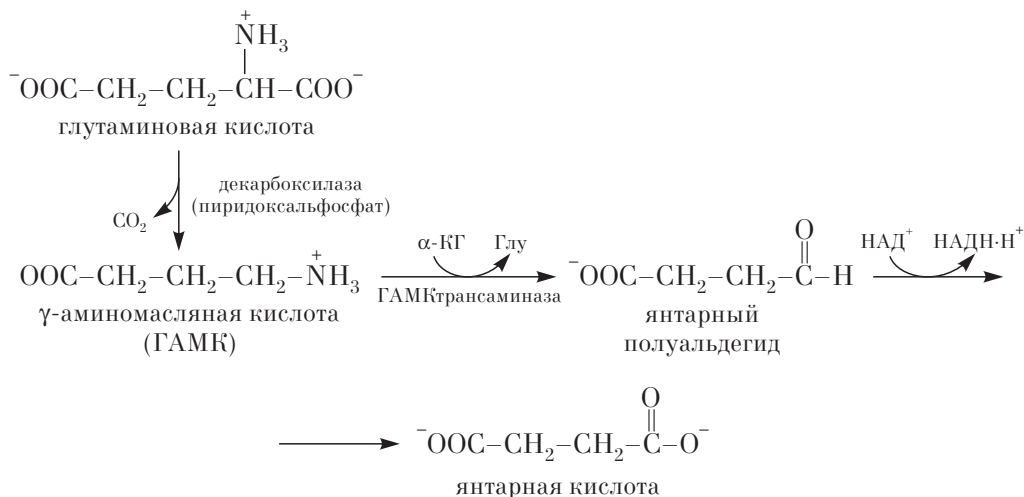


Рис. 9.21. Синтез и распад ГАМК

Одновременно является наиболее распространенным возбуждающим нейромедиатором в нервной системе позвоночных. При ее декарбоксилировании образуется γ -аминомасляная кислота (ГАМК) (рис. 9.21).

От 10 до 40 % нейронов коры, гиппокампа и черной субстанции используют ГАМК в качестве медиатора торможения. Существует несколько семейств рецептора ГАМК, но все они представляют собой лигандзависимые ионные каналы, построенные из пяти субъединиц (гетеропентамеры). После связывания рецептора с ГАМК происходит раскрытие канала и выход ионов хлора, что вызывает стойкую гиперполяризацию нейрона и торможение передачи потенциала действия.

Помимо участка связывания ГАМК, в рецепторе имеется несколько аллостерических центров, позволяющих связывать разные модуляторы (рис. 9.22). Известно большое количество молекул, способных после связывания модулировать активность рецептора.

Модуляторами с потенцирующим (усиливающим) действием ГАМК являются снотворные средства (бензодиазепины, барбитураты), этанол, нейроактивные стероиды (класс эндогенных стероидов, синтезируемых в мозге, надпочечниках, гонадах и способных быстро воздействовать на нейрональную активность), с ингибирующим эффектом — ионы Zn^{2+} .

Агонистами рецептора, помимо ГАМК, являются мусцинол, габоксадол, иботеновая кислота (вещества, выделенные из мухоморов и вызывающие галлюцинации). Антагонист ГАМК — бикикулин выделен из растительных тканей. Его введение может имитировать эпилепсию.

ГАМК в виде препаратов *гаммалон* или *аминалон* применяют при сосудистых заболеваниях головного мозга (атеросклероз, гипертония), нарушениях мозгового кровообращения, умственной отсталости, эндогенных депрессиях

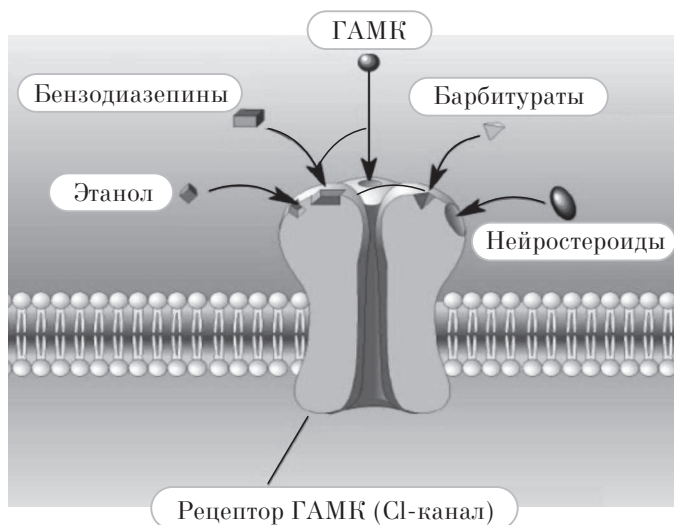


Рис. 9.22. Рецептор ГАМК и его некоторые агонисты

и травмах головного мозга, а также при заболеваниях ЦНС, связанных с резким возбуждением коры мозга (например, эпилепсия).

Разрушение ГАМК катализируется трансаминазой (ГАМК-трансаминазой). Многие седативные средства — ингибиторы этой трансаминазы.

Гистамин синтезируется путем декарбоксилирования гистидина при участии гистидиндекарбоксилазы (рис. 9.23). Основное место синтеза — тучные клетки и некоторые клетки белой крови (базофилы и эозинофилы). Кроме того, он синтезируется нейронами мозга, где выполняет функцию нейромедиатора, и энтерохромафинными клетками желудка. Образовавшийся гистамин в комплексе с белками содержится в секреторных гранулах.

Наиболее частой причиной высвобождения гистамина из гранул являются иммунологические реакции. IgE связывается со специфическими рецепторными белками на поверхности тучных клеток в тканях и базофильных лейкоцитов в крови. Подобные комплексы, в свою очередь, могут служить рецепторами для антигенов. Присоединение к ним антигенов усиливает секрецию гистамина, который вызывает расширение кровеносных сосудов, увеличение их проницаемости, что лежит в основе клинических проявлений таких аллергических реакций, как сенная лихорадка, астма и крапивница.



Рис. 9.23. Синтез гистамина из гистидина

Некоторые амины и алкалоиды, включая такие препараты, как морфий, алкалоиды кураре, могут способствовать выделению гистамина. Антибиотики типа полимиксина также стимулируют секрецию гистамина.

В мембранах клеток сосредоточены четыре типа рецепторов гистамина (H_1-H_4), которые относятся к рецепторам, ассоциированным с G-белками.

Конечный эффект действия гистамина зависит от типа рецептора и особенностей сигнальных систем клеток, содержащих эти рецепторы. Многие эффекты гистамина обусловлены его взаимодействием с H_1 -рецепторами. Эти рецепторы обнаружены в нервной системе, кровеносных сосудах и гладких мышцах. Локальная инъекция гистамина вызывает у людей боль и зуд, а если его ввести в кровоток, наблюдается выраженный сосудорасширяющий эффект, который ответствен также за снижение артериального давления (коллапс) и покраснение кожи. Гистамин вызывает увеличение сосудистой проницаемости, что приводит к локальному отеку тканей. Гистамин, высвобождаемый местно из тучных клеток, участвует в возникновении симптомов аллергических кожных заболеваний (экзема, крапивницы) и аллергических ринитов, а системное высвобождение гистамина связывают с развитием анафилактической реакции.

К эффектам, связанным с H_1 -рецепторами, относятся также сужение просвета дыхательных путей, затруднение дыхания вплоть до удушья и сокращение гладких мышц желудочно-кишечного тракта.

Основным эффектом влияния гистамина на H_2 -рецепторы является секреция кислоты в желудке. Это связано с тем, что основное количество H_2 -рецепторов расположено в желудке, где их активация является частью конечного эффекта, приводящего к секреции H^+ . Кроме того, H_2 -рецепторы есть также в сердце, где их активация путем повышения цАМФ может увеличивать сократимость миокарда, частоту сердечных сокращений и проводимость в атрио-вентрикулярном узле.

Широкое распространение заболеваний, сопровождающихся повышением уровня гистамина, вызвало необходимость поиска и создания антигистаминных препаратов. Первый такой препарат (*фенбензамин*) был синтезирован в 1942 г. К настоящему времени выпускаются антигистаминные препараты уже четвертого поколения. Первые антигистаминные препараты обладали широким и неспецифическим механизмом действия и вызывали многочисленные побочные эффекты (*димедрол*, *супрастин* и др.). Они использовались в качестве противорвотных (*меклозин*), седативных и снотворных средств. Побочными действиями таких препаратов являются сонливость, сухость во рту, запоры. Новые средства (препараты второго поколения) не проникают в ЦНС, поэтому не обладают седативным эффектом и не оказывают атропиноподобное действие. К этой группе относятся *цетиризин*, *лоратадин* и др. Препараты третьего поколения, сохранив специфичность эффекта действия, оказывают свое влияние на рецепторы после предварительного образования активных форм из неактивных предшественников и не способны проникать через гематоэнцефалический

барьер, что уменьшает вероятность возникновения побочных эффектов их влияния на головной мозг.

H₂-Антигистаминные препараты блокируют секрецию желудочного сока и применяются в качестве противозачаточных средств. Первый представитель данной группы — *циметидин* может изменять действие других лекарств, так как ингибирует цитохромоксидазу печени. Местно применяется группа стабилизаторов тучных клеток, которая блокирует выброс гистамина и других медиаторов тучных клеток при аллергических реакциях.

Серотонин синтезируется из 5-гидрокситриптофана, образующегося из триптофана. Эту реакцию катализирует гидроксилаза ароматических аминокислот. В качестве донора ионов водорода этот фермент использует тетрагидробиоптерин, а ионы железа обеспечивают присоединение атома кислорода к молекуле триптофана (рис. 9.24). Этот фермент катализирует также гидроксилирование фенилаланина в тирозин и тирозина в диоксифенилаланин (ДОФА).

У человека 90 % серотонина содержится в энтерохромаффинных клетках слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Остальное количество находится в тромбоцитах и ЦНС.

Серотонинергическая нейрональная система представлена многочисленными нейронами ядер центрального серого вещества, шва ствола и среднего мозга и широкой сетью аксонов, проецирующихся в различные структуры головного и спинного мозга. Эти структуры ЦНС традиционно рассматриваются как одно из главных звеньев эндогенной болеутоляющей системы. Кроме того, серотонинергическая система принимает участие в регуляции поведения, эмоций, аппетита, температуры тела.

Рецепторы серотонина относятся к группе рецепторов, ассоциированных с тримерными G-белками, и встречаются в разных клетках. Появление лекарственных препаратов — селективных агонистов и антагонистов рецепторов 5-гидрокситриптофана — значительно повысило эффективность лечения депрессии, тревожных состояний, тошноты, рвоты, головной боли.

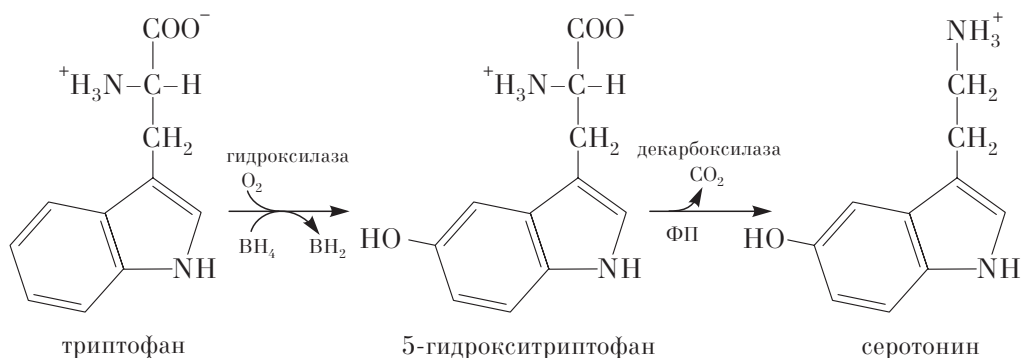
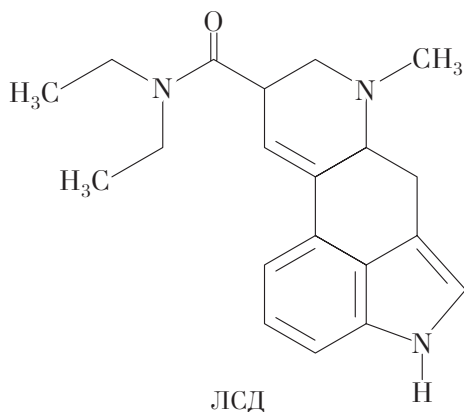


Рис. 9.24. Синтез серотонина из триптофана:

BH₄ — тетрагидробиоптерин; BH₂ — дигидробиоптерин; ФП — фосфопиридоксаль

Серотонин усиливает агрегацию тромбоцитов (кровь свертывается быстрее); участвует в воспалительной реакции (повышает проницаемость сосудов, усиливает миграцию лейкоцитов в очаг воспаления; усиливает выделение других медиаторов аллергии и воспаления); усиливает секрецию и перистальтику в ЖКТ; является стимулятором роста для некоторых бактерий кишечной флоры (при дисбактериозе образуется меньше серотонина); является причиной тошноты, рвоты и диареи при химиотерапии злокачественных опухолей (из-за массивного выхода серотонина из гибнущих клеток слизистой желудка и кишечника); участвует в регуляции сократимости матки и маточных труб и в координации родов.

Антагонистом рецепторов серотонина является диэтиламид *d*-лизергиновой кислоты (ЛСД), обладающий психотропным действием.



Стимуляторы серотониновых рецепторов в кровеносных сосудах головного мозга (*суматриптан*, *ризатриптан*, *элетриптан*, *золмитриптан* и др.) вызывают их сокращение и уменьшение головной боли. Блокаторы серотониновых рецепторов в головном мозге (*границетрон*, *ондансетрон*, *трописетрон*) применяются для подавления тошноты и рвоты при лечении злокачественных опухолей и после хирургических операций. В кардиологии в качестве гипотензивных средств применяются блокаторы серотониновых рецепторов *кетансерин* (*сульфрексал*) и *урапидил* (*эбрантил*).

Реакции декарбоксилирования аминокислот с участием активной формы витамина В₆ используются и в синтезе **катехоламинов**. К этой группе соединений относятся дофамин, норадреналин и адреналин. Основным субстратом для их образования служит тирозин, который, в свою очередь, может синтезироваться из фенилаланина. Реакции образования тирозина из фенилаланина и первая реакция превращения тирозина на пути синтеза катехоламинов катализируются гидроксилазами, коферментом которых является тетрагидробиоптерин, а кофактором — ионы Fe²⁺, и протекают по единому механизму. Тетрагидробиоптерин в результате реакции превращается в дигидробиоптерин,

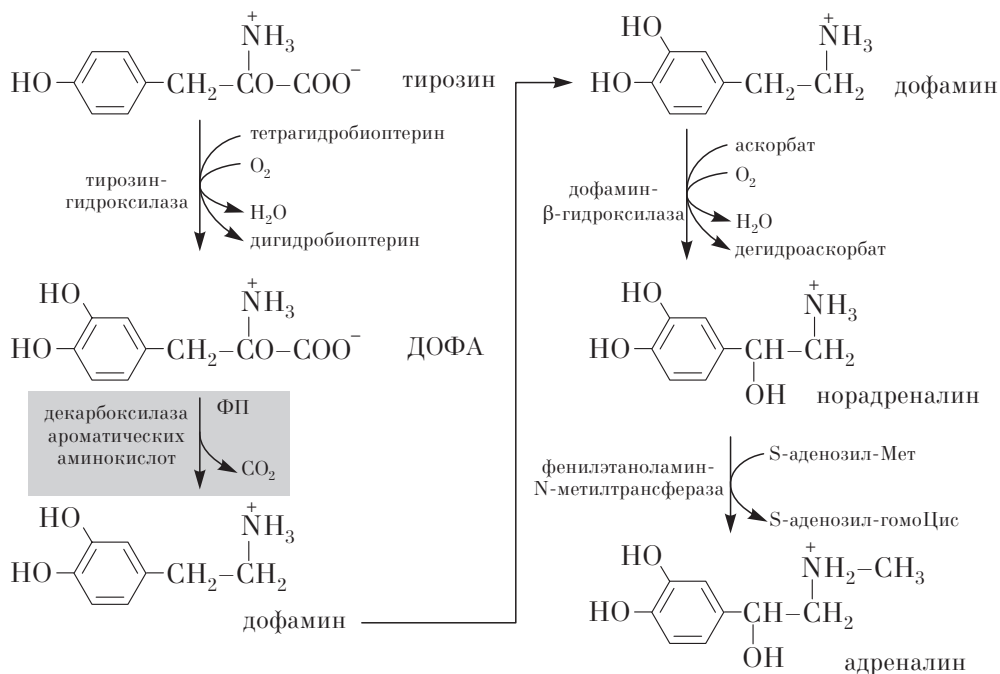


Рис. 9.25. Реакции синтеза катехоламинов (ФП — фосфопиридоксаль)

а его восстановление катализируется дигидробиоптеринредуктазой, коферментом которой служит НАДФН·Н⁺ (рис. 9.25).

Тирозингидроксилаза найдена только в надпочечниках и катехоламинергических нейронах (преимущественно в их нервных окончаниях). Этот фермент определяет скорость синтеза катехоламинов.

Дофамин — важный нейромедиатор среднего отдела мозга, нейроны которого управляют движениями. Эффекты дофамина обеспечиваются его взаимодействием со специфическими рецепторами, относящимися к группе рецепторов, ассоциированных с G-белками. Известны два семейства таких рецепторов: D₁ и D₂.

В нейронах симпатической нервной системы дофамин может гидроксилироваться специфической гидроксилазой, коферментом которой служит аскорбиновая кислота, с образованием норадреналина.

Норадреналин — аллостерический ингибитор тирозингидроксилазы, а цАМФ-зависимая протеинкиназа активирует фермент путем его фосфорилирования, что повышает сродство фермента к тетрагидробиоптерину. Продукт гидроксилирования тирозина диоксифенилаланин (ДОФА) декарбоксилируется при участии фосфопиридоксала (ФП) с образованием дофамина.

Норадреналин — тормозной медиатор постганглионарных симпатических нейронов и возбуждающий медиатор в клетках гипоталамуса. В клетках мозгового слоя надпочечников норадреналин метилируется с участием S-аденозилметионина (SAM) и превращается в *адреналин*.

Норадреналин и адреналин действуют непосредственно на эффекторные органы через группу рецепторов, ассоциированных с G-белками. Известны два семейства таких рецепторов: α - и β -адренорецепторы. Более подробно о сигнальных путях с участием катехоламинов см. главу 13.

В целом катехоламины отвечают за биохимические реакции адаптации к острым стрессам, связанным с мышечной активностью, — реакция *«борьба или бегство»*:

- стимулируют липолиз и продукцию жирных кислот в жировой ткани для мышечной активности;
- стимулируют глюконеогенез и гликогенолиз, способствуя повышению уровня глюкозы в крови;
- стимулируют гликогенолиз в мышечных клетках;
- активируют протеолиз в лимфоидной ткани для обеспечения глюконеогенеза необходимыми субстратами (аминокислотами);
- тормозят анаболические процессы, способствуя уменьшению секреции инсулина.

Учитывая широкий спектр действия норадреналина и адреналина в процессах жизнедеятельности, в медицинской практике находит широкое применение бесчисленное множество адреноблокаторов и адреномиметиков.

9.13. Распад биогенных аминов и катехоламинов

Продолжительность пребывания нейромедиатора в синапсах зависит от скорости его разрушения и обратного захвата пресинаптическими клетками. Если в инактивации ГАМК принимает участие только специфическая трансминаза, то большинство других биогенных аминов инактивируются при помощи двух механизмов.

Норадреналин, серотонин, дофамин подвергаются окислительному дезаминированию, которое катализируется моноаминоксидазами (МАО) с коферментом ФАД. При этом образуются соответствующие альдегиды, окисляемые далее в кислоты, которые покидают организм с мочой (рис. 9.26).

Различают две изоформы МАО:

- МАО-А образуется исключительно в норадреналиновых нейронах, катализирует реакции с участием норадреналина, адреналина, серотонина, имеет низкое сродство к дофамину;
- МАО-В синтезируется в серотониновых нейронах, участвует в метаболизме дофамина.

Адреналин и гистамин чаще метилируются метилтрансферазами (катехол-О-метилтрансферазы — КОМТ) с участием активного метионина (SAM). Известны генетические варианты КОМТ: 108-Вал-КОМТ и 108-Мет-КОМТ (различия касаются только одной аминокислоты). Вариант 108-Мет-КОМТ ассоциируется с увеличенным риском нервно-психических заболеваний.

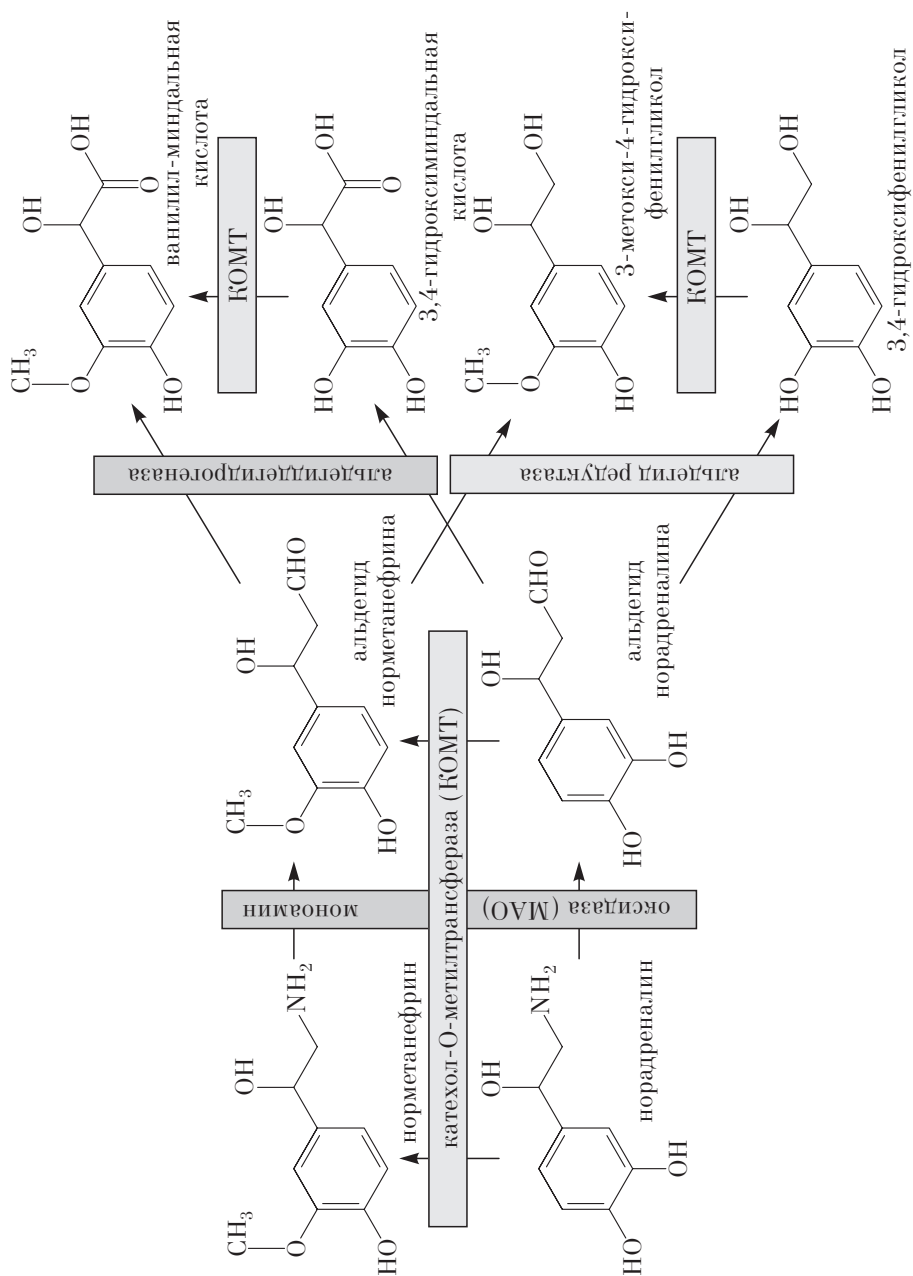


Рис. 9.26. Схема инактивации норэпинефрина

Ингибиторы МАО широко используются для лечения депрессивных состояний и паркинсонизма. Различают неселективные необратимые и селективные обратимые и необратимые ингибиторы.

Неселективные необратимые ингибиторы МАО улучшают общее состояние больных с депрессией и уменьшают приступы стенокардии.

Обратимые селективные ингибиторы МАО оказывают антидепрессивное и психоэнергизирующее действия, активно подавляют дезаминирование серотонина и норадреналина.

Необратимые селективные ингибиторы МАО используются в лечении паркинсонизма, оказывая влияние на метаболизм дофамина и катехоламинов.

Химия и обмен нуклеопротеинов

На протяжении многих лет механизмы метаболизма нуклеопротеинов были предметом исследований, направленных на создание лекарственных средств для вмешательства в такие процессы, как деление клетки, синтез и секреция белков, функционирование ряда кофакторов и т.д. Настоящая глава посвящена механизмам метаболизма нуклеопротеинов и их роли в процессах жизнедеятельности клеток.

10.1. Мономеры нуклеиновых кислот

Впервые нуклеиновую кислоту выделил Ф. Мишер в 1868 г. из клеток гноящейся раны. Он назвал это соединение *нуклеином*. В 1882 г. А. Коссель показал существование двух типов нуклеиновых кислот: РНК и ДНК, а к 1906 г. он выделил четыре азотистых основания, входящие в состав нуклеиновых кислот. В 1910 г. за эти открытия ему была присуждена Нобелевская премия.

С конца 1950-х гг. представления о строении и роли нуклеопротеинов углубились настолько, что было создано несколько направлений биологической науки (молекулярная биология, биотехнология, молекулярная генетика и т.д.), изучена последовательность нуклеотидов во всех молекулах ДНК человека. Стали понятны причины многих болезней, сделаны первые шаги в исправлении генетических дефектов. Исследуются механизмы деления клеток, ведется поиск средств лечения опухолей.

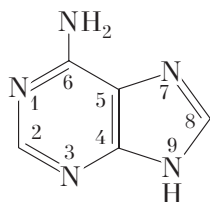
Дезоксирибонуклеопротеины (ДНП) сосредоточены главным образом в ядре клетки и в очень небольших количествах встречаются в цитозоле и митохондриях, а *рибонуклеопротеины (РНП)* выполняют свои функции преимущественно в цитозоле. И те, и другие в качестве небелкового компонента содержат нуклеиновые кислоты.

Подобно полисахаридам и белкам, нуклеиновые кислоты состоят из мономеров. Ими являются *мононуклеотиды*, которые, соединяясь друг с другом, формируют цепи олиго- и полинуклеотидов (нуклеиновых кислот). Большая часть нуклеиновых кислот связана с белками, образуя нуклеопротеины, которые расположены в разных частях клетки.

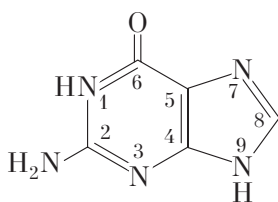
Мононуклеотид состоит из трех компонентов:

- 1) азотистого основания;
- 2) пентозы;
- 3) от 1 до 3 остатков фосфорной кислоты.

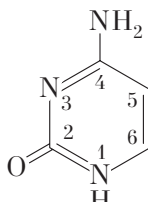
Среди множества азотистых оснований природа выбрала производные пурина — аденин (6-аминопурин) и гуанин (2-амино-6-оксопурин) — и производные пиримидина — цитозин (2-оксо-4-аминопиримидин), урацил (2,4-диоксопиримидин) и тимин (5-метилурацил).



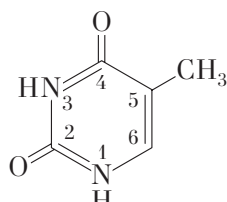
аденин (A)



гуанин (G)

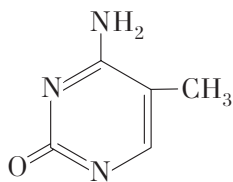


цитозин (C)

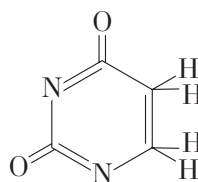


тимин (T)

Они называются главными, а большое число их производных, которые присутствуют в незначительных количествах, — минорными. К пуриновым минорным основаниям относятся инозин, N₆-метиладенин, N₂-метилгуанин, ксантин, гипоксантин, 7-метилгуанин и др. К пиримидиновым основаниям относятся 5-метил- и 5-окси-метилцитозин, дигидроурацил, 1-метилурацил, оротовая кислота, 5-карбоксиурацил, 4-тиоурацил и др.



5-метилцитозин



дигидроурацил

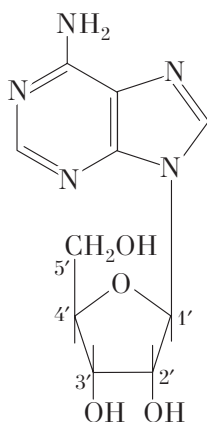
Метилированные основания выполняют защитную функцию, предохраняя молекулы нуклеиновых кислот от разрушения ферментами.

Все оксопроизводные азотистых оснований могут существовать в лактимной (енольной) и лактамной (кетонной) форме. При физиологических значениях pH превалирует лактамная форма.

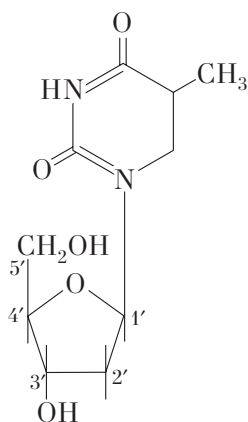
Азотистые основания поглощают свет в УФ-области спектра с максимумом при 260 нм. Это свойство используется для количественного определения нуклеиновых кислот.

Гетероциклические основания, связываясь с пентозой, образуют *нуклеозид*. Пентоза соединяется с азотистым основанием N-гликозидной связью, которая образуется между C₁-атомом пентозы и N₁-атомом пиримидина или N₉-атомом пурина (при нумерации атомов в составе азотистого основания используют

цифры 1, 2, 3 и т.д., в пентозе — 1', 2', 3' и т.д.). По свойствам нуклеозиды гидрофильны.



аденозин



2'-дезокситимидин

Название нуклеозидов складывается из названия азотистого основания, изменяя окончание у пуринов на **-озин**, а у пиримидинов — на **-идин**.

Если к гидроксильным группам пентоз нуклеозида присоединить остаток(ки) фосфорной кислоты, образуется *моонуклеотид*. В зависимости от числа имеющихся в молекуле нуклеотида остатков фосфорной кислоты различают моно-, ди- и трифосфаты нуклеозидов. Остатки фосфорной кислоты обозначаются соответственно α , β и γ . Введение β -остатка и γ -остатка повышает свободную энергию реакции гидролиза таких соединений до 50 кДж/моль (макроэрги). Это количество энергии сохраняется в нуклеозидтрифосфатах и может быть использовано для проведения сопряженных химических реакций, потребляющих энергию в клетке.

Название моонуклеотида состоит из названия нуклеозида, указания места присоединения и числа остатков фосфорной кислоты. В названии моонуклеотидов, содержащих дезоксирибозу, используется дополнительная приставка **дезокси-** или **д-** (табл. 10.1).

Таблица 10.1

Состав и номенклатура нуклеозидов и нуклеотидов

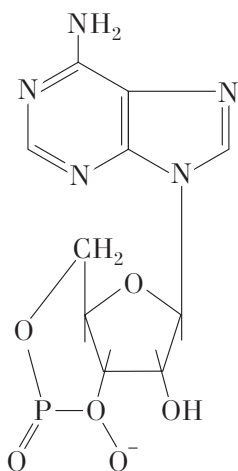
Азотистое основание	Нуклеозид (азотистое основание + рибоза или дезоксирибоза)	Нуклеотид (нуклеозид + Φ_n)
Аденин	Аденозин	Аденозинмонофосфат (АМФ), адениловая кислота
	Дезоксиаденозин (д-аденозин)	Дезоксиаденозинмонофосфат (дАМФ)
Гуанин	Гуанозин	Гуанозинмонофосфат (ГМФ), гуаниловая кислота
	Дезоксигуанозин (д-гуанозин)	Дезоксигуанозинмонофосфат (дГМФ)

Окончание табл. 10.1

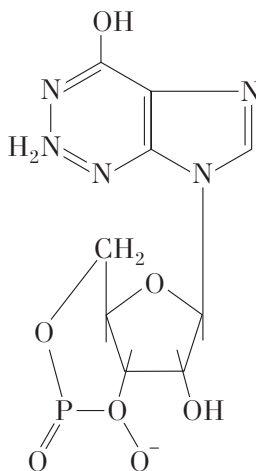
Азотистое основание	Нуклеозид (азотистое основание + рибоза или дезоксирибоза)	Нуклеотид (нуклеозид + Φ_n)
Урацил	Уридин	Уридинмонофосфат (УМФ), уридиловая кислота
Тимин	Дезокситимидин (д-тимидин)	Дезокситимидинмонофосфат (дТМФ)
Цитозин	Цитидин	Цитидинмонофосфат (ЦМФ), цитидиловая кислота
	Дезоксицитидин (д-цитидин)	Дезоксицитидинмонофосфат (дЦМФ)
Гипоксантин	Инозин	Инозинмонофосфат (ИМФ), инозиновая кислота

Мононуклеотиды выполняют специфические функции. Во-первых, они используются в качестве субстратов для синтеза рибонуклеиновой кислоты (АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ). Во-вторых, входят в состав ряда коферментов: НАД(Ф), ФАД, КоА-SH, 5-деоксиаденозилкобаламина. В-третьих, участвуют в реакциях запасания и использования энергии (АТФ, ГТФ, УТФ и т.д.) и являются аллостерическими регуляторами активности ферментов. Нуклеотиды также используются для образования активных форм углеводов (УДФ-глюкозы, ГДФ-маннозы), азотистых оснований (ЦДФ-холина), сульфата (ФАФС) и метионина (SAM).

При образовании еще одной фосфоэфирной связи между гидроксильной группой 3'-углеродного атома рибозы и OH-группой фосфорной кислоты образуется **циклический мононуклеотид** (цАМФ, цГМФ). Циклическим его называют потому, что остаток фосфата замыкает кольцо между 3' и 5' атомами одной и той же пентозы.



циклический 3',5'-АМФ (цАМФ)



циклический 3',5'-ГМФ (цГМФ)

Циклические мононуклеотиды образуются при помощи специальных ферментов — нуклеотидциклаз — из соответствующих нуклеозидтрифосфатов. Основными функциями циклических нуклеотидов являются передача и усиление молекулярного сигнала при действии гормонов, цитокинов и др.

Дидезоксинуклеотиды нашли широкое использование в исследовании первичной структуры ДНК. В состав таких мононуклеотидов вместо обычной дезоксирибозы (2-дезоксирибозы) входит 2,3-дидезоксирибоза. При использовании дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов в искусственной системе синтеза ДНК они останавливают ее синтез.

10.2. Структура нуклеиновых кислот

При соединении мононуклеотидов при помощи **фосфодиэфирной связи** между 3'-углеродным атомом пентозы одного нуклеотида и 5'-углеродным атомом пентозы другого образуются **полинуклеотиды**. Их молекулярная масса может достигать десятков миллионов.

Молекулы полинуклеотидов имеют **нитевидную структуру**. В основе этих нитей лежит однообразно повторяющаяся последовательность из пентозы и остатка фосфорной кислоты, а основания, подобно радикалам аминокислот в полипептиде, находятся на внешней части цепей. Как и у белков, последовательность чередования мононуклеотидов в молекуле называют **первичной структурой полинуклеотида (нуклеиновой кислоты)** (рис. 10.1).

Соединение мононуклеотидов в клетке катализируется **полимеразами**. Эти ферменты для образования нуклеиновых кислот в качестве субстратов используют нуклеозидтрифосфаты.

В молекуле нуклеиновых кислот присутствуют следующие связи: 5'-фосфоэфирная, N-гликозидная и 3',5'-фосфодиэфирная.

В зависимости от вида пентозы и типа азотистых оснований различают два типа нуклеиновых кислот: **дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)** и **рибонуклеиновая кислота (РНК)** (табл. 10.2).

Таблица 10.2

Особенности нуклеиновых кислот

Признак	ДНК	РНК
Месторасположение в клетке	Ядро, небольшое количество в цитозоле	Цитозоль, небольшое количество в ядре
Сахар	Дезоксирибоза	Рибоза
Главные основания	А, Г, Ц, Т	А, Г, Ц, У
Молекулярная масса	Более 10^9	$2 \times (10^5 - 10^9)$
Функция	Хранение и передача генетической информации	Синтез белков
Форма вторичной структуры молекулы	Двойная спираль	Одноцепочечная молекула

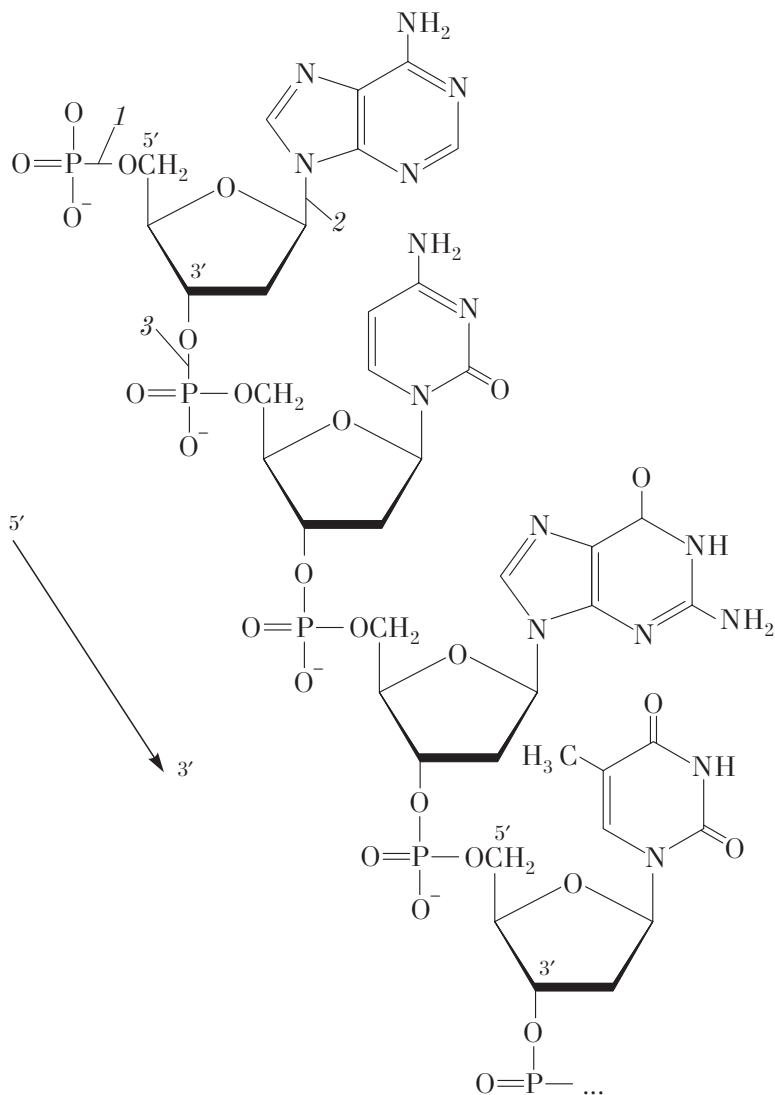


Рис. 10.1. Первичная структура участка молекулы нуклеиновых кислот:
 1 — 5'-фосфоэфирная связь; 2 — N-гликозидная связь; 3 — 3',5'-фосфодиэфирная связь

10.2.1. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)

Общие представления о пространственной организации молекул полинуклеотидных цепей в молекуле ДНК были разработаны к 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком. Они предложили модель *вторичной структуры ДНК*, образно названную «двойная спираль». На уровне вторичной структуры молекула ДНК

представляет собой двухнитевую спираль, образованную полинуклеотидными цепями, расположенными *антипараллельно*. Это означает, что на каждом конце молекулы ДНК всегда будут находиться 5'-конец одной цепи и 3'-конец другой.

Эти две полинуклеотидные цепи соединяются между собой при помощи водородных связей, образующихся между азотистыми основаниями расположенных рядом цепей. Цепи не идентичны. Основания расположены таким образом, что они пространственно дополняют друг друга (*принцип комплементарности*): порядок чередования нуклеотидов одной цепи определяет порядок чередования другой (рис. 10.2). Количество адениловых нуклеотидов равно количеству тимидиловых нуклеотидов (А–Т), а гуаниловых — количеству цитидиловых (Г–Ц). *Соотношение (А–Т)/(Г–Ц) — величина постоянная и является видоспецифической характеристикой организма (правило Чаргаффа).*

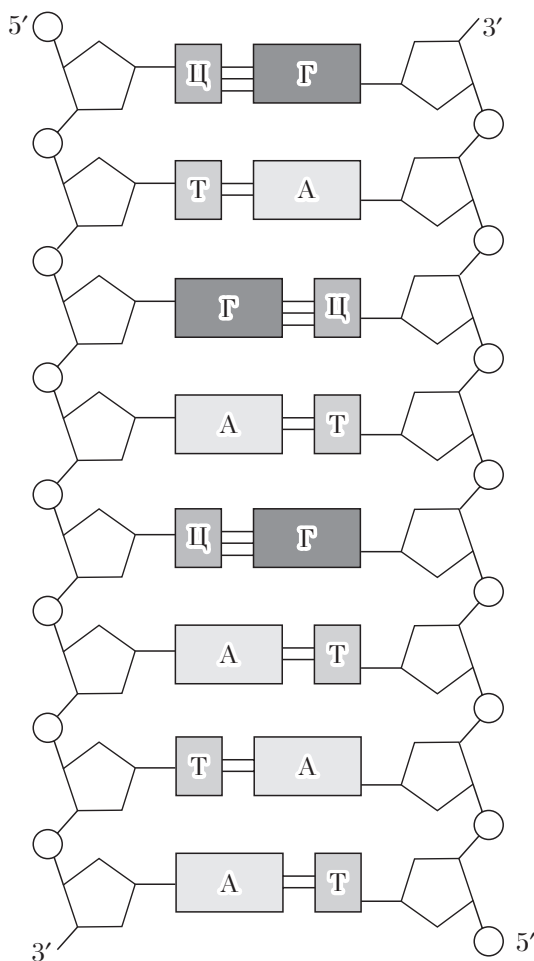


Рис. 10.2. Вторичная структура ДНК

При таком расположении достигается важное условие стабильности макромолекулы — максимум водородных связей.

Азотистые основания каждой цепи обращены внутрь молекулы и лежат в одной плоскости, перпендикулярной оси молекулы, формируя структуры, напоминающие монетные столбики. Между основаниями каждого столбика возникают силы гидрофобного взаимодействия, которые вносят дополнительный вклад в стабилизацию молекулы ДНК.

Подобно белковой молекуле, ДНК можно денатурировать. Денатурация (плавление) вызывается нагреванием, действием факторов, нарушающих водородные связи, и другими способами. Каждая молекула ДНК может распадаться на составные цепи при нагревании ее раствора до определенной для нее температуры. Это зависит от количественного соотношения А–Т- и Г–Ц-пар. ДНК, содержащие больше Г–Ц пар, денатурируют при более высокой температуре, так как эта пара образует больше водородных связей (три), чем пара А–Т (две). При медленном охлаждении (отжиг) две цепи вновь вступают во взаимодействие, формируя двойную спираль. Скорость объединения зависит от степени схожести объединяемых цепей друг с другом.

Человеческий диплоидный геном состоит приблизительно из $3,2 \times 10^9$ пар азотистых оснований. Если их соединить конец к концу, то получится молекула длиной примерно 2 м (расстояние между основаниями 0,34 нм). При формировании хромосом длина молекулы ДНК сокращается в 8–10 тыс. раз. Каждая молекула ДНК упаковывается при участии белков в отдельную хромосому. Хромосомы формируются в период деления клетки, а в период покоя комплексы ДНК с белками равномерно распределены по ядру в форме *хроматина*. В составе хроматина можно выделить гистоновые и негистоновые белки.

Основную роль в формировании пространственной структуры ДНК играют *гистоны*. Они богаты основными аминокислотами (лизин и аргинин) с М.М. от 11 до 22 тыс. а.е.м. Различают несколько типов гистонов: Н1, Н2А, Н2В, Н3 и Н4. Все они принимают участие в образовании третичной структуры ДНК — *нуклеосом*. Суть процесса состоит в том, что двухспиральная молекула ДНК образует несколько витков (150–200 пар оснований) вокруг белковой глобулы, состоящей из четырех пар гистонов Н2А, Н2В, Н3 и Н4. Гистон Н1 связывается с участком ДНК (линкерная ДНК), соединяющим соседние нуклеосомы (рис. 10.3).

Группа нуклеосом формирует фибриллы ДНК. Около 6 таких фибрилл сворачиваются с образованием нитей хроматина, диаметр которых составляет около 30 нм. Нити хроматина стабилизируются гистонами и укладываются в структуры более высокого порядка.

Помимо гистонов, в структуре хроматина находится большое число разнообразных негистоновых белков. Многие из них — факторы транскрипции, которые могут специфически связываться с отдельными участками молекул ДНК. В структуре таких белков есть специфические домены типа «цинковых

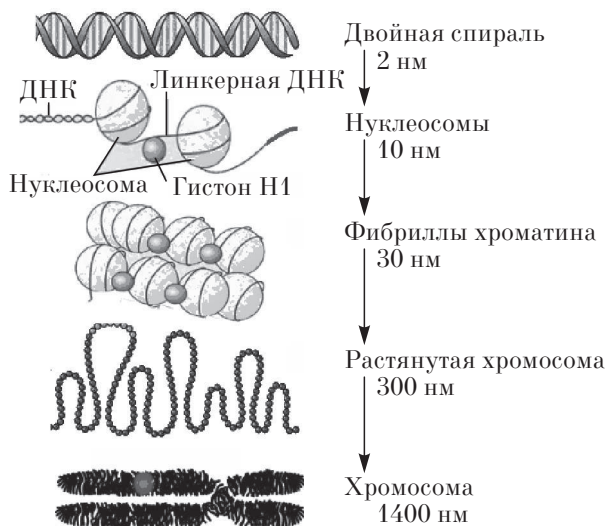


Рис. 10.3. Пространственная структура ДНК

пальцев» или «спираль — поворот — спираль», позволяющие проникать в бороздки ДНК и взаимодействовать с определенными последовательностями оснований. К негистоновым белкам относятся ферменты репликации, транскрипции и репарации.

Различают две формы хроматина: *гетерохроматин* и *эухроматин*. Первый более плотно упакован, часто находится около центромеров хромосом и довольно редко транскрибируется. Эухроматин упакован менее плотно и активно транскрибируется.

Есть два первичных механизма, способных динамично влиять на структуру хроматина. Один из них заключается в метилировании остатков цитозина в ДНК, другой — в модификации гистонов. Метилирование происходит непосредственно после репликации ДНК под действием специфических метилтрансфераз. Оно важно в механизмах регуляции транскрипции. К метилированным цитозинам легко присоединяется специфический белок, что тормозит транскрипцию этих участков ДНК. Фосфорилирование такого белка снижает его способность связываться с метилированным основанием и запускает транскрипцию.

Гистоны могут подвергаться ацетилированию, убиквитилированию, метилированию, фосфорилированию. Такие модификации также влияют на структуру хроматина и его транскрипционную активность.

10.2.2. Рибонуклеиновые кислоты (РНК), их типы

Из клеток можно выделить несколько типов РНК, которые различаются функцией, структурой, локализацией в клетке и размерами (табл. 10.3).

Таблица 10.3

Основные типы РНК клеток, участвующих в транскрипции и трансляции

Тип РНК	Функция
иРНК	Информационная РНК, кодирование белков
рРНК	Рибосомная РНК, формирует основу структуры рибосом и участвует в синтезе белков
тРНК	Транспортная РНК, участвует в механизмах рекогниции, является адаптором между иРНК и аминокислотами
мяРНК	Малая ядерная РНК, участвует в разных ядерных процессах, включая сплайсинг пре-иРНК
мядрРНК	Малая ядрышковая РНК, участвует в процессинге и химической модификации рРНК
миРНК	МикроРНК, регулирует экспрессию генов, блокируя трансляцию специфических иРНК и способствует их распаду

Около 80 % всей клеточной РНК находится в цитозоле в составе рибосом — *рибосомная РНК (рРНК)*. У эукариот рибосомы цитозоля содержат несколько типов рРНК (рис. 10.4), которые различаются константой седиментации (скоростью их оседания при ультрацентрифугировании, выражается в единицах Сведберга — S). Пространственная структура рРНК формируется при участии связанных с молекулами РНК белков. Вся рибосома состоит из двух субъединиц с общей константой седиментации в 80S. Рибосомы есть и в митохондриях. Их строение напоминает строение рибосом прокариот (рис. 10.4).

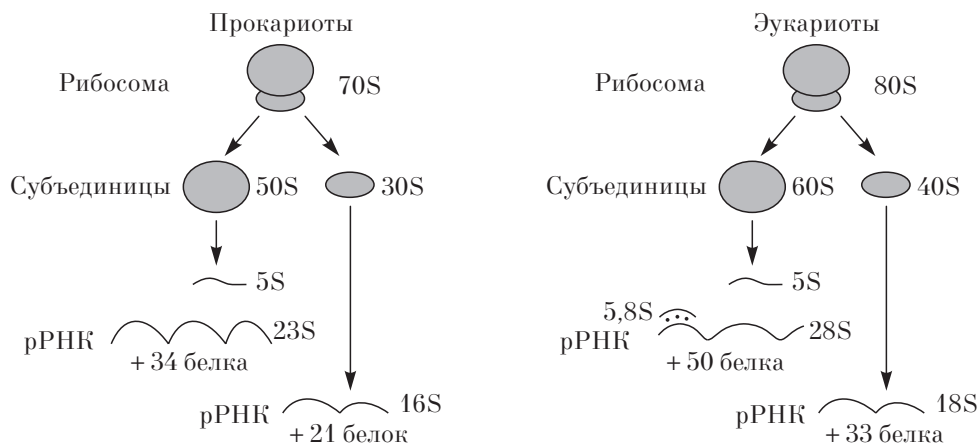


Рис. 10.4. Строение рибосом

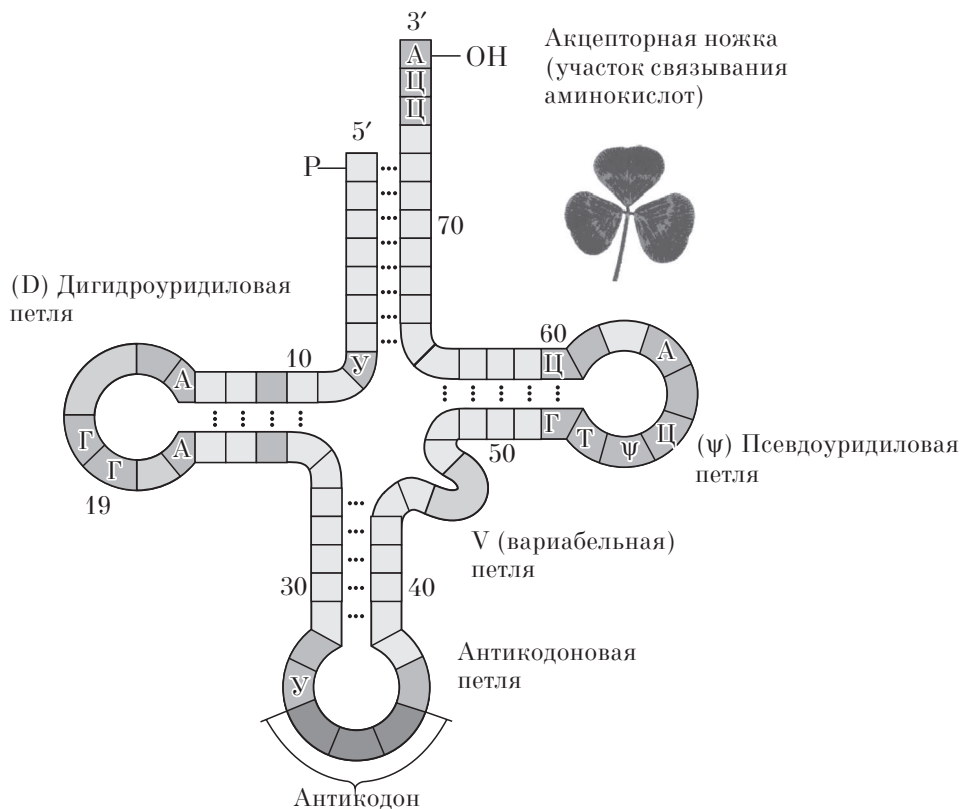


Рис. 10.5. Вторичная структура тРНК

Матричная, или информационная, РНК (иРНК) составляет 2–4 % всей РНК-клетки. Разнообразие первичных структур таких РНК связано с тем, что они представляют копии отдельных участков ДНК, несущих информацию о белках клетки. Они играют роль матриц для синтеза белков и быстро разрушаются.

Около 15 % всей РНК клетки — *транспортные РНК* (тРНК). Эти небольшие по размерам (около 80 нуклеотидов) молекулы участвуют в переносе аминокислот и выполняют адапторную функцию. Адапторная функция заключается в том, что 3'-конец молекулы связывается с аминокислотой, а антикодоновая петля — с мРНК, что позволяет считывать информацию, кодируемую последовательностью нуклеотидов мРНК. Известно около 60 типов тРНК. Это достаточно стабильные молекулы. Вторичная структура тРНК приведена на рис. 10.5.

Малые РНК составляют приблизительно 1–2 % всей РНК в клетке. Известно около 30 различных вариантов таких РНК.

10.3. Переваривание нуклеиновых кислот

Пищевые нуклеопротеины, попадая в организм человека, в желудке расщепляются на белковый компонент и полинуклеотидную часть. Белки под действием HCl желудочного сока денатурируют, а полинуклеотидный компонент подвергается ферментативному гидролизу в кишечнике до мононуклеотидов (рис. 10.6).

В расщеплении нуклеиновых кислот принимают участие ДНКазы и РНКазы панкреатического сока, которые, будучи эндонуклеазами, гидролизуют макромолекулы до олигонуклеотидов. Последние под действием фосфодиэстераз панкреатической железы расщепляются до смеси 3'- и 5'-мононуклеотидов.

Нуклеотидазы и неспецифические фосфатазы гидролитически отщепляют фосфатный остаток нуклеотидов и превращают их в нуклеозиды, которые либо перемещаются в клетки тонкого кишечника, либо расщепляются нуклеозидфосфорилазами кишечника с образованием рибозо- и дезоксирибозо-1-фосфата, пуриновых и пиримидиновых оснований.

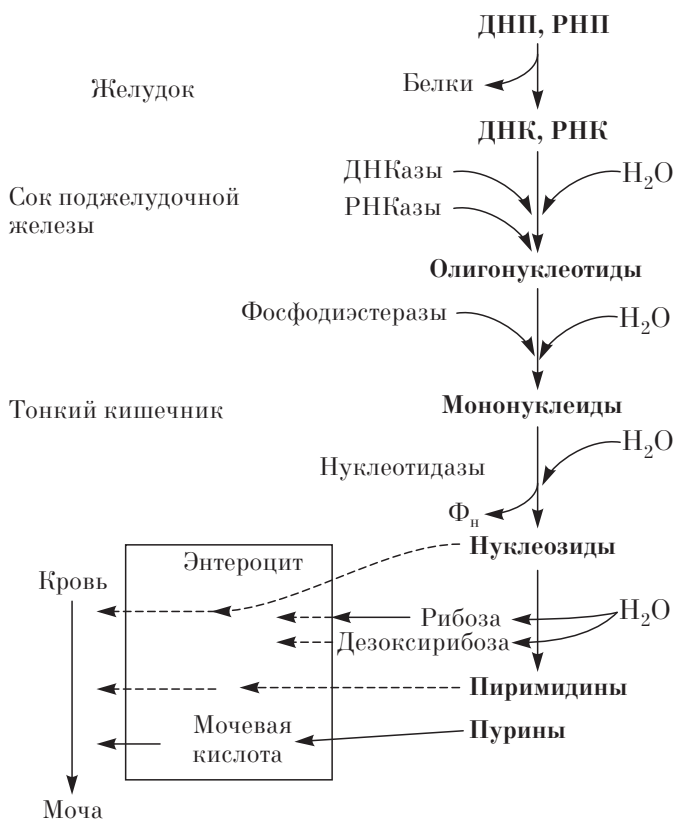


Рис. 10.6. Схема переваривания нуклеопротеинов пищи в желудочно-кишечном тракте

Пищевые пурины и пиримидины не являются незаменимыми пищевыми факторами и очень мало используются для синтеза нуклеиновых кислот тканей. В эритроцитах обнаружена высокая активность ксантиноксидазы — фермента, который превращает большую часть пуринов, поступающих в клетки, в мочевую кислоту — конечный продукт катаболизма.

10.4. Катаболизм пуриновых нуклеотидов

Пуриновые мононуклеотиды под влиянием фосфатаз (нуклеотидаз) превращаются в нуклеозиды. Аденозин дезаминируется при участии аденозиндезаминазы, превращаясь в инозин. Затем от инозина под влиянием нуклеозидфосфорилазы отщепляется пентоза и образуется гипоксантин. Гуанозин с участием нуклеозидфосфорилазы теряет пентозу и образующийся гуанин и, дезаминируясь гуаназой, превращается в ксантин. Гипоксантин и ксантин окисляются с участием кислорода в мочевую кислоту в реакциях, катализируемых ксантиноксидазой (рис. 10.7).

Мочевая кислота — конечный продукт катаболизма пуринов у человека, выделяется в основном почками и в небольших количествах кишечником. У здорового взрослого человека содержание мочевой кислоты в крови составляет 0,15–0,47 ммоль/л, за сутки с мочой выделяется 300–600 мг мочевой кислоты.

Нарушение обмена пуриновых нуклеотидов сопровождается, как правило, *гиперурикемией* — повышением содержания мочевой кислоты в крови. Хроническое повышение уровня мочевой кислоты в крови может быть следствием или повышенного образования пуринов, или снижения выделения мочевой кислоты.

Мочевая кислота плохо растворяется в биологических жидкостях и может кристаллизироваться в тканях (суставные хрящи, связки), вызывая воспалительные реакции и формирование подагрических бугорков или способствуя образованию камней в почках. Заболевание с поражением суставов называется **подагрой**. Ею страдают от 0,3 до 1,7 % людей, причем у мужчин она встречается в 20 раз чаще.

Различают первичную и вторичную подагру. *Первичная* генетически детерминирована и обусловлена дефектом синтетазы фосфорибозилпирофосфата. Измененный фермент теряет способность ингибироваться конечными продуктами синтеза нуклеотидов и проявляет высокую активность. Генетический дефект гипоксантин/гуанинфосфорибозилтрансферазы сопровождается снижением ее активности, что уменьшает реутилизацию оснований и ведет к повышению их распада до мочевой кислоты. Чтобы понять взаимосвязь выше-названных ферментов с накоплением мочевой кислоты в организме, нужно познакомиться с синтезом нуклеотидов (см. п. 10.6).

Вторичная подагра может развиваться как следствие повышенного распада клеток при некоторых заболеваниях (например, лейкозах).

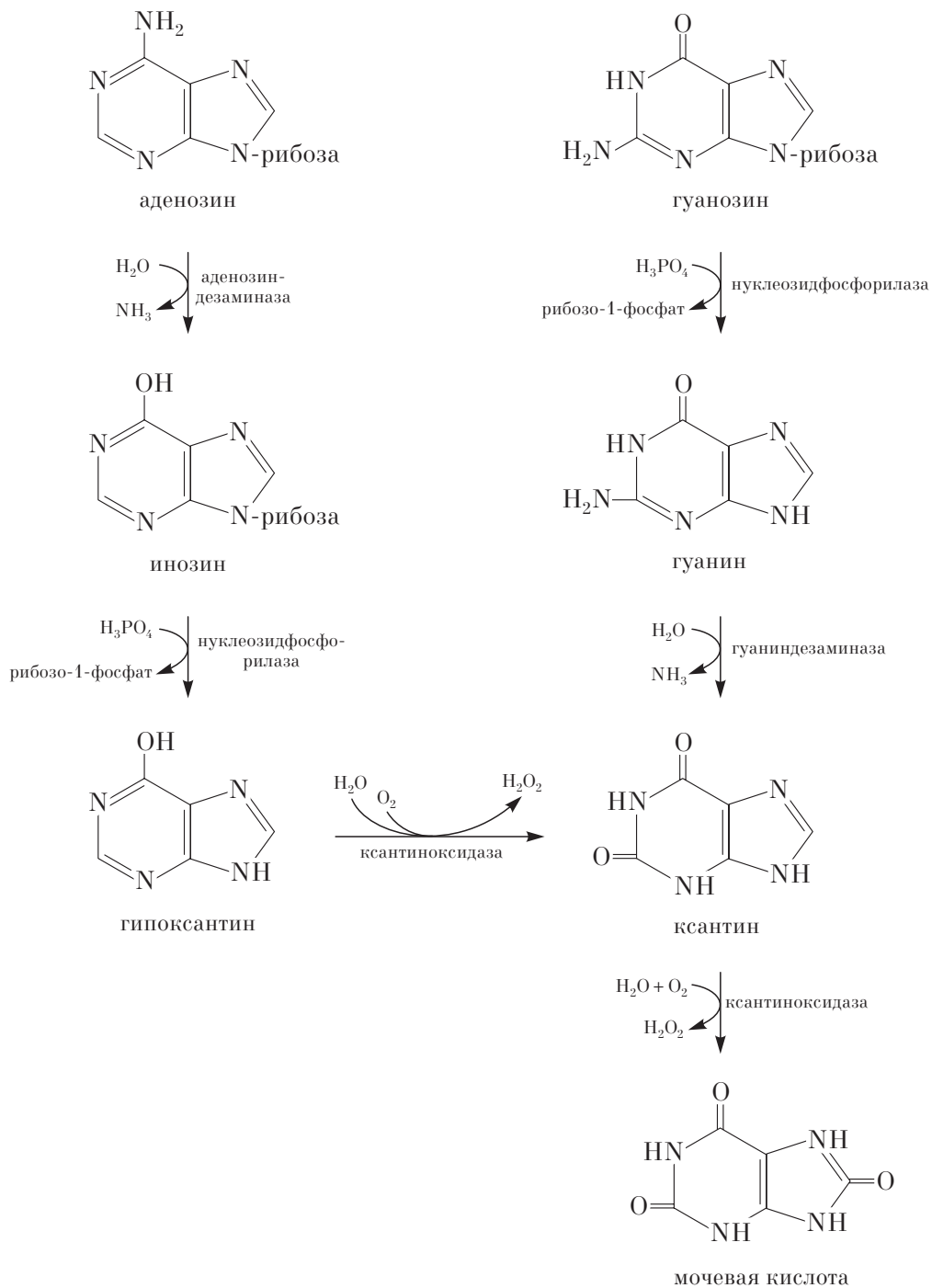
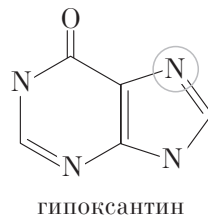
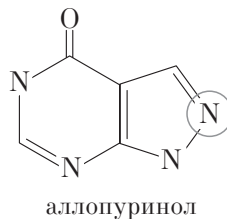


Рис. 10.7. Схема катаболизма пуриновых нуклеотидов

Для лечения подагры рекомендуются ограничение потребления продуктов, богатых пуринами, и лекарственная терапия, в которой ведущее место занимает использование аллопуринола — конкурентного ингибитора ксантиноксидазы.

Под влиянием ксантиноксидазы аллопуринол превращается в оксипуринол, который прочно связывается с активным центром фермента и останавливает превращение азотистых оснований на уровне гипоксантина и ксантина. Последние обладают более высокой растворимостью и выделяются почками. При этом снижается и образование мочевой кислоты.

Еще одно патологическое состояние — *синдром Лёша – Нихана* — развивается при полной потере активности гипоксантин/гуанинфосфорибозилтрансферазы. У детей наблюдаются неврологические и психические отклонения, вследствие кристаллизации солей мочевой кислоты в ткани почек развивается почечная недостаточность. Болезнь наследуется как рецессивный признак, сцепленный с X-хромосомой, и наблюдается только у мальчиков.



10.5. Катаболизм пиримидиновых нуклеотидов

Распад пиримидиновых нуклеотидов начинается с реакций отщепления фосфорной кислоты, а образующиеся нуклеозиды подвергаются ряду превращений с образованием конечных продуктов CO_2 , NH_3 и β -аминокислот (рис. 10.8, 10.9).

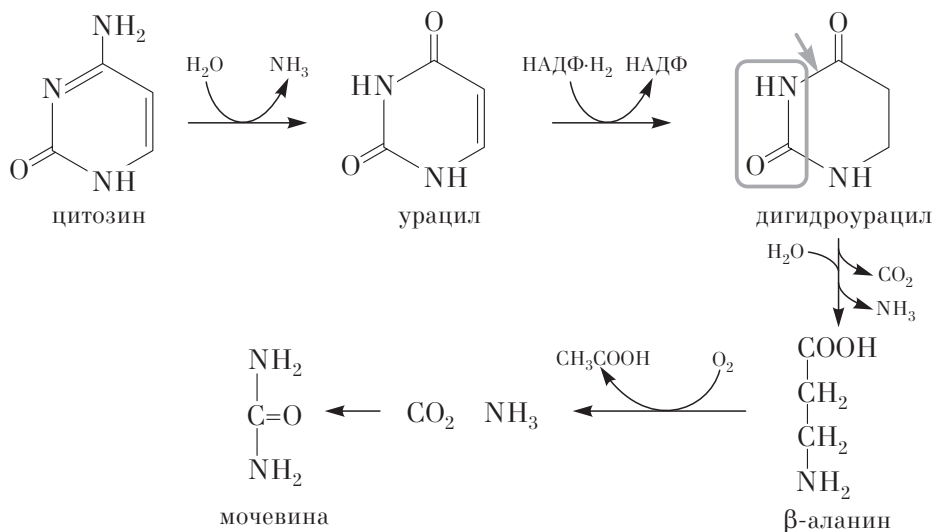


Рис. 10.8. Реакции катаболизма пиримидиновых азотистых оснований

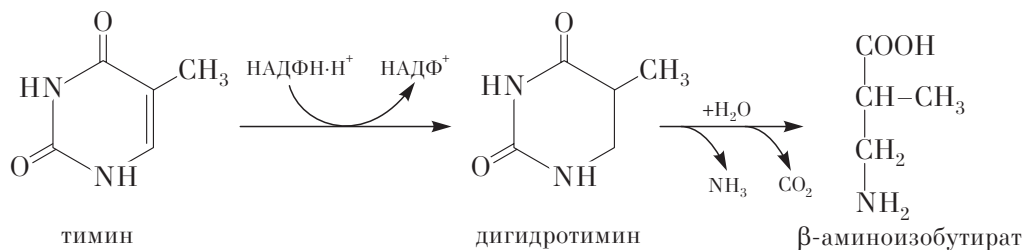


Рис. 10.9. Реакции катаболизма тимина

Продукты распада пиримидиновых нуклеотидов хорошо растворяются в воде, аммиак и CO_2 участвуют в реакциях синтеза мочевины, а аминокислоты используются (например, β-аланин — компонент мышечных дипептидов) или удаляются почками.

10.6. Биосинтез нуклеотидов

Известны два основных пути синтеза нуклеотидов:

1) реутилизация оснований и нуклеозидов для повторного синтеза нуклеотидов. Он имеет меньшее в количественном отношении значение (10–15 % всех реакций). Наиболее активно этот путь проходит в интенсивно размножающихся клетках (эмбриональных, регенерирующих, эпителиальных, опухолевых);

2) синтез нуклеотидов *de novo* (80–90 % всех реакций).

Если синтез *de novo* в основном протекает в печени, то в клетках других тканей пуриновые нуклеотиды могут синтезироваться из продуктов катаболизма нуклеотидов — азотистых оснований и нуклеозидов.

10.6.1. Пути повторного использования азотистых оснований и нуклеозидов

Использование пуриновых азотистых оснований катализируется двумя ферментами: аденинфосфорибозилтрансферазой (АФРТ) и гипоксантин/гуанинфосфорибозилтрансферазой (ГГФРТ). АФРТ обеспечивает присоединение фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ) к аденину, образуя АМФ. ГГФРТ катализирует присоединение ФРПФ или к гипоксантину (образуется ИМФ), или к гуанину (образуется ГМФ) (рис. 10.10).

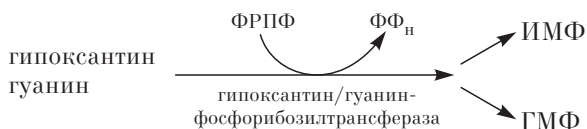


Рис. 10.10. Схема реутилизации гипоксантина и гуанина



Рис. 10.11. Схема реутилизации нуклеозидов

Эти ферменты предотвращают необратимое превращение гипоксантина, гуанина и аденина в мочевую кислоту и уменьшают ее образование, а также способствуют снижению синтеза нуклеотидов *de novo*, который потребляет большое количество энергии. О важности этих ферментов свидетельствуют последствия, связанные с их отсутствием или низкой активностью (см. с. 357).

Повторное использование нуклеозидов (аденозина и гуанозина) катализируется специфическими киназами пуриновых нуклеозидов (рис. 10.11).

Реутилизация пиримидиновых оснований протекает в два этапа. Вначале относительно неспецифическая фосфорилаза пиримидиновых нуклеозидов превращает основания в их нуклеозиды. Затем более специфические нуклеозидкиназы катализируют фосфорилирование нуклеозидов. Специфичная для тимина фосфорилаза катализирует взаимодействие тимина с дезоксирибозой, поэтому рибонуклеозиды, содержащие тимин, обычно не образуются. Специфичность киназ увеличивается по мере увеличения числа остатков фосфата в составе мононуклеотида. Этот путь малоэффективен из-за очень низкой концентрации оснований в плазме и тканях.

Ведущее место в реакциях обоих механизмов синтеза занимает ФРПФ, который образуется из продукта окислительной части пентозофосфатного пути (рибозо-5-фосфата) путем его фосфорилирования. Фосфорилирование рибозо-5-фосфата катализирует фосфорибозилпирофосфатсинтаза (рис. 10.12).

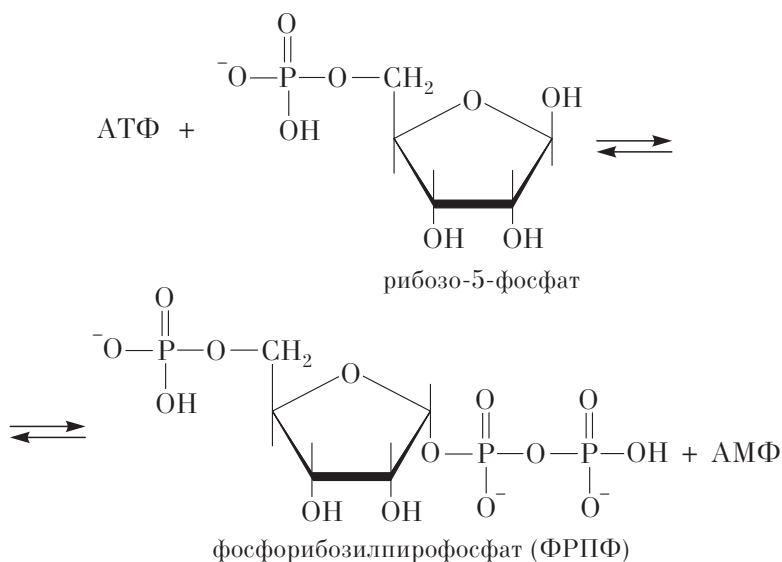


Рис. 10.12. Реакция образования 5-фосфорибозил-1-пирофосфата

10.6.2. Синтез пуриновых нуклеотидов *de novo*

Субстратами синтеза пуриновых нуклеотидов являются ФРПФ, аминокислоты (глицин, аспартат, глутамин) и одноуглеродные фрагменты, которые поставляются в форме N^5 -формилтетрагидроfolата, N^5, N^{10} -метенилтетрагидроfolата (ТГФК — тетрагидроfolиловая кислота, активная форма витамина B_9 , является переносчиком одноуглеродных фрагментов) и CO_2 .

Пуриновые нуклеотиды синтезируются в клетках большинства тканей. Однако основным местом их образования в организме является цитозольная часть гепатоцитов.

Синтез пуриновых нуклеотидов *de novo* — это сложный, потребляющий большое количество энергии (6 АТФ на каждую молекулу пуринового нуклеотида), многоступенчатый (10 этапов) путь, который можно условно разделить на две части. Вначале идет образование мононуклеотида — инозиновой кислоты (ИМФ). Она является предшественником основных пуриновых нуклеотидов. В качестве азотистого основания в ее составе выступает гипоксантин. Затем образуются основные пуриновые нуклеотиды — АМФ и ГМФ.

Синтез начинается с рибозо-5-фосфата, на ранних этапах синтеза образуется N-гликозидная связь, а затем формируется пуриновое кольцо. Ключевая реакция, лимитирующая скорость синтеза, — образование 5-фосфорибозил-1-амин. Она катализируется глутамин:фосфорибозилпирофосфатамидотрансферазой (рис. 10.13). При этом формируется β -N-гликозидная связь с N_9 будущего кольца пурина. Затем к аминогруппе 5-фосфорибозил-1-амин присоединяется остаток глицина, который полностью включается в кольцо (C_4 , C_5 и N_7). C_8 возникает из N^5, N^{10} -метенилтетрагидроfolата, N_3 и N_9 — из глутамин, C_6 — из CO_2 , N_1 — из аспартата, C_2 — из формилтетрагидроfolата (рис. 10.14).

Образующийся в первом этапе инозинмонофосфат (ИМФ) служит точкой ветвления, от которой отходят пути синтеза АМФ и ГМФ (рис. 10.15). Для образования АМФ аспартат взаимодействует с ИМФ, образуя аденилосукцинат с затратой энергии гидролиза ГТФ. Освобождаемый затем фумарат вступает в цикл Кребса и превращается в оксалоацетат, который может аминироваться вновь с образованием аспартата. Эта реакция, получившая название *пуриновый нуклеотидный цикл*, играет важную роль в мышечной ткани в качестве

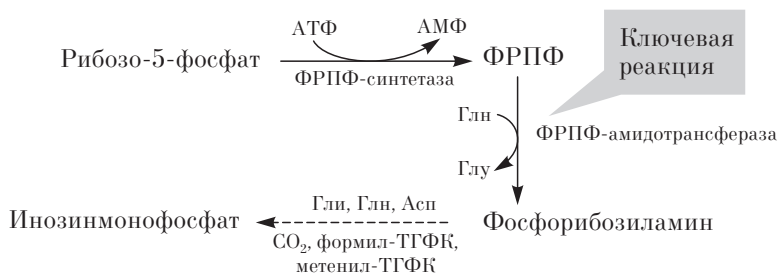


Рис. 10.13. Реакции синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo*

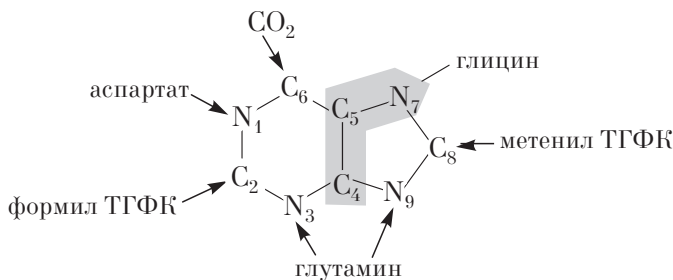


Рис. 10.14. Происхождение атомов С и N в пуриновом кольце

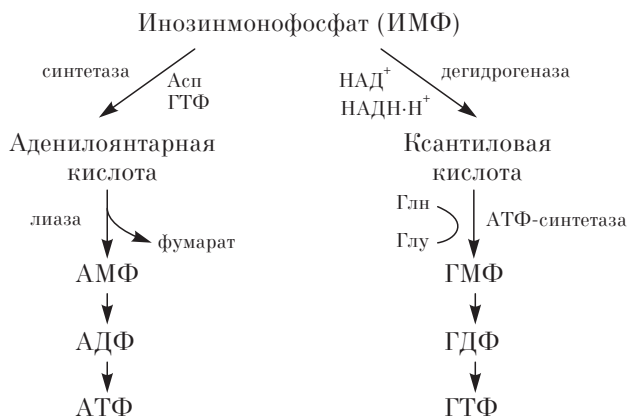
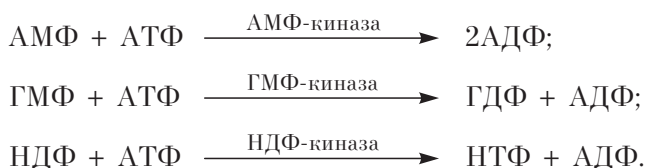


Рис. 10.15. Схема превращений ИМФ

своеобразной анаплеротической реакции, способствующей подключению белков к обеспечению мышц энергией и одновременному обезвреживанию аммиака, который при этом возникает в ходе дезаминирования аминокислот.

Превращение инозиновой кислоты в гуаниловую кислоту (ГМФ) сопряжено с предварительным ее окислением в ксантиловую кислоту (ксантозин-монофосфат) при участии дегидрогеназы ИМФ. Принимая впоследствии аминогруппу от глутамина (Гли), ксантиловая кислота трансформируется в ГМФ. Эта реакция сопровождается пиррофосфоролитическим распадом АТФ.

Образовавшиеся АМФ и ГМФ далее фосфорилируются нуклеозидмонофосфаткиназами (высокоспецифичными для отдельных нуклеотидов), образуя АДФ и ГДФ, и нуклеозиддифосфаткиназами (с широкой специфичностью) с образованием АТФ и ГТФ.



Регуляция синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo* осуществляется на уровне четырех регулируемых ферментов: фосфорибозилпирофосфатсинтетазы, амидофосфорибозилтрансферазы, аденилосукцинатсинтетазы и дегидрогеназы ИМФ (рис. 10.16).

Фосфорибозилпирофосфатсинтетаза имеет два отдельных аллостерических центра для связывания пуриновых нуклеотидов (ГДФ и АДФ), которые ингибируют этот фермент. Роль ключевой реакции играет формирование 5-фосфорибозил-1-амина при участии фермента ФРПФ-амидотрансферазы. Этот фермент ингибируется и ГМФ, и АМФ, а также соответствующими нуклеозид ди- и трифосфатами. Связывание АМФ и ГМФ с ферментом преобразует его мономерную активную форму в димерную неактивную. Так как оба нуклео-

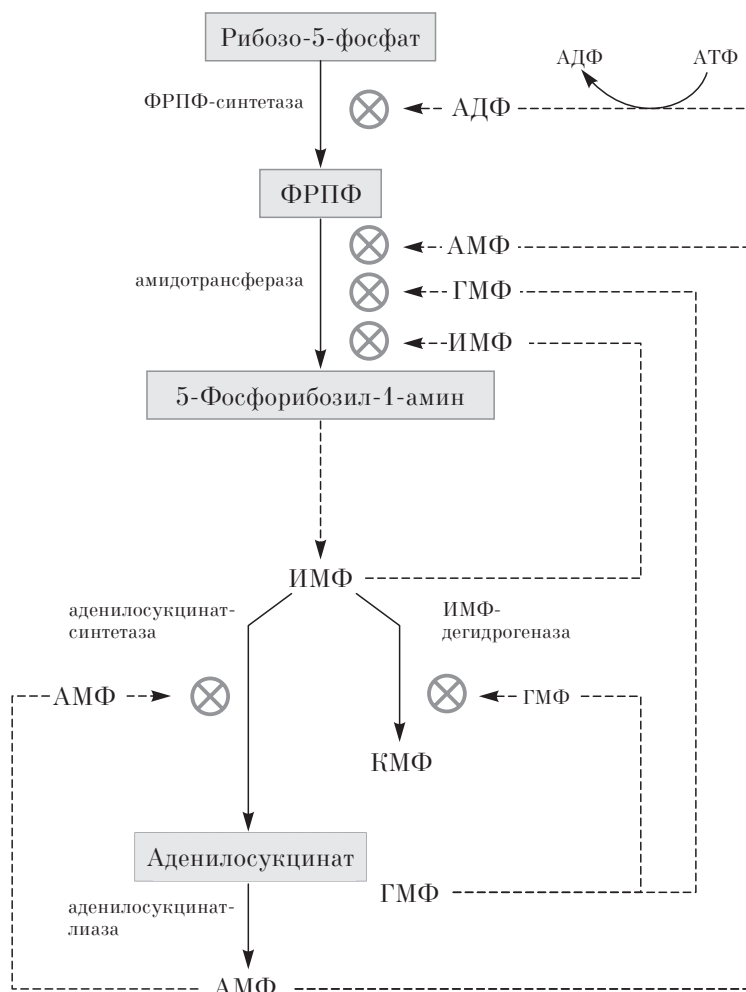


Рис. 10.16. Регуляция синтеза пуриновых нуклеотидов

тида связываются с одной и той же молекулой фермента на различных участках, они действуют синергично. Избыток пиримидиновых нуклеотидов и ФРПФ активируют ФРПФ-амидотрансферазу.

Формирование АМФ из ИМФ требует ГТФ, а формирование ГМФ требует АТФ. Такой перекрестный контроль поддерживает уровни ГТФ и АТФ в клетках в определенных соотношениях.

10.6.3. Синтез пиримидиновых нуклеотидов

В отличие от синтеза пуриновых нуклеотидов синтез пиримидиновых нуклеотидов *de novo* начинается с образования основания, и только затем к нему присоединяется углеводная половина. Пуриновое кольцо образуется из трех «простых» соединений: глутамина, аспартата и CO_2 (рис. 10.17). Фосфорибозилпирофосфат присоединяется к уже сформированному азотистому основанию (рис. 10.18).

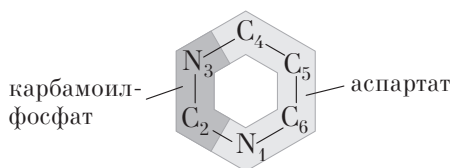


Рис. 10.17. Источники атомов пиримидинового кольца

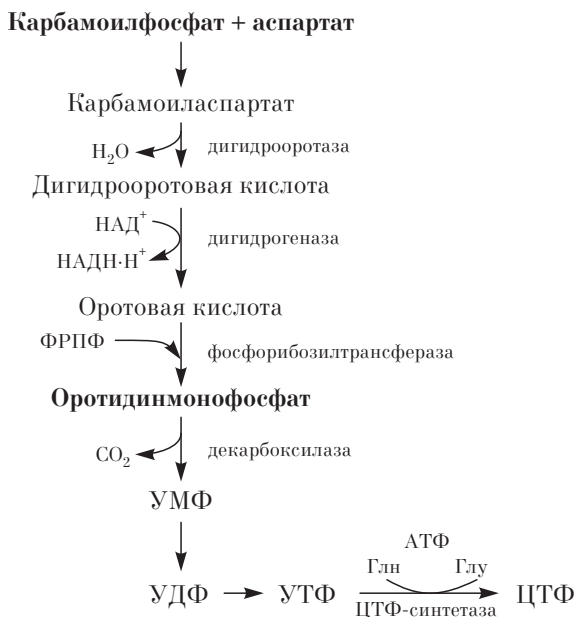


Рис. 10.18. Схема реакций синтеза пиримидиновых нуклеотидов

Ключевым этапом в синтезе пиримидиновых нуклеотидов у млекопитающих считается образование карбамоилфосфата:



Первые три реакции синтеза (образование карбамоилфосфата, карбамоиласпартата и дигидрооротовой кислоты) катализируются одним ферментом, отдельные домены которого обладают активностью карбамоилфосфатсинтетазы II, аспартаткарбамоилтрансферазы и дигидрооротаза, — *КАД-ферментом*. Этот фермент расположен в цитозоле. Домен с карбамоилсинтазной активностью отличается от карбамоилфосфатсинтетазы I, которая располагается в митохондриях и использует аммиак для образования карбамоилфосфата. Последний в митохондриях начинает путь синтеза мочевины.

Дегидрогеназа дигидрооротовой кислоты расположена в митохондриях и катализирует превращение дигидрооротовой кислоты в оротовую, которая становится субстратом второго многофункционального фермента, катализирующего две реакции: образование оротидинмонофосфорной кислоты и ее декарбоксилирование с образованием УМФ. Этот бифункциональный фермент называется *УМФ-синтаза*.

После фосфорилирования УМФ нуклеозидмоно- и дифосфаткиназами до УТФ, последний может аминироваться по углероду в 4-м положении с участием глутамина и расходом АТФ и превращаться в ЦТФ (фермент ЦТФ-синтаза). УМФ и УДФ не аминируются.

Регуляция синтеза пиримидиновых нуклеотидов происходит по механизму обратной отрицательной связи. Карбамоилфосфатсинтаза II — ключевой фермент в регуляции синтеза пиримидиновых нуклеотидов у людей. Основными его регуляторами являются УТФ и УДФ (тормозят активность), а избыток пуриновых нуклеотидов и ФРПФ оказывают активирующее действие.

Нарушение синтеза пиримидиновых нуклеотидов ведет к нарушению деления клеток, развивается мегалобластическая анемия, нарушается функция желудочно-кишечного тракта, страдает интеллектуальное развитие. Для предотвращения и ослабления этих последствий применяют препараты цитидина или уридина.

10.6.4. Биосинтез дезоксирибонуклеотидов

Все приведенные выше механизмы синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов ведут к образованию рибонуклеотидов. И это не удивительно, поскольку количество РНК в клетке значительно превышает количество ДНК.

Синтез дезоксирибонуклеотидов происходит путем восстановления ОН-группы у С_{2'}-атома рибозы в составе молекулы соответствующего рибонуклеозиддифосфата. Эта реакция катализируется рибонуклеотидредуктазой (рис. 10.19). В качестве восстановителя используется небольшой белок *тиоредоксин*. Его восстановление, в свою очередь, катализируется тиоредоксинредуктазой, исполь-



Рис. 10.19. Схема синтеза дезоксирибонуклеотидов

зующей НАДФН·Н⁺ в качестве донора водорода. Образование дезоксирибонуклеотидов тщательно регулируется, чтобы обеспечить достаточное количество субстратов для синтеза ДНК при делении клетки. Ингибиторами рибонуклеотидредуктазы являются дезоксирибонуклеозидди- и трифосфаты.

Тимидиловый нуклеотид образуется из дезоксиуридиловой кислоты путем ее метилирования с участием донора метильной группы N⁵,N¹⁰-метилентетрагидрофолата. Реакцию катализирует специфическая тимидилатсинтаза (рис. 10.20).

Образование метильной группы из метенильной требует для восстановления ионов водорода, донором которых становится тетрагидрофолат.

Дезоксирибонуклеотиды могут также синтезироваться путем реутилизации дезоксирибонуклеозидов с участием тимидин- и дезоксицитидинкиназ.

Повышение активности ферментов, катализирующих образование дезоксирибонуклеотидов, наблюдается в клетках, готовящихся к делению.

При нарушении процессов распада пуриновых нуклеотидов из-за снижения активности аденозиндезаминазы и пуриннуклеозидфосфорилазы происходит не только снижение образования мочевой кислоты. Снижение активности этих ферментов ведет к накоплению в клетках рибо- и дезоксирибонуклеотидов,

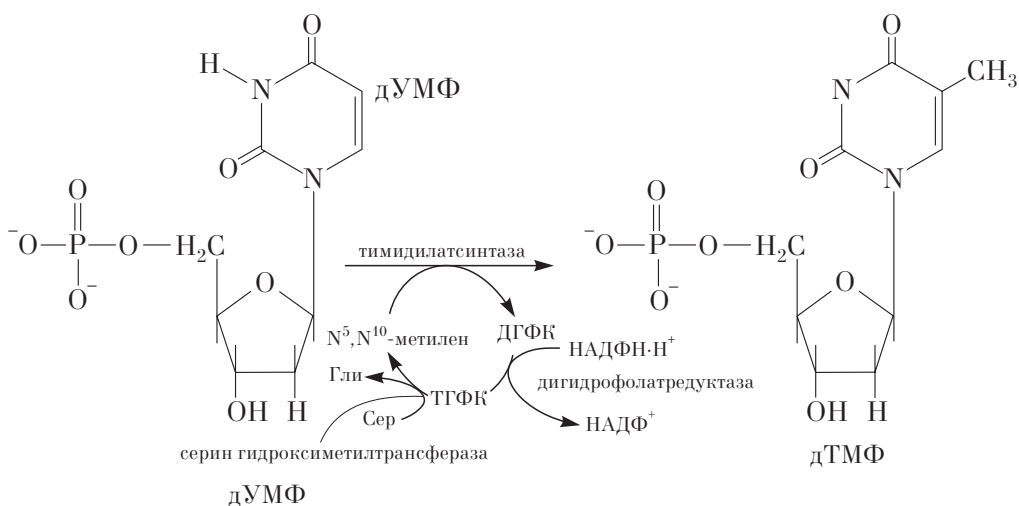


Рис. 10.20. Схема синтеза дТМФ

что, в свою очередь, вызывает накопление дАТФ и дГТФ. Последние ингибируют восстановление других нуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды. Это тормозит механизмы синтеза ДНК и деление клетки.

Врожденная недостаточность аденозиндезаминазы сопровождается развитием тяжелых форм клеточного и гуморального иммунодефицита из-за нарушения пролиферации и созревания Т- и В-лимфоцитов. Дети с такой патологией обычно погибают от инфекций.

10.6.5. Азотистые основания, нуклеозиды и их производные как лекарственные средства

Химические аналоги естественных метаболитов синтеза нуклеотидов нашли применение в качестве лекарственных средств в лечении опухолей (например, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин и 8-азагуанин и др.).

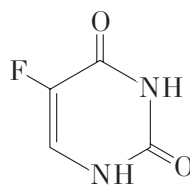
Такие аналоги действуют как конкурентные ингибиторы естественных нуклеотидов, используются в синтезе ДНК, при этом происходит нарушение деления клетки. Так, например, 6-меркаптопурины ингибируют превращение ИМФ в ГМФ и АМФ.

Исключительная роль *тимидилатсинтазы* и фолиевой кислоты в синтезе ТМФ обусловила целенаправленное использование ингибиторов этой реакции — лекарственных средств (5-фторурацил, 5-йодоурацил, 3-дезоксидиурин, 6-азауридин, 6-азацитидин), которые конкурентно ингибируют тимидилатсинтазу. Это ведет к блокированию синтеза ДНК.

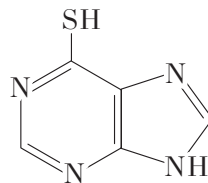
Ингибиторы дигидрофолатредуктазы — *метотрексат*, *аминоптерин* — препятствуют ресинтезу ТГФК, тем самым нарушают использование одноуглеродных фрагментов для синтеза нуклеотидов.

Ацикловир, зидовудин (Азидотимидин) и другие препараты используются в лечении вирусных инфекций.

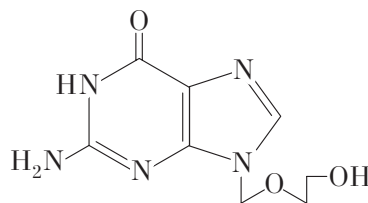
Ацикловир — пролекарство, аналог гуанозина. В инфицированных вирусом клетках происходит фосфорилирование препарата и превращение в активное соединение — ациклогуанозинтрифосфат, ингибирующий ДНК-полимеразу вирусов.



5-фторурацил



6-меркаптопурин



ацикловир

Биосинтез ДНК, РНК и белков. Механизмы регуляции

Основные принципы хранения и реализации генетической информации были сформулированы Ф. Криком в 1958 г. В подавляющем большинстве случаев передача наследственной информации от материнской клетки к дочерней обеспечивается молекулами ДНК (*репликация*). Реализация генетической информации самой клеткой происходит при участии молекул РНК, которые образуются на матрице ДНК (*транскрипция*) и, наконец, молекулы РНК непосредственно участвуют во всех этапах синтеза белковых молекул (*трансляция*), обеспечивающих структуру и деятельность клетки. Эти положения стали основой центральной догмы молекулярной биологии, согласно которой генетическая информация не может быть передана от белка к белку или от белка к нуклеиновой кислоте.

11.1. Репликация ДНК

Во время деления каждая дочерняя клетка получает точную копию генетической информации материнской клетки. Этот процесс копирования ДНК известен как *репликация ДНК*. Дочерняя клетка получает одну цепь ДНК из материнской клетки, а вторую синтезирует заново. Такой способ образования молекул ДНК получил название *полуконсервативный тип репликации*. Каждая цепь служит матрицей (шаблоном), по которой синтезируется новая комплементарная цепь. Первичная структура дочерней цепи определяется первичной структурой родительской цепи, потому что в основе ее образования лежит принцип комплементарности оснований (Г–Ц и А–Т).

Репликацию можно разделить на четыре этапа:

- 1) образование репликативной вилки (*инициация*);
- 2) синтез новых цепей (*элонгация*);
- 3) исключение праймеров;
- 4) завершение синтеза двух дочерних цепей ДНК (*терминация*).

Сигналами начала репликации служат факторы роста, высвобождаемые в S-фазу клеточного цикла. Репликация ДНК начинается с узнавания участка начала репликации. Участки начала репликации (сайты) на цепи ДНК у бактерий получили название *ori*. Соответствующие области у более высокораз-

витых организмов называют **репликаторами**. У млекопитающих в молекуле ДНК идентифицировано большое число таких сайтов. Их называют *автономными реплицирующимися последовательностями*. Эти области опознаются специфичными белками, формирующими комплекс узнавания начала репликации.

Репликация начинается с раскручивания двойной цепочки ДНК. ДНК-хеликаза, используя энергию гидролиза АТФ, разрывает водородные связи в точке начала репликации. Возникающая при этом суперспирализация молекулы ДНК снимается при участии ДНК-топоизомераз (I, II и III), которые обладают нуклеазной активностью. Так, ДНК-топоизомераза I разрывает фосфодиэфирную связь в одной из цепей двойной спирали и после окончания вращения разрезанного конца молекулы вновь соединяет нуклеотиды в точке разрыва. ДНК-топоизомераза II разрывает обе цепи ДНК и затем вновь их соединяет. Функции топоизомераз у бактерий выполняет гираза, которая действует на их кольцевую молекулу.

Комплекс ферментов и других факторов, необходимых для репликации ДНК, получил название *реплисома* или *система репликации ДНК*. В ее составе более 20 разных ферментов и белков. Среди них можно назвать *белок А*, который связывается со специфическими участками начала репликации, *топоизомеразы*, *хеликазы*, *SSB-белки*, связывающиеся с цепями ДНК и предотвращающие их обратное скручивание. Хеликаза движется в двух противоположных направлениях от места начала, формируя две репликативные вилки, между которыми возникает репликативный пузырь.

Основными исполнителями репликация служат ДНК-зависимые ДНК-полимеразы, субстратами которых и одновременно источниками энергии являются дезоксирибонуклеозидтрифосфаты — дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ. Активаторами полимераз служат ионы магния, которые нейтрализуют отрицательный заряд нуклеотидов (рис. 11.1).

ДНК-полимераза не может самостоятельно инициировать новый (*de novo*) синтез цепи. Для этого ей нужно, чтобы уже существовала цепь нуклеотидов, которая называется **праймер**. Праймер синтезируется у эукариот ДНК-полимеразой α .

Синтез ДНК идет в направлении $5' \rightarrow 3'$ растущей цепи, поскольку цепь ДНК растет за счет формирования фосфодиэфирной связи между $3'$ -кислородом растущей цепи и α -фосфатом дНТФ.

Каждая из цепей ДНК служит матрицей для образования комплементарной цепи. Комплементарность оснований противоположных цепей гарантирует идентичность новосинтезированной и исходной ДНК. Синтезируемая цепь всегда антипараллельна матричной цепи. В ходе репликации образуются две дочерние цепи, представляющие собой копии матричных цепей (рис. 11.2).

В клетках млекопитающих различают 5 ДНК-полимераз: α , β , γ , δ и ϵ . ДНК-полимеразы α , β , δ , ϵ участвуют в синтезе ДНК в ядре клеток, ДНК-полимераза γ — в репликации митохондриальной ДНК.

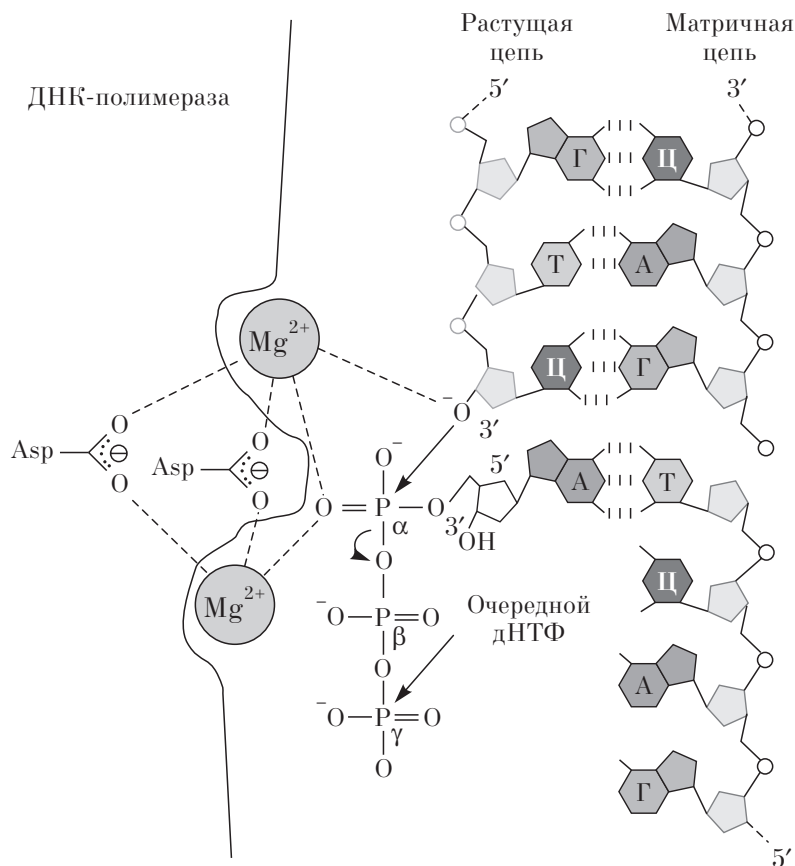


Рис. 11.1. Роль ионов Mg^{2+} в работе ДНК-полимеразы

Сродством к одиночной нити ДНК из всех ДНК-полимераз обладает только ДНК-полимераза α , которая состоит из четырех субъединиц. После присоединения к ДНК одной из субъединиц она синтезирует небольшой фрагмент РНК-праймер, состоящий из 8–10 рибонуклеотидов, и затем приступает к синтезу фрагмента цепи ДНК, содержащего около 50 дезоксирибонуклеотидов. Этот олигонуклеотидный фрагмент, синтезированный ДНК-полимеразой α , затем становится местом присоединения ДНК-полимеразы δ , которая продолжает синтез новой цепи в направлении $5' \rightarrow 3'$ по ходу раскручивания репликативной вилки. Таков механизм непрерывного синтеза дочерней цепи, получившей название *лидирующей*.

На второй матричной цепи синтез дочерней ДНК происходит при участии двух ферментов: ДНК-полимеразы α и ДНК-полимеразы ϵ тоже в направлении $5' \rightarrow 3'$, но против движения репликативной вилки. Эта цепь синтезируется прерывисто. Короткие фрагменты будущей дочерней цепи ДНК, образованные ДНК-полимеразой α (праймер) и ДНК-полимеразой ϵ , получили название

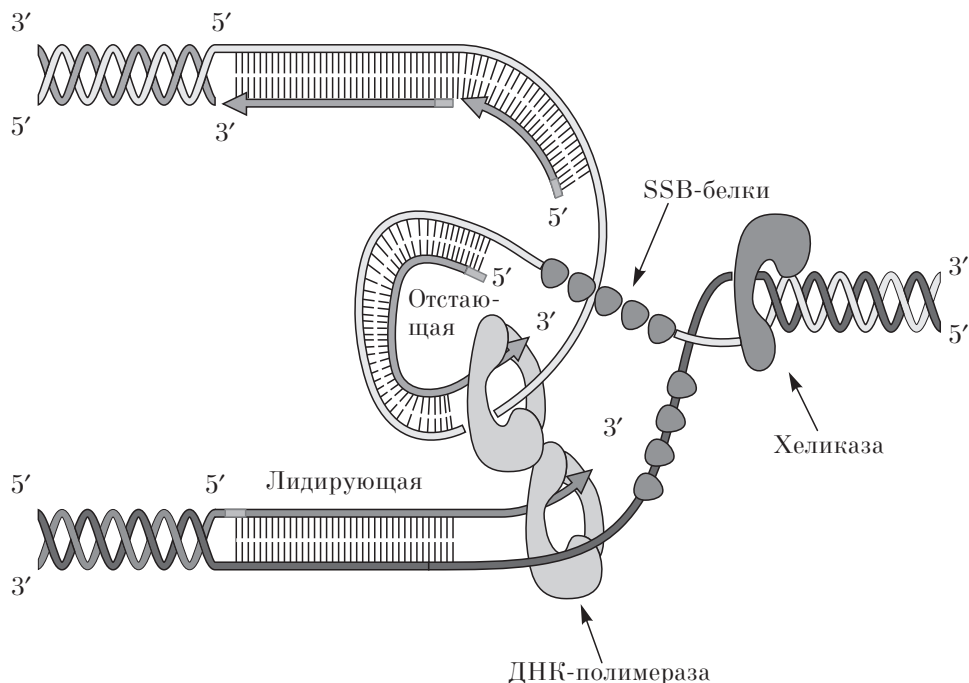


Рис. 11.2. Схематическое изображение матричного репликативного синтеза лидирующей и отстающей дочерних цепей ДНК

фрагменты Оказаки (в честь открывшего их японского ученого Рейджи Оказаки). Такая синтезируемая фрагментами дочерняя цепь ДНК получила название *отстающей цепи*.

Удаляет праймеры группа структурно-специфических эндонуклеаз. ДНК-полимераза β присоединяет дезоксирибонуклеотиды в количестве, равном вырезанному праймеру, и таким образом заполняет возникшую брешь.

В завершение формирования отстающей цепи еще один из ферментов реплисом, ДНК-лигаза, катализирует образование фосфодиэфирной связи между 3'-ОН-группой дезоксирибозы одного фрагмента цепи ДНК и 5'-фосфатом следующего фрагмента. Реакция протекает с затратой энергии АТФ. Таким образом, из множества фрагментов Оказаки образуется непрерывная цепь ДНК.

11.2. Процессинг ДНК

По окончании репликации дочерняя цепь отличается от материнской меньшим числом метильных групп. Этим отличием пользуются системы репарации для проверки «качества» синтезированной молекулы. Затем дочерняя цепь вступает в этап *метилирования*. Метильные группы в структуре ДНК необходимы для формирования хромосом и регуляции транскрипции генов. Источ-

ником метильных групп является S-аденозилметионин. Метилируются в основном аденин в последовательности –ГАТЦ– и цитозин в последовательности –ГЦ– с образованием N₆-метиладенина и N₅-метилцитозина соответственно. Такое метилирование не нарушает правила комплементарности. Количество метилированных оснований достигает 1–8 %.

В 1932 г Г. Мёллер предложил термин **теломера** для концевых участков хромосом, удаление которых приводило к слиянию хромосом и их деградации. Теломера нормальной клетки человека длиной 5–15 тысяч пар нуклеотидов состоит из многократно повторяющейся нуклеотидной последовательности ТТГГГГ (рис. 11.3).

С каждым клеточным делением концы хромосом укорачиваются, что связано с неполным копированием концов цепей ДНК ферментом ДНК-полимеразой и удалением концевых РНК-праймеров (проблема концевой репликации). Такая особенность репликации служит механизмом, контролирующим число делений клетки и ее апоптоз. В 1985 г. Э. Блэкбёрн и К. Грейдер открыли фермент **теломеразу**, которая катализировала достройку утраченных участков ДНК. Это открытие широко использовалось в теориях долголетия.

Теломераза является РНК-зависимой ДНК-полимеразой (обратной транскриптазой), в составе которой имеется особая молекула РНК, используемая в качестве матрицы для обратной транскрипции во время удлинения теломер.

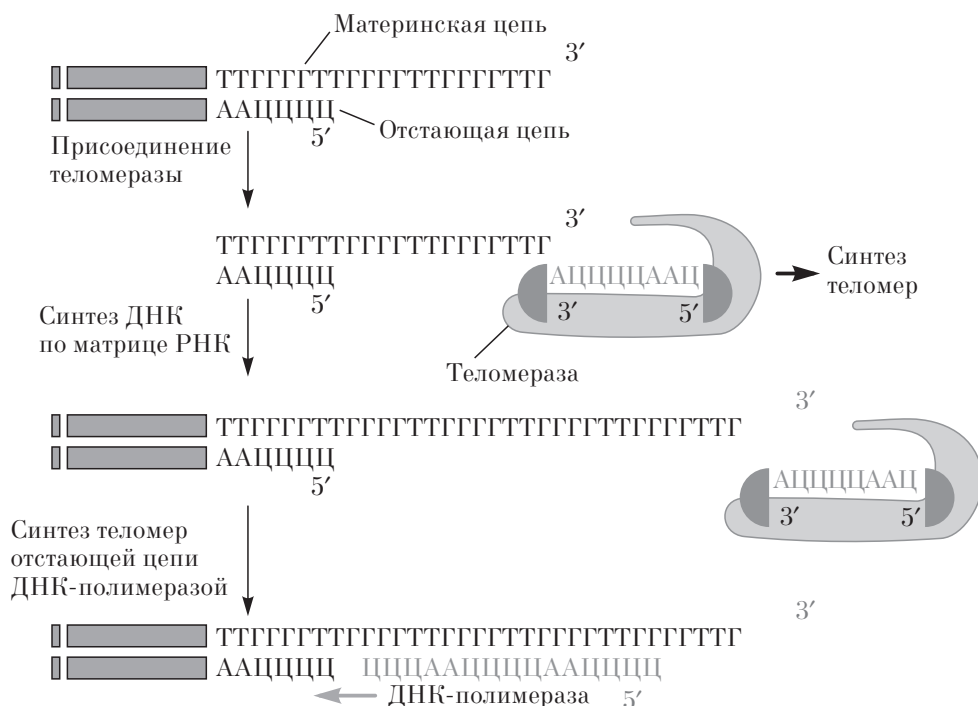


Рис. 11.3. Механизм синтеза теломер

Стволовые клетки эмбрионов активно синтезируют теломеразу, которая позволяет им непрерывно делиться, формируя ткани и органы. У взрослых ее активность обнаруживается в клетках, которые должны часто делиться, однако большинство соматических клеток ее не производят. Изучение теломеразы в различных типах опухолей указывает на достаточно выраженную зависимость между активностью фермента и злокачественностью (высокий уровень теломеразной активности был обнаружен в 90 % злокачественных опухолей). Всё это делает теломеразу важным объектом диагностики злокачественных новообразований.

Известны лекарственные препараты, ингибирующие матричный репликативный синтез ДНК. Одни из них тормозят репликацию у бактерий и используются как антибактериальные средства, другие ингибируют репликацию и останавливают деление клеток у человека. Они нашли применение в качестве противоопухолевых препаратов (табл. 11.1).

Таблица 11.1

Ингибиторы репликации

Препарат	Действие
<i>Антибактериальные средства</i>	
Ципрофлоксацин, Налидиксин, Новобиоцин	Ингибитор ДНК-гиразы у бактерий
<i>Противоопухолевые средства</i>	
Этопосидин, Адриамицин, Доксорубин	Ингибитор топоизомеразы
6-Меркаптопурин	Ингибитор ДНК-полимеразы
5-Фторурацил	Ингибитор тимидилатсинтазы

11.3. Репарация ДНК

В процессе репликации и после ее завершения могут возникать повреждения структуры ДНК. Процессы, позволяющие восстанавливать такие повреждения, называют **репарацией**. Чаще всего повреждения затрагивают одну из цепей ДНК, поэтому при репарации другая цепь используется как матрица для исправления повреждения.

Если во время репликации происходит некорректное присоединение нуклеотида, экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы катализирует его удаление. Эта же ДНК-полимераза в последующем исправляет ошибку (рис. 11.4).

С другой стороны, молекула ДНК постоянно подвергается разнообразным изменениям, спонтанным или вызванным действием различных факторов внешней и внутренней среды. Наиболее частыми из них являются следующие:

- ошибки репликации, когда в дочернюю цепь ДНК включаются нуклеотиды, некомплементарные нуклеотидам матричной цепи;

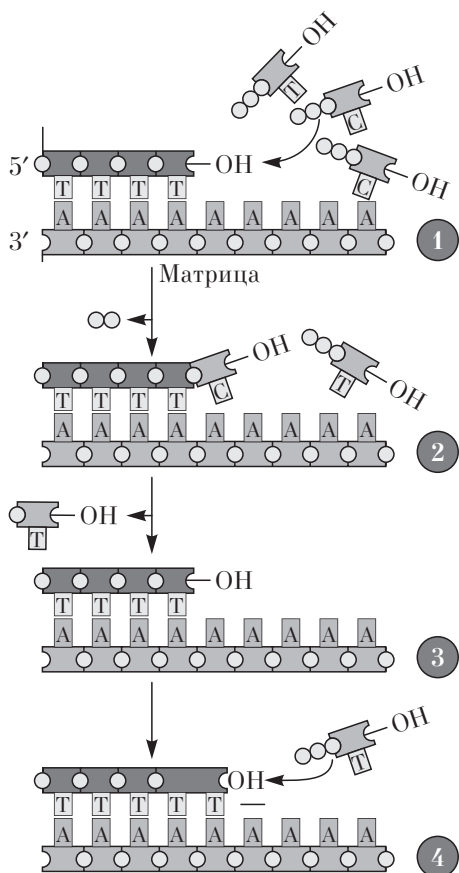


Рис. 11.4. Репарация ДНК:

1 — ДНК-полимераза катализирует поэтапное присоединение одного нуклеотида; 2 — если нуклеотид присоединен некорректно, элонгация цепи ДНК прекращается; 3 — 3'-5'-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы удаляет некорректный нуклеотид; 4 — ДНК-полимераза присоединяет необходимый нуклеотид

- дезаминирование оснований, при котором цитозин превращается в урацил, аденин — в гипоксантин, а гуанин — в ксантин. Чаще всего дезаминируется цитозин;

- депуринизация или депиримидинизация, результатом которых является появление в ДНК остатков дезоксирибозы, лишенных основания;

- образование под действием ультрафиолета пиримидиновых димеров между рядом расположенными в цепи основаниями;

- разрыв нуклеотидных цепей;

- появление ковалентных сшивок между цепями или цепями и гистонами;

- образование продуктов метилирования азотистых оснований в составе ДНК (6-метилгуанина, 7-метилгуанина, 3-метиладенина) в результате воздействия некоторых химических веществ.

Исправление возникших дефектов может проходить несколькими путями.

1. *Экцизионная репарация* (рис. 11.5):

- эндонуклеаза определяет место повреждения и катализирует гидролиз 3', 5'-фосфодиэфирной связи;

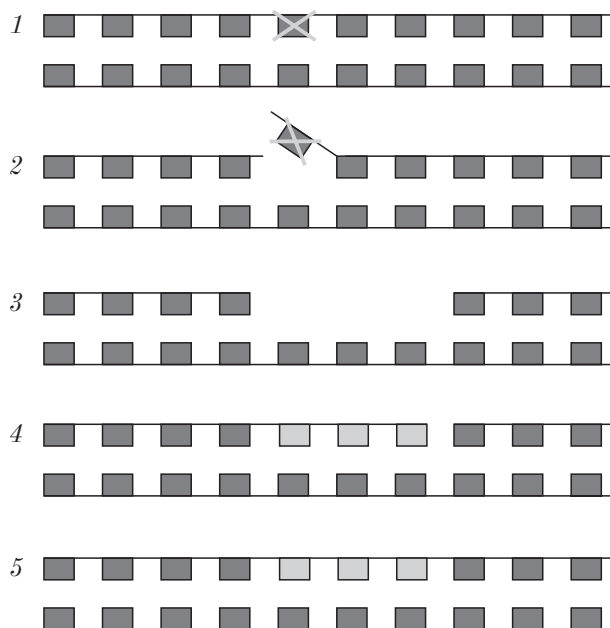


Рис. 11.5. Схематическое изображение этапов эксцизионной репарации:
 1 — обнаружение дефекта; 2 — разрыв цепи; 3 — удаление поврежденного участка;
 4 — достройка участка; 5 — восстановление целостности цепи

- экзонуклеаза находит место разрыва цепи и удаляет поврежденный участок;
- ДНК-полимераза β присоединяется к 3'-концу образовавшейся «бреши» и достраивает недостающий участок цепи (ликвидирует «брешь»). Матрицей служит неповрежденная цепь ДНК;
- ДНК-лигаза соединяет неповрежденный и вновь синтезированный участки цепи ДНК.

2. В случаях депуринизации (депиримидинизации) имеет место *прямая репарация*, когда фермент ДНК-инсераза катализирует присоединение к дезоксирибозе необходимого основания в соответствии с правилом комплементарности.

Репарация возможна благодаря существованию двух цепей в молекуле ДНК — двух копий генетической информации. Если одновременно повреждается комплементарная пара нуклеотидов, то репарация в гаплоидных клетках невозможна, а в диплоидных может идти за счет присутствия идентичного гена в гомологичной хромосоме.

Репарация необходима для сохранения генетического материала на протяжении всей жизни организма (сохранение структуры генома). Все ферменты постоянно активны и процесс идет непрерывно. Снижение активности ферментов репарации приводит к накоплению повреждений (мутаций) в ДНК.

Приведем несколько примеров наследуемой по аутосомно-рецессивному типу патологии.

Пигментная ксеродерма (от греч. xeres — сухой и derma — кожа) вызывается нарушением механизма эксцизионной репарации нуклеотидов. Известны 7 генов пигментной ксеродермы (от А до G), необходимых для механизма такой репарации. Мутация в любом из них может привести к развитию заболевания. В результате повышенной чувствительности к солнечному свету (ультрафиолету) у больных уже в раннем возрасте появляются пигментация, сухость кожи, изъязвления, рубцы, а затем развивается рак кожи, включая меланомы и карциномы. Средний возраст появления первой опухоли у больных пигментной ксеродермой — 8 лет, а вероятность развития карцином слизистой рта в 20 тыс. раз превышает средние значения в популяции. Частота встречаемости заболевания в разных странах составляет от 1/250 тыс. человек до 1/40 тыс. человек.

Синдром Коккейна вызывается дефектами эндонуклеаз эксцизионного пути репарации ДНК. Синдром проявляется как карликовость при нормальном уровне гормонов роста. Кроме того, для больных характерны кальцификация костей черепа, атрофия зрительного нерва, глухота и ускоренное старение.

Еще одно заболевание, причиной которого является нарушение репаративного синтеза ДНК, — *трихотиодистрофия*. Важнейший диагностический признак болезни — специфическая ломкость волос, обусловленная уменьшением содержания в них низкомолекулярных богатых серой белков. К этому следует добавить аномалии зубов и кожи, ихтиоз, дефекты полового развития, часто наблюдающиеся умственную и физическую отсталость, а также повышенную предрасположенность к раку кожи.

11.4. Транскрипция ДНК

Основное направление реализации генетической информации в клетке включает два основных процесса — синтез молекул РНК (*транскрипция*) и синтез молекул белков (*трансляция*) (рис. 11.6). Это положение принято называть догмой молекулярной биологии. Этот процесс протекает во время деления клетки. В ходе транскрипции образуются молекулы мРНК, служащие матрицей для синтеза белков, а также транспортные, рибосомальные и другие виды молекул РНК, выполняющие структурную, адапторную и каталитическую функции. Если процесс репликации можно образно сравнить с копированием всех страниц книги, то процесс транскрипции сравним с ксерокопированием отдельных страниц.

При переписывании пользуются алфавитом, на котором написана вся книга (4 азотистых основания, но одна буква Т заменяется на У). Основные изменения алфавита происходят во время перевода (трансляции). Он протекает в цитозоле, когда последовательность нуклеотидов транслируется в последовательность

аминокислот. иРНК действует в качестве посредника, транспортирующего информацию, записанную в гене на ДНК, к белоксинтезирующему механизму в цитозоле. Она несет сообщение, которое будет переведено на язык аминокислотной последовательности.

11.4.1. Участники процесса транскрипции

Все транслируемые молекулы синтезируются при участии ДНК-зависимых РНК-полимераз, которые были открыты в середине прошлого века. В клетках эукариот имеются три различных класса РНК-полимераз: I, II и III. Кроме того, имеются митохондриальные и хлоропластные РНК-полимеразы. Их молекулярная масса 500–600 тыс. а.е.м. Каждая полимераза отвечает за синтез разных типов РНК.

РНК-полимераза* I катализирует синтез рРНК (за исключением 5S рРНК) в виде длинных предшественников, называемых *прерибосомальными РНК*. 45S прерибосомальная РНК служит в качестве исходной молекулы предшественника для 18S, 28S, и 5,8S рРНК.

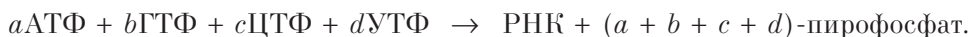
РНК-полимераза II катализирует синтез иРНК и отдельных мяРНК.

РНК-полимераза III синтезирует тРНК, 5S рРНК и некоторые мяРНК.

В целом механизм синтеза РНК по многим свойствам напоминает синтез ДНК. Для работы РНК-полимеразы необходимы:

- матрица (роль матрицы, как правило, выполняет двухцепочечная ДНК);
- субстраты (необходимы все четыре рибонуклеозидтрифосфата — АТФ, ГТФ, ЦТФ и УТФ);
- ионы двухвалентных металлов (обычно это ионы Mg^{2+}).

Суммарную схему синтеза РНК можно изобразить следующим образом:



Синтез молекулы РНК идет в направлении $5' \rightarrow 3'$ с перемещением фермента по матрице в направлении $3' \rightarrow 5'$. Механизм соединения нуклеотидов под влиянием РНК-полимеразы подобен синтезу ДНК и заключается в нуклеофильной атаке внутреннего фосфата очередного рибонТФ $3'$ -ОН-группой на конце растущей цепи. Необратимость реакции связана с гидролизом пирофосфата, высвобождаемого в реакции синтеза РНК.

Однако в синтезе РНК существует ряд особенностей. РНК-полимераза не нуждается в затравочном олигонуклеотиде (праймере), не обладает нуклеазной активностью, перемещается значительно медленнее по матрице (при-

* У бактерий одна РНК-полимераза катализирует синтез всех типов РНК. Молекула корового фермента бактерий состоит из двух α -, двух β - и одной ω -субъединицы. Еще одна субъединица — четырехдоменный σ -фактор — представлена несколькими формами. Она обеспечивает узнавание места начала синтеза РНК и увеличивает аффинность фермента к промоторному сайту в ДНК.

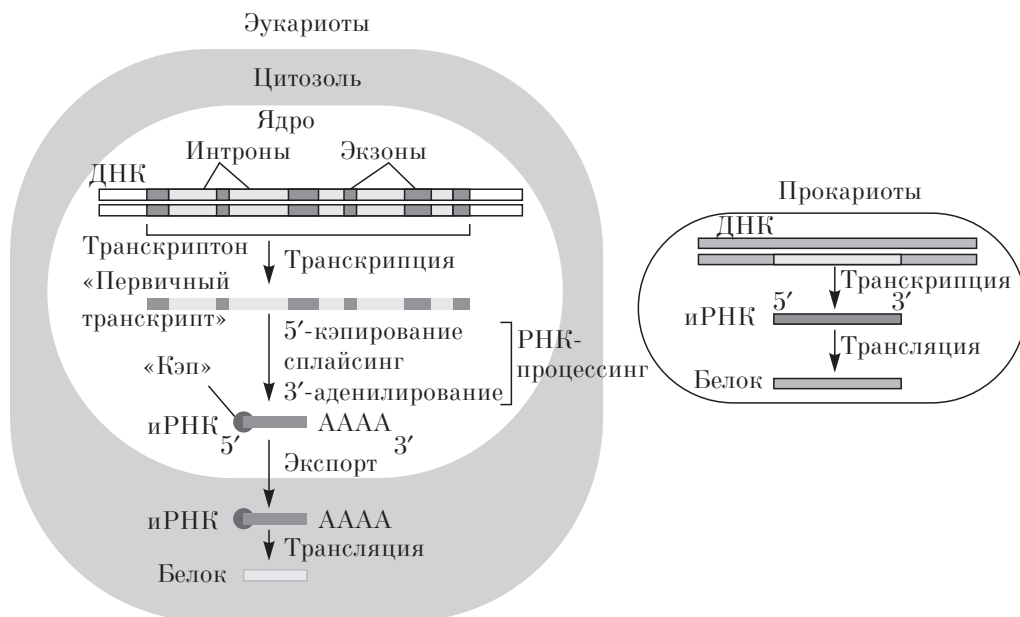


Рис. 11.6. Основное направление экспрессии генов у про- и эукариот

близительно 50–100 оснований в секунду для РНК против около 1000 оснований в секунду для ДНК). Точек инициации транскрипции намного больше, чем у репликации. Число молекул РНК-полимераз в клетке намного больше, чем ДНК-полимераз. Наконец, точность полимеризации РНК намного ниже, чем ДНК. Это допустимо, так как дефектные молекулы РНК могут быть просто удалены и взамен синтезированы новые «правильные» молекулы.

Синтез молекул РНК начинается в определенных местах ДНК, называемых **промоторами**, и завершается в участке, называемом **терминатором**. Участок ДНК, ограниченный промотором и терминатором, представляет собой единицу транскрипции — **транскриптон** (у эукариот) или **оперон** (у прокариот). Впервые представления о структурной и функциональной организации транскрибируемых участков молекулы ДНК появились в 1960 г. в виде теории оперона, предложенной французскими исследователями Ф. Жакобом, А. Львовом и Ж. Моно при работе с прокариотами, а к концу XX столетия подобный принцип организации стал использоваться и для эукариот.

По функциональному признаку в транскриптоне (опероне) выделяют регуляторные и структурные области (рис. 11.7). Структурная область может содержать информативные (**экзоны**) и неинформативные (**интроны**) участки.

В пределах каждого такого участка копируется только одна из двух нитей ДНК, которая называется **матричной**. Противоположная матричной цепь ДНК имеет ту же последовательность, что и иРНК (с заменой Т на У). Такую цепь ДНК называют **кодирующей** (рис. 11.8).

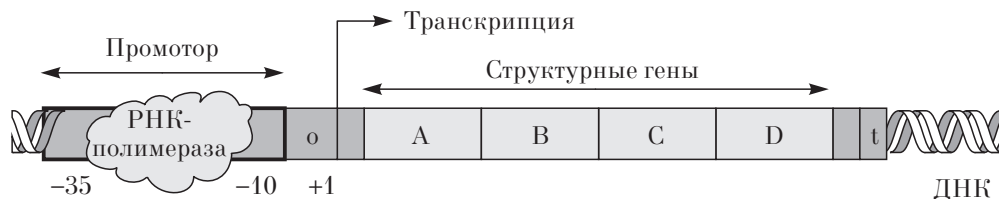


Рис. 11.7. Схема строения оперона

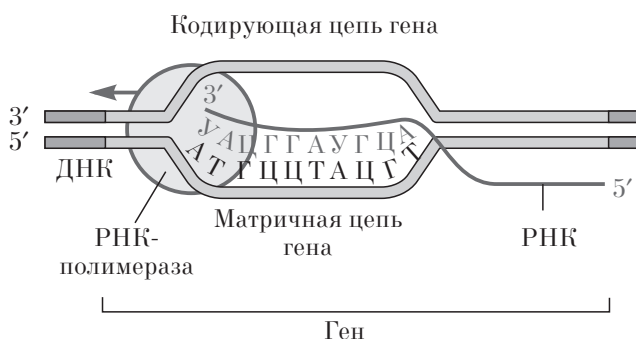


Рис. 11.8. Синтез РНК на матричной цепи ДНК

Разделение ДНК на множество транскриптонов обеспечивает возможность независимого считывания разных генов, их индивидуального включения и выключения. У эукариот в состав транскриптона, как правило, входит только один ген, у прокариот оперон может содержать несколько структурных генов.

Процесс транскрипции, как и любой матричный процесс, включает три этапа: инициацию, элонгацию и терминацию. У про- и эукариот эти этапы имеют ряд существенных различий.

11.4.2. Инициация транскрипции

В качестве стартовых сайтов транскрипции служат определенные консенсусные последовательности нуклеотидов ДНК, которые могут быть расположены по разные стороны от места начала синтеза РНК. У человека приблизительно 10^5 сайтов инициации на всех молекулах ДНК.

РНК-полимераза присоединяется к промотору матричной цепи ДНК. Структура промотора у эукариот и прокариот значительно различается. Для сравнения можно привести структуру промотора РНК-полимеразы II, который занимает примерно 100–200 полинуклеотидов. В нем различают базовую и дополнительную части. Базовая часть служит для точной ориентации РНК-

полимеразы II (РНКП II) относительно первого транскрибируемого нуклеотида (обычно это А). Она, в свою очередь, состоит из двух элементов:

- *инициатора* — включает первый транскрибируемый нуклеотид и предшествующий ему нуклеотид (обычно это С), а также окружающие их пиридинины;
- последовательности на кодирующей цепи 5'-ТАТАААА-3' (ее называют *ТАТА-бокс*).

РНКП II и набор транскрипционных факторов, работающих на базовой части, образуют базовый транскрипционный аппарат, который обеспечивает минимальный уровень транскрипции любого гена. Субъединица фактора транскрипции ТВР (англ. TATA-box-binding protein) распознает ТАТА-бокс и связывается с ним (рис. 11.9). Это способствует последующему формированию комплекса с другими базовыми факторами транскрипции (Е, F, H, G и др.), что обеспечивает посадку РНКП II на промотор. Дополнительная часть промотора включает в себя два или более участка, характерных для большинства генов. Это ЦААТ-бокс (консенсус ГГЦЦААТЦТ), ГЦ-бокс (консенсус ГГГЦЦГ) и другие боксы, участвующие в регуляции.

Для обеспечения максимального уровня экспрессии гена используются дополнительные элементы — *энхансеры* (англ. to enhance — усиливать)

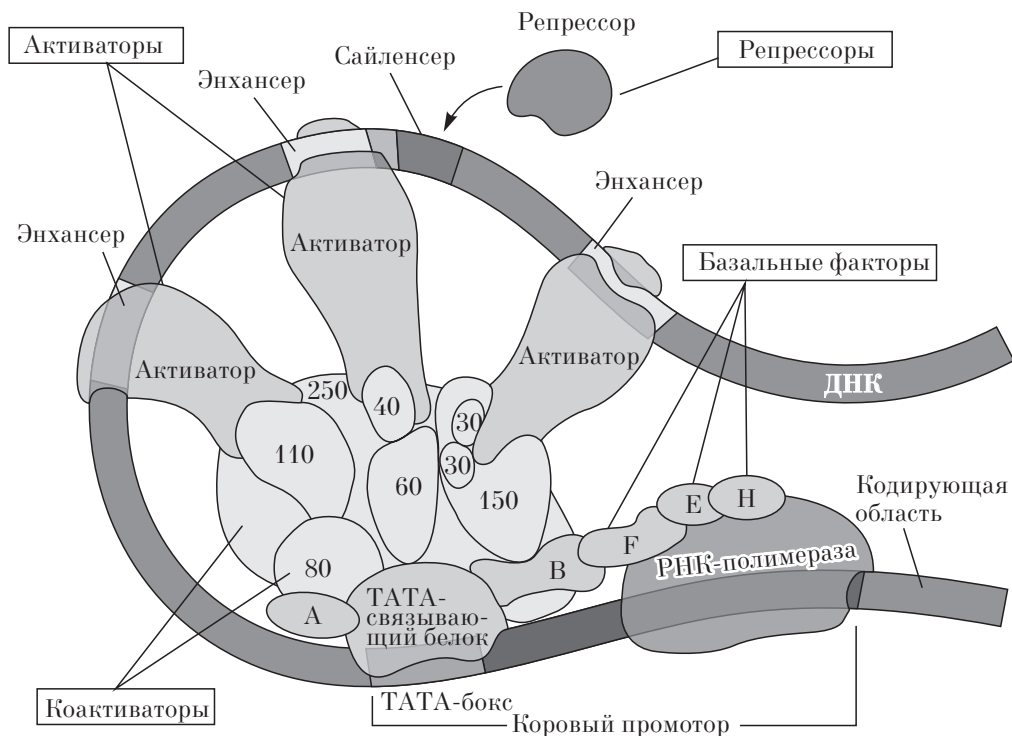


Рис. 11.9. Промотор и регуляторы транскрипции у эукариотов

и *сайленсеры* (англ. silence — тишина), обладающие противоположным регуляторным эффектом. Роль энхансеров или сайленсеров могут выполнять ре-спонсивные элементы гормонов, факторы роста. Разнообразие комбинаций транскрипционных факторов и других регуляторных белков, связывающихся с различными энхансерами/сайленсерами, обеспечивает различную скорость генной экспрессии.

РНК-полимераза эукариот не может самостоятельно инициировать транскрипцию. Для ее активации необходимо большое число белков (факторов транскрипции), которые объединяются в *транскрипционный комплекс*, позиционирующий РНК-полимеразу. Этот комплекс состоит из четырех типов белков:

- *базальные факторы* — детерминируют стартовую точку транскрипции;
- *коактиваторы* — связывают базальные факторы с активаторами;
- *активаторы* — связываются с энхансерами и увеличивают эффективность связывания базальных факторов с промотором, следовательно, увеличивают скорость транскрипции;
- *репрессоры* — связываются с сайленсерами (они обычно перекрывают энхансерную последовательность) и предотвращают связывание активаторов, тем самым снижая интенсивность транскрипции.

Регуляторные последовательности находятся не только вблизи промотора, но и на удалении от него.

Многие факторы транскрипции синтезируются или активируются в ответ на определенные сигналы, роль которых могут выполнять цАМФ, гормоны и другие соединения.

В основном механизмы транскрипции у эукариот сходны с хорошо исследованной транскрипцией прокариот. Однако имеются и значительные различия. Так, транскрипция у эукариот происходит в ядре с участием трех разных РНК-полимераз. В отличие от прокариот, РНК-транскрипты у эукариот не соединяются с рибосомами до завершения транскрипции.

Трансляция (синтез белка) на иРНК происходит после ее выхода из ядра в цитоплазму клетки. Еще одно отличие заключается в том, что ни одна из полимераз эукариот не способна самостоятельно связываться с промоторами транскрибируемых ими генов. Для присоединения к транскриптонам эукариот служат специфичные для каждой РНК-полимеразы белковые факторы транскрипции (TF-факторы). РНК-полимеразы I, II и III требуют участия факторов транскрипции, называемых TFI, TFII, TFIII соответственно.

11.4.3. Элонгация транскрипции

И у прокариот, и у эукариот началу синтеза РНК предшествует раскручивание молекулы ДНК в областях промоторов, которые богаты АТ парами оснований.

Раскручивание ДНК обеспечивает РНК-полимераза, а суперспирализация в возникающем пузыре транскрипции снимается при участии топоизомераз. Раскручиваются примерно 20 пар оснований, и первый нуклеотид у прокариот присоединяется при помощи β -субъединицы РНК-полимеразы. Чаще всего таким нуклеотидом и, следовательно, 5'-концевым становится пуриновый рибонуклеотид. После его присоединения наступает этап *элонгации*, который состоит в образовании фосфодиэфирной связи с очередным нуклеотидом. После образования небольшого полинуклеотида (10–20 нуклеотидов) происходит удаление σ (сигма)-фактора и РНК-полимеразы, постепенно раскручивая ДНК и перемещаясь, синтезирует молекулу РНК.

РНК-полимераза не обладает нуклеазной активностью и, следовательно, не может исправлять ошибки, поэтому вероятность появления ошибок при транскрипции иРНК в 10^4 – 10^5 раз больше, чем при репликации ДНК. Однако синтезированная с ошибками РНК не передается следующему поколению и легко заменяется РНК с нормальной последовательностью.

Терминация транскрипции. Это завершающий этап транскрипции. РНК-полимераза, перемещаясь по матрице, достигает особой терминирующей последовательности, диссоциирует с матрицы, высвобождая первичный транскрипт. Терминатор образован палиндромной последовательностью, богатой ГЦ парами, которая формирует шпильку, на конце которой располагается несколько уридиловых нуклеотидов (рис. 11.10).

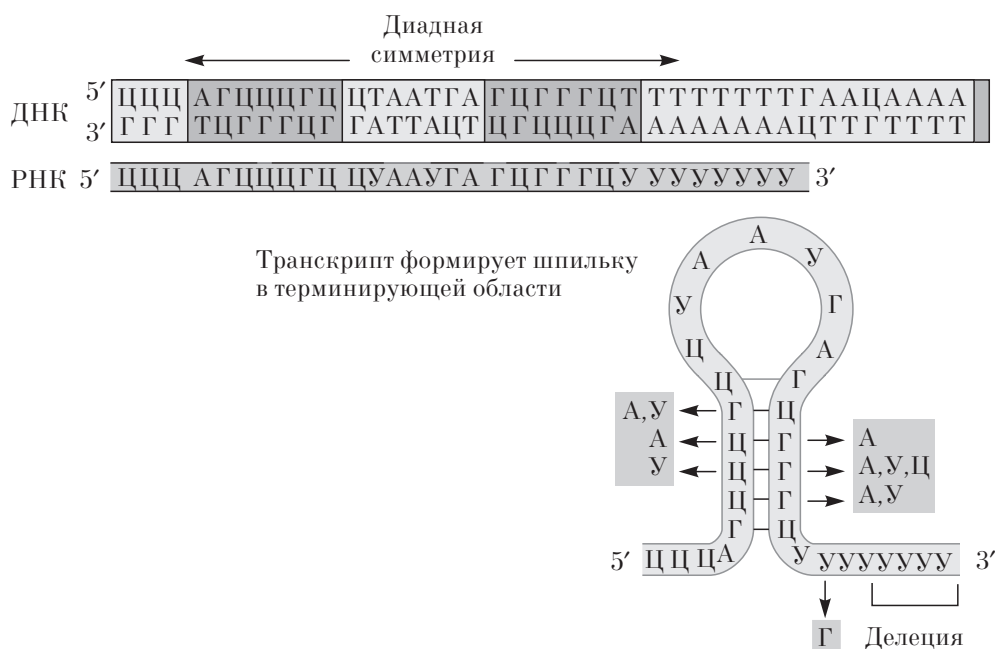


Рис. 11.10. Терминация транскрипции

У некоторых микроорганизмов в процессе терминации транскрипции может принимать участие специфический дополнительный белковый фактор ρ , представляющий собой гексамер с М.М. 275 тыс. а.е.м. и состоящий из одинаковых субъединиц. ρ -Фактор связывается с особыми сайтами растущей нити РНК, следует по ней за РНК-полимеразой и в области терминирующей последовательности вытесняет фермент с матрицы.

РНК-полимераза II по окончании транскрипции одной РНК у эукариот может вновь вступать в этап инициации синтеза новой молекулы РНК.

11.4.4. Процессинг

Продукты транскрипции — первичные транскрипты — у эукариот составляют основную массу гетерогенной ядерной РНК (гяРНК). Первичные транскрипты вступают в цепь биохимических реакций, которая приводит к их созреванию — образованию активных тРНК, рРНК, а у эукариот и иРНК. Совокупность таких реакций называют *процессингом*.

У прокариот первичный транскрипт тРНК и рРНК под влиянием РНКазы III распадается на молекулы — предшественники основных рРНК и тРНК, которые затем превращаются в свои активные формы при участии экзонуклеаз. У эукариот первичные транскрипты рРНК и тРНК образуются на разных генах.

В первичном транскрипте тРНК вначале удаляются концевые участки, затем модифицируются отдельные основания, к 3'-концу присоединяется три-нуклеотид ЦЦА и удаляется интрон (*сплайсинг*). рРНК эукариот синтезируется в форме предшественника РНК-полимеразой I, затем при участии эндонуклеаз распадается на основные рРНК (18S, 28S и 5,8S). Информационная РНК прокариот не претерпевает особых изменений и может еще до окончания синтеза вступать в процесс трансляции.

Наиболее сложным является процессинг иРНК у эукариот. Он включает метилирование и кэпирование 5'-конца, полиаденилирование 3'-концевого отдела и сплайсинг (рис. 11.11).

Кэпирование пре-мРНК включает добавление 7-метилгуанозина к 5'-концу иРНК. В этом процессе участвуют три фермента. Фосфатаза и гуанозилтрансфераза катализируют присоединение остатка ГТФ к 5'-концу фрагмента пре-иРНК с образованием 5',5'-фосфодиэфирной связи. Метилтрансфераза катализирует метилирование гуанина в составе ГТФ «кэпа» и завершает его образование. Это происходит еще в начале транскрипции. В последующем возможно метилирование и других рядом расположенных нуклеотидов. «Кэп» защищает 5'-конец первичного РНК-транскрипта от действия рибонуклеаз, которые обладают специфичностью к 3',5'-фосфодиэфирным связям.

При завершении элонгации РНК-полимераза II синтезирует последовательность 5'-ААУААА-3', которая служит сигналом процесса *полиаденилирования*. Мультисубъединичный белковый комплекс, включающий полиА-полимеразу, присоединяется к сигнальной последовательности и катализирует присоеди-

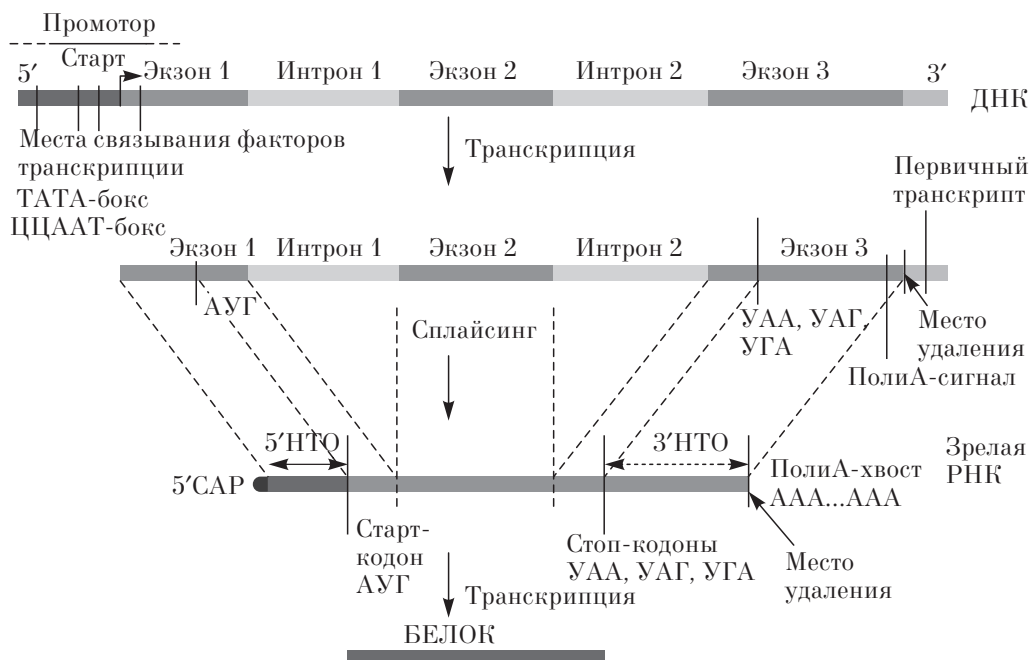


Рис. 11.11. Сплайсинг иРНК у эукариот (НТО — нетранслируемая область)

нение до 200 адениловых нуклеотидов, формируя полиадениловый хвост молекулы, который облегчает выход иРНК из ядра, замедляет гидролиз нуклеазами, тем самым увеличивая время ее жизни, и служит в качестве сигнала узнавания для рибосомы.

Первичный транскрипт иРНК представляет копию транскриптона и содержит как *экзоны* — последовательности, несущие информацию о структуре определенных участков молекулы белка, так и *интроны* — некодирующие последовательности. Формирование молекул «зрелой» мРНК требует удаления неинформативных областей. Интроны вырезаются из первичного транскрипта, а концы экзонов соединяются друг с другом — эту реакцию называют **сплайсингом РНК**.

Процесс удаления интронов протекает при участии малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП), которые образуют комплексы — *сплайсосомы*. мяРНП состоят из мяРНК, связанной с белковым остовом, в который входит несколько протомеров. Отдельные мяРНП по принципу комплементарности узнают специфические последовательности интронов в первичном транскрипте, катализируют реакцию расщепления 3',5'-фосфодиэфирной связи на границе экзона с интроном и последующее соединение двух экзонов. После завершения сплайсинга «зрелая» иРНК становится значительно короче первичного транскрипта. Сплайсинг происходит в ядре, в цитозоль переносится уже «зрелая» мРНК.

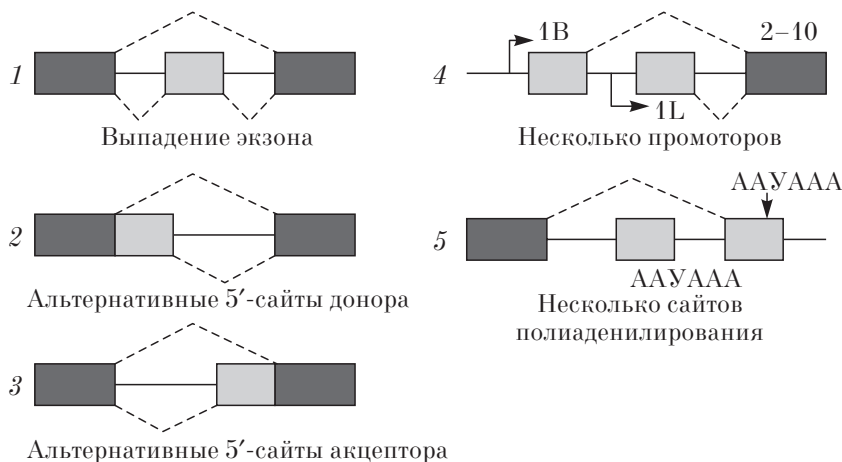


Рис. 11.12. Возможности альтернативного сплайсинга

Процессинг иРНК создает условия для образования разных иРНК из одной молекулы первичного транскрипта РНК, что широко используется для специфической экспрессии одного и того же гена в разных клетках. Это становится возможным прежде всего благодаря альтернативному сплайсингу (рис. 11.12). При этом может происходить селективное удаление экзонов (1) или могут использоваться разные сайты полиаденилирования (5). Вместе с интронами возможно удаление и частей экзонов благодаря существованию нескольких альтернативных 5'-участков сплайсинга в экзоне-доноре, что изменяет 3'-границу этого экзона (2) или несколько 3'-участков сплайсинга в экзоне-акцепторе, что меняет его 5'-границу (3).

У человека 94 % генов подвержено альтернативному сплайсингу. Так, например, результатом сплайсинга первичного транскрипта гена кальцитонина в щитовидной железе является иРНК, кодирующая кальцитонин, который регулирует обмен кальция. Сплайсинг такого транскрипта в клетках мозга приводит к формированию иРНК, экспрессирующей кальцитонин-подобный пептид (нейропептид).

Нарушения механизмов сплайсинга могут быть причиной болезней. Так, например, для одной из разновидностей β -талассемии характерна мутация в области соединения интрона и экзона, что вызывает нарушение сплайсинга: один из интронов не удаляется, что становится причиной нарушения синтеза β -цепи гемоглобина.

Еще одним механизмом, ведущим к возникновению разных иРНК из одного первичного транскрипта иРНК, является **редактирование** — процесс, в ходе которого информация, содержащаяся в молекуле РНК, изменяется путем химической модификации оснований в первичном транскрипте.

Примером такого редактирования может служить механизм синтеза белка *аполипопротеина В* (апоВ). В печени экспрессия гена, кодирующего этот

белок, приводит к образованию апоВ-100 с М.М. 512 кДа (4536 аминокислот). В кишечнике при транскрипции этого гена образуется иРНК, в которой при участии дезаминазы цитидина кодон ЦАА превращается в терминирующий кодон УАА в строго специфическом месте молекулы, который останавливает трансляцию с образованием белка с молекулярной массой 241 кДа, что составляет 48 % от апоВ-100 (апоВ-48).

11.4.5. Обратная транскриптаза

Как уже упоминалось, догма молекулярной биологии указывает, что информация в клетке хранится в молекулах ДНК и при участии РНК-полимераз передается от ДНК на РНК. Однако, как оказалось, первичный генетический материал некоторых животных, растений и вирусов может быть представлен молекулами РНК.

Х. Темин и Д. Балтимор (США) в 1970 г. выделили из ретровирусов (РНК-зависимых вирусов) фермент, который катализировал образование ДНК, используя в качестве матрицы молекулу РНК. Фермент получил название *РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза)*. Используя в качестве субстратов дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, обратная транскриптаза катализировала синтез цепи ДНК с образованием гибридной (РНК-ДНК) двойной спирали. Затем специфическая РНКаза Н катализировала гидролиз цепи РНК, а оставшаяся цепь ДНК использовалась в качестве матрицы для синтеза второй цепи ДНК. Таким образом генетическая информация передавалась от РНК на ДНК. Как оказалось, обратной транскриптазой обладают некоторые из онкологических вирусов. Присутствие этого фермента может быть индикатором ретровирусной инфекции.

Малые ядерные РНК (мяРНК) — это небольшие молекулы, которые построены из 90–300 мононуклеотидов и содержат большое число уридина. Взаимодействуя со специфическими белками, они формируют мяРПС, которые, связываясь с транскриптами РНК в области экзон-интроновых соединений, формируют сплайсосомы, катализирующие процессы сплайсинга.

Кроме того, мяРНК поддерживают целостность теломер в ДНК, участвуют в регуляции транскрипции.

Функция РНК в сплайсосомах — пример ферментативной активности РНК-рибозимов. Рибозимы катализируют распад специфических последовательностей нуклеотидов и придерживаются закономерностей кинетики Михаэлиса–Ментен. Ферментативная активность РНК была обнаружена в 1980-х гг. (Т. Чех и С. Альтман). Принято считать, что нуклеиновые кислоты в предклеточную эру эволюции играли роль биологических катализаторов и к настоящему времени эта их ферментативная активность сохранилась в сплайсосомах, пептидилтрансферазах, которые участвуют в синтезе белков на рибосомах.

Кроме уже названных видов РНК, имеется многочисленная группа некодирующих РНК, куда входят *малые ядерные РНК (мядрРНК)*, которые

построены из нескольких десятков нуклеотидов (до 70) и образуют комплексы с белками. Такие комплексы обеспечивают модификации нуклеотидов в РНК.

Еще один тип малых РНК — *микроРНК*. Классические микроРНК — это один из классов малых некодирующих РНК эндогенного происхождения, выполняющих в клетках функцию регуляции активности определенных генов на посттранскрипционном уровне и принимающих участие в развитии, дифференцировке, пролиферации и апоптозе клеток, а также участвующих в опухолевом процессе. Размеры молекул микроРНК составляют приблизительно 21–23 нуклеотида. Нередко такие РНК синтезируются из интронов первичного транскрипта РНК в период сплайсинга.

Интерференционная РНК — короткие двухцепочечные РНК, длиной приблизительно 21–25 оснований, которые могут остановить работу соответствующего гена. РНК-интерференция — наиболее быстрый способ выключить гены. И микроРНК, и интерференционная РНК вызывают снижение синтеза белков в клетках. Результатом действия интерференционной РНК чаще является разрушение иРНК, микроРНК — торможение трансляции РНК.

Интерференция РНК — естественный биологический инструмент, посредством которого маленькие двухцепочечные молекулы РНК подавляют генную экспрессию. Приготовленная искусственным путем интерференционная РНК рассматривается как мощный метод торможения генов в случае различных патологических состояний.

Механизмы действия малых некодирующих РНК стали основой для развития антисмысловой терапии. Последовательность нуклеотидов в иРНК несет определенный смысл — информацию о структуре белковой молекулы. Нуклеотид, комплементарный такой РНК, — антисмысловой. Если такой антисмысловой олигонуклеотид (РНК или ДНК) добавить к иРНК во время трансляции, синтез белков будет остановлен. Небольшие олигонуклеотиды (приблизительно 7–10 пар оснований) могут действовать как антисмысловые молекулы. Наиболее сложным в этой стратегии является введение антисмысловых нуклеотидов в клетку. Для этой цели используют липосомы или проникающие в клетку пептиды.

11.5. Трансляция

Трансляция — это управляемый РНК синтез белка. Процесс требует участия всех типов РНК. Хотя химическая реакция формирования пептидной связи является относительно простой, процессы, ведущие к ее образованию в клетке, чрезвычайно сложны. Матрицей для правильного добавления отдельных аминокислот служит иРНК. тРНК переносят активные аминокислоты на рибосомы и считывают информацию. Рибосомные РНК, являясь структурными организаторами рибосом, обеспечивают надлежащее расположение иРНК, организуют взаимодействие с ней тРНК и катализируют образование пептидной связи. Основные участники механизма трансляции приведены в табл. 11.2.

Таблица 11.2

Основные участники трансляции

Участники	Функции
Аминокислоты	Субстраты для синтеза белков
тРНК	Переносят аминокислоты, связываясь с ними акцепторным участком, и выполняют функцию перевода (адапторы), используя антикодоновый участок
Аминоацил-тРНК-синтетазы	Катализируют реакции активирования аминокислот, обеспечивая соединение аминокислоты со специфической тРНК
иРНК	Матрица, определяющая первичную структуру молекул белков
Рибосомы	Субклеточные структуры, место синтеза белков, катализируют образование пептидной связи
АТФ, ГТФ	Источники энергии
Белки — факторы инициации (eIF), элонгации (eEF) и терминации (eRF)	Нерибосомные белки, обеспечивающие начало синтеза (eIF), удлинение полипептидной цепи (eEF) и окончание синтеза (eRF)
Ионы магния	Стабилизируют рибосомы, участвуют в использовании макроэргов

Трансляция — цитозольный процесс. иРНК транслируется от 5'- к 3'-концу. В синтезированной полипептидной цепи первая аминокислота — N-концевая, и рост цепи происходит к С-концевой аминокислоте.

Процесс трансляции удобно разделить на фазы:

- активирование аминокислоты (рекогниция);
- инициация;
- элонгация;
- терминация;
- посттрансляционный процессинг.

11.5.1. Генетический код и его свойства

В основе процессов передачи информации между нуклеиновыми кислотами (репликация, транскрипция) лежит принцип комплементарности между азотистыми основаниями, однако в процессе трансляции такой принцип исключается из-за различий в структуре азотистых оснований и аминокислот и их количества (4 основания в нуклеиновых кислотах и 21 аминокислота в белке). Предполагалось существование некоего «кода», позволяющего оценить, каким образом последовательность азотистых оснований в нуклеиновой кислоте определяет последовательность аминокислот в белке. Этот «код» получил название *генетического, биологического, нуклеотидного или аминокислотного кода*. Простой расчет показывал, что 21 аминокислоту можно закодировать, если единица кода будет представлена тремя азотистыми основаниями ($4^3 = 64$), т.е. код должен быть триплетен. Это было блестяще подтверждено М. Ниренбергом и Г. Маттеи (США), которые в начале 1960-х гг. расшифровали

все 64 кодона. Оказалось, что аминокислоты кодируются 61 кодоном, а три кодона (УАА, УАГ, УГА) выполняют роль терминирующих кодонов.

Каждому кодону соответствует только одна определенная аминокислота, что указывает на высокую специфичность генетического кода, однако аминокислот 21, а кодонов — 61, т.е. одна аминокислота может быть закодирована несколькими триплетами (рис. 11.13). Эта избыточность кодонов получила название *вырожденности кода*. У человека одним кодоном шифруются только две аминокислоты — Мет и Три; у Лей, Сер и Арг — по шесть кодонов, у Ала, Вал, Гли, Про, Тре — по четыре.

Избыточность кодонов чрезвычайно важна. Она повышает устойчивость генетической информации к возможным изменениям во внешней и внутрен-

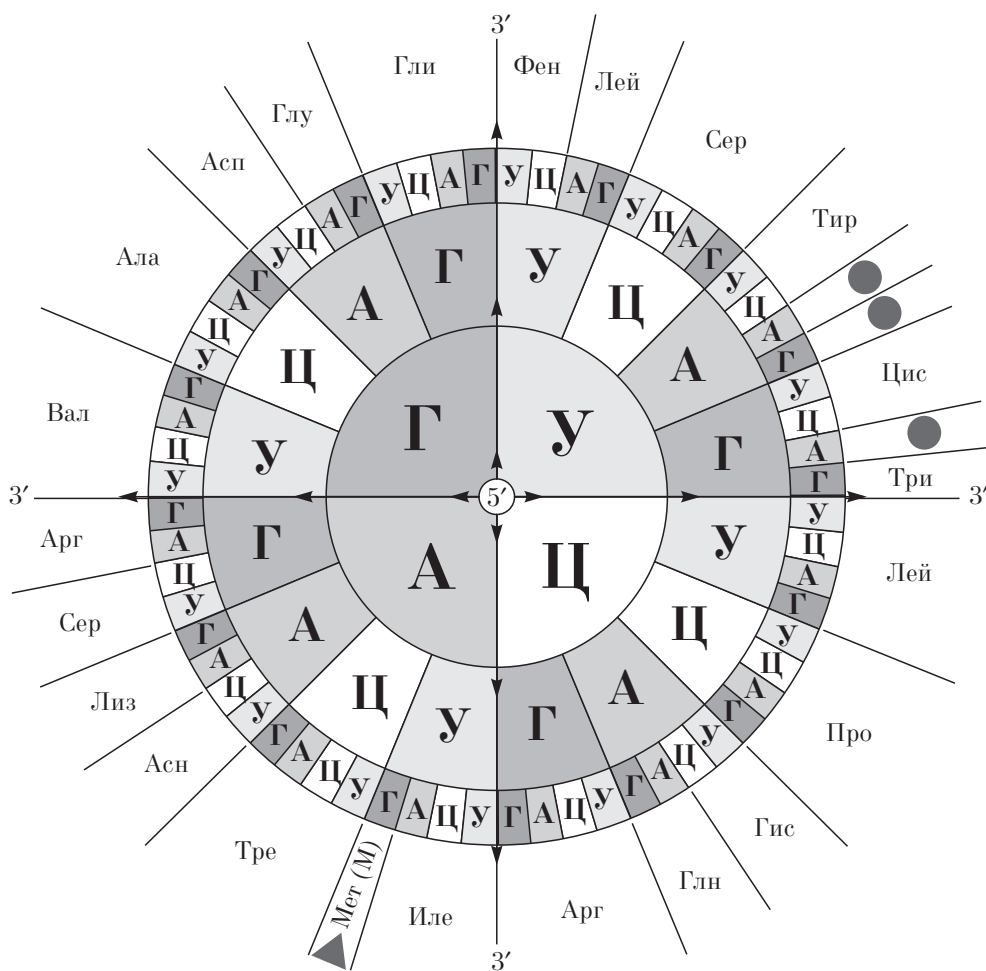


Рис. 11.13. Таблица генетического кода:

▶ — старт; ● — стоп

ней среде. При определении природы аминокислоты, которая должна быть включена в белок, третий нуклеотид в кодоне не имеет столь важного значения, как первые два. Это снижение требовательности к комплементарности между третьим основанием кодона и соответствующим ему основанием антикодона получило название *качания*. Образование пар в этом месте во время трансляции может колебаться (*теория качания*). Например, 5'-ГГУ-3', 5'-ГГЦ-3' и 5'-ГГА-3' — кодоны глицина; все три будут узнаваться антикодоном 3'-ЦЦИ-5' (I — инозиновая кислота) в тРНК для глицина.

Код *непрерывен*, т.е. последовательность нуклеотидов не разделена на отдельные фрагменты из трех нуклеотидов. Но код и *неперекрываем*, что означает, что нуклеотиды одного кодона не могут использоваться для кодирования другой аминокислоты в процессе считывания. Правда, линейное соответствие последовательности кодонов гена и последовательности аминокислот в кодируемом белке (*коллинеарность*), характерное для прокариот, может нарушаться при помощи интронов у эукариот, у которых аминокислотная последовательность колинеарна последовательности экзонов в гене или зрелой иРНК после посттранскрипционного удаления интронов.

Долгое время код считали универсальным для всех изученных организмов: вирусов, бактерий, растений, земноводных, млекопитающих. Однако оказалось, что у прокариот и в митохондриях несколько триплетов отличаются от кодонов ядерной иРНК. Так, в митохондриях УГА кодирует Три, АУА — Мет, а АГА и АГГ используются как дополнительные стоп-кодоны.

11.5.2. Активирование аминокислоты (рекогниция)

Молекулы тРНК имеют сходные функции и трехмерные структуры. Адапторная функция молекул тРНК требует взаимодействия каждой конкретной тРНК со своей специфической аминокислотой. Поскольку нуклеиновые кислоты не обладают сродством к конкретным функциональным группам аминокислот, такое узнавание обеспечивается белковой молекулой, способной распознавать как молекулу тРНК, так и специфичную для нее аминокислоту. В этом процессе участвуют, по крайней мере, 20 ферментов.

Реакция распознавания и взаимодействия протекает в два этапа и катализируется ферментом аминоацил-тРНК-синтетазой. Фермент вначале образует активный промежуточный аминоацил-АМФ-ферментный комплекс (рис. 11.14), который затем распознает специфическую тРНК и присоединяет аминоацильный остаток к 3'-ОН-группе аденилового нуклеотида на акцепторном участке этой тРНК. В такой форме аминокислота находится до момента включения ее в механизм трансляции.

Пирофосфат, выделяющийся в ходе этой реакции, гидролитически расщепляется с образованием двух молекул ортофосфата и выделением энергии, что делает реакцию активации аминокислот необратимой.

Высокая специфичность aa-тРНК-синтетаз в связывании аминокислоты с соответствующими тРНК лежит в основе точности трансляции генетической

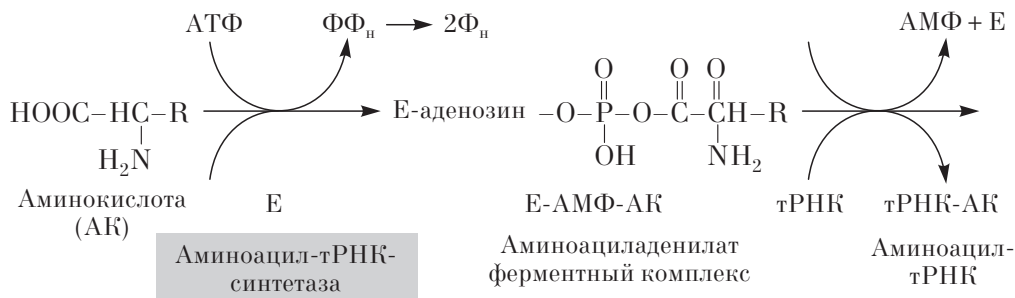


Рис. 11.14. Схема реакций присоединения аминокислоты к тРНК, опосредованного аминокислот-тРНК-синтетазой

информации. Поэтому эти ферменты образно называют *кодазами*. Активный центр аа-тРНК-синтетазы содержит четыре специфических участка для узнавания: аминокислоты, тРНК, АТФ и молекулы H_2O , необходимую для гидролиза ошибочных аминокислот-адезилатов. Благодаря такому корректирующему механизму, позволяющему удалять ошибочно присоединенные аминокислотные остатки, резко снижается вероятность ошибки (менее чем 1 на 10 тыс.).

11.5.3. Инициация трансляции

Дальнейший процесс трансляции зависит исключительно от комплементарного взаимодействия кодонов иРНК и антикодона на тРНК. В *инициации* трансляции принимают участие иРНК, пул аминокислот-тРНК, включая специфическую иницирующую тРНК-мет, рибосому и нерибосомные белки, называемые факторами инициации eIF (эукариотические факторы инициации трансляции).

Инициация трансляции включает:

- 1) образование преиницирующего комплекса, состоящего из иницирующей мет-тРНК, eIF-2, ГТФ и свободной 40S субъединицы рибосомы;
- 2) связывание этого комплекса с иРНК;
- 3) соединение с субъединицей 60S и образование комплекса инициации 80S.

Формирование преиницирующего комплекса начинается со связывания ГТФ с eIF-2, затем сюда присоединяется мет-тРНК и субъединица 40S рибосомы (рис. 11.15). Образуется преиницирующий комплекс 43S, который взаимодействует с иРНК в области «кэпа» и перемещается по ней до встречи с иницирующим кодоном АУГ. Антикодон Мет-тРНК^{Мет} связывается с кодоном АУГ, что сопровождается присоединением к комплексу 60S-субъединицы рибосомы, гидролизом ГТФ и удалением факторов инициации. На рибосоме формируются **аминоацильный (А)** и **пептидильный (Р)** центры. Мет-тРНК^{Мет} оказывается в Р-центре рибосомы, а в А-центре — первый смысловой кодон иРНК (на рис. 11.15 — это АЦЦ). Кроме eIF2, в процессе инициации участвует более 10 факторов инициации.

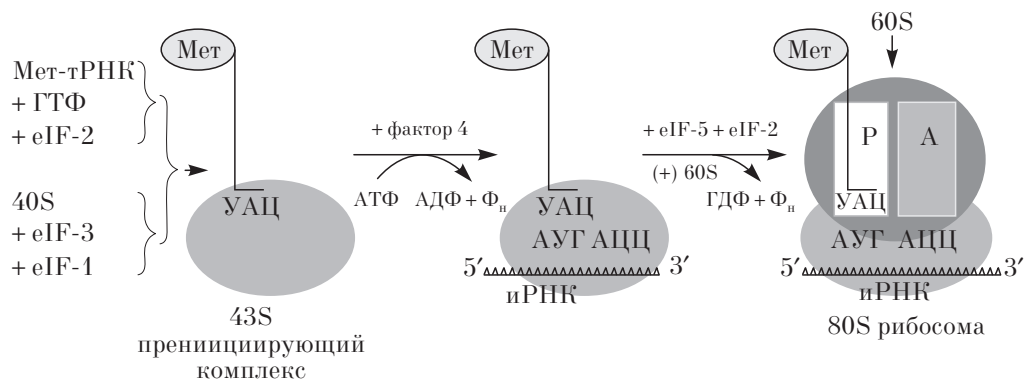


Рис. 11.15. Инициация трансляции

11.5.4. Элонгация

Этап элонгации включает три последовательные стадии:

1) связывание следующей аа-тРНК^{аа} в А-центре с затратой энергии ГТФ и участием фактора элонгации EF-1 (на рис. 11.16 — это Три-тРНК^{Три});

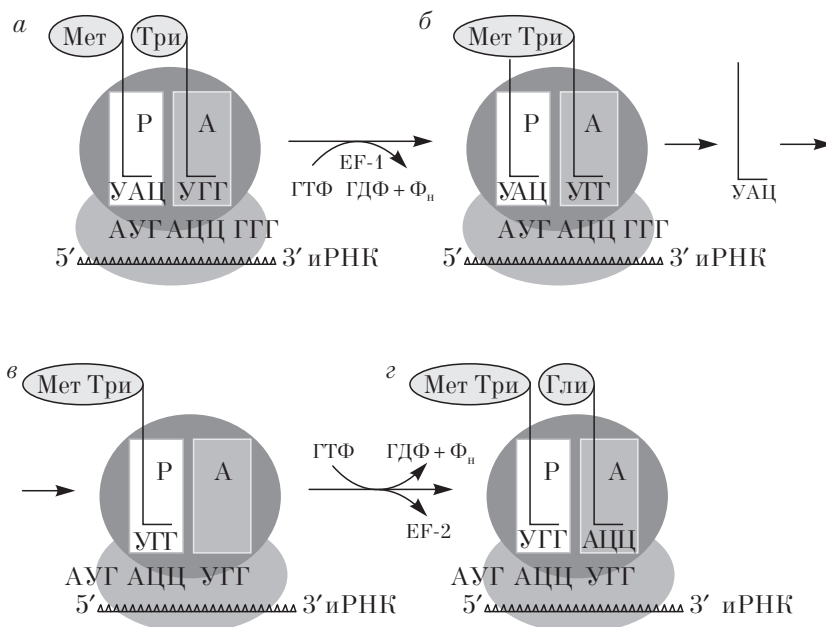


Рис. 11.16. Этап элонгации в ходе трансляции:

а — поступление новой аминокислоты в А-центр; б — образование пептидной связи между метионином и триптофаном; в — удаление тРНК и транслокация дипептида в Р-центр; г — поступление глицина в А-центр

2) образование пептидной связи, которое катализируется пептидилтрансферазой. Этот фермент представляет собой пример рибозима, активный центр которого формируется рРНК, входящей в состав большой субъединицы рибосомы;

3) перемещение рибосомы по иРНК на один кодон в направлении от 5'-к 3'-концу с использованием энергии ГТФ (транслокация) при участии фактора EF-2.

11.5.5. Терминация

При попадании в А-центр одного из стоп-кодонов (УАГ, УГА, УАА) синтез полипептидной цепи прекращается (*терминация*) (рис. 11.17).

С такими кодонами начинают взаимодействовать белковые факторы терминации RF-1 и RF-3 (от англ. releasing factor), которые при участии пептидилтрансферазы обеспечивают гидролитическое отщепление синтезированного полипептида от тРНК, а также освобождение тРНК из пептидильного центра и диссоциацию рибосомы на субъединицы с затратой энергии молекулы ГТФ.

Занимая участок, равный примерно 80 нуклеотидам иРНК, каждая рибосома может располагаться на иРНК с интервалами в 100 нуклеотидов. Поэтому в трансляции одной мРНК могут участвовать одновременно несколько рибосом (*полисома*).

Регуляция инициации у эукариот обеспечивается фосфорилированием остатка серина в α -субъединице eIF-2 (eIF-2 α). Фосфорилированный eIF-2 не способен к обмену ГДФ на ГТФ, и синтез белка останавливается. Этот механизм регуляции используется при многих стрессовых состояниях (голодание, недостаток аминокислот, недостаток гема, вирусная инфекция). Существуют уникальные протеинкиназы для eIF-2 α . Выключая синтез большинства белков, они одновременно стимулируют экспрессию факторов транскрипции, которые регулируют синтез белков, участвующих в механизмах апоптоза.

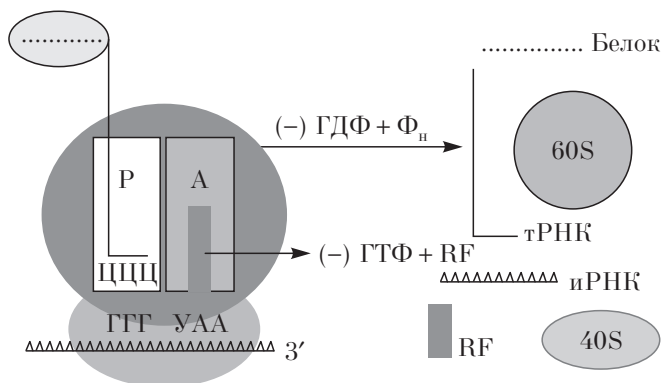


Рис. 11.17. Этап терминации в ходе трансляции

11.5.6. Посттрансляционный процессинг

Во время синтеза полипептидной цепи возможен ее протеолиз, однако этого не происходит благодаря специальным белкам, которые взаимодействуют с растущей полипептидной цепью. При достижении длины примерно в 70 аминокислотных остатков полипептидная цепь формирует новый комплекс — SRP (англ. signal recognition particle), который защищает гидрофобную часть сигнального пептида от протеаз и обеспечивает проход этой цепи через мембрану ЭР (рис. 11.18), где сигнальный пептид удаляется при помощи специальной сигнальной пептидазы. В дальнейшем такие белки при помощи других специфических сигнальных последовательностей в своей структуре могут направляться в комплекс Гольджи, лизосомы, плазматическую мембрану или секретироваться клеткой.

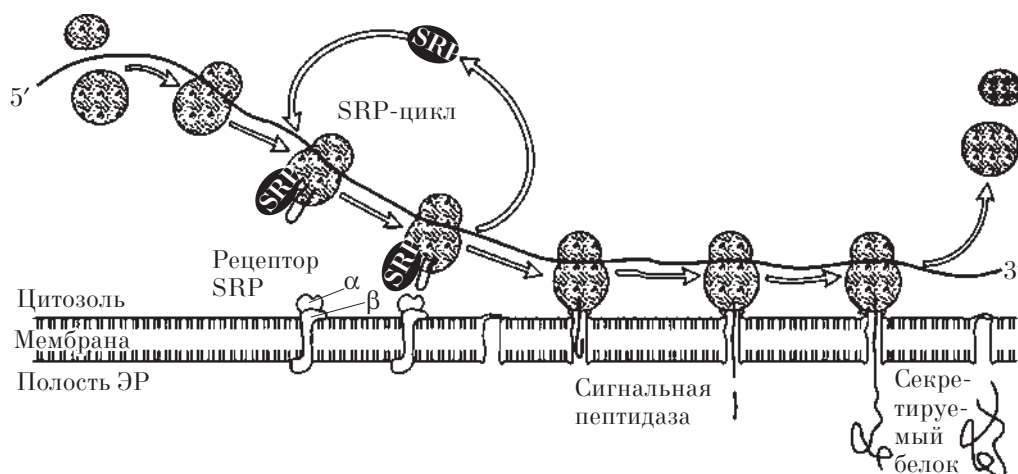


Рис. 11.18. Роль комплекса SRP в доставке новосинтезированного пептида в эндоплазматический ретикулум

Если у белка отсутствует сигнальный пептид на N-конце, то растущая полипептидная цепь взаимодействует со специальной системой белков теплового шока (англ. HSP — heat shock protein). Такие белки (HSP 70 и HSP 40) образуют комплекс с растущей полипептидной цепью, сдерживая ее неспецифическую агрегацию и распад под действием внутриклеточных протеаз, обеспечивают формирование правильной, специфичной для цепи пространственной организации (фолдинг). Сигнальные последовательности в структуре таких белков обеспечивают направленную доставку их в ядро, митохондрии, пероксисомы или цитозоль.

11.5.7. Модификация белковых молекул после трансляции

Синтезированные на рибосомах белки часто функционально неактивны и могут подвергаться преобразованиям в эндоплазматической сети, аппарате Гольджи, цитозоле, секреторных пузырьках, межклеточных пространствах и даже в секретах желез, превращаясь в свои активные формы. Механизмами таких преобразований могут быть:

- *ограниченный протеолиз* — специфический гидролиз пептидных связей, способствующий образованию активного белка. Примерами могут служить гидролиз проинсулина в секреторных пузырьках β -клеток поджелудочной железы, образование кортикотропина и других гормонов из проопиомеланокортина в гипофизе, превращение пропептидаз (пепсиногена, трипсиногена, протромбина и др.) в активные формы, ограниченный протеолиз рецепторов тромбина и др.;

- *образование дисульфидных связей* между остатками цистеина — важно для окончательного формирования пространственной структуры и для проявления активности многих белков (инсулина, иммуноглобулинов, рибонуклеазы и др.);

- *соединение белков с небелковыми группами* — присоединение олигосахаридов в аппарате Гольджи, взаимодействие ферментов с ФАД, ФМН, ТПФ и другими простетическими группами и коферментами, соединение гема с глобином, присоединение фарнезила, геранила, жирных кислот (пренилирование) к «заякоренным» белкам мембран и др.;

- *сборка отдельных полипептидных цепей* (субъединиц) с образованием белков с четвертичной структурой;

- *специфическая модификация аминокислотных остатков*, необходимая для проявления функций белков: гидроксилирование остатков Про и Лиз в молекулах коллагенов; карбоксилирование остатков Глу в факторах свертывания крови (II, VII, IX, X); метилирование остатков Арг и Лиз в молекулах гистонов; йодирование остатков Тир в белке щитовидной железы — тиреоглобулине; фосфорилирование гидроксильных групп в остатках Сер, Тре и Тир (при проведении сигнала в клетку).

11.6. Механизмы регуляции количества белков в клетке

Эффективность метаболических процессов в клетке во многом определяется количеством молекул белков, задействованных в этих процессах, поэтому регуляция количества белков — важная составляющая адекватной реакции клетки на изменения окружающей среды.

При условии адекватного поступления всех незаменимых факторов, необходимых для синтеза, объектами регуляции синтеза белков в клетке могут

быть механизмы транскрипции, механизмы процессинга РНК, «продолжительность жизни» иРНК, механизмы трансляции, посттрансляционная модификация белковых молекул, механизмы протеолиза, внутриклеточный и межклеточный транспорт белковых молекул.

Несомненно, ведущей мишенью действия регуляторов является начальный этап экспрессии генома — инициация транскрипции.

Экспрессия генов для отдельных белков может происходить с относительно постоянной скоростью — *конститутивная экспрессия*. Она характерна, например, для генов, кодирующих ферменты основных метаболических путей. Конститутивная экспрессия обеспечивается базовыми элементами транскриптона. Экспрессия других белков может вызываться действием внешних сигналов. Такой процесс называют *индукцией*, а экспрессируемые таким образом белки — *индуцибельными*. Процесс торможения экспрессии действием внешних сигналов называют *репрессией*. Примеры механизмов регуляции транскрипции приведены ниже.

Классический пример механизма регуляции транскрипции у бактерий — управление работой лактозного оперона (*lac*-оперона) *E. coli* (рис. 11.19). Он содержит промотор, оператор и три гена: *lac Z*, *lac Y* и *lac A*, кодирующие три фермента: β-галактозидазу, β-галактозидпермеазу и трансацилазу, необходимые для усвоения бактериями лактозы. Транскрипция всех генов оперона регулируется синхронно.

Во-первых, активность РНК-полимеразы контролируется при помощи специфических белков-репрессоров или белков-активаторов. Кроме того, для взаимодействия с опероном РНК-полимераза *E. coli* должна связаться с небольшим белком — σ-фактором.

Во-вторых, транскрипция *lac*-оперона управляется *lac*-репрессором и катаболитным активаторным белком — **САР** (англ. catabolite activator protein), каждый из которых связывается со специфическими последовательностями нуклеотидов в области, которая управляет транскрипцией *lac*-оперона (рис. 11.19, а).

Lac-репрессор связывается с участком ДНК, получившим название «оператор», нуклеотидная последовательность которого перекрывается с участком связывания РНК-полимеразы — промотором. *Lac*-репрессор — продукт экспрессии специального гена-регулятора, состоит из четырех субъединиц. В присутствии лактозы он теряет способность связываться с оператором. В среде с недостатком лактозы *lac*-репрессор, наоборот, связывается с оператором и блокирует присоединение РНК-полимеразы — синтеза иРНК не происходит. Клетка не тратит энергию и субстраты на синтез ферментов, которые ей не нужны в данный момент.

САР состоит из двух субъединиц. Его способность связываться с опероном обеспечивается взаимодействием с цАМФ. Количество цАМФ увеличивается по мере снижения концентрации глюкозы в клетке. Комплекс САР–цАМФ в 10–20 раз увеличивает активность РНК-полимеразы.

Для поддержания своей жизнедеятельности клетка обычно использует глюкозу, транскрипция *lac*-оперона при этом репрессирована (рис. 11.19, б). Если к среде, содержащей глюкозу, добавлять лактозу, то подключение *lac*-оперона будет усиливаться по мере повышения соотношения лактоза/глюкоза. Снижение количества глюкозы (рис. 11.19, г) вызовет повышение уровня цАМФ и способность CAP связываться с опероном, а репрессор, в свою очередь связавшись с лактозой, освободит оператор и позволит РНК-полимеразе транскрибировать гены оперона и экспрессировать белки, необходимые для усвоения

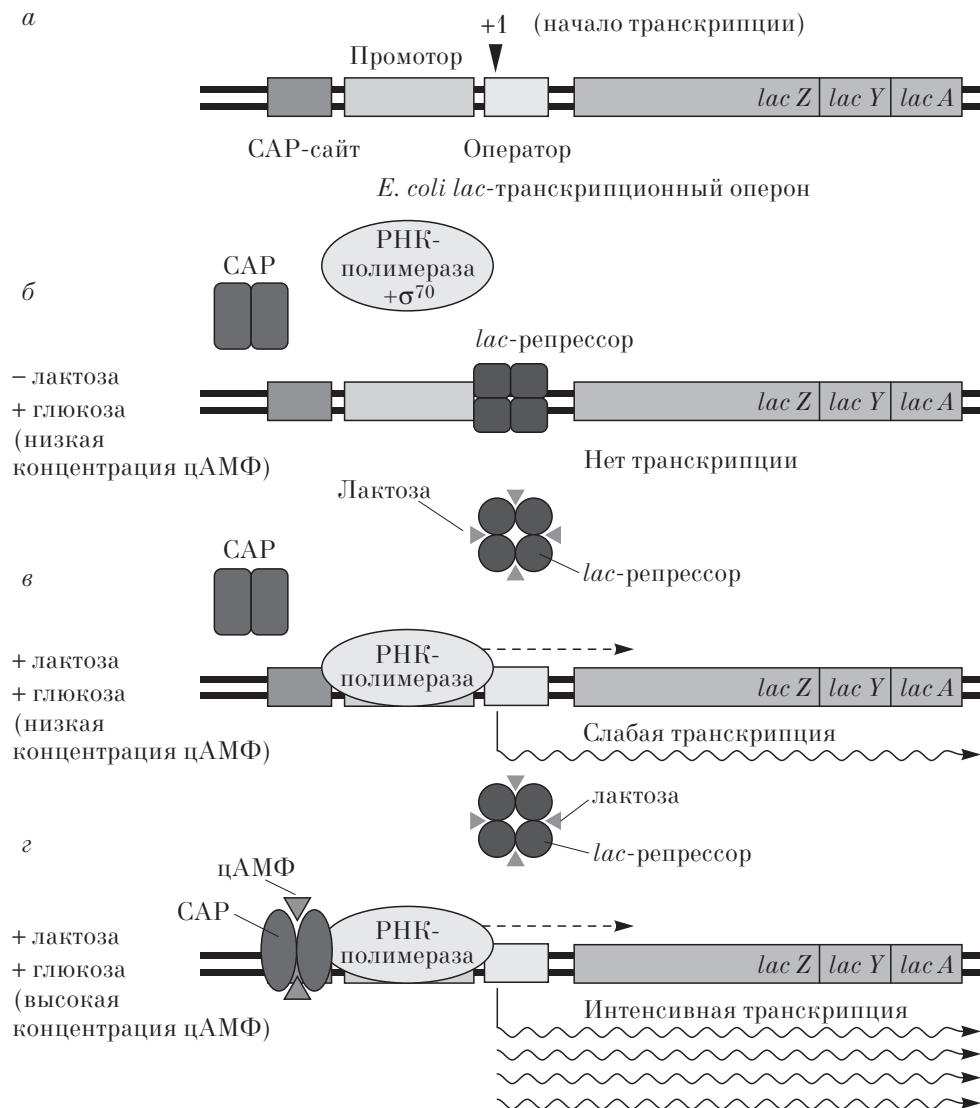


Рис. 11.19. Схема, иллюстрирующая работу *lac*-оперона у *E. coli*

лактозы. Гидролиз лактозы и появление глюкозы станет причиной снижения экспрессии *lac*-оперона (рис. 11.19, в).

На примере индукции белков у микроорганизмов видна биологическая целесообразность контроля белкового синтеза на уровне транскрипции. Этот же механизм приобретает решающую роль в процессе дифференцировки клеток многоклеточного организма.

Выше уже упоминалось о сложности устройства регуляторной области транскриптона. В организме человека имеется более 200 различных типов клеток, которые существенно различаются своей структурой и функциями, хотя имеют практически одинаковый набор генов. У одних клеток ряд транскриптонов стабильно репрессируется на протяжении всей жизни клетки, у других эта репрессия может проявляться только на определенном этапе или являться следствием влияния факторов внешней среды (адаптивная регуляция).

В дифференцированных клетках можно выделить участки плотно упакованного хроматина (гетерохроматин), в которых ДНК не транскрибируется, и участки, имеющие более рыхлую упаковку, которые способны связывать РНК-полимеразу (эухроматин). В разных типах клеток области эухроматина расположены в разных участках генома. Области эухроматина характеризуются более высокой чувствительностью к действию ДНКаз, молекулы гистонов в них модифицированы путем метилирования или ацетилирования аминогрупп радикалов Лиз и Арг, а остатки Сер фосфорилированы. Это снижает суммарный положительный заряд гистонов и ослабляет связь нуклеосом с ДНК.

Определенное значение в регуляции состава и содержания белков имеют посттранскрипционные превращения пре-мРНК в процессе альтернативного сплайсинга, изменение стабильности РНК в разные периоды жизни клетки. Описаны примеры влияния факторов среды на сродство рибосом к мРНК, посттрансляционные модификации полипептидных цепей и изменения продолжительности жизни белковых молекул.

Количество синтезируемых белков зависит также от изменения количества структурных генов. Число копий отдельных генов может возрастать (амплифицироваться), если возникает необходимость увеличить синтез определенного генного продукта. Так, в ответ на повышение концентрации тяжелых металлов (медь, ртуть, кадмий, цинк и др.) в крови в тканях происходит амплификация гена металлотионеина. Продукт экспрессии этого гена — низкомолекулярный белок, способный связывать тяжелые металлы и защищать клетки от отравления ими.

Встречаются случаи утраты генетического материала. Они отмечаются в процессе образования В-лимфоцитов разных клонов и классов, в процессе дифференцировки клеток кроветворной системы и образования эритроцитов. В последнем случае происходит потеря всего генома за счет разрушения ядра и митохондрий.

Таким образом, клетки эукариот обладают значительно более широким набором механизмов, поддерживающих определенный уровень белков, необходимых для их жизнедеятельности.

11.7. Яды и лекарственные вещества, действующие на синтез нуклеиновых кислот и белков

Остановка любого из матричных синтезов опасна для клеток и может вызвать их гибель. Описана довольно большая группа разных по структуре природных и синтетических соединений, являющихся ингибиторами матричных синтезов. Многие из них являются сильными ядами для человека.

Рицин — белок, выделенный из семян клещевины, представляет собой гетеродимер, одна субъединица которого обладает свойствами N-гликозидазы. За счет этой ферментативной активности происходит депуринизация молекулы рибосомной 28S РНК в консервативной последовательности 5'-АГУАЦГАГАГГА-3', называемой сарцин-рициновой петлей, которая важна для связывания факторов элонгации. Вследствие этого синтез белка на рибосоме полностью и необратимо блокируется. Каждая молекула этого фермента выводит из строя до 1500 рибосом в минуту, что вызывает нарушение процесса синтеза белка на рибосомах. Вторая субъединица рицина способствует проникновению этого белка в цитозоль клетки.

Причиной гибели людей при отравлении белой поганкой *Amanita phalloides* является токсин **α -аманитин**, который содержится в теле гриба и вызывает необратимую дисфункцию печени и почек. Токсичность соединения обусловлена его способностью ингибировать РНК-полимеразы, прежде всего РНК-полимеразу II, катализирующую синтез мРНК.

Энтеротоксин возбудителя дифтерии *Corynebacterium diptheriae* ингибирует синтез белков в клетках слизистой оболочки зева и гортани, что обуславливает чрезвычайно тяжелое течение болезни. В цитоплазме клеток под влиянием протеолитических ферментов токсин расщепляется на два фрагмента, один из которых является АДФ-рибозилтрансферазой. Субстратом фермента является фактор элонгации FE-2, модификация которого нарушает транслोकацию рибосом, прекращает биосинтез белков в инфицированных клетках и вызывает их гибель.

Однако многие ингибиторы матричных биосинтезов получили известность как лекарственные средства и нашли применение в медицине. Наиболее широко используются антибиотики, образующиеся в процессе жизнедеятельности микроорганизмов и способные оказывать избирательное токсическое действие на синтез ДНК, РНК или белка в про- или эукариотических клетках.

Противоопухолевые препараты — ингибиторы репликации. В молекуле антибиотиков *даунорубицина*, *доксорубицина* содержится циклическая структура, которая встраивается («интеркалирует») между комплементарными основаниями Г=Ц, нарушая структуру ДНК и ингибируя репликацию и транскрипцию. Избирательность действия этих препаратов невелика и основана на том, что опухолевые клетки, как правило, часто делятся и их мембрана более проницаема, чем у клеток нормальных тканей. В то же время эти препараты токсичны для быстроделящихся клеток организма (стволовых клеток крове-

творной системы, клеток слизистой оболочки желудка и кишечника, фолликулов волос).

В лечении онкологических заболеваний используют также **алкилирующие препараты** (мелфалан, цисплатин, циклофосфамид), которые взаимодействуют с азотистыми основаниями ДНК, образуют внутри- и межпочечные сшивки и нарушают репликацию.

Антибактериальные препараты разнообразны и могут ингибировать у прокариотов любой из матричных биосинтезов.

Так, высокоактивны в отношении большинства грамотрицательных и некоторых грамположительных бактерий антибиотики из семейства *фторхинолонов* (норфлоксацин, цiproфлоксацин и др.). Эти препараты нарушают репликацию и являются мощными ингибиторами ДНК-гиразы (фермента, аналогичного топоизомеразам эукариотических клеток), отвечающей за суперспирализацию и раскручивание кольцевой бактериальной ДНК.

К ингибиторам транскрипции относятся антибиотики из семейства *рифамицинов*. Они связываются с β -субъединицей бактериальной ДНК-зависимой РНК-полимеразы и препятствуют инициации транскрипции. Антибиотики этой группы используют в лечении туберкулеза, так как они специфичны и не влияют на работу ядерных РНК-полимераз у человека.

Действие большой группы антибиотиков разных классов направлено на ингибирование трансляции у прокариотов. Все они используются в медицинской практике как антибактериальные препараты. Так, *стрептомицин* ингибирует инициацию синтеза белка в клетках патогенной микрофлоры и вызывает ошибки в прочтении информации, закодированной в мРНК. *Тетрациклины* связываются с 30S-субъединицей и препятствуют присоединению aa-тРНК в А-центр рибосомы, нарушая процесс элогации. *Левомецетин* присоединяется к 50S-субъединице рибосомы и подавляет пептидилтрансферазную реакцию. *Эритромицин* также присоединяется к 50S-субъединице рибосомы и ингибирует транслокацию.

В отличие от ингибиторов репликации, антибактериальные препараты характеризуются высокой избирательностью и сравнительно малотоксичны для человека. Это объясняется существенными различиями в структуре РНК-полимераз, РНК и белков рибосом у про- и эукариот.

11.8. Вирусы и противовирусная активность интерферонов

Течение многих вирусных инфекций сопровождается гибелью зараженных клеток. Попадая в эукариотические клетки, вирусы прекращают синтез нуклеиновых кислот и белков, характерных для данного организма, и переключают ферментные системы и энергетические ресурсы на воспроизведение вирусных частиц. Продукция вирусных частиц идет вплоть до гибели зараженной клетки.

Как противовирусные, противоопухолевые и иммуностимулирующие препараты применяют *интерфероны* — небольшие белки, гликопротеины, которые синтезируются и секретируются некоторыми клетками позвоночных (макрофагами, В- и Т-лимфоцитами, фибробластами). Связываясь с рецепторами на плазматической мембране клеток, они индуцируют синтез белков и ферментов, способных разрушать мРНК вирусов и прекращать синтез белков на рибосомах. Механизм такого их действия включает:

- индукцию синтеза фермента, катализирующего образование коротких олигоаденилатов 2',5'-олиго(А), которые активируют РНКазу. Последняя расщепляет мРНК и рРНК, необходимые для образования вирусных белков;
- синтез протеинкиназы, которая фосфорилирует фактор инициации трансляции IF-2, в результате синтез белков в зараженных клетках останавливается.

Кроме того, интерфероны повышают фагоцитарную активность макрофагов и усиливают специфическое цитотоксическое действие лимфоцитов на клетки-мишени.

Методы молекулярной биологии

Методы молекулярной биологии уже давно заняли важное место в медицине, ветеринарии, микробиологии, сельском хозяйстве и т.д. В фармации использование таких методов позволяет создавать лекарственные препараты, наладить их выпуск, исследовать механизм их действия.

12.1. Ферменты — инструменты молекулярного биолога

Основными инструментами, которыми пользуются молекулярные биологи, являются *ферменты*. Их можно разделить на несколько групп (табл. 12.1):

- рестриктазы — ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК;
- полимеразы и обратные транскриптазы (ревертазы) — ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК и РНК соответственно;
- лигазы — ферменты, соединяющие фрагменты ДНК;
- терминальные трансферазы — ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК.

Таблица 12.1

Некоторые ферменты — инструменты молекулярного биолога

Ферменты и их первооткрыватели	Действие
Рестриктазы (В. Арбер, 1962)	Фрагментация молекулы ДНК путем гидролиза обеих полинуклеотидных цепей
Ревертазы (Г. Темин, 1970)	Синтез ДНК на матрице РНК
ДНК-полимеразы (А. Корнберг, 1958)	Синтез ДНК на матрице ДНК
ДНК-лигазы (М. Геллерт, 1967)	Соединение фрагментов ДНК за счет формирования фосфодиэфирных связей между нуклеотидами
Терминальные трансферазы (Ф. Боллум, 1962)	Достраивание нуклеотидов к концам двойной спирали ДНК: к одной из нитей — пуриновых, к другой — пиримидиновых
Нуклеаза Bal31 (Х. Грей, 1975)	Отщепление 5'- и 3'-концов двойной спирали ДНК (экзонуклеазная активность)

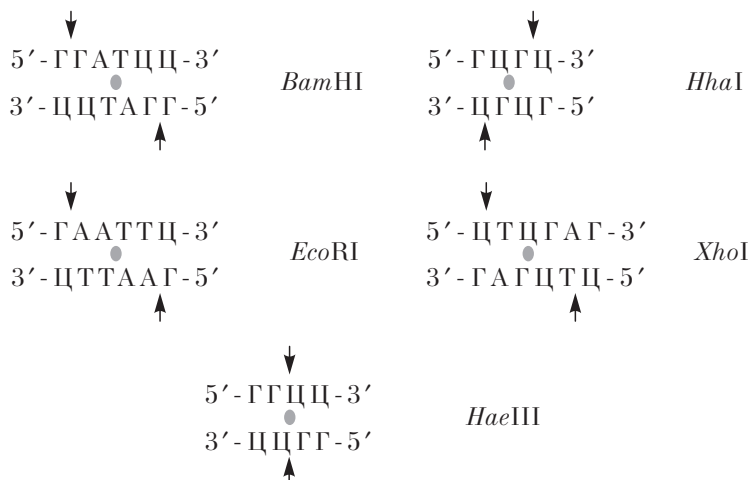


Рис. 12.1. Примеры действия рестриктаз

Рестриктазы, или *рестрикционные эндонуклеазы* (ферменты, расщепляющие ДНК), выделены из бактериальных клеток. Они узнают специфические последовательности из 4–6, реже 8–12 нуклеотидов в двухцепочечной молекуле ДНК (сайты рестрикции) и катализируют гидролиз фосфодиэфирных связей в местах локализации этих последовательностей (рис. 12.1). В большинстве случаев участки рестрикции представляют палиндромные последовательности нуклеотидов.

С помощью набора рестриктаз можно разрезать молекулу ДНК на фрагменты желаемой длины и затем разделить их методом электрофореза в полиакриламидном геле или в агарозном геле (подробнее см. главу 2). Выделено несколько сотен таких ферментов.

За выделение первой рестриктазы, изучение ее свойств и первое применение для картирования хромосом В. Арбер (Швейцария), Д. Натанс и Г. Смит (США) в 1978 г. получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине.

Для создания новых молекул ДНК нужно не только уметь разрезать исходную молекулу ДНК, но и иметь возможность соединить две полинуклеотидные цепи. Это делают с помощью ферментов *ДНК-лигаз*, которые «сшивают» сахарофосфатный остов двух цепей ДНК. Их действие во многом облегчается рестриктазами, которые, катализируя гидролиз фосфодиэфирных связей у разных нуклеиновых кислот, создают комплементарные «липкие концы», позволяющие соединить отрезки таких нуклеиновых кислот по принципу комплементарности. ДНК-лигазы соединяют отрезки разных фрагментов полинуклеотидных цепей ДНК ковалентными связями (рис. 12.2). После этого клетка не может отличить полученную молекулу от своей собственной ДНК.

Методы электрофореза широко используются для разделения и выявления нуклеиновых кислот и их фрагментов. Для электрофореза нуклеиновых

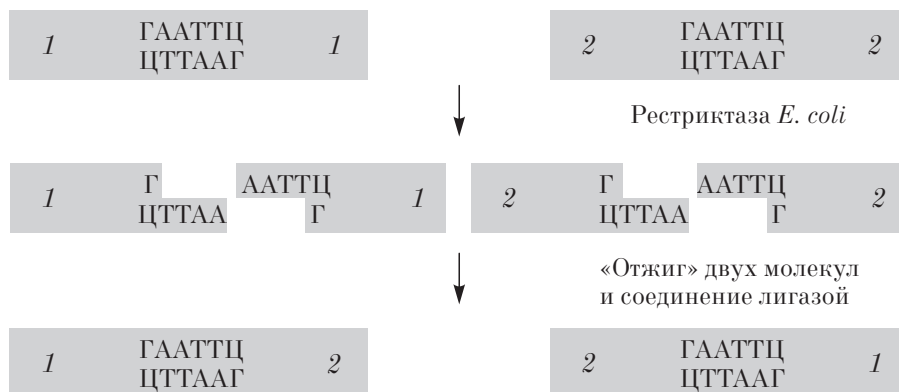


Рис. 12.2. Использование рестриктаз и ДНК-лигаз для создания рекомбинантных ДНК

кислот используют электрофорез в гелях (агарозном или полиакриламидном). Гели обычно легко повреждаются, что затрудняет дальнейшую их обработку.

В 1975 г. английский биолог Э. Саузерн предложил использовать перенос результатов электрофореза ДНК на геле на пористые пластинки (нитроцеллюлоза, нейлон) путем механического капиллярного переноса (блоттинг) или при помощи электрофореза (электроблоттинг). Обработка гелевой пластинки щелочью способствовала денатурации ДНК, разрушению примесей РНК и улучшало адсорбцию молекул ДНК и ее фрагментов к материалу пористой пластинки. В последующем метод переноса результатов электрофореза с геля на пористые механически прочные пластинки стали использовать для выделения методом электрофореза и последующего обнаружения белков (вестерн-блоттинг) и РНК (нозерн-блоттинг) (рис. 12.3).

Саузерн-блоттинг: ДНК, выделенную из линии клеток или ткани, гидролизуют рестриктазами, смесь наносят на агарозный или полиакриламидный гель и проводят электрофорез. ДНК имеет отрицательный заряд и мигрирует к аноду; меньшие фрагменты в геле движутся с большей скоростью. По окончании электрофореза, ДНК в геле денатурируют слабой щелочью и переносят на нитроцеллюлозную или нейлоновую пластинку, получая точную копию фракций, разделенных в геле. ДНК связывается с пластинкой под воздействием тепла или ультрафиолета, и пластинка затем обрабатывается меченым кДНК-зондом, который гибридизируется с комплементарными ему участками на пластинке. После тщательного промывания пластинка подвергается авторадииграфии, что позволяет выявить специфические полосы, соответствующие фрагментам ДНК, комплементарным кДНК-зонду. **Нозерн-блоттинг** проводится по такому же принципу. Вначале проводят электрофоретическое разделение РНК и затем переносят разделившиеся фракции на нитроцеллюлозную пластинку. При этом используют приемы, гарантирующие целостность РНК. Затем пластинку обрабатывают зондом и подвергают авторадииграфии.

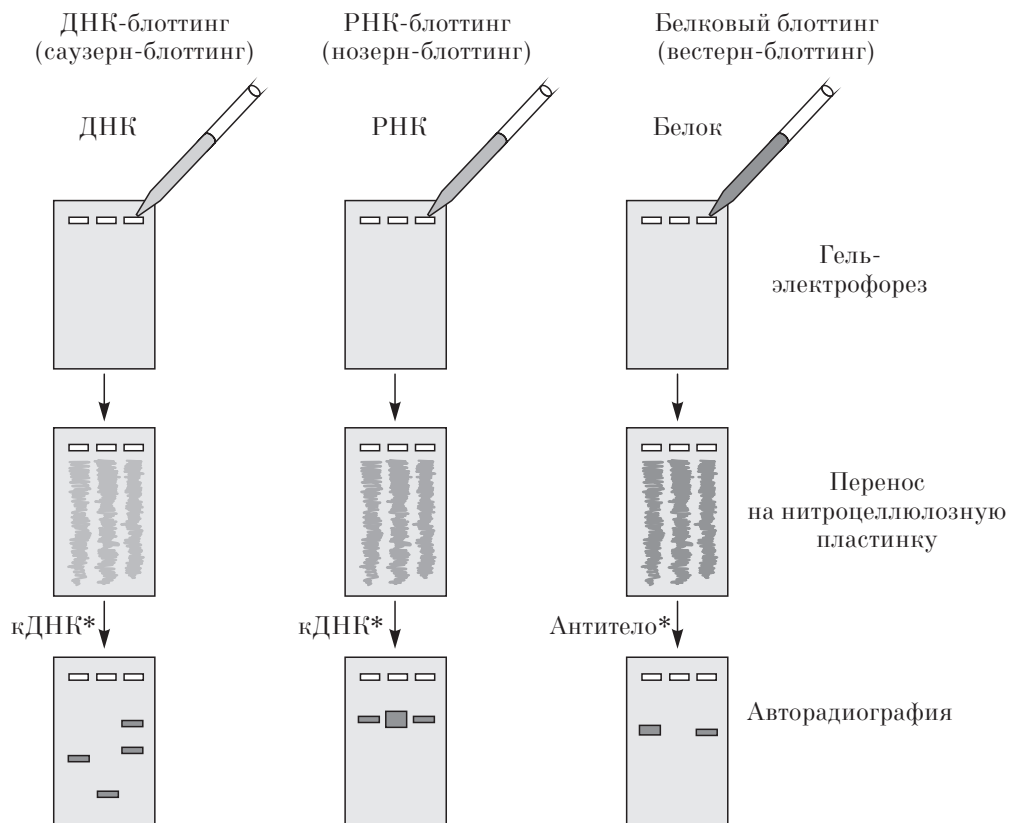


Рис. 12.3. Сравнительная характеристика разных видов блот-анализа

Вестерн-блоттинг (см. 2.4.2). В случае исследования комплексов ДНК–белок используют вестерн-саузерн блот-анализ, при котором после разделения белков и переносе на нитроцеллюлозную пластинку последнюю обрабатывают кДНК-зондом. Звездочки на рисунке обозначают наличие радиоактивной или флюоресцирующей метки.

12.2. Библиотеки комплементарных ДНК (кДНК)

Для производства определенного белка в больших количествах прежде всего необходимо выделить ген, кодирующий этот белок.

Один из подходов предполагает экстракцию ДНК из клетки и ее фрагментацию (создание библиотеки фрагментов ДНК), поиск гена в имеющихся фрагментах и, наконец, его выделение. Однако гены, кодируемые такой ДНК, содержат экзоны и интроны и не могут использоваться прокариотами из-за отсутствия у них механизмов процессинга иРНК, характерных для эукариот.

Другой подход предполагает использование библиотек комплементарных ДНК (кДНК). Такая библиотека представляет собой коллекцию молекул комплементарных ДНК, синтезируемых клеткой иРНК. Библиотеки кДНК создаются при помощи фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы). С этой целью выделяют все синтезируемые клеткой иРНК и, пользуясь ими в качестве матриц, копируют их при участии обратной транскриптазы. Тем самым создается библиотека комплементарных ДНК.

РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза) впервые выделена из ретровирусов. Такие вирусы хранят генетическую информацию в молекулах РНК и при попадании в клетку при помощи обратной транскриптазы синтезируют ДНК, которая встраивается в геном хозяина.

Известны несколько основных классов векторов*, позволяющих встраивать исследуемый нуклеотидный фрагмент в геном клетки хозяина: плазмиды лямбда-бактериофаги, хромосомы дрожжей или бактерий. Выбор определяется размерами переносимого фрагмента. Плазмиды могут переносить фрагменты размером менее 10 тыс. пар оснований, бактериофаги — до 25 тыс. пар. Для переноса более крупных фрагментов используют векторы-химеры (плазмида лямбда-вектор), называемые *космидами*. Еще более крупные фрагменты, необходимые для работы с геномом человека, переносятся с использованием хромосомы дрожжей.

На рис. 12.4 показаны этапы использования *плазмиды* в качестве вектора, переносящего молекулу ДНК для встраивания ее в *E. coli*. Молекула ДНК и плазида гидролизуются рестриктазами (EcoRI или PvuII) с образованием «липких» или «тупых» концов соответственно, а затем «сшиваются» ДНК-лигазой.

Полученный вектор вводится в бактерии, которые культивируют на плотной питательной среде. В результате образуется коллекция колоний бактерий, каждая из которых содержит плазмиды с различными встроенными молекулами ДНК. Их структура подобна молекулам, синтезированным клеткой иРНК. По сути, это библиотека векторов, содержащих кДНК.

Колонии бактерий высевает на чашки с агаром для последующего роста (так называемые *чашки хозяина*). Затем на чашки накладывают нитроцеллюлозные фильтры и снимают реплику выросших колоний бактерий. Фильтр обрабатывают щелочью для разрушения (лизиса) бактерий. ДНК плазмид денатурируют. В ходе денатурации образуются отдельные полинуклеотидные цепи, которые связываются с фильтром. Наличие на фильтре зон с одноцепочечной ДНК соответствует местоположению бактериальных колоний на чашке хозяина (рис. 12.5).

Для поиска колонии, содержащей искомый ген, фильтр обрабатывают раствором, содержащим радиоактивный зонд, комплементарный такому гену. После автордиографии реплики, обработанной зондом, на покрытой фотоэмульсией

* Вектор — автономно-реплицирующаяся в клетке-хозяине молекула ДНК, к которой можно присоединить фрагмент ДНК, чтобы обеспечить его репликацию.

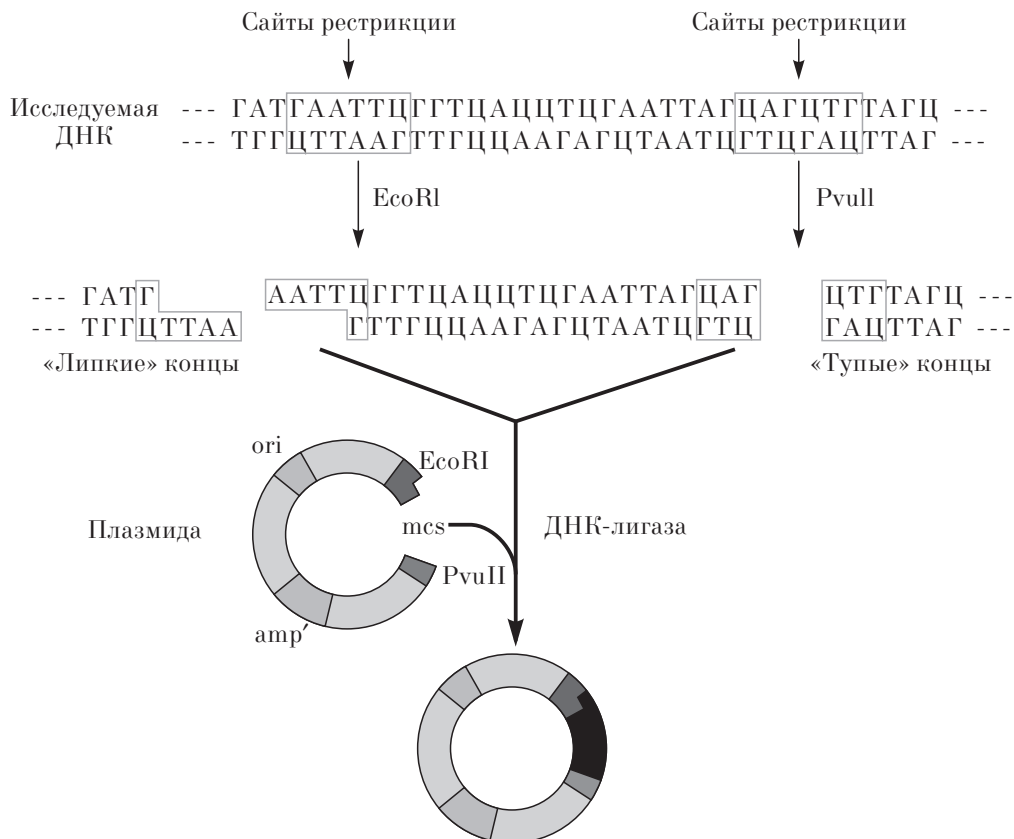


Рис. 12.4. Использование плазмид для клонирования

пластинке будет видно темное пятно, которое соответствует месторасположению на фильтре ДНК искомого гена.

Далее из соответствующей колонии выбирают бактерии, выращивают их в питательном бульоне и экстрагируют плазмидную ДНК. Она содержит в своем составе фрагмент ДНК человека с искомым геном.

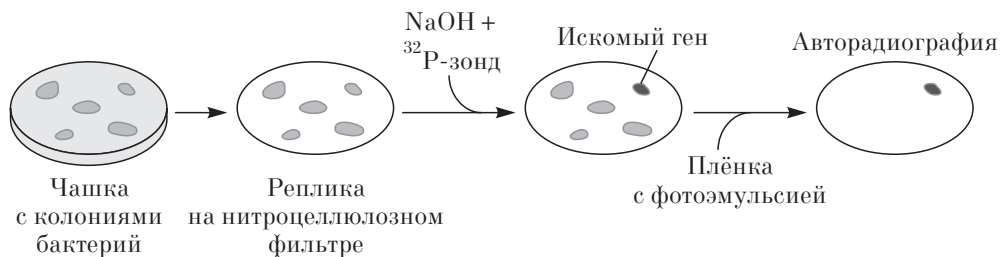


Рис. 12.5. Метод поиска гена в составе фрагмента ДНК с использованием бактериальных колоний

12.2.1. Получение геномных библиотек

Для клонирования геномной ДНК используют другие векторы. Одним из них является вектор, созданный на базе *фага лямбда*. Как уже упоминалось, такой вектор способен переносить 15–25 тыс. пар оснований ДНК. Для клонирования в дрожжевых клетках используют хромосомы дрожжей. Их называют *YAC-векторы* (англ. Yeast Artificial Chromosome). Они позволяют клонировать фрагменты геномной ДНК, которые приближаются к 3 млн пар оснований (рис. 12.6).

Эти векторы содержат несколько элементов, характерных для хромосом дрожжей: центромеру дрожжей (CEN), теломеры дрожжей (TEL) и дрожжевые автономно реплицирующиеся последовательности (ARS — autonomously replicating sequence). ARS дрожжей — по существу репликаторы, которые функционируют в дрожжевых клетках автономно от репликаторов дрожжевых хромосом. Точка начала репликации дает возможность плазмиде реплицироваться вне хромосом клеток хозяина. BamHI и EcoRI — рестрикционные

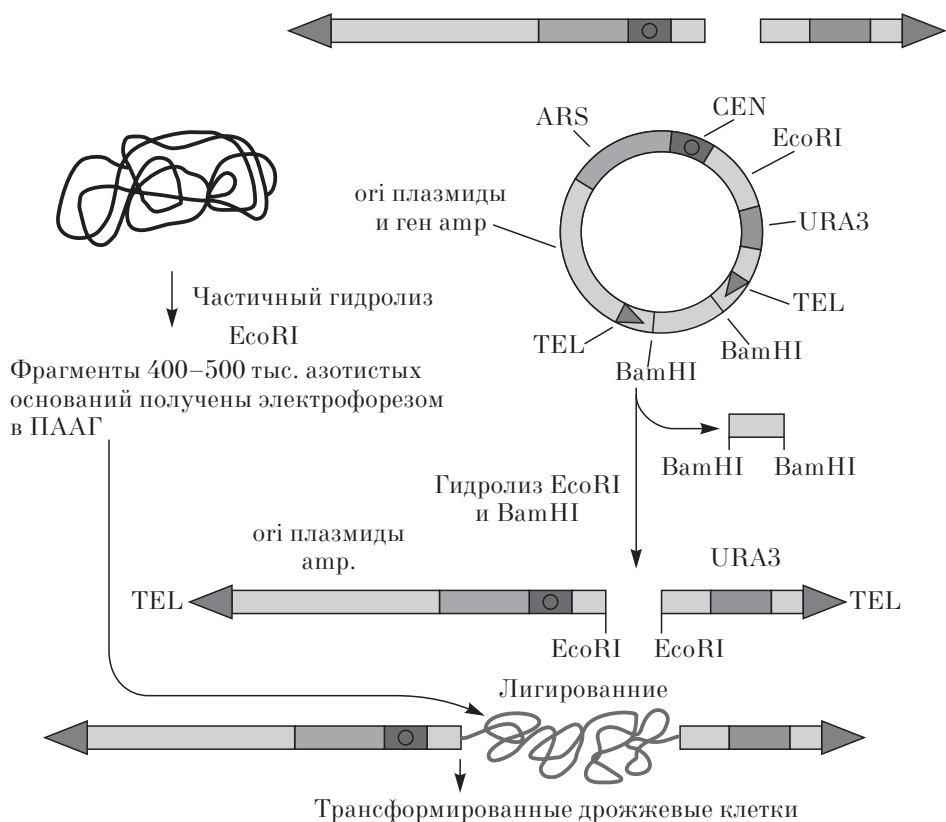


Рис. 12.6. Искусственный хромосомный вектор дрожжей (YAC-вектор)

эндонуклеазы, которые разрезают двойную спираль ДНК в строго определенных сайтах. Последовательность, обозначенная URA3, кодирует ферменты, которые служат селективными маркерами для отбора трансформированных дрожжевых клеток, несущих искусственную хромосому. Ori плазмиды и ген устойчивости к ампициллину *amp^r* — часть вектора, используемая для размножения вектора в бактериальных клетках.

12.2.2. Синтез ДНК-зондов

Цепи ДНК могут быть синтезированы автоматически путем последовательного присоединения активированных мономеров к растущей цепи, связанной с нерастворимым носителем. Удлинение нити ДНК на один мономер занимает несколько минут.

Способность быстро синтезировать нити ДНК любой заданной последовательности открывает многие экспериментальные направления. Например, синтезированный олигонуклеотид можно пометить на одном конце ^{32}P или флуоресцентной меткой и использовать для поиска комплементарной последовательности в наборе последовательностей ДНК. Так, например, можно изготовить радиоактивный ДНК-зонд, комплементарный соответствующей части гена интересующего белка, и использовать его для скрининга коллекции последовательностей ДНК на предмет выявления участка ДНК, который кодирует этот белок.

Однако чтобы осуществить этот этап работы, сначала исследуемый белок выделяют при помощи клональных антител и, используя метод тандемной масс-спектрометрии, определяют последовательность аминокислот одного из его участков. Затем, имея такую информацию и копию генетического кода, преобразуют данные в нуклеотидную последовательность и, наконец, синтезируют зонд для поиска гена интересующего белка.

Определенную сложность в таком способе создает вырожденность генетического кода, которая преодолевается синтезом нескольких зондов, с учетом особенностей кодирования аминокислот в разных клетках или группах генов.

Обнаружить клон клеток, синтезирующих искомый белок, можно и другим способом. Для этого после выращивания клеток, содержащих векторы с молекулами кДНК, делают копию выращенных колоний и лизируют их. Освободившиеся белки переносят на нитроцеллюлозный фильтр, который обрабатывают мечеными моноклональными антителами и, после инкубации, автордиографируют. Темное пятно укажет на колонию, где экспрессируется искомый белок (рис. 12.7). Колонии клеток, содержащих интересующий ген и экспрессирующих его, можно использовать для производства больших количеств нужного белка.

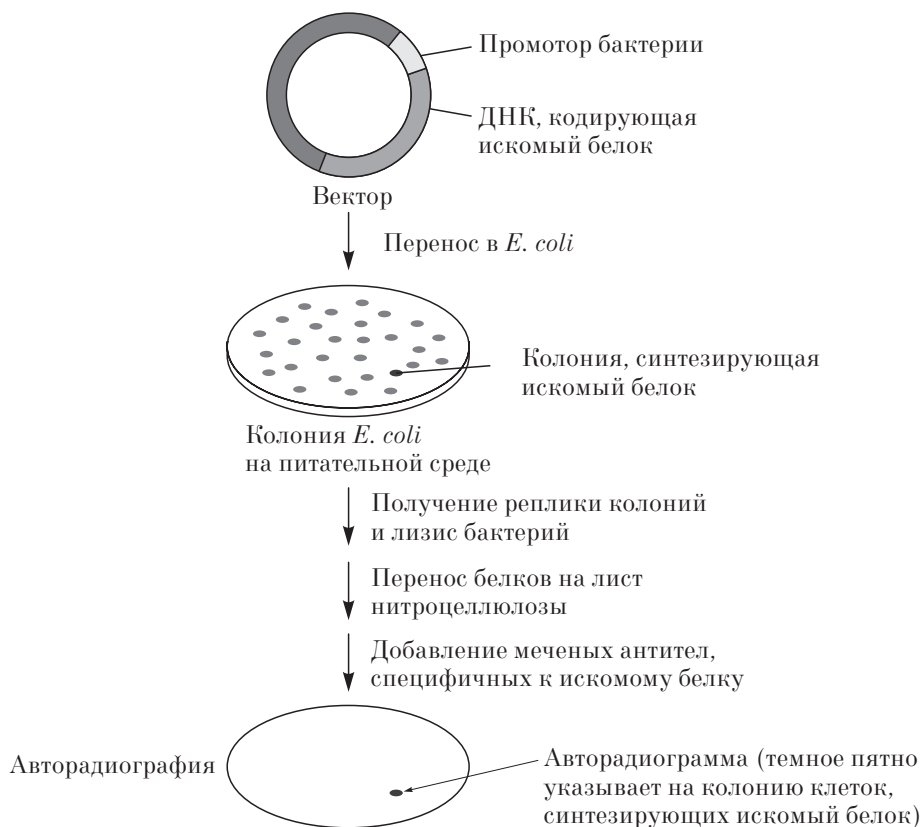


Рис. 12.7. Обнаружение клона клеток, синтезирующих искомый белок, после встраивания вектора

12.3. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)

Геном человека содержит сотни вариаций последовательности оснований, которые не влияют на фенотип. Свойство молекулы существовать в более чем одной форме известно как *полиморфизм*. Различия между мутациями и полиморфизмом ДНК: если более 1 % населения имеют частичное изменение последовательности, то это полиморфизм; если такое изменение имеют только несколько человек, то это мутация. Полиморфизм — это нормальные вариации, которые, как правило, не оказывают вредного воздействия. Мутация является ненормальной вариацией, иногда ее следствием является нарушение функции.

Существование двух или более разновидностей однотипных рестрикционных фрагментов называется *полиморфизмом длин рестрикционных*

фрагментов (ПДРФ). Он может быть использован в качестве генетического маркера. ДНК обрабатывают ферментами рестрикции (эндонуклеазами), которые расщепляют ДНК на фрагменты заданной длины. Затем проводится электрофорез в агарозном геле. После разделения фрагменты ДНК из агарозного геля переносят на нитроцеллюлозную пластинку (саузерн-блоттинг) и проводят гибридизацию с меченым зондом. Генотипические изменения могут быть установлены по результатам анализа фрагментов рестрикции.

ПДРФ может использоваться при определении родства в популяционной генетике. При генетических заболеваниях также могут происходить изменения распределения размеров фрагментов рестрикции. Примером может служить полиморфизм фрагментов рестрикции у больных серповидно-клеточной анемией (рис. 12.8). Это заболевание вызывается точечной мутацией в β -цепи гемоглобина А, где в 6-м положении у здорового человека находится глутамат, а у больного место глутамата занимает валин. Причиной указанного явления служит замена тимина на аденин в структурной части гена, кодирующего аминокислотную последовательность β -цепи гемоглобина. В результате изменяется один из сайтов ДНК, ответственных за взаимодействие с рестриктазой МСТ-II. Таким образом, мутация устраняет один из сайтов действия МСТ-II, и тогда после действия рестриктаз появляется большой фрагмент ДНК (1,35 тыс. пар оснований).

Если при этом подобный сайт в аллельном гене не изменен, действие МСТ-II сохраняется. Поэтому инкубация ДНК, полученных из АА (нормальный HbA), гетерозиготных AS и гомозиготных SS (серповидно-клеточная ане-

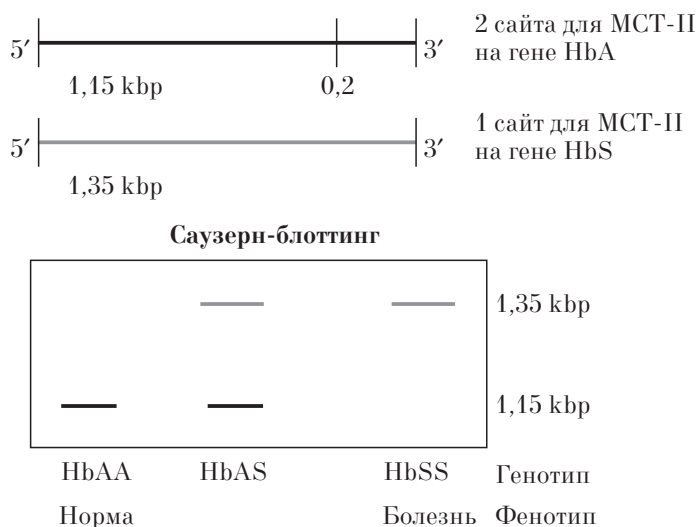


Рис. 12.8. Саузерн-блоттинг продуктов рестриктазы МСТ-II (фрагмент 0,2 не показан) (kbp — тыс. пар азотистых оснований)

мия) физических лиц, дает три различных варианта распределения фрагментов ДНК по подвижности при использовании саузерн-блоттинга.

Этот подход полезен в качестве диагностического теста на присутствие измененного аллеля у гетерозигот (без симптомных носителей) или физических лиц, у которых болезнь еще не проявляется. Такой тест информативен также для пренатальной диагностики, поскольку ДНК, полученная из клеток амниотической жидкости, может быть использована для анализа.

12.4. Геномная дактилоскопия

В хромосомах существуют тандемные повторы (TR) коротких последовательностей нуклеотидов, расположенные на разных сайтах. Число их варьируется от человека к человеку, но является уникальным для конкретного человека (вероятность сходства между двумя людьми $1:(3 \cdot 10^{10})$). Поэтому TR служат своеобразными молекулярными отпечатками пальцев. Их еще называют ДНК-профилем. В настоящее время созданы ДНК-зонды, которые могут вступать в реакции гибридизации с большим числом этих повторов и дают на электрофореграмме картины распределения повторов, специфичных для данного человека (рис. 12.9).



Рис. 12.9. Вариации тандемного повтора длин аллелей шести человек

Геномная дактилоскопия используется для точного определения виновника преступления, а также помогает установить степень родства. ДНК можно выделить из биологических материалов даже спустя значительное время.

12.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — это процедура амплификации ДНК *in vitro*, в которой могут быть получены миллионы копий определенной последовательности ДНК в течение нескольких часов. Изобрел этот метод в 1989 г. К. Муллис (США; Нобелевская премия, 1993).

Должны быть известны фланкирующие (прилежащие к 3'- и 5'-концам) последовательности исследуемого гена. Необходимо синтезировать два праймера ДНК размером приблизительно 20–30 нуклеотидов, комплементарные фланкирующей области. Цикл реакций имеет несколько этапов (рис. 12.10):

1) раскручивание (денатурация) — нити ДНК разделяются (плавление) путем нагревания при 95 °С в течение от 15 с до 2 мин;

2) присоединение праймеров (отжиг) — праймеры присоединяются при охлаждении до 50 °С в течение 0,5–2 мин. Возникают гибриды праймеров с комплементарной им одноцепочечной ДНК, полученной в первом шаге;

3) полимеризация — Taq-полимераза катализирует синтез новых нитей ДНК. Этот фермент получен из бактерий *Thermus aquaticus*, найденных в горячих источниках, поэтому он не денатурирует, сохраняя активность при высокой температуре.

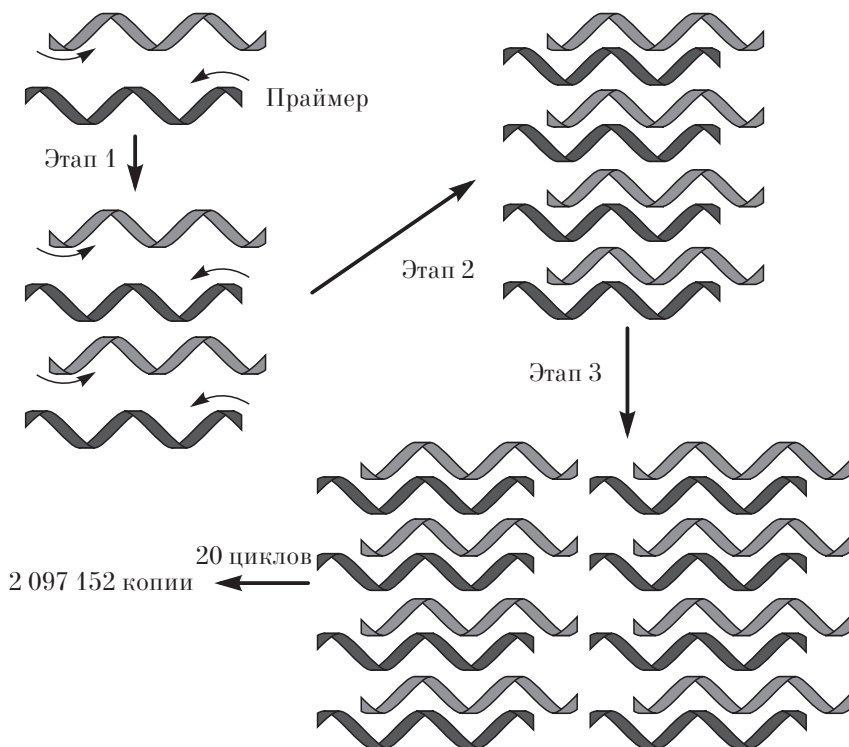


Рис. 12.10. Этапы ПЦР

Полимеразная реакция протекает при 72 °С в течение 30 с в присутствии дНТФ (всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов). Дублируются обе нити ДНК.

Этапы 1, 2 и 3 повторяются. За каждый цикл цепи ДНК удваиваются. Таким образом, 20 циклов предусматривают 10⁶ амплификаций. В настоящее время эти циклы воспроизводит автоматизированный инструмент, получивший название «термоциклер».

В настоящее время ПЦР применяют в следующих областях.

Диагностика бактериальных и вирусных заболеваний. На ранних стадиях туберкулеза мокрота может содержать очень небольшое количество микобактерий туберкулеза, так что обычно используемые методы быстрой окраски мазков могут дать отрицательный результат. Но ПЦР может обнаружить даже одну палочку, присутствующую в образце. Любая другая бактериальная инфекция также может быть обнаружена аналогичным образом. Специфическая нуклеотидная последовательность ДНК в составе микроорганизмов умножается с помощью ПЦР и затем обнаруживается с помощью саузерн-блоттинга. Этот метод широко используется в диагностике вирусных инфекций, таких как гепатит С, цитомегаловирусная инфекция, ВИЧ, при обнаружении латентных вирусов и т.д.

Судебно-медицинская экспертиза. ПЦР позволяет анализировать ДНК из фолликул волос или клеток крови. ДНК из этих и других возможных источников, размноженную с помощью ПЦР, «разрезают» рестриктазами на фрагменты, которые затем разделяют электрофорезом в агарозном геле. Рестриктазная «нарезка» ДНК одного человека высокоспецифична (см. п. 12.4). Полученную картину на электрофореграмме сравнивают с аналогичными образцами ДНК у нескольких подозреваемых. Электрофоретическая подвижность фрагментов у преступника будет полностью совпадать с выделенным образцом.

Диагностика генетических нарушений. Технология ПЦР широко используется в диагностике наследственных заболеваний для умножения и последующего обнаружения генных сегментов, которые содержат известные мутации (серповидно-клеточная анемия, талассемия, муковисцидоз и т.д.).

ПЦР важна для пренатальной диагностики наследственных заболеваний, когда клеток, полученных из плода путем амниоцентеза, очень мало.

Обнаружение опухолей. ПЦР широко используется для мониторинга остаточных аномальных клеток у больных при лечении злокачественных новообразований. Можно также идентифицировать мутации в генах онкосупрессоров, таких как *p53*, ген ретинобластомы и т.д., что может помочь выявить лиц с высоким риском развития рака.

Изучение эволюции. ДНК может быть выделена из ископаемых животных и размножена ПЦР для сравнения последовательностей нуклеотидов у вымерших и живых организмов.

12.6. Обратнотранскриптазная ПЦР

Обратнотранскриптазную ПЦР (ОТ-ПЦР) использовали для амплификации, выделения или идентификации известных последовательностей из клеточных или тканевых библиотек РНК. По существу, нормальной ПЦР предшествует обратная транскрипция для преобразования РНК в кДНК. Метод широко используется в исследовании экспрессии: определении того, когда и где экспрессируются определенные гены. Вместо Taq-полимеразы, описанной выше (см. с. 414), используют Tth-полимеразу, полученную из *Thermus thermophilus*. Этот фермент имеет как ДНК-полимеразную, так и обратнотранскриптазную активность и катализирует эти реакции при высокой температуре. Это позволяет вначале синтезировать кДНК из мРНК, а затем амплифицировать полученный продукт с помощью ПЦР.

В обычной ПЦР обнаруживают ДНК, которая может принадлежать как живым, так и погибшим организмам. В обратной ПЦР обнаруживают мРНК, что предполагает ее происхождение только из живого организма. Так, ОТ-ПЦР позволяет обнаружить присутствие РНК вируса иммунодефицита человека в крови в первые 4 недели после заражения.

12.7. Количественная ПЦР, или ПЦР в реальном времени

Метод используется для непосредственного наблюдения за измерением количества конкретного ПЦР-продукта в каждом цикле реакции. В этом методе используют:

- флуоресцентно меченые праймеры или ДНК-зонды для точного измерения количества продукта реакции по мере его накопления;
- флуоресцентный интеркалирующий краситель SYBRGreen I, который связывается с двухцепочечной ДНК.

SYBRGreen I обеспечивает простой и экономичный вариант для детекции и количественного определения продуктов в ходе ПЦР в режиме реального времени без необходимости использования специфичных флуоресцентных зондов или праймеров. В ходе амплификации краситель SYBRGreen I встраивается в малую бороздку ДНК и испускает более сильный по сравнению с несвязанным красителем флуоресцентный сигнал при облучении синим лазером.

SYBRGreen I совместим со всеми известными на сегодняшний день приборами для проведения ПЦР в режиме реального времени. Максимум поглощения для SYBRGreen I находится при длине волны 494 нм. Кроме главного, в спектре красителя имеются два небольших дополнительных максимума поглощения — при 290 нм и 380 нм. Максимум испускания для SYBRGreen I находится при длине волны 521 нм (зеленый).

12.8. Секвенирование ДНК

К 1977 г. были разработаны две технологии секвенирования ДНК. Максам и Гилберт (Maxam A.M., Gilbert W.A., США) предложили химический метод специфического расщепления молекулы по отдельным нуклеотидам. Метод, предложенный Ф. Сэнджером (Sanger F., США), основывается на синтезе комплементарной копии исследуемой ДНК с использованием в качестве субстратов дезоксинуклеозидтрифосфатов, специфического синтетического олигонуклеотида в качестве праймера и ДНК-полимеразы.

Метод Сэнджера называется *контролируемая остановка синтеза*, так как он использует вещества, обрывающие (терминирующие) рост цепи. Предположим, что для исследования в качестве матрицы берут полинуклеотидную последовательность 3'-ААЦТГЦГАЦГЦТ-5' и помещают ее в 4 пробирки (рис. 12.11). Во все пробирки добавляют фрагмент ДНК-полимеразы I (фермент Кленова, ДНК-полимераза без экзонуклеазной активности), праймер (радиоактивно меченный ТТ), дНТФ (четыре разновидности нуклеотидов). В каждой пробирке происходит синтез новой цепи ДНК, которая должна иметь последовательность 5'-ГАЦГЦТГЦГА-3'.

Вместе с дНТФ в 1-ю пробирку добавляют ддГТФ (2',3'-дидезоксиГТФ). ДНК-полимераза может использовать этот нуклеотид в качестве субстрата, но присоединение следующего нуклеотида будет остановлено, так как у ддГТФ отсутствует 3'-ОН-группа, необходимая для образования фосфодиэфирной связи. Другими словами, ддГТФ остановит рост цепи на Г. Вместо ддГТФ в этой пробирке полимеразы может добавить обычный ГТФ, тогда рост цепи будет продолжаться до следующего Г. Таким образом, в 1-й пробирке можно получить четыре олигонуклеотида: ГАЦГЦТГЦГ (9 мононуклеотидов), ГАЦГЦТГ (7 мононуклеотидов), ГАЦГ (4 мононуклеотида) и Г (1 мононуклеотид).

Во 2-ю пробирку добавляют ддАТФ и рост цепи остановится на А, т.е. во 2-й пробирке возникнут 2 олигонуклеотида: ГА (2 мононуклеотида) и ГАЦГЦТГЦГА (10 мононуклеотидов).

Подобным образом в 3-й пробирке, куда добавили ддТТФ, можно получить 1 олигонуклеотид ГАЦГЦТ (6 мононуклеотидов).

В 4-й пробирке, содержащей ддЦТФ, могут синтезироваться ГАЦ (3 мононуклеотида), ГАЦГЦ (5 мононуклеотидов) и ГАЦГЦТГЦ (8 мононуклеотидов).

Затем содержимое каждой пробирки одновременно разделяют методом электрофореза на полиакриламидном геле. Положение этих фрагментов на электрофореграмме будет соответствовать длине цепи. Например, цепь из 10 нуклеотидов будет двигаться медленнее, чем 1 мононуклеотид, который будет двигаться быстрее всех. Другие нуклеотиды будут располагаться в порядке их молекулярных размеров. Затем гель подвергают автордиографии. Излучение ^{32}P будет просматриваться в виде темных полос на пластинке, покрытой фотоэмульсией. Просматривая результаты, можно сделать вывод, что 7-е и 9-е основания представлены Г. Аналогично можно расшифровать позиции других

оснований и записать последовательность нуклеотидов во вновь синтезированной нити. Комплементарная копия этой цепи — последовательность нуклеотидов в составе ДНК, взятой в качестве матрицы.

Получение ддНТФ, меченных разными флуоресцентными красителями, намного ускорило и упростило этот метод. Реакцию проводят в одной пробирке, куда добавляют все указанные выше компоненты и окрашенные в разный цвет ддНТФ. После электрофореза электрофореграмму можно просканировать и сразу прочитать последовательность нуклеотидов (рис. 12.12).

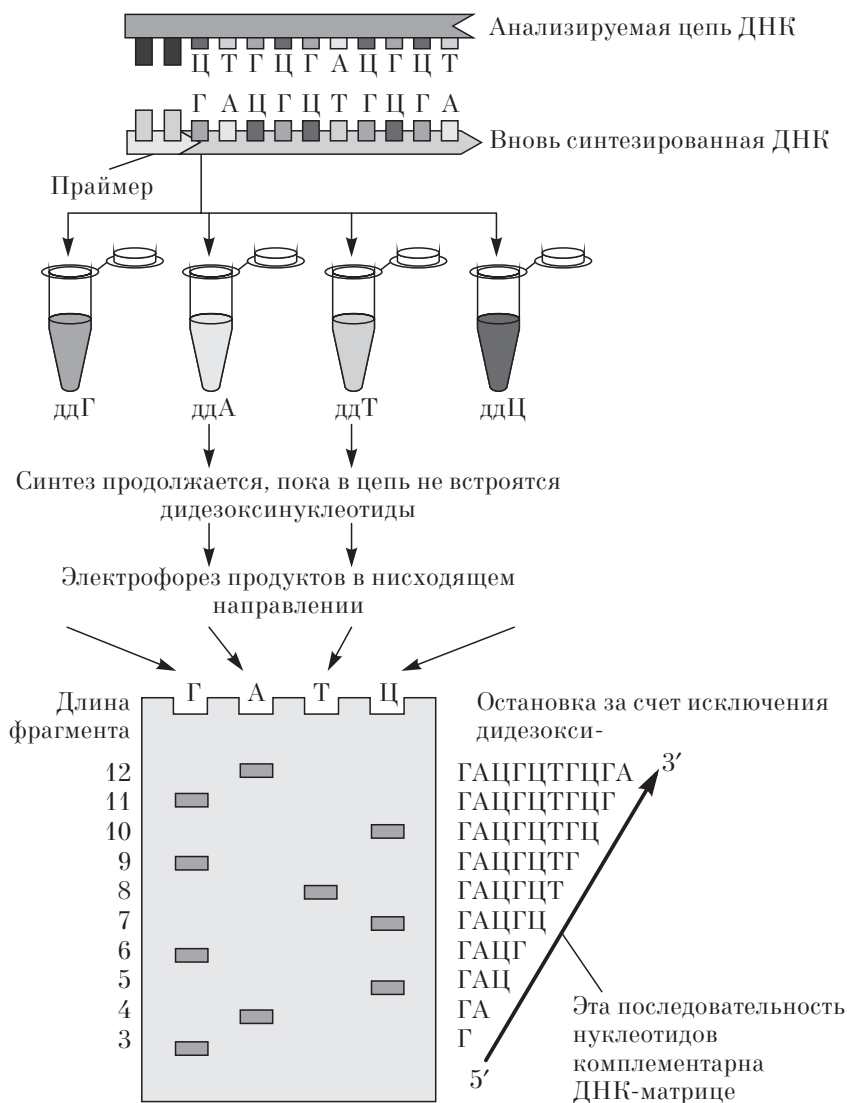


Рис. 12.11. Схема секвенирования по Сэнгеру

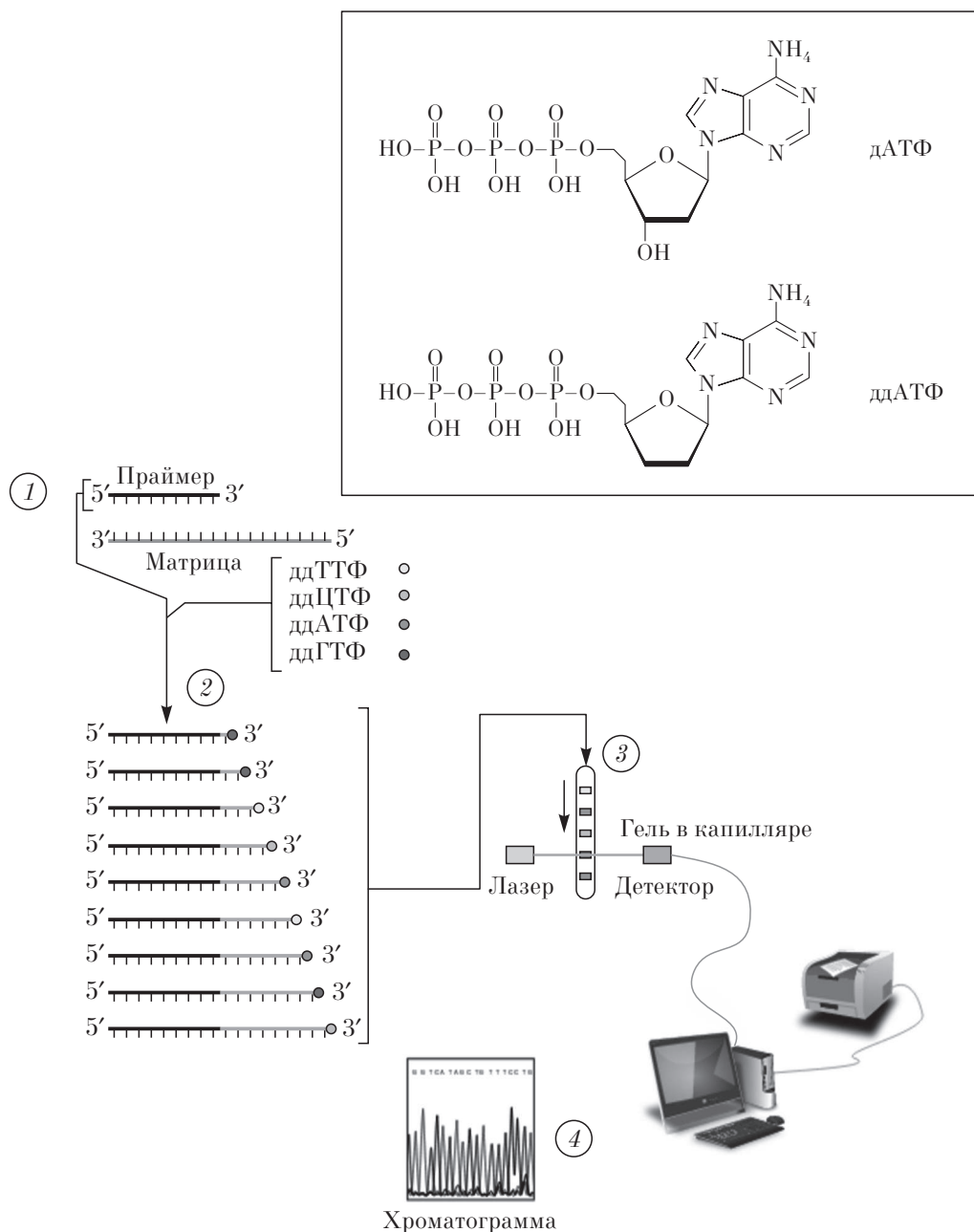


Рис. 12.12. Метод Сэнджера с применением флуоресцентных ддНТФ:

1 — реакционная смесь: праймер, ДНК-матрица, ДНК-полимераза, ддНТФ (флуорохром), дНТФ (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ); 2 — синтез и терминация; 3 — капиллярный электрофорез разделения фрагментов ДНК; 4 — компьютерная обработка данных и определение последовательности нуклеотидов

Методы секвенирования ДНК продолжают развиваться. Существующие в настоящее время методы можно разделить на две категории: классические и методы нового поколения. Метод Сэнджера считается классическим. По сравнению с новыми методами, у него есть важное преимущество: длина прочтения, т.е. количество нуклеотидов в последовательности, которое можно получить за один раз. По методу Сэнджера можно одномоментно прочитать до 1000 нуклеотидов. У методов нового поколения эта величина пока не превышает 500 нуклеотидов, увеличение же числа нуклеотидов приводит к появлению большого числа ошибок.

12.9. Трансгенез

Трансгенез — это процесс введения чужеродной ДНК (трансгена) в клетку, приводящий к появлению у нее новых свойств, которые она может передавать потомству.

Механизм внесения чужеродной ДНК в бактерии приводился на рис. 12.4 (с. 408). Он широко применяется там, где необходимо получить большое количество того или иного белка человека. В качестве примера можно привести использование этой технологии для синтеза проинсулина (рис. 12.13). Информационную РНК, экспрессирующую в клетке проинсулин, выделяют из гомогената поджелудочной железы. При помощи обратной транскриптазы получают кДНК проинсулина, которую затем переносят в кишечную палочку, используя плазмидный вектор. В результате такая бактерия продуцирует проинсулин человека.

Такие бактерии размножают в промышленных масштабах и производят необходимый белок. Используя подобную технологию, в настоящее время в промышленных количествах получены гормоны (инсулин, соматотропин), многие аминокислоты, антибиотики, вакцины и др. С помощью генетических методов получен штамм микроорганизма *Pseudomonas denitrificans*, который производит в десятки раз больше витамина С, витаминов группы В, чем исходная

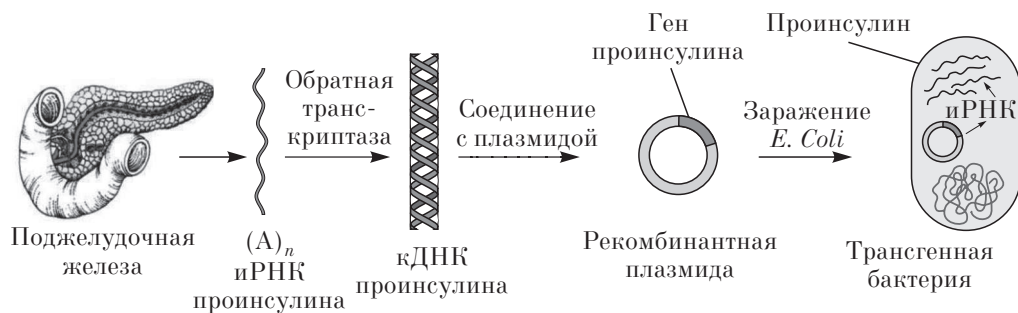


Рис. 12.13. Этапы получения культуры *E. coli*, синтезирующей молекулы проинсулина человека

форма; новый штамм бактерии *Micrococcus glutamicus* выделяет в сотни раз больше аминокислоты лизина, чем исходная (дикая) культура лизинообразующей бактерии.

Однако чаще термин «трансгенез» используется для описания процесса переноса чужеродной ДНК не в бактериальные, а в животные или растительные клетки. Среди основных способов внедрения трансгенных векторов в животные клетки можно назвать микроинъекции ДНК в пронуклеус зиготы или использование генетически модифицированных эмбриональных стволовых клеток (рис. 12.14). Участок ДНК с искомым геном (трансген) вводят в мужской пронуклеус и яйцеклетку имплантируют самкам. После успешного завершения беременности и родов у полученного потомства выявляют носителей трансгена.

Трансгенных животных используют для получения фармацевтических препаратов. Вот несколько примеров важных в медицинской практике белков человека, синтезируемых трансгенными животными: гемоглобин, белок С (антикоагулянт), α -1-антитрипсин, инсулин, вакцины (антигены), гормон роста, фактор VIII системы свертывания крови, фактор IX системы свертывания крови, фибриноген, лактоферрин и др.

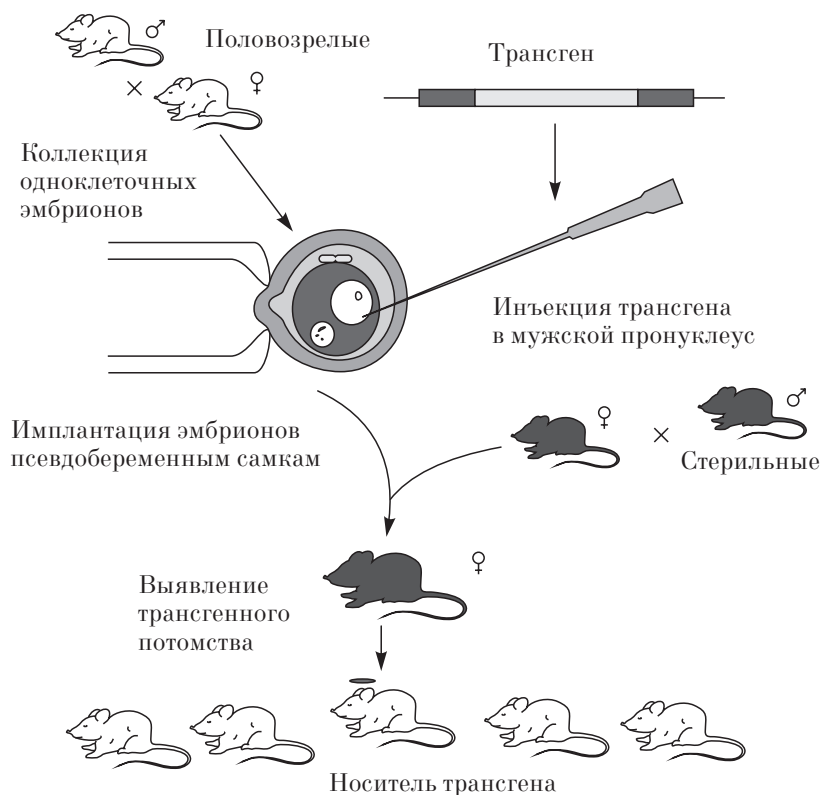


Рис. 12.14. Схема получения трансгенных животных

12.10. Генная терапия

Генная терапия определяется как введение нуклеиновых кислот (ДНК) в соматические клетки пациентов с целью получения терапевтического эффекта (либо для коррекции имеющегося генетического дефекта, либо для придания клеткам новых свойств за счет экспрессии терапевтически полезных белков).

Первым заболеванием, в лечении которого применили генную терапию, был врожденный комбинированный иммунодефицит, связанный с дефектом аденозиндезаминазы (АДА). В сентябре 1990 г. в США четырехлетней девочке, страдающей этим недугом, была проведена пересадка ее собственных лимфоцитов, предварительно трансформированных *ex vivo* геном АДА на ретровирусном носителе. Терапевтический эффект сохранялся несколько месяцев, затем потребовалось повторное введение гена. При этом ребенок нормально развивался, мог общаться со сверстниками, со временем ходить в школу, в отличие от других пациентов с подобной патологией, которые вынуждены жить в специальных камерах в условиях полной стерильности, так как любой контакт с инфекционными агентами представляет для них смертельную угрозу. К сожалению, первое успешное применение генной терапии для лечения наследственного моногенного заболевания было омрачено множественными последующими неудачами.

Разработки генной терапии на сегодняшний день остаются в большей степени проблемой фундаментальной науки, нежели реально применяемых в клинике методов лечения. Остается нерешенным множество технических и этических вопросов.

Несомненно, наследственные болезни можно было бы вылечить, вводя здоровые гены в зародышевую линию клеток так, чтобы они включались во все клетки реципиента и даже передавались по наследству. Это называется *генная терапия зародышевых клеток*, и такой подход был реализован на трансгенных животных. Однако генная модификация человеческих половых клеток поднимает множество проблем, в первую очередь этических, поэтому на сегодняшний день просто не рассматривается. Когда мы говорим о генной терапии человека, имеется в виду введение генетической информации только в соматические клетки — *соматическая генная терапия*.

Вообще генная терапия была нацелена на лечение наследственных генетических заболеваний (моногенных), но впоследствии поле ее применения существенно расширилось. Она стала рассматриваться как универсальный подход к лечению практически всего спектра болезней: от инфекционных до так называемых болезней цивилизации, включая рак, атеросклероз, диабет, СПИД и др. С полигенными заболеваниями дело обстоит сложнее, поскольку требуется детально разбираться в генетике болезни и других патогенетических моментах, а это непростая задача. Даже среди классических генетических заболеваний лишь для небольшой группы установлен точный генетический дефект и изучен биохимический механизм, с помощью которого ген осуществляет свою функцию (табл. 12.2).

Таблица 12.2

**Некоторые заболевания и генетические дефекты,
коррекция которых возможна генной терапией**

Болезнь	Генетический дефект	Клетки-мишени
<i>Моногенные заболевания</i>		
Иммунодефицит	Аденозиндезаминаза	Лимфоциты
Иммунодефицит	Пуриннуклеозидфосфорилаза	Лимфоциты
Муковисцидоз	CFTR, α -1-антитрипсин	Эпителий бронхов
Болезнь Гоше	Глюкоцереброзидаза	Макрофаги, стволовые клетки
Болезнь Хантера	Идуонат-2-сульфатаза	Макрофаги, стволовые клетки
Семейная гиперхолестеро- лемия	Рецептор липопротеинов низ- кой плотности (ЛПНП)	Гепатоциты
Гемофилия А	Фактор VIII	Фибробласты
Гемофилия В	Фактор IX	Фибробласты
Мышечная дистрофия Дюшенна	Дистрофин, саркогликан, утрофин	Миобласты, миофибриллы
Гипераммониемия	Орнитинкарбамоилтрансфераза	Гепатоциты
Цитрулинемия	Аргининсукцинатсинтетаза	Гепатоциты
Фенилкетонурия	Фенилаланингидроксилаза	Гепатоциты
<i>Полигенные заболевания</i>		
Болезнь Паркинсона	Тирозингидроксилаза	Нервные клетки, фибробласты
Рак	Множественные	—
Сердечно-сосудистые забо- левания (ИБС, атероскле- роз, стеноз периферических артерий)	Факторы роста (VEGF-A, VEGF-C, bFGF, FGF-4, HIF-1 α /VP16, E2F-Decoy)	Эндотелиоциты, миоциты, фибробласты
СПИД	Rev, антитела, антисмысловые РНК, рибозимы	—
Ревматоидный артрит	Цитокины, IL-1RA	—
Хронический гранулематоз	НАДФН-оксидаза, gp91 phox	Гранулоциты
Рассеянный склероз	Иммуномодуляторы	—

Большинство клинических испытаний методов генной терапии проводится при заболеваниях, для которых имеющиеся доступные методы лечения недостаточно эффективны (например, рак или ВИЧ-инфекция), а также при редко встречающихся моногенных заболеваниях (например, муковисцидоз).

12.11. Микрочипы

При изучении функции гена очень важно узнать, когда, в каких тканях организма и с какими другими генами он работает (экспрессируется). Если это касается небольшого числа генов и тканей, то сделать это можно очень просто: выделить РНК из ткани, провести обратную транскрипцию, получив кДНК, и затем провести количественную ПЦР. В зависимости от того, прошла ли ПЦР, мы узнаем, имеется ли мРНК исследуемого гена в ткани.

Однако при проведении большого числа исследований с множеством тканей и генов такая методика становится очень долгой и затратной. В таком случае используют *ДНК-микрочипы* — небольшие пластинки, на которые нанесены и прикреплены молекулы ДНК, комплементарные РНК изучаемых генов; причем заранее известно, где на них (пластинках) какая молекула расположена. Одним из способов создания чипа является синтез молекул ДНК прямо на нем с помощью робота или печатающего устройства.

Чтобы изучать экспрессию генов с помощью чипов, вначале синтезируют кДНК к иРНК исследуемого материала и метят их флуоресцентным красителем (не разделяя кДНК разных генов). Такую смесь наносят на микрочип. При этом образуются гибриды кДНК с молекулами ДНК на чипе. После этого сравнивают наблюдаемую флуоресценцию с расположением молекул ДНК на чипе. Если место флуоресценции совпадает с положением молекулы ДНК, то в данной ткани искомый ген экспрессирован (рис. 12.15). Можно приготовить кДНК из разных тканей (например, здоровые и опухолевые клетки), пометив их разными красителями, что позволит сравнить экспрессию таких тканей на одном чипе: по цвету флуоресценции можно определить, в какой из тканей он экспрессирован (если сразу в нескольких, то получится смешанный цвет). Например, если кДНК опухолевых клеток пометить красителем с зеленой флуоресценцией, а нормальные клетки — с красной флуоресценцией, то пятна красного цвета указывают, что ген экспрессируется здоровыми клетками, а зеленый цвет указывает на экспрессию этого гена опухолевыми клетками. Промежуточные цвета (оранжевые, желтые) указывают на различные уровни экспрессии таких генов в обоих образцах. Используя компьютер для расчетов интенсивности гибридизации, можно получить полную картину уровня экспрессии каждого гена на чипе для каждого образца кДНК.

В обычном ДНК-микрочипе олигонуклеотиды ковалентно прикрепляются к твердой поверхности — стеклянному или кремниевому чипу, однако вместо больших твердых поверхностей можно использовать микроскопические шарики.

ДНК-микрочипы используют не только для анализа изменения экспрессии генов, но и для выявления однонуклеотидных полиморфизмов, генотипирования или повторного секвенирования мутантных геномов. Микрочипы отличаются по конструкции, особенностям работы, точности, эффективности и стоимости.

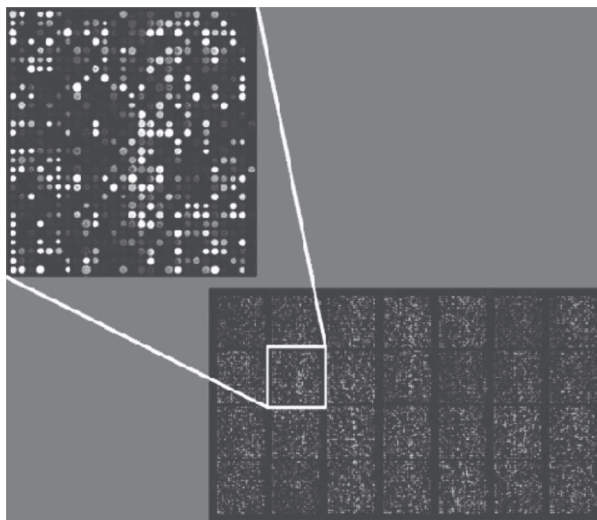


Рис. 12.15. Строение фрагмента микрочипа после проведенного исследования (светящиеся точки — места гибридизации ДНК на подложке с кДНК из исследуемого материала)

В последнее время все чаще вместо чипов используют массовое секвенирование всей кДНК из ткани (создание так называемых *транскриптомов*). Эта процедура стала доступной вследствие развития методов секвенирования. Это оказывается дешевле и эффективнее, поскольку знание полных последовательностей всех мРНК дает больше информации, чем просто сам факт их наличия или отсутствия.

Гормоны. Механизмы передачи гормональных сигналов

Раскрытие механизмов действия биологических регуляторов на функциональную активность клеток позволило выявить новые потенциальные мишени и разработать новые подходы в создании лекарственных препаратов, действующих на эти мишени. Наряду с широким использованием гормональных препаратов (природные гормоны и их синтетические заменители), находят применение препараты, которые блокируют или имитируют действие гормонов на рецепторы, регулируют уровень вторичных посредников в клетке или оказывают влияние на других участников сигнальных систем.

13.1. Гормоны — молекулы, действующие на расстоянии

Термин «гормон» (греч. *ὁρμάω* — возбуждаю, побуждаю) был впервые использован в работах английских физиологов У. Бейлисса и Э. Старлинга в 1905 г. для обозначения молекулы секретина. Это вещество синтезировалось клетками двенадцатиперстной кишки и стимулировало секрецию пищеварительных соков. В последующем таким термином стали обозначать соединения, которые синтезируются специализированными клетками, секретируются в кровеносное русло, связываются со специфическими молекулами (рецепторами) клеток-мишеней и оказывают влияние на обмен веществ и физиологические функции таких клеток.

В XXI столетии в группу молекул, традиционно называемых гормонами, включили вещества, синтезируемые не только клетками желез внутренней секреции, но и кардиомиоцитами, адипоцитами, клетками крови и др., а также клетками растений.

Гормоны могут действовать на расстоянии, синтезируясь в одной части организма и действуя на далеко расположенные клетки путем переноса туда кровотоком (*эндокринно*). При *паракринном* действии гормон влияет на соседние клетки, достигая их путем диффузии по межклеточному матриксу. В случае *аутокринного* эффекта гормон действует на клетку, в которой он синтезировался.

Гормональная регуляция — это, по сути, химическая координация функций организма. В главе, посвященной ферментам (глава 3), уже назывались

основные объекты регуляции, воздействие на которые позволяет изменить скорость химических реакций, протекающих в клетке. Таковыми являются активность фермента, его количество и количество участников реакций. Там же описаны и основные механизмы, позволяющие влиять на такие объекты. Среди них важное место занимают изо- и аллостерическая регуляции активности фермента, регуляция количества фермента и проницаемости мембран, а также ковалентная модификация структуры белков, участвующих в проведении сигнала. Все указанные принципы регуляции широко используются в механизмах действия гормонов на клетки, а это действие затрагивает практически все жизненно важные функции в норме и патологии. Гормоны поддерживают метаболический гомеостаз, регулируют рост и деление клеток, гамето-генез, дифференцировку клеток и клеточный иммунитет, являются важными участниками воспалительных процессов и процессов регенерации тканей.

13.2. Сигнальный путь

Открытие роли цАМФ в механизмах внутриклеточной передачи сигналов (Э. Сазерленд, 1971) позволило развить идеи внутриклеточных молекулярных сигнальных путей, связывающих внешние сигналы с внутриклеточными молекулярными процессами.

В зависимости от природы сигнала сигнальный путь включает несколько этапов (рис. 13.1):

- 1) синтез и высвобождение (хранение) внеклеточной сигнальной молекулы;
- 2) транспорт сигнальной молекулы к клетке-мишени;
- 3) рецепция — узнавание сигнала специфичными белками-рецепторами, которое сопровождается изменением их конформации;

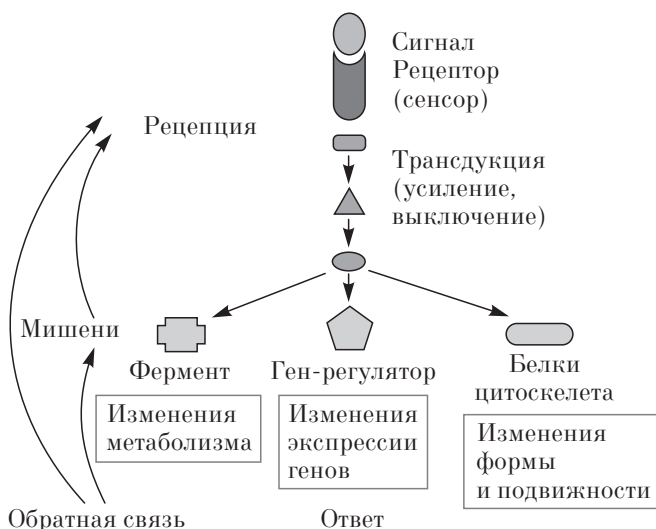


Рис. 13.1. Схема сигнального пути

4) трансдукция, или передача сигнала — связывание с рецептором клетки-мишени и продолжение передачи сигнала при помощи ряда внутриклеточных реакций;

5) ответная реакция — сигнал вызывает изменение метаболических процессов в клетках-мишенях (активность ферментов, синтез белков, проницаемость клеточных мембран и т.д.), приводящих к изменению функции клетки-мишени;

6) терминация, или удаление сигнала и молекул, образующихся при проведении сигнала.

13.3. Классификация гормонов по химической природе

Гормоны как сигнальные молекулы можно разделить по химической природе на четыре основные группы:

1) *стероиды* — производные холестерина и других полиизопренов (альдостерон, кортизол, ретиноевая кислота, витамин D);

2) *производные аминокислот* (адреналин, серотонин, тироксин, мелатонин);

3) *белково-пептидной природы*:

- сложные белки (тиреотропин, гонадотропины);
- простые белки (соматотропин, инсулин);
- пептиды (глюкагон, кортикотропин, факторы роста, цитокины);

4) *эйкозаноиды* — производные арахидоновой кислоты (простагландин E₁, тромбоксан A₂) (подробнее см. п. 7.5.5).

13.4. Особенности биологического действия гормонов

Действие гормонов на клетку характеризуется рядом особенностей.

Высокая специфичность достигается путем комплементарного связывания молекулы гормона со специфическим белком, получившим название *рецептор*. Рецептор может быть расположен на плазматической мембране, в ядре или в цитозоле клетки-мишени. Гормон в данном случае выступает в качестве лиганда, который связывается с участком белка-рецептора.

Высокая чувствительность к гормону обеспечивается его сродством (комплементарным соответствием) с рецептором. Такое сродство приводит к связыванию гормона с рецептором. Это, в свою очередь, вызывает конформационное изменение рецептора, который инициирует последовательность реакций, приводящих к специфическому клеточному ответу.

Плейотропность действия — один и тот же гормон оказывает влияние на разные клетки, обладающие разными функциями. Это связано, во-первых,

с локализацией рецептора того или иного гормона в разных клетках, а также с тем обстоятельством, что гормоны действуют на клетки через разные пути проведения сигналов.

Избыточность действия — разные гормоны оказывают одинаковый эффект на функции клетки. Это связано с тем, что они используют одинаковые пути проведения сигналов.

Синергичность действия — разные гормоны усиливают действие друг друга.

Антагонизм действия — гормоны снижают эффект действия друг друга.

Каскадная индукция — одни участники пути проведения действия гормона в клетке индуцируют образование других.

13.5. Биосинтез гормонов

Механизм образования, транспорта и действия гормона зависит от его химической природы. Так, гормоны, которые являются производными холестерина, синтезируются в окончательной форме и сразу секретируются, не задерживаясь в клетках, а гормоны белковой (пептидной) природы или гормоны-аминокислоты синтезируются в форме предшественников, депонируются в клетках, их производящих, и переходят в активные формы в местах хранения или клетках-мишенях.

Химическая природа гормонов определяет особенности их синтеза и хранения в клетках. Так, производные холестерина синтезируются в окончательной форме и не депонируются. Их эффект влияния определяется скоростью синтеза. Катехоламины тоже синтезируются в активной форме, но депонируются в специальных везикулах и секретируются путем экзоцитоза.

Паратирин также хранится в секреторных везикулах, однако около 80–90 % синтезированного пропаратирина разрушается до его поступления в секреторные пузырьки для хранения. Скорость распада зависит от регулируемого паратерином уровня ионов кальция в крови. При его повышении разрушение пропаратирина увеличивается. Для инсулина, наоборот, уровень глюкозы, в регуляции которого он участвует, влияет на скорость его образования из проинсулина.

Значительно более высокими запасами гормонов характеризуется щитовидная железа. Запасов T_3 и T_4 в тиреоглобулине коллоида фолликулов щитовидной железы достаточно для поддержания нормальной функции железы на протяжении нескольких недель. Тиреоглобулин — самый большой прогормон среди предшественников гормонов. Это гомодимер. Мономер состоит из 2768 аминокислотных остатков, среди которых 120–150 остатков тирозина, около 20 из них йодируются. Скорость его синтеза регулируется ТТГ. Ниже приводится сравнительная продолжительность существования метаболически активных форм гормонов в организме (табл. 13.1).

Таблица 13.1

Продолжительность действия гормонов

Гормон	Продолжительность действия
Стероидные гормоны	Не хранится
Катехоламины, паратирин	Часы
Инсулин	Дни
T ₃ , T ₄	Недели

13.5.1. Синтез стероидных гормонов

Холестерол для синтеза гормонов поступает или из плазматической мембраны, или из эндоплазматического фонда эфиров холестерина (рис. 13.2). Эфиры холестерина образуются при участии специфической ацил-КоА-холестеролацилтрансферазы (АХАТ) из поступающего в клетку или синтезируемого самой клеткой свободного холестерина. Гидролиз эфиров холестерина катализируется специфической гидролазой. Образующийся при этом свободный холестерол транспортируется через межмембранное пространство митохондрий к внутренней митохондриальной мембране при участии белка StAR (англ. Steroid Acute Regulatory), ограничивающего скорость синтеза стероидных гормонов. Его синтез, в свою очередь, регулируется гормонами гипофиза.

Образование *прегненолона* — первая реакция в синтезе всех стероидных гормонов. Последующие преобразования прегненолона протекают в митохондриях и цитозоле клеток, продуцирующих гормоны. В реакциях участвуют гидроксилазы, использующие молекулярный кислород и НАДФН·Н⁺, а также дегидрогеназы, изомеразы и лиазы (рис. 13.3).

Специфичность синтеза отдельных типов гормонов достигается набором ферментов, катализирующих синтез такого гормона. Например, клетки *клубочковой зоны надпочечников* избирательно синтезируют и выделяют минералокортикоид *альдостерон*. В этих клетках отсутствует 17- α -гидроксилаза, и поэтому прегненолон может превращаться только в прогестерон. Зато в этих клетках синтезируется особый фермент — *синтаза альдостерона*, — который катализирует ключевые реакции образования этого гормона (см. рис. 13.3):

- 11- β -гидроксилирование 11-дезоксикортикостерона в кортикостерон;
- 18-гидроксилирование кортикостерона в 18-гидроксикортикостерон;
- 18-окисидирование 18-гидроксикортикостерона в альдостерон.

Клетки *пучковой зоны надпочечников* синтезируют и секретируют глюкокортикоиды (*кортизол* или *кортикостерон*). Их синтез находится под влиянием кортикотропина гипофиза, секреция которого носит пульсирующий характер (7–15 волн в сутки). Уровень кортизона повышается спустя 15 мин после увеличения секреции кортикотропина, при этом максимальные значения наблюдаются в утренние часы.

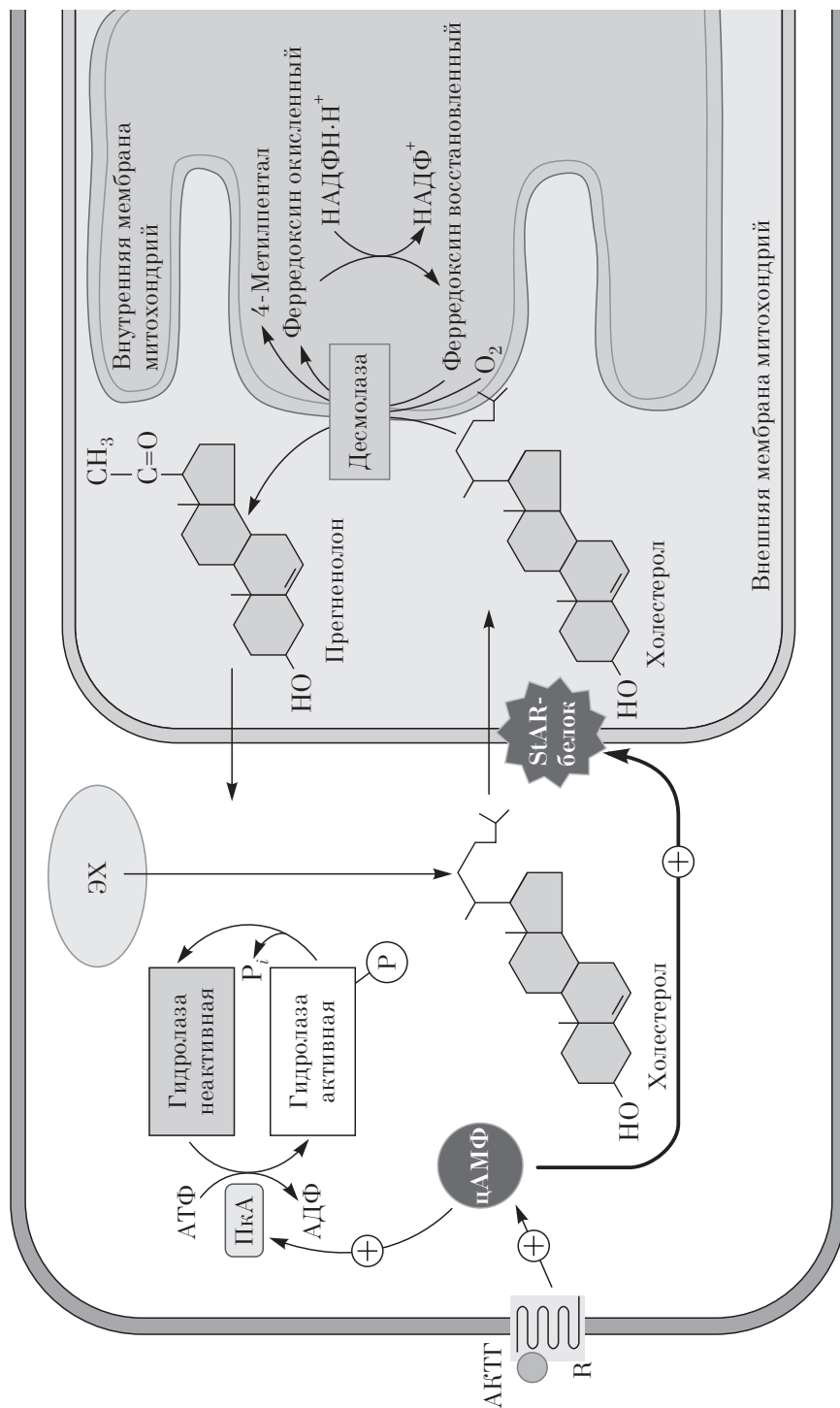


Рис. 13.2. Синтез прегненолона из холестерина:

АКТГ — адrenокортикотропный гормон; R — рецептор АКТГ; ПКА — протеинкиназа A; ЭХ — эфиры холестерина; гидролаза — гидролаза эфиров холестерина

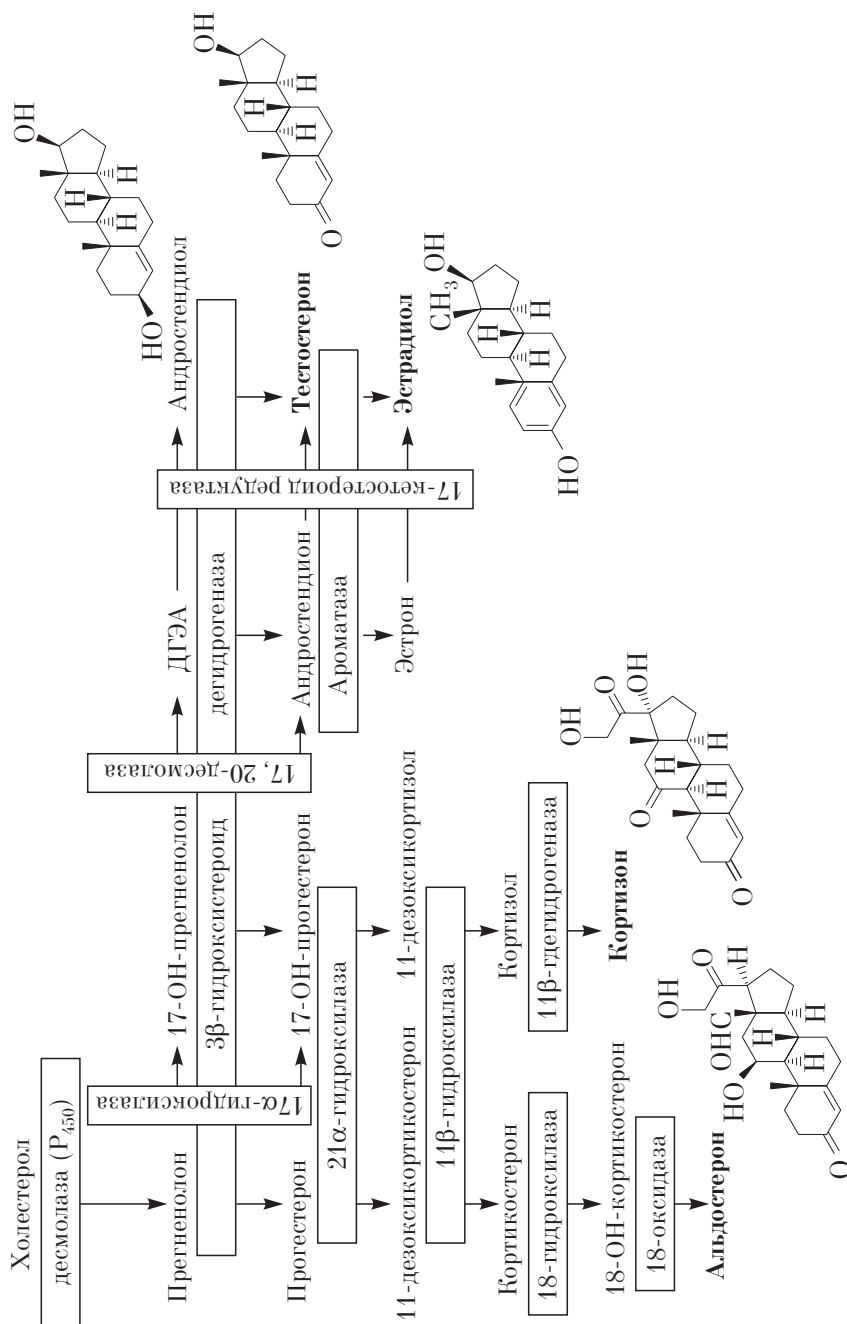


Рис. 13.3. Образование гормонов коры надпочечников и половых гормонов (ДГЭА — дегидроэпиандростерон)

В *сетчатой зоне коры надпочечников* вырабатываются половые стероиды — *андрогены, эстрогены и прогестерон*. Секреторная активность сетчатой зоны, так же как и пучковой, контролируется гипоталамо-гипофизарной системой.

В клетках половых желез начальные этапы синтеза половых гормонов регулируются преимущественно лютеинизирующим гормоном гипофиза. В *яичках* прегненолон превращается в *тестостерон* двумя путями: прогестероновым и дегидроэпиандростероновым (см. рис. 13.3).

Дальнейшие превращения тестостерона также могут протекать двумя путями. В одном происходит окисление углерода в 17-м положении, в другом — восстановление двойной связи в кольце. Первый путь протекает во многих органах, включая печень, и ведет к образованию 17-кетостероидов (неактивных форм гормона). Второй путь функционирует, прежде всего, в тканях-мишенях и ведет к образованию высокоактивного метаболита — дегидротестостерона (ДГТ) (на рис. 13.3 этот путь не показан). Это обусловлено тем, что в их клетках синтезируется НАДФН·Н⁺-зависимая 5'-редуктаза. За сутки у взрослого человека образуется около 400 мкг ДГТ, при этом в яичках — лишь 50–100 мкг, а остальное количество — в клетках-мишенях.

Таким образом, тестостерон можно считать прогормоном, так как он превращается в намного более активное соединение (ДГТ); в основном это превращение происходит вне яичек. Некоторое количество тестостерона ароматизируется в эстрадиол.

17-β-Эстрадиол — основной эстроген *яичников*, является членом большого семейства женских половых гормонов, синтезируемых многими тканями. Эстрадиол образуется путем ароматизации тестостерона. Процесс ароматизации включает три реакции гидроксилирования с участием O₂ и НАДФН·Н⁺. Они катализируются ароматазой, которая представляет собой разновидность цитохрома P₄₅₀. Ароматаза обнаружена в адипоцитах, гепатоцитах, клетках кожи и других тканях. При участии этого фермента тестостерон превращается в эстрадиол, а андростендион — в эстрон (см. рис. 13.3).

Повышение активности ароматазы может способствовать «эстрогенизации», которая характерна для заболеваний печени (цирроз), гипертиреоза, старения и ожирения. Ингибиторы ароматазы (Тамоксифен, Аримидекс, Аромазин) используются как терапевтические средства при раке молочной железы и женских репродуктивных органов.

К гормонам стероидной природы относится еще одно производное холестерина — витамин D₃ (*кальцитриол 1,25-(ОН)₂-D₃*). Однако его образование отличается от реакций образования стероидных гормонов. Витамин D синтезируется в ходе серии реакций, протекающих в коже, печени и почках (рис. 13.4).

Специальный транспортный белок переносит витамин D₃ и его метаболиты от кожи или кишечника в печень, где в эндоплазматическом ретикулуме клеток подвергается 25-гидроксилированию с участием магния, НАДФН·Н⁺ и молекулярного кислорода. В реакции участвуют НАДФН-зависимая цитохром P₄₅₀-редуктаза и цитохром P₄₅₀.

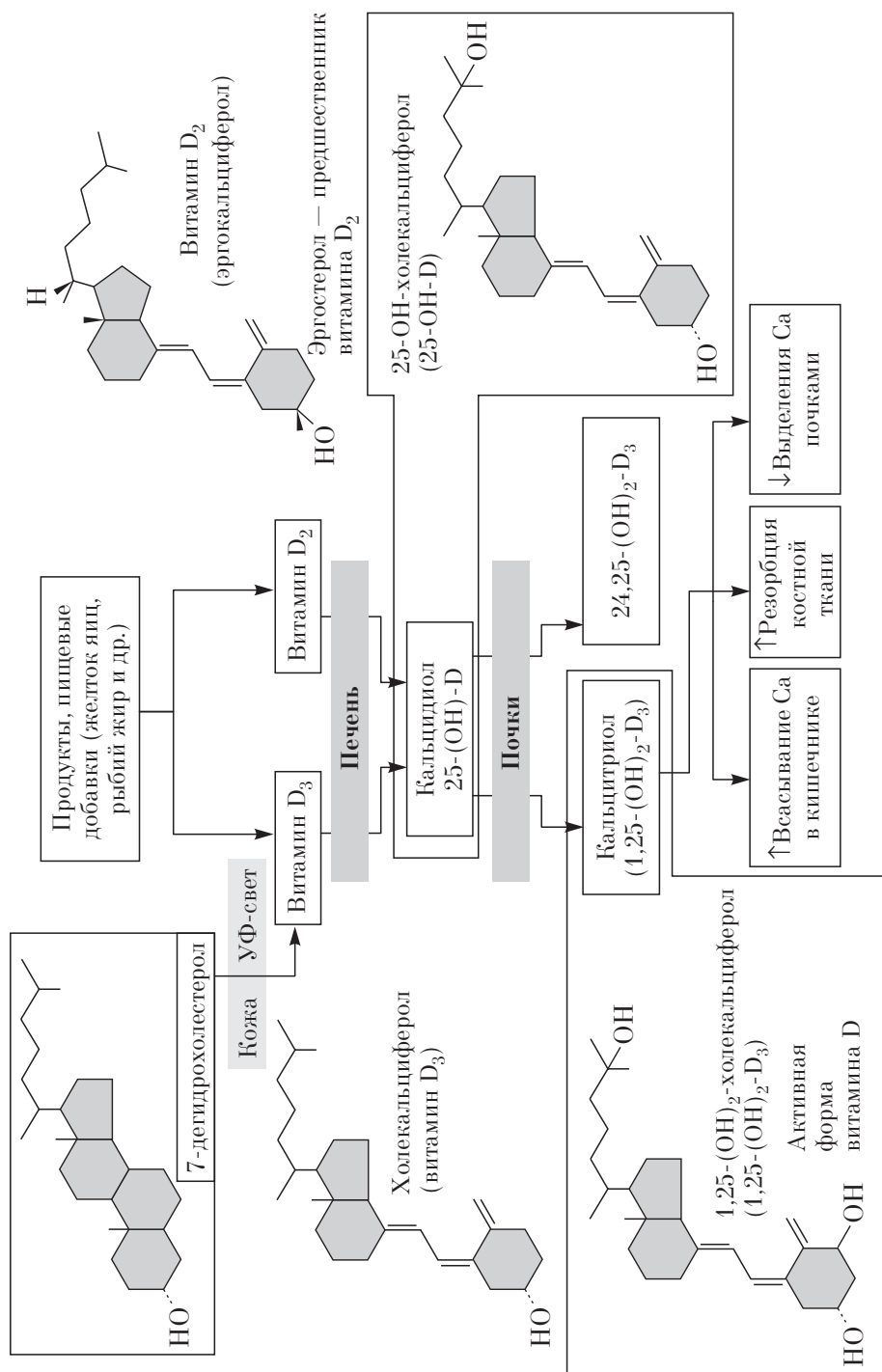


Рис. 13.4. Схема метаболизма и эффекты витамина D

Продукт реакции 25-ОН-D₃ поступает в плазму крови и с помощью связывающего белка транспортируется в почки. 25-ОН-D₃ обладает относительно низкой активностью, но в митохондриях проксимальных извитых почечных канальцев происходит еще одно гидроксилирование по C₁. Это довольно сложная реакция, в которой участвуют НАДФН·Н⁺, Mg²⁺, молекулярный кислород и α₁-гидроксилаза. Результат реакции — образование 1,25-(ОН)₂-D₃ — наиболее активного из природных метаболитов витамина D.

13.5.2. Синтез гормонов, производных аминокислот

Три амина — дофамин, норадреналин и адреналин, получившие название **катехоламины**, — синтезируются хромаффинными клетками мозгового слоя надпочечников: 80 % всех катехоламинов надпочечников составляет *адреналин*. Катехоламины синтезируются из тирозина. Превращение тирозина в адреналин протекает в четыре этапа:

- 1) гидроксилирование тирозина;
- 2) декарбоксилирование диоксифенилаланина (ДОФА) с образованием дофамина;
- 3) гидроксилирование боковой цепи с образованием норадреналина;
- 4) N-метилирование норадреналина с образованием адреналина.

Эти реакции описаны в главе 9.

Катехоламины в окончательной форме сохраняются в клетке и выделяются по мере поступления сигналов.

В клетках щитовидной железы синтезируются **йодсодержащие гормоны**: *трийодтиронин* (Т₃) и *тетрайодтиронин* (Т₄, тироксин). Эти гормоны образуются из тирозина. Особенностью их синтеза является зависимость от йода. Многие зоны на нашей планете характеризуются низким содержанием йода в продуктах питания и питьевой воде, что служит одной из причин распространенности нарушений синтеза таких гормонов.

Функциональная единица щитовидной железы — фолликул. Он состоит из слоя эпителиоцитов, окружающих полость, заполненную коллоидом (рис. 13.5). Коллоид составляет около 30 % массы щитовидной железы. С-клетки расположены вне фолликулов, они синтезируют пептидный гормон кальцитонин. Клетки фолликулярного эпителия синтезируют белок-тиреоглобулин (ТГ) и тиреопероксидазу (ТПО) и секретируют их в просвет фолликула. Йодид поступает в фолликул через клетки фолликулярного эпителия, где используется тиреопероксидазой для йодирования тирозина в составе тиреоглобулина с образованием модифицированного, т.е. йодированного тиреоглобулина (ТГ*).

Тиреоглобулин — гликопротеин с М.М. 660 тыс. а.е.м., состоит из двух субъединиц, содержит 115 остатков тирозина, каждый из которых представляет собой потенциальный сайт йодирования. Механизм синтеза тиреоглобулина такой же, как и у большинства секретируемых белков, и включает синтез

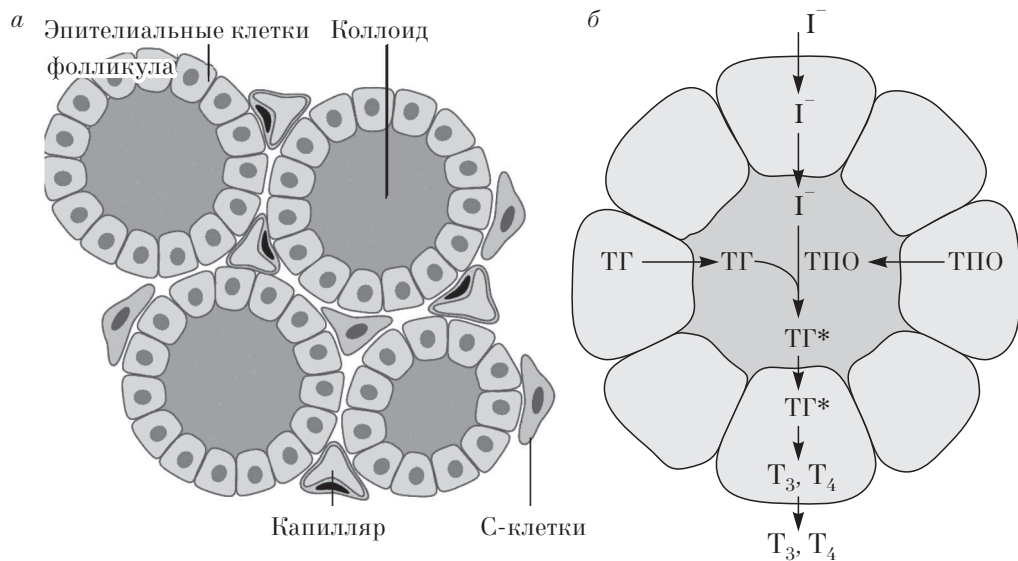


Рис. 13.5. Структура щитовидной железы:

a — схематическое изображение структуры фолликулов щитовидной железы;
б — синтез гормонов

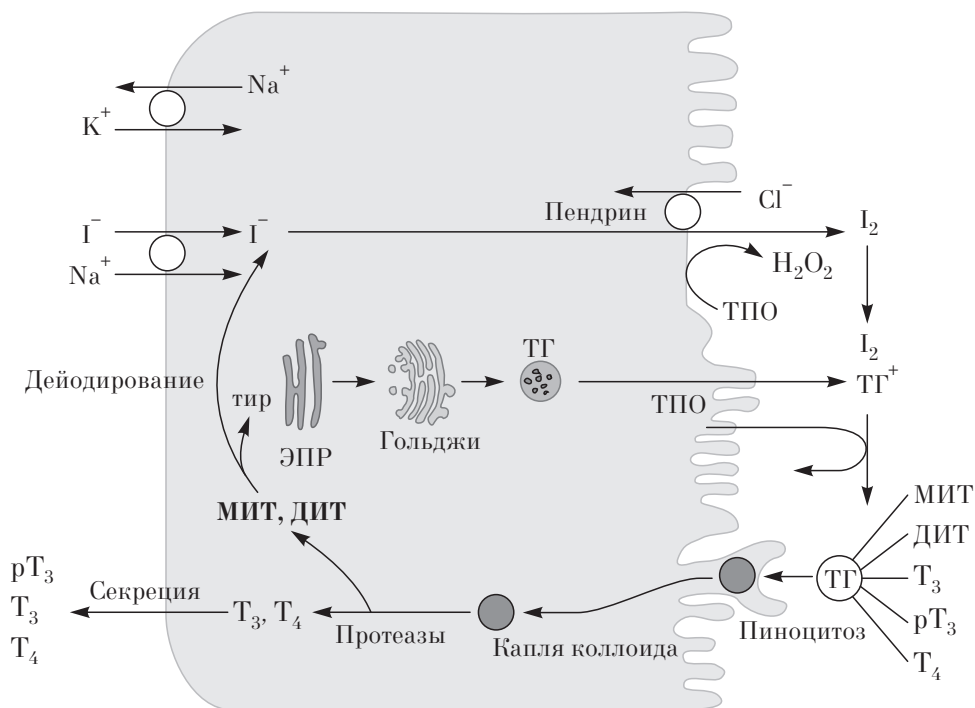


Рис. 13.6. Схема синтеза йодтиронинов

препротиреоглобулина на рибосомах, удаление сигнального пептида и переход в полость пузырьков эндоплазматической сети, гликозилирование в аппарате Гольджи и секрецию в полость фолликула, где происходит йодирование остатков тирозина и образование гормонов.

Транспорт йодида в клетки щитовидной железы происходит при помощи активного транспорта, который обеспечивается специфическим белком (рис. 13.6). Белок переносит одновременно 2Na^+ и I^- в клетку. Сопряженно работающая Na^+/K^+ -АТФаза удаляет ионы натрия из клетки. В клетках при участии тиреопероксидазы происходит окисление йодида с образованием активной формы йода, способной участвовать в реакциях йодирования остатков тирозина в составе молекулы тиреоглобулина с образованием моноидтирозина (МИТ) и ди-идтирозина (ДИТ).

Образовавшиеся МИТ и ДИТ конденсируются с образованием гормонов щитовидной железы: при конденсации двух молекул ДИТ образуется T_4 ; при конденсации молекул МИТ и ДИТ — T_3 . Эти процессы проходят при участии тиреопероксидазы, которая расположена на мембране апикальной части тиреоцита (рис. 13.7).

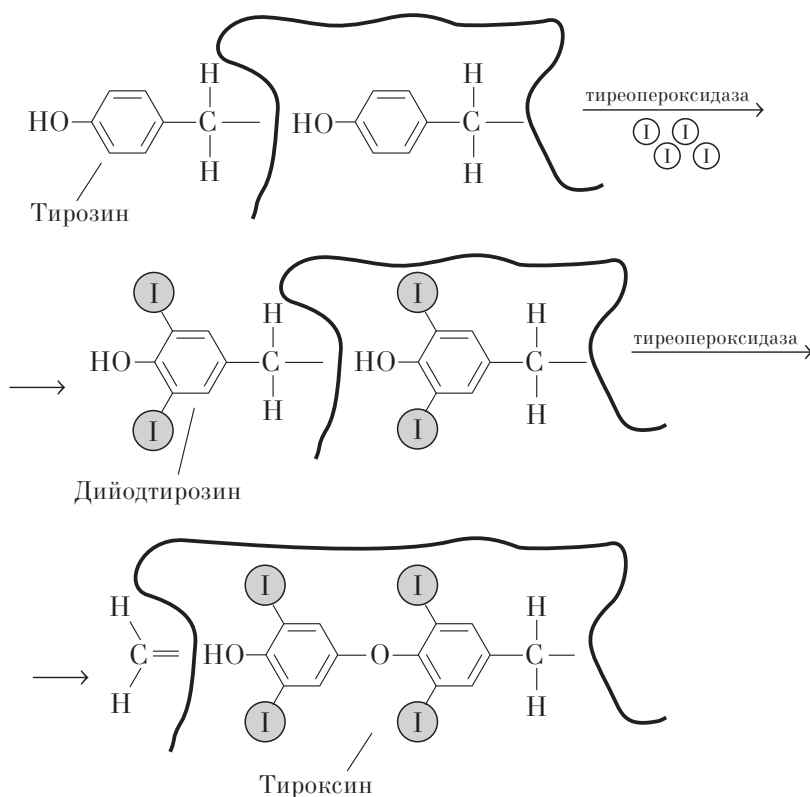


Рис. 13.7. Схема конденсации дийодтирозинов

По мере йодирования остатков тирозина и образования йодтирозинов молекулы тиреоглобулина перемещаются в просвет фолликула, где они накапливаются «про запас». Этого запаса хватает на месяц. Накопленный в полости фолликула йодированный тиреоглобулин поступает в составе эндоцитозных везикул внутрь клеток. Под влиянием лизосомных ферментов происходит протеолиз тиреоглобулина. Продуктами протеолиза являются МИТ, ДИТ, T_4 и T_3 .

МИТ и ДИТ дейодируются под действием йодтирозиндейодазы, и освобождающийся йодид вновь используется клетками щитовидной железы в биосинтезе тиреоидных гормонов. Основным секретируемым гормоном (свыше 95 %) является T_4 .

Периферический катаболизм гормонов щитовидной железы представляет собой последовательное дейодирование при участии дейодаз трех типов (ДI, ДII и ДIII) (рис. 13.8). Для проявления активности дейодаз важным является

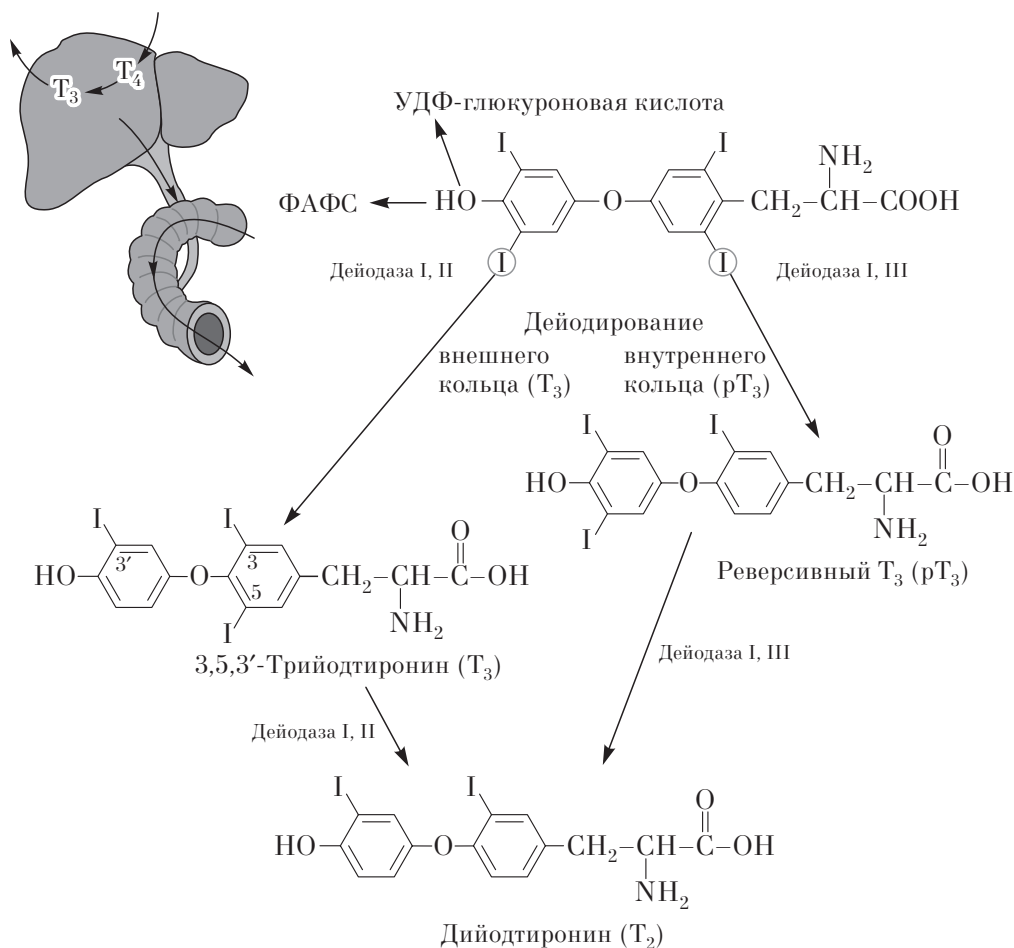


Рис. 13.8. Метаболизм гормонов щитовидной железы

присутствие в их структуре селеноцистеина. Дейодазы не только обеспечивают преобразование T_4 в более активную T_3 -форму, но и участвуют в реакциях инактивации гормонов до их окончательного обезвреживания в печени, где они связываются с глюкуроновой кислотой или сульфатом, что увеличивает их растворимость и способствует окончательному выделению из организма.

Дейодаза I синтезируется преимущественно в печени, почках и щитовидной железе. Она может катализировать дейодирование как внешнего, так и внутреннего колец тироксина, что важно для образования T_3 , транспортируемого по крови, и преобразования T_4 в неактивную форму реверсивного трийодтиронина (rT_3). Дейодаза II экспрессируется преимущественно в мозге, передней доле гипофиза и щитовидной железе. Она катализирует дейодирование внешнего кольца T_4 . Дейодаза III синтезируется преимущественно в мозге, плаценте и эмбриональных тканях. Она катализирует дейодирование внутреннего кольца, что приводит к инактивации гормона и может рассматриваться как важный регулятор внутриклеточной активности гормона.

13.5.3. Вещества и лекарственные средства, влияющие на синтез йодтиронинов

Перхлорат (ClO^-) и тиоцианат (SCN^-) ингибируют натрий-зависимый йодидный транспортер. Это приводит к уменьшению поступления йодидов в фолликулярные клетки щитовидной железы и снижению количества продукции тироксина. Поэтому при гипотиреозе необходимо ограничивать пищевые продукты, богатые тиоцианатами и изотиоцианатами (белокочанная, брюссельская и цветная капуста, брокколи, репа, хрен, кресс-салат).

Радиоактивный йод ($^{131}I^-$) ингибирует тиреопероксидазу, поэтому используется для лечения гипертиреоза. Литий и препараты лития также ингибируют высвобождение тиреоидных гормонов из щитовидной железы. Это является побочным действием препаратов лития при лечении депрессий.

Активность тиреопероксидазы ингибируют антитиреоидные препараты тиамазол (Мерказолил) и пропилтиоурацил, что приводит к торможению йодирования тиреоглобулина и задержке превращения дийодтирозина в T_3 и T_4 (тироксин). Эти препараты используются для лечения гипертиреоза.

Пропранолол, метопролол (селективные блокаторы, которые избирательно подавляют способность к связыванию лигандов β_1 -адреноблокаторами) способны ингибировать дейодазу и снижать превращение T_4 в T_3 .

13.5.4. Синтез гормонов белково-пептидной природы

Многие гормоны белковой природы образуются в форме препрогомонов из своих предшественников, которые затем подвергаются ограниченному протеолизу с образованием активных форм и секретируются. Несколько примеров такого синтеза приведены ниже.

Инсулин синтезируется в форме препроинсулина на полисомах. При участии сигнального пептида он проникает в полость ЭР, где последний удаляется сигнальной пептидазой и формируется проинсулин (86 аминокислотных остатков). Затем образовавшийся проинсулин поступает в аппарат Гольджи, где под действием специфических протеаз расщепляется в нескольких участках с образованием инсулина и С-пептида (рис. 13.9). Инсулин состоит из двух цепей: А (21 аминокислотный остаток) и В (30 аминокислотных остатков), — связанных между собой дисульфидными мостиками.

Инсулин и С-пептид в эквимольных количествах включаются в гранулы, которые секретируются путем экзоцитоза.

В результате повышения уровня глюкозы в крови скорость преобразования проинсулина в инсулин в клетках поджелудочной железы увеличивается. Высвобождаемый при этом С-пептид секретируется вместе с инсулином в эквимольных соотношениях, поэтому уровень С-пептида служит характеристикой секреторной активности β -клеток поджелудочной железы. В норме за сутки секретируется приблизительно 40–50 единиц инсулина (1 МЕ = 41,66 мкг инсулина), что составляет около 15–20 % гормона в составе β -клеток.

Распад инсулина катализируется протеазами в основном в печени, в меньшей степени — в почках.

Паратирин синтезируется клетками паращитовидных желез в виде препаратирина (115 аминокислотных остатков). После проникновения в полость ЭР он теряет сигнальный пептид и превращается в пропаратирин, который при участии протеаз превращается в паратирин (84 аминокислоты).

Основная масса синтезируемого паратирина быстро разрушается в клетках паращитовидных желез. Скорость этого распада зависит от уровня ионов кальция: замедляется при снижении уровня ионов кальция в крови и увеличивается при его повышении.

Ограниченный протеолиз участвует и в образовании гормонов аденогипофиза из большого белка *проопиомеланокортина* (ПОМК). Экспрессия гена ПОМК происходит не только в клетках гипофиза, но и во многих других тканях позвоночных (мозг, плацента, желудочно-кишечный тракт и др.). В разных клетках процессинг протекает по-разному. Можно выделить следующие основные группы пептидов, образующихся в результате ограниченного протеолиза ПОМК:

- адrenокортикотропный гормон (АКТГ), из которого образуются α -меланоцитстимулирующий гормон (α -МСГ) и кортикотропиноподобный пептид промежуточной доли (КППДГ);
- β -липотропин, который является предшественником γ -липотропина, β -МСГ и β -эндорфина. Из последнего, в свою очередь, образуются α - и γ -эндорфины (рис. 13.10).

Важное значение в организме принадлежит *адrenокортикотропному гормону* (АКТГ). Это однопептидный полипептид, состоящий из 39 аминокислот. Биологическая активность обеспечивается N-концевым участком из 24 аминокислот.

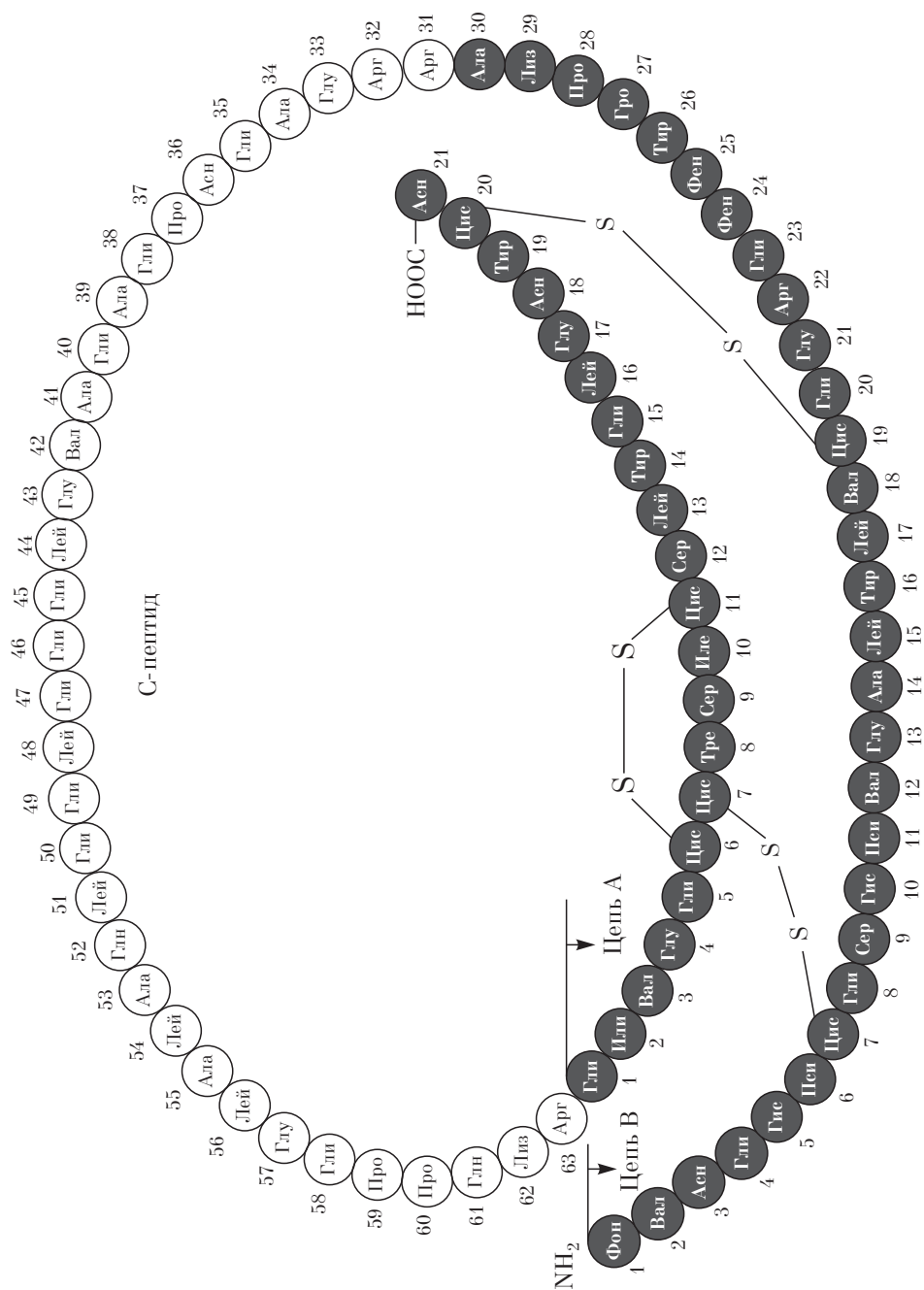


Рис. 13.9. Строение проинсулина и участки действия ферментов (обозначены чертой) ограниченного протеолиза (цифрами обозначены остатки аминокислот)

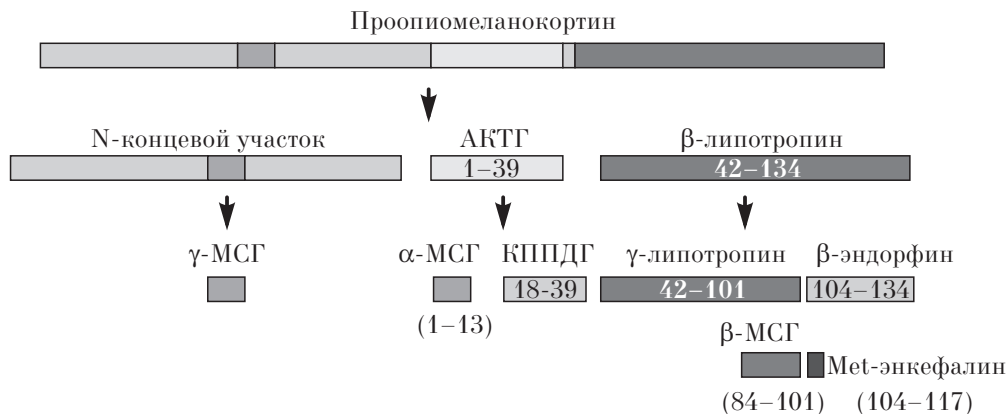


Рис. 13.10. Продукты, возникающие путем ограниченного протеолиза проопиомеланокортина (цифрами обозначены порядковые номера аминокислот)

Гормон при участии 7-ТМС рецептора способствует образованию цАМФ и активированию протеинкиназы А, которая катализирует фосфорилирование холестеролэстеразы, способствуя высвобождению холестерина из эфиров и активированию белка, переносящего холестерол в митохондрии (STAR). В результате в митохондриях ускоряется синтез прегненолона — основного предшественника всех стероидов надпочечников.

13.6. Транспорт гормонов в кровотоке

Особенности химической природы гормонов оказывают влияние и на механизмы их транспорта.

Гормоны *стероидной природы* и гормоны *щитовидной железы* плохо растворяются в воде. Их растворимость повышается при помощи специальных транспортных белков. Между свободной и связанной с белками формами гормонов устанавливается подвижное равновесие. Белки защищают гормон от разрушения, но биологически активна свободная форма.

Основная масса гормонов щитовидной железы (около 70 %) транспортируется в кровотоке с помощью тироксинсвязывающего глобулина (ТСГ), около 15 % — альбумина плазмы, около 10 % — транстретина. Основным переносчиком глюкокортикоидов служит белок в составе α-глобулиновой фракции плазмы крови, который получил название *транскортин* или *глобулин, связывающий кортикостероиды* (КСГ). Этот белок синтезируется в печени, и его синтез стимулируется эстрогенами.

Половые гормоны также транспортируются при помощи специфических белков. У большинства млекопитающих, включая человека, в составе β-глобулиновой фракции плазмы крови обнаружен белок, специфически и с высоким

средством связывающий эстрогены и тестостерон. Он синтезируется в печени, и его количество у мужчин в два раза меньше, чем у женщин. При гипотиреозе и с возрастом уровень этого белка снижается. Он обладает значительно большим средством к тестостерону, чем к эстрогенам.

Гормоны *пептидной природы* (инсулин, гормон роста, АКТГ и др.) циркулируют в свободной активной форме и имеют короткое время биологического полураспада.

13.7. Рецепторы и их классификация

Концентрация гормонов во внеклеточной жидкости характеризуется довольно низкими цифрами — от 10^{-15} до 10^{-9} моль/л. При такой низкой концентрации эффективность их действия на внутриклеточный метаболизм достигается узнаванием гормонами клеток-мишеней с помощью специальных молекул, встроенных в мембрану или локализованных в цитозоле, ядре, митохондриях и других органоидах клеток-мишеней. Эти молекулы получили название **рецепторы**.

Лигандами рецепторов служат гормоны, нейромедиаторы, фармакологические соединения или токсины, а также многокомпонентные крупные комплексы (например, адипонектины, липополисахариды, липопротеиновые частицы и т.д.).

Каждый вид рецептора обладает высокой специфичностью к своим лигандам. При связывании лиганда рецептор обязательно изменяет конформацию, что приводит к последующей передаче внутрь клетки информации о наличии внешнего сигнала.

Существуют и *антагонисты* рецепторов. Связавшись с рецептором, такие соединения блокируют взаимодействие с лигандом и препятствуют передаче сигнала внутрь клетки.

В противоположность антагонистам, лиганды, активирующие рецептор, часто называют *агонистами*, независимо от того, имеют они биологическое или искусственное происхождение.

За редким исключением, антагонисты и соответствующие им рецепторы не встречаются в пределах одного организма, но могут существовать у разных биологических видов. Так, большинство природных антагонистов рецепторов высших животных имеют растительное происхождение.

Клеточные рецепторы классифицируются по их структурной организации и механизмам действия. Выделяют несколько групп клеточных рецепторов. Четыре из них включают интегральные мембранные белки.

13.7.1. 7-ТМС-рецепторы

7-ТМС-рецепторы (рис. 13.11) образованы одной полипептидной цепью, формирующей 7 трансмембранных α -спиральных участков, разделенных гидрофильными последовательностями, которые на уровне третичной структуры находятся вне мембраны, образуя внеклеточные и внутриклеточные домены. Внеклеточный домен рецептора формирует активный центр, связывающий лиганд, а внутриклеточный домен связывает молекулы G-белка, состоящего из трех субъединиц (α , β и γ). В семейство 7-ТМС-рецепторов входит свыше 700 членов.

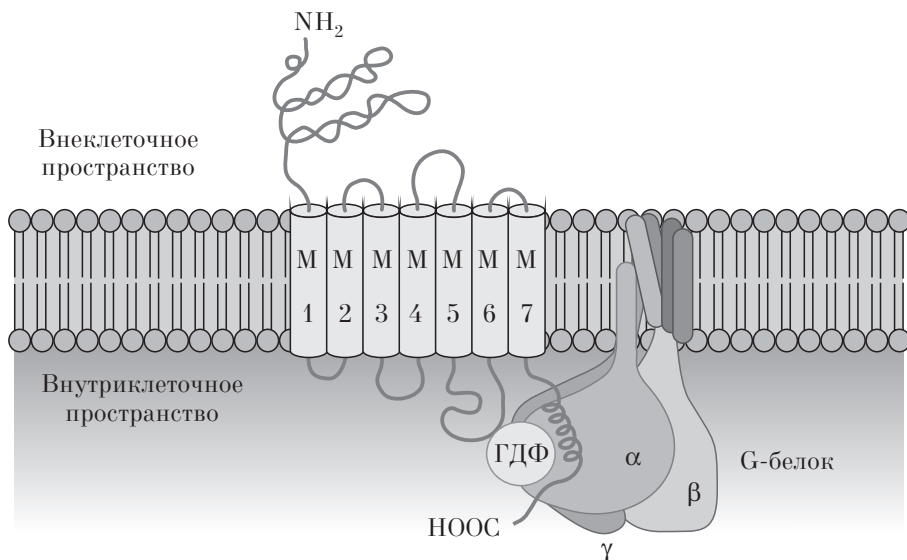


Рис. 13.11. Строение 7-ТМС-рецептора, ассоциированного с G-белком

13.7.2. 1-ТМС-рецепторы

Мембранные рецепторы с одним трансмембранным сегментом — 1-ТМС-рецепторы (рис. 13.12). Внутриклеточный домен такого рецептора обладает собственной ферментативной активностью или присоединяет ферменты из цитозоля.

Наиболее распространенная группа таких рецепторов — рецепторы, внутриклеточный домен которых обладает тирозинкиназной активностью.

К этой группе принадлежат также рецепторные гуанилатциклазы, внутриклеточный домен которых катализирует образование вторичного посредника — циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), который в свою очередь, активи-

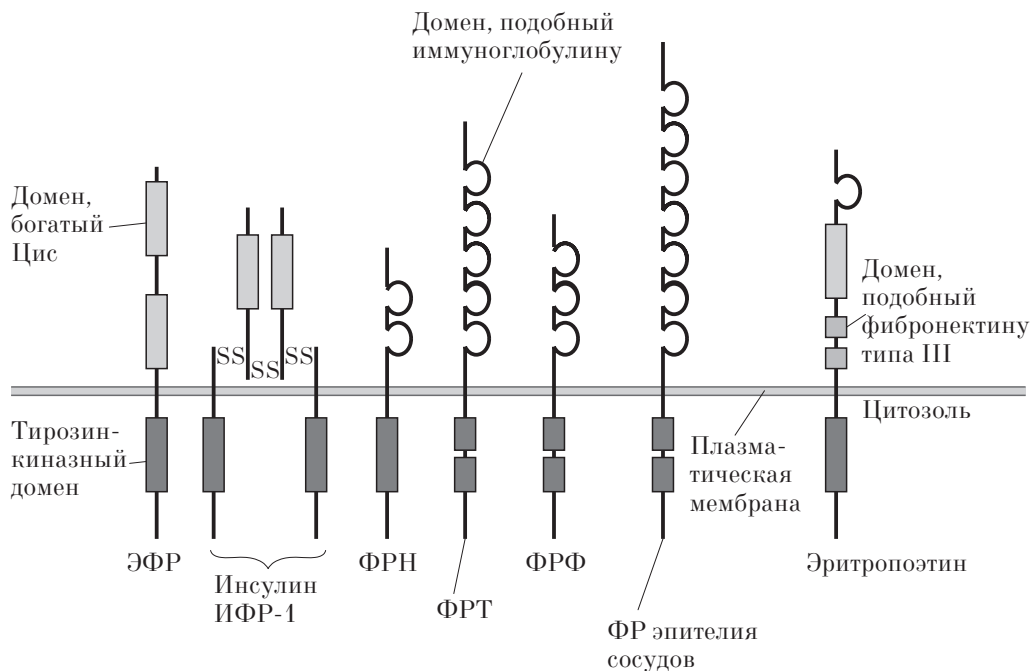


Рис. 13.12. 1-ТМС-рецепторы со свойствами тирозинкиназ:

ЭФР — эпидермальный фактор роста; ФРН — фактор роста нервов; ФРТ — фактор роста тромбоцитов; ФРФ — фактор роста фибробластов; ИФР-1 — инсулиноподобный фактор роста

рует в цитозоле протеинкиназу, фосфорилирующую клеточные белки, и таким образом изменяет их активность.

Рецепторы цитокинов, гормона роста по способу действия похожи на рецепторы с тирозинкиназной активностью. Однако не обладая собственной ферментативной активностью, они после связывания с «внешним» лигандом привлекают ферменты из цитозоля. Чаще в качестве таких ферментов выступают протеинкиназы, которые после связывания с рецептором приобретают способность фосфорилировать остатки тирозина в специфических белках-субстратах, передавая таким способом сигнал в цитозоль.

К 1-ТМС-рецепторам относятся также рецепторы с серин/треонинкиназной, протеолитической или фосфатазной активностью.

13.7.3. Адгезионные рецепторы

Адгезионные рецепторы взаимодействуют с макромолекулярными компонентами внеклеточного матрикса (например, коллагеном) и передают системе цитоскелета «инструкцию» миграции клетки или ее сцепления с матриксом. Примером такого рода рецепторов могут быть интегрины (рис. 13.13).

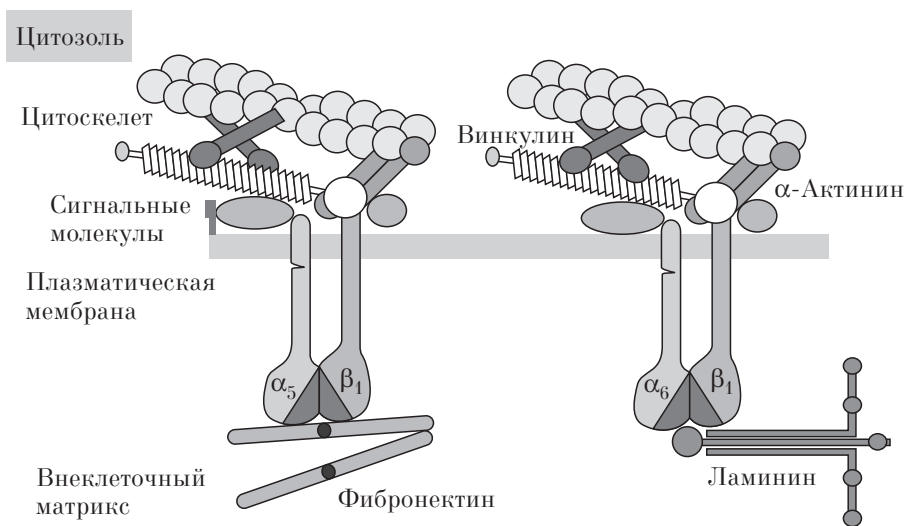


Рис. 13.13. Схема строения интегринов: интегрин $\alpha_5\beta_1$ — рецептор фибронектина; интегрин $\alpha_6\beta_1$ — рецептор ламинина

13.7.4. Лигандзависимые ионные каналы плазматической мембраны

Обычно лигандзависимые ионные каналы построены из нескольких субъединиц, каждая из которых содержит трансмембранный домен. По форме они образуют структуру, внутри которой расположен канал (рис. 13.14).

В не связанном с лигандом состоянии субъединицы плотно взаимодействуют друг с другом и внутренний канал практически отсутствует (закрыт). Связывание лиганда меняет конформацию и взаимодействие субъединиц, что

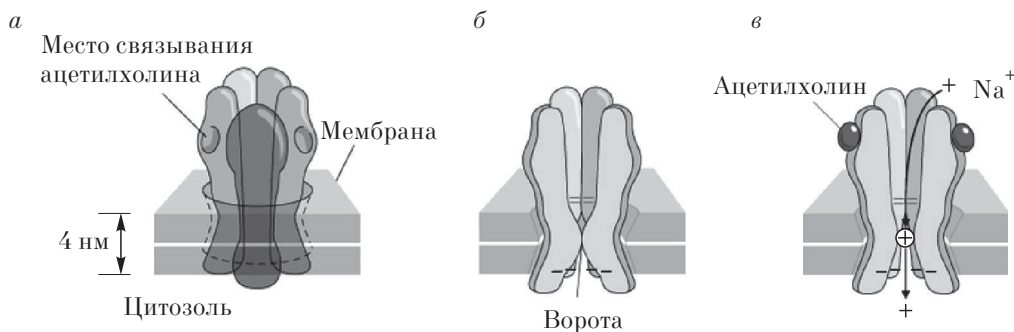


Рис. 13.14. Схема действия лигандзависимого ионного канала: а — строение рецептора; б — закрытая конформация; в — открытая конформация

приводит к появлению просвета (открытие канала). Это наиболее простые передатчики сигнала. Примером такого механизма может служить ацетилхолин-зависимый ионный канал.

13.7.5. Внутриклеточные рецепторы

Рецепторы, расположенные внутри клеток, в основном являются регуляторами механизмов транскрипции. По локализации в клетке различают две группы таких рецепторов:

- группа I — рецепторы, расположенные в цитозоле;
- группа II — рецепторы, расположенные в ядре.

Структура внутриклеточных рецепторов, локализованных в цитозоле (рис. 13.15), включает ряд доменов, обозначаемых буквами от А до F. Основной функцией N-концевого А/В домена (также обозначается как АF-1) является активация транскрипции. Домен не имеет стабильной третичной структуры и приобретает нужную конформацию во время взаимодействия рецептора с ДНК и коактиваторами транскрипции. Домен, связывающий ДНК, содержит два участка, получивших название «цинковые пальцы». Каждый Zn^{2+} -связывающий участок содержит две пары цистеинов, отстоящих друг от друга на 10–15 аминокислотных остатков и координирующих ион Zn^{2+} . Шарнирный участок D разделяет ДНК и лиганд-связывающие домены, обеспечивая перемещение рецептора в ядро (NLS-сайт ядерной локализации). На домене D имеется специальная последовательность аминокислот, которая распознается транспортными системами ядра. К домену D также присоединяются коактиваторы и репрессоры транскрипции. Домен E, помимо связывания лиганда, участвует в активировании транскрипции, димеризации рецептора и связывании белков теплового шока (HSP90-белки) (для рецепторов, расположенных в цитозоле) или коактиваторов или корепрессоров (для рецепторов, распо-

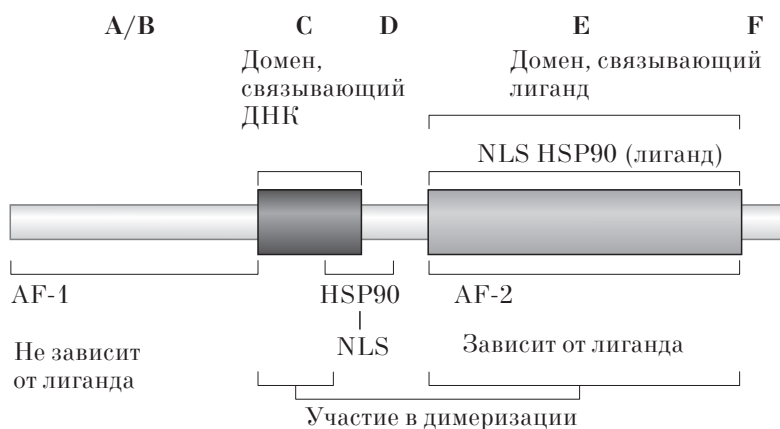


Рис. 13.15. Строение внутриклеточного рецептора, локализованного в цитозоле

женных в ядре). Домен F у многих внутриклеточных рецепторов принимает участие в связывании гормона.

Внутриклеточные рецепторы обычно пребывают в динамическом равновесии между неактивной и активной конформациями. Лиганды и коактиваторы стабилизируют активную форму, а белки теплового шока (для цитозольных рецепторов) или корепрессоры (для ядерных рецепторов) стабилизируют неактивную конформацию. Финальная конформация, приобретаемая рецептором, зависит от комбинации этих факторов.

Активация внутриклеточного рецептора путем связывания лиганда является первым этапом в действии рецептора (рис. 13.16). Это вызывает изменение конформации рецептора, который становится более компактным и устойчивым к действию протеолитических ферментов. Рецептор покидают путем диссоциации связанные с ним белки теплового шока, стабилизовавшие его в неактивной конформации. Вслед за этим происходит димеризация рецептора. Димеризованный рецептор перемещается в ядро, где связывается с ДНК. У рецепторов, локализованных в ядре, связывание лиганда приводит к освобождению от корепрессоров и переходу в активную форму.

Участки ДНК, с которыми связываются рецепторы, называют *респонсивными элементами*. Они представляют собой специфические последовательности нуклеотидов (часто это палиндромная последовательность), узнаваемые факторами транскрипции.

Связывая лиганды, рецепторы воспринимают гормоны благодаря изменению своей конформации. Разные рецепторы часто запускают общие сигнальные механизмы. И наоборот, различные сигнальные пути используются сходными рецепторами одного класса.

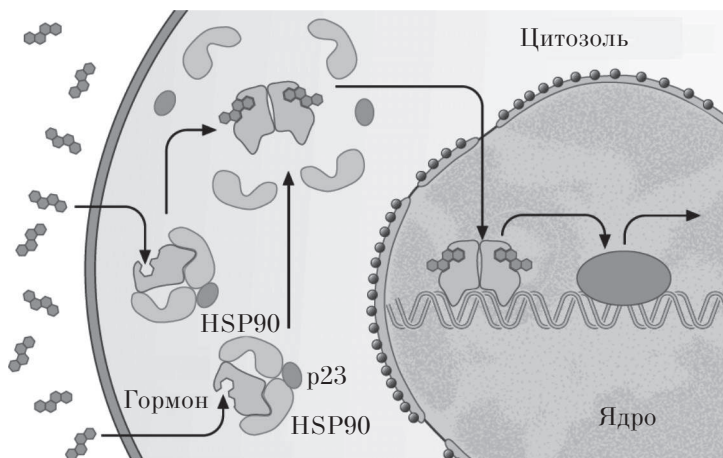


Рис. 13.16. Схема передачи сигнала из цитозоля в ядро при участии внутриклеточных рецепторов (p23 — белок, связывающий белки теплового шока (HSP90))

13.8. Проведение сигнала в клетке

Трансдукция сигнала — следующий этап в действии гормона на клетку-мишень. На этом этапе необходимо усилить сигнал для того, чтобы привлечь к ответной реакции большое число молекул, пространственно связать участников переноса сигнала и обеспечить механизмы выключения передачи сигнала. Схема одного из возможных гипотетических сигнальных путей показана на рис. 13.17.

СИР-белок — субстрат инсулинового рецептора; РН-домены выполняют функции «заякоривания» в мембранах и связываются с разными фосфатидилинозитолами; SH2 и РТВ связывают участки с фосфотирозином в составе рецептора; SH3 связывают участки, богатые пролином; скаффолд-белки связывают рецепторы с последующими этапами сигнальной трансдукции, например с каскадом MAP-киназ. SOS-белок, принимающий участие в замене гуанилового нуклеотида, — заменяющий фактор в составе одномерного белка, обладающего ГТФазной активностью.

Взаимодействие между участниками переноса сигнала требует сближения и соединения между ними. Для обеспечения сближения рецептора с внутриклеточными участниками сигнального пути широко используются липидные якоря, в качестве которых выступают жирные кислоты, изопреноиды и сложные гликолипиды. Эти молекулы помогают белкам — проводникам сигнала связываться с мембраной и повышают эффективность их взаимодействия с активированным рецептором. Такую же функцию выполняют специальные белки-адапторы: GRB2 (англ. Growth factor receptor binding protein); белок, в составе которого имеется SH2-домен, взаимодействующий с фосфорилированными аминокислотами; белки с РН-доменами (связываются с фосфатидилинозитолами) и РТВ-доменами (связываются с фосфотирозином рецептора).

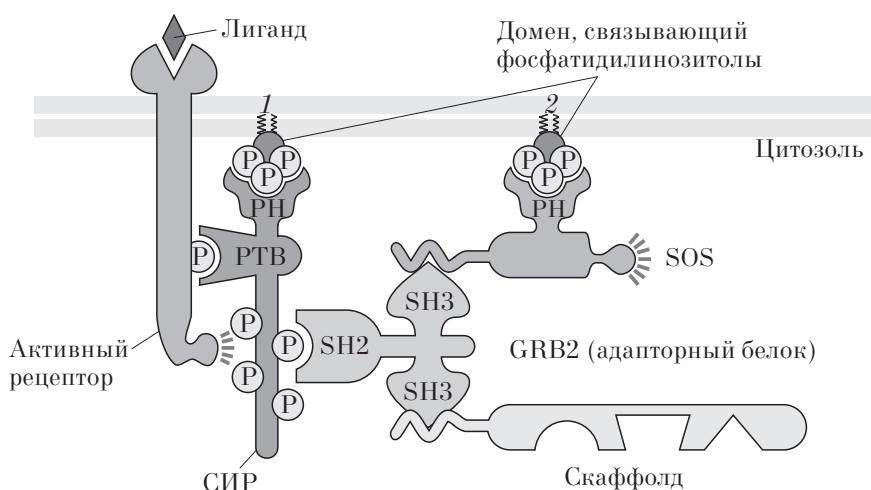


Рис. 13.17. Гипотетический сигнальный путь

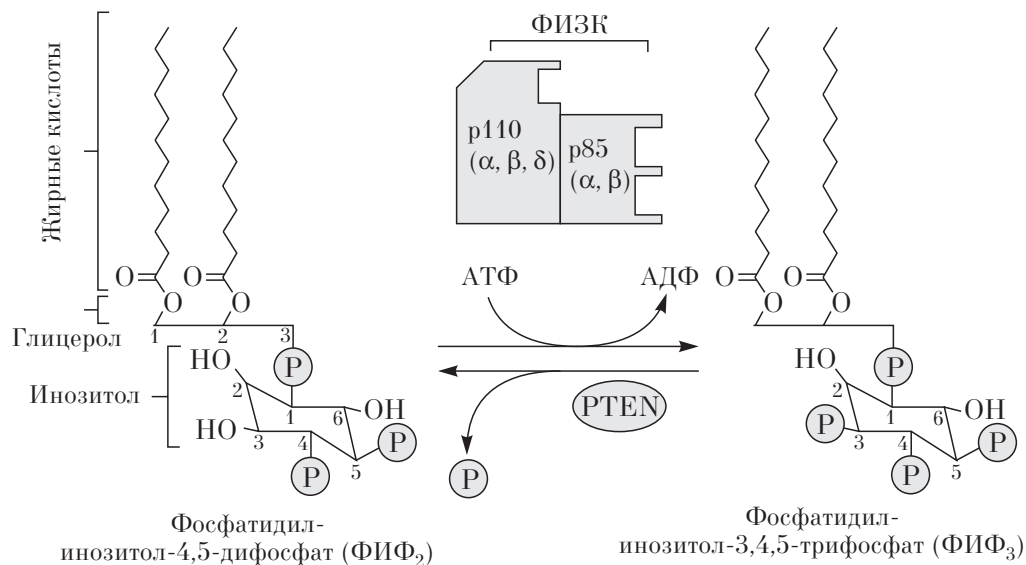


Рис. 13.18. Реакция, катализируемая фосфатидилинозитол-3-киназой: p110 — регуляторная, p85 — каталитическая субъединица фермента

При активации мембранных рецепторов модифицируются некоторые фосфолипиды. Например, гормон-рецепторное взаимодействие стимулирует фосфатидилинозитол-3-киназу (ФИЗК), которая катализирует образование в мембране фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (ФИФ₃) (рис. 13.18). ФИФ₃ дефосфорилируется фосфатазой (PTEN), играющей важную роль в механизмах торможения действия гормона.

С ФИФ₃ связывается фосфоинозитолзависимая протеинкиназа, претерпевает структурную перестройку и активируется. В результате фермент приобретает способность катализировать фосфорилирование своего субстрата — протеинкиназы В. Протеинкиназа В также содержит РН-домен. В то же время существуют специфические фосфатазы, которые катализируют дефосфорилирование ФИФ₃ и выключают действие факторов, вызвавших активирование ФИЗК.

13.9. G-белки

Важную роль в механизмах внутриклеточного переноса сигналов с участием гормонов, взаимодействующих с мембранными рецепторами, играют ГТФазы, катализирующие гидролиз ГТФ и получившие название **G-белки**. По строению они разделяются на *гетеротримерные* — G-белки, состоящие из трех разных субъединиц (α, β и γ), и *мономерные* — белки, состоящие из одной субъединицы.

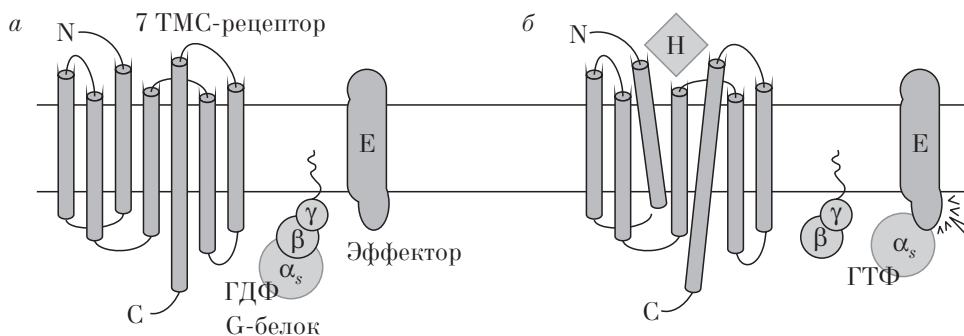


Рис. 13.19. Участники переноса сигнала снаружи внутрь клетки: рецептор, G-белок и эффектор (E):

a — состояние без сигнала; *б* — состояние после присоединения сигнала (H)

Тримерный G-белок после контакта с рецептором диссоциирует на субъединицу α и димер, состоящий из β - и γ -субъединиц. α -Субъединица тримерного G-белка и одномерный G-белок структурно схожи, обладают ГТФазной активностью и в неактивном состоянии связаны с ГДФ. G-белки действуют как молекулярные «реле»-переключатели при передаче сигнала внутри клетки. Они «включаются» и передают сигнал после замены молекулы ГДФ на ГТФ, но «выключаются» и прерывают передачу сигнала после гидролиза ГТФ. Образующийся ГДФ остается связанным с белком.

Большинство гормонов, построенных из аминокислот, действуют через рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками. Внутриклеточный перенос сигналов инициируют три основных участника, встроенные в мембрану: рецептор, G-белок и эффектор (E) (рис. 13.19).

Роль эффекторов могут играть аденилатциклаза, Ca^{2+} -, Na^{+} -, Cl^{-} - или K^{+} -каналы, фосфолипаза C.

Существует большое число различных видов $G\alpha$ субъединиц, входящих в состав тримерных G-белков (табл. 13.2). По гомологии первичных структур этих субъединиц выделяют три семейства тримерных G-белков:

- 1) семейство стимулирующих G_s -белков;
- 2) семейство ингибиторных G_i -белков;
- 3) семейство G_q -белков.

Таблица 13.2

Разновидности α -субъединицы в составе тримерных G-белков и ее функции

α -Субъединица	Эффект α -субъединицы	Примеры 7-ТМС-рецепторов	Опосредованный физиологический эффект
<i>Семейство G-белков, стимулирующих аденилатциклазу</i>			
$G\alpha_s$	Активация аденилатциклазы	β -Адренорецепторы, серотониновые рецепторы, дофаминовые рецепторы, гистаминовые H_2 -рецепторы	Повышение частоты сердечных сокращений, расслабление гладких мышц, стимулирование активности нейронов

Окончание табл. 13.2

α -Субъединица	Эффект α -субъединицы	Примеры 7-ТМС-рецепторов	Опосредованный физиологический эффект
$G\alpha_{olf}$	Активация аденилатциклазы	Обонятельные рецепторы	Передача обонятельного сигнала
<i>Семейство ингибиторных G_i</i>			
$G\alpha_i, G\alpha_o$	Ингибирование активности аденилатциклазы, открытие K^+ -каналов, закрытие Ca^{2+} -каналов	Мускариновые холинорецепторы типов M2 и M4, хемокиновые рецепторы, α_2 -адренорецепторы, серотониновые рецепторы подтипа 5-HT ₁ , гистаминовые рецепторы подтипа H ₃ и H ₄ , дофаминовые рецепторы подтипа D2	Сокращение гладких мышц, снижение активности нейронов
$G\alpha_t$ (трансдукцин)	Активация фосфодиэстеразы	Родопсин	Передача зрительного сигнала
$G\alpha_{gust}$ (густдукцин)	Активация фосфодиэстеразы	Вкусовые рецепторы	Передача вкусового сигнала
<i>Семейство G_q</i>			
$G\alpha_q, G\alpha_{11}, G\alpha_{14}, G\alpha_{15}, G\alpha_{16}$	Активация фосфолипазы C	α_1 -Адренорецепторы, мускариновые холинорецепторы, гистаминовые рецепторы, серотониновые рецепторы	Сокращение гладких мышц, ток Ca^{2+}

Активация молекулы мишени или эффектора, вызванная действием $G\alpha$ -субъединицы, приводит к изменению количества молекул с небольшой молекулярной массой — *вторичных посредников*. К ним относятся цАМФ, цГМФ, Ca^{2+} , ДАГ и др.

Димер, состоящий из β - и γ -субъединиц и образующийся при диссоциации тримерного G-белка, также может участвовать в механизмах передачи сигнала. При этом он может оказывать как стимулирующий, так и ингибирующий эффект на активность ферментов.

Мономерные G-белки относятся к суперсемейству Ras-белков. Они ответственны за пролиферацию клеток, управление морфологией клетки, ядерным и везикулярным транспортом.

Сопряжение с рецептором у многих G-белков обеспечивается при помощи вспомогательных белков, регулирующих обмен гуаниловых нуклеотидов в ГТФ-связывающем участке. Они ускоряют обмен ГДФ на ГТФ и таким образом активируют G-белки. У тримерных G-белков такую функцию выполняет активированный гормоном рецептор, а у мономерных — специальные белки (например, Sos-белок в одном из сигнальных путей действия инсулина). Другие белки активируют гидролиз ГТФ, ускоряя инактивацию G-белков.

13.10. Вторичные посредники

Как уже упоминалось, в результате взаимодействия гормонально-рецепторного комплекса с эффектором меняется количество так называемых вторичных посредников (рис. 13.20). Это короткоживущие и небольшие по размеру внутриклеточные молекулы, которые передают и умножают сигналы, получаемые от активированных рецепторов.

Выделяют три группы вторичных посредников:

1) гидрофильные молекулы: цАМФ, цГМФ, ИФ₃, Ca²⁺ и др. — действуют в цитозоле;

2) гидрофобные молекулы: диацилглицеролы (ДАГ) и фосфатидилинозитолы (ФИФ_n) — действуют локально в мембранах;

3) газы: оксид азота (NO) и углерода (CO) — являются короткоживущими, но относительно стабильными продуктами активных форм кислорода; растворимы в цитозоле и могут проникать туда извне через клеточные мембраны.

Сигнальные системы, в которых используются вторичные посредники, имеют обычно три уровня усиления сигнала. Вначале рецептор, связавшийся с гормоном, активирует несколько своих мишеней (например, G-белков), которые, в свою очередь, влияют на несколько эффекторов (в случае G-белков это связанные с мембраной ферменты или каналы). Этот второй уровень усиления

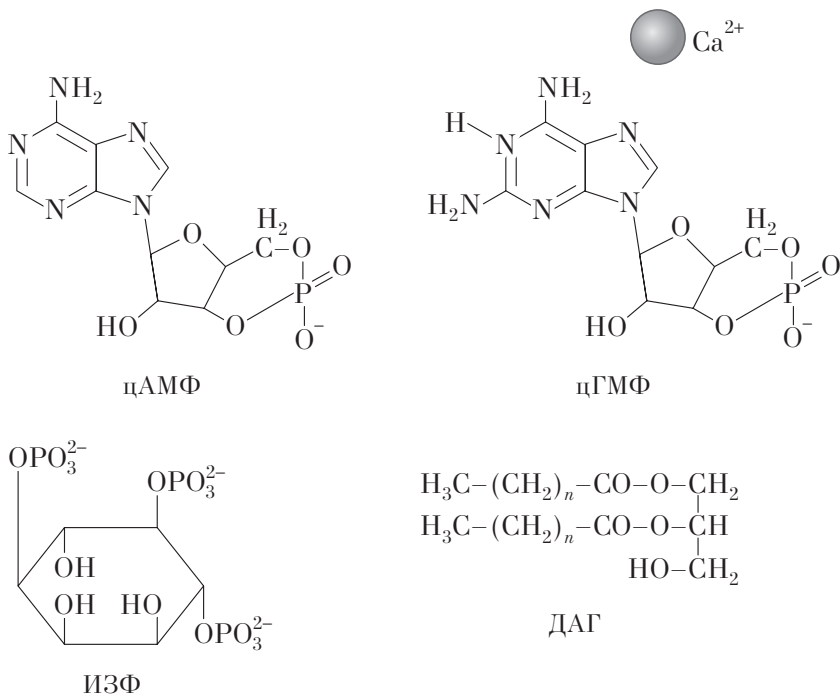


Рис. 13.20. Примеры молекул вторичных посредников

сигнала довольно мощный, поскольку такие ферменты синтезируют большое число вторичных посредников, которые на третьем этапе усиления, действуя как аллостерические активаторы, привлекают большое число ферментов. Чаще всего вторичные посредники изменяют активность протеинкиназ, катализирующих фосфорилирование исполнительных ферментов или факторов транскрипции.

13.11. Протеинкиназы

Геном человека содержит свыше пятисот генов протеинкиназ, которые составляют около 2 % всех генов. Различают *мембранные* и *цитозольные* протеинкиназы.

Вторичные посредники действуют в основном на цитозольные ферменты, которые представляют собой серин/треониновые протеинкиназы. Они катализируют фосфорилирование серина или треонина в составе белков-мишеней. Наиболее хорошо изучена цАМФ-зависимая протеинкиназа А (ПкА).

Молекула ПкА в неактивном состоянии представляет собой тетрамер и состоит из двух регуляторных и двух каталитических субъединиц. При повышении уровня цАМФ в клетке к каждой регуляторной субъединице присоединяется по две молекулы цАМФ, что способствует высвобождению активных каталитических субъединиц (рис. 13.21). Каталитическая субъединица катализирует фосфорилирование многих ферментов, занимающих ключевые позиции в метаболических реакциях клетки.

К настоящему времени выделено несколько сотен таких киназ. Они отличаются субъединичным составом, специфичностью к субстратам, молекулярной массой. В клетке такие киназы связываются со специфическими белками,

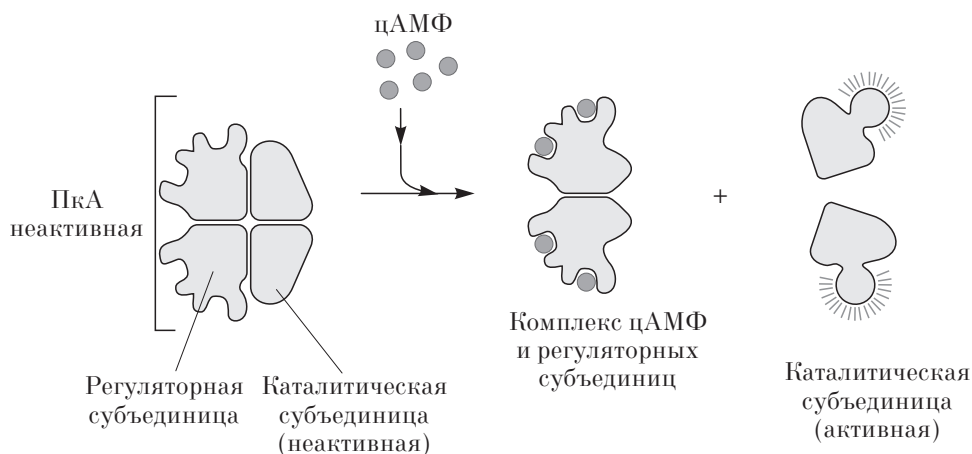


Рис. 13.21. Роль цАМФ в регуляции протеинкиназы А

которые обеспечивают их организацию, локализацию, облегчают взаимодействие с субстратами.

Активная ПкА может катализировать фосфорилирование ферментов в митохондриях или проникать в ядро и фосфорилировать факторы транскрипции. Например, CREB-белок, который связывается с CRE (цАМФ-зависимым респонсивным элементом) на ДНК. В нефосфорилированном состоянии этот белок — слабый активатор транскрипции, но фосфорилирование стимулирует его взаимодействие с коактиватором, который обладает свойствами гистон ацетилазы. Ацетилирование гистонов ослабляет взаимодействие гистонов с ДНК и способствует более активному протеканию транскрипции (рис. 13.22).

К другим цитозольным протеинкиназам, активность которых зависит от вторичных посредников, относятся протеинкиназа G, которая регулируется цГМФ; протеинкиназа C, регулируемая ДАГ и ионами кальция; кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа и др. При изложении сигнальных систем с участием гормонов функции этих протеинкиназ будут описаны подробнее.

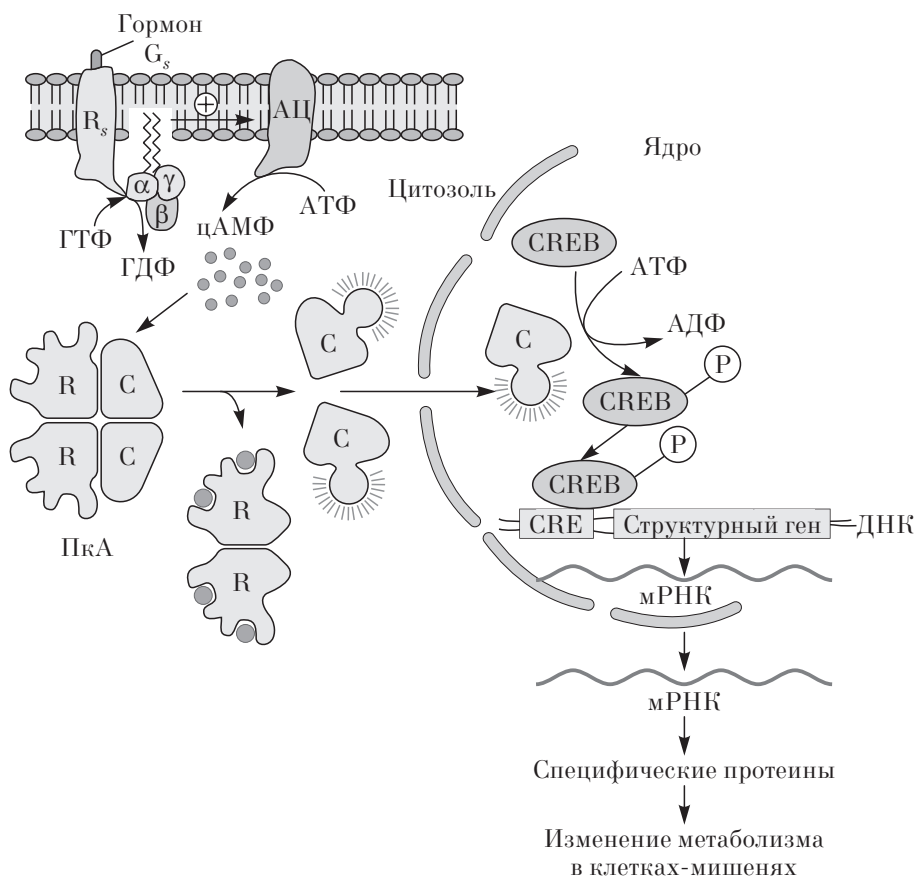


Рис. 13.22. Роль протеинкиназы А в регуляции транскрипции

Удаление фосфата с фосфорилированных протеинкиназами ферментов и белков катализируется специфическими сопряженными с киназами протеинфосфатазами.

Важное место во внутриклеточных сигнальных системах занимают протеинкиназы, активируемые митогенами (МАПК). Они реагируют на многие внеклеточные стимулы (митогены) и активируются при участии специфических сигнальных каскадов, которые включают МАПК, ее киназу (МАПКК) и киназу МАПКК (МАПККК). Активируясь внеклеточными стимулами, МАПККК фосфорилирует МАПКК, которая затем путем фосфорилирования активирует МАПК. Такой сигнальный МАПК-каскад характерен для всех эукариот, от дрожжей до млекопитающих.

Организация подобных сигнальных каскадов становится возможной благодаря специальным каркасным (скаффолд) белкам. Они связывают несколько участников сигнальных каскадов, объединяя их в функциональные комплексы, направляют их в определенные области клетки и часто служат объектом действия обратных регуляторных связей. Тем самым они выполняют ту же функцию в сигнал-проводящей системе, что и адапторные белки.

13.12. Механизмы проведения гормонального сигнала в клетке

Механизмы проведения гормонального сигнала в клетке многообразны. Вместе с тем они подчинены общим закономерностям и включают большое количество белков-проводников. Конкретный механизм проведения сигнала зависит от типа гормонального рецептора.

13.12.1. Рецепторы, сопряженные с тримерными $G\alpha_s$ -белками

На рецепторы, сопряженные с тримерными $G\alpha_s$ -белками, действуют гормоны АКТГ, АДГ, кальцитонин, кортиколиберин, ФСГ, лютеинизирующий гормон (ЛГ), глюкагон, ТСГ, паратирин, адреналин (β -адренергические рецепторы), вазопрессин, хорионический гонадотропин, меланоцитостимулирующий гормон (рис. 13.23).

После взаимодействия с рецептором (1) комплекс соединяется с G-белком, который диссоциирует на α_s - и $\beta\gamma$ -субъединицы (рис. 13.23). У α -субъединицы происходит замена ГДФ на ГТФ (2), и перемещаясь по мембране, α -субъединица взаимодействует с АЦ (3) и активирует ее (4). Активная АЦ катализирует синтез цАМФ — активатор ПкА (5). ПкА катализирует фосфорилирование молекул серина или треонина в составе ферментов-мишеней (6), активность которых при этом может повышаться у одних ферментов и тормозиться у других (7). ПкА, как отмечалось выше, может также катализировать фосфорилирование факторов

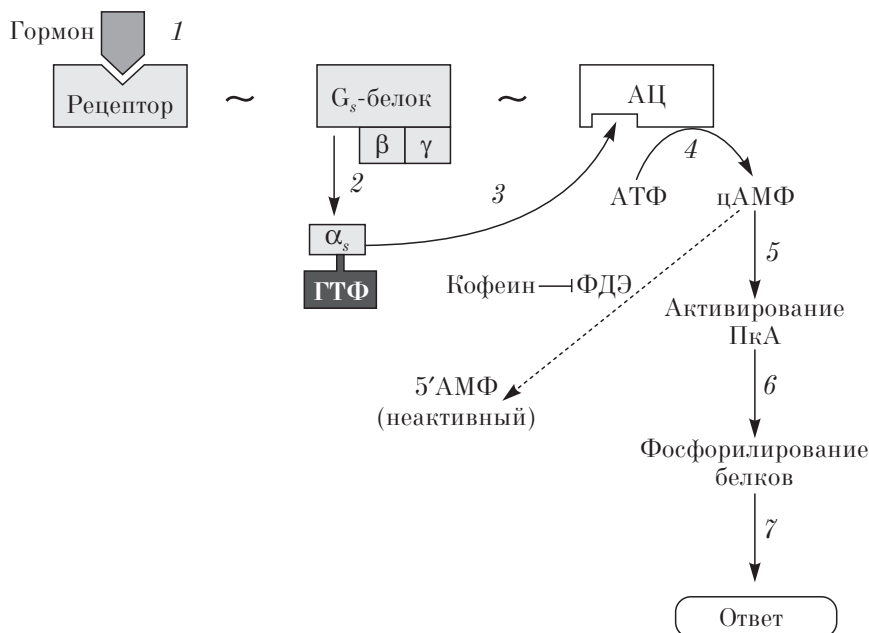


Рис. 13.23. Компоненты сигнальной системы, включающей тримерные G-белки (ФДЭ — фосфодиэстераза; 1–7 — этапы)

транскрипции, что ведет к изменению количества отдельных белков или ферментов в клетке.

Действие гормонов, способствующих увеличению цАМФ, можно ограничить путем гидролиза цАМФ фосфодиэстеразами (ФДЭ), которые значительно укорачивают продолжительность влияния гормона на клетку. К настоящему времени известно 11 членов семейства фосфодиэстераз. Их активность, в свою очередь, регулируется субстратами, гормонами, ионами кальция. Ингибиторы фосфодиэстераз имитируют действие гормонов или пролонгируют их эффект. Наиболее известным ингибитором фосфодиэстераз являются метилированные производные ксантина (кофеин).

Фосфорилированные молекулы-мишени протеинкиназ являются субстратами для протеинфосфатаз. Сочетанное действие этих киназ и фосфатаз чрезвычайно важно в регуляции ключевых метаболических путей. Наиболее подробно это изложено в метаболизме гликогена (см. главу 6).

Подобно гормонам, активирующим сопряженные с G_{α_s} -белком рецепторы, на аденилатциклазу действует форсколин (колеонол) — дитерпеноидный алкалоид, который образуется растением *Coleus forskohlii*. Основным применением форсколина в настоящее время является использование в клеточной биологии его способности непосредственно (минуя рецепторы) активировать аденилатциклазу и повышать уровень цАМФ в клетке.

13.12.2. Рецепторы, сопряженные с тримерными $G\alpha_i$ -белками

На рецепторы, сопряженные с тримерными $G\alpha_i$ -белками, действуют гормоны ацетилхолин, адреналин (α_2 -адренергические рецепторы), ангиотензин II, соматостатин.

Начальные этапы сигнального пути с участием таких гормонов ничем не отличаются от начала действия предыдущей группы гормонов. Однако после высвобождения $G\alpha_i$ -субъединицы из G-белка и обмена ГДФ на ГТФ она взаимодействует с активной АЦ и тормозит ее активность. В частности, такой механизм проведения сигнала относится к соматостатину, секретируемому гипоталамусом (рис. 13.24). Количество синтезируемого и секретируемого клетками гипофиза гормона роста (ГР) — результат интегрального действия соматолиберина и соматостатина на рецепторы. При этом одни рецепторы сопряжены с $G\alpha_s$ -субъединицей (для соматолиберина), а другие — с $G\alpha_i$ -субъединицей (для соматостатина).

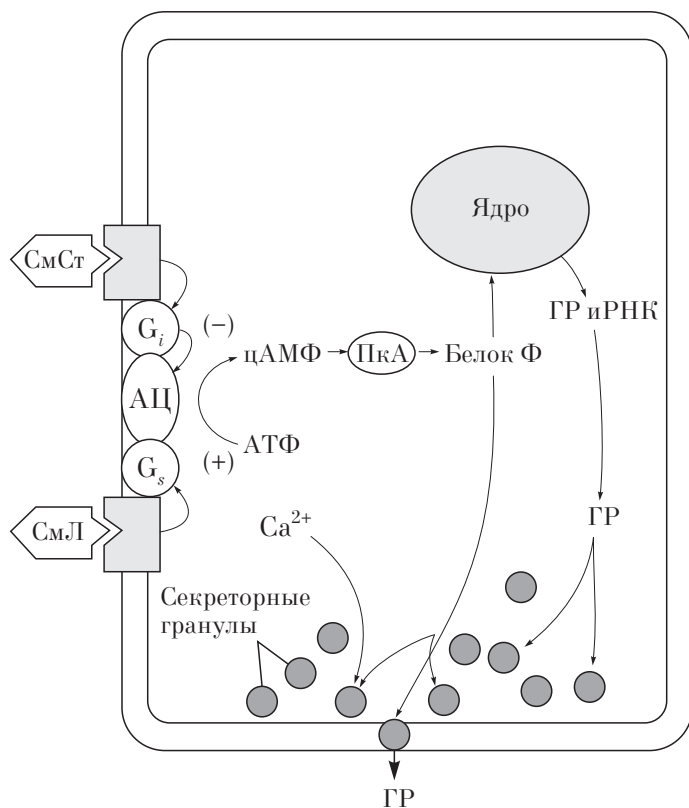


Рис. 13.24. Сопряженный эффект соматостатина и соматолиберина на АЦ в клетках, секретирующих гормон роста:

СмСт — соматостатин; СмЛ — соматолиберин; ГР — гормон роста; АЦ — аденилатциклаза

13.12.3. Рецепторы, сопряженные с тримерными $G\alpha_q$ -белками

С этими рецепторами взаимодействуют ацетилхолин (М), катехоламины (через α_1 -адренергические рецепторы), ангиотензин II, вазопрессин, холецистокинин, гастрин, гонадолиберин, окситоцин, тиреолиберин, фактор роста тромбоцитов, субстанция Р.

В качестве мембранного эффектора для этой сигнальной системы выступает фосфолипаза С (рис. 13.25). Как и в предыдущих механизмах, гормон-рецепторный комплекс стимулирует обмен ГДФ на ГТФ и диссоциацию тримерного G-белка, но с высвобождением G_q -субъединицы, которая взаимодействует с эффекторным ферментом и активирует его. Фосфолипаза С катализирует гидролиз мембранного фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (ФИФ₂) с образованием инозитол-1,4,5-трифосфата (ИФ₃) — гидрофильной молекулы, перемещающейся в цитозоль, и диацилглицерола (ДАГ), который остается в мембране из-за своей плохой растворимости в воде.

Инозитолтрифосфат в цитозоле связывается со специфическим рецептором, который расположен в мембранах ЭР и способствует быстрому увеличению концентрации ионов кальция в цитозоле.

В состоянии покоя уровень ионизированного кальция в цитозоле очень низкий (0,05–10 мкмоль/л). Клетка затрачивает большое количество энергии на поддержание такого низкого уровня. В частности, его обеспечивают: Na^+/Ca^{2+} -обменный механизм, позволяющий удалять Ca^{2+} из клетки в обмен на поступление в клетку Na^+ ; Ca^{2+}/H^+ -АТФаза, обменивающая Ca^{2+} на внеклеточные протоны; Ca^{2+} -АТФаза, активно закачивающая Ca^{2+} в пузырьки эндоплазматической сети. Повышению уровня цитозольного Ca^{2+} способствуют:

1) метаботропные кальциевые каналы, являющиеся рецепторами некоторых гормонов;

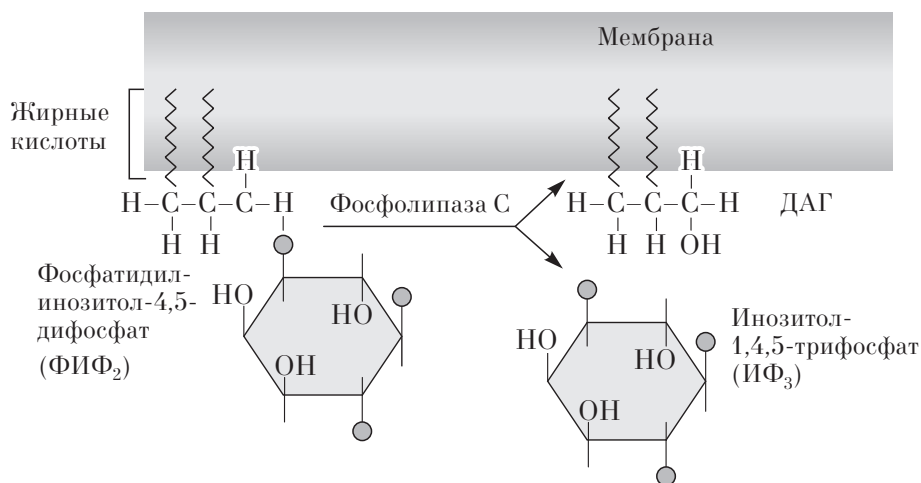


Рис. 13.25. Действие фосфолипазы С на фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат

- 2) потенциалзависимые кальциевые каналы, которые открываются при изменении мембранного потенциала;
 3) мобилизация Ca^{2+} из ЭР или митохондрий.

Инозитолтрифосфат является лигандом для метаботропного кальциевого канала, встроенного в мембраны эндоплазматической сети. В пузырьках эндоплазматической сети депонируются ионы кальция. Изменение конформации канала после связывания лиганда обеспечивает выход ионов кальция в цитозоль (рис. 13.26).

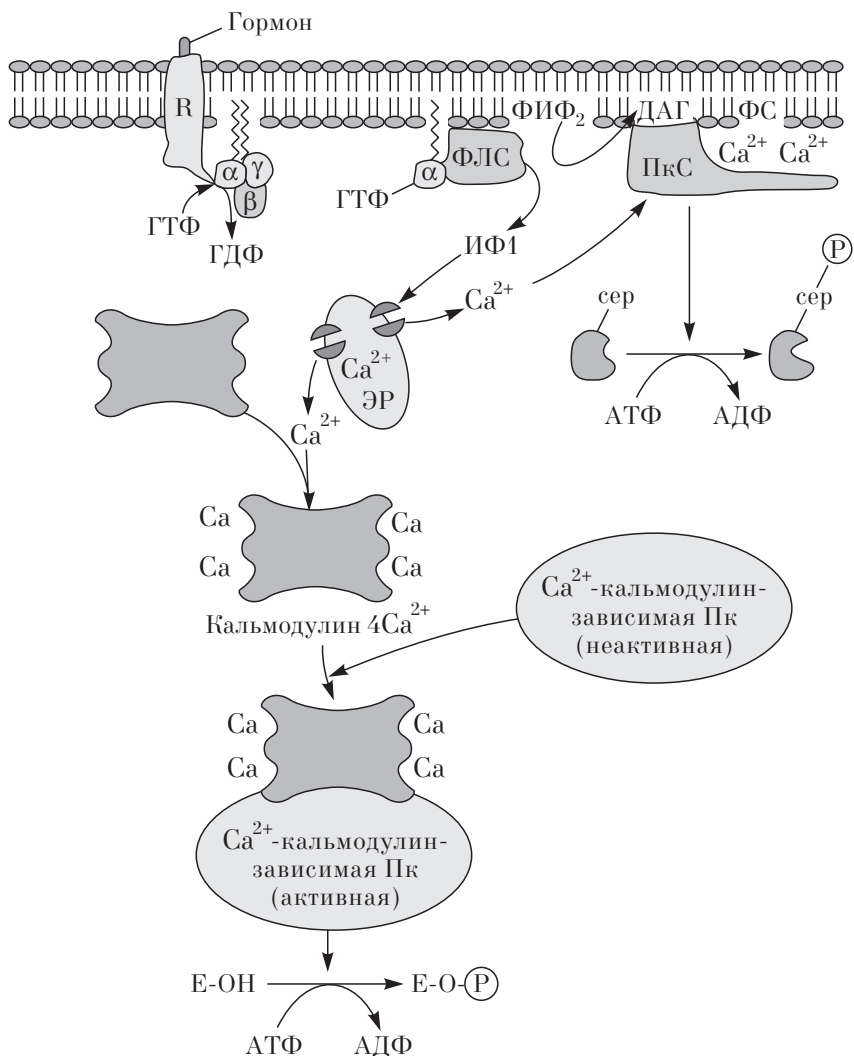


Рис. 13.26. Проведение сигнала в клетку с помощью рецепторов, сопряженных с тримерными $\text{G}\alpha_q$ -белками (ФЛС — фосфолипаза С; ПКС — протеинкиназа С)

Повышение концентрации кальция в цитозоле вызывает ряд событий, обусловленных прямым действием ионов кальция или опосредованных белками, специфически связывающими кальций. Среди них особое место занимает кальмодулин (М.М. 17 тыс. а.е.м.), который может быть субъединицей многих ферментов. По структуре и функции он гомологичен мышечному белку тропонину С.

Кальмодулин содержит четыре участка связывания Ca^{2+} (см. рис. 13.26). Связывание Ca^{2+} по всем четырем участкам ведет к изменению конформации белка — он приобретает способность активировать или инактивировать различные протеинкиназы.

ДАГ, образующийся в мембранах, в свою очередь может быть активатором протеинкиназы С — серин/треониновой протеинкиназы, катализирующей фосфорилирование ферментов или факторов транскрипции. Он также служит субстратом диацилглицероллипазы, катализирующей отщепление из состава молекулы арахидоновой кислоты, необходимой для синтеза простагландинов.

13.12.4. Рецепторы, обладающие тирозинкиназной активностью

Рецепторы, обладающие тирозинкиназной активностью, являются начальным звеном в сигнальных путях, инициируемых некоторыми гормонами и факторами роста. Среди них прежде всего следует назвать инсулин, инсулиноподобные факторы I и II.

В отличие от многих 1-ТМС-рецепторов, которые представлены одной полипептидной цепью и образуют димеры после взаимодействия с лигандом, рецептор *инсулина* — гетеротетрамер. Каждая половина рецептора образована внеклеточной α -цепью, участвующей в связывании лиганда, и внутриклеточной β -цепью, обладающей тирозинкиназной активностью. Если рецепторы, сопряженные с G-белками, являются частью сигнальной системы, в которой важную роль играют вторичные посредники, а протеинкиназы и фосфатазы используются в заключительной части передачи сигнала, то в механизмах передачи сигналов с участием 1-ТМС-рецепторов протеинкиназы действуют уже в начале сигнальной системы.

На рис. 13.27 представлен упрощенный пример такого каскада белков — инозитол-3-фосфаткиназная сигнальная система.

После взаимодействия инсулина с рецептором происходит активирование тирозинкиназного домена рецептора и его аутофосфорилирование. Фосфорилированные остатки тирозина в составе рецептора (PY) опознаются SH2-доменами субстратов инсулинового рецептора (СИР-1, СИР-2), происходит их связывание и фосфорилирование. Фосфатидилинозитол-3-киназа (ФИ-3К) своими SH2-доменами присоединяется к СИР, активируется и катализирует фосфорилирование фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата ФИФ_2 с образованием ФИФ_3 . PH-домены обеспечивают присоединение фосфатидилинозитолфосфатзависимой протеинкиназы (PDK) к протеинкиназе В (ПкВ) и фосфорилирование ПкВ.

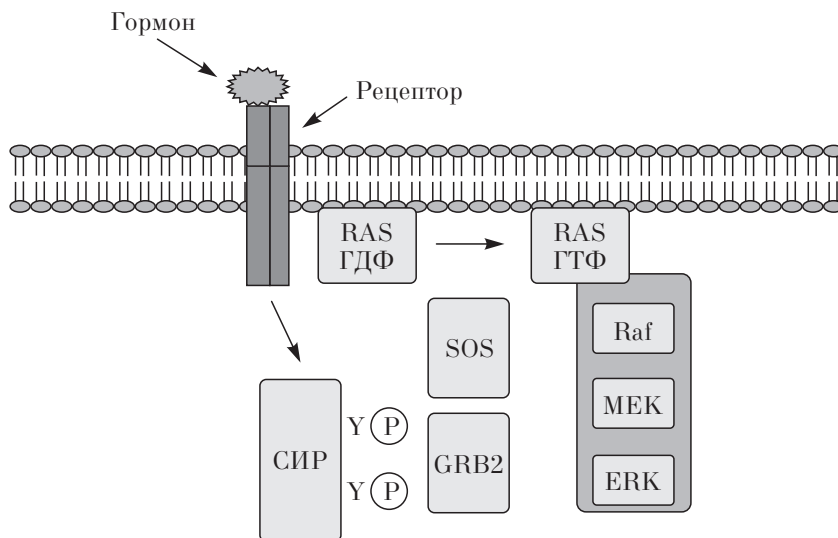


Рис. 13.28. Схема сигнальной системы с участием каскада МАП-киназ:

СИР — субстрат инсулинового рецептора; GRB2 — белок, связывающийся с рецептором фактора роста; Raf — киназа киназы активируемой митогенами протеинкиназы (МАПККК); MEK — киназа активируемой митогенами протеинкиназы (МАПКК); ERK — активируемая митогенами протеинкиназа (МАПК)

Этот путь проведения сигнала от инсулина приводит к активированию синтеза глюкокиназы, 6-фосфофрукто-1-киназы, пируваткиназы, гексокиназы, маликфермента, ацил-КоА-карбоксилазы, ацил-КоА-синтазы и торможению синтеза ключевых ферментов глюконеогенеза.

В формировании системы МАП-киназ важная роль принадлежит скаффолд-белкам. Белки, содержащие домены SH2 и SH3, связываются парой СИР–GRB2, а к ним присоединяются белки, ускоряющие замену ГДФ на ГТФ (SOS) у мембраносвязанных одномерных белков RAS. RAS-белок, выполняющий роль переключателя сигнала, взаимодействует с белком, организатором каскада МАП-киназ. Активная (фосфорилированная) МАПК перемещается в ядро, где фосфорилирует факторы транскрипции, изменяя скорость синтеза белков.

13.12.5. Рецепторы, взаимодействующие с тирозинкиназами цитозоля

Рецепторы некоторых гормонов и цитокинов (гормон роста, пролактин, эритропоэтин) не обладают тирозинкиназной активностью, а взаимодействуют с тирозинкиназами цитозоля семейства Янус-киназ (JAK-1, JAK-2 и др.).

После димеризации рецептора и присоединения JAK-киназ происходит их аутофосфорилирование (рис. 13.29). В последующем к ним присоединяются

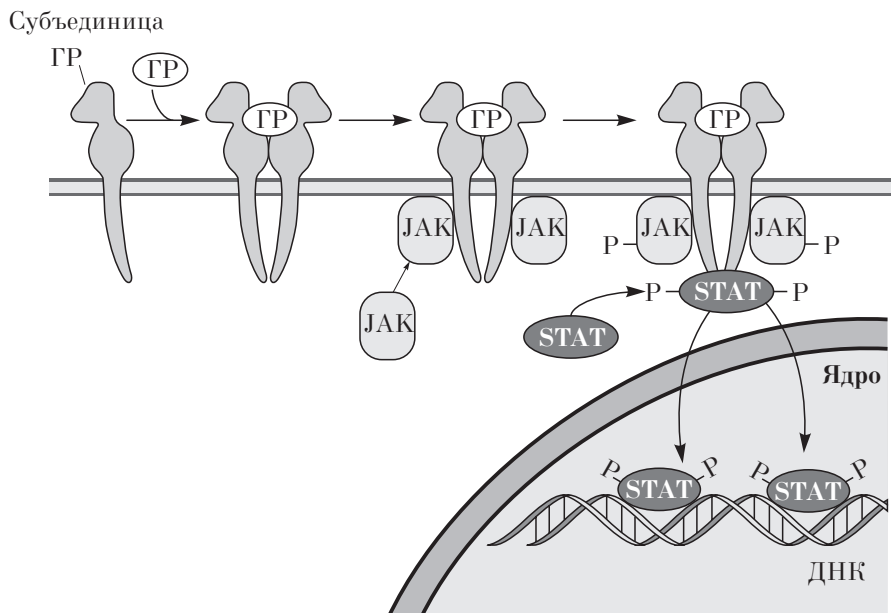


Рис. 13.29. Сигнальная система с участием гормона роста

белки с SH2-доменами, которые также фосфорилируются. Среди таких белков можно назвать семейство цитозольных факторов транскрипции, выполняющих роль переносчика сигналов (STAT). После фосфорилирования JAK-киназой такой белок мигрирует в ядро, где может активировать различные гены. К белкам, экспрессия которых активируется белками STAT в печени, относятся, например, инсулиноподобные факторы роста. С помощью этих белков гормон роста оказывает непрямой эффект на клетки различных органов.

Фосфорилированная внутриклеточная часть рецептора может взаимодействовать и с другими белками, содержащими SH2-домены, например, с участниками МАП-киназного пути (через белок GRB2).

13.12.6. Мембранные рецепторы с гуанилатциклазной активностью

Мембранный рецептор, обладающий гуанилатциклазной активностью (*мембраносвязанная рецепторная ГЦ*), в почках активируется натрийуретическим пептидом предсердий (ANP) и желудочков сердца (BNP), которые секретируются клетками при их растяжении из-за увеличения объема циркулирующей крови (рис. 13.30). Доставляемые кровотоком к почке молекулы натрийуретического пептида взаимодействуют с гуанилатциклазным рецептором и активируют гуанилатциклазу в клетках собирательных трубочек. Повышение при этом уровня цГМФ способствует увеличению почечной экскреции Na^+ и, следова-

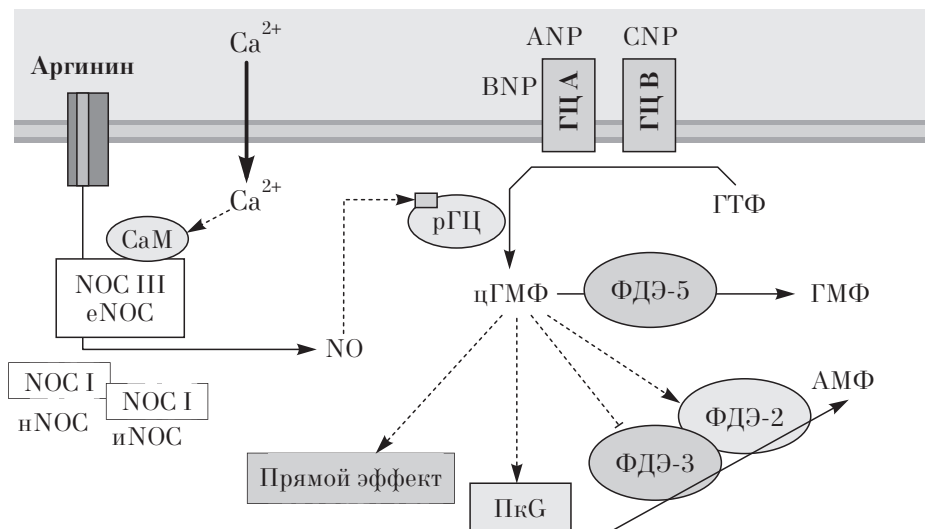


Рис. 13.30. Пути передачи сигналов с участием цГМФ:

ANP — натрийуретический пептид предсердий; BNP — натрийуретический пептид мозга (получил такое название, поскольку впервые был выделен из ткани мозга); CNP — натрийуретический пептид эндотелия; ГЦ А и ГЦ В — мембранные гуанилатциклазы; рГЦ — растворимая гуанилатциклаза; ФДЭ — фосфодиэстеразы; ПкG — протеинкиназа G; eNOC — эндотелиальная NO-синтаза; иNOC-индуцируемая NO-синтаза; нNOC — NO-синтаза нейронов; CaM — кальмодулин

тельно, воды. Выведение воды с мочой снижает объем циркулирующей крови, и секреция уретических пептидов снижается.

Клетки гладких мышц сосудов также имеют мембраносвязанные гуанилатциклазные рецепторы. При связывании с ними натрийуретический пептид эндотелия вызывает расслабление мышц сосудистой стенки (вазодилатацию), что ведет к снижению кровяного давления.

Гуанилатциклаза в плазматической мембране кишечных эпителиальных клеток активируется кишечным пептидом гуанилином, который регулирует секрецию Cl⁻ в кишечнике. Этот рецептор является также мишенью устойчивого к высокой температуре пептидного эндотоксина, образуемого *E. coli* и другими грамотрицательными бактериями. Повышение концентрации цГМФ, вызванной эндотоксином, увеличивает секрецию Cl⁻ и уменьшает реабсорбцию воды кишечным эпителием, вызывая диарею.

Растворимая ГЦ — белок с прочно связанной группировкой гема. Этот фермент активируется оксидом азота (NO). Последний образуется из аргинина с помощью Ca²⁺-зависимой NO-синтазы, присутствующей во многих животных тканях. В клетках-мишенях NO связывается с гемом в составе гуанилатциклазы, активируя образование цГМФ.

Образовавшийся таким образом цГМФ вызывает снижение силы сердечных сокращений, стимулируя ионные насосы, работа которых направлена

на удаление кальция из цитозоля. Это вызывает расслабление сердечной мышцы. Подобный эффект лежит в основе механизма действия нитроглицерина и других нитровазодилататоров, которые являются источниками NO и нашли широкое применение при болях в сердце, вызываемых нарушением доставки кислорода при спазмах коронарных сосудов.

Оксид азота нестабилен и его действие кратковременно — в течение нескольких секунд после формирования он подвергается окислению в нитриты или нитраты. Нитровазодилататоры вызывают длительное расслабление сердечной мышцы, потому что они разрушаются медленно, обеспечивая более продолжительное действие NO. С другой стороны, избыточное кратковременное образование NO может привести к развитию шока, а длительное его образование лежит в основе развития хронического воспаления.

Предполагается, что большинство эффектов цГМФ опосредуется цГМФ-зависимой серин/треониновой протеинкиназой — протеинкиназой G (ПкG). Каталитические и регулирующие домены этого фермента расположены на одном полипептиде. Связывание цГМФ с регуляторным доменом изменяет конформацию полипептидной цепи и активирует каталитический домен.

цГМФ участвует также в механизмах восприятия света. Он стимулирует открытие специфичных ионных каналов в палочках и колбочках сетчатки. Кроме того, цГМФ — активатор фосфодиэстераз (исключение ФДЭ-3, которая ингибируется цГМФ). Напомним, что фосфодиэстеразы катализируют гидролиз циклических мононуклеотидов и тем самым значительно снижают эффекты опосредованных ими путей передачи сигнала в клетки. Известно 12 семейств таких фосфодиэстераз. Они характеризуются уникальным тканевым распределением, специфичностью, особенностями структуры и функции.

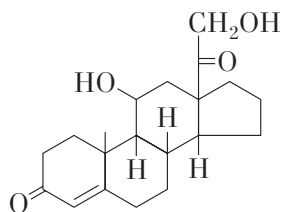
Ингибиторы ФДЭ нашли широкое применение в медицинской практике при лечении легочной гипертензии, сердечной патологии, деменции, депрессии, ХОБЛ. К примеру, лекарственный препарат Виагра ингибирует ФДЭ-5, которая используется для лечения нарушений эректильной функции у мужчин, а Ролипрам (ингибитор ФДЭ-4) применяется в качестве антидепрессанта.

13.12.7. Внутриклеточные рецепторы, расположенные в цитозоле

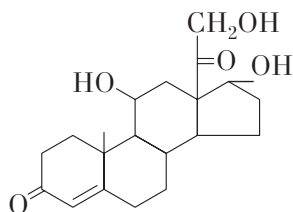
С рецепторами, расположенными в цитозоле, связываются глюкокортикоиды, минералокортикоиды, андрогены, эстрогены, прогестерон. Для них характерна способность образовывать гомодимеры и связываться с ДНК в месте локализации палиндромного респонсивного элемента ГТАЦА n nnТГТТЦТ. Только для рецепторов к эстрогенам на ДНК имеется другое место связывания — последовательность АГГТЦА n nnТГАЦЦТ.

Глюкокортикоиды. Глюкокортикоиды (кортикостерон, кортизол, кортизон) оказывают умеренный катаболический эффект. Они поддерживают длитель-

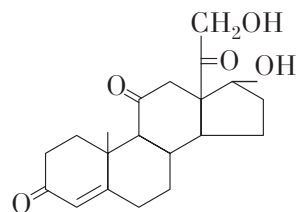
ный стресс, стимулируют распад белков в мышцах, повышают мобилизацию липидов жировой ткани, стимулируют глюконеогенез в печени. В результате увеличивается концентрация аминокислот, жирных кислот и глюкозы в крови.



кортикостерон



кортизол (гидрокортизон)



кортизон

Причиной изменения уровня глюкокортикоидов могут быть не только изменения характера их секреции надпочечниками. Секреция глюкокортикоидов регулируется системой гипоталамуса и гипофиза, взаимосвязанных между собой функционально по принципу обратной связи. Поэтому патология этих желез также может приводить к изменению уровня глюкокортикоидов и имитировать гипо- или гиперфункцию надпочечников. С другой стороны, применение препаратов глюкокортикоидов может тормозить секрецию нативных гормонов вплоть до полного выключения секреторной активности надпочечников.

Глюкокортикоиды находят широкое применение для лечения многих заболеваний, сопровождающихся воспалительными реакциями или нарушением иммунной защиты. Их противовоспалительные и иммуномодуляторные эффекты в значительной мере объясняются торможением активности ядерного фактора NF-κB (каппа-би), который регулирует экспрессию провоспалительных генов (цитокинов, рецепторов цитокинов, молекул адгезии, протеиназ и др.). В обычном состоянии NF-κB находится в цитозоле, состоит из двух субъединиц p50 и p65 и связан со своим ингибитором (IκB) (рис. 13.31).

Ингибитор фосфорилируется сериновой киназой ИКК (киназа IκB). Она представляет собой гетерогексамерный комплекс, состоящий из α-, β-, и γ-субъединиц. Фосфорилированный IκB связывается с убиквитином и разрушается в протеасоме, а свободный NF-κB перемещается в ядро, где взаимодействует с промоторами многих генов, участвующих в механизмах воспаления, и активирует их транскрипцию.

Многие гены в своих промоторах содержат респонсивные элементы глюкокортикоидов. Связывание активированного глюкокортикоидами рецептора с респонсивным элементом в области промотора приводит к активированию транскрипции генов, кодирующих противовоспалительные медиаторы, такие как аннексин-1 (липокортин-1), ингибитор секреторной лейкопротеазы, интерлейкин-10 (ИЛ-10) и ингибитор ядерного фактора κB. Кроме того, комплекс рецептор — кортикостероид взаимодействует с молекулами проактиватора ацетилтрансферазы гистонов (НАТ), активируемого ядерным фактором NF-κB, и тормозит его активность. Тем самым угнетается экспрессия генов провоспалительных цитокинов (рис. 13.32).

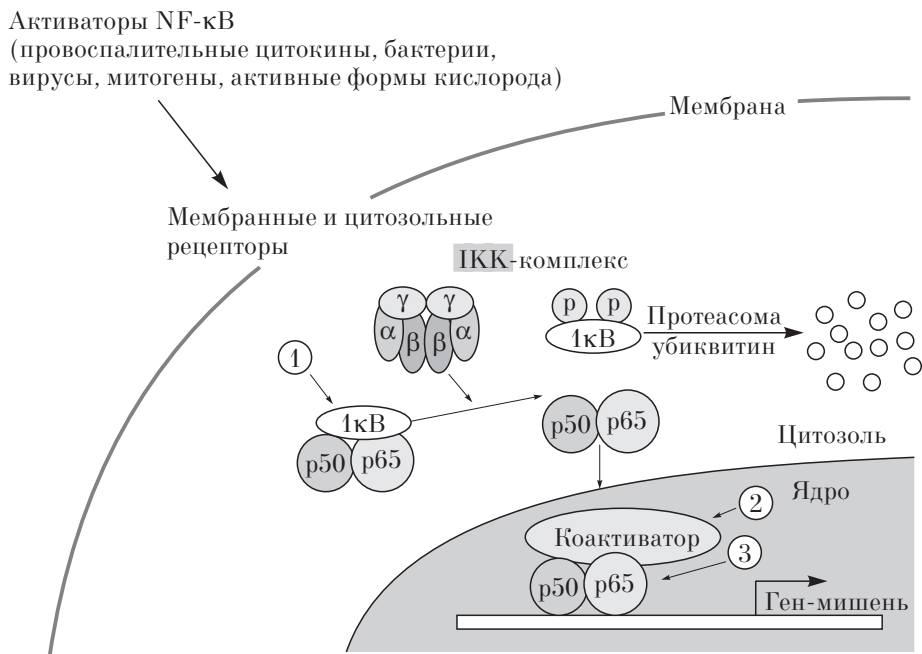


Рис. 13.31. Механизм действия NF-κB

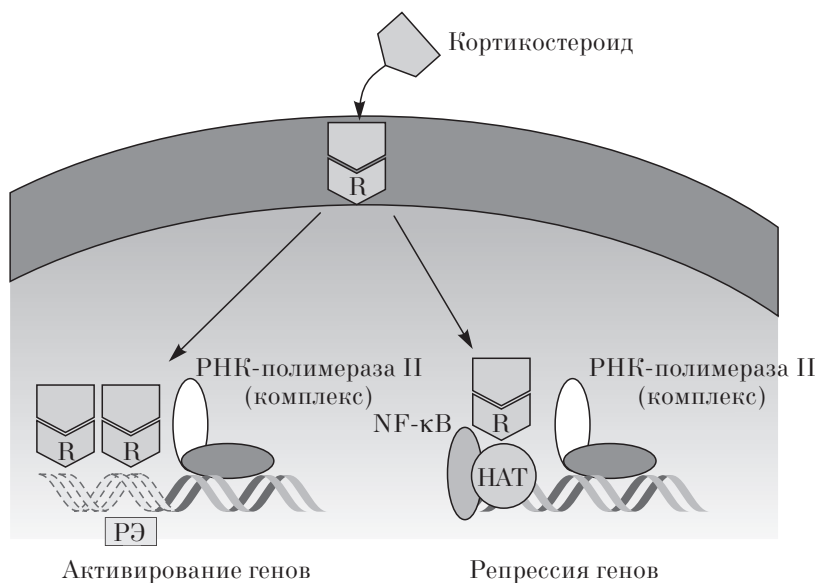


Рис 13.32. Механизмы противовоспалительного действия глюкокортикоидов:
R — рецептор; РЭ — респонсивный элемент; HAT — ацетилтрансфераза гистонов;
NF-κB — ядерный фактор

Одним из важнейших протеинов, синтез которых стимулируется глюкокортикоидами, является липокортин. Он ингибирует фермент фосфолипазу А₂ и тем самым подавляет синтез простагландинов и лейкотриенов — важных участников воспалительной реакции.

Альдостерон. Альдостерон синтезируется клетками клубочковой зоны коры надпочечников. Активаторами его синтеза и секреции являются стрессовые состояния, снижение уровня Na^+ в крови, повышение уровня K^+ в крови, снижение объема циркулирующей крови и (или) артериального давления.

Клетками-мишенями альдостерона являются эпителий корковой части собирательных трубочек почек, кишечника, потовых желез, нейроны ЦНС. Важное место в регуляции синтеза и секреции альдостерона занимает ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) (рис. 13.33).

Ангиотензиноген (М.М. 62–65 кДа) — один из белков в составе α -глобулиновой фракции плазмы крови, синтезируется в печени. Под действием ренина (протеаза, секретируемая почками) образуется декапептид, названный ангиотензин I. Он не обладает биологической активностью и превращается в дальнейшем в ангиотензин II. Это превращение происходит под действием ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), который отщепляет от С-конца молекулы ангиотензина I дипептид гис-лей. Дальнейшее расщепление ангиотензина II под действием ангиотензиназ приводит к образованию ангиотензина III и IV.

Рецептор альдостерона взаимодействует с респонсивными элементами генов, кодирующих белки системы поддержания водно-солевого баланса. Среди таких белков можно назвать киназу, регулируемую альдостероном. Она катализирует

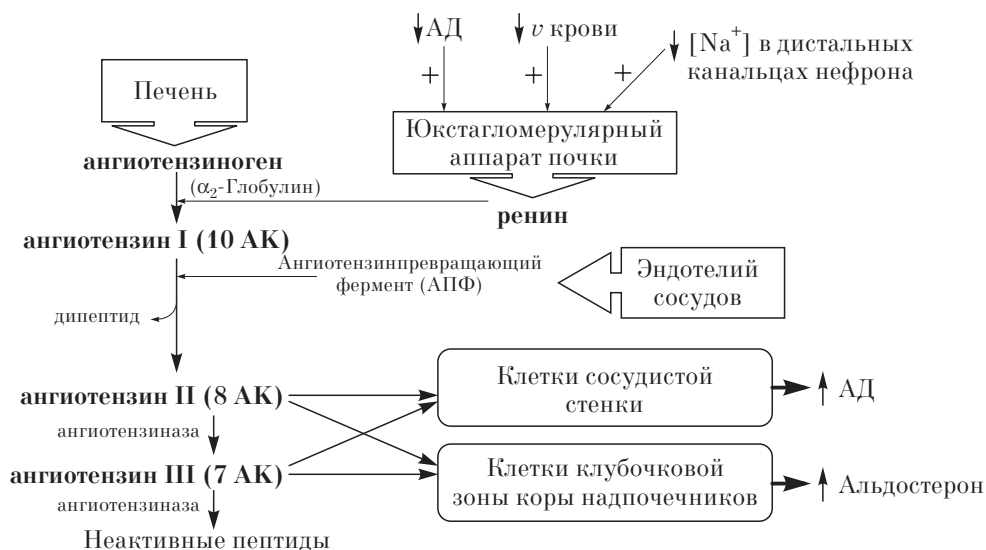


Рис. 13.33. Ренин-ангиотензин-альдостероновая система

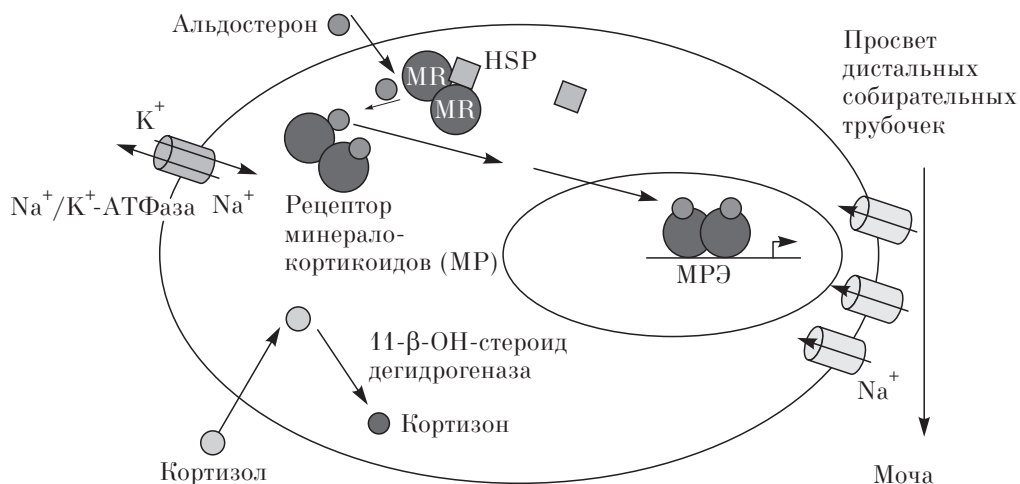


Рис. 13.34. Роль альдостерона в реабсорбции натрия (МРЭ — респонсивный элемент минералокортикоидов в ядре клетки)

фосфорилирование и тем самым способствует открытию натриевых каналов в собирательных трубочках и дистальных канальцах почек, повышая реабсорбцию ионов натрия (рис. 13.34).

В гладкомышечных клетках сосудов альдостерон оказывает негеномный эффект, активируя путь проведения сигнала через фосфолипазу С, что способствует повышению уровня ИФ₃ и ДАГ, а затем $[Ca^{2+}]$. Одновременно активируется и перемещается к мембранам ПкС, которая ингибирует Na^+/H^+ -антипорт.

Ингибиторы РААС. На данный момент широко используются лекарственные препараты, которые ингибируют РААС: ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (*каптоприл, хинаприл, эналаприл, рамиприл* и др.), блокаторы рецепторов ангиотензина II (*лозартан, эпросартан* и др.), а также β -блокаторы (*пропранолол, метопролол* и др.) и антагонисты рецепторов альдостерона (*спиронолактон*).

В современных стандартах лечения артериальной гипертензии и хронической сердечной недостаточности одно из ведущих мест занимают ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АПФ). В настоящее время имеется несколько десятков химических соединений, способных блокировать переход ангиотензина I в биологически активный ангиотензин II. Это способствует расширению сосудов и удалению избытка натрия из организма. Ингибиторы АПФ замедляют распад брадикинина, сильного вазодилататора, стимулирующего расширение кровеносных сосудов с помощью выброса оксида азота (NO) и простаглицлина (простагландина).

Антагонисты рецепторов ангиотензина II, или блокаторы AT_1 -рецепторов, — одна из новых групп антигипертензивных средств. Она объединяет лекарственные средства, модулирующие функционирование РААС посредством взаимодействия с ангиотензиновыми рецепторами.

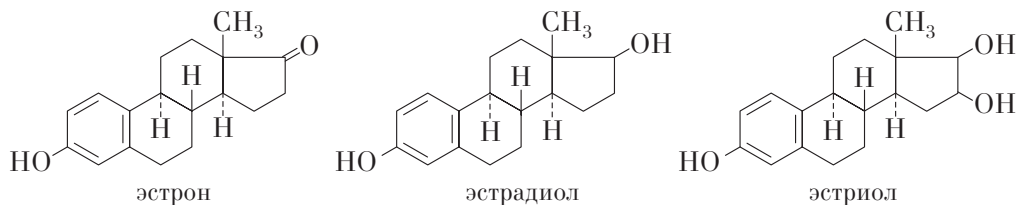
У человека идентифицированы и наиболее полно изучены два подтипа мембраносвязанных, сопряженных с G-белком рецепторов ангиотензина II — подтипы AT_1 и AT_2 . Через AT_1 -рецепторы происходит реализация таких эффектов ангиотензиногена II, как выработка альдостерона, сокращение сосудистой стенки, пролиферация гладкомышечных клеток сосудов, задержка жидкости, секреция вазопрессина и норадреналина. Таким образом, специфическая блокада AT_1 -рецепторов позволяет обеспечить выраженный антигипертензивный эффект в отношении клеток сосудов и сердца.

Кардиоваскулярные эффекты ангиотензина II, опосредованные AT_2 -рецепторами, противоположны эффектам, обусловленным возбуждением AT_1 -рецепторов, и являются относительно слабо выраженными.

Структурный аналог альдостерона *спиронолактон* (калийсберегающий диуретик) действует как антагонист альдостерона. По химической структуре он очень похож на альдостерон, а потому блокирует альдостероновые рецепторы в дистальных канальцах нефрона, что нарушает обратное поступление натрия в клетку почечного эпителия и увеличивает экскрецию натрия и воды с мочой. Препарат повышает кальцийурез, оказывает прямое положительное инотропное действие на сердечную мышцу (увеличивает силу сокращений).

Содержание кортизола в плазме крови в 1000 раз превышает уровень альдостерона, и в клетках-мишенях альдостерона для защиты от избытка кортизола используется 11β -гидроксистероиддегидрогеназа, которая катализирует превращение кортизола в малоактивный кортизон (см. рис. 13.33). Растение лакричник (солодка) содержит глициризин, который является ингибитором этого фермента. Прием лакричника оказывает эффект, подобный действию высокого уровня альдостерона (псевдогиперальдостеронизм). Поэтому лакричник противопоказан больным, принимающим гипотензивные средства — ингибиторы АПФ.

Эстрогены. К эстрогенам относятся эстрон, эстрадиол и эстриол. Эстрадиол синтезируется и секретируется яичниками. Из него образуется эстрон, а эстриол — продукт преобразования эстрона в печени. Основным гормоном является эстрадиол. Во время беременности желтое тело и плацента становятся источником прогестерона.



Известны два типа рецепторов эстрогенов — α и β . Они присутствуют практически во всех клетках. В зависимости от клеток после связывания с гормоном и удаления шаперонов могут формироваться гомо- и гетеродимеры.

Эстрогены обладают широким спектром действия, затрагивающим метаболические и морфологические изменения (рис. 13.35). Они определяют развитие

организма по женскому типу, регулируют циклические процессы, связанные с развитием яйцеклетки (менструальные циклы), и в случае ее оплодотворения, наряду с другими гормонами, контролируют протекание беременности, родов и последующее вскармливание.

Эффекты эстрогенов в разных клетках различны. Изменения метаболизма в клетках эпителия эндометрия, регулируемые эстрогенами, лежат в основе менструального цикла. Эстрогены способствуют синтезу ЛПВП в гепатоцитах и снижению образования ЛПНП в крови, что является одной из причин большей устойчивости женщин к атеросклерозу.

У женщин в возрасте старше 50 лет начинает нарушаться регулярность менструальных циклов, в яичниках исчезают фолликулы и прекращается их функция. Изменяется соотношение гормонов, снижается количество основного гормона эстрадиола и растет количество эстрона (продукт превращения эстрадиола и результат ароматизации андростендиона надпочечников). Все это может приводить к заболеваниям, среди которых следует назвать остеопороз и болезни сердечно-сосудистой системы.

В настоящее время ведется активный поиск селективных модуляторов рецепторов эстрогенов для предотвращения нарушений в постменопаузе. Селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов — это лекарственные средства, которые связываются с рецептором и оказывают специфический эффект на различные ткани, сходный с влиянием эстрогенов на кости и сердечно-сосудистую систему, но не на другие ткани (например, на молочную железу или матку). Идеальный модулятор должен уменьшать потерю костной ткани, не вызывать развития рака матки или грудной железы, оказывать благоприятный эффект на обмен липидов. Среди известных модуляторов можно назвать *тамоксифен*, *ралоксифен*, *ормелоксифен* и др.

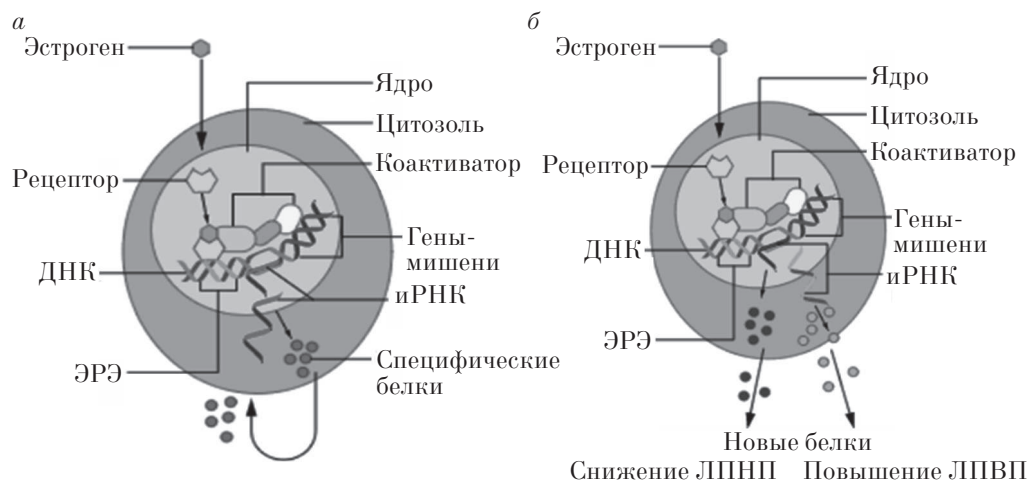


Рис. 13.35. Эффекты эстрогенов на процессы метаболизма:

а — изменение поведения клеток (например, пролиферация); б — изменение транспортных форм липидов в крови

Андрогены. Основной мужской половой гормон тестостерон во многих клетках-мишенях при участии НАДФН-зависимой 5 α -редуктазы превращается в более активную форму — дигидротестостерон (рис. 13.36).

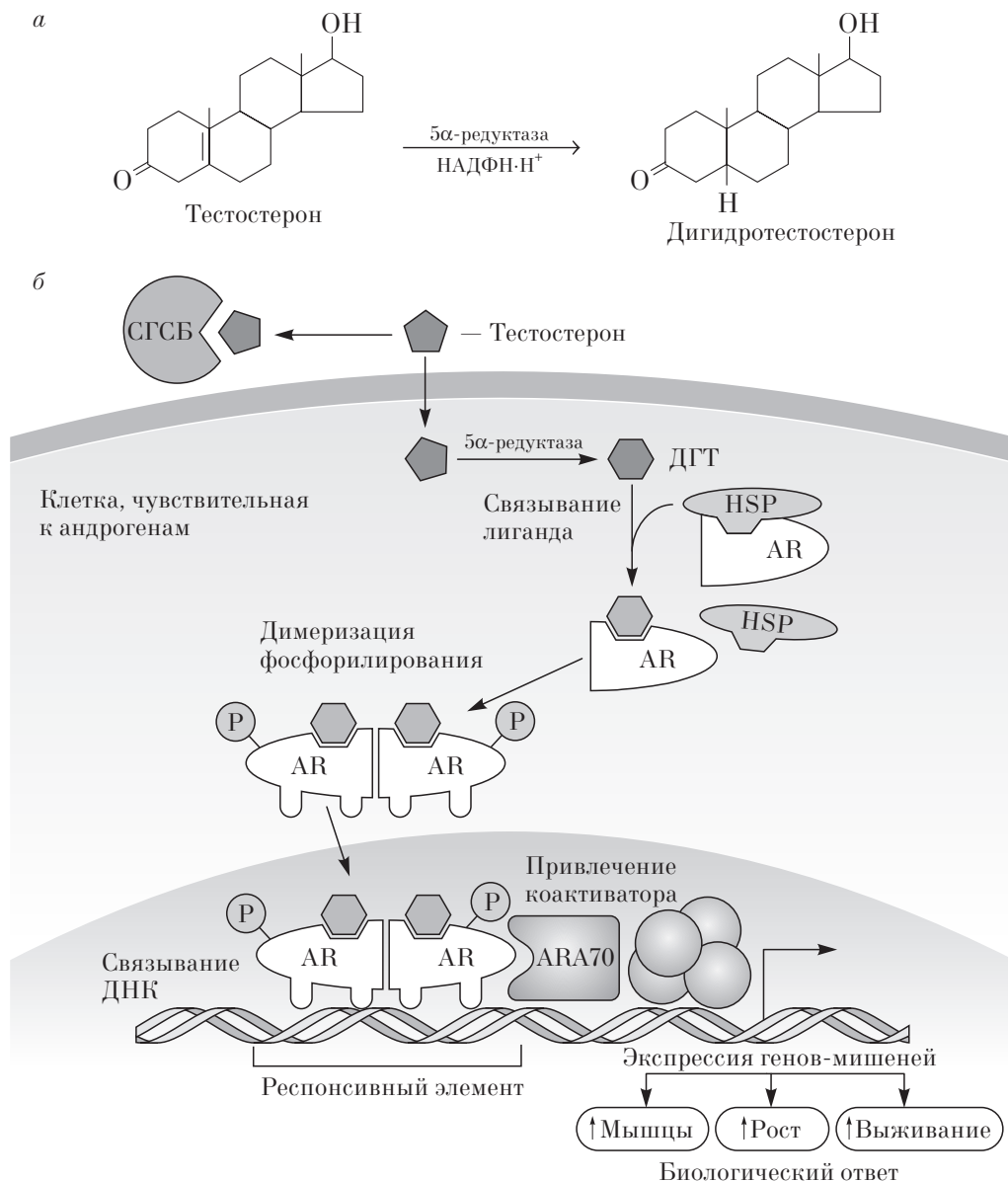


Рис. 13.36. Реакция синтеза дигидротестостерона (а) и система проведения сигнала в клетку с участием андрогенов (б):

AR — рецептор андрогенов; ДГТ — дигидротестостерон; HSP — белок теплового шока; СГСБ — белок, связывающий половые гормоны; ARA70 — коактиватор андрогенов

Тестостерон с помощью СГСБ (белок, связывающий половые гормоны) достигает клетки и, проникнув в нее через мембрану, превращается в дигидротестостерон (ДГТ). В цитозоле дигидротестостерон связывается со своим рецептором (AR). В результате от рецептора отщепляется белок теплового шока (HSP) и гормон-рецепторный комплекс димеризуется и фосфорилируется. Образовавшийся димер проникает в ядро клетки, где связывается с соответствующей «респонсивной» последовательностью нуклеотидов в ДНК. К месту связывания привлекаются коактиваторы (ARA70). Образовавшийся комплекс гормон – рецептор – ДНК инициирует транскрипцию участка ДНК, включающего определенные гены. Вслед за транскрипцией разворачивается трансляция, т.е. синтез белков, ответственных за реализацию последующего биологического эффекта.

Эффекты андрогенов многообразны. Они влияют на рост скелетных мышц, хрящей гортани, эпифизарных хрящей (резко усиливая механизмы синтеза белков), стимулируют эритропоэз, способствуют потреблению глюкозы клетками, регулируют сперматогенез, развитие первичных и вторичных половых признаков (тип оволосения, распределение подкожного жира по мужскому типу) и др. Производные тестостерона используются в качестве средств, активирующих анаболические процессы в организме.

13.12.8. Ядерные рецепторы

Ядерные рецепторы — группа внутриклеточных рецепторов с высоким сродством к гормонам, расположенная в ядре. Она включает рецепторы к ретиноевой кислоте, витамину D, гормонам щитовидной железы.

Т₃ и Т₄. Основной и наиболее активной формой гормонов щитовидной железы является Т₃. Он образуется локально в цитозоле клетки-мишени при участии дейодазы и быстро проникает в ядро, где связывается со своим рецептором. Рецептор Т₃ — классический ядерный рецептор, в свободном состоянии связан в форме димера со своим респонсивным элементом на молекуле ДНК и вместе с белком-корепрессором ингибирует транскрипцию генов (рис. 13.37).

Во время *неактивной фазы* свободный от трийодтиронина (Т₃) димер рецептора Т₃ связан с ДНК в областях респонсивных элементов гормона щитовидной железы (ТРЭ) и вместе с корепрессором действует как супрессор транскрипции генов. Во время *активной фазы* Т₄ поступает в цитозоль, где при участии дейодазы (5'DI) превращается в Т₃, который перемещается в ядро и присоединяется к лигандсвязывающему домену мономера рецептора (ТР-ЛСД). Это вызывает диссоциацию димера рецептора и удаление корепрессора. Связанный с Т₃ мономер рецептора образует гетеродимер с рецептором ретиноевой кислоты (РХР) и к образованному гетеродимеру присоединяется коактиватор. Это обеспечивает активирование транскрипции генов.

Присоединение гормона вызывает ряд последующих событий, ведущих к активированию транскрипции. Прежде всего происходит диссоциация ком-

плекса димер — рецептор — корепрессор. Рецептор T_3 связывается с рецептором ретиноевой кислоты, формируя гетеродимер, к которому присоединяется коактиватор, что переводит РНК-полимеразу в активное состояние и способствует транскрипции генов и синтезу белков. За счет этого механизма активируется, к примеру, образование синтазы жирных кислот, малик-фермента, фосфоенол-

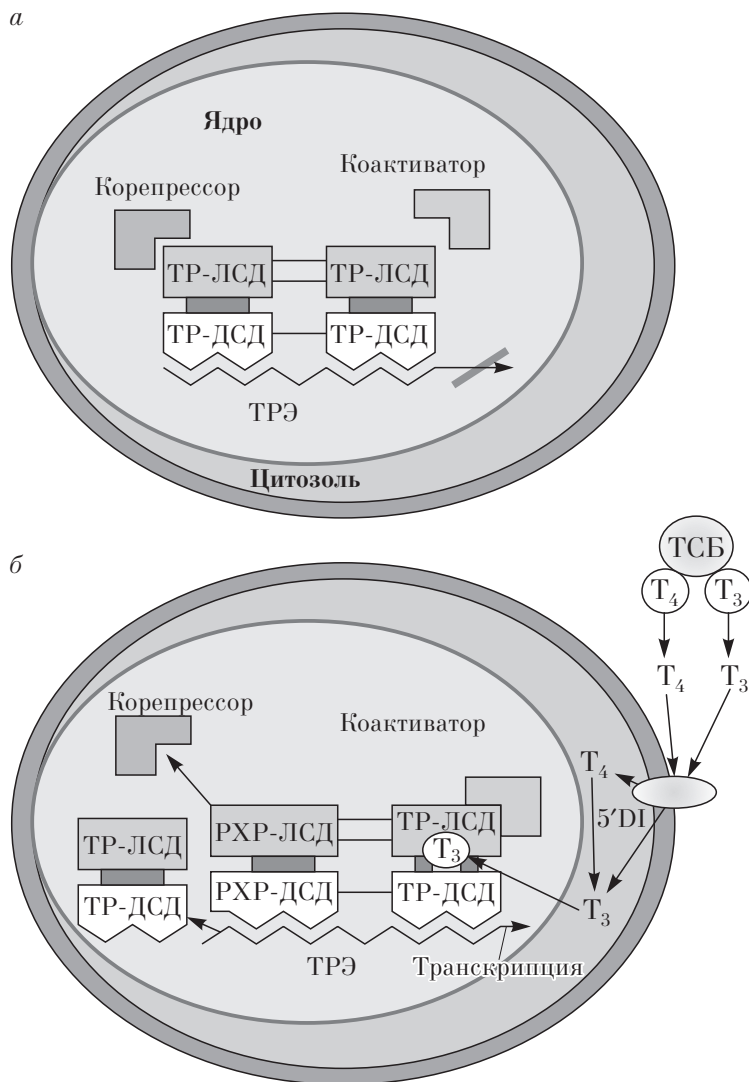


Рис. 13.37. Модель взаимодействия T_3 с рецептором:

а — неактивная фаза; б — активная фаза (5'DI — дейодаза); ТР-ЛСД — лигандсвязывающий домен рецептора T_3 ; ТР-ДСД — ДНК-связывающий домен рецептора T_3 , РХР-ЛСД — лигандсвязывающий домен рецептора ретиноевой кислоты; РХР-ДСД — ДНК-связывающий домен рецептора ретиноевой кислоты)

пируваткарбоксикиназы, белков, разобщающих окислительное фосфорилирование и тканевое дыхание, гормона роста, тяжелой цепи миозина, дейодазы.

Помимо ядерных рецепторов, предполагается действие гормонов щитовидной железы через мембранные, цитозольные и внутримитохондриальные рецепторы.

Йодсодержащие гормоны оказывают выраженное влияние на умственное и физическое развитие человека, регулируют метаболические процессы в нервной, сердечно-сосудистой, мышечной системах, влияют на иммунную систему, изменяют свойства мембран, интенсивность биоэнергетических реакций.

Наиболее частым проявлением нарушения функции щитовидной железы является зоб — любое увеличение размеров щитовидной железы. Простой зоб — проявление попытки организма компенсировать снижение образования тиреоидных гормонов. Причинами такого снижения служат дефекты отдельных стадий биосинтеза тиреоидных гормонов: недостаточное поступление йодидов, нарушение йодирования, недостаточность дейодаз. Продолжительное действие таких нарушений приводит к гипотиреозу. Ответом на снижение образования йодсодержащих гормонов является повышение уровня ТТГ, который способствует пролиферации клеток щитовидной железы.

Гипотиреоз у плодов или новорожденных приводит к кретинизму, который характеризуется множественными врожденными нарушениями и тяжелой необратимой задержкой умственного развития. У детей старшего возраста гипотиреоз сопровождается отставанием в росте без задержки умственного развития.

У взрослых развивается состояние, получившее название «микседема» (слизистый отек). Микседема характеризуется плохим аппетитом, запорами, ожирением, гиперхолестеролемией. Уменьшается продукция предсердного натрийуретического пептида, что приводит к задержке натрия и воды в организме. Замедляется распад гликозаминогликанов.

Для лечения используют экзогенные тиреоидные гормоны. При недостаточности йодидов в пищевом рационе рекомендуют увеличение потребления йода. В настоящее время разрабатываются биотехнологические подходы к созданию искусственной щитовидной железы, в основе которых лежит компьютерное моделирование геометрии стромально-сосудистого каркаса щитовидной железы с использованием гиалуроновой кислоты и молекул коллагена I типа, заселение такого каркаса тиреоцитами и эндотелиально-сосудистыми клетками-предшественниками (предварительно культивированными в присутствии определенных факторов роста).

Гипертиреоз (базедова болезнь, болезнь Грейвса, тиреотоксикоз) обусловлен избыточным образованием тиреоидных гормонов, ослаблением прочности связи тироксина с тироксинсвязывающим глобулином, снижением метаболизма гормонов щитовидной железы или повышением чувствительности тканей-мишеней к их действию. Оно может быть локальным или стимулироваться усилением образования ТТГ или тиреолиберина. Базедова болезнь проявляется рядом типичных признаков: увеличением щитовидной железы, пучеглазием, усилением теплопродукции, тахикардией, дрожанием пальцев рук, повышением психической возбудимости.

Существует множество форм этой патологии, но наиболее часто она является результатом образования тиреоид-стимулирующего иммуноглобулина (IgG). Это приводит к диффузному разрастанию щитовидной железы и избыточной неконтролируемой продукции T_3 и T_4 . Лечение гипертиреоза состоит в подавлении образования гормонов, что достигается применением антитиреоидных средств, блокированием функции железы радиоактивным изотопом йода или комбинацией этих двух приемов. Иногда производят хирургическое удаление железы.

Витамин D. Почти все эффекты витамина D опосредуются взаимодействием его активной формы (1,25-дигидроксихолекальциферола) с ядерным рецептором, который является фактором транскрипции. После попадания в ядро 1,25-(OH) $_2$ -холекальциферол взаимодействует с рецептором и ускоряет его связывание с рецептором ретиноевой кислоты (рис. 13.38). Образовавшийся гетеродимер связывается с респонсивным элементом на молекуле ДНК и инициирует каскад молекулярных взаимодействий, которые модулируют транскрипцию специфических генов. Известно свыше 50 генов, экспрессия которых регулируется 1,25-дигидроксихолекальциферолом.

Эффекты действия витамина D зависят от типа клеток. Например, витамин D $_3$ стимулирует синтез белков RANKL, остеопонтина и остеокальцина, регулирующих обмен кальция в костной ткани, а также белков, обеспечивающих всасывание кальция в кишечнике и белков, необходимых для реабсорбции ионов кальция и фосфора клетками почечных канальцев. Поэтому дефицит витамина D, который встречается довольно часто, может быть причиной многих заболеваний.

Пищевые источники витамина D $_3$, суточная потребность, признаки гиповитаминоза и гипервитаминоза D описаны в главе 14 (п. 14.6.4).

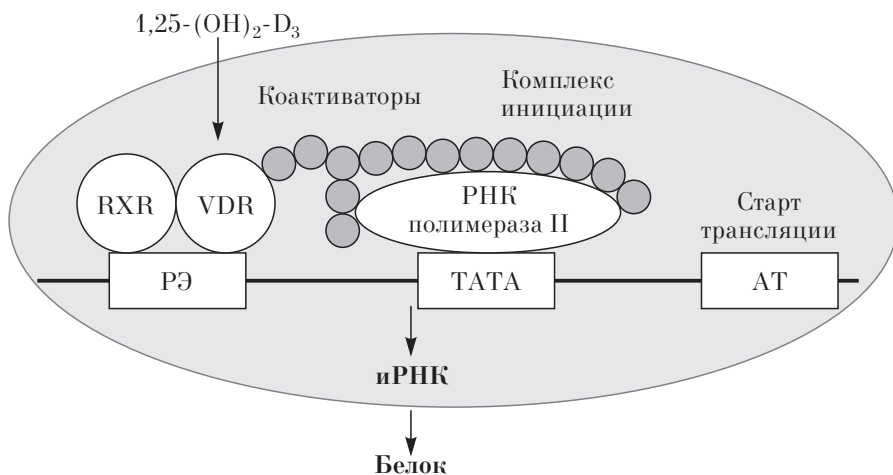


Рис. 13.38. Сигнальная система с участием витамина D:
РЭ — респонсивный элемент; VDR — рецептор витамина D;
RXR — рецептор ретиноевой кислоты

Биохимия питания. Витамины

«Наши пищевые вещества должны быть лечебным средством, а наши лечебные средства должны быть пищевыми веществами», — писал древнегреческий врач Гиппократ (около 460–377 гг. до н.э.).

Особенно актуальными вопросы питания стали сейчас, когда, с одной стороны, в мире больше миллиарда людей страдают от ожирения, а с другой — в противовес ожирению распространяется *анорексия* — болезненное голодание. Ясно, что современная жизнь предлагают человеку такие условия, к которым его организм не успел и не мог успеть приспособиться. В отличие от далеких предков, у современного человека энергозатраты резко снижены. Это, в свою очередь, ведет к необходимости уменьшения объема потребляемой пищи.

14.1. Незаменимые факторы питания

Питание поставляет живому организму необходимую ему энергию и вещества, обеспечивая его рост, развитие и нормальную жизнедеятельность.

Условно различают три важнейшие категории питательных веществ:

- энергодающие — белки, углеводы и липиды. Это макрокомпоненты пищи;
- витамины и витаминоподобные вещества, необходимые для биохимических процессов в качестве коферментов;
- вода и минеральные вещества.

Кроме питательных веществ, в пище должны содержаться волокнистые соединения (неперевариваемые полисахариды), которые не имеют ни энергетического, ни пластического значения, однако стимулируют работу ЖКТ, выполняют роль энтеросорбентов и ряд других функций (см. главу 6).

Для того чтобы обеспечить нормальную жизнедеятельность организма, пищевой рацион человека должен содержать незаменимые факторы питания и необходимый запас энергии.

При расчете энергетических потребностей организма исходят из того, что организм взрослого человека массой 70 кг расходует на основной обмен (в состоянии полного покоя) около 1300 ккал/сут — женщины и около 1800 ккал/сут — мужчины. Остальные дополнительные энергетические затраты определяются физиологическим состоянием (возраст, пол, беременность), физической актив-

ностью и родом профессиональной деятельности человека. В среднем энергетические потребности для здоровых мужчин составляют около 2800–3200 ккал/сут, для женщин — около 2100–2800 ккал/сут. При физических нагрузках, травмах, ожогах, в период восстановления после болезни требуется большее количество энергии.

Поскольку энергетическую ценность имеют только белки, жиры и углеводы, то при расчетах учитывается содержание именно этих компонентов питания. Соответственно рекомендациям ВОЗ желательно, чтобы 55 % энергии высвобождалось в результате окисления углеводов, 30 % — липидов и 15 % — белков.

Для некоторых людей реальные показатели вклада пищевых веществ в энергопродукцию отличаются от показателей, рекомендуемых ВОЗ. Так, для большинства населения основными источниками энергии являются углеводы (42 %) и жиры (40 %). Этанол тоже может служить источником энергии у людей, употребляющих спиртные напитки. При этом вклад этанола в общую калорийность пищи у них может составлять от 1 до 10 % (при окислении 1 г этанола выделяется около 7 ккал). Наряду с неблагоприятными социальными и экономическими последствиями, употребление этанола в качестве источника энергии имеет ряд негативных биохимических последствий, связанных с метаболизмом этанола в организме (см. главу 18).

Как упоминалось ранее, общая суточная потребность взрослого человека в *белках* составляет 0,8–1,0 г/кг в сутки, из них половина должна быть животного происхождения. Биологическая ценность белков, особенно незаменимых, определяется их аминокислотным составом. Белки, содержащие все незаменимые аминокислоты, относятся к полноценным. Растительные белки в отличие от животных, как правило, менее полноценны (см. главу 9).

Суточная потребность взрослого человека в *углеводах* составляет 450–500 г. Из них 60–80 % приходится на полисахариды (крахмал), остальная часть — на дисахариды (сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу) и только небольшая доля — на моносахариды (глюкозу, фруктозу). Основная функция углеводов — энергетическая, но они выполняют и другие функции (см. п. 6.3).

Суточная потребность в пищевых *липидах* составляет 1 г на 1 кг массы тела, из них не менее 25 г растительных липидов, содержащих ненасыщенные жирные кислоты. Триацилглицеролы составляют главную (по массе) часть липидов пищи. Они определяют энергетическое значение пищевых липидов.

С липидами пищи в организм поступают жирорастворимые витамины.

Незаменимые факторы питания — питательные вещества, которые не синтезируются в организме или синтезируются в недостаточном количестве и должны поступать в организм с пищей. Для человека к ним относятся полиненасыщенные жирные кислоты (линолевая, линоленовая), незаменимые аминокислоты (8–10), витамины, вода, макро- и микроэлементы.

Выделяют два класса эссенциальных (незаменимых) *полиненасыщенных жирных кислот* (ПНЖК): $\omega 3$ и $\omega 6$ (классификацию и функции жирных кислот

см. в главе 7). В пищевом рационе на долю незаменимых жирных кислот должно приходиться (по калорийности) не менее 2 % от общей потребности организма в калориях.

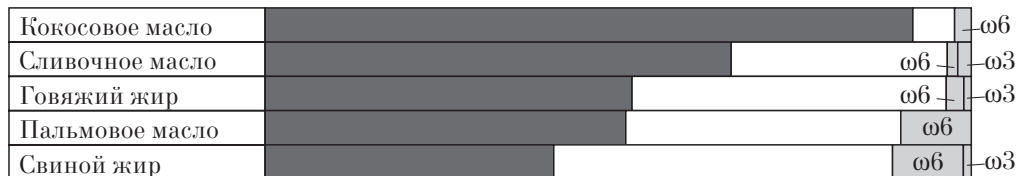
В организме человека они не могут синтезироваться в связи с отсутствием ферментов — десатураз, которые могли бы катализировать реакции образования двойных связей далее C_9 . Так как $\omega 6$ жирные кислоты синтезируются большинством растений, то основным пищевым источником $\omega 6$ полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) являются растительные масла. Главный пищевой источник $\omega 3$ ПНЖК — палтус, скумбрия, лосось, тунец, а также льняное, рапсовое, соевое и другие растительные масла (рис. 14.1). Оптимальное соотношение $\omega 3$ и $\omega 6$ жирных кислот в пище 1:4.

Линолевая кислота ($C_{18:2}$, $\omega 6$) в организме может превращаться в арахидоновую кислоту ($C_{20:4}$, $\omega 6$). Арахидоновая кислота является незаменимой в организме только при недостатке линолевой кислоты (см. главу 7).

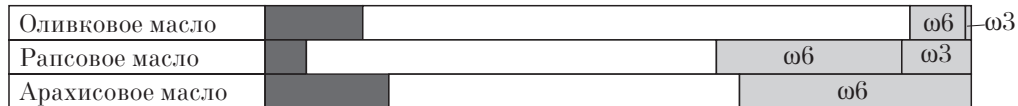
Из α -линоленовой кислоты ($C_{18:2}$, $\omega 3$) в клетках могут синтезироваться длинноцепочечные ПНЖК $\omega 3$: эйкозапентаеновая кислота ($C_{20:5}$, $\omega 3$) и докозагексаеновая кислота ($C_{22:6}$, $\omega 3$).

Список *незаменимых аминокислот* и продуктов, в которых они содержатся, приведен в табл. 14.1.

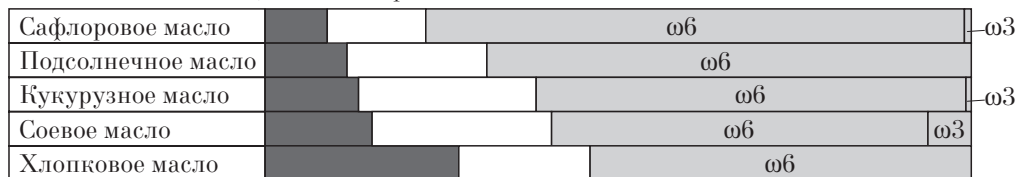
Богаты насыщенными жирными кислотами



Богаты мононенасыщенными жирными кислотами



Богаты полиненасыщенными жирными кислотами



■ Насыщенные
жирные кислоты

□ Мононенасыщенные
жирные кислоты

▒ Полиненасыщенные
жирные кислоты

Рис. 14.1. Сравнительный состав пищевых жиров

Таблица 14.1

Незаменимые аминокислоты

Название аминокислоты	Продукты
<i>Валин</i>	Зерновые, бобовые, арахис, грибы, молочные продукты, мясо
<i>Изолейцин</i>	Миндаль, кешью, чечевица, рожь, соя, яйца, мясо, рыба, печень
<i>Лейцин</i>	Чечевица, орехи, овес, неочищенный рис, рыба, яйца, мясо
<i>Лизин</i>	Пшеница, орехи, молочные продукты, рыба, мясо
<i>Метионин</i>	Бобы, фасоль, чечевица, соя, молоко, яйца, рыба, мясо
<i>Треонин</i>	Орехи, бобы, молочные продукты, яйца, мясо
<i>Триптофан</i>	Бобовые, овес, финики, арахис, кунжут, кедровые орехи, молоко, творог, рыба, курица, индейка, говядина
<i>Фенилаланин</i>	Бобовые, орехи, говядина, куриное мясо, рыба, яйца, творог, молоко. Фенилаланин также образуется в организме при распаде синтетического сахарозаменителя — аспартама, который активно используется в пищевой промышленности
<i>Аргинин</i>	Семена тыквы, арахис, кунжут, йогурт, сыр, свинина, говядина
<i>Гистидин</i>	Соевые бобы, арахис, чечевица, тунец, лосось, куриное мясо, говядина

Аргинин и гистидин относятся к *частично-заменимым аминокислотам*, поскольку не синтезируются в достаточном количестве в клетках детского организма и образуются из аминокислот, поступающих с пищей. К *условно-заменимым аминокислотам* (образуются из незаменимых аминокислот) относятся тирозин и цистеин. Синтез тирозина происходит только при условии достаточного поступления с пищей фенилаланина, а цистеина — при поступлении метионина.

Минеральные вещества поступают в организм в растворенном состоянии с питьевой водой, частично с продуктами животного и растительного происхождения.

Суточная потребность в минеральных веществах сильно колеблется: от нескольких миллиграммов и микрограммов (микроэлементы) до нескольких граммов (макроэлементы).

Важность получения минеральных веществ с пищей вызвана тем, что они входят в состав ферментов и других необходимых организму веществ — участников биохимических реакций.

Витамины и витаминоподобные соединения являются незаменимыми компонентами пищи. Они поступают в организм с растительными и животными продуктами. Кроме того, некоторые витамины в небольших количествах синтезируются микрофлорой кишечника человека.

Биологическая роль воды, минеральных веществ, витаминов и витаминоподобных соединений будет рассмотрена ниже.

14.2. Гормоны, контролирующие пищевое поведение

Количество потребляемой пищи определяется многими факторами, в том числе регуляторами чувства голода и насыщения.

Существует две основные группы гормонов, регулирующих пищевое поведение:

1) гормоны, оказывающие орексигенный эффект, т.е. увеличивающие потребление пищи, — нейропептид Y, агутиподобный пептид, грелин, β -эндорфин, соматостатин, норадреналин (α_2 -рецепторы), анаболические стероиды, глюкокортикостероиды;

2) гормоны, обладающие анорексигенным действием, т.е. уменьшающие потребление пищи, — инсулин, лептин, серотонин, холецистокинин, кортиколиберин, α -меланокортин, панкреатический полипептид (PYY_{3-36}), энтеростатин, глюкагон.

Гормоны, регулирующие потребление пищи и аппетит, образуются в желудке, кишечнике, поджелудочной железе, жировой ткани и центральной нервной системе. Мишенью для них являются нейроны мозга, локализованные в зоне аркадного ядра гипоталамуса. Клетки этой зоны участвуют в регуляции не только пищевого поведения и массы тела, но и температуры, кровяного давления и других жизненно важных функций (памяти, эмоций, полового поведения, размножения, заботы о потомстве, сна и бодрствования).

Нейропептид Y (NPY) является одним из наиболее распространенных нейропептидов. Он состоит из 36 аминокислот. Высокие концентрации этого пептида обнаруживают в мозге (гипоталамической и кортикальной областях) и периферической нервной системе. Действуя на центр голода, нейропептид Y вызывает чувство голода, стимулирует пищевое поведение (поиск и потребление пищи).

Агутиподобный пептид (AgRP) — один из ключевых нейрохимических регуляторов аппетита: если его уровень повышается, то есть хочется больше, и наоборот, его уменьшение ведет к потере аппетита.

Когда поглощенная пища достигает дистальных отделов тонкого кишечника, сосредоточенные там эндокринные клетки начинают синтезировать *пептидные гормоны* (PYY_{3-36}). Главными стимуляторами секреции пептида YY являются жиры, углеводы и желчные кислоты хилиуса. Молекула пептида YY является линейной, имеет в своем составе 36 аминокислотных остатков и по структуре гомологична нейропептиду Y. Пептид YY при попадании по кровотоку в гипоталамус стимулирует нейроны, от которых зависит чувство насыщения, и ингибирует нейроны, стимулирующие возникновение аппетита.

Грелин — гормон голода; является пептидом, состоящим из 28 аминокислотных остатков. Грелин существует в гормонально неактивной (чистый пептид) и активной (октаноил-грелин) формах. Последняя образуется после прикреплении октановой кислоты.

Клетки, продуцирующие этот гормон, находятся в фундальном отделе желудка и тонком кишечнике. У человека уровень грелина повышается непосредственно перед приемом пищи и быстро снижается после еды.

Грелин активизирует клетки в дугообразном ядре, которые возбуждают аппетит, секретирова нейропептид Y. Грелин является участником сложного процесса регуляции энергетического гомеостаза (синтез АТФ, накопление жира, накопление гликогена, теплообмен).

Холецистокинин — нейропептидный гормон, который продуцируется в двенадцатиперстной и тощей кишке. С его образованием связано возникновение чувства насыщения.

Холецистокинин существует в нескольких молекулярных формах (холецистокинин-8, холецистокинин-12, холецистокинин-33 и др.). В крови преобладает холецистокинин-8. Стимуляторами секреции холецистокининов являются поступающие в тонкую кишку из желудка в составе химуса: жирные кислоты, аминокислоты, пептиды и компоненты лекарственных растений (алкалоиды, протопин, сангвинарин, эфирные масла и др.).

На уровне пищеварения холецистокинины блокируют секрецию соляной кислоты париетальными клетками желудка, стимулируют ток печеночной желчи, повышают панкреатическую секрецию, вызывают сокращение привратника желудка, что тормозит перемещение переваренной пищи в двенадцатиперстную кишку. Ингибитором холецистокинина является соматостатин.

Грелин и холецистокинины составляют систему, которая регулирует начало и конец потребления пищи. Мишенью для них являются два вида нейронов: нейроны, которые секретируют нейропептид Y, и меланокортин-продуцирующие нейроны.

Если действие нейропептида Y направлено на нейроны, стимулирующие потребление пищи, то продукты метаболизма из меланокортинпродуцирующих нейронов ингибируют нейроны, инициирующие потребление пищи. Как было указано выше (см. главу 13) в результате процессинга проопиомеланокортина образуется и секретируется анорексический пептид — *α-меланоцит-стимулирующий гормон (α-меланокортин)*. Существуют, по меньшей мере, пять подтипов меланокортиновых рецепторов (МКР). Особенно важны в регуляции пищевого поведения и энергетического баланса МКР-3 и МКР-4. Активация этих рецепторов после связывания α-меланокортина снижает потребление пищи и увеличивает расход энергии. Напротив, препятствование связыванию этих рецепторов со своим лигандом заметно увеличивает потребление пищи и снижает расход энергии.

Инсулин и лептин — регуляторы пищевого поведения, снижающие потребление пищи.

Ранее уже упоминалось, что инсулин секретируется из β-клеток поджелудочной железы, когда в крови увеличивается концентрация глюкозы. Такая повышенная секреция стимулирует адипоциты к образованию лептина.

Лептин (греч. *leptos* — худой, тонкий) синтезируется в адипоцитах и является белковым гормоном, состоящим из 167 аминокислот. Причем чем больше в этих клетках накапливается триацилглицеролов, тем больше там образуется лептина.

Лептин служит связующим звеном между уровнем триацилглицеролов в адипоцитах и центральной нервной системой. Он действует на гипоталамус, блокируя синтез и высвобождение нейропептида Y, вызывающего чувство голода. Когда уровень лептина низок (голод), аппетит усиливается, а когда он высок (переедание), аппетит угнетается, поэтому лептин часто называют *гормоном насыщения*.

Действие лептина на депонирование триацилглицеролов в жировой ткани опосредовано его влиянием на гипоталамические центры, контролирующие поведение и чувство голода, температуру тела и энергозатраты. Кроме того, действие лептина стимулирует симпатическую нервную систему (рис. 14.2). В результате повышается высвобождение норадреналина, который, взаимодействуя в жировой ткани с β_3 -адренергическими рецепторами, вызывает увеличение экспрессии гена, ответственного за синтез разобщающего белка митохондрий термогенина. Это ведет к разобщению процессов окисления (клеточного дыхания) и фосфорилирования (синтез АТФ) в митохондриях жировой ткани. Поэтому энергия, высвобождающаяся при окислении органических субстратов, не используется на образование АТФ, а рассеивается в виде тепла.

Действие лептина опосредовано взаимодействием со специфическими рецепторами. Рецепторы обнаружены в мозге (гипоталамус), Т-лимфоцитах, эндотелиальных клетках сосудистой стенки, легких и почках.

Концентрация лептина в крови у людей с ожирением обычно повышена, что связывают с потерей чувствительности к лептину, но не с дефицитом этого



Рис. 14.2. Схематическое изображение механизма действия лептина

белка. Поэтому в кровотоке отмечается высокое содержание лептина, а центр голода в гипоталамусе продолжает синтезировать и секретировать мощнейший стимулятор аппетита — нейропептид Y.

Снижение концентрации лептина ведет к развитию ожирения и рассматривается в качестве одного из факторов патогенеза сахарного диабета 2-го типа.

14.3. Лекарственные препараты, влияющие на пищевое поведение

Существует большое количество препаратов, способных уменьшать массу тела, однако лишь некоторые из них официально рекомендованы для лечения ожирения.

Сибутрамин (Меридиа) относится к препаратам центрального действия. Он подавляет аппетит за счет усиления действия нейромедиаторов (норадреналина, дофамина и серотонина) на центры насыщения в вентромедиальной области гипоталамуса. Этот препарат также повышает основной обмен в среднем на 100 ккал/сут и стимулирует термогенез.

Существуют снижающие вес препараты, которые относятся к группе сильнотензивных: например, *фентермин* (производное амфетамина), а также антидепрессанты *бупропион* (Веллбутрин), *флуоксетин* (Прозак, Профлузак). Существенным моментом, ограничивающим практическое использование, является их способность вызывать к ним зависимость.

Изучается воздействие препаратов, блокирующих эндоканнабиноидные рецепторы. Эти рецепторы расположены в гипоталамических центрах голода и на поверхности адипоцитов. Они активируются под влиянием арахидоноил-глицерола, что сопровождается повышением аппетита, усилением синтеза триацилглицеролов и снижением синтеза адипонектина в адипоцитах. При блокировании этих рецепторов аппетит подавляется.

14.4. Витамины — незаменимые факторы питания

История открытия витаминов связана с изучением роли различных пищевых веществ в жизнедеятельности организма. Российский ученый Н.И. Лунин впервые (1880) обратил внимание на то, что, помимо белков, жиров, углеводов, минеральных солей и воды, животным необходимы «некие особые факторы питания, без которых они заболевают и гибнут».

Витамины (от лат. *vita* — жизнь) — органические вещества, которые необходимы в малом количестве для нормального функционирования организма в поддержании его метаболической интеграции, не синтезируются в организме и должны поступать с пищей. Дефицит того или иного витамина

в организме приводит к появлению специфических признаков и симптомов, которые исчезают при устранении дефицита.

В отличие от других незаменимых пищевых веществ, витамины не являются пластическим материалом или источником энергии, а используются в обмене веществ в основном как участники биокатализа. Почти все водорастворимые витамины, а также жирорастворимый витамин К являются кофакторами биохимических реакций. Витамины А, D, Е способны регулировать работу генетического аппарата клетки. Всё это делает витамины незаменимыми в жизнедеятельности клетки.

Недостаток поступления витаминов с пищей, нарушение всасывания или их использования организмом приводит к развитию патологического состояния — *гиповитаминоза*. Гиповитаминоз проявляется характерной клинической картиной (цинга, рахит, бери-бери, пеллагра, анемия и др.). Наиболее частыми неспецифическими проявлениями гиповитаминоза являются потеря аппетита, усталость, раздражительность, кровоточивость десен, гнойничковые заболевания кожи и др. В этих случаях биохимические тесты (например, определение концентрации витамина и активности витаминзависимых ферментов в доступных анализу тканях и жидкостях организма) выявляют недостаток того или иного витамина.

Термин «авитаминоз», т.е. отсутствие витамина в организме, вряд ли актуален, так как при полном отсутствии витамина в клетках прекращаются зависимые от него биохимические реакции, что приводит к их гибели и смерти организма.

Гиповитаминозное состояние характерно для большого числа практически здоровых людей. Оно существенно усугубляется при любых заболеваниях, особенно при болезнях пищеварительной системы, когда нарушается всасывание витаминов в кишечнике и их использование в организме. Свой «вклад» в развитие гиповитаминоза вносит и лекарственная терапия, поскольку некоторые лекарства являются антагонистами витаминов. Многие антибиотики подавляют рост и размножение не только патогенных микроорганизмов, но и симбионтов, играющих важную роль в обеспечении организма биотином, пантотеновой кислотой, витамином К. К недостаточной обеспеченности витаминами приводит увеличение доли рафинированных и консервированных продуктов питания.

Раскрытие причин гиповитаминозов и участие витаминов в процессах метаболизма дало основание использовать витамины как лекарственные средства. Чрезмерное употребление витаминных форм и (или) несбалансированное питание может вызвать *гипервитаминозное состояние*, которое также является патологическим. Особенно токсична передозировка витаминами А и D. Абсолютно безопасные уровни потребления витаминов А и D превышают среднюю суточную потребность в 10 раз, витаминов В₆, Е, В₁, В₂ и фолиевой кислоты — в 100 раз.

Соединения, которые не являются витаминами, но могут служить предшественниками их образования в организме, называются *провитаминами*. К ним относятся, например, каротины, из которых образуется витамин А.

Эргостерол или 7-дегидрохолестерол под действием УФ-лучей превращаются соответственно в эргокальциферол (D_2) и холекальциферол (витамин D_3).

Однако есть вещества, обладающие антивитаминными свойствами, — **анти-витамины**. Их можно разделить на две основные группы:

1) химические вещества, которые инактивируют витамин путем его расщепления, разрушения или связывания его молекул в неактивные формы;

2) химические вещества, структурно-подобные или структурно-родственные витаминам. Они вытесняют витамины из биологически активных соединений и таким образом делают их неактивными.

В результате действия антивитаминов обеих групп нарушается нормальное течение процесса обмена веществ в организме.

Некоторые антивитамины используются в медицинской практике как лекарственные средства. Так, антивитамины К (варфарин, дикумарол) являются антикоагулянтами, сульфаниламидные лекарственные препараты проявляют антифолатное действие, а противотуберкулезное средство изониазид — анти-витамин РР. При приеме таких лекарственных препаратов необходимо помнить о возможном возникновении гиповитаминоза.

Открытие антивитаминов способствовало более полному и углубленному изучению физиологического действия самих витаминов, так как применение в эксперименте антивитамина приводит к выключению действия витамина и соответствующим изменениям в организме. Это в известной степени расширяет наши познания о функциях, которые тот или другой витамин выполняет.

14.5. Классификация и номенклатура витаминов

По физико-химическим свойствам витамины делятся на две группы:

- *водорастворимые* (витамины группы В, витамины С, Н, Р);
- *жирорастворимые* (витамины А, Е, D, К).

Для обозначения каждого из них существует буквенный символ, химическое название и название с учетом излечиваемого этим витамином заболевания с приставкой «анти». Например, витамин B_1 , тиамин, антиневритный.

Рекомендуется также использовать рациональные названия витаминов, отражающие их химическую природу, например: пиридоксин, пиридоксаль (спиртовая и альдегидная форма витамина B_6), ретиналь (альдегидная форма витамина А), эргокальциферол (витамин D_2) и холекальциферол (витамин D_3).

14.6. Жирорастворимые витамины

Жирорастворимые витамины объединяет ряд общих особенностей (табл. 14.2).

Так, в каждой группе имеется несколько аналогов близкой химической структуры, обладающих одинаковыми свойствами и действием.

Таблица 14.2

Жирорастворимые витамины

Буквенное обозначение	Химическое название	Формы, производные	Основное действие
А	Ретинол	Ретинол, ретиналь, ретиновая кислота	Антиксерофтальмический
Д	Кальциферолы	D ₂ (эргокальциферол), D ₃ (холекальциферол), 1,25-дигидроксихолекальциферол	Антирахитический
Е	Токоферолы	α -, β -, γ - и δ -токоферолы и токо-триенолы, их эфиры	Антистерильный
К	Нафтохиноны	K ₁ (филохинон), K ₂ (менахинон), K ₃ (менадион) и др.	Антигеморрагический

Жирорастворимые витамины всасываются в желудочно-кишечном тракте только в присутствии липидов и желчных кислот.

Жирорастворимые витамины накапливаются в организме, что может привести к развитию гипервитаминозов (местом их накопления являются жировая ткань и печень).

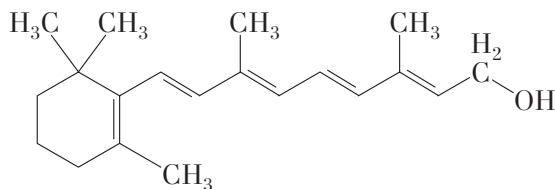
Наконец, в отличие от водорастворимых витаминов, механизм их действия выяснен не до конца, но хорошо известны процессы, на которые они оказывают влияние. Установлено, что, наряду со стероидными гормонами, они выполняют функцию индукторов синтеза белка. Особенно высокой гормональной активностью обладают активная форма витамина D₃ и ретиновая кислота (витамин А).

14.6.1. Витамин А (ретинол)

Витамин А включает ряд близких по структуре соединений: ретинол, дегидроретинол, ретиналь, ретиновую кислоту и эфиры этих соединений.

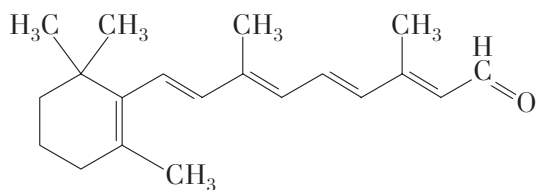
Витамин А был открыт в 1940 г. и назван *фактором роста*.

Ретинол представляет собой циклический непредельный одноатомный спирт, состоящий из β -ионового кольца и боковой цепи из двух остатков изопрена и первичной спиртовой группы.

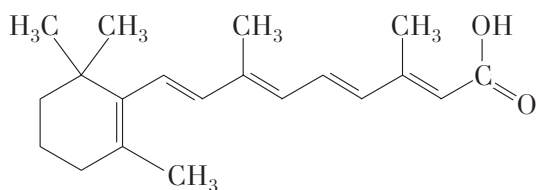


ретинол

В организме ретинол окисляется до *ретинала* (альдегид витамина А) и *ретиновой кислоты* (вместо спиртовой группы образуется карбоксильная).



ретиналь



ретиновая кислота

Пищевые источники. Витамин А в виде эфира с пальмитиновой кислотой содержится в животных продуктах — рыбьем жире (трески, палтуса, морского окуня), сливочном масле, печени, молоке и молочных продуктах.

Витамин А может образовываться в слизистой кишечника и печени из *провитамин*ов — α -, β - и γ -каротинов — под воздействием каротиноксигеназы. Наибольшей активностью обладает β -каротин. Ферментативное расщепление (гидролиз) одной молекулы β -каротина приводит к образованию двух молекул витамина А (рис. 14.3). Наибольшее количество β -каротинов содержится в моркови (от 8 до 25 мг на 100 г сырого веса). Источником каротинов являются также красный перец, салат, тыква и томаты.

Однако следует заметить, что β -каротины не могут полностью заменить витамин А, так как лишь ограниченное их количество способно превратиться в ретинол.

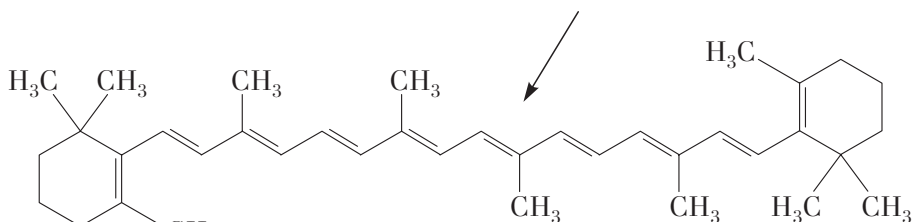
 β -каротин

Рис. 14.3. Структурная формула β -каротина (стрелкой обозначено место разрыва связи)

Суточная потребность в витамине А составляет 1,5–2,0 мг.

Метаболизм. Всасывание витамина и его провитаминов происходит в составе мицелл, затем в энтероцитах они включаются в состав хиломикронов. В крови витамин А может связываться с ретинолсвязывающим белком (один из белков фракции α_1 -глобулинов). Ретинолсвязывающий белок обеспечивает растворимость ретинола, защиту от окисления, транспорт и доставку в различные ткани. В сетчатке глаза ретинол превращается в ретиналь, а в печени — сначала в ретиналь, а затем в ретиноевую кислоту, которая выводится с желчью в виде глюкуронидов.

Депонируется витамин А в печени в форме эфиров пальмитиновой и уксусной кислот (ретинилпальмитат и ретинилацетат), а также в виде ретинилфосфата.

Биологическая роль. Ретинол является структурным компонентом клеточных мембран. Ретиноевая кислота регулирует рост и дифференцировку клеток эмбриона и молодого организма, а также деление и дифференцировку быстро пролиферирующих тканей (в первую очередь эпителиальных, хряща и костной ткани). Это соединение принимает участие в регуляции синтеза белков цитоскелета, реакций распада и синтеза гликопротеинов. Недостаток витамина А приводит к нарушению синтеза гликопротеинов, что проявляется потерей защитных свойств слизистых оболочек.

Механизм регуляторного действия ретиноидов сходен со стероидными гормонами. Ретиноиды связываются со специфическими рецепторными белками в клеточных ядрах. Далее лиганд-рецепторный комплекс взаимодействует со специфическими участками ДНК, что оказывает влияние на транскрипцию отдельных генов. Идентификация этих генов служит предметом активного научного поиска.

Ретинол является важнейшим компонентом антиоксидантной защиты организма. Ретиноевая кислота, ретинол и его эфиры стимулируют реакции клеточного иммунитета, в частности, влияют на деление иммунокомпетентных клеток, синтез факторов специфической (иммуноглобулин) и неспецифической (интерферон, лизоцим) защиты организма от инфекционных и других заболеваний.

Ретинол обладает противоопухолевым действием, а ретиналь *участвует в фотохимическом акте зрения*.

В сетчатке глаза имеются специализированные фоторецепторные клетки двух типов — палочки и колбочки. Наибольшей светочувствительностью обладают палочки, а колбочки обеспечивают цветное зрение. Палочка (рис. 14.4) состоит из двух основных частей: наружного и внутреннего сегментов. Наружные сегменты палочек содержат уплотненные замкнутые мембранные пузырьки — диски, уложенные в стопку и богатые белком опсином. Коферментом зрительного белка опсина служит 11-*цис*-ретиналь, альдегидное производное витамина А. Ретиналь и опсин образуют родопсин, пигмент пурпурно-красного цвета. Родопсин является светочувствительным хромопротеином.

Поглощение молекулой родопсина кванта света индуцирует изомеризацию 11-*цис*-ретиная в *транс*-форму. В результате этой *фотохимической реакции* изменяется геометрия ретиная и изменяется белковая опсиновая часть рецепторов, родопсин обесцвечивается и переходит в метародопсин II (рис. 14.4, а).

Метародопсин II взаимодействует с другим белком — трансдуцином (разновидность семейства G-белков). Трансдуцин состоит из трех протомеров (α -, β - и γ -субъединиц). В результате активации энергией фотона α -протомер трансдуцина обменивает ГДФ, который связан с ним в темновой фазе, на ГТФ (рис. 14.4, б).

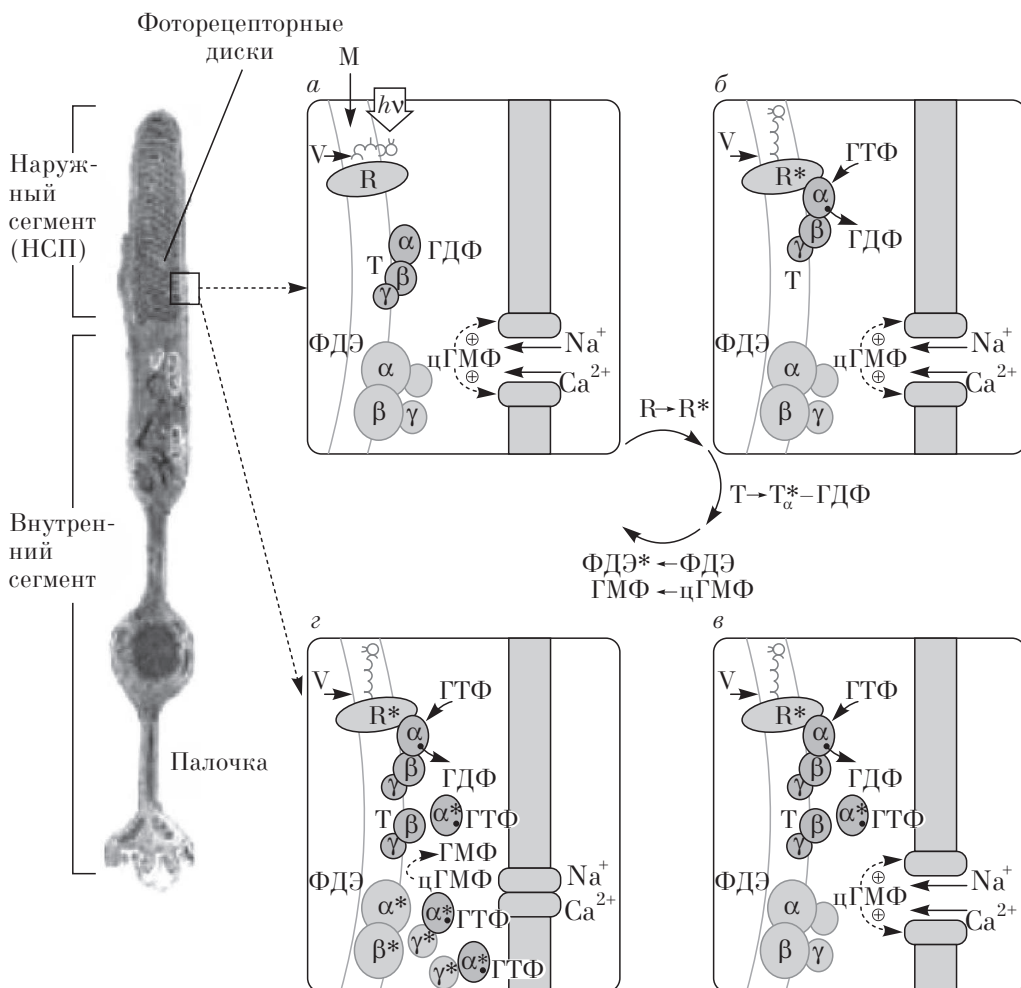


Рис. 14.4. Механизм восприятия света в сетчатке глаза:

М — мембрана наружного сегмента палочек; R — белок родопсин; R* — метародопсин II;
 $h\nu$ — энергия фотона; T — трансдуцин; V — витамин А

Комплекс α -субъединицы трансдуцина с ГТФ активирует специфическую фосфодиэстеразу, которая расщепляет цГМФ до ГМФ. Значение этой реакции — снижение концентрации цГМФ в цитоплазме наружного сегмента (рис. 14.4, в).

цГМФ стимулирует каскад событий, генерализующих зрительный сигнал в мозге. При уменьшении концентрации цГМФ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -каналы в плазматической мембране наружного сегмента, которые были открыты в темноте и через которые внутрь рецепторных клеток входили ионы Na^+ и Ca^{2+} , закрываются. Уменьшение входа ионов Na^+ приводит к гиперполяризации мембраны, возникновению электрического импульса. Этот импульс преобразуется в мозге в зрительное восприятие (рис. 14.4, г).

В темноте высокий уровень цГМФ в палочках поддерживается благодаря активности гуанилатциклазы. Поэтому цГМФ-зависимые катионные каналы плазматической мембраны остаются открытыми, и катионы Na^+ и Ca^{2+} беспрепятственно поступают в клетку. В этом состоянии зрительная клетка постоянно выделяет нейромедиатор глутамат в синаптическую щель.

При освещении уровень цГМФ резко падает за счет активации фосфодиэстеразы, что приводит к перекрыванию ионных каналов. Так как ионы Na^+ и Ca^{2+} постоянно выкачиваются из клетки, концентрация их быстро падает. Это приводит к гиперполяризации клетки, что останавливает выделение нейромедиатора. Снижение концентрации ионов Ca^{2+} инициирует активацию гуанилатциклазы, что влечет за собой быстрый подъем уровня цГМФ настолько, что ионные каналы открываются вновь.

Участие витамина А в антиоксидантной защите организма. Благодаря наличию сопряжённых двойных связей в молекуле ретинол способен взаимодействовать со свободными радикалами различных типов, в том числе и со свободными радикалами кислорода. Он защищает организм от пероксидного стресса и способствует поддержанию SH-групп в составе самых разных соединений в восстановленном состоянии. В частности, препятствуя окислению SH-содержащих белков и образованию в них поперечных S–S-сшивок в составе кератина, ретинол тем самым препятствует кератинизации эпителия. При гиповитаминозе А усиление кератинизации кожи приводит к усиленному слущиванию эпителия, развитию дерматита и раннему старению кожи.

Антиоксидантное действие ретинола проявляется также в том, что он значительно усиливает антиоксидантное действие витамина Е. Вместе с токоферолом и витамином С он обеспечивает включение селена (Se) в состав глутатионпероксидазы (фермента, обезвреживающего перекиси липидов).

Однако витамин А может проявлять себя и как прооксидант, так как он легко окисляется кислородом с образованием высокотоксичных перекисных продуктов. Полагают, что симптомы гипervитаминоза А как раз и обусловлены его прооксидантным действием на биомембраны. Особенно усиливается процесс ПОЛ.

Гиповитаминоз. Наиболее ранним симптомом недостаточности витамина А является гемералопия (ночная, куриная слепота) — резкое снижение темновой адаптации. Для этого состояния характерно также поражение кожи (гиперкератоз), слизистых оболочек кишечника, бронхов, мочеполовой системы. В результате облегчается инфицирование слизистых оболочек и кожи, что способствует развитию воспалительных процессов, замедляется заживление ран.

Дерматиты сопровождаются патологической пролиферацией, кератинизацией и слущиванием эпителия. Десквамация эпителия слезных каналов может приводить к их закупорке и уменьшению смачивания роговицы глаза слезной жидкостью — она высыхает (ксерофтальмия) и размягчается (кератомалация) с образованием язв и «бельма».

Гипервитаминоз. При гипервитаминозе развивается общее истощение организма, воспаление роговицы глаза, потеря аппетита, тошнота (при остром отравлении — рвота), понос, головные боли, боли в суставах, увеличение печени. Хроническое отравление наблюдается при регулярном употреблении высоких доз витамина, больших количеств рыбьего жира. Случаи острого отравления со смертельным исходом наблюдали при употреблении в пищу печени акулы, белого медведя, морских животных (печень и жировая ткань — основные депо витамина).

Оценка обеспеченности организма. Степень обеспеченности определяется по содержанию витамина в крови.

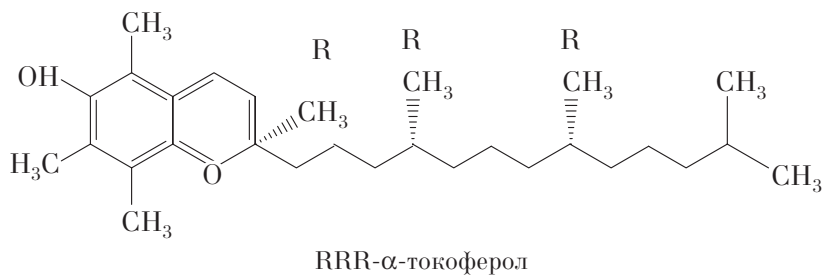
Лекарственные препараты. Витамин А применяется в виде ретинола-ацетата внутрь, наружно и внутримышечно для лечения и профилактики А-витаминной недостаточности, в комплексной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний, поражении кожи и глаз, желудочно-кишечных заболеваниях.

14.6.2. Витамин Е (токоферол)

В 1920-е гг. американские ученые-биологи Г. Эванс и К. Бишоп установили, что при нормальной овуляции и зачатии у беременных самок крыс происходила гибель плода при исключении из рациона жирорастворимого пищевого фактора. Они сумели излечить бесплодие у крыс, добавляя им в корм листья салата. Активное соединение, способствующее развитию эмбриона, было выделено также из масел зародышей пшеницы и других семян. Оно получило название *токоферол* (от греч. tokos — потомство, phero — несу) или *витамин Е*. Синтез витамина Е был осуществлен в 1938 г. французским биологом П. Каррером.

Молекула токоферола состоит из кольца производного бензохинона и изопреноидной боковой цепи. Он включает природные и синтетические вещества, производные токола, характеризующиеся биологической активностью.

Витамины группы Е объединяют 8 токоферолов, обозначаемых начальными буквами греческого алфавита.



Между природным и синтетическим витамином Е существуют различия, что отражено в их классификации. Натуральные формы токоферола обозначаются как RRR-токоферолы (R обозначает конфигурацию метильной группы) и имеют единственный стереоизомер. Именно он является основной биологически активной формой.

Токоферолы — прозрачные, светло-желтые, вязкие масла, хорошо растворимые в большинстве органических растворителей. Медленно окисляются на воздухе, разрушаются под действием УФ-лучей.

Пищевые источники. Основным источником токоферола — свежие растительные масла (соевое, хлопковое, подсолнечное, арахисовое, кукурузное, облепиховое). Также источником витамина Е являются орехи, семечки, гречневая крупа, проросшие ростки пшеницы, листья салата и капусты. Из продуктов животного происхождения более всего токоферолов содержится в сливочном масле, сале, мясе, желтке яиц. В молоке этого витамина мало.

Суточная потребность — 10–20 мг.

Метаболизм. Витамин Е с продуктами питания поступает в ЖКТ, всасывается и в составе хиломикронов секретируется в кровяное русло. Не всосавшиеся в кишечнике токоферолы выводятся с калом. Продукты метаболизма витамина — токофериновая кислота и ее водорастворимые глюкурониды — выводятся с мочой.

В печени витамин Е связывается с токоферолсвязывающими белками, причем наибольшим сродством обладает RRR-α-токоферол. Эти белки «экспортируют» витамин в кровь в составе ЛПОНП. В плазме крови происходит обмен токоферолом между ЛПОНП и другими липопротеинами. Витамин Е поступает во внепеченочные ткани в составе ЛПНП после взаимодействия последних с соответствующими рецепторами.

Кроме *рецептор*-опосредованного механизма имеется и другой, *ферментативно*-опосредованный, зависящий от активности липопротеинлипазы. Действие фермента на триацилглицеролы способствует высвобождению токоферола из хиломикронов и ЛПОНП, после чего витамин поступает в ткани путем пассивной диффузии. Структурная организация фосфолипидов клеточных мембран способна «узнавать» хиральную форму RRR-α-токоферола, благодаря чему витамин задерживается в мембране, где и выполняет свою функцию.

Биологическая роль. Во-первых, токоферол является *антиоксидантом*. Его антиоксидантные свойства обусловлены способностью подвижного гидроксила его молекулы непосредственно взаимодействовать со свободными радикалами кислорода, радикалами ненасыщенных жирных кислот и перекисями жирных кислот, способностью защищать от окисления двойные связи в молекулах каротина и витамина А. Мембраностабилизирующее действие витамина проявляется и в его свойстве предохранять от окисления SH-группы мембранных белков. Витамин Е (совместно с аскорбатом) способствует включению селена в состав активного центра глутатионпероксидазы, тем самым он обеспечивает ферментативную антиоксидантную защиту (см. п. 5.6.2).

Витамин Е занимает такое положение в мембране, которое препятствует контакту кислорода с ненасыщенными липидами мембран. Он защищает биомембраны от окислительного повреждения и их перекисной деструкции.

Токоферол является *антигипоксантом*, что объясняется его способностью стабилизировать митохондриальную мембрану и экономить потребление кислорода клетками.

Витамин Е необходим для *нормального функционирования убихинона* — компонента дыхательной цепи и главного антиоксиданта митохондрий, микросомных цитохромов и других гемсодержащих белков. Вследствие мембраностабилизирующего эффекта витамина Е в митохондриях увеличивается сопряжение тканевого дыхания с окислительным фосфорилированием (синтез АТФ).

Токоферол способствует *усвоению организмом белков и росту мышечной массы*. Он играет роль при формировании коллагеновых и эластичных волокон межклеточного вещества. Достаточный уровень витамина Е нормализует мышечную деятельность, предотвращая развитие мышечной слабости.

Витамин Е обладает способностью *угнетать активность фосфолипазы А₂*. Это подавляет образование лейкотриенов и простагландинов, способствующих формированию воспалительной реакции.

Витамин Е является эффективным *иммуномодулятором*, способствующим укреплению иммунозащитных сил организма.

Гиповитаминоз. Повышение проницаемости мембран всех клеток и субклеточных структур, накопление в них продуктов ПОЛ — главное проявление гиповитаминоза. При этом наблюдаются частичный гемолиз эритроцитов; воспаление суставов (артрит) и кожи (дерматит); боли мышечного и нервного происхождения, вплоть до дегенеративных изменений в скелетных мышцах и мышцах сердца; повышенная проницаемость и ломкость капилляров, которые проявляются в виде множественных кровоподтеков; некроз печени и размягчения участков мозга, особенно мозжечка; атрофия половых желез, приводящая к полному или частичному бесплодию.

Дефицит витамина Е в организме сопровождается снижением содержания иммуноглобулинов Е. После его введения нормализуется численность и восстанавливается функциональная активность Т- и В-лимфоцитов в периферической крови.

Гипервитаминоз. Витамин Е не токсичен при значительных (10–20-кратных к суточной потребности) и длительных превышениях его дозировки, что обусловлено снижением связывающей способности специфических токоферол-связывающих белков печени включать витамин в состав ЛПОНП. Его избыток выводится из организма с желчью.

Оценка обеспеченности организма. Основным методом является определение концентрации витамина Е в крови. Применяются и функциональные тесты, позволяющие оценить глубину Е-витаминной недостаточности.

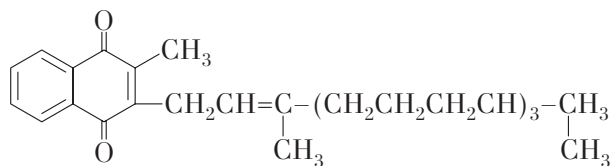
Основными являются тесты на перекисную или гемолитическую устойчивость эритроцитов, содержание продуктов ПОЛ в крови и эритроцитах. Уже на ранних стадиях гиповитаминоза в сыворотке крови растет активность ферментов, выходящих из поврежденных тканей (креатинфосфокиназы, аланинаминотрансферазы и др.), и содержание продуктов ПОЛ.

Лекарственные препараты. Витамин Е в виде токоферола-ацетата (масляный раствор, желатиновые капсулы) применяется для профилактики и лечения гиповитаминоза Е; в комплексной терапии при гормональном лечении нарушений менструального цикла; при дегенеративных и пролиферативных изменениях суставов и связочного аппарата, позвоночника; мышечной дистрофии; реконвалесценции после перенесенных заболеваний; неполноценном и несбалансированном питании; повышенной физической нагрузке. Токоферол-ацетат входит в состав комбинированных (поливитаминных) препаратов Аевит, Ундевит, Компливит и др.

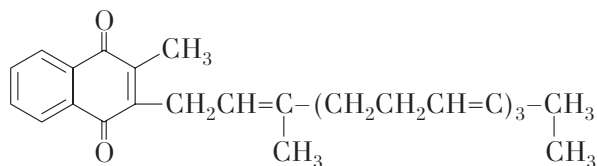
14.6.3. Витамин К (нафтохинон)

Витамин К был открыт датским исследователем Х. Дамом в 1935 г. Он был назван по первой букве в немецко-скандинавском слове «Koagulation» (свертывание).

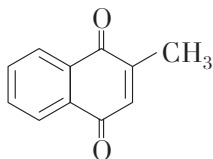
Витамин К (витамин коагуляции) включает в себя группу жирорастворимых витаминов, химически они относятся к производным 2-метил-1,4-нафтохинона.



K₁ (филлохинон)



K₂ (менахинон)

K₃ (менадион)

Все члены семейства витамина К имеют метилированное нафтохиноновое кольцо и боковую цепь, содержащую различное число остатков изопрена. Филлохинон (витамин К₁) имеет четыре остатка изопрена в боковой цепи, один из которых ненасыщен. Менахиноны (витамин К₂) содержат различное количество ненасыщенных остатков изопрена. Наличие остатков изопрена сближает витамины К с другими жирорастворимыми витаминами (А, Е) и убихиноном (КоQ).

Пищевые источники. Витамин К₁ (филлохинон) синтезируется растениями и содержится в цветной капусте, брокколи, шпинате, люцерне, зеленых томатах, рябине. Витамин К₂ (менахинон) синтезируется сапрофитными бактериями тонкого кишечника человека.

Суточная потребность составляет 30–80 мкг.

Метаболизм. Всасывание витамина К происходит при участии желчных кислот.

О **биологической роли** витамина К подробнее см. п. 16.3.3. Естественные антагонисты витамина К рассмотрены в п. 16.4.

Причиной гиповитаминоза К могут быть заболевания желудочно-кишечного тракта, сопровождающиеся нарушением всасывания жиров, заболевания печени, желчнокаменная болезнь. У маленьких детей, у которых кишечник еще не заселен бактериями в достаточном количестве, нередко наблюдается гиповитаминоз К, который может давать склонность к кровотечениям.

Ранним признаком гиповитаминоза К является пониженное содержание протромбина в крови. Содержание витамин К-зависимых факторов системы свертывания в плазме крови не изменяется, но нарушается их активация и способность связываться на фосфолипидной поверхности для участия в реакции гемокоагуляции. Авитаминоз К у взрослых — редкое явление, встречается, в основном, при дисбактериозах после лечения антибиотиками.

Лекарственные препараты. Известен ряд производных нафтохинона, обладающих антигеморрагическим действием, которые получены синтетическим путем. К их числу относятся следующие соединения: витамин К₃ (менадион) и его водорастворимая форма — *викасол* (менадиона натрия бисульфит), витамин К₄ (2-метил-1,4-нафтогидрохинон), витамин К₅ (2-метил-4-амино-1-нафтогидрохинон) и др.

14.6.4. Витамин D (кальциферол)

В начале XX в. А. Гессом и М. Вейнштоком из растительных масел был выделен эргостерол, получивший название *витамин D₁*. При воздействии УФ-лучей на витамин D₁ образовывалось излечивающее рахит соединение — *витамин D₂* (эргокальциферол) (*кальциферол* — букв. «несущий кальций»). В 1932 г. Г. Брокман из рыбьего жира тунца выделил *витамин D₃*. В том же году немецкий биохимик А. Виндаус получил его фотоизомеризацией 7-дегидрохолестерола. В растениях при УФ-облучении синтезируются и другие витаминеры эргостерола (D₄₋₇).

Наиболее важный из группы витаминов D — витамин D₃ (холекальциферол). Он образуется в качестве промежуточного продукта при биосинтезе холестерина из 7-дегидрохолестерола в клетках кожи человека под влиянием УФ-лучей (см. рис. 13.4 на с. 434).

Пищевые источники. Витамин D₃ содержится исключительно в животной пище. Особенно богат им рыбий жир, печень, желток яиц. В растительных маслах и молоке присутствует витамин D₂. Много его и в дрожжах, но биологически он менее активен.

Суточная потребность для детей колеблется от 12,5 до 25 мкг (500–1000 МЕ), у взрослых она ниже — 2,5–10 мкг.

Метаболизм. Витамины группы D всасываются подобно витамину A (см. п. 14.6.1). В печени витамин D подвергается гидроксилированию в положении C₂₅ под действием ферментов микросомной оксигеназной системы. В результате из витамина D₃ образуется 25-(ОН)-D₃, т.е. 25-гидроксистолекаркальциферол, который с помощью специфического транспортного белка током крови переносится в почки. В почках осуществляется вторая реакция гидроксилирования в положении C₁ с помощью митохондриальных оксигеназ (образуется 1,25-(ОН)₂-D₃, т.е. 1,25-дигидроксистолекаркальциферол, или кальцитриол). Эта реакция активируется паратиреоидным гормоном, когда уровень кальция в крови снижается. Если уровень кальция адекватен физиологической потребности организма, вторичное гидроксилирование происходит в положении C₂₄ (вместо C₁), при этом образуется неактивный метаболит 1,24-(ОН)₂-D₃. В реакциях гидроксилирования принимает участие витамин C.

Витамин D₃ накапливается в жировой ткани. Выводится он главным образом с калом в неизменном или окисленном виде, а также в виде конъюгатов.

Биологическая роль. Витамин D₃ можно рассматривать как *прогормон*, так как он превращается в 1,25-(ОН)₂-D₃, действующий аналогично стероидным гормонам. Проникая в клетки-мишени, он связывается с рецепторами, которые мигрируют в ядро клетки.

В *энтероцитах* этот гормон-рецепторный комплекс стимулирует *транскрипцию иРНК*, которая кодирует аминокислотную последовательность белков-переносчиков ионов кальция. В разных клетках 1,25-(ОН)₂-D₃ стимулирует синтез Ca²⁺-АТФазы.

В *кишечнике* всасывание кальция осуществляется путем как облегченной диффузии (с участием кальцийсвязывающего белка), так и активного транспорта (с помощью Ca^{2+} -АТФазы). Одновременно ускоряется всасывание фосфора.

В *костной ткани* $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ стимулирует процесс деминерализации (синергично с паратиринном).

В клетках *мембран почечных канальцев* за счет активации синтеза кальциевой АТФазы витамин D приводит к увеличению реабсорбции ионов кальция; возрастает и реабсорбция фосфатов.

Подробнее механизм действия и биохимические функции кальцитриола рассматривались в п. 6.4.5.

Гиповитаминоз. Недостаток витамина D у детей приводит к *рахиту*. Основные проявления этого заболевания сводятся к симптоматике недостаточности кальция. Прежде всего страдает остеогенез: отмечается деформация скелета конечностей (искривление в результате размягчения — *остеомаляции*), черепа (позднее заращение родничков), грудной клетки (появление своеобразных «чётков» на костно-хрящевой границе ребер), задерживается прорезывание зубов. Развивается гипотония мышц (увеличенный живот), возрастает нервно-мышечная возбудимость (у младенца выявляется симптом облысения затылочка из-за частого вращения головкой), возможно появление судорог.

У взрослого недостаточность кальция в организме приводит к *кариесу* и *остеомаляции* (размягчение кости), у пожилых — к развитию *остеопороза* (снижение плотности костной ткани вследствие нарушения остеосинтеза). Разрушение неорганического матрикса костей при дефиците витамина D объясняется усиленным «вымыванием» кальция из костной ткани и нарушением реабсорбции кальция в почечных канальцах.

Гипервитаминоз. Избыточный прием витамина D приводит к интоксикации и сопровождается выраженной деминерализацией костей, вплоть до их переломов. Содержание кальция в крови повышается, что приводит к кальцификации мягких тканей. Особенно склонны к этому процессу почки (образование камней, развитие почечной недостаточности).

Интересно, что пигментация кожи (загар) является защитным фактором, предохраняющим от избыточного образования витамина D при УФ-облучении кожи. Однако у светложкожих жителей северных стран, несмотря на недостаток солнечной инсоляции, D-дефицитные состояния, как правило, не развиваются, так как их диета включает рыбий жир.

Оценка обеспеченности организма. Обеспеченность организма витамином D оценивается на основании определения:

- 1) содержания активных форм витамина D в крови и тканях;
- 2) содержания кальция, фосфора и активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови;
- 3) уровня экскреции с мочой фосфатов.

Применяются также нагрузочные пробы с приемом фиксированных доз кальция при парентеральном введении с последующим определением содержания кальция в крови и моче.

Лекарственные препараты. Используются рыбий жир очищенный и масляные растворы витамина D внутрь при гиповитаминозе, гипокальциемии, гипофосфатемии, остеопорозе, переломах костей, замедленном образовании костной мозоли и др.

В целях профилактики обычно назначают витамин D₃ в дозе 300–500 МЕ (1 МЕ = 0,025 мкг холекальциферола) в сутки.

14.7. Водорастворимые витамины

Водорастворимые витамины в организм поступают в основном с продуктами растительного происхождения. Однако некоторые из них содержатся в животной пище в больших количествах, чем в растительной. Водорастворимые витамины легко всасываются из кишечника, не накапливаются в тканях (исключением является витамин B₁₂), быстро выводятся из организма, поэтому их необходимо ежедневно принимать с пищей. Поступая в организм, водорастворимые витамины образуют кофакторы и участвуют в ферментативных реакциях.

Препараты водорастворимых витаминов принимают активное участие в метаболических процессах обмена белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот.

Получают водорастворимые витамины химическим (тиамин, B₆, фолиевая кислота и др.) и микробиологическим (рибофлавин, витамин B₁₂) синтезом или выделяют из природных источников (аскорбиновая кислота, биофлавоноиды и др.). Выпускаются также активные коферментные формы: тиаминмоно- и тиаминдифосфат (коферментная форма тиамина), флавинмонопнуклеотид и флавинаденинднуклеотид (коферментные формы рибофлавина), пиридоксальфосфат (коферментная форма витамина B₆) и др.

Основные водорастворимые витамины перечислены в табл. 14.3.

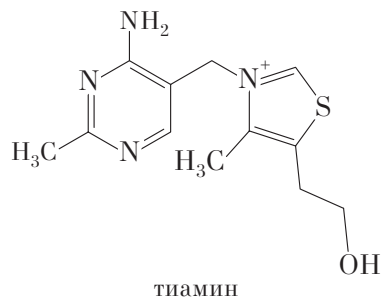
Таблица 14.3

Водорастворимые витамины

Буквенное обозначение	Наименование	Основное действие
B ₁	Тиамин	Антиневритный
B ₂	Рибофлавин	Витамин роста
B ₅	Пантотеновая кислота	Антидерматитный
B ₆	Пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин	Антидерматитный
B ₉	Фолиевая кислота	Антианемический
B ₁₂	Кобаламин	Антианемический
H	Биотин	Антисеборейный
PP	Никотиновая кислота, никотинамид, ниацин	Антипеллагрический
C	Аскорбиновая кислота	Антискорбутный

14.7.1. Витамин В₁ (тиамин)

Химическая формула тиамина была установлена американским химиком Уильямсом в 1935 г. В 1939 г. тиамин был выделен в кристаллической форме, в которой его можно было использовать. Молекула витамина В₁ содержит два соединенных метиленовой связью кольца: пиримидиновое и тиазоловое. Тиамин — белый кристаллический порошок, хорошо растворимый в воде, нерастворимый в спирте. Разрушается при нагревании.

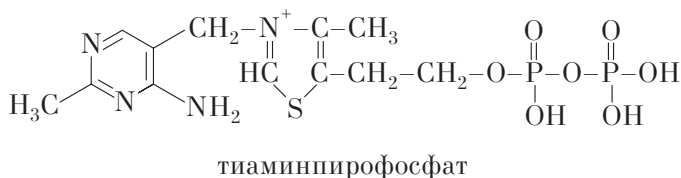


В кислой среде тиамин устойчив к нагреванию и действию окислителей, в щелочной среде легко окисляется в тioxром(II) — желтое вещество, обладающее интенсивной синей флуоресценцией с $\lambda_{\text{макс}} = 460\text{--}470$ нм. Этот метод используется для определения тиамина в пищевых продуктах, лекарственных растениях и готовых лекарственных препаратах.

Пищевые источники. Тиамин широко распространен в живой природе. Он синтезируется растениями и многими микроорганизмами, в частности некоторыми видами бактерий толстого кишечника человека. Животные и человек не синтезируют тиамин и должны получать его с пищей. Наиболее богаты тиамином дрожжи, хлеб и хлебобулочные изделия из муки грубого помола, крупы (особенно гречневой, овсяной, пшенной; зернобобовые, печень, свинина).

Суточная потребность в тиаминах для взрослого человека составляет от 1,1 до 2,2 мг в зависимости от энергозатрат. При избыточном углеводном питании потребность в витамине В₁ увеличивается; жиры, наоборот, уменьшают эту потребность.

Метаболизм. Всасывание тиамина происходит на всем протяжении тонкой кишки путем активного транспорта. Через 15 мин он обнаруживается в крови, через 30 мин — в тканях. Этанол замедляет скорость всасывания тиамина после перорального приема. В плазме крови циркулирует преимущественно свободный тиамин. В тканях присутствуют свободный тиамин и его фосфорные эфиры: тиаминмонофосфат (ТМФ), тиаминдифосфат (ТДФ) или наиболее часто употребляемое название — тиаминпирофосфат (ТПФ).



ТПФ — основная форма, на долю которой приходится 80 % общего содержания тиамин. Он синтезируется главным образом в печени, мышечной ткани и в мозге из тиамин и АТФ в присутствии ионов Mg^{2+} при участии фермента тиаминкиназы.

Выводится тиамин через кишечник и почки с мочой.

Биологическая роль витамина B_1 в виде ТПФ входит в состав пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназных комплексов. Таким образом он участвует в *центральных метаболических путях* (окислительном декарбоксилировании пирувата и цикле трикарбоновых кислот), которые снабжают клетки энергией.

Тиамин опосредованно, т.е. вместе с пантотеновой кислотой, способствует синтезу *ацетилхолина* и, следовательно, необходим для нормального функционирования нервной системы. Синтез ацетилхолина в нервной системе протекает при участии глюкозы, дихотомический распад которой дает ацетильные группы и энергию, которые необходимы для синтеза.

В составе транскетолазы ТПФ участвует в *пентозофосфатном пути окисления глюкозы*, являющемся источником НАДФН· H^+ и рибозо-5-фосфата.

ТПФ принимает участие в *окислительном декарбоксилировании* α -кетокислот с разветвленным углеродным скелетом, которые являются продуктами дезаминирования аминокислот — валина, изолейцина и лейцина. Эти реакции играют важную роль в катаболизме белков.

Антивитамины. *Окситиамин* является структурным аналогом витамина B_1 и конкурирует с тиамином за место связывания в активном центре ТПФ-зависимых ферментов, тем самым нарушая работу этих ферментов.

Другим известным антивитамином является фермент *тиаминаза*. Он разрушает витамин B_1 . Этот фермент содержится в тканях некоторых видов пресноводной и морской рыбы (семейств сельдевых, карповых и корюшковых). Тиаминаза денатурируется при нагревании, поэтому рыбу при приготовлении необходимо подвергать термической обработке.

Гиповитаминоз. Как правило, развитие дефицита тиамин бывает связано с нарушениями в питании. Это может быть как следствием недостаточного поступления тиамин с пищей (питание очищенным рисом, продуктами из муки тонкого помола), так и результатом избыточного употребления продуктов, богатых антивитаминами B_1 . Недостаток тиамин в организме ведет к накоплению в крови и тканях недоокисленных продуктов обмена веществ. Одной из форм развивающейся вследствие этого клинической симптоматики является болезнь бери-бери. В современном обществе заболевание встречается редко.

При полиневритной, или *сухой*, форме бери-бери на первый план выступает расстройство функции нервной системы (онемение пальцев, чувство «ползания мурашек», утрата периферических рефлексов, боль по ходу нервов, развитие параличей). Наиболее характерен симптом симметричного опускания ступни при ходьбе (овечья походка). Наблюдаются нарушения психической деятельности (раздражительность, забывчивость, страх, иногда галлюцинации, снижение интеллекта). Нарушения со стороны пищеварительной системы про-

являются резкой потерей аппетита, снижением секреции желудочного сока и соляной кислоты, атонией, диареей.

Особая чувствительность нервной ткани к недостатку тиамина объясняется тем, что коферментная форма этого витамина абсолютно необходима нервным клеткам для усвоения глюкозы, которая является для них почти единственным источником энергии (большинство других клеток организма может использовать иные энергетические вещества, например жирные кислоты).

При *отечной* форме бери-бери преимущественно поражается сердечно-сосудистая система. Для этой формы характерны высокое артериальное давление, одышка, тахикардия и нарастающая сердечная недостаточность с выраженными отеками.

При алкоголизме вследствие дефицита V_1 развивается синдром Вернике – Корсакова. Данный синдром характеризуется нарушением координации движений и зрительных функций (нистагм, офтальмоплегия), а также нарушением памяти, галлюцинациями, психозами.

Гипервитаминоз. При чрезмерных и длительных приемах тиамина наступает гипervитаминозное состояние, которое проявляется в виде аллергических реакций (крапивница, кожный зуд, отек, одышка, кровоизлияния, судороги), вплоть до анафилактического шока.

Оценка обеспеченности организма. С этой целью обычно определяют содержание витамина и (или) его коферментов в эритроцитах крови.

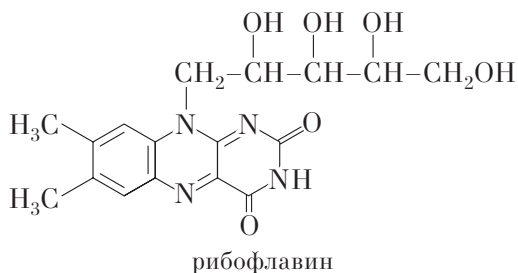
Наилучшим способом является определение активности тиаминзависимых ферментов. Активность пируват- и α -кетоглутаратдегидогеназ снижается только при глубоком гиповитаминозе, поскольку их апофермент прочно связывает ТПФ. Транскетолаза связывает ТПФ слабее, поэтому ее активность в эритроцитах начинает снижаться уже на раннем этапе гиповитаминоза V_1 . Если к образцу крови добавить ТПФ, то величина возрастания активности транскетолазы (так называемый ТПФ-эффект) позволит судить о степени недостаточности тиамина.

Лекарственные препараты. Применяется тиаминбромид и тиаминхлорид в виде таблеток, порошка и растворов для внутримышечного, подкожного и внутривенного введения для профилактики и лечения V_1 -гиповитаминозов, при периферических и алкогольных невритах, энцефалопатии Вернике, сердечно-сосудистой недостаточности. Препарат Кокарбоксилаза (ТПФ) применяется при сердечно-сосудистых заболеваниях.

В промышленности тиамин получают в ходе искусственного синтеза путем конденсации производных метилпиримидина, сероуглерода и производных метилтиазолона. ТПФ получают взаимодействием тиамина с пироглутарной кислотой.

14.7.2. Витамин В₂ (рибофлавин)

В основе структуры витамина В₂ лежит изоаллоксазин, соединенный со спиртом рибитолом.



Рибофлавин представляет собой игольчатые кристаллы желто-оранжевого цвета. Плохо растворяется в воде и этаноле, стабильный в кислой среде и быстро разрушается в щелочной. Водные и спиртовые растворы рибофлавина дают зеленовато-желтую окраску с интенсивной зеленой флуоресценцией в УФ-свете, что позволяет установить подлинность рибофлавина в лекарственных препаратах и продуктах питания. Рибофлавин легко окисляется и восстанавливается. При восстановлении его водородом образуется бесцветное соединение — лейкофлавин, которое, окисляясь, превращается в рибофлавин.

Пищевые источники. Источниками витамина В₂ для человека являются молоко и молочные продукты, яйца, печень, почки, сердце животных, пивные и пекарские дрожжи, в меньшей степени крупы и овощи. Частично человек получает рибофлавин как продукт жизнедеятельности микрофлоры кишечника.

Суточная потребность в витамине В₂ взрослого человека составляет 2–3 мг.

Метаболизм. В кишечнике рибофлавин высвобождается из состава пищевых ФМН и ФАД и диффундирует в кровь. В слизистой кишечника и клетках других тканей из него вновь образуются ФМН и ФАД.

Биологическая роль. Рибофлавин в качестве коферментов флавиномононуклеотида (ФМН) или флавинадениндинуклеотида (ФАД) (структурные формулы см. главу 3) функционирует в составе большого числа важнейших *флавопротеинов*, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях. В частности, они являются кофакторами дегидрогеназ в составе I и II комплекса дыхательной цепи, сукцинатдегидрогеназы (ЦТК), ацил-КоА-дегидрогеназы (β -окисление жирных кислот), некоторых оксидаз, например таких, как моноаминоксидазы (катаболизм аминов), ксантиноксидазы (распад пуриновых нуклеотидов).

ФАД и ФМН также выполняют коферментную функцию в составе тиоредоксинредуктазы (биосинтез нуклеотидов), фолатредуктазы (обмен витамина В₉), глутатионредуктазы (восстановление глутатиона), цитохрома b₅ — оксидоре-

дуктазы. В составе микросомной системы вместе с цитохромом P₄₅₀ ФАД участвует в метаболизме лекарственных веществ и других ксенобиотиков.

Антивитамины. Изорибофлавин, диэтилрибофлавин, галактофлавин и др., обладая сходной химической структурой, конкурируют с рибофлавином за связывание с белками-ферментами, но образовавшийся комплекс белка с антивитамином не обладает биологической активностью. Некоторые вещества с противомаларийным действием, в особенности акрихин, хинин, хотя и не обладают структурным сходством с рибофлавином, все же угнетают активность рибофлавиновых энзимных систем. Возможно, в данном случае проявляется неконкурентная форма антагонизма.

Гиповитаминоз. Внешними проявлениями недостаточности рибофлавина у человека является поражение слизистой оболочки губ и слущивание эпителия (хейлоз), изъязвления в углах рта (ангулярный стоматит), отек и покраснение языка (глоссит), дерматит носогубной складки. Поражаются слизистые оболочки ЖКТ. Часто развивается поражение органов зрения. Конъюнктива глаза теряет блеск из-за сухости, вызываемой закупоркой слезного канала слущивающимся эпителием, роговица прорастает сосудами (компенсаторная реакция на недостаточность дыхательной функции роговицы) и затем мутнеет, развивается катаракта (помутнение хрусталика).

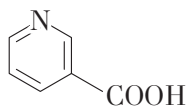
Гипервитаминоз. Гипервитаминозных состояний не наблюдается, так как рибофлавин не токсичен и его избыток выводится с мочой.

Оценка обеспеченности организма. Содержание витамина В₂ в крови остается в пределах нормы даже при выраженном гиповитаминозе. О степени тяжести гиповитаминоза следует судить по уровню его коферментных форм в тканях.

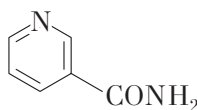
Лекарственные препараты. Препараты рибофлавина в виде порошка, таблеток, раствора для внутримышечного введения применяют для профилактики и лечения недостаточности витамина В₂, при кожных заболеваниях, вяло заживающих ранах, заболеваниях глаз, нарушении функции желудочно-кишечного тракта.

14.7.3. Витамин РР (никотиновая кислота, ниацин, никотинамид)

Витамин РР (от англ. preventive pellagra — предотвращающий пеллагру) представлен двумя формами — никотиновой кислотой (β-пиридинкарбоновой кислотой) и никотинамидом.



никотиновая кислота



никотинамид

Никотиновая кислота представляет собой бесцветные кристаллы игольчатой формы, легко растворимые в воде и спирте. Она термостабильна и сохраняет свою биологическую активность при кипячении и автоклавировании, устойчива к воздействию света, кислорода воздуха, нагреванию и окислителям.

Пищевые источники. Никотиновая кислота широко распространена в растительных и особенно животных продуктах. Источником витамина РР являются печень, почки, сердце, мясо животных, рыба, черный хлеб, продукты растительного происхождения (пшеничные и рисовые отруби, бобовые). Витамин РР может синтезироваться в кишечнике бактериальной микрофлорой.

Суточная потребность для взрослых составляет 15–25 мг.

Метаболизм. Поступивший с пищей витамин РР быстро всасывается в желудке и кишечнике, в основном путем простой диффузии. В организме человека и животных никотиновая кислота превращается в амид никотиновой кислоты. В печени возможен биосинтез ниацина из незаменимой аминокислоты триптофана. Для синтеза 1 мг ниацина требуется около 60 мг триптофана. Для реакций превращения триптофана в НАД⁺ требуются витамин В₂, витамин В₆ и железо.

Никотиновая кислота и продукты ее превращения, главным образом в виде N-метилникотинамида, выделяются почками.

Биохимические функции. Биологическая роль витамина РР связана с коферментной функцией НАД⁺ и НАДФ⁺ и их участием в окислительно-восстановительных процессах в организме. В главе 3 «Ферменты (энзимы) — биологические катализаторы» приведены структурные формулы этих коферментных форм. НАД⁺ является коферментом НАД⁺-зависимых дегидрогеназ, таких как пируватдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, α -КГ-дегидрогеназа (ферментов цикла Кребса), ферментов гликолиза — глицеральдегидфосфат дегидрогеназы, лактатдегидрогеназа (ЛДГ), β -гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа (β -окисление жирных кислот), алкогольдегидрогеназа и альдегиддегидрогеназа (окисление этанола уксусного альдегида), глутаматдегидрогеназа (окисление глутаминовой кислоты).

В пентозофосфатном пути окисления глюкозы участвуют НАДФ⁺-зависимые глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и 6-фосфоглюконат-дегидрогеназа. НАД⁺ участвует в поли-АДФ-рибозилировании в процессе сшивки хромосомных разрывов и репарации ДНК, что замедляет апоптоз клеток.

Восстановленный НАДФН·Н⁺ участвует в *восстановительных биосинтезах* (синтезе жирных кислот, холестерина, стероидных гормонов и др.), в реакциях гидроксилирования, включая реакции обезвреживания лекарственных веществ. НАДФН·Н⁺ является необходимым компонентом антиоксидантной системы клетки.

Антивитамины РР. Лекарственные средства, используемые для лечения туберкулеза (Фтивазид, Тубазид, Ниазид), являются антивитаминами РР,

так как образуют «неправильные» коферменты, аналогичные НАД⁺ и НАДФ⁺, что блокирует протекание окислительно-восстановительных реакций.

Гиповитаминоз. Проявления недостаточности витамина РР объединены в группу симптомов, получившую название *пеллагра* (от итал. *pella agra* — шершавая кожа). Для пеллагры характерна триада симптомов (ЗД): дерматит (поражение кожи), диарея (нарушение функции ЖКТ), деменция (поражение ЦНС). Начальный этап гиповитаминоза сопровождается воспалением слизистых оболочек рта (стоматит), языка (глоссит) и ЖКТ (диарея, сменяемая запорами). Появляются симметричные поражения открытых участков кожи — лица, шеи, кистей рук (фотодерматит), развивается гипохромная анемия. Возникают глубокие нарушения центральной и периферической нервной системы, вплоть до паралича, мышечной атрофии и нарушений психики, что выражается в потере памяти, галлюцинациях и бреде.

Для предупреждения пеллагры важно достаточное содержание в пищевом рационе белков, в частности, содержащих триптофан, поскольку из него образуется никотиновая кислота.

Оценка обеспеченности организма. Обеспеченность организма ниацином оценивается по величине экскреции основных продуктов его катаболизма — N-метилникотинамида и метил-2-пиридон-5-карбоксиямида. В обычных условиях концентрация выводимых с мочой метаболитов никотиновой кислоты и никотинамида невелика, но резко возрастает при их избыточном поступлении в организм.

Лекарственные препараты. Никотиновую кислоту и никотинамид применяют внутрь и парентерально при пеллагре, заболеваниях печени, гастритах с пониженной кислотностью, кожных заболеваниях. Никотиновая кислота также обладает выраженным, но непродолжительным сосудорасширяющим действием. Поэтому ее иногда назначают при сосудистых спазмах, атеросклерозе. Никотинамид такими свойствами не обладает. Никотиновая кислота в больших дозах (3–4 г/сут) влияет на липидный обмен, снижая содержание в крови холестерина и свободных жирных кислот.

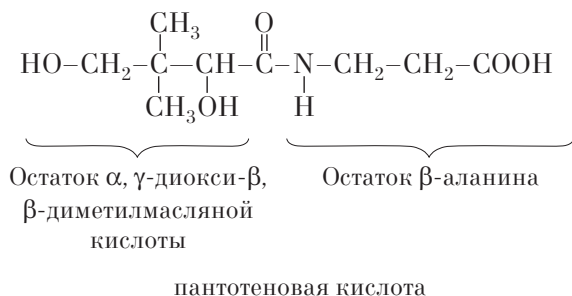
Никотиновая кислота и ее амид в больших дозах (50 мг в сутки на 1 кг массы тела) являются токсическими веществами и могут вызвать развитие аллергической реакции, сопровождающейся рвотой, судорогами, и даже вызвать жировую инфильтрацию печени.

В промышленных масштабах никотиновую кислоту получают из 3-метилпиридина.

14.7.4. Витамин В₅ (пантотеновая кислота)

Пантотеновая кислота (от греч. *panthos* — повсюду) была открыта американским химиком Р. Уильямсом в 1933 г. Спустя десятилетие она уже была синтезирована искусственным путем.

По химическому строению пантотеновая кислота состоит из остатков D-2,4-дигидрокси-3,3-диметилмасляной кислоты и β -аланина, соединенных пептидной связью.



Пантотеновая кислота (пантоил- β -аланин) — светло-желтая маслянистая жидкость, хорошо растворяется в воде и этаноле.

Пищевые источники. Пантотеновая кислота широко распространена в природе. Пищевым источником для человека являются рисовые и пшеничные отруби, дрожжи, печень, почки, мясо животных, рыба, яичный желток, икра, цветная капуста, картофель. В кишечнике человека пантотеновая кислота в небольших количествах продуцируется бактериями.

Метаболизм. Пантотеновая кислота выводится из организма с мочой и калом в неизменном виде.

Суточная потребность для взрослых 10–15 мг.

Биологическую роль пантотеновая кислота в форме 4-фосфопантетеина входит в состав кофермента А (КоА-SH) и ацилпереносящего белка (АПБ-SH).

В составе кофермента А обнаружены адениловая кислота, пантотеновая кислота и тиоэтанолламин (рис. 14.5). Функциональной является сульфгидрильная группа — SH, которая и обеспечивает образование тиоэфиров при взаимодействии КоА с карбоксильными группами органических кислот.

Коэнзим А участвует в активации и переносе ацильных групп (ацетил-, сукцинил-, малонил- и др.), в реакциях синтеза холестерина, гема, ацетилхолина; в активации, окислении, синтезе жирных кислот; синтезе кетонных тел, триацилглицеролов, сложных липидов, гексозаминов; модификации белков-гистонов и детоксикации (путем ацетилирования) чужеродных веществ в печени.

Гиповитаминоз. Гиповитаминоз пантотеновой кислоты у человека встречается редко, так как в обычных продуктах питания содержится достаточное количество этого витамина. При экспериментальном гиповитаминозе у животных отмечалось поражение нервной системы (парестезии, синдром «жжения стоп», изменение походки, нарушения координации), снижение функции надпочечников. Низкий уровень пантотеновой кислоты в крови часто сопровождается другими гиповитаминозами.

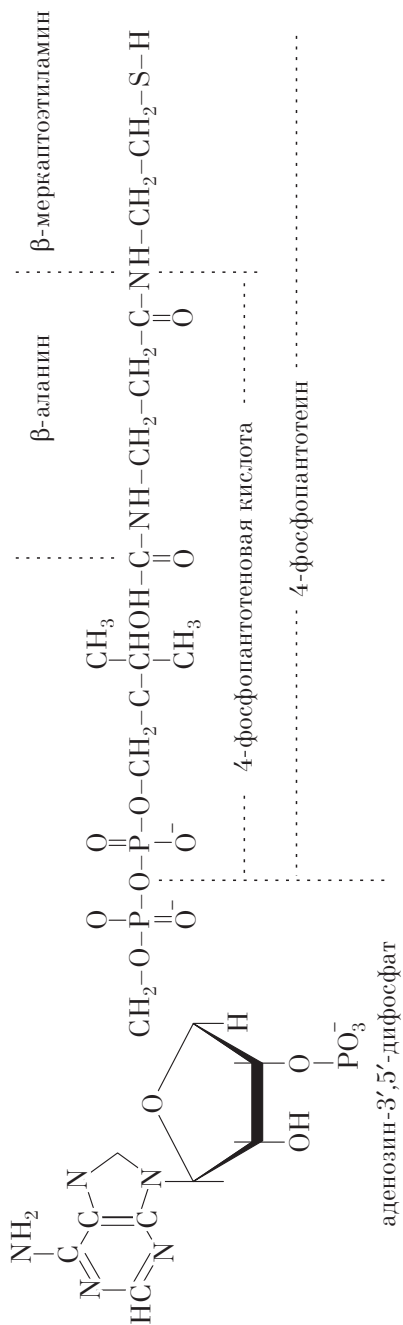


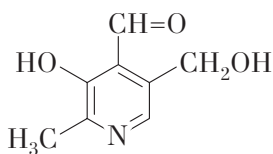
Рис. 14.5. Структурная формула кофермента А

Оценка обеспеченности организма пантотеновой кислотой. Для этой цели применяются микробиологический и хроматографический методы определения содержания пантотеновой кислоты и ее производных в крови и моче.

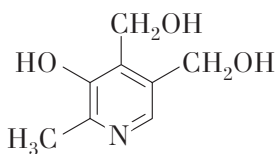
Лекарственные препараты пантотеновой кислоты. Пантотеновая кислота применяется в виде кальциевой соли (кальция пантотенат). Декспантенол — спиртовое производное пантотеновой кислоты, входит в состав средств для наружного применения Пантенол и Бепантен (используются при ожогах и других повреждениях кожных покровов).

14.7.5. Витамин В₆ (пиридоксин)

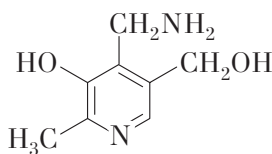
Витамин В₆ был открыт в 1934 г. венгерским биохимиком А. Сент-Дьёрдьи. Он включает группу трех природных производных пиридина, обладающих одинаковой витаминной активностью, но отличающихся друг от друга наличием спиртовой, альдегидной или аминогруппами (пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин).



пиридоксаль



пиридоксин



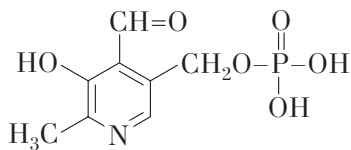
пиридоксамин

Пищевые источники. Витамином В₆ богаты бобовые, зерновые культуры, мясные продукты, рыба, картофель. Он синтезируется кишечной микрофлорой, частично восполняя потребность организма в этом витамине.

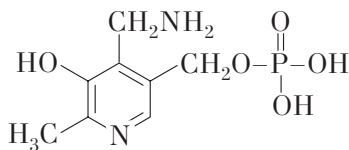
Суточная потребность. В сутки человек должен получать 2–2,2 мг пиридоксина. Потребность в витамине возрастает при увеличении количества белка в рационе, а также во время беременности и грудного вскармливания. Прием алкоголя и курение уменьшают содержание пиридоксальфосфата в тканях.

Метаболизм. Всосавшись в тонком кишечнике, все формы витамина В₆ током крови разносятся к тканям и, проникая в клетки, фосфорилируются с участием АТФ и пиридоксалькиназы. Коферментные функции выполняют пиридоксальфосфат и пиридоксаминфосфат.

Пиридоксин хорошо растворяется в воде и этаноле, устойчив в кислой и щелочной среде, но легко разрушается под действием света при pH 7,0.



пиридоксальфосфат



пиридоксаминфосфат

Распад коферментов осуществляется путем дефосфорилирования и окисления в тканях. Основным продуктом катаболизма является 4-пиридоксильная кислота, которая экскретируется с мочой.

Биологическая роль. Витамин В₆ часто называют «королем обмена аминокислот»; вместе с тем его коферментные формы участвуют в реакциях, катализируемых представителями почти всех классов ферментов:

1) *аминотрансфераз аминокислот*, катализирующих обратимый перенос NH₂-группы от аминокислоты на α-кетокислоту. В этой реакции образуются новые α-кетокислоты и заменимые аминокислоты;

2) *аминотрансфераз йодитирозинов и йодитиронинов*, участвующих в синтезе гормонов щитовидной железы и распаде этих гормонов в периферических тканях;

3) *декарбоксилаз аминокислот*, катализирует реакцию отщепления карбоксильной группы от аминокислот, что приводит к образованию биогенных аминов (гистамина, серотонина, ГАМК и др.);

4) *моноаминоксидаз, гистаминазы (диаминоксидазы) и аминотрансферазы ГАМК*, обезвреживающих (окисляющих) биогенные амины;

5) *изомераз аминокислот*, с помощью которых D-аминокислоты превращаются в L-аминокислоты;

6) *синтазы δ-аминолевулиновой кислоты*, участвующей в биосинтезе гема гемоглобина и других гемсодержащих белков.

Коферментные формы витамина В₆ также участвуют в реакциях синтеза фосфолипидов и витамина РР.

Помимо каталитического действия, пиридоксальфосфат необходим для активного транспорта некоторых аминокислот через клеточные мембраны. Ему присуща функция регулятора конформационного состояния гликогенфосфорилазы — фермента, катализирующего распад гликогена.

Антивитамины. Противотуберкулезный препарат — изониазид является антагонистом пиридоксала. Поэтому при длительном лечении изониазидом может развиваться гиповитаминоз В₆.

Гиповитаминоз. Основными проявлениями недостаточности витамина В₆ являются гипохромная анемия и судороги. Развитие гипохромной анемии объясняется нарушением биосинтеза гема вследствие низкой активности синтазы δ-аминолевулиновой кислоты, коферментом которой является фосфопиридоксаль. Из-за нарушения образования гема содержание гемоглобина в эритроцитах снижается, а не утилизируемое железо откладывается в тканях. Повышенная возбудимость и склонность к судорогам объясняются недостаточным образованием ГАМК (γ-аминомасляной кислоты) — медиатора торможения нейронов. Отмечается развитие сухого себорейного дерматита, стоматита и глоссита. Поражение кожи частично обусловлено недостаточностью витамина РР, в синтезе которого принимает участие витамин В₆.

Наиболее часто гиповитаминоз В₆ встречается у маленьких детей при искусственном вскармливании стерилизованным молоком (в процессе стерилизации витамин разрушается) и при токсикозах в период беременности.

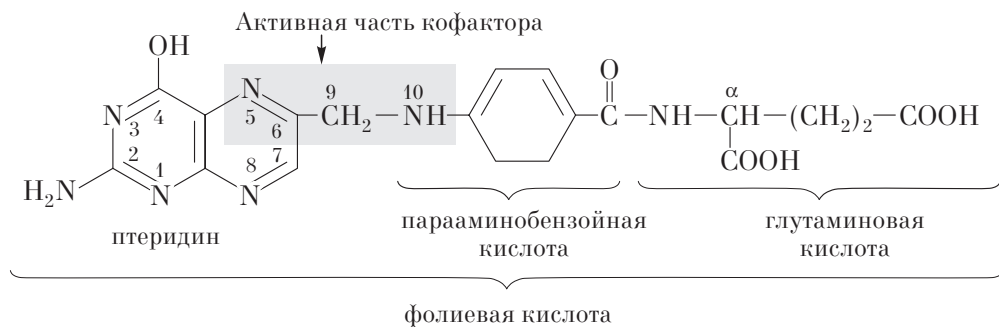
Оценка обеспеченности организма. Наиболее популярным методом оценки обеспеченности организма витамином В₆ является флуориметрическое определение содержания в моче 4-пиридоксидовой кислоты — продукта деградации витамина. При гиповитаминозе В₆ суточная экскреция 4-пиридоксидовой кислоты снижается (в норме — 3–5 мг). Однако более точную информацию дает измерение содержания самого витамина (особенно пиридоксальфосфата) в плазме крови и моче.

Лекарственные препараты. Применяется витамин В₆ в виде пиридоксина гидрохлорида. Доза 200–5000 мг может вызвать онемение, покалывание и кратковременную потерю чувствительности в конечностях.

14.7.6. Витамин В₉ (фолиевая кислота)

Впервые витамин В₉ был выделен из зеленых листьев шпината. В 1941 г. Б. Стокстэд получил фолиевую кислоту (от лат. *folium* — лист) в чистой кристаллической форме и определил ее химическую структуру.

Фолиевая кислота состоит из остатка птеридина, парааминобензойной кислоты и глутаминовой кислоты. Она плохо растворяется в воде и органических растворителях, но хорошо растворяется в щелочных растворах. Разрушается под действием света. К витамину В₉, наряду с фолиевой кислотой, относятся и ее производные: ди-, три-, полиглутаматы — фолаты.



Пищевые источники. Наиболее богаты фолиевой кислотой свежие зеленые листья овощей, салат, шпинат, капуста, лук, помидоры, морковь, из продуктов животного происхождения — печень, почки, яичный желток, сыр, а также пивные и пекарские дрожжи. При кулинарной обработке пищи фолиевая кислота может разрушаться.

Суточная потребность в фолиевой кислоте варьирует от 100 до 200 мкг; из-за плохой всасываемости этого витамина рекомендуемая суточная доза составляет 400 мкг.

Метаболизм. Фолиевая кислота (ФК) метаболически неактивна, в клетках организма после восстановления птеридинового кольца может превращаться

в дигидрофолиевую кислоту (ДФК) и активную форму — тетрагидрофолиевую кислоту (ТГФК) с помощью НАДФН·Н⁺-зависимых ферментов: фолатредуктазы (1) и дигидрофолатредуктазы (2):



Биологическая роль. ТГФК выполняет коферментную функцию переноса одноуглеродных групп: формильной (–СНО), метильной (–СН₃), метиленовой (–СН₂–), метенильной (–СН=) и формиминогруппы (–СН=NH). Присоединение этих групп к 5-му или 10-му атому ТГФК осуществляется ферментативно с образованием ковалентной связи. Одноуглеродные группы в составе ТГФК могут превращаться друг в друга (рис. 14.6).

Эти коферменты участвуют в синтезе пуриновых нуклеотидов, в превращениях дУМФ в дТМФ, гомоцистеина в метионин, в обмене глицина и серина. Тесная связь фолиевых коферментов с метаболизмом нуклеиновых кислот объясняет, почему ее наличие особенно важно в период быстрого роста и развития организма.

Антивитамины. Производные птеридина (аминоптерин, метотрексат) являются конкурентными ингибиторами фолатредуктазы и дигидрофолатредуктазы. Их применяют в комплексной терапии онкологических заболеваний для подавления синтеза ДНК в опухолевых клетках, а также при лейкозах для ингибирования лейкопоэза.

В отличие от человека, многие микроорганизмы не могут использовать экзогенную фолиевую кислоту и вынуждены синтезировать ее сами. Поэтому для них необходимым фактором роста и развития является парааминобензойная кислота (ПАБК). В роли ее антивитаминов могут выступать сульфаниламидные препараты, которые включаются вместо ПАБК в структуру фолиевой кислоты и блокируют функции фолатзависимых коферментов. На этом основано применение сульфаниламидов для лечения бактериальных инфекций.

Гиповитаминоз. Недостаточность фолиевой кислоты — явление, распространенное во всем мире; часто встречается среди неимущих людей, у престарелых, у беременных женщин, новорожденных и у лиц, получающих в течение длительного периода времени антибиотики, которые подавляют кишечную микрофлору. Гиповитаминоз может возникнуть в случае подавления микрофлоры кишечника лекарственными препаратами сульфаниламидной природы или при нарушении всасывания витамина в желудочно-кишечном тракте.

Важно помнить также, что для активирования и метаболизма фолиевой кислоты в организме необходимы другие витамины: В₆, В₁₂, С и РР.

При дефиците фолиевой кислоты развиваются общая слабость, потеря веса, а в дальнейшем — *мегалобластическая макроцитарная анемия*, весьма сходная с анемией вследствие дефицита витамина В₁₂, но без неврологических симптомов. Причиной ее служит нарушение биосинтеза пуриновых нуклеотидов

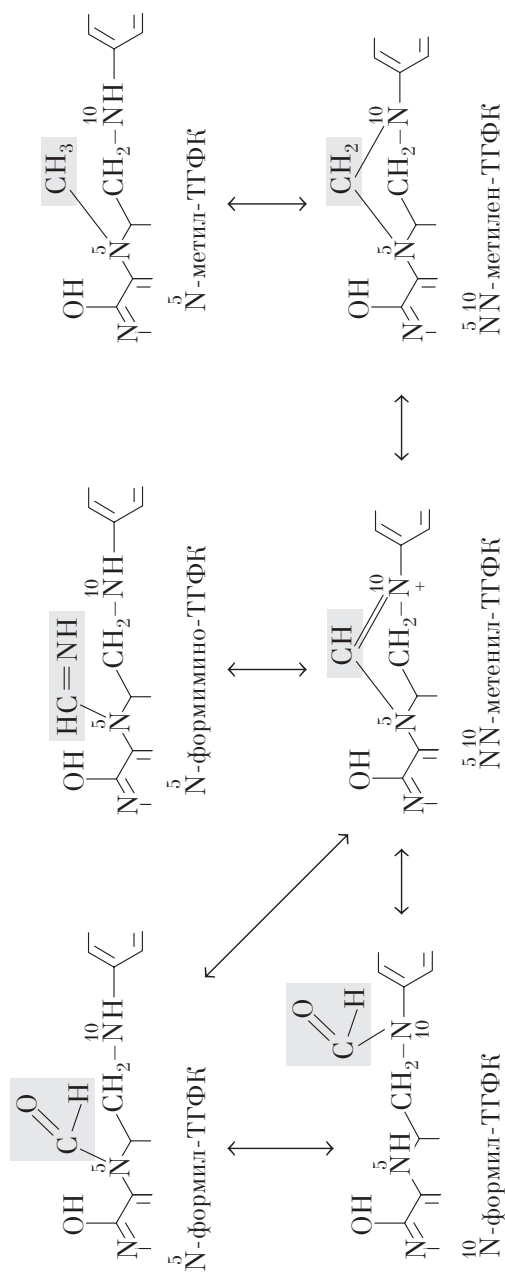


Рис. 14.6. Коферментные формы фолиевой кислоты и их взаимопревращения

и дезоксирибонуклеотидов, что вызывает угнетение синтеза ДНК и пролиферации (деления) кроветворных клеток. Как следствие нарушения эритропоэза в крови появляются мегалобласты — молодые клетки с низким содержанием ДНК. При этом имеет место понижение количества лейкоцитов (лейкопения), так как для их образования в костном мозге также необходим активный синтез ДНК.

Дефицит фолиевой кислоты приводит к повышению уровня гомоцистеина в крови. Во время беременности это может быть причиной развития внутриутробной гипоксии плода, а также более тяжелых последствий: появление дефектов нервной трубки, другие врожденные пороки развития плода (микроцефалия, спинномозговые грыжи, аномальное развитие лицевого черепа). В женских консультациях это учитывают и тщательно следят за тем, чтобы беременная женщина принимала фолиевую кислоту с профилактической целью.

Оценка обеспеченности организма. Об обеспеченности организма фолиевой кислотой можно судить по содержанию ее в плазме крови. Содержание фолиевой кислоты в моче не является достоверным критерием, однако можно определить содержание продуктов ее обмена (формиминоглутаминовой или уруканиновой кислоты).

Лекарственные препараты. В аптеках предлагается фолиевая кислота как в чистом виде в форме порошков, таблеток (в дозировке 100 мг, 400 мг), так и в сочетании с другими витаминами и микроэлементами в составе витаминно-минеральных комплексов.

14.7.7. Витамин B₁₂ (кобаламин)

Витаминами B₁₂ (кобаламинами) называют группу кобальтсодержащих биологически активных веществ. К ним относят цианокобаламин, гидроксокобаламин, метилкобаламин и аденозилкобаламин. В более узком смысле витамином B₁₂ называют цианокобаламин, так как именно в этой форме в организм человека поступает основное количество витамина B₁₂.

Структура витамина B₁₂ отличается от строения всех других витаминов своей сложностью и наличием в его молекуле кобальта (рис. 14.7). Молекулярную химическую структуру витамина B₁₂ установила английский биохимик Дороти Кроуфут-Ходжкин в 1956 г. по данным рентгеноструктурного анализа.

В молекуле B₁₂ центральный атом кобальта соединен с атомами азота четырех восстановленных пиррольных колец, образующих корриновое ядро. Коррин во многом похож на порфирины, входящие в состав гема, хлорофилла и цитохромов, но отличается от них тем, что два пиррольных цикла в составе коррина соединены между собой непосредственно, а не метиновым мостиком. Еще одна координационная связь соединяет кобальт с нуклеотидом. Последняя, шестая координационная связь кобальта остается свободной: именно по этой связи и присоединяется цианогруппа (цианокобаламин), гидроксильная группа (гидроксокобаламин), метильный (метилкобаламин) или 5'-дезоксаденозилный

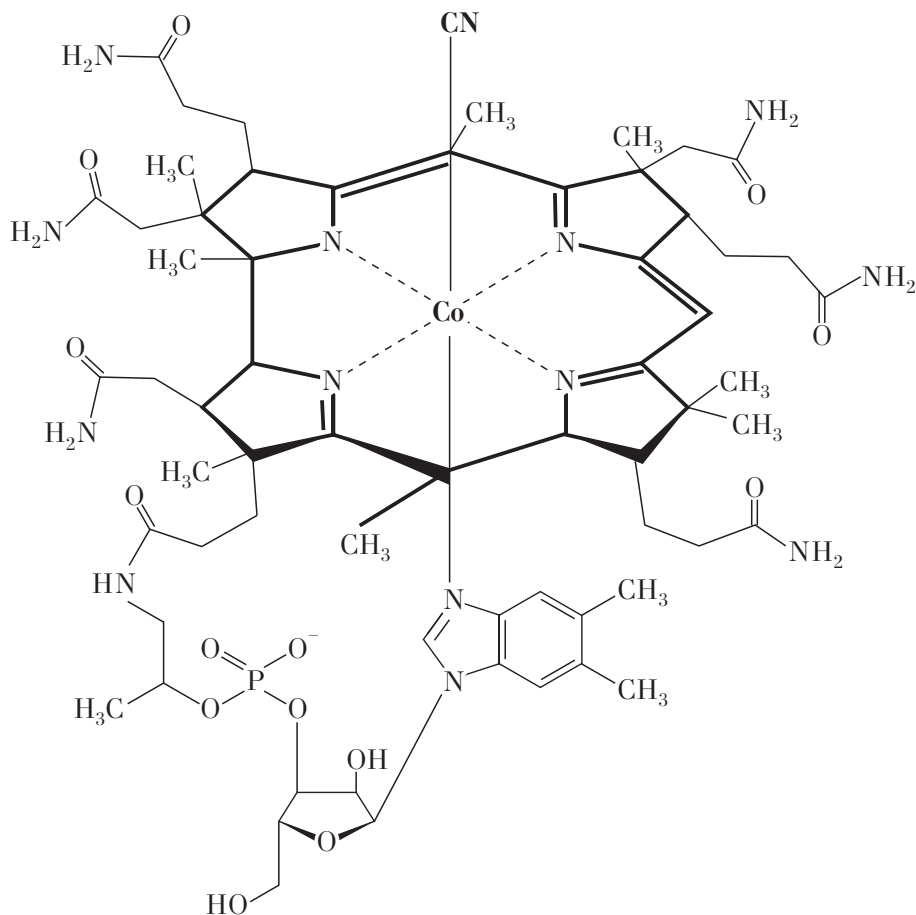


Рис. 14.7. Структура цианокобаламина (витамина B_{12})

остаток (дезоксиаденозилкобаламин) с образованием четырех вариантов витамина B_{12} .

Пищевые источники. Витамины группы B_{12} содержатся в печени животных, мясе, рыбе, крабах, креветках, сырах, яйцах, молоке. В растительной пище этот витамин отсутствует. Витамин B_{12} синтезируется исключительно микроорганизмами. У вегетарианцев, исключаящих из пищи мясные и молочные продукты, в течение 5–6 лет развивается B_{12} -дефицитная анемия.

Суточная потребность — 3 мкг.

Метаболизм. Parietalными клетками желудка синтезируется *внутренний фактор Кастла* — гликопротеин, необходимый для активного всасывания B_{12} в кишечнике. Известен еще один связывающий B_{12} белок — это R-протеин слюны (кобалофилин), предохраняющий его от разрушения желудочным соком. В двенадцатиперстной кишке протеазы высвобождают B_{12}

из комплекса с R-протеином, затем V_{12} связывается с внутренним фактором, и только в таком связанном виде распознается рецепторами поглощающих энтероцитов подвздошной кишки и всасывается. Примерно 1 % витамина V_{12} всасывается в кишечнике путем диффузии.

Транспорт кобаламина по крови осуществляется специфическими белками: транскобаламином I (α -глобулин с М.М. $\sim 120\,000$ а.е.м.) и транскобаламином II (β -глобулином с М.М. $\sim 35\,000$ а.е.м.). Из плазмы комплекс транскобаламин — V_{12} захватывается рецепторами клеток печени, поступает внутрь клетки, после чего V_{12} высвобождается, а транскобаламин разрушается в лизосомах. Частично V_{12} поглощается клетками селезенки и почек, несколько меньше — мышечной тканью. В печени и почках кобаламин превращается в свои коферментные формы.

Основным местом депонирования витамина V_{12} является печень (около 2 мг). Общие запасы кобаламина в организме взрослого человека составляют около 2–5 мг.

Метаболизм витамина происходит очень медленно. Выводится он желчью, в кишечнике основная его часть подвергается реабсорбции, т.е. ему свойственна энтерогепатическая циркуляция. Благодаря такой циркуляции витамин V_{12} может депонироваться в печени.

При поступлении витамина V_{12} в количестве, превышающем связывающую способность транспортирующих белков, его избыток выводится с мочой.

Биохимические функции. Витамин V_{12} входит в состав двух типов коферментов: метилкобаламина и 5'-дезоксаденозилкобаламина, которые используются в транспорте одноуглеродных фрагментов и метаболизме фолиевой кислоты.

Как и в случае фолиевой кислоты, метилкобаламин принимает участие в превращении гомоцистеина в метионин (рис. 14.8). Фермент переносит метильную группу с 5'-метил-ТГФК на гомоцистеин с образованием метионина. Описанная реакция служит примером тесной взаимосвязи между двумя витаминами — фолиевой кислотой и кобаламином.

Метилкобаламин принимает участие в образовании пиримидиновых и пуриновых нуклеотидов, нуклеиновых кислот.

Кофермент 5'-дезоксаденозилкобаламин необходим в процессах превращения пропионил-КоА в сукцинил-КоА (см. рис. 7.48 на с. 294). Эта реакция важна для катаболизма таких аминокислот, как метионин, треонин, валин,

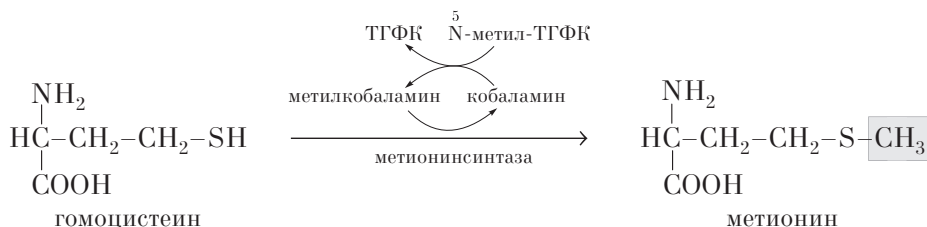


Рис. 14.8. Реакция образования метионина с участием метилкобаламина

лейцин, изолейцин, а также для β -окисления жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов (см. главу 7). Поэтому при его дефиците накапливается метилмалонил-КоА, определение уровня которого используется для диагностики гиповитаминоза B_{12} .

Гиповитаминоз. Дефицит кобаламина может быть следствием неправильного питания, вегетарианства, нарушения всасывания витамина, а также длительного приема некоторых лекарственных препаратов, в частности блокаторов H^+/K^+ -АТФазы (омепразол, лансопразол и др.).

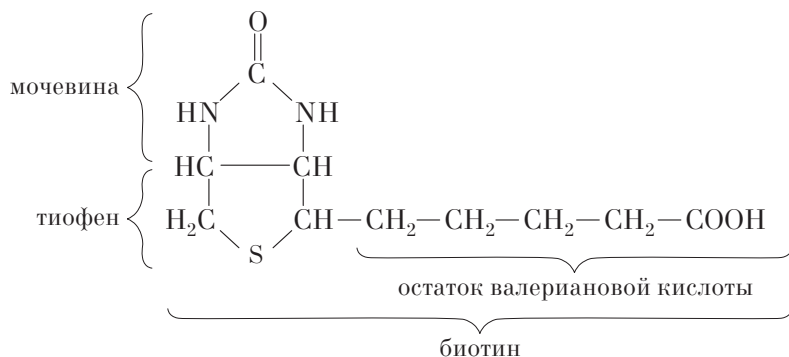
Недостаточность витамина B_{12} приводит к развитию *злокачественной макроцитарной анемии* (так называемой *пернициозной анемии Аддисона – Бирмера*). Помимо нарушения кроветворной функции, резко снижается кислотность желудочного сока, усугубляется деятельность нервной системы (фуникулярный миелоз). Последнее является следствием нарушения синтеза миелина. Повреждаются периферическая нервная система, спинной и головной мозг. Неврологические симптомы сводятся к парестезиям, онемению кистей и ступней, неустойчивости походки, ослаблению памяти. Могут наблюдаться спутанность сознания и галлюцинации.

Оценка обеспеченности организма кобаламином. Для этой цели служит определение содержания витамина в сыворотке крови, либо определение экскреции метилмалоновой кислоты.

Лекарственные препараты витамина B_{12} . В медицинской практике используют цианокобаламин.

14.7.8. Витамин Н (биотин)

Биотин (от греч. *bios* — жизнь) был выделен в 1935 г. из яичного желтка. Молекула витамина Н состоит из имидазольного и тетрагидротиофенового колец, боковая цепь представлена валериановой кислотой.



Биотин плохо растворяется в воде, но хорошо в спирте. Он устойчив при нагревании и в растворах слабых щелочей и оснований.

Пищевые источники. Витамином Н богаты бобовые, а также цветная капуста, грибы; из продуктов животного происхождения — печень, почки, молоко, яичный желток.

Биотин синтезируется микрофлорой кишечника человека, что в значительной мере удовлетворяет потребности организма.

Суточная потребность составляет 150–200 мкг.

Метаболизм. С растительной пищей витамин Н поступает преимущественно в свободном состоянии. В кровеносном русле биотин переносится альбумином и аккумулируется главным образом в печени.

Выводится биотин с мочой и калом, причем с калом его выводится больше, чем поступает с пищей. Объясняется это способностью микрофлоры кишечника синтезировать биотин.

Биохимические функции. Витамин Н способствует усвоению тканями ионов бикарбоната и активирует реакции карбоксилирования и транскарбоксилирования. Местом карбоксилирования является атом азота в составе имидазольного кольца. Связываясь с ионом гидрокарбоната (HCO_3^-), биотин превращается в карбоксибиотин и становится коферментом. В этом коферменте для проявления своей активности нуждаются следующие ферменты:

1) *пируваткарбоксилаза* — катализирует АТФ-зависимое образование оксалоацетата из пирувата и HCO_3^- . Эта реакция является одной из важнейших в глюконеогенезе. Кроме того, в клетках с помощью этой реакции восполняется запас оксалоацетата, необходимого для функционирования цикла Кребса (анаэробная реакция);

2) *ацетил-КоА-карбоксилаза* — катализирует первую реакцию биосинтеза жирных кислот. В ходе нее происходит перемещение карбоксильной группы бикарбоната на ацетил-КоА с образованием малонил-КоА;

3) *пропионил-КоА-карбоксилаза* — участвует в окислении жирных кислот с нечетным числом атомов углерода. При этом происходит стереоспецифический перенос активированной карбоксильной группы от карбоксибиотина к пропионил-КоА с образованием метилмалонил-КоА (см. рис. 7.48 на с. 294).

Антивитамины. Авидин — гликопротеин белка куриного яйца, образует прочный комплекс с биотином, который не может расщепляться пищеварительными ферментами. Поэтому при частом употреблении сырых яиц прекращается всасывание присутствующего в пище биотина. Способность молекул авидина и биотина специфически связываться друг с другом используется в молекулярной биологии.

Гиповитаминоз. Для биотинового гиповитаминоза характерно поражение кожных покровов (дерматит), жирная себорея (повышенное выделение нейтральных липидов на поверхность кожи лица и волосистой части головы), алопеция (очаговое облысение), сонливость, усталость. Часто отмечаются боли в мышцах. К гиповитаминозному состоянию может привести прием антибиотиков и лечение цитостатиками, которые угнетают микрофлору кишечника.

Конечными продуктами деградации витамина С являются щавелевая, треоновая, ксилоновая и ликсоновая кислоты. Аскорбат и продукты его распада экскретируются с мочой.

Биологическая роль. Витамин С участвует в окислительно-восстановительных процессах, свертывании крови, регенерации тканей, метаболизме ароматических аминокислот, иммунных реакциях, гидроксилировании веществ; повышает устойчивость организма к инфекциям; уменьшает сосудистую проницаемость; снижает потребность в витаминах В₁, В₂, А, Е, фолиевой кислоте, пантотеновой кислоте.

Витамин С участвует во всасывании *железа* из кишечника (см. главу 15) и освобождении железа из комплекса с транспортным белком крови — трансферрином, облегчая поступление этого металла в ткани.

Витамин С может включаться в работу дыхательной цепи митохондрий, являясь *донором электронов* для цитохрома *c*.

Очень важную роль играет аскорбат в реакциях *гидроксилирования*. Пролин гидроксилаза с участием витамина С, ионов железа, α -кетоглутарата и кислорода катализирует гидроксилирование аминокислоты пролина в составе «незрелого» коллагена. ОН-группы оксипролина участвуют в стабилизации структуры, формируя водородные связи между цепями триплетной спирали зрелого коллагена. Витамин С нужен также для образования оксилизина в коллагене. Остатки оксилизина в коллагене служат для образования участков связывания с полисахаридами.

С участием витамина С происходит гидроксилирование триптофана и превращение его в 5-гидрокситриптофан в ходе синтеза серотонина, реакции гидроксилирования при биосинтезе гормонов корковой и мозговой части надпочечников, гидроксилирование п-гидроксифенилпирувата и превращение его в гомогентизиновую кислоту. Витамин С необходим для биосинтеза карнитина.

Витамин С активно участвует в *обезвреживании токсинов, ксенобиотиков*, осуществляемом микросомной системой окисления. В составе этой оксигеназной системы витамин С играет роль прооксиданта, т.е. обеспечивает образование свободных радикалов кислорода.

Взаимодействие аскорбата с ионами железа или меди в присутствии пероксида водорода вызывает мощный прооксидантный эффект, поскольку при этом образуется гидроксильный радикал (ОН•), инициирующий реакции ПОЛ. Усиление прооксидантного действия витамина С приводит к нежелательным последствиям, особенно в условиях «перегрузки» организма железом.

В плазме крови и тканях ионы железа и меди находятся в связи с транспортными и депонирующими белками (церулоплазмином, трансферрином, ферритином и др.), которые препятствуют развитию свободнорадикальных цепных реакций, катализируемых этими металлами и аскорбиновой кислотой.

Витамин С занимает доминирующее положение во *внеклеточной антиоксидантной защите*, значительно превосходя в этом отношении глутатион. Антиоксидантная функция аскорбиновой кислоты объясняется ее способностью

легко отдавать два атома водорода, используемых в реакциях обезвреживания свободных радикалов. Важной функцией аскорбата является обезвреживание свободного радикала токоферола (витамина Е), благодаря чему предупреждается его окислительная деструкция.

Витамин С регулирует иммунологические реакции, активируя синтез антител, С₃-компонента комплемента, интерферона. Он способствует фагоцитозу, повышая сопротивляемость организма инфекциям.

Антивитамины. Ацетилсалициловая кислота, пероральные контрацептивы, щелочное питье снижают всасывание и усвоение аскорбиновой кислоты и повышают ее выведение с мочой. Ацетилсалициловая кислота снижает всасывание аскорбиновой кислоты на 30 %.

Гиповитаминоз. Уже незначительный дефицит витамина С проявляется ощущением усталости, снижением аппетита, подверженностью простудным заболеваниям. Характерно появление синяков (кровоизлияний) на коже. Кровоточивость десен — уже достаточно позднее проявление гиповитаминоза С.

Выраженный дефицит витамина С приводит к *цинге* (скорбуту). Главным симптомом заболевания является нарушение проницаемости капилляров, обусловленное недостаточностью гидроксилирования пролина и лизина в коллагене, и синтеза хондроитинсульфатов. Отсюда понятно происхождение таких клинических проявлений гиповитаминоза, как кровоточивость десен, расшатывание зубов, отеки и боли в суставах, поражение костей, бледность кожных покровов, нарушение заживления ран. Мышечная слабость является следствием быстро развивающейся недостаточности карнитина, обеспечивающего β -окисление жирных кислот и связанную с этим процессом энергопродукцию в миоцитах.

При гиповитаминозе С развивается *железододефицитная анемия* из-за нарушения всасывания железа и использования его запасов при синтезе гемоглобина. При недостатке аскорбата снижается также участие *фолиевой кислоты* в пролиферации костномозговых клеток, что усугубляет симптоматику анемии.

Гиповитаминоз С всегда сопровождается ослаблением иммунозащитных сил организма, а также усилением реакций свободнорадикального окисления.

Гипервитаминоз. Аскорбиновая кислота в больших дозах (1–10 г в сутки) может вызвать диарею, повышение всасывания железа, риск образования оксалатных камней в почках. При гипервитаминозе увеличивается артериальное давление, нарушается питание миокарда, возникает чувство жара, бессонница, снижается острота зрения. У беременных женщин может произойти выкидыш. Длительное применение больших доз аскорбиновой кислоты угнетает β -клетки островков Лангерганса (риск сахарного диабета), повышает концентрацию протромбина крови, что предрасполагает к тромбообразованию.

Оценка обеспеченности организма аскорбиновой кислотой. Проводится путем определения содержания витамина в моче. Возможно проведение нагрузочного теста. Для этого определяют концентрацию витамина С в моче

до и после приема 500 мг витамина С. При этом используется моча, собранная в течение последующих 6 часов. В норме за этот период с мочой должно выделиться около 500 мг витамина.

14.8. Межвитаминные взаимодействия

Под взаимодействием лекарственных веществ или биологически активных веществ, в том числе витаминов, понимают случаи, когда одновременное применение двух и более препаратов дает эффект, отличающийся от такового вследствие употребления каждого из них в отдельности. Отношения синергизма и антагонизма между витаминами необходимо учитывать при создании витаминных комплексных препаратов.

Межвитаминные взаимоотношения могут выражаться:

- 1) в непосредственном взаимодействии витаминов друг с другом;
- 2) влиянии одного витамина на образование коферментной формы другого;
- 3) совместном участии нескольких витаминов в реализации какой-либо определенной функции.

Тесным синергичным антиоксидантным действием обладают *витамины С, Е и А*. Аскорбиновая кислота стабилизирует витамин Е (который легко разрушается), а витамин Е усиливает антиоксидантное действие витамина С. Помимо токоферола, синергистом действия аскорбата является витамин А. Подробно пример этого взаимодействия рассмотрен в п. 14.7.9.

Примером второго типа межвитаминных взаимодействий может служить особая роль *рибофлавина* в реализации функций других витаминов. Поскольку витамин В₂ необходим для образования активных форм витаминов В₆, В₉, D и синтеза ниацина из триптофана, его дефицит неизбежно нарушит функцию других витаминов и приведет к развитию вторичной их недостаточности даже при достаточном поступлении с пищей.

Витамины РР, В₆, С и В₁₂ способствуют образованию коферментной формы фолиевой кислоты, и при их недостатке нарушатся функции фолатов.

Примеры взаимодействия третьего типа особенно многочисленны, так как большинство функций клетки обеспечивается синергичной работой нескольких витаминов. Так, пролиферативная активность клеток крови поддерживается *витаминами В₉, В₁₂, В₆, С*; образование родопсина в сетчатке глаза — *витаминами А, В₂, В₆, РР*; регуляция проницаемости капилляров — *витаминами С и Р* (рутином).

Чрезвычайно важно совместное функционирование *витаминов В₁, В₂, РР, пантотеновой кислоты* в составе мультиферментных комплексов дегидрогеназ α -кетокислот.

Взаимодействие *витаминов В₁₂, В₉ и В₆* обеспечивает поддержание гомеостаза гомоцистеина. Напомним, что его накопление является одним из тератогенных факторов, а также факторов риска развития ишемической болезни сердца.

14.9. Витаминоподобные вещества

Витаминоподобные вещества — группа условно заменимых факторов питания, напоминающих по биологическому действию витамины. К ним обычно относят холин, инозитол, карнитин, S-метилметионин, липоевую кислоту, пангамовую кислоту, оротовую кислоту, парааминобензойную кислоту, биофлавоноиды и др.

Инозитол — шестиатомный циклический спирт, хорошо растворимый в воде. Он входит в состав фосфолипидов (фосфатидилинозитолов), содержащихся во всех тканях. Особенно богата ими нервная ткань. Инозитол-1,4,5-трифосфат (ИТФ) является посредником в действии на клетку гормонов. ИТФ способствует высвобождению ионов кальция из кальцисом. Витаминными свойствами обладает *фитин* — соль инозитфосфорной кислоты.

Карнитин — небелковая аминокислота, поступает в организм с продуктами питания и синтезируется в печени из аминокислоты лизина. Основная роль карнитина — участие в транспорте жирных кислот через митохондриальную мембрану внутрь митохондрий. Введение карнитина животным повышает образование энергии в митохондриях, стимулирует регенераторные процессы в миокарде. Имеются данные, что карнитин стимулирует внешнесекреторную функцию поджелудочной железы, активизирует сперматогенез.

S-метилметионин называют «противоязвенным» фактором или витамином U (от лат. *ulcus* — язва). Подобно метионину, S-метилметионин является донором метильных групп в реакциях синтеза холина и креатина. Показано его участие в синтезе метионина и некоторых других соединений, нуждающихся в метильных группах. Он оказывает липотропное действие на печень.

Холин — аминоэтиловый спирт, содержащий три метильные группы у атома азота. Он является метаболическим предшественником важного нейромедиатора — ацетилхолина.

Фосфохолин, активируясь с помощью ЦДФ, используется для синтеза фосфатидилхолина (лецитина). Холин необходим для синтеза другого фосфолипида — сфингомиелина. Он также является донором метильных групп в реакциях трансметилирования, например в реакциях синтеза метионина.

Основная биохимическая функция **пангамовой кислоты** — участие в процессах метилирования и трансметилирования в клетках. Как донор метильных групп пангамовая кислота участвует в синтезе метионина, холина, креатина, некоторых стероидных гормонов и катехоламинов.

Пангамовая кислота активирует аэробные окислительные процессы, что обуславливает ее антигипоксический эффект. Это определяет ее важность для организма и использование как лекарственного средства.

Биофлавоноиды — разнообразная группа растительных полифенольных соединений. В нее входят рутин, цитрин, гесперидин, кахетин, ресвератрол и др. В настоящее время известно около 6000 биофлавоноидов. Они содержатся в листьях, цветах, плодах, корнях, древесине многих растений. Именно

присутствие определенных флавоноидов часто объясняет лекарственные свойства некоторых растений. В клетках животных и человека флавоноиды не синтезируются; присутствие флавоноидов в тканях полностью зависит от потребления с пищей растительных продуктов.

Интерес к флавоноидам обусловлен не только возможным положительным действием этих веществ на организм, но и перспективой получения их синтетических производных, обладающих лекарственным действием. На основе флавоноидов возможно создание новых высокоактивных лекарственных препаратов, обладающих противовоспалительной, антиканцерогенной, противовирусной и (или) бактерицидной активностью. В настоящее время на основе флавоноидов создаются и испытываются новые антибиотики, а также агенты, способствующие усилению действия других лекарств благодаря способности флавоноидов препятствовать проявлению лекарственной устойчивости.

Водно-минеральный обмен

Жизнь зародилась в воде мирового океана и часть этого океана по мере эволюции стала внутренней средой организмов, при этом максимально используются ее необычные свойства, отличающие воду от большинства других жидкостей.

Вода — единственная из жидкостей, которая может находиться в разных физических состояниях: твердом, жидком, газообразном (лед, жидкость, пар) в узком диапазоне температур. При таянии льда его плотность увеличивается (почти у всех остальных веществ при плавлении плотность уменьшается). При охлаждении воды плотность падает. Благодаря этому жизнь может поддерживаться в замерзающих водоемах. Когда температура падает ниже 4 °С, более холодная вода, как менее плотная, остается на поверхности и замерзает, а подо льдом сохраняется положительная температура.

Вода мирового океана содержала разнообразные минеральные соединения. Одни из них, присутствующие в организме в больших количествах (больше 50 мг/кг массы тела), стали называть **макроэлементами**. Им принадлежит важная роль в регуляции распределения и перемещения воды между клетками и межклеточными пространствами организма, создании электрических потенциалов на поверхности клеточных мембран, обеспечении механизмов возбудимости тканей и другие функции.

Другая группа минеральных веществ получила название **микроэлементы**. К этой группе относят минеральные соединения, содержащиеся в организме в количестве менее 50 мг/кг массы тела. Они являются структурными компонентами белков, входят в состав активных центров ферментов, выполняют некоторые специфические функции.

Водно-минеральным обменом называется совокупность процессов поступления воды и электролитов в организм, распределения их во внутренней среде и выделения из организма.

15.1. Роль воды в клетке

Вода — хороший растворитель *полярных* молекул. Минеральные соли, моносахариды, аминокислоты и другие полярные соединения хорошо растворяются в воде, что обеспечивает их транспорт по крови и участие во внутриклеточных

процессах. Вода — плохой растворитель для *неполярных* и *дифильных* молекул, что широко использовалось в ходе эволюции при формировании клеточных структур и границ компартментов внутри клеток. Она участник химических реакций, играющих важную роль в процессах жизнедеятельности.

Каждый из двух атомов водорода в молекуле воды образует ковалентную связь (общая пара электронов) с атомом кислорода. Взаимное расположение возникающих при этом двух электронных пар способствует формированию V-образной формы молекулы воды. Оставшиеся две электронные пары атома кислорода, не участвующие в образовании химических связей (неподеленные пары), придают ему частичный отрицательный заряд (в вершине V-образной структуры). Более электроотрицательный атом кислорода стремится притянуть электроны атомов водорода, поэтому на ядрах обоих атомов водорода (протонах) локализуются частичные положительные заряды.

Хотя молекула воды в целом электрически нейтральна, ее частичные отрицательный и положительный заряды пространственно разделены, что приводит к возникновению у нее электрического дипольного момента. Благодаря такому разделению зарядов две соседние молекулы воды могут притягиваться друг к другу за счет сил электростатического взаимодействия между частичным отрицательным зарядом, локализованным на атоме кислорода одной молекулы воды, и частичным положительным зарядом, локализованным на атоме водорода другой молекулы. Это **водородная связь**.

Структура молекулы воды по форме подобна тетраэдру, что предполагает возможность образования четырех водородных связей каждой молекулой воды (рис. 15.1). В жидкой воде эти связи быстро образуются и быстро разрушаются. В своей кристаллической структуре (лед) молекулы воды образуют максимально возможное число водородных связей.

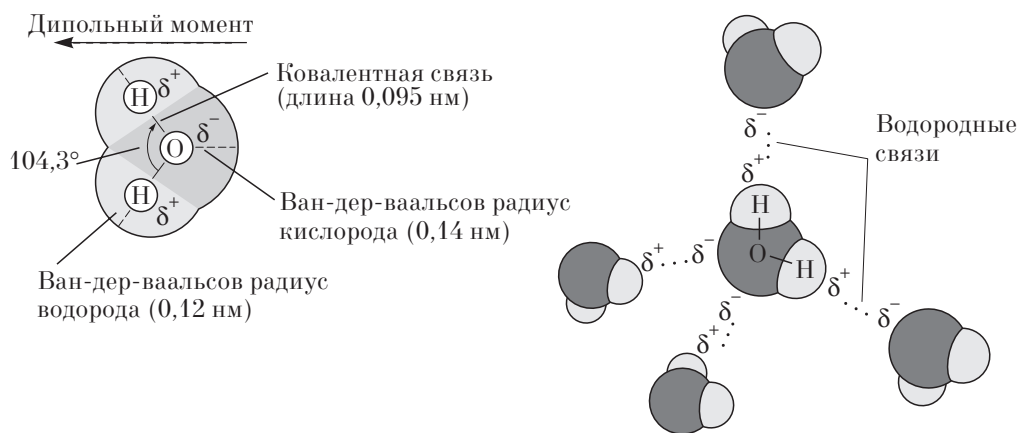


Рис. 15.1. Структура молекулы воды и ее участие в образовании водородных связей (ван-дер-ваальсов радиус — эффективный радиус атома, характеризующий минимально допустимые контакты атомов, принадлежащих разным молекулам)

Способность формировать водородные связи с другими молекулами — одна из причин хорошей растворимости в воде многих органических молекул. Атомы кислорода альдегидов, кетонов и амидов обладают парами электронов, которые могут притягивать водороды воды. Спирты и амины могут формировать водородные связи с водой, используя свои атомы водорода и кислорода.

Свойства молекулы воды как диполя делают ее хорошим растворителем для диссоциирующих молекул. Так, кристаллическая решетка NaCl, стабилизированная за счет сильного электростатического притяжения между чередующимися друг с другом положительно и отрицательно заряженными ионами, при помещении в воду распадается благодаря тому, что биполярные молекулы воды начинают очень сильно притягивать ионы Na^+ и Cl^- , извлекая их из решетки. В результате эти ионы в гидратированной форме постепенно переходят в раствор, а заряженные группы окружаются оболочкой из диполей молекул воды (гидратной оболочкой).

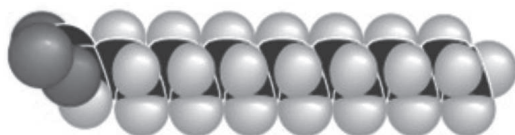
Особое место занимает взаимодействие воды и молекул, содержащих как полярные (*гидрофильные* — букв. любят воду), так и неполярные (*гидрофобные* — букв. боятся воды) группы. Их часто называют *амфифильными* или *дифильными* молекулами. Мыла или соли высших жирных кислот — классический пример таких молекул. Их длинная углеводородная цепь гидрофобна и с водой не взаимодействует, что не позволяет им создать истинный молекулярный раствор. Однако при перемешивании такие молекулы легко формируют структуры, называемые *мицеллами*. В них гидрофильные отрицательно заряженные карбоксильные группы «поворачиваются» к водной фазе и взаимодействуют с молекулами воды, а гидрофобные неполярные углеводородные цепи располагаются внутри структуры. Мицеллы, каждая из которых объединяет сотни или даже тысячи таких молекул, равномерно суспендированы в воде, так как на поверхности несут отрицательный заряд и отталкиваются друг от друга.

Сближение неполярных групп углеводородных цепей заставляет взаимодействовать между собой их электронные оболочки, что приводит к образованию слабого электростатического взаимодействия, названного силами гидрофобного взаимодействия. Именно это взаимодействие стабилизирует мицеллы.

Многие компоненты живых клеток (например, фосфолипиды, белки и нуклеиновые кислоты) обладают дифильными свойствами. Поэтому в водных растворах неполярные, гидрофобные участки их молекул изолируются от водной фазы и стабилизируются силами гидрофобного взаимодействия, которые иногда называют гидрофобными связями. На рис. 15.2 показан механизм образования мицеллы с участием пальмитиновой кислоты.

Такое поведение неполярных молекул связано в первую очередь со стремлением молекул воды формировать льдоподобные организованные структуры вокруг неполярных групп, понижающие суммарную энтропию системы. Стремление к формированию минимума организованных структур способствует глобу-

a Пальмитат натрия



б

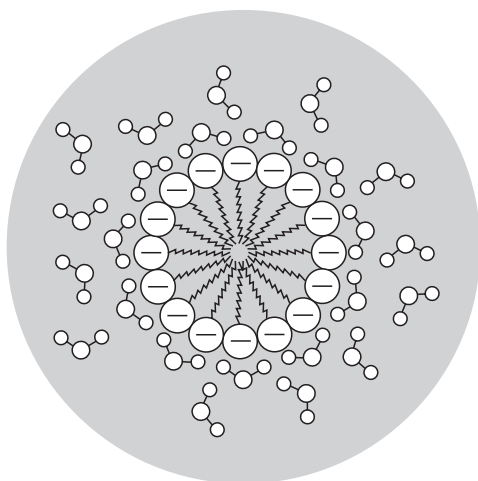
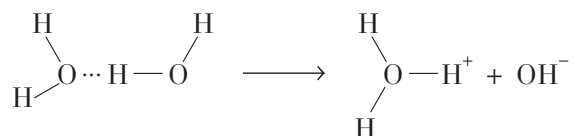


Рис. 15.2. Образование мицелл:

a — структура дифильного липида; *б* — мицелла

лярной организации (шарик — минимум соприкосновения с водой) неполярных молекул в водном окружении.

Молекулы воды диссоциируют с образованием H^+ и иона OH^- :



После диссоциации H^+ гидратируется с образованием иона H_3O^+ .

Растворам кислот, щелочей и нейтральных соединений соответствует определенное соотношение $[H^+]$ и $[OH^-]$:

- $[H^+] = [OH^-]$ — нейтральная реакция среды;
- $[H^+] > [OH^-]$ — кислая реакция среды;
- $[H^+] < [OH^-]$ — щелочная реакция среды.

Для характеристики реакции среды пользуются значением концентрации H^+ -ионов, которое для упрощения логарифмируют. Отрицательный десятичный логарифм концентрации H^+ -ионов обозначается рН. Например, $[H^+] = 10^{-7}$ моль/л; $\lg[H^+] = -7$; $-\lg[H^+] = \text{pH } 7$. Выражение рН 7,0 означает, что в данном растворе концентрация ионов H^+ составляет 10^{-7} моль/л; значение рН 8,6 соответствует концентрации $10^{-8,6}$ моль/л ионов H^+ .

Вещества, которые полностью диссоциируют в воде с образованием ионов, называют **сильными электролитами**. Термин «электролит» описывает вещества, образующие ионы в растворе и тем самым увеличивающие электрическую проводимость раствора. К ним относятся большинство солей ($NaCl$, K_2SO_4), сильные кислоты (HCl) и сильные основания ($NaOH$). Кислоты являются протонными донорами, а основания — акцепторами протонов. У сильных электролитов в воде сродство ионов друг к другу чрезвычайно низкое, и они находятся в полностью диссоциированном состоянии. Вещества с небольшой тенденцией диссоциировать с образованием ионов в растворе называют **слабыми электролитами**.

Поддерживают ионное равновесие в воде **буферные системы** — комбинации веществ, которые в состоянии поддерживать постоянное значение рН раствора при добавлении ограниченного количества ионов H^+ или OH^- . Такая система состоит из смеси слабой кислоты и конъюгированного основания (например, уксусная кислота и ионы ацетата $[CH_3COO^-]$ или H_2CO_3 и HCO_3^- — бикарбонатная система) либо смеси слабого основания и соли, имеющей с этим основанием общий катион (например, смесь гидроксида аммония NH_4OH с хлоридом аммония NH_4Cl).

Буферным системам принадлежит важная роль в поддержании рН на постоянном уровне в крови (подробнее см. в п. 16.6.1).

15.2. Обмен воды

В организме человека выделяют два главных водных пространства (табл. 15.1):

- *внутриклеточное* — представляет собой сумму водного содержимого каждой клетки организма;
- *внеклеточное* — включает жидкость, находящуюся вне клеток.

Соответственно пространствам различают *внутриклеточную* и *внеклеточную* жидкость. Первая составляет 2/3, а вторая — 1/3 всего количества воды в организме. Внеклеточная жидкость локализована внутри сосудов и в межклеточном интерстициальном пространстве.

Таблица 15.1

Неоднородность воды в жидкостных пространствах организма

Пространство	Форма воды
Внутриклеточная вода (<i>интрацеллюлярная жидкость</i>)	Связанная с гидрофильными органическими и неорганическими веществами. Адгезированная на поверхности коллоидных частиц. Свободная наиболее лабильная часть воды, количество которой быстро меняется в норме и при патологических состояниях
Внеклеточная вода (<i>экстрацеллюлярная жидкость</i>)	Внутрисосудистая жидкость (плазма крови). Межклеточная (интерстициальная) жидкость. Трансцеллюлярная жидкость, находящаяся в различных пространствах: <ul style="list-style-type: none"> • спинномозговая жидкость; • синовиальная жидкость (суставы, сухожилия); • желудочный и кишечный соки; • жидкость полостей капсулы клубочка и канальцев (первичная моча); • жидкость серозных полостей (плевральной, перикарда, брюшной и др.); • вода камер глаза

Вода неравномерно распределена в отдельных органах: от 20 % в жировой ткани до 83–90 % в почках и крови. У девочек и женщин в связи с большим количеством жировой клетчатки, в которой мало воды, содержание воды в организме ниже, чем у мальчиков и мужчин. Следует также отметить, что чем моложе организм, тем больше удельный вес воды в его составе (табл. 15.2).

Таблица 15.2

Распределение воды в жидкостных пространствах у людей разного возраста, % от массы тела

Жидкость	Возраст				
	Новорожденный	1–6 мес.	6 мес. — 1 год	1–5 лет	Взрослый
Общая вода	75–85	70	70	65–70	60–65
Внутриклеточная	30–40	30	35	35–40	40–45
Интерстициальная	32–44	34,5	30	25	17
Плазма	6	5,5	5	5	5

Вода в организме *пополняется* из двух источников:

- метаболизм — в ходе катаболических превращений за сутки в среднем образуется 400 мл воды;
- пища — за сутки объем выпитой взрослым человеком воды должен составлять не менее 1,5 л или 25–30 мл/кг массы. Еще до 1,5 л воды поступает с напитками, жидкой и твердой пищей. У ребенка первого года жизни суточная потребность в воде значительно выше и составляет 100–165 мл/кг массы.

Выведение воды из организма также осуществляется несколькими путями:

- с выдыхаемым воздухом за сутки выделяется в среднем 400 мл. Эта величина может возрастать при глубоком дыхании, дыхании сухим воздухом, при гипервентиляции, искусственной вентиляции легких;
- потери через кожу могут составлять от 500 мл/сут (так называемые «неощутимые» потери) до 2,0 л/ч (потоотделение при повышении температуры тела, физической работе);
- через кишечник из организма выводится 100–200 мл/сут; при рвоте, диарее это количество возрастает;
- с мочой (через почки) у взрослого человека покидает организм до 1000–1500 мл/сут.

В нормальных условиях вода из организма выделяется в количестве, соответствующем объему принимаемой жидкости. Основной силой, обеспечивающей перемещение воды из одного пространства в другое, является изменение осмотического давления в соответствующем секторе. Прием, потеря или ограничение потребления воды, усиленное потребление солей или их дефицит, изменение интенсивности метаболизма — всё это способно менять объем и состав жидкостей организма. Обычно потребность в воде определяется количеством выводимой жидкости.

15.3. Регуляция водно-минерального обмена

Важнейшими параметрами водно-солевого гомеостаза являются осмотическое давление, pH, объем внутриклеточной и внеклеточной жидкости. Изменение этих параметров может привести к изменению артериального давления (АД), ацидозу или алкалозу, дегидратации и отекам тканей. В тонкой регуляции водно-солевого баланса принимают участие антидиуретический гормон, альдостерон (см. п. 13.12.7) и предсердные натрийуретические факторы (ПНФ).

Антидиуретический гормон (АДГ), или **вазопрессин**, — пептид с молекулярной массой около 1100 Да, содержащий 9 аминокислот, соединенных одним дисульфидным мостиком. АДГ синтезируется в нейронах гипоталамуса в виде предшественника препогормона, который поступает в аппарат Гольджи и превращается в прогормон. В составе нейросекреторных гранул прогормон переносится в нервные окончания задней доли гипофиза (нейрогипофиз). Во время транспорта гранул происходит процессинг прогормона, в результате чего он расщепляется на зрелый гормон и транспортный белок нейрофизин.

Гранулы, содержащие зрелый АДГ и нейрофизин, хранятся в терминальных расширениях аксонов в задней доле гипофиза, из которых секретируются в кровоток при соответствующей стимуляции. Повышение концентрации ионов натрия и увеличение осмотического давления внеклеточной жидкости увеличивают секрецию АДГ. Снижение потребления воды, потеря воды при сильном потоотделении или прием большого количества соли оказывают влияние

на осморецепторы гипоталамуса, которые генерируют нервные импульсы, действующие на заднюю долю гипофиза, и вызывают высвобождение АДГ. Такой же эффект оказывают барорецепторы предсердий. Изменение осмолярности всего на 1 % приводит к заметным изменениям секреции АДГ.

Рецепторы АДГ относятся к семейству рецепторов, сопряженных с тримерными G-белками. Различают два типа таких рецепторов: V_1 и V_2 .

Рецепторы V_2 (группа G_s) расположены главным образом на базолатеральной мембране клеток собирательных трубочек и дистальных канальцев, которые относительно непроницаемы для молекул воды. Связывание АДГ с V_2 -рецепторами стимулирует аденилатциклазную систему и активирует ПкА, которая катализирует фосфорилирование аквапоринов-2, обычно встроенных в мембраны везикул, расположенных в цитозоле (рис. 15.3). Аквапорин-2 перемещается к апикальной мембране собирательных канальцев, встраивается в нее, образуя водные каналы. Это обеспечивает избирательную проницаемость мембраны для клеток воды, которые свободно диффундируют в клетки почечных канальцев и затем поступают в интерстициальное пространство. Результатом действия является усиление реабсорбции воды из почечных канальцев и снижение объема выделяемой мочи (антидиуретический эффект). В отсутствие АДГ вода не реабсорбируется и может выделяться в количестве, превышающем 20 л/сут.

Рецепторы типа V_1 относятся к группе G_{α_q} -рецепторов и встроены в мембраны гладкомышечных клеток сосудов. Взаимодействие АДГ с рецептором V_1 вызывает активирование фосфолипазы С, которая катализирует гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата в составе цитозольной мембраны с образованием инозитолтрифосфата и диацилглицерола (см. п. 13.12.3). Инозитолтри-

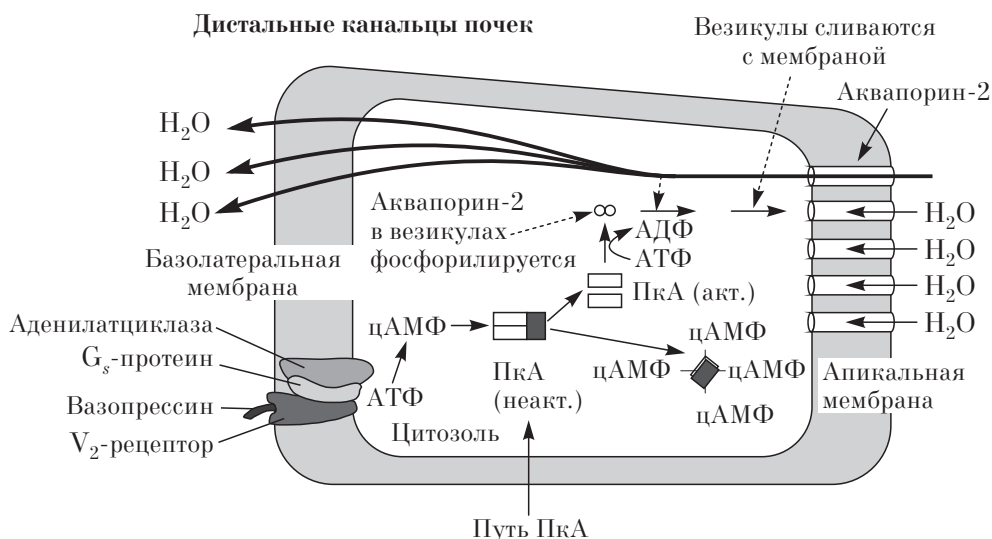


Рис. 15.3. Механизм действия вазопрессина на клетки дистальных канальцев почек

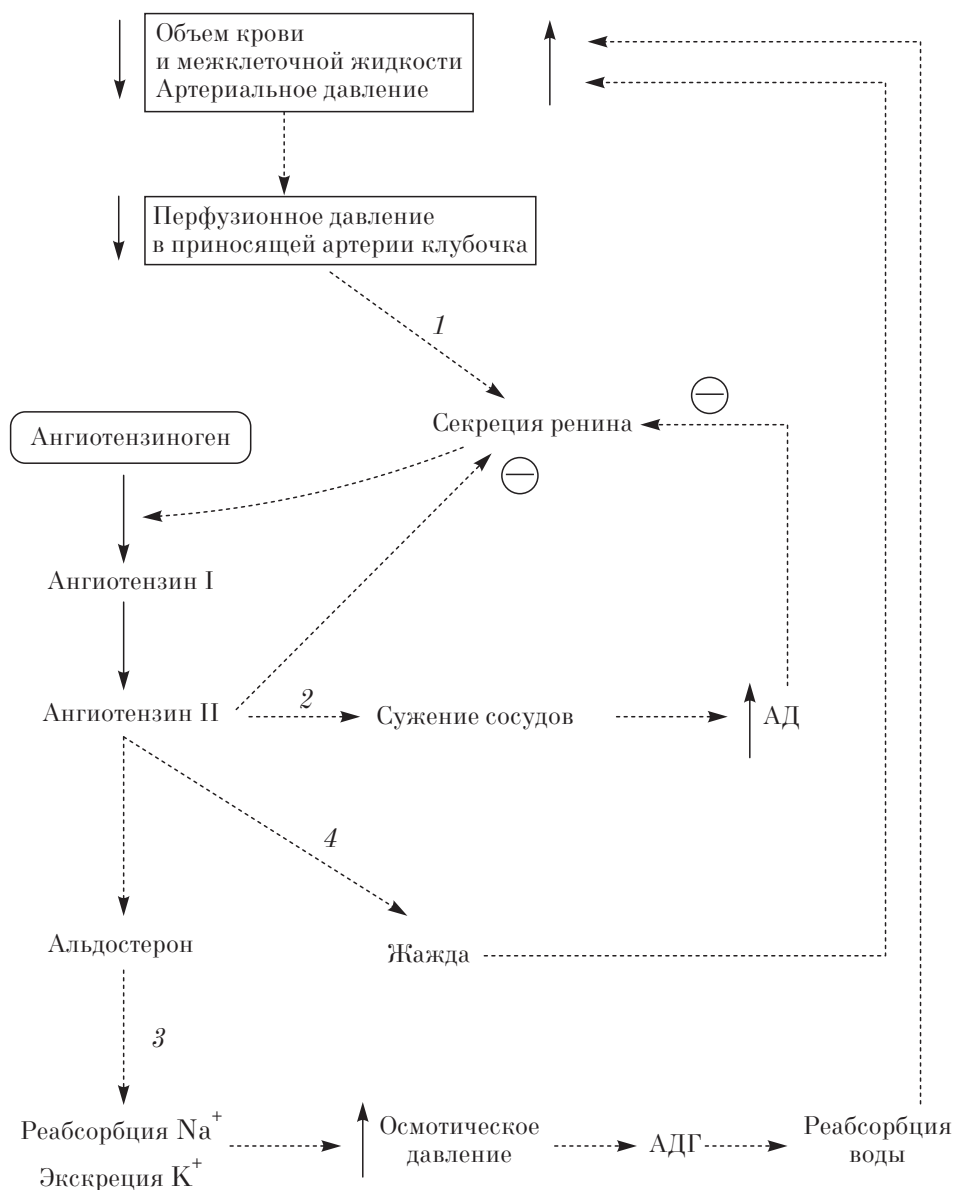


Рис. 15.4. Схема восстановления объема крови при кровопотере и обезвоживании организма:

1 — уменьшение объема жидкости и снижение АД стимулируют ренин-ангиотензиновую систему; 2 — ангиотензин II вызывает сужение сосудов, что временно поддерживает АД; 3 — альдостерон повышает реабсорбцию натрия, что способствует секреции вазопрессина и усилению реабсорбции воды; 4 — ангиотензин II вызывает также чувство жажды, что обеспечивает повышение объема жидкости в организме

фосфат является лигандом рецепторов кальциевых каналов ЭР. Он стимулирует высвобождение Ca^{2+} в цитозоль, что вызывает сокращение гладкомышечного слоя сосудов. Этот эффект АДГ проявляется при высокой концентрации гормона.

Поскольку сродство АДГ к рецептору V_2 выше, чем к рецептору V_1 , при физиологической концентрации гормона в основном проявляется его антидиуретическое действие.

Несахарный диабет (мочеизнурение) — следствие нарушений функции сигнальной системы с участием вазопрессина, что сопровождается большими потерями воды, которые могут привести к дегидратации организма. Различают центральный и нефрогенный несахарный диабет.

Основными причинами центрального несахарного диабета могут быть генетические дефекты синтеза препроАДГ в гипоталамусе, дефекты процессинга и транспорта проАДГ (наследственная форма), а также повреждения гипоталамуса или нейрогипофиза (например, в результате черепно-мозговой травмы, опухоли, ишемии).

Нефрогенный несахарный диабет возникает вследствие мутации гена рецептора АДГ типа V_2 (наследственная форма), следствием которого является неспособность почек реагировать на гормон.

Несахарный диабет проявляется гипотонической полиурией (выделение большого количества мочи низкой плотности). Это сопровождается жаждой и усиленным потреблением воды.

На обмен воды влияют также регуляторы обмена натрия и калия. К ним относятся альдостерон, компоненты ренин-ангиотензиновой системы, а также натрийуретические факторы предсердий. Последовательность событий, которые развиваются в ответ на потерю жидкости (кровопотеря, обезвоживание) показана на рис. 15.4 (подробнее см. выше).

15.4. Минеральные вещества клетки. Макроэлементы

15.4.1. Натрий

В организме взрослого человека содержится 70–100 г натрия (у детей его содержание ниже), из которых 75 % составляет обмениваемый натрий. Он обнаруживается во всех тканях главным образом в виде катионов натрия. Содержание натрия в плазме крови — 130–150 ммоль/л.

Натрий — главный внеклеточный катион: на его долю приходится более 90 % всех катионов плазмы. Около 85 % ионов натрия находится в свободной форме, приблизительно 15 % его удерживается белками. Во внеклеточных жидкостях находится около 40 % всего натрия, около 50 % — в костях и хрящах, менее 10 % — внутри клеток.

Объем внутриклеточной жидкости примерно в два раза превышает объем внеклеточной жидкости, но концентрация натрия во внутриклеточной жидкости

не достигает 5 ммоль/л. Неравномерное распределение натрия по обе стороны клеточной мембраны обеспечивается работой Na^+/K^+ -АТФазы, которая потребляет значительную часть энергии, вырабатываемой клеткой.

Основные функции натрия:

- поддерживает осмотическое давление внеклеточных жидкостей и регулирует водный баланс;
- входит во внеклеточные буферные системы;
- участвует в формировании потенциала действия в нервной и мышечной тканях;
- участник транспортных систем в мембранах эпителия кишечника и почек для аминокислот, глюкозы.

Натрий поступает в организм в основном с поваренной солью, небольшое количество — в виде бикарбоната, цитрата, сульфата и глутамата натрия, которые как добавки встречаются в продуктах питания. Суточная потребность ребенка в натрии составляет от 200 мг в первые месяцы жизни до 1300 мг к 14 годам. Для взрослых потребность в натрии составляет 1300–1500 мг в день.

Основное количество натрия (около 95 %) выводится почками с мочой в виде натриевых солей фосфорной, серной, угольной и других кислот. Натрий выводится также с потом и через кишечник.

Обмен натрия регулируется альдостероном и предсердными натрийуретическими пептидами, а также антидиуретическим гормоном. Если действие альдостерона и предсердных натрийуретических пептидов направлено на регуляцию выведения натрия почками, то АДГ влияет на обмен натрия через регуляцию обмена воды. Механизмы действия данных регуляторов описаны ранее.

Гипернатриемия — состояние, при котором повышена концентрация натрия в сыворотке крови. Клинические проявления начинаются при повышении этого показателя более 155 ммоль/л. При гипернатриемии, как правило, развивается гипертоничность жидкостей всех компартментов организма, поскольку повышение осмолярности внеклеточной жидкости вызывает перемещение воды из внутриклеточного пространства, что приводит к повышению осмотического давления внутри клеток и дегидратации клеток.

Причинами гипернатриемии могут быть:

- избыточное поступление натрия (передозировка препаратов натрия, неправильное приготовление детского питания);
- снижение потребления воды;
- повышенные потери воды через кожу (гипергидроз, ожоги);
- повышенные потери воды через желудочно-кишечный тракт (наиболее частой причиной этого состояния, особенно у детей, является диарея);
- задержка натрия вследствие гиперальдостеронизма, почечной недостаточности, снижения клубочковой фильтрации;
- несахарный диабет;
- применение так называемых петлевых диуретиков (фуросемид, буметанид, этакриновая кислота) и др.

Гипонатриемия — состояние, при котором концентрация натрия в сыворотке снижена.

Причинами гипонатриемии могут быть снижение выведения воды почками и высокое потребление жидкости (более 1 л/ч). Это состояние наблюдают у больных, получающих внутривенно избыточное количество гипонатриемических жидкостей, и при психогенной полидипсии (патологической жажде).

15.4.2. Калий

В отличие от натрия, калий является внутриклеточным катионом. У взрослых содержание калия составляет приблизительно 2 г/кг; 95 % его обменивается. Уровень калия в организме ребенка ниже. Основное количество калия (90 %) находится внутри клеток в виде непрочных соединений с белками, углеводами и фосфором и менее 10 % — внеклеточно. Часть калия содержится в клетках в ионизированном виде и обеспечивает мембранный потенциал. В плазме и межклеточной жидкости находится 2–5 % общего калия. Во внеклеточной среде небольшое количество калия находится преимущественно в ионизированном виде. Наиболее богата калием мышечная ткань. В эритроцитах калия в 15–20 раз больше, чем в плазме, в которой содержится 4–5 ммоль/л калия.

Суточная потребность взрослого человека в калии — 2–3 г, ребенка — 680 мг/кг в сутки. Основным пищевым источником калия являются продукты растительного происхождения.

Практически весь калий, поступающий с пищей, всасывается в кишечнике (с калом за сутки выводится менее 400 мг). При этом концентрация калия в секрете тонкого кишечника гораздо ниже, чем в толстом кишечнике (рис. 15.5). Всасываясь из желудочно-кишечного тракта в кровь, калий поступает в печень и временно там задерживается. Калий депонируется главным образом в мышечной ткани, особенно во время мышечной деятельности. Из организма калий выводится преимущественно почками (80–90 %), в меньшей степени кишечником и потовыми железами.

Калий вместе с натрием создает и поддерживает осмотическое давление жидкостей организма (преимущественно внутриклеточной), участвует в регуляции кислотно-основного состояния организма.

Калий — активатор ряда ферментов. Вместе с Na^+ он генерирует электрохимический потенциал в мембранах, который обеспечивает электрическую возбудимость нервных и мышечных клеток, принимает участие в активном транспорте моносахаридов и аминокислот.

Ионы калия влияют на сердечную проводимость и регулируют функцию сердца, повышают тонус и силу гладкой и поперечнополосатой мускулатуры. Концентрация калия увеличивается при ацидозе (рис. 15.6) и снижается при алкалозе. Как дефицит, так и избыток калия вызывают серьезные изменения в организме и особенно опасны для детей.

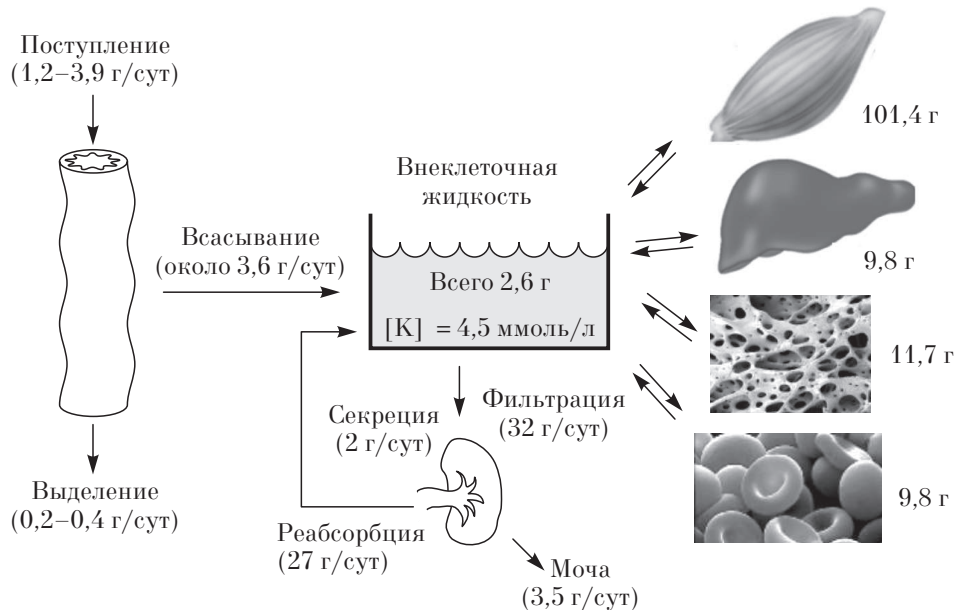


Рис. 15.5. Обмен калия в организме

Калий внеклеточного компартмента пропорционально распределен между интерстициальным пространством и плазмой. Концентрация калия в сыворотке крови взрослого человека составляет 3,5–5,1 ммоль/л.

Потеря или накопление воды мало сказывается на уровне сывороточного калия, тогда как даже небольшие сдвиги содержания калия во внутриклеточном пространстве приводят к существенным изменениям в концентрации внеклеточного калия. Поступление калия в клетки стимулирует инсулин. Существенное влияние на распределение калия оказывают изменения pH. При накоплении

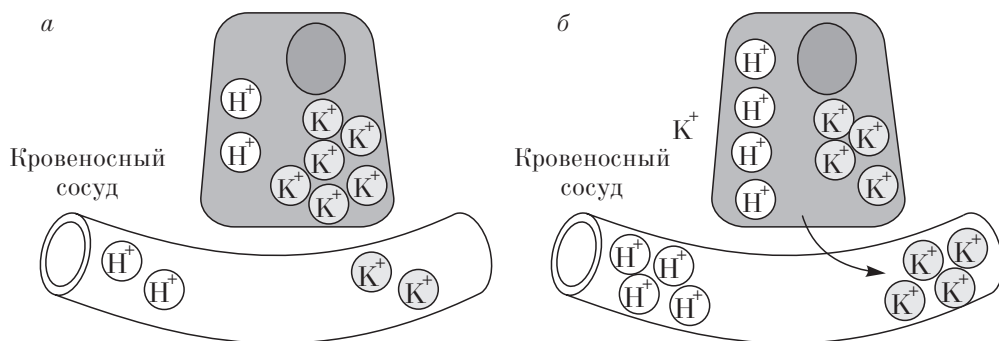


Рис. 15.6. Гиперкалиемия, связанная с ацидозом:
а — норма; б — ацидоз

ионов водорода внутри клеток для поддержания электронейтральности в межклеточные пространства и кровь из клеток перемещаются ионы калия.

Уровень калия в сыворотке отражает состояние мембранного потенциала клеток. Изменение концентрации калия в сыворотке означает, что такие «возбудимые» клетки, как нервные и мышечные, могут изменять свои ответные реакции на стимуляцию. В частности, избыточная или очень низкая концентрация калия в плазме может приводить к угрожающим жизни состояниям в связи с нарушениями в работе сердца.

Основным регулятором обмена Na^+ и K^+ является альдостерон, который стимулирует активность натриевых каналов, Na^+/K^+ -АТФазы. Тем самым повышается реабсорбция натрия и одновременно растет секреция калия почками.

Гипокалиемия — стойкое снижение концентрации калия в сыворотке крови до уровня менее 3,5 ммоль/л. Клинически гипокалиемия проявляется мышечными болями, слабостью. Характерны снижение интенсивности перистальтики кишечника, запоры. Возможно развитие периферической полинейропатии, признаком которой служат парестезии (снижение чувствительности). Стойкая гипокалиемия ассоциирована со значительным ухудшением работы сердца.

Потери K^+ с содержимым желудка и кишечника могут сопровождаться метаболическим алкалозом или ацидозом. К примеру, гипокалиемический метаболический алкалоз развивается вследствие упорной рвоты или диареи. Увеличение выведения K^+ с мочой часто являются следствием массивной полиурии, которая возникает после длительной терапии петлевыми или тиазидными диуретиками.

Частой причиной гипокалиемии является изменение распределения K^+ вследствие его перемещения из внеклеточной жидкости во внутриклеточную. Это может произойти после введения инсулина, при лечении диабетической комы или как осложнение применения β_2 -адреноблокаторов — лекарственных средств, блокирующих β_2 -адренорецепторы.

Гиперкалиемия наблюдается, если концентрация калия в сыворотке крови у детей старше 7 суток жизни и у взрослых повышается более 5,0 ммоль/л.

Причины гиперкалиемии можно разделить на две группы:

- почечные — тяжелая почечная недостаточность, гипоальдостеронизм, применение нефротоксических лекарственных средств;
- внепочечные — попадание в организм избыточного количества калия, дефицит инсулина, массивный гемолиз, гиперосмолярность, ацидоз, применение β -адреноблокаторов, препаратов наперстянки.

Тяжелая гиперкалиемия является опасным для жизни состоянием. Нарушается сердечная деятельность вплоть до фибрилляции желудочков.

15.4.3. Хлориды

У здорового взрослого человека содержание хлоридов составляет около 30 ммоль/кг массы тела. Во внеклеточном пространстве находится большая часть всех хлоридов: около 14 % — в плазме крови, 27 % — в интерстициальной жидкости, 17 % — в межклеточной жидкости плотной соединительной ткани и хряща, 15 % — в межклеточной жидкости костной ткани, 5 % — в трансцеллюлярном пространстве. В составе внутриклеточной жидкости содержится 12 % хлоридов.

Количество хлоридов в организме — отражение баланса между их потреблением и выделением. Потребление хлоридов зависит от особенностей рациона питания.

Содержание хлоридов в большинстве пищевых продуктов соответствует содержанию натрия. В норме взрослый человек получает 1,8–7,1 г/сут хлоридов. Основным местом их всасывания служит тонкий кишечник. После всасывания хлориды током воротной вены поступают в печень, а затем распределяются по организму.

В выделении хлоридов принимают участие ЖКТ, кожа и почки. В нормальных условиях потери хлоридов через ЖКТ минимальны и составляют 35,5–70 мг/сут. В ряде случаев они могут превысить 3,55 г/сут.

Содержание хлоридов в секретах потовых желез составляет в среднем 40 ммоль/л. Подобно натрию концентрация хлоридов в потовой жидкости уменьшается под влиянием альдостерона и повышается при муковисцидозе¹.

В случае усиленного потоотделения потери хлоридов через кожу могут превысить 7,0 г/сут. Основное количество хлоридов выделяется почками.

Во внеклеточном пространстве хлориды находятся в основном в виде солей Na, K, Ca, Mg. Здесь они играют важную роль в создании осмотического давления, в поддержании кислотно-щелочного равновесия. В физиологических условиях изменения концентрации хлора в этом жидкостном пространстве вторичны к изменениям других электролитов и направлены в первую очередь на создание электронейтральности среды. Некомпенсированная гиперхлоремия приводит к метаболическому ацидозу.

Гиперхлоремия наблюдается тогда, когда уровень хлоридов в плазме крови превышает 110 ммоль/л. Специфических клинических проявлений она не имеет и является частью других изменений обмена электролитов. Обычно гиперхлоремия сочетается с гипернатриемией. Причины, вызывающие накопление хлоридов, в основном те же, что и для задержки натрия.

Гипохлоремия обычно ассоциируется с метаболическим алкалозом. При этом недостаточное поступление хлоридов — редкая причина гипохлоремии. Чаще

¹ *Муковисцидоз (кистозный фиброз)* — системное наследственное заболевание, обусловленное мутацией гена трансмембранного регулятора муковисцидоза. У детей при этом развивается гипохлоремический и гипокалиемический метаболический алкалоз.

она связана с потерями хлоридов через ЖКТ вследствие постоянной рвоты. Повышенные потери хлоридов через кожу могут быть вызваны чрезмерным потоотделением. Высокое содержание хлоридов в поте характерно для пациентов с муковисцидозом. Повышение потерь хлоридов с мочой наблюдается после длительной терапии диуретиками.

15.4.4. Магний

Магний широко распространен в организме. По содержанию он занимает четвертое место после натрия, кальция и калия, а среди внутриклеточных катионов — второе после калия. Концентрация его в клетках в 3–15 раз выше, чем во внеклеточной среде. В клетке до 90 % магния связано с АТФ, поэтому уровень внутриклеточного АТФ является одним из значимых факторов, влияющих на накопление данного катиона в клетке.

Содержание общего магния в организме составляет около 25 г. Наибольшая его часть (до 69 %) находится в костной ткани, где он входит в состав кристаллов апатитов, которые рассматриваются как депо магния. Основная часть внутриклеточного магния находится в мышечной и нервной тканях. Много магния содержат кардиомиоциты и гепатоциты. В клетках магний сконцентрирован преимущественно в ядрах.

Около 1 % магния находится во внеклеточной жидкости. Содержание магния в крови колеблется от 0,75 до 1,25 ммоль/л; 60–70 % магния сыворотки находится в ионизированном состоянии (активная форма), оставшаяся часть связана с белками и липидами. Клетки крови содержат незначительное количество данного катиона (например, в эритроцитах его концентрация составляет 8,0–10,0 ммоль/л).

Магний поступает в организм человека с водой и пищей. Наибольшее количество магния содержится в продуктах растительного происхождения.

Ежедневно с пищей должно поступать 5–15 мг магния на 1 кг массы тела. Начиная с 8-й недели беременности, и особенно в третьем триместре, во время лактации потребность в магнии значительно увеличивается, достигая 15–20 мг на 1 кг массы тела.

Всасыванию подвергается около 30–40 % поступившего магния (преимущественно в двенадцатиперстной кишке за счет ионной диффузии). Усиливают абсорбцию магния паратиреоидный гормон, витамин D ($1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$), витамин B₆, органические кислоты, белки (казеин). Потребление продуктов с высоким содержанием кальция тормозит всасывание магния.

Всосавшийся из кишечника магний по системе воротной вены попадает в печень. Там он на некоторое время задерживается, а затем поступает в кровь и с током крови — в другие органы, прежде всего в кости и мышечную ткань.

В почках вследствие ультрафильтрации за сутки в первичную мочу выделяется около 30 мг магния на 1 кг массы, т.е. до 75 % магния, содержащегося в плазме крови. С мочой же выделяется около 5 % этого количества магния,

остальной подвергается реабсорбции. Увеличению реабсорбции магния способствует низкое поступление магния с пищей, введение паратиреоидного гормона, низкое поступление в организм кальция. Снижение реабсорбции магния и, следовательно, увеличенная экскреция его с мочой происходит при внутривенном введении глюкозы, введении минералокортикоидов и катехоламинов, гентамицина, циклоспоринов, фуросемида, этакриновой кислоты.

При обильном потоотделении (физической, тепловой нагрузке, у лихорадящих больных) могут существенно возрасти потери магния с потом. В норме с потом выводится не более 1 % выводимого ежедневно магния, при значительном потоотделении потери могут достигать 10–15 %.

Функции магния. Ионы магния способны формировать обратимые хелатоподобные соединения с многими органическими соединениями, в частности с АТФ. Известно свыше 300 ферментов, которые катализируют реакции с участием АТФ и других нуклеотидов. К ним относятся ферменты гликолиза и цикла Кребса, окисления и синтеза жирных кислот. Магний — специфический кофактор ферментов, катализирующих синтез нуклеиновых кислот и белков.

В растворе ионы магния интенсивно взаимодействуют с лекарственными препаратами, изменяя их действие. При одновременном введении препаратов магния и сердечных гликозидов увеличивается риск нарушения внутрисердечной проводимости и возникновения атривентрикулярной блокады. Совместное введение препаратов магния с миорелаксантами и нифедипином может привести к усилению нейромышечной блокады. Сочетание магния с барбитуратами, наркотическими анальгетиками, гипотензивными средствами может привести к угнетению дыхательного центра и развитию тяжелой дыхательной недостаточности. При смешивании растворов для внутривенного введения сульфат магния образует нерастворимый осадок с препаратами кальция, этиловым спиртом, карбонатами, бикарбонатами и фосфатами щелочных металлов, солями бария, стронция, гидрокортизоном, натрия сукцинатом, полимиксина В сульфатом, новокаина гидрохлоридом, салицилатами и тартратами.

Применение некоторых препаратов (инсулина, гентамицина) может приводить к развитию *гипомагниемии*.

Состояние *гипермагниемии* развивается при использовании солей магния в качестве лекарственных препаратов, острой и хронической почечной недостаточности, сниженной функции надпочечников. Характерными признаками гипермагниемии являются нарушения дыхательной системы вплоть до остановки дыхания. Со стороны сердечно-сосудистой системы отмечаются артериальная гипотензия, брадикардия, изменения на ЭКГ. Ранними клиническими признаками гипермагниемии могут быть тошнота и рвота.

15.4.5. Кальций

В организме взрослого человека содержится 1,0–1,5 кг кальция, что составляет 1,5 % от массы тела. Основным местом хранения и источником кальция является костная ткань (около 99 % всего кальция), где он находится в основном в виде гидроксиапатитов — кристаллов, состоящих из кальция и фосфатов, а также небольшого количества гидроксида и карбоната кальция. Лишь 0,1 % общего кальция находится во внеклеточной жидкости и около 1 % кальция — внутри клеток.

Ионы внутриклеточного кальция регулируют активность ферментов, связываясь с ними непосредственно или со специальными кальцийсвязывающими белками. Ионы кальция — важный участник сигнальных систем клеток, регулирующих внутриклеточный метаболизм, двигательную активность клеток, механизмы секреции и многие другие жизненно важные процессы.

Суточная потребность в кальции для взрослого человека составляет 1000–1200 мг. У детей она выше и зависит от возраста. Самая высокая она у детей до 3 лет — 1300–1500 мг. Кальцием богаты молоко, сыр, творог, лук, шпинат, капуста, петрушка.

В желудочно-кишечный тракт кальций поступает с пищей и секретами. Всасывается в основном в верхних отделах тонкого кишечника путем активного транспорта при участии специфических Ca^{2+} -переносящих белков, способствующих поступлению кальция и фосфатов в клетку и затем — в кровь. У взрослых всасывается около половины кальция, поступающего с пищей, у детей, а также беременных и кормящих женщин — больше. За сутки всасывается около 400 мг кальция. Примерно половина этого количества у взрослых экскретируется почками (рис. 15.7). Вторая половина поступает обратно в просвет кишечника с продуктами секреции, желчью и слущенными эпителиальными клетками.

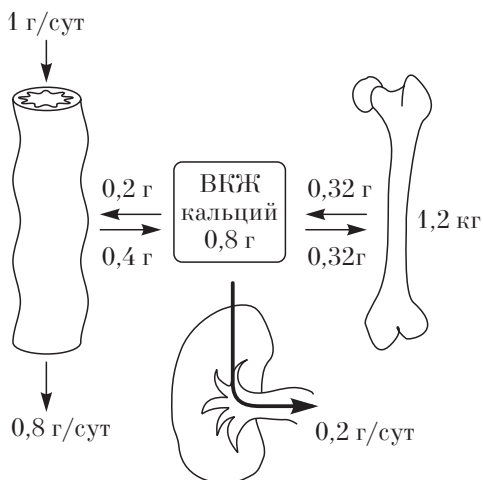


Рис. 15.7. Обмен кальция в организме взрослого человека (ВКЖ — внеклеточная жидкость)

Организм человека регулирует обмен кальция в зависимости от содержания его в пищевом рационе. Как только поступление кальция превышает потребности организма, его всасывание уменьшается. У детей, в отличие от взрослых, имеется положительный баланс кальция, так как большая часть всосавшегося в кишечнике кальция поступает в костную ткань.

Около 10 г кальция ежедневно фильтруется почками, но основная часть этого количества подвергается реабсорбции в проксимальных канальцах при участии специфических Ca^{2+} -переносящих белков. Поэтому концентрация кальция в моче в норме составляет 2,5–7,5 ммоль/л и зависит от количества кальция, поступившего в организм. Небольшое количество кальция покидает организм с потом.

Наиболее важное физиологическое значение имеет изменение уровня кальция во внутриклеточной жидкости и в плазме крови. Концентрация Ca^{2+} в плазме крови здоровых людей колеблется в пределах 2,12–2,6 ммоль/л. Это несвязанный, ионизированный кальций (около 50 %); ионы кальция, связанные с белками, главным образом с альбумином (45 %), и недиссоциирующие комплексы с цитратом, сульфатом, фосфатом и карбонатом (5 %).

Ионизированный кальций является биологически активной фракцией, концентрация которой поддерживается в интервале 1,1–1,3 ммоль/л. Изменение уровня кальция может привести к нарушению многих процессов: изменению порога возбудимости нервных и мышечных клеток, нарушению функционирования кальциевого насоса, снижению активности ферментов и нарушению гормональной регуляции метаболизма.

Концентрация Ca^{2+} в плазме регулируется с высокой точностью: изменение ее всего на 1 % приводит в действие гомеостатические механизмы, восстанавливающие равновесие.

В поддержании гомеостаза кальция принимают участие три основных регулятора: паратиреоидный гормон (повышает концентрацию свободного ионизированного кальция в плазме), кальцитонин (оказывает противоположное паратормону действие) и метаболиты витамина D.

Паратгормон (ПТГ) — наиболее важный регулятор. Этот белок (84 аминокислотных остатка) секретируется паращитовидными железами в ответ на снижение содержания в плазме несвязанного кальция и магния. ПТГ стимулирует резорбцию костной ткани и регулирует реабсорбцию кальция в почечных канальцах, предотвращая его потерю с мочой. Одновременно снижается реабсорбция фосфатов, что может приводить к фосфатурии.

Кальцитриол (1,25-дигидроксихолекальциферол) обеспечивает всасывание кальция и фосфатов в кишечнике. Он действует подобно стероидным гормонам, связываясь с ядерным рецептором — фактором транскрипции, который регулирует синтез белка, переносящего кальций через энтероциты. Как уже упоминалось ранее, кальцитриол образуется из витамина D₃ (холекальциферола) путем последовательного гидроксирования в печени (в положении C₂₅) и почках (в положении C₁). Активность фермента 1- α -гидроксилазы, катали-

зирующего гидроксилирование в почках, регулируется паратиринном. Следовательно, всасывание кальция из кишечника также зависит (косвенно) от этого гормона.

Кальцитонин — полипептид (32 аминокислотных остатка), секретируется С-клетками щитовидной железы. Он понижает концентрацию кальция в плазме за счет снижения костной резорбции и реабсорбции кальция из почечных канальцев.

Гипокальциемия чаще выявляется у новорожденных. В течение первых двух дней жизни она обнаруживается примерно у 30 % недоношенных детей, родившихся в асфиксии, и у 50 % детей, родившихся от матерей с инсулин-зависимым сахарным диабетом.

Причины гипокальциемии — низкий уровень паратирина в крови, дефицит витамина D, влияние лекарственных препаратов.

Гиперкальциемия представляет собой стойкое повышение уровня кальция в крови более 3,0 ммоль/л. Наиболее частая причина — повышенная мобилизация кальция из костной ткани. Реже это состояние развивается вследствие повышенного всасывания кальция в ЖКТ или снижения экскреции кальция с мочой.

Усиленная мобилизация кальция из костной ткани может быть обусловлена передозировкой витамина D вследствие неправильного применения его препаратов, в том числе используемых при приготовлении молочной смеси. Передозировка витамина А, который обычно принимается вместе с препаратами витамина D, также может привести к гиперкальциемии. Увеличение концентрации кальция в крови вследствие усиленной его реабсорбции в почечных канальцах может быть вызвано производными бензотиадиазина — тиазидными мочегонными препаратами (гидрохлортиазид, циклопентиазид, индапамид).

15.4.6. Фосфор

Фосфор играет важную роль в растущем организме. Фосфат входит в состав кристаллов гидроксиапатита, который составляет основу минерализованных тканей (костной, дентина, цемента, эмали). В этих тканях сосредоточено до 80 % всех фосфатов. Фосфаты входят в состав внутри- и внеклеточной жидкостей, формируя в них буферные системы, участвующие в поддержании pH этих жидкостей. Подвергаясь в почках фильтрации, они создают такую же буферную систему в моче (рис. 15.8).

Фосфор имеет важное значение и для обмена органических соединений. Фосфат-ион входит в состав нуклеотидов и нуклеиновых кислот, фосфолипидов, макроэргических соединений (креатинфосфата и др.), вторичных посредников в проведении гормонального сигнала в клетках (цАМФ, цГМФ, ИТФ), коферментных форм многих водорастворимых витаминов (тиаминпирофосфата, пиридоксальфосфата, ФАД, ФМН, НАД⁺ и НАДФ⁺). Присоединение фосфата к небольшой молекуле резко меняет ее способность проникать через

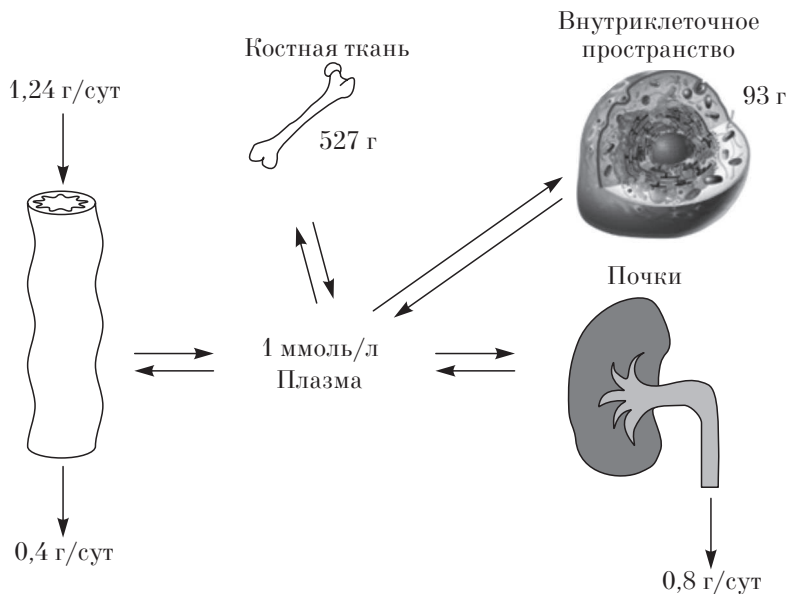


Рис. 15.8. Обмен фосфора в организме

мембраны, а присоединение к макромолекулам вызывает изменение их конформации и функциональной активности.

С возрастом уровень неорганического фосфора снижается, достигая к 14 годам 1,4 ммоль/л, у взрослых — 1,29 ммоль/л. На уровень неорганического фосфора в сыворотке крови влияет функциональное состояние паращитовидных желез, щитовидной железы, обеспеченность витамином D и функция почек. Экскреция фосфора осуществляется почками и кишечником. Выведение фосфора с мочой с возрастом повышается. Около 90 % фосфора после его фильтрации в почках реабсорбируется. Регулятором реабсорции выступает паратгормон. Повышенное количество паратгормона в крови уменьшает реабсорбцию, и наоборот, при низком содержании паратгормона реабсорбция увеличивается. Реабсорбция фосфата регулируется также другими гормонами: кальцитонином и соматотропным гормоном.

Потребность в фосфатах взрослого человека — около 1,2 г/сут. Фосфор в достаточном количестве присутствует в пищевом рационе, так как содержится практически во всех пищевых продуктах и всасывается (около 50 %) в виде фосфат-иона.

Изменение содержания фосфора в крови даже в широком диапазоне не вызывает обычно клинических проявлений. **Гиперфосфатемия** часто протекает бессимптомно. Наиболее распространенной причиной ее считается острая или хроническая почечная недостаточность. Однако она может наблюдаться после гипертонических клизм с использованием фосфата натрия (особенно у маленьких детей или при кишечной непроходимости), а также после

внутривенного введения препаратов, содержащих фосфор. Гиперфосфатемия и фосфатурия, связанные с гиперкальциемией, могут появиться при передозировке витамина D.

Обмен фосфора тесно связан с обменом кальция в организме. Поэтому при остром повышении уровня фосфатов в сыворотке крови может наступить резкое снижение уровня кальция и возникновение парестезии, судорог, нарушения психики, сердечного ритма, артериальная гипотензия и даже смерть.

Гипофосфатемия. Уровень фосфора в сыворотке крови непрерывно снижается с возрастом. Тем не менее, гипофосфатемия у подростков и взрослых определяется как состояние, когда концентрация фосфора в сыворотке менее 0,81 ммоль/л. Обычно она протекает бессимптомно. Тяжелая недостаточность фосфора, связанная с быстрым перемещением его в клетки, может привести к опасному для жизни состоянию: сердечной недостаточности с желудочковой аритмией, артериальной гипотензии, дыхательной недостаточности, коме.

Увеличение потребления углеводов стимулирует высвобождение инсулина, который, в свою очередь, способствует перемещению фосфора в клетки и возникновению гипофосфатемии. Таким образом, введение в организм глюкозы, фруктозы, лактата или солей аминокислот (особенно в период кормления истощенных пациентов или при диабетическом кетоацидозе) может привести к гипофосфатемии. Респираторный алкалоз в результате острой гипервентиляции (например, в состоянии страха) также может способствовать возникновению гипофосфатемии. Лекарственные препараты, такие как инсулин, глюкагон, андрогены, β -адренергические агонисты, могут оказывать аналогичный эффект. Карбонат кальция и другие препараты, которые могут связываться с фосфором в продуктах питания, могут также привести к гипофосфатемии.

15.5. Микроэлементы

Микроэлементы входят в состав тела в ничтожных количествах — менее 50 мг/кг массы тела. Большая их часть является ионами металлов.

Микроэлементы принимают непосредственное участие в катализе химических реакций, происходящих в организме. Их недостаток может быть причиной серьезных расстройств метаболизма. Потребность в микроэлементах существенно возрастает в период беременности и кормления грудью. В чрезмерно высокой концентрации они могут быть токсичны.

15.5.1. Железо

В организме взрослого человека содержится 3–5 г железа (3,5–4,0 г у женщин и 4,0–5,0 г у мужчин), при этом на долю гемоглобина приходится 65 %, миоглобина и ферментов — около 15 %. Около 20 % железа хранится в депо

(ферритин и гемосидерин), 0,1–0,2 % входит в состав транспортной формы — трансферрина.

Железо находится в различных соединениях либо в двух-, либо в трехвалентной форме. Оно может быть *геминным* (в составе гема и других порфиринов) либо *негеминным* (в составе фермента аконитазы и железосерных белков, принадлежащих полиферментным комплексам системы тканевого дыхания).

Железо принимает непосредственное участие в транспорте кислорода в составе гемоглобина, в связывании и депонировании кислорода в составе миоглобина, в транспорте электронов в дыхательной цепи (в составе цитохромов), в окислительно-восстановительных реакциях (является составной частью некоторых оксидоредуктаз), реакциях гидроксирования (в составе цитохрома P₄₅₀), реакциях обезвреживания пероксида водорода (в составе каталазы и пероксидаз).

Всасывание. При попадании в желудок под действием HCl желудочного сока железо высвобождается из компонентов пищи. Всасывание происходит в проксимальном отделе тонкого кишечника в количестве около 1,0–2,0 мг/сут (10–15 % пищевого железа). Всасывается железо в виде двухвалентного иона, в то время как с пищей поступает преимущественно трехвалентное железо. Для восстановления Fe³⁺ в Fe²⁺ используются аскорбиновая и соляная кислоты. Только железо мясных продуктов находится в двухвалентной гемовой форме и поэтому хорошо всасывается.

Железо перемещается из просвета кишечника в энтероциты тремя путями.

1) негемовое Fe(III) взаимодействует с белком интегрином и при помощи другого белка — мобилферрина — перемещается в цитозоль;

2) негемовое Fe(III) восстанавливается до Fe(II) при помощи аскорбиновой кислоты, соляной кислоты или при участии ферроредуктазы (ДцитВ — дуоденальный цитохром *b*) и далее переносится внутрь белком DMT1 (англ. divalent metal ion transporter 1);

3) гемовое железо связывается с белком HCP1 (англ. — heme carrier protein 1) на поверхности мембраны энтероцита и в цитозоле высвобождается из гема при действии гемоксигеназы.

Железо мясных продуктов усваивается на 20–30 %, яиц и рыбы — на 10–15 %, растительных продуктов — на 1–5 %.

Наличие в пище фитиновой кислоты (сухие завтраки, растительные продукты), кофеина и танина (чай, кофе, напитки), фосфатов, оксалатов (растительные продукты) ухудшает всасывание железа, так как образуются нерастворимые комплексы.

После всасывания формируется пул внутриклеточного железа Fe²⁺ (рис. 15.9). В зависимости от насыщенности трансферрина железом оно может остаться в клетке в составе ферритина, который обладает оксидазной активностью и образует Fe³⁺, или выйти из клетки, окисляясь гефестином (феррооксидазой) до Fe³⁺, в кровоток при помощи белка ферропортина и связаться в таком виде (Fe³⁺) с трансферрином.

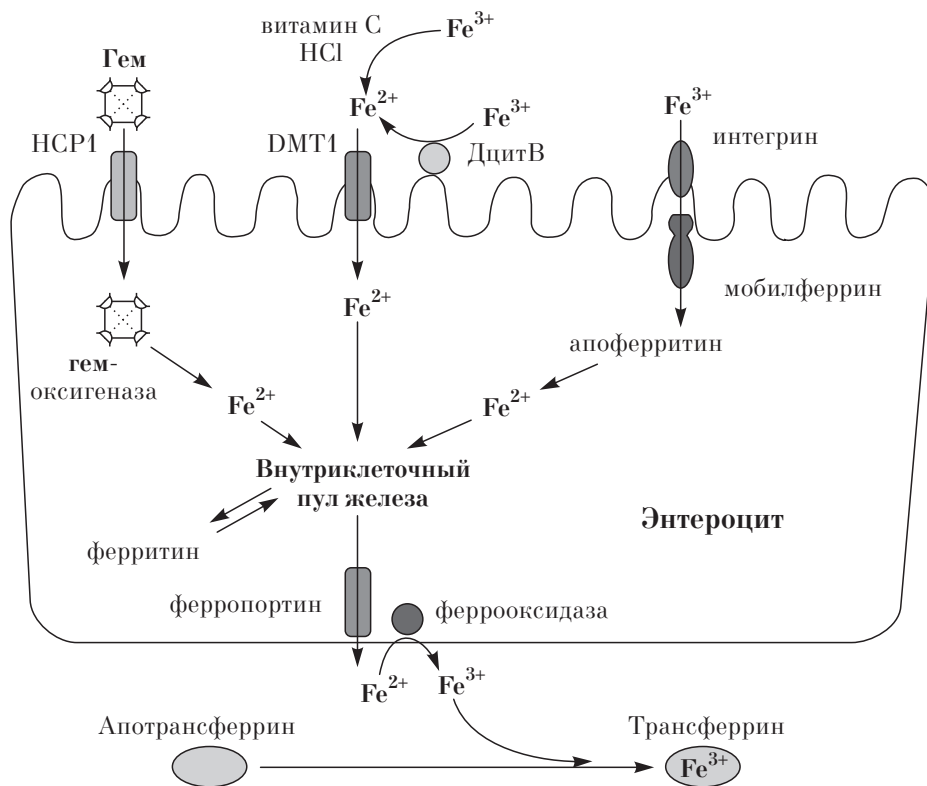


Рис. 15.9. Механизмы всасывания железа в кишечнике

В крови железо находится только в составе *трансферрина*, содержание которого составляет 70–180 мг/100 мл плазмы (26–42 мкмоль/л). Связывание железа с белками необходимо потому, что трехвалентное железо в водной среде обладает ограниченной растворимостью и при физиологических значениях pH склонно к полимеризации.

Железотранспортирующий белок трансферрин является гетерогенным гликопротеином. Каждая молекула этого белка связывает два атома Fe^{3+} . Наряду с функцией транспортера железа, трансферрин в крови играет роль буфера для защиты тканей от токсического действия свободных ионов железа. Кроме того, он уменьшает выведение железа с мочой.

Трансферрин после связывания со специфическим мембранным рецептором поступает вместе с ним в клетку. После высвобождения железа рецептор трансферрина возвращается в плазматическую мембрану. Одновременно из клетки высвобождается апотрансферрин, способный связывать в кровотоке новые ионы железа.

Основным потребителем железа, транспортируемого трансферрином, являются клетки костного мозга (эритробласты), где происходит синтез гемоглобина

и железосерных белков. Значительно меньшая часть используется для биосинтеза ферментов или запасается в депо.

В качестве депо железа выступает *ферритин*. Он имеется в клетках печеночной паренхимы, в ретикулоэндотелиальных клетках костного мозга и селезенки. Ферритин представляет собой белок апоферритин, связанный с Fe^{3+} . Апоферритин состоит из 24 субъединиц, формирующих 6 каналов, через которые в центральную часть молекулы поступают ионы железа. Одна молекула белка может заключать в себе до 4500 атомов железа. Ферритин способен запасать до 23 % (от своей массы) железа в виде фосфата или гидроксида.

Железо может быть снова использовано только после распада ферритина. В этом процессе могут участвовать лизосомы или протеасомы. Освобождаемое железо восстанавливается в Fe^{2+} и пополняет фонд железа. При выходе из клетки Fe^{2+} окисляется медьсодержащими ферментами феррооксидазой-1 (церулоплазмин) и феррооксидазой-2 до Fe^{3+} для связывания с апотрансферрином.

При заполнении депо железа (ферритина) микроэлемент откладывается в виде нерастворимого в воде комплекса — *гемосидерина*, который может накапливать до 35 % (от своей массы) гидроксида железа, образуя в клетках видимые в микроскоп гранулы. В состав гемосидерина, помимо ферритина, входят также нуклеотиды, липиды и углеводы. Из обоих депо железо будет поступать в кровь при кровопотерях и повышенном эритропоэзе, однако из гемосидерина металл мобилизуется намного медленнее.

Железо выводится из организма главным образом с мочой, желчью и слюной. Особенностью обмена железа является неспособность организма выделять (экскретировать) его в большом количестве. В норме имеется четкое соответствие между всасыванием железа и его выведением.

Дефицит железа возникает вследствие кровопотери. С 1 мл крови организм теряет около 0,5 мг железа (при концентрации гемоглобина 15 г/100 мл); при менструации кровопотеря составляет 25–60 мл, что эквивалентно 12–30 мг железа.

Регуляция внутриклеточного обмена железа. В гемоглобинсинтезирующих ретикулоцитах костного мозга поступление, накопление и внутриклеточный обмен железа определяются совместным действием рецептора трансферрина, ферритина и синтазой δ -аминолевулиновой кислоты (ключевой фермент синтеза гема). Особую роль в этих процессах играет железосерный белок (ES-BP), идентичный аконитазе. При низкой концентрации железа в клетке ES-BP связывается с определенным участком матричной РНК рецептора трансферрина и стимулирует синтез последнего. В результате содержание рецепторов трансферрина в клетке увеличивается и становится возможным дополнительный захват железа.

Недостаток железа может возникать при потреблении бедной железом пищи, нарушении всасывания и хронической кровопотере. В результате снижается интенсивность синтеза гемоглобина (*железодефицитная анемия*) и его

количество в эритроцитах уменьшается (*гипохромная анемия*); нарушаются также все другие метаболические процессы, в которых принимает участие железо.

Анемия — наиболее распространенное заболевание у человека. Считается, что им страдает не менее 20 % населения земного шара. Состояние дефицита железа можно лечить пероральным приемом препаратов двухвалентного железа, особенно в сочетании с витамином С.

Избыточное отложение железа в клетках регистрируется при неадекватном его поступлении в организм (переливание крови) или снижении интенсивности выделения (гемолиз эритроцитов) из организма. Излишнее железо будет запасаться в виде гемосидерина в ретикулоэндотелиальной ткани или в паренхиматозных клетках печени и селезенки. Увеличение накопления железа без повреждения тканей называется *гемосидерозом*, с их повреждением — *гемохроматозом*. Гемосидероз часто наблюдается при алкогольном повреждении печени.

Суточная потребность в железе для взрослых составляет 1–2 мг. Однако у здорового человека всасывается лишь около 10 % содержащегося в рационе питания железа, поэтому для предотвращения дефицита этого микроэлемента в организме необходимо потреблять его не менее 10 мг. Повышена потребность в железе у беременных (2–4 мг), подростков (1,5–2 мг) и малышей (9–27 мг).

Источником железа для организма являются пищевые продукты (табл. 15.3), а также железо, освобождающееся при постоянном распаде эритроцитов в клетках печени и селезенки (около 25 мг/сут). Лучшим поставщиком железа является мясо. Железо, содержащееся в рыбных продуктах, всасывается в 2 раза хуже. Этого микроэлемента много в фасоли, но он плохо усваивается.

Таблица 15.3

Содержание железа в продуктах питания, мг/100 г

Продукты растительного происхождения		Продукты животного происхождения	
Морская капуста	16	Печень	11–15
Какао	12,5	Мясо	2–4
Шиповник	12	Яйца	3
Отрубной хлеб	11	Свежие белые грибы	5
Гречка	8		

15.5.2. Медь

Медь содержится во всех тканях организма. Общее количество меди у человека — 40–80 мг. Медь всасывается клетками кишечника при участии мембранного транспортера меди — белка СМТ1. Всасывание и последующий метаболизм меди во многом зависят от адекватных поступлений цинка и марганца.

Поскольку цинк может конкурировать с медью при всасывании в энтероциты, у людей, которые потребляют с пищей большое количество цинка, может повышаться риск развития дефицита меди.

В энтероцитах часть ионов меди связывается специальными белками металлотронеинами, а другая часть при помощи внутриклеточного транспортного белка АТОХ1 переносится к аппарату Гольджи, где при участии еще одного белка АТР7А высвобождается в кровь воротной вены. Здесь медь связывается с альбуминами плазмы и доставляется в печень. В мембранах гепатоцитов также присутствуют белки СМТ1, металлотронеины и АТОХ1, которые обеспечивают поступление меди в гепатоцит.

Покидают ионы меди гепатоцит при помощи другого белка — АТР7В, который способствует связыванию ионов меди с церулоплазмином и высвобождению его в кровоток. Около 90 % меди плазмы крови связано с церулоплазмином. Этот белок обеспечивает перенос ионов меди к тканям. Церулоплазмин, как и почти все медьсодержащие белки, имеет голубую окраску. Он обладает оксидазной активностью и катализирует в кровотоке окисление аскорбиновой кислоты, адреналина, диоксифенилаланина и некоторых других соединений. Концентрация меди в сыворотке крови составляет 13–23 мкмоль/л.

Часть меди из печени секретируется в желчный пузырь и удаляется через кишечник. Наряду с этим, незначительное количество меди выделяется с мочой.

Роль меди в обмене веществ. Благодаря высокому редокс-потенциалу медьсодержащие оксидазы способны переносить электроны на молекулу кислорода. Медь включена в состав таких ферментов, как цитохромоксидаза (фермент дыхательной цепи), моноаминоксидазы (обезвреживание биогенных аминов), церулоплазмин, каталаза (обезвреживание пероксида водорода), тирозиназа (синтез меланина), супероксиддисмутазы (обезвреживание супероксидного радикала кислорода), лизилоксидазы (синтез коллагена и эластина).

Суточная потребность в меди составляет 2–3 мг. При недостатке меди в рационе может наблюдаться клиническая картина железодефицитной анемии, так как медь непосредственно участвует в метаболизме железа (см. выше). Такая железодефицитная анемия далеко не всегда может быть излечена назначением железа.

Основные пищевые источники — рыба, печень, ржаной хлеб, черная смородина.

15.5.3. Цинк

В организме человека содержится 2–3 г цинка, причем 99 % находится внутри клеток. Наиболее высокая концентрация металла обнаружена в β -клетках поджелудочной железы, где он принимает участие в депонировании инсулина, в предстательной железе и яичках. Цинк содержится в сперме (стабилизатор хроматина), радужной и сетчатой оболочке глаза (кофактор ретинолдегидрогеназы, катализирующей превращение ретинола в ретиналь).

Цинк всасывается в тонкой и подвздошной кишках. Тормозят всасывание фитаты (соли инозитолгексофосфата). В крови он связывается с белками плазмы, в основном с альбуминами и α_2 -макроглобулином, которые поставляют этот микроэлемент в ткани. Концентрация цинка в плазме составляет 15–20 мкмоль/л. Основное количество (75 %) цинка крови приходится на эритроциты (он входит в состав карбангидразы), 3 % содержится в лейкоцитах (в составе фермента фосфатазы).

Регуляция обмена цинка поддерживается тесной взаимосвязью белков, транспортирующих и депонирующих (металлотионеины) цинк в клетке. Выделение цинка из организма происходит преимущественно с калом.

Участие цинка в метаболизме обусловлено тем, что свыше 10 % генома человека кодирует белки, содержащие цинк. Цинк является незаменимой составной частью, или кофактором, более 300 ферментов (панкреатической карбоксипептидазы, глутамат-, малат-, лактатдегидрогеназ, алкогольдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, карбангидразы и др.). Здесь он образует координационные связи, которые прочно удерживают субстрат и активизируют его для протекания ферментативной реакции. Путем образования координационных связей он стабилизирует четвертичную структуру белков и удерживает аминокислотные цепи в порядке, благоприятном для химического катализа.

Цинк является составной частью ДНК-связывающих белков, служит стабилизатором мембран, активатором тимулина — пептида, стимулирующего активность Т-лимфоцитов.

Суточная потребность в цинке составляет 10–15 мг. При полноценном питании дефицит цинка не наблюдается, но при вегетарианской диете всасывание цинка снижается из-за образования его нерастворимых соединений с фитатами зерновых.

Приобретенный дефицит цинка (при остром воспалении, заболеваниях кишечника, печени и др.) приводит к расстройствам гуморального и клеточного иммунного ответа, нарушению барьерной функции кожи, бесплодию, импотенции и выпадению волос. Развивается ночная («куриная») слепота, снижается обоняние.

Хронический дефицит цинка с младенческого возраста приводит к развитию болезни Прасада, типичным проявлением которой являются карликовый рост и гипогонадизм.

15.5.4. Селен

Роль в метаболизме. Селен — мощный антиоксидант. Свою функцию «защитника» от свободнорадикальной деструкции тканей и жидкостей организма он может выполнять как самостоятельно (например, защищая SH-группы от окисления), так и в составе глутатионпероксидазы (металл входит в ее активный центр). Глутатионпероксидаза является важнейшим звеном ферментативной

антиоксидантной системы организма, обезвреживающей пероксиды липидов, которые образуются в реакциях ПОЛ клеточных мембран.

Селен — составная часть тироксин-5'-дейодазы, обеспечивающей синтез трийодтиронина. Таким образом, селен, наряду с йодом, принимает участие в метаболизме гормонов щитовидной железы.

Суточная потребность. Ежедневно в организм должно поступать 100 мкг селена, доза до 500 мкг/сут не превышает безопасный для здоровья уровень, но свыше 1500 мкг может быть токсичной. Описаны случаи отравления животных, выпас которых производился на территориях с высоким содержанием селена в почве.

Селенодефицитный рацион у животных приводит к дистрофии скелетных мышц и миокарда, отекам, бесплодию, облысению. У человека хроническая недостаточность селена проявляется кардиомиопатией, способной провоцировать приступы стенокардии и инфаркт миокарда. Нередко дисфункция щитовидной железы связана не с недостаточностью йода, а с дефицитом селена в организме.

В Беларуси отмечена недостаточность селена в пищевом рационе; значительно снижено содержание селена в молоке кормящих женщин.

Основные источники селена — печень, почки, яйца, морская рыба, моллюски, ракообразные. Для всасывания селена в кишечнике необходим метионин, которым богат творог.

15.5.5. Марганец

В организме содержится 10–15 мг марганца. Всасываясь из кишечника, марганец связывается в крови с β -глобулинами (рис. 15.10). Из кровотока он быстро поступает в клетки тканей и используется в основном в митохондриях. Поэтому ткани, богатые митохондриями, имеют относительно высокую кон-

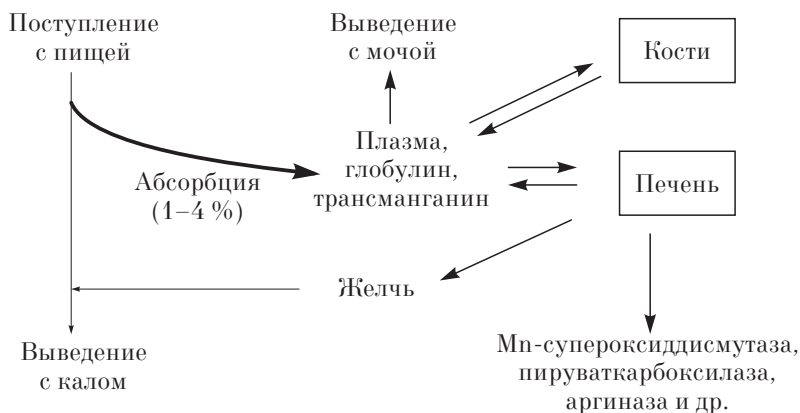


Рис. 15.10. Обмен марганца в организме (пояснения в тексте)

центрацию марганца. Основное депо марганца — костная ткань. Выделяется марганец из организма через кишечник.

Участие в метаболизме. Роль Mn^{2+} в метаболизме достаточно многогранна. Он необходим для активации ферментов глюконеогенеза — пируваткарбоксилазы и фосфоенолпируваткарбоксикиназы; аргиназы (фермент синтеза мочевины); изоцитратдегидрогеназы (цикл Кребса). Марганец входит в состав активного центра митохондриальной Mn^{2+} -СОД — важнейшего фермента антиоксидантной защиты митохондрий; играет важную роль в обмене хрящевой и костной тканей, участвуя в синтезе протеогликанов.

Марганец как двухвалентный катион может заменять Mg^{2+} во многих реакциях, в частности в ДНК-полимеразной при синтезе молекулы ДНК. Однако такая замена неравноценна: синтез ДНК при этом осуществляется быстро, но с многочисленными ошибками.

Недостаточность марганца у человека не описана. У животных его дефицит ведет к задержке роста и нарушению полового созревания, а также к деформации скелета из-за нарушения метаболизма костной ткани.

Отравление марганцем возможно при вдыхании его паров. Развивается симптоматика нарушения корковых (расстройство психической деятельности) и подкорковых центров.

15.5.6. Йод

Йод необходим для синтеза гормонов щитовидной железы — тироксина и трийодтиронина. Щитовидная железа активно захватывает из крови йод (I^-) и при участии йодидпероксидазы окисляет его в I_2 , который необходим для йодирования аминокислоты тирозина, используемого в синтезе тиреоидных гормонов.

Уменьшение поступления йода в организм приводит к развитию зоба — компенсаторному увеличению щитовидной железы. Увеличение массы железистой ткани на какое-то время обеспечивает поддержание необходимой концентрации тиреоидных гормонов в крови, однако продолжающийся дефицит йода приводит к развитию гипотиреоза.

Ежедневно в организм должно поступать с пищей 100–200 мкг йода. Основными источниками этого микроэлемента являются морепродукты (например, в мороженой камбале содержание йода достигает 60 мкг/100 г, в то время как в карпе — всего 6 мкг/100 г). Особенно много йода содержится в морской капусте (ламинарии) — до 0,2 %. Следует подчеркнуть, что значительное число регионов Беларуси относится к йододефицитным. Поэтому в целях профилактики йодной недостаточности у населения йод добавляют в поваренную соль.

15.5.7. Кобальт

Содержание кобальта в организме человека составляет примерно 1–2 мг. Он быстро всасывается в кишечнике и быстро выводится из организма.

Известной функцией кобальта является его участие в построении кобаламина — витамина В₁₂. Установлено также, что кобальт ускоряет всасывание железа в кишечнике.

Этот микроэлемент в несвязанном состоянии токсичен даже в низкой концентрации.

15.5.8. Фтор

Это наиболее изученный микроэлемент. Фтор, содержащийся в пищевых продуктах, напитках и воде, всасывается в желудочно-кишечном тракте практически полностью.

Концентрация фтора в плазме крови составляет 0,01–0,02 мг/100 мл. При повышенном поступлении в организм уровень фтора быстро, в течение минуты, возрастает и затем устанавливается на стационарном уровне, так как избыточное количество микроэлемента поступает в костную ткань. У взрослого человека 99 % общего количества фтора находится в костях и зубах, остальное — в других тканях и межклеточной жидкости.

Основным органом выделения фтора являются почки. В очень незначительном количестве он выводится из организма в составе кала, с потом и слюной.

Фтор участвует в построении минерального матрикса костей и зубов. В скелете он представлен труднорастворимым фторгидроксиапатитом, который образуется путем обмена фтора на ионы хлора и ОН[–] в кристаллах апатита.

При недостатке фтора уменьшается содержание фторгидроксиапатита в скелете, что является одной из важных причин развития остеопороза. Однако фтор ингибирует специфическую фосфотирозинфосфатазу остеобластов, поэтому его избыток, так же как и недостаток, нарушает структуру кости.

Фтор обладает также высоким сродством к зубным тканям. Он ускоряет реминерализацию поверхности зуба. Реминерализацией называется восполнение дефектного разрыхления эмали. Если преобладает ускоренная реминерализация, то развивается резистентность к кариесу. Напротив, деминерализация зуба ведет к кариесу.

Антикариозный эффект фтора заключается в том, что он замещает ОН-ион из гидроксиапатита, благодаря чему минерал приобретает устойчивость к органическим кислотам, образуемым микроорганизмами. Молочная кислота ведет к деминерализации поврежденной эмали. Вслед за этим разлагаются дентин и цемент, поскольку бактерии вызывают протеолиз белкового матрикса зуба.

Местная аппликация ионов фтора, способствуя образованию фторида кальция, делает зубы устойчивыми к действию бактерий. С другой стороны, повышенная концентрация ионов фтора ведет к торможению продукции органических

кислот бактериями полости рта (предположительно, путем ингибирования енолазной реакции гликолиза фтором).

Избыточное поступление фтора приводит к *флуорозу* — пятнистой эмали. Заболевание проявляется повышенной хрупкостью зубов, они легко крошатся и безболезненно стираются до корней. Ранняя стадия флуороза характеризуется появлением меловидных пятнышек на коренных зубах, затем они сливаются, пигментируются, зуб разрушается.

Наиболее богаты фтором морская рыба (особенно скумбрия атлантическая — 1400 мг/100 г, в морском окуне его в 10 раз меньше) и печень животных (230 мг/100 г). В растительных продуктах его немного.

Важным источником фтора является питьевая вода, содержание этого микроэлемента в ней должно составлять 1–1,2 мг/л. Однако следует учитывать, что фторирование водопроводной воды — плохой путь профилактики кариеса, так как фтор в открытых водоемах способен образовывать крайне токсичные свободные радикалы, повреждающее действие которых превосходит супероксидный и другие свободные радикалы кислорода.

Биохимия крови

Кровь — жидкая подвижная соединительная ткань организма. Общий объем крови взрослого человека составляет 5–6 л.

Благодаря работе сердца кровь циркулирует по замкнутой системе кровеносных сосудов и осуществляет транспорт различных химических веществ. Она переносит:

- в составе гемоглобина эритроцитов кислород — из легких к тканям и углекислый газ — из тканей в легкие;
- продукты переваривания пищи из кишечника в ткани, а конечные продукты обмена — из тканей в выделительные органы;
- промежуточные продукты обмена веществ, синтез и использование которых происходит в разных органах;
- сигнальные молекулы (гормоны) от органов внутренней секреции к тканям-мишеням.

Кровь поддерживает кислотно-основной и водный баланс организма.

С помощью крови поддерживается постоянство температуры тела в разных его частях.

Кровь также выполняет защитную функцию. Во-первых, в ней содержатся элементы иммунного реагирования — лейкоциты (обеспечивают клеточный иммунитет) и антитела (обеспечивают гуморальный иммунитет). Во-вторых, она обладает способностью свертываться и образовывать тромб, который закупоривает просвет поврежденного сосуда и останавливает кровотечение.

Белки плазмы крови могут служить резервом аминокислот.

16.1. Физико-химические свойства крови

В норме относительная плотность цельной крови 1,050–1,064 г/см³, плазмы — 1,024–1,030 г/см³. Средняя скорость движения крови в артериях человека 0,2–0,5 м/с. Кровь обладает значительной вязкостью (в 4–5 раз выше вязкости воды) благодаря высокому содержанию белка и эритроцитов. Осмотическое давление плазмы — около 7,5 атм. Оно определяется осмотической концентрацией, т.е. суммой всех частиц, находящихся в единице объема. Онкотическое давление плазмы — около 0,03 атм. (25–30 мм рт. ст.).

16.1.1. Химический состав крови

Кровь состоит из жидкой части — *плазмы*, составляющей около 55 % ее общего объема, и *форменных элементов*, к которым относят *эритроциты* (красные клетки), *лейкоциты* (белые клетки) и *тромбоциты*. Форменные элементы можно отделить от плазмы путем центрифугирования (рис. 16.1). Среди клеток крови преобладают эритроциты (около 45 % объема) крови. Остальные форменные элементы занимают только 5 % объема.



Рис. 16.1. Разделение крови на составные части центрифугирования

Объемные соотношения между форменными элементами и плазмой называют *гематокритом*.

Плазма крови состоит из воды (90–91 %) и сухого остатка (10–9 %), включающего белки (6,6–8,5 % объема крови), углеводы, липиды, азотосодержащие продукты белкового катаболизма, электролиты (Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- и др.), органические кислоты и основания. Водный и электролитный состав плазмы фактически не отличается от состава всех внеклеточных биологических жидкостей.

Химический состав растворимых в плазме крови веществ относительно постоянен (табл. 16.1), так как существуют мощные нервные и гуморальные механизмы, поддерживающие гомеостаз (постоянство внутренней среды).

Таблица 16.1

Органические составные компоненты плазмы крови человека

Компонент	Плазма	Компонент	Плазма
α -Кетоглутарат	0,02–0,07 ммоль/л	Молочная кислота	1,1–1,2 ммоль/л
Азот аминокислот	2,9–4,3 ммоль/л	Мочевая кислота	0,15–0,5 ммоль/л
Ацетоуксусная кислота	0,05–0,19 ммоль/л	Мочевина	2,5–8,3 ммоль/л
Билирубин общий	8,5–20,5 мкмоль/л	Общие липиды	3,5–6,5 г/л
Глюкоза в плазме	3,9–6,1 ммоль/л	Остаточный азот	14,3–25 ммоль/л
Глюкоза в цельной крови	3,3–5,5 ммоль/л	Пентозы	0,13–0,26 ммоль/л

Окончание табл. 16.1

Компонент	Плазма	Компонент	Плазма
Индикан	1–4 мкмоль/л	Пируват	0,07–0,14 ммоль/л
Кетоновые тела (ацетон)	0,2–0,6 ммоль/л	Триацилглицеролы	0,85–2,0 ммоль
Креатин	0,08–0,11 ммоль/л	Фосфолипиды	2,2–4,0 г/л
Креатинин	0,06–0,16 ммоль/л	Холестерол	3,35–6,4 ммоль/л
Лимонная кислота	0,10–0,15 ммоль/л	Янтарная кислота	0,01–0,04 ммоль/л

Кровь связана со всеми тканями организма, поэтому возникновение патологического процесса в каком-либо органе приводит к изменению биохимических показателей крови. Эта информация может быть ценной как при постановке диагноза, так и при оценке эффективности лечебных мероприятий.

16.1.2. Белки плазмы крови и их функции

У взрослого здорового человека общее содержание белков в плазме составляет 65–85 г/л. Используя метод высаливания нейтральными солями, белки плазмы крови можно разделить на три группы: альбумины — 35–50 г/л, глобулины 20–30 г/л и фибриноген — 2–4 г/л.

Обычным методом электрофореза (рис. 16.2) в плазме крови обнаруживают 5 белковых фракций: альбумин (55–65 %), α_1 -глобулины (2–4 %), α_2 -глобулины (6–12 %), β -глобулины (8–12 %) и γ -глобулины (12–22 %). Альбумин имеет наибольшую, а γ -глобулины — наименьшую подвижность в электрическом поле.

Плазма крови, лишенная фибриногена, называется **сывороткой**.

При помощи современных методов электрофореза и иммуноэлектрофореза белки удается разделить на более чем 30 фракций.

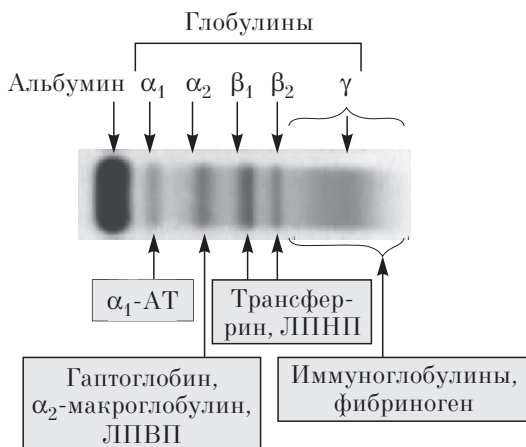


Рис. 16.2. Разделение белков плазмы крови на фракции методом электрофореза

Совокупность всех белков, содержащихся в плазме крови, называют **протеомом** плазмы крови. Крупномасштабное изучение протеома плазмы крови человека было проведено под эгидой международной организации HUPO (Human Proteome Organization). В рамках этого проекта было идентифицировано 7884 белков плазмы крови.

Белки плазмы проявляют полиморфизм. Хорошо известны генетические разновидности альбумина, α_1 -антитрипсина, α_1 -кислого гликопротеина, гемоглобина, церулоплазмينا, трансферрина, фибриногена и т.д. В ряде случаев генетически детерминированные варианты белков не обладают полноценной функциональной активностью, что может приводить к тяжелым клиническим проявлениям — молекулярным болезням.

Общее содержание белков плазмы в организме является результатом взаимосвязанных процессов их синтеза и распада (время полураспада составляет от 0,5 до 20 суток). Главным органом, синтезирующим белки плазмы крови, является печень. Здесь синтезируются альбумины, большинство α - и β -глобулинов, фибриноген. γ -Глобулины синтезируются клетками селезенки, тимуса, костного мозга, лимфатических узлов.

В соответствии с функциями различают несколько групп белков в жидкой части крови:

- *транспортные белки* (табл. 16.2) — выполняют одну из ведущих функций (подробнее о транспортных системах лекарственных веществ см. главу 18).

Таблица 16.2

Белковые фракции и их транспортная функция

Фракция, выделяемая при электрофорезе	Белки из фракции	Транспортируемые эндогенные метаболиты, лекарственные вещества и витамины
Альбумины	Альбумин	Ca^{2+} , жирные кислоты, билирубин, альдостерон, пенициллины, сульфаниламиды, салицилаты, барбитураты, варфарин, гидрокортизон
α_1 -Глобулины	α_1 -Липопротеин	Холестерол, ТАГ, фосфатиды
	α_1 -Гаптоглобин	Гемоглобин
	Тироксинсвязывающий белок	Тироксин
	Ретинолсвязывающий белок	Ретинол
	Транскортин	Кортизол
	Транскобаламин	Витамин B_{12}
α_2 -Глобулины	α_2 -Липопротеин	Витамины D, K, E, холестерол, ТАГ, фосфатиды
	α_2 -Гаптоглобин	Гемоглобин
	α_2 -Макроглобулин	Цинк и никель
β -Глобулины	Трансферрин	Fe^{3+}

- *белки систем гемостаза и фибринолиза* — белки, обеспечивающие остановку кровотечения (фибриноген, протромбин, другие факторы свертывания крови), входящие в систему фибринолиза (плазминоген, активаторы и ингибиторы плазминогена), белки-эфффекторы (например, серпины, являющиеся регуляторами метаболизма, в том числе свертывания крови и фибринолиза);

- *белки системы комплемента* — более 20 белков сыворотки крови, обозначаемых латинской буквой «С», которые свободно циркулируют в крови в форме неактивных компонентов. В результате ограниченного протеолиза из них образуются различные фрагменты системы комплемента, которые имеют высокую биологическую активность. Они способны каскадным образом активировать другие белки системы или взаимодействовать с мембранами клеток и вызывать изменение тонуса и проницаемости сосудов, хемотаксис клеток и их взаимодействие между собой, обеспечивать защиту от внешних патогенных факторов;

- *белки калликреин-кининовой системы* — калликреины, ангиотензиноген, высокомолекулярный кининоген (ВМК), ангиотензинпревращающий фермент (АПФ). Эта группа белков участвует в регуляции тонуса кровеносных сосудов, кровяного давления, в процессах формирования воспалительного ответа, гемокоагуляции;

- *белки — ингибиторы протеолиза* (α_2 -макроглобулин, α_1 -антитрипсин, антитромбин III и др.);

- *белки иммунной защиты* — γ -глобулины выполняют функцию антител. Под антителами понимают белки, которые могут взаимодействовать с чужеродными белками или другим веществами, переводя их в неактивное состояние или разрушая их.

Познакомимся с конкретными представителями белков плазмы крови.

Альбумин — главный простой белок плазмы крови человека (М.М. 66 тыс. а.е.м.). Синтезируется в печени со скоростью 10–12 г в сутки. Хорошо растворяется в воде, солевых растворах, кислотах и щелочах. Высокая растворимость объясняется большим количеством ионизируемых групп на поверхности молекулы.

Кроме высокой связывающей способности по отношению к различным низкомолекулярным соединениям (транспортная функция), альбумины играют важную роль в распределении воды в организме. Так как альбумины самые маленькие среди белков, но количественно самые многочисленные, они на 80 % определяют коллоидно-осмотическое давление плазмы. Снижение количества белков в плазме приводит к выходу воды из сосудов и накоплению ее в межклеточных пространствах (отеки).

В качестве лекарственного препарата используют 5, 10, 20 и 25%-е растворы очищенного альбумина для восстановления и поддержания объема циркулирующей крови. Наряду с препаратами чистого альбумина, применяют также растворы, содержащие до 20 % α - и β -глобулинов.

α_1 -Кислый гликопротеин синтезируется печенью (М.М. 41 тыс. а.е.м.). Содержание углеводов в нем составляет 38 %. Обладает способностью тормозить активность протеолитических ферментов. Относится к белкам острой фазы, так как его содержание в плазме крови повышается в 2–4 раза при развитии острой воспалительной реакции.

α_1 -Антитрипсин (М.М. 45 тыс. а.е.м.). Содержит 12–14 % углеводов. Термоллабилен, необратимо инактивируется при pH ниже 5,0. Синтезируется в печени, время полураспада — 6 суток. Тормозит в крови активность широкого спектра протеаз.

α_2 -Макроглобулин (М.М. 820 тыс. а.е.м.). Содержит около 9 % углеводов. Синтезируется в печени. Время полураспада — 10 суток. Обладает широким спектром ингибирующего влияния на пептидазы всех типов. При недостатке этого белка развиваются нарушения в системах свертывания, фибринолиза и др.

С-реактивный белок получил свое название в результате способности вступать в реакцию преципитации с С-полисахаридом пневмококков. В сыворотке крови здорового организма С-реактивный белок отсутствует, но обнаруживается при многих патологических состояниях, сопровождающихся воспалением и некрозом тканей.

Появляется в острый период болезни, поэтому его называют белком «острой фазы». При электрофорезе белок перемещается вместе с α_2 -глобулинами.

Гаптоглобин — гликопротеин плазмы крови, который специфически связывает внеклеточный гемоглобин (Hb), образуя с ним прочный нековалентный комплекс. Одна молекула гаптоглобина связывает одну молекулу гемоглобина. Формирующийся комплекс гемоглобина с гаптоглобином (М.М. 155 тыс. а.е.м.) не способен пройти через капилляры клубочка почек. Таким образом, гаптоглобин предотвращает попадание свободного Hb в почки.

Церулоплазмин (М.М. 134 тыс. а.е.м.) — медьсодержащий гликопротеин плазмы, обладающий оксидазной активностью. Концентрация в плазме $\approx 0,3$ г/л (от 0,1 до 0,5 г/л). Содержит 7–8 атомов меди, которые придают ему синий цвет.

Церулоплазмин катализирует окисление различных полифенолов, ароматических полиаминов и других веществ. Его оксидазные свойства проявляются при взаимодействии с аскорбиновой кислотой, биогенными аминами, соединениями двухвалентного железа (ферроксидазные свойства).

Трансферрин — β_1 -гликопротеин плазмы крови. Не связанную с железом форму называют *апоферрином*. Доля углеводов составляет 6,1 %. Трансферрин состоит из двух одинаковых доменов, каждый из которых связывает по одному атому железа. В молекуле трансферрина железо трехвалентное, однако, Fe^{2+} связывается с феррином легче, затем оно окисляется до Fe^{3+} . С феррином могут связываться и другие металлы: Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} , Co^{3+} , Mn^{3+} , Cd^{3+} .

Криоглобулин в сыворотке крови здоровых людей отсутствует и появляется в ней при патологических состояниях. Способность выпадать в осадок

или желатинизироваться при температуре ниже 37 °С — отличительное свойство этого белка. При электрофорезе передвигается вместе с γ -глобулинами.

Интерфероны — общее название, под которым в настоящее время объединяют ряд белков со сходными свойствами, выделяемых клетками организма в ответ на вторжение вируса. Эти белки обладают способностью угнетать размножение вирусов в клетках, но не разрушают уже имеющиеся вирусные частицы. Они индуцируют синтез фермента, который, в свою очередь, катализирует синтез олигонуклеотида, активирующего РНКазу. Активная РНКаза разрушает мРНК прокариотов. Кроме того, интерфероны изменяют свойства клеточной мембраны, предотвращают адгезию и проникновение вируса внутрь клетки.

Интерфероны человека подразделяют на группы в зависимости от типа клеток, в которых они образуются. α -Интерферон продуцируется лейкоцитами (имеет около 25 подтипов, М.М. ~ 20 тыс. а.е.м.), β -интерферон — фибробластами, γ -интерферон — стимулированными Т-лимфоцитами и макрофагами.

Интерфероны обладают видовой и тканевой специфичностью. Это означает, что интерферон человека действует только в организме человека и неактивен в организме других биологических видов. Они являются относительно устойчивыми белками и хорошо переносят кислую среду (рН 2,2), что используется для их выделения и очистки.

В настоящее время выпускаются коммерческие препараты интерферонов: человеческий лейкоцитарный, лимфобластный (Велферон), фибробластный (Ферон); интерфероны, полученные генно-инженерными методами: рекомбинантные α -интерфероны (Лаферобион, Роферон, Реальдирон, Виферон, Гриппферон, Генферон), β - и γ -интерфероны (Ингарон).

Иммуноглобулины. Основная часть γ -фракции белков плазмы крови представлена иммуноглобулинами, или антителами. Эти белки являются гликопротеинами. Они синтезируются клетками, происходящими из В-лимфоцитов.

Все молекулы иммуноглобулинов состоят из двух идентичных легких (L) цепей и двух тяжелых (H) цепей, связанных в форме тетрамера дисульфидными мостиками (рис. 16.3). Каждая легкая и тяжелая цепь имеет переменный участок на N-конце (V_L и V_H соответственно).

Переменные участки легких (V_L) и тяжелых (V_H) цепей молекулы иммуноглобулина формируют *активный центр* иммуноглобулина (антитела), который связывает специфический антиген.

Тип тяжелой (H) цепи определяет *класс* иммуноглобулина и его функциональные особенности. Известно 5 классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, содержащих соответственно α -, δ -, ϵ -, γ - и μ -типы H-цепи (рис. 16.4). Иммуноглобулин M состоит из пяти взаимосвязанных димеров. Димеры в олигомерных IgA и IgM удерживаются благодаря связывающему I-пептиду (от англ. joining — соединение).

Иммуноглобулины A (IgA) составляют 10–15 % от общего количества. Они преобладают в секретах желез слизистых оболочек.

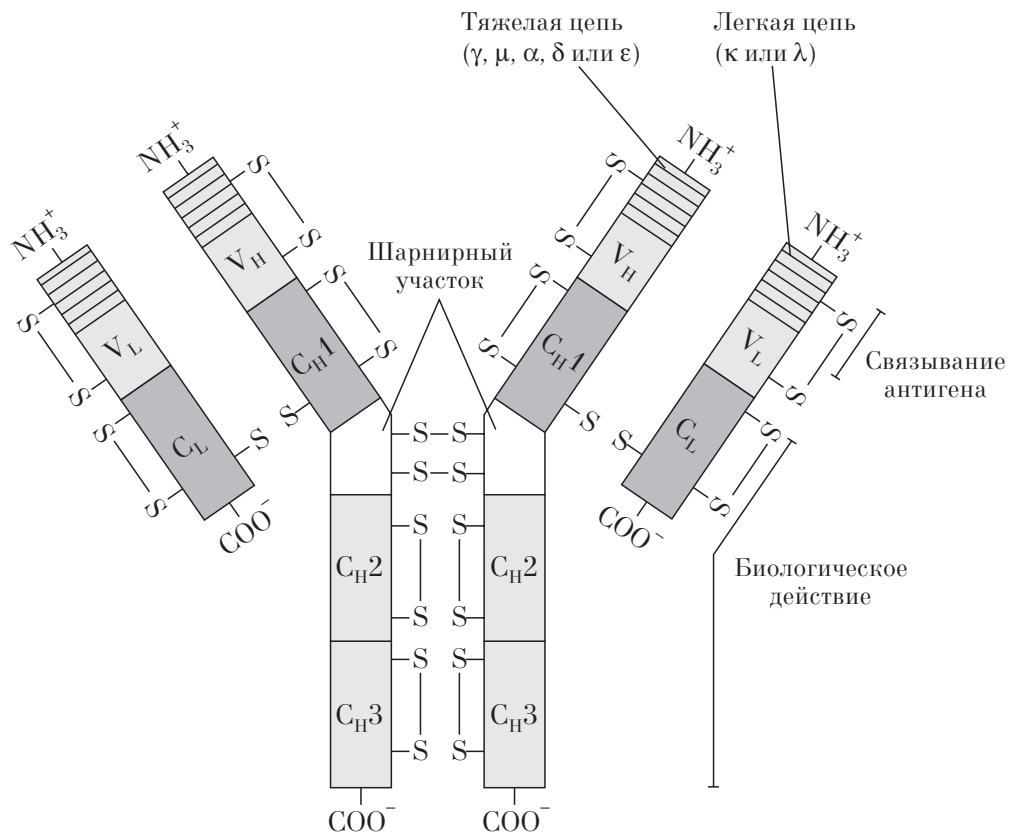


Рис. 16.3. Строение молекулы иммуноглобулинов:

С — константные области; V — варибельные области; штриховкой обозначен активный центр

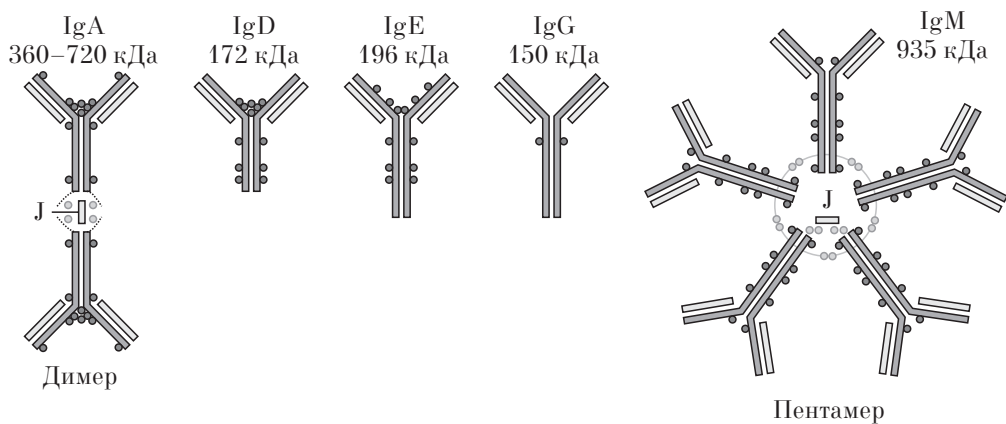


Рис. 16.4. Схема строения иммуноглобулинов крови

Иммуноглобулины G (IgG) — это основные антитела плазмы крови. Они составляют около 70 % всех сывороточных иммуноглобулинов и продуцируются при обязательном участии Т-лимфоцитов. Проникая через плацентарный барьер, они обеспечивают организм новорожденного естественным пассивным иммунитетом. Прием иммунодепрессантов подавляет синтез иммуноглобулинов G.

Иммуноглобулины M (IgM) составляют 5–10 % от общего количества. К классу иммуноглобулинов M принадлежат антитела против стрептококка, агглютинины групп крови.

Иммуноглобулины D (IgD) составляют около 0,2 % от общего количества иммуноглобулинов. Функционируют почти исключительно в качестве мембранных рецепторов для антигенов.

Иммуноглобулины E (IgE) составляют около 0,2 % от общего количества иммуноглобулинов. Защищают слизистые оболочки, контактирующие с окружающей средой. Они прикрепляются к специфическим рецепторам поверхности тучных клеток и базофилов, и, если происходит связывание с антигеном, образуют комплекс, стимулирующий освобождение из клеток медиаторов аллергических реакций.

16.2. Клетки крови и их биохимические особенности

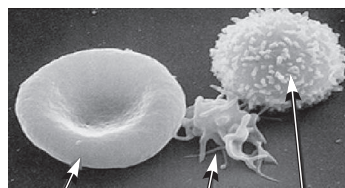
Основными представителями клеток крови являются эритроциты, тромбоциты и лейкоциты (рис. 16.5).

Эритроциты (красные кровяные тельца) — высокоспециализированные клетки, функцией которых является перенос кислорода из легких к тканям тела и транспорт диоксида углерода (CO_2) в обратном направлении. Их количество в крови составляет $(3,9\text{--}5,5) \times 10^{12}$ на 1 л ($(4,5\text{--}5,5) \times 10^6$ в 1 мм^3).

Зрелые эритроциты не содержат ядра, рибосом, митохондрий и эндоплазматического ретикулума. Отсутствие внутриклеточных органелл приводит к невозможности практически всех синтетических реакций в этих клетках (возможен только синтез липидов). Цитоплазма эритроцитов богата гемоглобином, на долю которого приходится ≈ 98 % массы белков цитоплазмы.

В эритроцитах присутствуют ферменты, необходимые для поддержания гемоглобина в восстановленном состоянии (дезоксигемоглобина): метгемоглобинредуктаза, глутатионредуктаза и глутатион, а также система защиты от активных форм кислорода: супероксиддисмутаза и каталаза.

Клеточная (плазматическая) мембрана эритроцитов пропускает газы (кислород, углекис-



эритроцит тромбоцит лейкоцит

Рис. 16.5. Клетки крови (сканирующая электронная микроскопия)

лый газ), ионы (Na, K), воду. Благодаря большому количеству остатков N-ацетилнейраминовой кислоты их наружная поверхность имеет отрицательный заряд. На поверхности мембраны находятся специфические антигены гликопротеиновой природы — *агглютиногены* — факторы систем групп крови, обуславливающие агглютинацию эритроцитов при действии специфических агглютининов.

Основным источником энергии для эритроцитов является процесс гликолиза. В реакциях пентозофосфатного шунта используется 10 % глюкозы. Энергия АТФ расходуется на транспорт глюкозы (вторичный активный транспорт) и для работы ионных насосов.

Тромбоциты (кровяные пластинки) — небольшие (2–4 мкм) безъядерные сферические бесцветные клетки крови. Они представляют собой ограниченные клеточной мембраной фрагменты цитоплазмы мегакариоцитов (гигантских клеток костного мозга). Их количество колеблется от 200×10^9 до 400×10^9 в 1 л.

Главной функцией тромбоцитов является участие в свертывании крови. Они обладают способностью к адгезии (прилипанию к чужеродной поверхности), агрегации (приклеиванию друг к другу), изменению формы и размеров. При этом продуцируют биологически активные вещества: сосудосуживающие (серотонин, адреналин, тромбоксан), коагуляционные (11 тромбоцитарных факторов свертывания), которые высвобождаются в окружающее пространство.

Тромбоциты также необходимы для регенерации поврежденных тканей. Они секретируют тромбоцитарный фактор роста, фактор роста эндотелия сосудов, трансформирующий фактор роста, фактор роста фибробластов и другие, которые стимулируют рост и деление клеток.

Лейкоциты (белые клетки крови) являются частью иммунной системы организма. Они способны к выходу за пределы кровяного русла в ткани. Главная функция лейкоцитов — защитная. Они участвуют в иммунных реакциях. В норме лейкоцитов в крови намного меньше, чем других форменных элементов. Количество лейкоцитов в крови у взрослых, здоровых мужчин и женщин составляет $(4-9) \times 10^9$ на 1 л.

16.3. Система гемостаза

Система гемостаза — это совокупность функционально-морфологических и биохимических механизмов, обеспечивающих остановку кровотечения и поддерживающих кровь в жидком состоянии.

Значение системы гемостаза для сохранения жизнеспособности организма определяется тем, что она препятствует выведению крови из циркуляторного русла и тем самым способствует обеспечению нормального кровоснабжения органов, сохранению необходимого объема циркулирующей крови.

16.3.1. Компоненты системы гемостаза

Основными участниками свертывания крови являются клетки крови, главным образом тромбоциты, сосудистая стенка и факторы свертывания крови.

Однако в систему гемостаза входят и молекулы, действие которых направлено на сдерживание образования сгустка крови. *Антикоагулянтная система* представлена ингибиторами участников свертывания. Тем самым ее компоненты препятствуют образованию сгустка крови. Другая система, *фибринолитическая*, обеспечивает медленное растворение сгустка. Ослабление процессов свертывания сопровождается склонностью к кровотечению. С другой стороны, низкая активность компонентов системы фибринолиза или высокая активность компонентов коагуляционного гемостаза повышают риск развития тромбоза.

Биологически активные вещества, принимающие участие в свертывании крови и находящиеся в плазме, называют **плазменными факторами свертывания крови**. Большинство из них синтезируются в печени и являются ферментами (сериновыми протеазами), которые катализируют ограниченный протеолиз своих субстратов. В норме белковые факторы свертывания крови находятся в плазме в неактивном состоянии.

Различают 13 плазменных факторов и 11 тромбоцитарных. Некоторые из плазменных факторов имеют название, связанное с историей их открытия. Международный комитет по гемостазу присвоил плазменным факторам — римскую, а тромбоцитарным — арабскую нумерацию.

К *плазменным* факторам свертывания крови относятся:

- ф. I — фибриноген;
- ф. II — протромбин;
- ф. III — тканевый тромбопластин;
- ф. IV — ионы кальция;
- ф. V — проакцелерин;
- ф. VII — проконвертин;
- ф. VIII — антигемофильный глобулин А;
- ф. IX — антигемофильный глобулин В (фактор Кристмаса);
- ф. X — фактор Стюарта – Прауэра;
- ф. XI — плазменный предшественник тромбопластина (антигемофильный глобулин С);
- ф. XII — контактный фактор (фактор Хагемана);
- ф. XIII — фибринстабилизирующий фактор (трансглутаминаза).

Среди *тромбоцитарных* факторов имеются:

- P₃ (тромбоцитарный тромбопластин) — липидно-белковый комплекс, на котором, как на матрице, происходит гемокоагуляция;
- P₆ (тромбостенин) — актомиозиновый комплекс, обеспечивающий ре-тракцию тромба;
- P₁₀ — серотонин;
- P₁₁ — фибринстабилизирующий фактор.

Если фактор активизируется, к его обозначению добавляют букву «а».

Условно выделяют два механизма гемостаза: *сосудисто-тромбоцитарный* (первичный, или микроциркуляторный) и *коагуляционный* (вторичный, или макроциркуляторный). Они тесно связаны между собой. В зависимости от условий меняется лишь доля участия того или иного механизма.

Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз обеспечивает остановку кровотечения при повреждении капилляров и одновременно служит инициатором процессов с участием белков плазмы крови. При больших повреждениях тканей и крупных сосудов включается коагуляционный гемостаз.

16.3.2. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз

В норме эндотелиальный слой сосудистой стенки обладает высокой тромборезистентностью и играет важную роль в сохранении жидкого состояния циркулирующей крови. Эндотелий сосудов предотвращает контактную активацию плазменных факторов свертывания и клеток крови благодаря несмачиваемости своей поверхности. Феномен несмачиваемости связан с синтезом эндотелиоцитами гепарансульфата. Кроме того, эндотелиоциты продуцируют факторы, ингибирующие агрегацию тромбоцитов и коагуляцию: NO, простагландин (простагландин I₂), АДФазу, тромбомодулин, тканевый активатор плазминогена (тАП).

У нормальных неактивных тромбоцитов поверхность мембраны гладкая, препятствующая их прилипанию к сосудистой стенке или друг к другу. При повреждении сосудистой стенки сначала развивается рефлекторный *спазм сосуда*, который позже поддерживается серотонином и адреналином, высвобождаемыми из активированных тромбоцитов.

Затем тромбоциты прилипают к краям поврежденного эндотелия (*адгезия тромбоцитов*), контактируют с другими тромбоцитами и с подлежащими под эндотелием белками межклеточного матрикса — коллагеном, фибронектином и ламинином. Адгезия осуществляется за счет рецепторов к коллагену, фактора Виллебранда (гликопротеин, синтезируется эндотелиоцитами и мегакариоцитами), который связывается с тромбоцитарными рецепторами (гликопротеин Ib/IX) и образует мостик между волокнами коллагена и тромбоцитом. Агрегация тромбоцитов между собой опосредуется фибриногеном (гликопротеин IIb/IIIa) (рис. 16.6).

После фиксации на субэндотелиальных структурах тромбоциты очень быстро теряют свою дисковидную форму и распластываются на сосудистой стенке. Изменение формы тромбоцитов, увеличение подвижности и высвобождение содержимого их гранул составляют следующую стадию сосудисто-тромбоцитарного гемостаза — стадию *активации тромбоцитов*. Активированный тромбоцит набухает, округляется, формирует отростки и приобретает сферически-шиповидную форму. Из тромбоцитов высвобождаются факторы агрегации (АДФ, адреналин, норадреналин, продукты окисления арахидоновой кислоты,

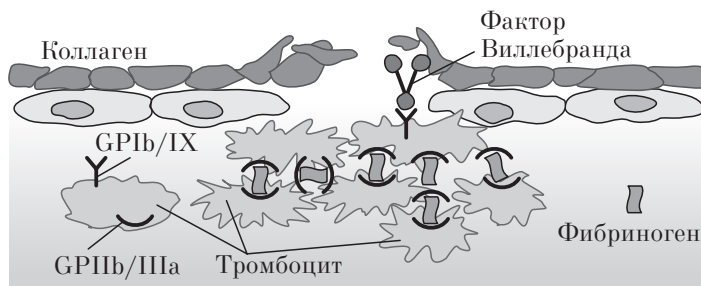


Рис. 16.6. Образование агрегатов тромбоцитов

тромбин), которые активируют присоединение к месту повреждения новых тромбоцитов.

Активация тромбоцитов регулируется изменением в цитоплазме уровня цАМФ и концентрации ионов Ca^{2+} .

Вслед за активацией происходит *агрегация тромбоцитов*. Начальная агрегация тромбоцитов инициируется АДФ, выделяющимся при повреждении эндотелия. Процесс агрегации тромбоцитов, индуцируемый АДФ, носит двух-фазный характер.

Первая фаза продолжительностью до 2 минут — обратимая. В ней агрегаты рыхлые, непрочные, легко разрушаются и недостаточно хорошо фиксируются.

При продолжительной и интенсивной стимуляции тромбоцитов первая фаза сменяется фазой необратимой агрегации, которая сопровождается усилением высвобождения факторов агрегации, таких как серотонин, адреналин, тромбоксан А₂, которые одновременно привлекают другие тромбоциты к агрегации, активируя их. Агрегация ускоряется фибриногеном, который связывает между собой соседние тромбоциты. Образованный агрегат тромбоцитов превращается в тромб, который может надолго закрыть капилляр.

Тромб, состоящий из тромбоцитов и фибриногена с небольшой примесью эритроцитов, называется белым тромбом. В образовавшемся тромбе начинаются морфологические превращения тромбоцитов, которые приводят их к необратимым изменениям и разрушению. Мембрана тромбоцитов растворяется внутри агрегата, образуется единая тромбоцитарная структура. В этом заключается стадия *вязкого метаморфоза тромбоцитов*.

Завершается процесс *сокращением (ретракцией) тромба*. Благодаря контрактильному белку тромбостенину, АТФ и Ca^{2+} тромбоциты подтягиваются друг к другу, тромбоцитарная пробка сокращается и уплотняется, наступает ее ретракция.

16.3.3. Коагуляционный гемостаз

Коагуляционный гемостаз — цепной каскадный ферментативный процесс, в ходе которого происходит взаимодействие и последовательная активация сериновых протеиназ на фосфолипидных матрицах (тромбопластинах), заканчивающийся превращением растворимого фибриногена в нерастворимый фибрин. В этом процессе занято большое число белковых и небелковых факторов, входящих в состав плазмы, клеток крови, сосудистой стенки и тканей.

Коагуляционный гемостаз продолжается около 7 минут и состоит из трех фаз.

В первую фазу, самую продолжительную (5–7 мин), образуется *протромбиназный комплекс*.

Вторая фаза процесса свертывания крови (продолжительность около 3 с), заключается в том, что под действием протромбиназы из протромбина образуется активный протеолитический фермент — тромбин. Завершается процесс фазой образования фибрина (третья фаза). В эту фазу растворимый белок крови — фибриноген под действием тромбина превращается в нерастворимый фибрин, образующий основу тромба (продолжительность фазы 2–5 с).

Каждая из этих реакций представляет собой образование активной протеазы из ее предшественника путем ограниченного протеолиза. Все они идут на фосфолипидных мембранах, требуют присутствия Ca^{2+} и простетических групп (кофакторов).

Выделяют и четвертую фазу — посткоагуляционную, или фазу ретракции (продолжительность фазы 55–85 мин).

В зависимости от механизма протекания первой фазы различают внутренний и внешний пути свертывания крови. Они сходятся на стадии активации фактора X и приводят к образованию тромбина, который превращает фибриноген в фибрин (рис. 16.7).

Реакции свертывания крови по *внешнему пути* начинаются с активации ф. III (тканевого тромбопластина), который представляет собой фосфолипотепеин. Он появляется в кровотоке после высвобождения из клеточных мембран при разрыве сосуда (травма, хирургическая операция, роды), повреждении клеток вследствие стаза крови, гипоксии, ацидоза, действия токсинов и быстро запускает внешний механизм свертывания.

На фосфолипидной матрице, роль которой выполняют фрагменты плазматических мембран тромбоцитов (там же содержится тромбоцитарный тромбопластин P_3), в присутствии ионов Ca^{2+} (ф. IV) тканевый тромбопластин образует комплекс с ф. VII плазмы, превращая его в активную протеазу. Как только в комплексе образуется активный ф. VIIа, он катализирует превращение фактора X в Ха. В этом же комплексе активируется ф. V. Образовавшийся фактор Ха — это сериновая протеаза, субстратом которой является протромбин (ф. II). Фактор Va обеспечивает взаимную ориентацию ф. Ха и протромбина, необходимую для превращения протромбина в тромбин (ф. IIа).

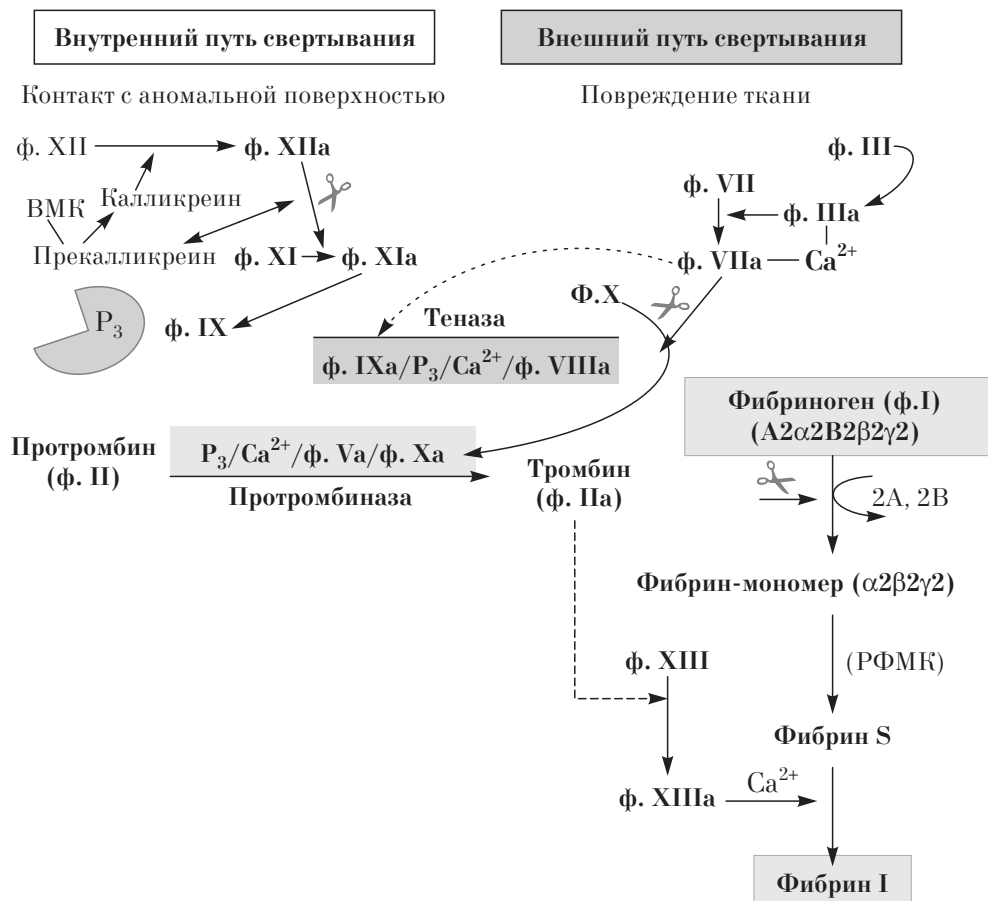


Рис. 16.7. Схема процессов коагуляционного гемостаза:

ф. I–XIII — факторы свертывания крови; ф. Ia–XIIIa — активные факторы свертывания крови; ВМК — высокомолекулярный кининоген; РФМК — растворимые фибрин-мономерные комплексы; P_3 — тромбоцитарный тромбопластин

Протромбин, ф. Va и ф. Xa совместно с дивалентными катионами кальция формируют на клеточной или фосфолипидной поверхности конечный *протромбиназный комплекс* в коагуляционном каскаде (рис. 16.8). Данный комплекс увеличивает активность ф. Xa в 350000 раз.

Внутренний путь — сравнительно медленный процесс. Во внутреннем пути все необходимые факторы присутствуют в крови, и свертывание крови начинается с активации ф. XII (фактора Хагемана) при контакте с чужеродной (стекло, металл) или измененной поверхностью сосудистой стенки (атеросклероз, васкулит). Активирование ф. XII может осуществляться также иммунными комплексами, адреналином, жирными кислотами, уратами, холестерином, триацилглицеролами, эндотоксинами и калликреином.

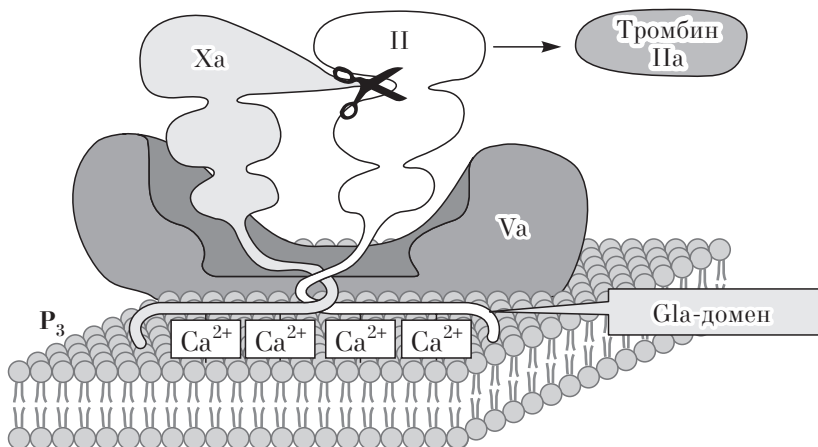


Рис. 16.8. Протромбиназный комплекс и превращение протромбина в тромбин

На аномальной поверхности образуется комплекс из ф. XII, высокомолекулярного кининогена (ВМК) и прекалликреина. Поверхность активированных тромбоцитов также является высокоаффинной для этих факторов. После связывания с ВМК ф. XII медленно превращается в активную протеазу (ф. XIIa), которая, в свою очередь, катализирует превращение прекалликреина в калликреин и активацию ф. XI (превращение его в активную форму — ф. XIa). В свою очередь, активный калликреин ускоряет превращение фактора XII в XIIa.

Фактор XIa участвует в последующих реакциях свертывания. Как сериновая протеиназа он катализирует превращение IX в IXa. Этот процесс происходит на поверхности тромбоцита с участием тромбоцитарного тромбопластина (P_3) и ионов Ca^{2+} . Фактор IXa — это тоже активная сериновая протеаза, субстратом которой является ф. X. Активирование ф. X требует образования на поверхности тромбоцита целого ансамбля молекул, названного теназой: ф. IXa, Ca^{2+} , ф. X, ф. VIII и P_3 . В этих условиях ф. IXa катализирует ограниченный протеолиз ф. X и превращение его в активную форму, в то время как ф. VIII обеспечивает взаимную ориентацию IXa и X факторов.

Появление протромбиназы (комплекс вышеназванных факторов и ф. Xa) свидетельствует о завершении *I фазы* свертывания крови.

Протромбиназа, как уже упоминалось, катализирует превращение протромбина в тромбин (*II фаза*). Образовавшийся тромбин ускоряет почти все предыдущие реакции коагуляции. Он активирует тромбоциты и способствует образованию протромбиназы.

Тромбин — ключевой фермент гемокоагуляции. Количество тромбина в крови строго контролируется. Его появление в крови инициирует *третью фазу* свертывания крови — образование фибрина из фибриногена.

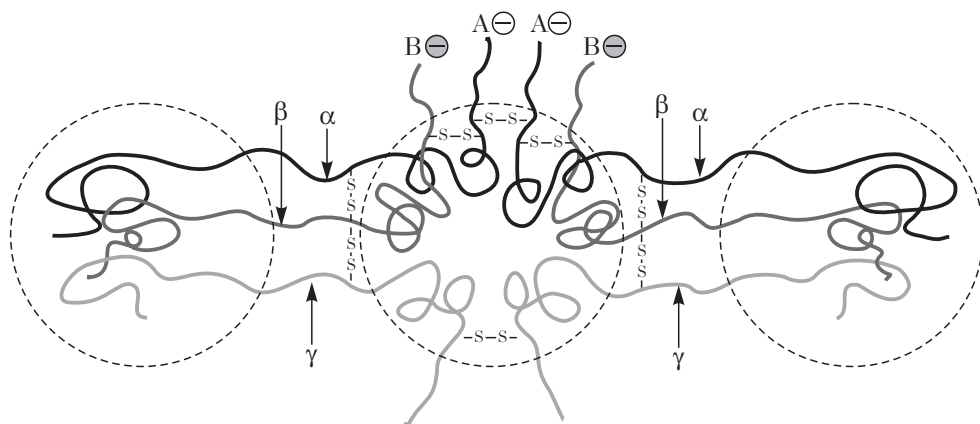


Рис. 16.9. Строение молекулы фибриногена

Фибриноген синтезируется в печени и содержится в плазме крови в концентрации 2–4 г/л. Молекула фибриногена состоит из 6 полипептидных цепей ($A_2\alpha_2$, $B_2\beta_2$ и γ_2), которые связаны между собой дисульфидными связями (рис. 16.9). На концах полипептидных цепей α и β находятся фибринопептиды А и В, которые содержат большое количество аспартата и глутамата. Это создает отрицательный заряд на N-концах молекул фибриногена и препятствует агрегации.

Тромбин отщепляет от фибриногена фибринопептиды 2А и 2В и образуется фибрин-мономер (α_2 , β_2 и γ_2) (рис. 16.10). Мономер фибрина соединяется

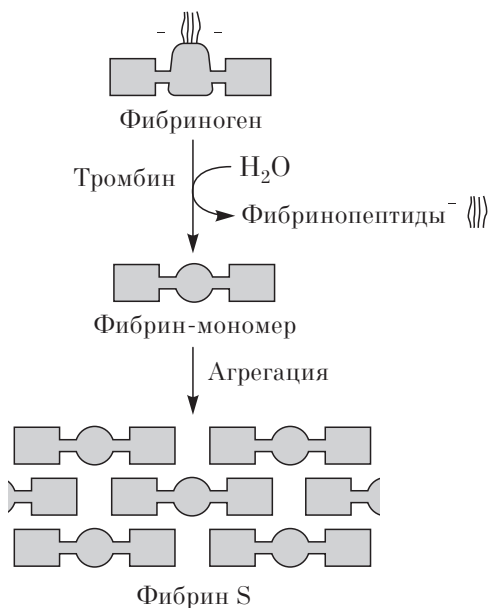


Рис. 16.10. Образование растворимого фибрина

с комплементарными молекулами фибрина, формируя фибрин-мономерные комплексы. Они растворимы в водной кислой среде, растворе мочевины и называются *фибрин S*.

Под влиянием ф. XIIIa (трансглютаминазы) происходит образование нерастворимого фибрин-полимера (фибрин I, *insoluble*). Стабилизация фибрина происходит в результате образования амидной связи между аминогруппой лизина одной молекулы фибрина и карбоксильной группой глутамин другой молекулы фибрина (рис. 16.11). Этот фермент активируется тромбином в присутствии ионов Ca^{2+} . Трансглютаминаза образует также амидные связи между фибрином и фибронектином, другими адгезивными белками. Таким образом, тромб фиксируется в месте повреждения сосуда. В фибриновых нитях оседают форменные элементы крови, в частности эритроциты, и формируется кровяной сгусток, или тромб, который закупоривает рану.

Роль ионов кальция в гемокоагуляции. Ca^{2+} (IV плазменный фактор свертывания крови) играет особую роль в системе свертывания крови. Содержание его в плазме крови составляет 1,1–1,3 ммоль/л. Ионы кальция стабилизируют структуры тромбопластинов и связывают на них витамин К-зависимые факторы гемокоагуляции (ф. II, VII, IX, X) (рис. 16.12). Важным условием для образования таких комплексов является наличие у факторов необычной аминокислоты — γ -карбоксиглутаминовой.

Ионы кальция участвуют в ретракции гемостатического тромба. Ретракцию обеспечивает актомиозин тромбоцитов — тромбостенин. Это сократительный белок, обладающий АТФазной активностью. Ретракция кровяного сгустка предупреждает полную закупорку сосуда, создавая возможность восстановления кровотока. Этим завершаются фазы коагуляции.

Далее процесс вступает в *посткоагуляционную фазу*. Во время этой фазы происходит фибринолиз — медленное растворение сгустка при помощи специфического фермента — плазмина.

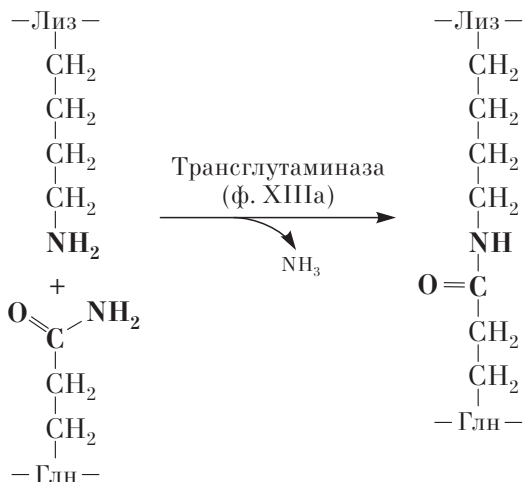


Рис. 16.11. Образование амидной связи между молекулами фибрина при его полимеризации

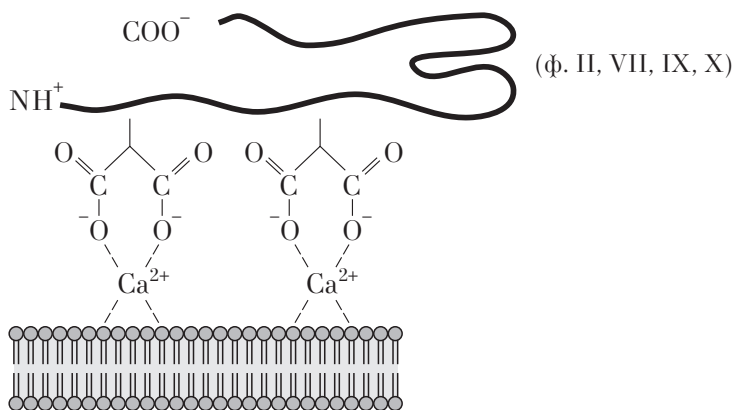


Рис. 16.12. Роль Ca^{2+} в связывании витамин-К-зависимых факторов гемокоагуляции на участках клеточных мембран

Для оценки состояния системы свертывания используется большое число методов исследования. Это, прежде всего, методы, дающие общее представление о состоянии системы свертывания (время свертывания крови, продолжительность кровотечения, количество тромбоцитов), или методы, характеризующие состояние отдельных фаз свертывания и противосвертывающих систем (протромбиновое время, количество фибриногена, определение продуктов распада фибриногена и т.д.).

Роль витамина К в гемокоагуляции. Витамин К принимает участие в посттрансляционном созревании факторов II, VII, IX и X свертывающей системы крови (а также в созревании витамин К-зависимых антикоагулянтов — протеинов С и S). Белки, которые претерпевают такую посттрансляционную модификацию, называются *Gla-белками*. Гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты в молекуле этих белков протекает после трансляции, в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов с участием γ -глутамилкарбоксилазы и диоксида углерода. Роль кофактора в составе этого фермента выполняет восстановленная (гидрохиноновая) форма витамина К (рис. 16.13).



Рис. 16.13. Реакция образования γ -карбоксиглутаминовой кислоты

Наличие дополнительной γ -карбоксильной группы в остатках глутаминовой кислоты придает этим белкам способность связывать ионы кальция на фосфолипидной поверхности и тем самым активировать факторы гемокоагуляции.

16.4. Антикоагулянтная система

Наряду с веществами, способствующими свертыванию крови, в кровотоке находятся вещества, препятствующие гемокоагуляции. Они называются *естественными антикоагулянтами*.

Антикоагулянты — это ингибиторы свертывания. В организме все естественные (физиологические) антикоагулянты по механизму образования разделяют на первичные и вторичные.

Первичные антикоагулянты постоянно синтезируются и с постоянной скоростью выделяются в кровоток. Они ингибируют активные факторы коагуляции и не действуют на неактивные формы этих факторов. К первичным антикоагулянтам относят антитромбин III, гепарин, протеины С и S, α_2 -макроглобулин, α_1 -антитрипсин, антиконвертин.

Антитромбин III (АТ-III) — гликопротеин, который синтезируется в печени и эндотелиальных клетках. Это главный ингибитор тромбина. Он также необратимо ингибирует большинство сериновых протеиназ свертывающей системы (ф. Ха, XIIa, XIa, IXa), калликреин, а также плазмин. На долю АТ-III приходится почти 90 % всей антитромбиновой и более 75 % всей антикоагулянтной активности крови.

Гепарин — естественный антикоагулянт широкого спектра действия, образуется в тучных клетках и базофильных лейкоцитах (строение и свойства гепарина см. п. 6.2.3). Антикоагуляционный эффект гепарина связан с прямым действием на систему свертывания крови за счет образования комплексов со многими факторами гемокоагуляции и проявляется в торможении I, II и III фаз свертывания.

Гепарин является активатором АТ-III. Без гепарина антитромбин III может лишь очень медленно инактивировать тромбин в крови. Гепарин, образуя комплекс с антитромбином III, изменяет его конформацию и повышает его сродство к сериновым протеазам. Затем гепарин освобождается из комплекса и может активировать другие молекулы антитромбина III.

Протеины С и S — витамин-К-зависимые гликопротеины, синтезируемые гепатоцитами. Протеин С синтезируется в неактивной форме и превращается в активную протеиназу тромбином. Он расщепляет неферментные факторы VIIIa и Va. Функция протеина С усиливается под влиянием протеина S, выполняющего роль кофактора.

α_2 -Макроглобулин является ингибитором взаимодействия тромбина с фибриногеном. На его долю приходится 3,5 % всего антитромбинового потенциала крови.

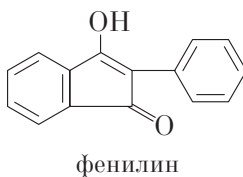
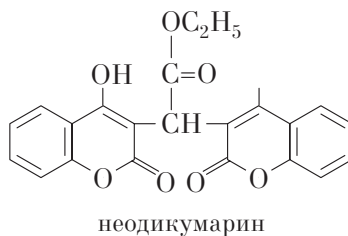
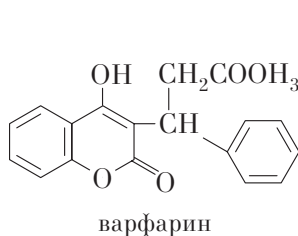
α_1 -**Антитрипсин** ингибирует тромбин, ф. XIa, калликреин, а также панкреатические и лейкоцитарные протеазы, ренин, урокиназу.

Антиконвертин (ингибитор пути тканевого фактора) синтезируется в основном эндотелиальными клетками, и большее его количество находится на поверхности эндотелия. Антиконвертин ингибирует внешний механизм свертывания крови: связывает и инактивирует ф. Ха и комплекс ф. VIIa/Ca²⁺/тканевый тромбопластин.

Вторичные антикоагулянты образуются в процессе свертывания крови и фибринолиза. Примером вторичных антикоагулянтов является **антитромбин I (фибрин)**, который адсорбирует и инактивирует тромбин. Продукты деградации фибрина нарушают полимеризацию фибрин-мономера, блокируют фибрин-мономер, угнетают агрегацию тромбоцитов.

Антикоагулянты в основном тормозят появление нитей фибрина; они препятствуют тромбообразованию, способствуют прекращению роста уже возникших тромбов, усиливают воздействие на тромбы эндогенных фибринолитических ферментов.

В зависимости от механизма и времени развития эффекта различают антикоагулянты *прямые*, или *быстрого действия* (гепарин), эффективные *in vitro* и *in vivo*, и *непрямые* (антагонисты витамина К), или *антикоагулянты длительного действия*. Последние являются производными оксикумарина (варфарин, дикумарол, синкумар) и производными индандиона (фенилин, фениндион). Они действуют только *in vivo* и после латентного периода.



Антикоагулянты непрямого действия — это структурные аналоги витамина К. Являясь конкурентными ингибиторами НАДФН·Н⁺-зависимой витамин-К-редуктазы (рис. 16.14), они блокируют восстановление неактивной (окисленной) формы витамина К в активную (восстановленную). Это нарушает синтез витамин-К-зависимых плазменных факторов гемостаза (II, VII, IX, X).

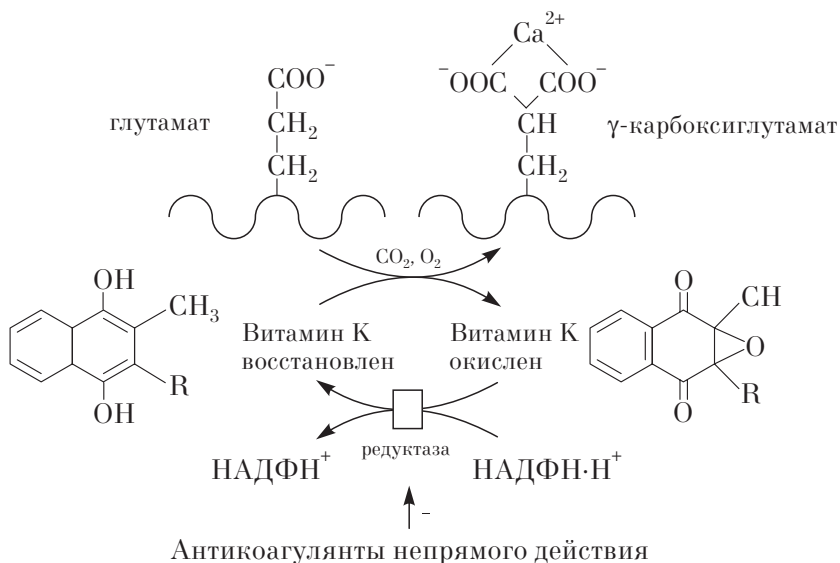


Рис. 16.14. Локализация действия не прямых антикоагулянтов

Антикоагулянты используют для профилактики и лечения тромбозов.

В физиологических условиях содержание антикоагулянтов достаточно для сдерживания процессов гемокоагуляции. При усиленном тромбинообразовании компенсаторно растет и уровень антикоагулянтов.

К факторам, замедляющим и предотвращающим гемокоагуляцию, относятся:

- 1) понижение температуры;
- 2) кальцийсвязывающие вещества — лимонная кислота, щавелевая кислота, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), что используется в лабораторной практике для получения плазмы крови и для консервирования крови;
- 3) гепарин;
- 4) гладкая поверхность (гладкие швы при сшивании сосудов в хирургии, покрытие силиконом или парафинирование канюль и емкостей для донорской крови).

Специфический ингибитор тромбина — природный антикоагулянт *гирудин* (от лат. *hirudo* — пиявка) — секрет слюнных желез медицинской пиявки.

В медицинской практике используются искусственные антикоагулянты.

16.5. Фибринолитическая система

В отличие от прямых и не прямых антикоагулянтов, действие которых направлено на предотвращение тромбообразования, механизм действия тромболитических средств заключается в растворении фибринового тромба. Принцип их действия заключается в том, что они активируют систему фибринолиза.

Фибринолиз — это процесс расщепления фибрина на растворимые фрагменты (пептиды), в результате чего происходит лизис (растворение) фибринового сгустка. Фибринолиз начинается одновременно с ретракцией. Этот этап гемостаза предотвращает закупорку сосуда фибриновым тромбом.

Фибринолиз может быть *ферментативный* (под действием плазмина или ферментов клеток крови) и *неферментативный* (комплексы гепарина с белками (фибриноген, тромбин, плазмин, пламиноген) и некоторыми биогенными аминами (адреналин, норадреналин, гистамин, серотонин) разрушают нестабилизированный фибрин). У здоровых людей активация фибринолиза всегда происходит вторично, в ответ на усиление гемокоагуляции.

Основным звеном фибринолиза является **плазминовая система** (рис. 16.15). В нее входят плазмин, его профермент пламиноген, активаторы пламиногена, проактиваторы пламиногена, ингибиторы плазмина и ингибиторы активаторов пламиногена.



Рис. 16.15. Плазминовая система

Плазмин обладает высокой специфичностью к фибрину и фибриногену. В результате действия плазмина фибрин (фибриноген) распадается на растворимые фрагменты (пептиды), которые затем удаляются из кровотока ретикулоэндотелиальной системой.

В плазме крови содержится неактивный предшественник плазмина **плазминоген** — гликопротеин, синтезируемый в печени, костном мозге, почках. Формирование фибринового тромба сопровождается осаждением на нем профермента плазминогена и его активаторов. Превращение плазминогена в плазмин происходит в результате частичного протеолиза под действием **активаторов плазминогена (АП)**.

Существует большое количество активаторов плазминогена, которые присутствуют в крови, других биологических жидкостях и тканях организма человека. Активаторы плазминогена классифицируются в зависимости от источника получения на *органные, тканевые, сосудистые, плазменные, кровяные и выделяемые культурами раковых и трансформированных онкогенами клеток*.

Тканевый активатор плазминогена (тАП) — важнейший внешний активатор плазминогена, синтезируется эндотелиальными клетками кровеносных сосудов. Являясь сериновой протеазой, он оказывает влияние на плазминоген лишь в присутствии фибрина.

В настоящее время в медицинской практике используют одноцепочечную рекомбинантную молекулу тканевого активатора плазминогена — *alteплазу*. Она обладает повышенным сродством к фибрину и на его поверхности избирательно воздействует на связанный с фибрином плазминоген, превращая его в плазмин.

Стрептокиназу продуцируют некоторые штаммы β -гемолитического стрептококка. Сама стрептокиназа протеолитической активностью не обладает, но, соединяясь с плазминогеном в соотношении (1:1), она приобретает ферментативную активность и способствует превращению молекулы плазминогена в плазмин как в тромбе, так и в плазме крови. В организме человека стрептокиназа частично связывается с антителами, в связи с чем лишь часть введенной дозы этого препарата взаимодействует с плазминогеном. Препарат стрептокиназы иммуногенен и часто вызывает аллергические реакции.

Урокиназа — специфический протеолитический фермент, образующийся в почках. Она превращает плазминоген в плазмин путем расщепления пептидной связи между аргинином и валином в его молекуле. Подобно стрептокиназе, урокиназа реагирует с плазминогеном, как адсорбированным на фибрине, так и циркулирующим в крови. Она снижает содержание плазминогена и фибриногена плазмы, а также уровень α_2 -антиплазмينا, повышает содержание продуктов расщепления фибрина и фибриногена, удлиняет тромбиновое время.

Сейчас препарат Урокиназу производят методом генной инженерии; ранее ее получали из человеческой мочи и культуры клеток почки человеческого эмбриона.

Урокиназа, как и стрептокиназа, может вызвать системный фибринолиз в результате превращения циркулирующего в крови плазминогена в плазмин.

Ингибирование фибринолиза осуществляется на каждом этапе активации этого процесса. Основные физиологические ингибиторы фибринолиза подразделяют на **ингибиторы плазмينا** (α_2 -антиплазмин, α_2 -макроглобулин, α_1 -протеиназный ингибитор (α_1 -антитрипсин), антитромбин III, α_2 -антитрипсин) и **ингибиторы активаторов плазминогена** (ПАИ-1, ПАИ-2, ПАИ-3, ПАИ-4). Они относятся к группе ингибиторов сериновых протеаз (серпинам).

Ингибитор активаторов плазминогена-1 (ПАИ-1) является основным антагонистом тканевого активатора плазминогена и урокиназы. На его долю приходится 60 % антиактиваторной активности. Найден в эндотелии, плазме, гепатоцитах и тромбоцитах. Он активируется на месте повреждения сосуда и предотвращает преждевременный лизис фибрина. Его выработку стимулируют тромбин, тромбоцитарный фактор роста, интерлейкин-1, фактор некроза опухоли альфа, инсулиноподобный фактор роста, глюкокортикоиды и эндотоксины. Активированный протеин С ингибирует выделенный из эндотелиальных клеток ПАИ-1 и тем самым стимулирует лизис сгустка.

Ингибитор II типа (ПАИ-2), получивший название плацентарного, синтезируется не только в плаценте, но и макрофагами и моноцитами. Он очень быстро связывает активатор плазминогена урокиназного типа, но не способен нейтрализовать проурокиназу.

Ингибитор III типа (ПАИ-3) обнаружен в плазме крови.

Ингибитор IV типа (ПАИ-4), или никсинпротеаза, синтезируется фибробластами и напоминает ингибитор трипсиноподобных протеаз.

Повышенное образование антиактиваторов плазминогена может быть причиной снижения фибринолитической активности крови.

Для нормализации повышенной активности системы фибринолиза, например, при лейкозах, операциях на богатых активаторами фибринолиза органах (матка, предстательная железа, легкие), можно использовать **искусственные ингибиторы фибринолиза**. Наиболее широко используются ϵ -аминокапроновая кислота и Амбен (блокируют активный центр активатора плазминогена и препятствуют образованию плазмينا), Трасилол, Контрикал, Гордокс (непосредственно ингибируют плазмин).

В условиях нормы активаторная и ингибиторная функции фибринолитической системы находятся в динамическом равновесии. Локальное или системное снижение фибринолитической активности приводит к тромбозам. С другой стороны, чрезмерное повышение фибринолитической активности может сопровождаться кровотечениями.

16.6. Кисотно-основное состояние и буферные системы крови

Кислотно-основное состояние (КОС) — соотношение концентрации водородных (H^+) и гидроксильных (OH^-) ионов в жидкостях организма. Оно отражает клеточный метаболизм, газотранспортную функцию крови, внешнее дыхание и водно-солевой обмен.

В процессе обмена веществ образуются кислоты и основания. За сутки в организме взрослого человека образуется 20 000 мэкв кислых продуктов (в пересчете на HCl — 20 л 1 М р-ра HCl). Несмотря на это, реакция среды в крови и тканях остается слабощелочной. Относительное постоянство pH внутренней среды организма обусловлено совместным действием буферных систем и ряда физиологических механизмов (дыхательная деятельность легких и выделительная функция почек).

Буферные системы состоят из слабых кислот и их солей с сильными основаниями. Буферное действие системы объясняется связыванием свободных H^+ и OH^- ионов компонентами буфера и переводом их в недиссоциированную форму слабой кислоты или воды. Количественной характеристикой буферного действия служит буферная емкость, которая зависит от абсолютных концентраций компонентов буфера.

16.6.1. Буферные системы крови

Установлено, что состоянию нормы соответствует pH крови от 7,36 до 7,44 (средняя величина 7,40).

Кислотно-основное равновесие поддерживается совместным участием буферных систем плазмы и клеток крови. Важнейшими буферными системами крови являются бикарбонатная, гемоглобиновая, фосфатная и белковая.

Бикарбонатная буферная система — мощная и управляемая система внеклеточной жидкости и крови. На долю бикарбонатного буфера приходится около 10 % всей буферной емкости крови. Бикарбонатная система представляет собой сопряженную кислотно-основную пару, состоящую из молекулы угольной кислоты H_2CO_3 , выполняющей роль донора протона, и бикарбонат-иона HCO_3^- , выполняющего роль акцептора протона. Соотношение $H_2CO_3:HCO_3^-$ составляет 1:20.

Недиссоциированная угольная кислота находится в равновесии с количеством CO_2 , поэтому обычно понятия «концентрация угольной кислоты» и «концентрация CO_2 » используются с одинаковым смыслом.

Механизм действия бикарбонатной системы заключается в том, что при выделении в кровь больших количеств кислых продуктов водородные ионы H^+ взаимодействуют с ионами бикарбоната HCO_3^- , что приводит к образованию слабодиссоциирующей угольной кислоты H_2CO_3 . Последующее снижение

концентрации H_2CO_3 достигается в результате ускоренного выделения CO_2 через легкие в результате их гипервентиляции:



Если в крови увеличивается количество оснований, то они, взаимодействуя со слабой угольной кислотой, образуют ионы бикарбоната и воду. При этом не происходит заметных сдвигов в величине рН. Кроме того, в этом случае подключаются физиологические механизмы регуляции кислотно-основного равновесия: происходит задержка в плазме крови некоторого количества CO_2 в результате гиповентиляции легких.

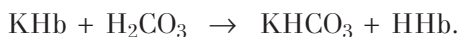
Как эффективный регулятор бикарбонатная буферная система функционирует в области рН 7,4.

Бикарбонатная буферная система тесно связана с гемоглобиновой системой.

Гемоглобиновая буферная система — самая мощная буферная система крови. На ее долю приходится 75 % от всей буферной емкости крови. Участие гемоглобина в регуляции рН крови связано с его ролью в транспорте кислорода и углекислого газа.

Гемоглобиновая буферная система состоит из неионизированного гемоглобина Hb (слабая органическая кислота, донор протонов) и калиевой соли гемоглобина KHb (сопряженное основание, акцептор протонов).

Буферные свойства гемоглобина обусловлены возможностью взаимодействия H_2CO_3 (или других кислот) с калиевой солью гемоглобина с образованием эквивалентного количества соответствующей калийной соли кислоты и свободного гемоглобина:



Именно таким образом превращение калийной соли гемоглобина эритроцитов в свободный гемоглобин с образованием эквивалентного количества бикарбоната обеспечивает поддержание рН крови в пределах физиологически допустимых величин, несмотря на поступление в венозную кровь большого количества углекислого газа и других кислых продуктов обмена.

Точно так же может быть рассмотрена *оксигемоглобиновая буферная система*. Система гемоглобина и система оксигемоглобина являются взаимопревращающимися системами и существуют как единое целое.

Константа диссоциации кислотных групп гемоглобина меняется в зависимости от его насыщения кислородом. При насыщении кислородом гемоглобин становится более сильной кислотой (HbO_2). В капиллярах большого круга кровообращения гемоглобин, отдавая кислород тканям, превращается в очень слабую органическую кислоту (Hb).

Из тканей продуцируемый CO_2 поступает в эритроциты. Здесь при участии карбоангидразы CO_2 взаимодействует с H_2O и образуется H_2CO_3 . После диссоциации угольной кислоты на H^+ и HCO_3^- , гидрокарбонат-ион выходит в плазму, а H^+ связывается Hb .

Гемоглобин (Hb), попадая в капилляры легких, превращается в оксигемоглобин (HbO₂), что приводит к некоторому подкислению крови, вытеснению части H₂CO₃ из бикарбонатов и понижению щелочного резерва крови.

Фосфатная буферная система представляет собой сопряженную кислотно-основную пару, состоящую из иона H₂PO₄⁻ (донор протонов) и иона HPO₄²⁻ (акцептор протонов). Она составляет всего 1 % от буферной емкости крови. В других тканях эта система является одной из основных.

Буферное действие фосфатной системы основано на возможности связывания водородных ионов ионами HPO₄²⁻ с образованием H₂PO₄⁻, а также ионов OH⁻ с ионами H₂PO₄⁻ с образованием воды и HPO₄²⁻. Буферная пара H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ оказывает влияние при изменениях pH в интервале от 6,1 до 7,7. В крови максимальная емкость фосфатного буфера проявляется вблизи значения pH 7,2.

Органические фосфаты также обладают буферными свойствами, но их мощность слабее, чем неорганического фосфатного буфера. Фосфатный буфер в крови находится в тесном взаимодействии с бикарбонатной буферной системой.

Действие фосфатного буфера контролируется выделительной функцией почек.

Белковая буферная система. Белки образуют буферную систему благодаря амфотерности, т.е. наличию кислотно-основных групп в молекуле: белок – H⁺ (кислота, донор протонов) и белок – сопряженное основание (акцептор протонов).

Диссоциация белков зависит от pH среды. При увеличении OH⁻-ионов усиливается диссоциация COOH-групп. Ионы H⁺ связывают OH⁻, и pH сохраняется, белок выступает в роли кислоты. При увеличении H⁺ подавляется диссоциация карбоксильных групп, группы NH₂ связывают избыток H⁺, pH сохраняется, белок заряжается положительно и выступает в роли основания.

Белковая буферная система плазмы крови эффективна в области значений pH 7,2–7,4.

16.6.2. Нарушения кислотно-основного равновесия

Все нарушения кислотно-основного равновесия делятся на две группы: ацидозы и алкалозы.

При *ацидозе* концентрация водородных ионов в крови увеличивается и pH уменьшается. Снижение величины pH крови ниже 6,8 приводит к смерти.

В тех случаях, когда концентрация водородных ионов в крови уменьшается (соответственно значение pH возрастает), наступает состояние *алкалоза*. Предел совместимости с жизнью — pH 8,0.

В зависимости от механизмов развития ацидоз и алкалоз разделяют на дыхательный и метаболический.

Дыхательный ацидоз возникает при гиповентиляции, т.е. уменьшении объема дыхания (бронхиальная астма, эмфизема легких, механическая асфиксия, нарушение функции дыхательных мышц), и при применении лекарственных препаратов, ингибирующих дыхательный центр (морфин, барбитураты).

Это ведет к повышению парциального давления CO_2 в крови выше 50 мм рт. ст. и, как следствие, к накоплению H_2CO_3 и HCO_3^- . Одновременно повышается выделение с мочой аммонийных солей органических кислот.

Самым распространенным нарушением кислотно-основного равновесия является **метаболический ацидоз**. Он развивается при нарушениях обмена веществ, сопровождаемых накоплением органических кислот в тканях и крови, при сахарном диабете, голодании, заболеваниях ЖКТ, гипоксии, почечной недостаточности и т.д. У больных сахарным диабетом и при голодании происходит усиленное образование кетонных тел, что сопровождается снижением концентрации H_2CO_3 в бикарбонатной буферной системе. При метаболическом ацидозе кислотность мочи и концентрация аммиака в моче увеличены.

Дыхательный алкалоз вызывается альвеолярной гипервентиляцией и отличается падением $p\text{CO}_2$ в артериальной крови. Возникает при активном усиленном дыхании (гипервентиляции), заболеваниях, сопровождающихся одышкой, а также при понижении артериального парциального давления O_2 до 70 мм рт. ст., что ведет к рефлекторной стимуляции дыхательного центра. Компенсируется это состояние снижением выделения протонов почками.

Метаболический алкалоз — состояние дефицита водородных ионов в крови (рН выше 7,45) в сочетании с избытком оснований. Возникает при гипокалиемии, потерях большого количества кислотных эквивалентов (рвота), поступлении большого количества щелочных эквивалентов из ЖКТ (приводит к повышению щелочных резервов крови), длительном лечении стероидными гормонами.

При метаболическом алкалозе повышена концентрация HCO_3^- в плазме, увеличен щелочной резерв крови. Компенсация метаболического алкалоза осуществляется прежде всего за счет снижения возбудимости дыхательного центра при повышении рН, что приводит к снижению частоты дыхания и возникновению компенсаторной гиперкапнии. Кислотность мочи и содержание аммиака в ней понижены.

Кислотно-основное состояние влияет на всасывание лекарственных веществ. От водородного показателя (рН) среды, в которой происходит всасывание, и физико-химических свойств лекарственных веществ зависит соотношение нейтральных молекул и ионов. Эти знания имеют большое значение. Например, в крови при рН 7,4 ацетилсалициловая кислота находится в ионизированной форме, поэтому плохо проникает в ткани. В очаге воспаления (ацидоз) преобладают ее нейтральные молекулы, что увеличивает их проникающую способность. Другой пример, при отравлении производными барбитуровой кислоты для ускорения их элиминации из организма проводят форсированный диурез с использованием мочегонных средств, изотонического раствора глюкозы и натрия гидрокарбоната. Последний создает в первичной моче щелочную среду, в которой ускоряется диссоциация барбитуратов на ионы, не подвергающиеся реабсорбции в почечных канальцах.

16.7. Транспорт кислорода и углекислого газа кровью

В состоянии покоя ткани и органы человека потребляют около 200 мл **кислорода** в минуту. При тяжелой физической работе количество потребляемого тканями кислорода возрастает в 10 и более раз (до 2–3 л/мин). Доставка от легких к тканям такого количества кислорода в виде газа, физически растворенного в плазме, невозможна вследствие его малой растворимости в плазме крови. Функцию переносчика кислорода в организме выполняет гемоглобин, 100 г которого могут связывать 134 мл кислорода, и в состоянии покоя за 1 мин ткани получают 200–240 мл кислорода.

Вспомним, что молекула гемоглобина построена из четырех субъединиц (полипептидных цепей), каждая из которых связана с гемом (см. п. 1.4.5). Следовательно, молекула гемоглобина имеет четыре гема, к которым может присоединяться четыре молекулы кислорода. При этом гемоглобин переходит в оксигемоглобин.

В легочных капиллярах происходит насыщение крови кислородом, а в тканевых капиллярах, где парциальное давление кислорода резко снижено, осуществляется отдача кислорода тканям.

Зависимость между степенью насыщения гемоглобина кислородом и парциальным давлением (pO_2) можно выразить в виде кривой насыщения гемоглобина кислородом, или кривой диссоциации оксигемоглобина, которая имеет S-образную форму и характеризует сродство гемоглобина к кислороду (см. п. 1.4.5).

На способность гемоглобина связывать кислород влияет ряд факторов. Сродство гемоглобина к кислороду в первую очередь связано с рН. Чем ниже рН, тем меньше способность гемоглобина связывать кислород и тем выше P_{50} (парциальное напряжение кислорода, при котором 50 % гемоглобина связано с кислородом). В тканевых капиллярах рН ниже (поступает большое количество CO_2), в связи с чем гемоглобин легко отдает кислород. В легких CO_2 выделяется, рН повышается, и гемоглобин активно присоединяет кислород.

Способность гемоглобина связывать кислород зависит и от *температуры*. Чем выше температура, тем меньше сродство гемоглобина к кислороду (в тканях температура выше, чем в легких). Напротив, снижение температуры вызывает обратное явление.

Образующийся только в эритроцитах *2,3-дифосфоглицерат* (2,3-ДФГ) является важным аллостерическим регулятором связывания кислорода с гемоглобином. Низкое содержание 2,3-ДФГ, в легочных капиллярах повышает сродство гемоглобина к O_2 и способствует образованию оксигемоглобина. Увеличение концентрации 2,3-ДФГ напротив, уменьшает сродство гемоглобина к O_2 и способствует отдаче кислорода тканям.

В целом за сутки с вдыхаемым воздухом в организм человека поступает примерно 600 л кислорода и выделяется в окружающую среду 480 л углекислого

газа (примерно 943 г). В организме человека в состоянии покоя от тканей к легким каждую минуту переносится примерно 180 мл *углекислого газа*.

Организм располагает несколькими механизмами переноса CO_2 от тканей к легким. Часть его переносится в физически растворенном виде. Растворимость CO_2 в плазме крови в 40 раз превышает растворимость в ней кислорода, тем не менее при небольшой артериовенозной разнице $p\text{CO}_2$ в физически растворенном виде может быть перенесено в покое 12–15 мл CO_2 , что составляет 7 % от всего количества переносимого углекислого газа.

Некоторое количество CO_2 может переноситься из тканей в легкие в виде *карбгемоглобина* (HbCO_2), который образуется путем присоединения CO_2 к аминогруппам глобина. Карбгемоглобин — соединение нестойкое и очень быстро диссоциирует в легочных капиллярах с отщеплением CO_2 . В такой форме из ткани к легким переносится от 3 до 10 % всего углекислого газа, поступающего из тканей в кровь. Основная масса CO_2 транспортируется с кровью к легким в форме бикарбоната, при этом также важнейшую роль играет гемоглобин эритроцитов.

В легочных капиллярах, в эритроцитах свободный гемоглобин (Hb) присоединяет кислород и превращается в оксигемоглобин (HbO_2). Образование оксигемоглобина в эритроцитах приводит к отдаче им ионов H^+ . Ионы H^+ реагируют с KHCO_3 , при этом образуется KHbO_2 и H_2CO_3 . Образующаяся угольная

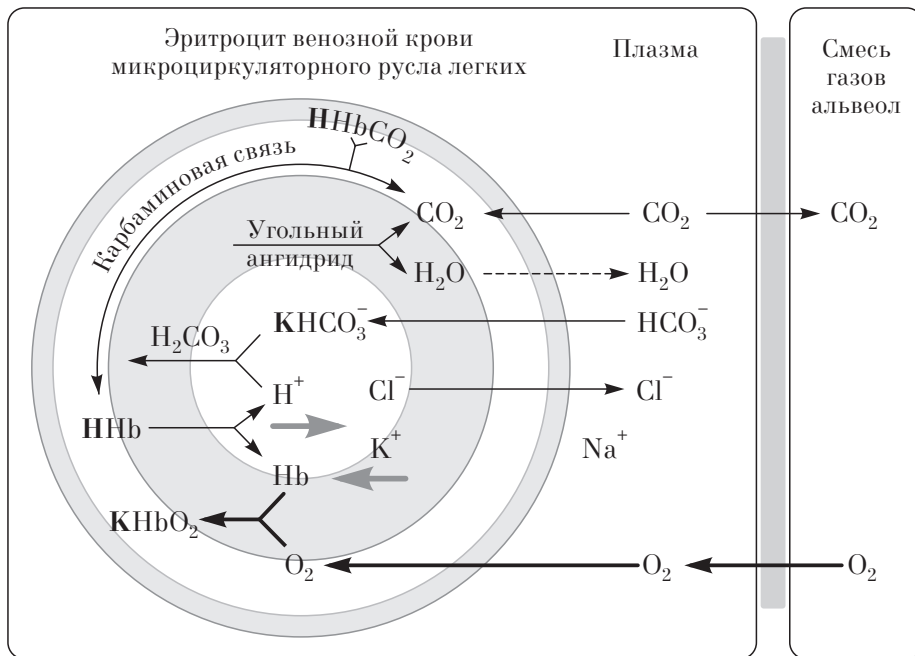


Рис. 16.16. Схема участия гемоглобина эритроцитов венозной крови в транспорте кислорода и углекислого газа

кислота при участии карбоангидразы быстро расщепляется на воду и углекислый газ, который из-за низкого $p\text{CO}_2$ выделяется из эритроцитов в просвет альвеол (рис. 16.16).

По мере снижения концентрации бикарбоната в эритроцитах из плазмы крови в них поступают новые порции ионов HCO_3^- , а в плазму выходит эквивалентное количество ионов Cl^- .

В периферических капиллярах большого круга кровообращения гемоглобин эритроцитов отдает кислород тканям ($\text{KНbO}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{KНb}$) и его способность связывать ионы водорода увеличивается. Одновременно в эритроцит поступает продукт обмена — углекислый газ (рис. 16.17).

Под влиянием фермента карбоангидразы углекислый газ взаимодействует с водой, при этом образуется угольная кислота. Возникающий за счет угольной кислоты избыток водородных ионов связывается с гемоглобином, отдавшим кислород, а накапливающиеся ионы HCO_3^- выходят из эритроцита в плазму. В обмен на эти ионы в эритроцит поступают анионы хлора, в то время как натрий (другой составной элемент хлорида натрия, содержащегося в крови) остается в плазме. В итоге в плазме крови повышается содержание бикарбоната натрия NaHCO_3 .

Итак, в форме бикарбоната при участии гемоглобина эритроцитов транспортируется с кровью к легким более 80 % от всего количества углекислого газа.

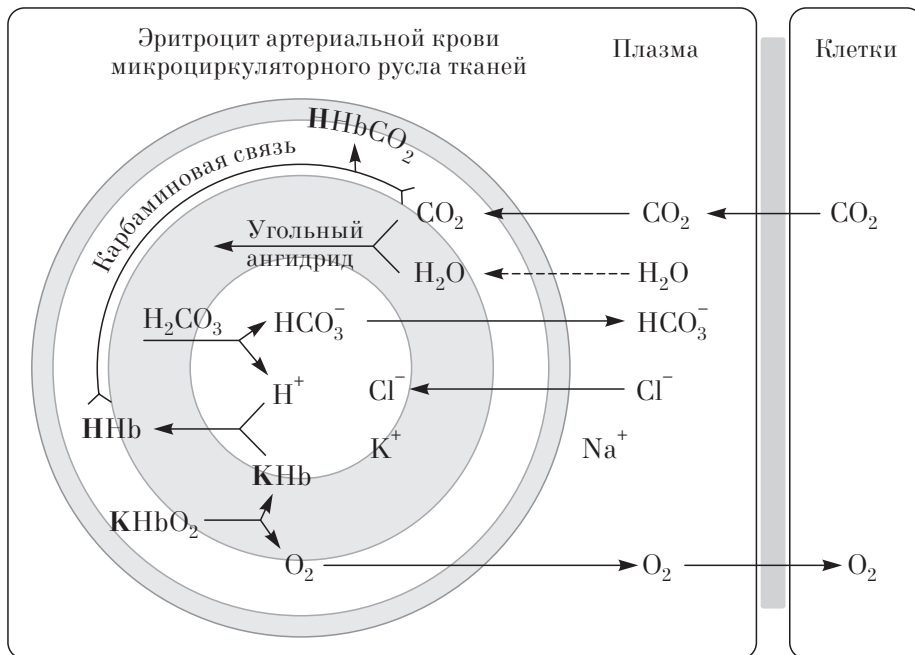


Рис. 16.17. Схема участия гемоглобина эритроцитов артериальной крови в транспорте кислорода и углекислого газа

Сродство гемоглобина к оксиду углерода (угарному газу) больше, чем к кислороду, примерно в 200 раз. Следовательно, СО может вытеснять кислород из оксигемоглобина. Образующийся *карбоксигемоглобин* ($HbCO$) не способен служить переносчиком кислорода, и поэтому угарный газ является ядом. Уже при концентрации 0,1 % СО в воздухе больше половины гемоглобина крови превращается в карбоксигемоглобин. В результате нарушается перенос кислорода от легких к тканям, развивается кислородное голодание и может быстро наступить смерть.

Функционирование гемоглобина могут серьезно нарушать различные лекарственные препараты. *Метгемоглобин* образуется при действии веществ, окисляющих двухвалентное железо гема до Fe^{3+} , приводя к серьезному снижению кислородпереносящей способности крови. Одновременно может происходить окисление глобина. К метгемоглобинообразователям относятся анилин и его производные, некоторые местные анестетики (например, бензокаин), нитриты и нитраты, нитробензол и его производные, оксиды азота, примаксин и сходные с ним противомаларийные средства, некоторые сульфаниламиды и продукты метаболизма фенаcetина.

Как и у большинства животных, у человека на разных стадиях развития организма имеются различные типы гемоглобина в крови (табл. 16.3). Фетальный гемоглобин (HbF) обладает более высоким сродством к кислороду, чем гемоглобин А взрослых людей. Благодаря этому возможен оптимальный перенос кислорода от гемоглобина А матери к гемоглобину F плода.

Таблица 16.3

Типы гемоглобина человека

Тип гемоглобина	Состав субъединиц	Распространенность
Гемоглобин А (HbA)	$\alpha_2\beta_2$	Основной тип гемоглобина у взрослых (95–98 %)
Гемоглобин A_2 (HbA_2)	$\alpha_2\delta_2$	Минорный тип гемоглобина у взрослых (1,5–3,5 %)
Гемоглобин F (HbF)	$\alpha_2\gamma_2$	Основной тип гемоглобина у плода; у взрослых — 0,5–1 %
Hb Гувер-1	$\zeta_2\varepsilon_2$	Эмбриональный гемоглобин
Hb Гувер-2	$\alpha_2\varepsilon_2$	Эмбриональный гемоглобин

В настоящее время известно более 100 мутантных гемоглобинов. Некоторые из аминокислотных замен являются безвредными, «поверхностными», тогда как другие затрагивают кислородсвязывающие участки или взаимодействие субъединиц, что может приводить к изменению связывания кислорода и вызывать заболевания.

Серповидно-клеточная анемия возникает в результате точечной мутации гена β -глобина, которая приводит при его экспрессии к замене в шестом положении β -глобиновой полипептидной цепи Глу на Вал. Следовательно, у индивидуумов с HbS полярная группа боковых цепей (Глу) на внешней поверхности

молекулы заменена неполярной гидрофобной группой (Вал) боковых цепей. За счет гидрофобного взаимодействия между неполярными радикалами валина HbS в его дезоксиконформации полимеризуется с другими молекулами дезоксигемоглобина S, приводя к осаждению гемоглобина в эритроцитах. Осаждение гемоглобина придает эритроциту форму серпа и неустойчивость, что приводит к ускорению гемолиза и изменению эластических свойств мембраны, необходимых во время кровообращения через капилляры. Такие эритроциты вызывают закупоривание капилляров.

Основными симптомами этого заболевания являются гемолитическая анемия и периодически проявляющийся болевой синдром. Интересно, что индивиды, гетерозиготные по HbS, устойчивы к паразиту малярии, который проводит часть своего жизненного цикла в эритроцитах.

16.8. Синтез гемоглобина

Гем синтезируется в клетках всех тканей и органов, но наиболее активно — в печени и костном мозге. Гем является простетической группой ряда жизненно важных сложных белков: гемоглобина, миоглобина, цитохромов дыхательной цепи и цитохрома P₄₅₀, каталазы, тиреопероксидазы, хлорофилла. Эти белки наделены рядом уникальных биологических функций. Они участвуют в фундаментальных процессах жизнедеятельности: фотосинтезе, дыхании клеток, транспорте кислорода и углекислого газа, окислительно-восстановительных реакциях, свето-, цветовосприятии и др.

Наибольшее количество гема содержится в составе гемоглобина эритроцитов, миоглобина миоцитов и в гепатоцитах из-за высокого содержания цитохрома P₄₅₀.

Гем в составе гемоглобина синтезируется клетками костного мозга на этапе преобразования эритробластов в ретикулоциты, а затем в эритроциты. По химической структуре он является циклическим тетрапирролом, который состоит из четырех пиррольных колец, соединенных в плоскую молекулу метиленовыми мостиками. Железо в геме занимает центральное положение в этой плоской молекуле, находится в восстановленном состоянии (Fe^{2+}) и связано двумя ковалентными и двумя координационными связями с атомами азота пиррольных колец (рис. 16.18).

Первая реакция синтеза гема — образование δ -аминолевулиновой кислоты из глицина и сукцинил-КоА (рис. 16.19) — идет в матриксе митохондрий, где в ЦТК образуется один из субстратов этой реакции — сукцинил-КоА. Эту реакцию катализирует пиридоксальфосфатзависимый фермент митохондрий *δ -аминолевулинатсинтаза* (*δ -АЛС*). Она является ключевым ферментом в синтезе гема, поскольку от ее активности зависит интенсивность всего процесса.

Из митохондрий δ -аминолевулиновая кислота поступает в цитоплазму, где проходят промежуточные этапы синтеза гема: соединение двух молекул

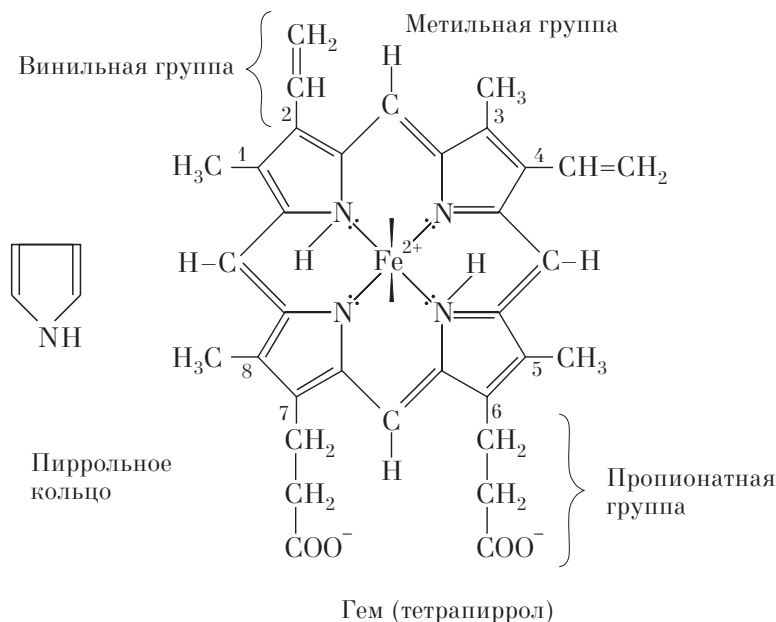


Рис. 16.18. Строение гема

δ -аминолевулиновой кислоты в молекулу порфобилиногена; дезаминирование порфобилиногена и ферментативное превращение в молекулу уropпорфобилиногена III; декарбоксилирование последнего с образованием копропорфириногена III.

Из цитоплазмы копропорфириноген III опять поступает в митохондрии, где проходят заключительные реакции синтеза гема. В результате двух последовательных окислительных реакций копропорфириноген III превращается в протопорфириноген IX, а протопорфириноген IX — в протопорфирин IX. Он является прямым предшественником гема и всех порфиринов. Фермент гемсинтаза (феррохелатаза), присоединяя к протопорфиру IX двухвалентное железо, превращает его в гем. Донором железа служит белок ферритин, депонирующий железо в клетках.

Синтезированный гем, соединяясь с α - и β -полипептидными цепями глобина, образует гемоглобин.

Регуляция синтеза гема. Активность δ -аминолевулинатсинтазы регулируется аллостерически и на уровне транскрипции гена фермента. Гем и гемоглобин являются аллостерическими ингибиторами и репрессорами синтеза δ -аминолевулинатсинтазы. Стероидные гормоны и некоторые лекарственные препараты (барбитураты, диклофенак, сульфаниламиды, эстрогены, прогестины) являются индукторами синтеза аминолевулинатсинтазы. Положительным модулятором δ -аминолевулинатсинтазы служит гипоксия тканей, которая в эритропоэтических тканях индуцирует синтез фермента. Дефицит пиридоксальфосфата

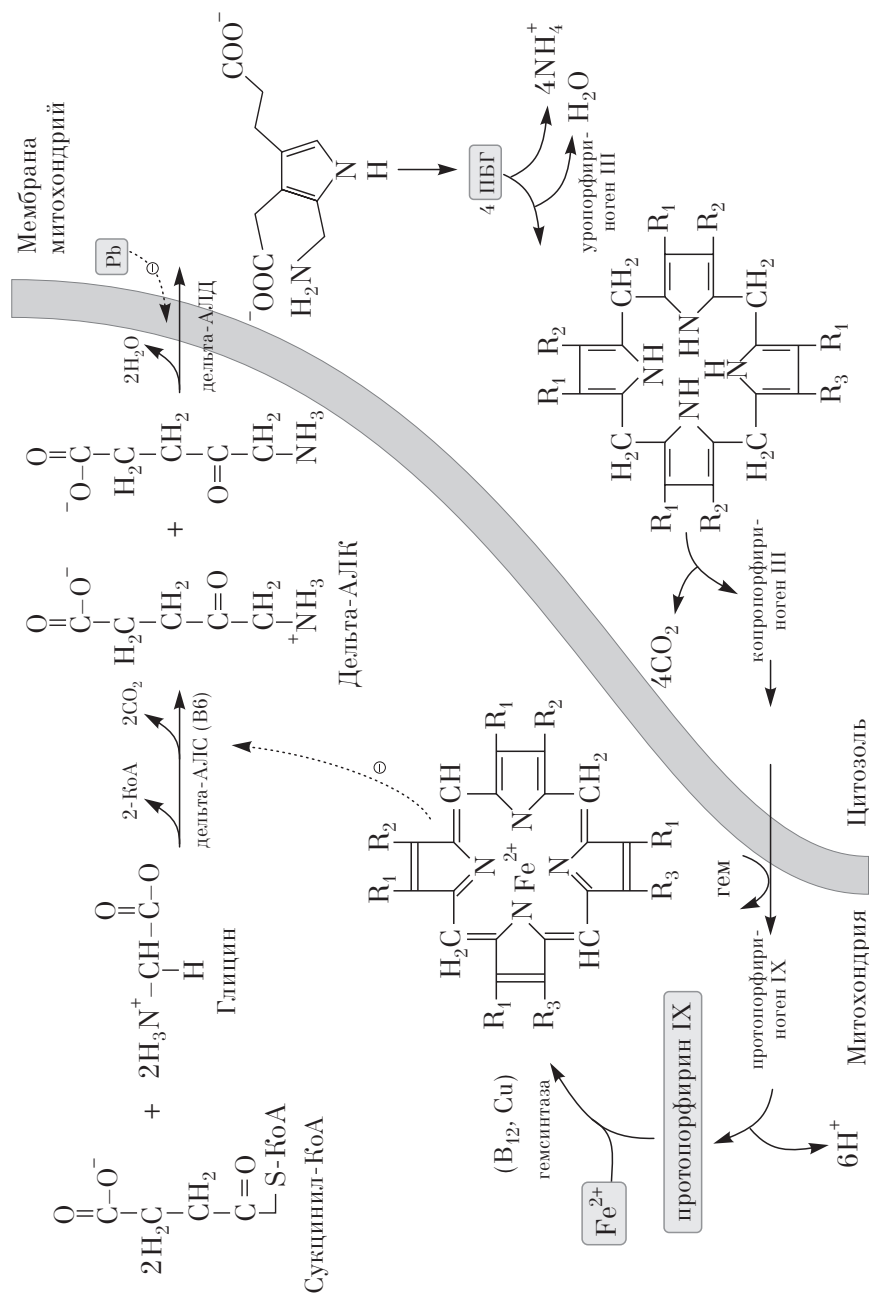


Рис. 16.19. Схема синтеза гема:

дельта-АЛС — δ -аминолевулинатсинтаза; АЛД — δ -аминолевулиновая кислота; дельта-АЛД — δ -аминолевулинатдегидратаза, ПБГ — порфириноген

и лекарственные препараты, которые являются его структурными аналогами (дезоксипиридоксин, изониазид), снижают активность δ -аминолевулинат-синтазы.

δ -Аминолевулинатдегидратаза и гемсинтаза чрезвычайно чувствительны к свинцу и другим тяжелым металлам.

Гем регулирует синтез глобина: при снижении скорости синтеза гема синтез глобина в ретикулоцитах тормозится.

Нарушение образования гема может быть связано с нарушением питания (недостаток Fe, Co, Cu, фолиевой кислоты, витамина B₁₂). При этом развиваются различного рода *анемии*.

В результате генетических дефектов или нарушения регуляции ферментов, участвующих в биосинтезе гема, развиваются *порфирии*. При порфирии накапливаются промежуточные метаболиты синтеза гема — порфириногены, которые оказывают токсическое действие на нервную систему и вызывают нервно-психические нарушения. Порфириногены на свету превращаются в порфирины, которые при взаимодействии с кислородом образуют активные радикалы, повреждающие клетки кожи. Кожа у таких пациентов чрезвычайно чувствительна к свету (фотосенсибилизация). После облучения солнечным светом на ней отмечаются экземопоподобные изменения, трещины.

16.9. Распад гемоглобина

Продолжительность жизни эритроцита составляет 120 дней. По мере снижения активности ферментов эритроцит стареет, захватывается клетками ретикулоэндотелиальной ткани и разрушается. Разрушение эритроцитов происходит главным образом в печени, селезенке и костном мозге. В ходе разрушения из эритроцитов высвобождается *гемоглобин* (8–9 г в сутки).

Распад гемоглобина (рис. 16.20) протекает с образованием гемоглобино-гаптоглобинового комплекса, который подвергается ферментативному окислению. Двухвалентное железо в составе гемоглобина окисляется до Fe³⁺, в результате чего гемоглобин превращается в *метгемоглобин*. Затем начинается разрушение тетрапиррольной структуры гема. Происходит разрыв α -метиновой

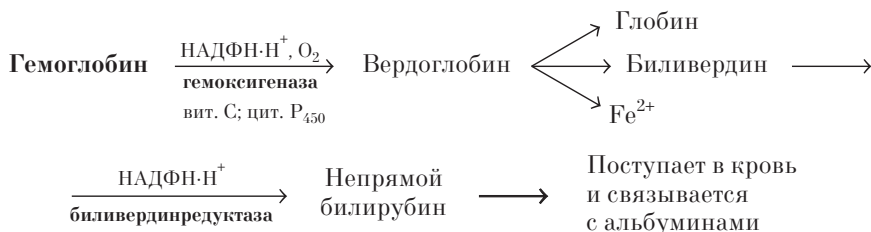


Рис. 16.20. Схема распада гемоглобина

связи между I и II порфириновыми кольцами. Первая реакция катаболизма гема происходит при участии НАДФН·H⁺-зависимого ферментативного комплекса *гемоксигеназы*. Ферментная система локализована в мембране ЭПР. В результате образуется *вердоглобин* (пигмент зеленого цвета).

Дальнейший распад вердоглобина происходит спонтанно с освобождением белка *глобина* и образованием линейного тетрапиррола, пигмента зеленого цвета *биливердина*, монооксида углерода и Fe³⁺. Железо образует комплекс с белком трансферрином, который поступает в ткани, где железо снова может быть использовано для синтеза новых молекул гемоглобина или других железосодержащих белков или депонироваться в виде комплекса с белком ферритином.

Спонтанный распад вердоглобина сопровождается перераспределением связей и атомов водорода в пиррольных кольцах и метиновых мостиках. Затем центральный метениловый мостик биливердина восстанавливается под действием биливердинредуктазы с образованием желтого пигмента *билирубина*, являющегося основным желчным пигментом у человека и животных. Образовавшийся билирубин называется свободным (неконъюгированным) или непрямой. Он не растворяется в воде, токсичен, не проходит через почечные мембраны. Составляет около 75 % общего билирубина крови, по крови транспортируется в комплексе с альбумином. Для его определения в крови необходимо предварительное осаждение белков спиртом. Только после этого билирубин вступает во взаимодействие с диазореактивом Эрлиха. Реакция Эрлиха основана на использовании диазосульфаниловой кислоты, которая при взаимодействии с билирубином дает азобилирубин розового цвета. По интенсивности окраски судят о концентрации билирубина в крови.

Дальнейший метаболизм билирубина осуществляется в печени, где происходит процесс соединения (конъюгации) непрямого билирубина с двумя молекулами глюкуроновой кислоты при участии фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы. Донором глюкуроновой кислоты является УДФ-глюкуронат. Индуктором синтеза УДФ-глюкуронилтрансферазы служит фенobarбитал. Образовавшийся *билирубиндиглюкуронид* называется прямым, связанным или конъюгированным билирубином. Он не токсичен, растворяется в воде, проходит через почечный барьер, дает прямую реакцию с диазореактивом. В норме в крови его содержание не более 25 % от общего билирубина.

Норма общего билирубина в крови — 8,55–20,52 мкмоль/л, из них более 75 % приходится на долю свободного билирубина. При повышении концентрации общего билирубина в крови более 25 мкмоль/л у человека желтеют кожные покровы, слизистые оболочки и склеры. Такое состояние называется *желтуха* (от лат. icterus). Различают гемолитическую, обтурационную и паренхиматозную желтуху.

Гемолитическая желтуха является результатом избыточного образования билирубина вследствие усиленного гемолиза эритроцитов. Возникает при переливании несовместимой крови, резус-конфликте матери и плода, отравлении

солями тяжелых металлов, малярии, пернициозной анемии, серповидноклеточной анемии, талассемии, приеме некоторых лекарственных препаратов.

Отдельные фармацевтические средства могут вызывать усиление разрушения эритроцитов. Гемолиз эритроцитов в данных случаях рассматривается как побочный эффект лекарственного препарата, который уходит при его отмене. К таким лекарственным средствам относятся некоторые анальгетики и антипиретики (ацетилсалициловая кислота и препараты, ее содержащие), мочегонные (Диакарб), препараты нитрофуранового ряда (Фурадонин), сульфаниламиды (сульфален, сульфапиридазин), сахароснижающие (толбутамид, хлорпропамид). Вызывать гемолиз эритроцитов могут также препараты, направленные на лечение туберкулеза (изониазид, ПАСК), и средства против малярии (хинин, акрихин).

Обтурационная желтуха (подпеченочная, механическая) вызывается механической закупоркой желчных путей камнем, опухолью или вследствие воспалительного процесса (холангит), что создает препятствие для поступления билирубинглюкуроида в кишечник и он поступает в кровь.

Паренхиматозная желтуха (печеночная) возникает в случаях тяжелого острого нарушения функциональной способности печени (например, в результате отравления химическими веществами, острого гепатита), когда происходит массивное разрушение печеночных клеток. Другой причиной могут быть дефекты в работе УДФ-глюкуронилтрансферазы: снижение активности или количества фермента, его отсутствие. Вследствие этого нарушается экскреция прямого билирубина в желчные капилляры и он поступает в кровь. Кроме того, снижается способность гепатоцитов к образованию билирубинглюкуроидов, поэтому в плазме крови увеличивается также концентрация непрямого билирубина.

Еще одной формой гипербилирубинемии является *физиологическая желтуха*, наблюдающаяся как временное состояние у новорожденных. Ее причиной является повышенный уровень разрушения эритроцитов ($\text{HbF} \rightarrow \text{HbA}$), незрелое состояние системы поглощения, конъюгации и секреции билирубина, а также избыток эстрогенов и более высокое их сродство к УДФ-ГТ. Накапливающийся билирубин, находясь в неконъюгированной форме, может преодолевать гематоэнцефалический барьер. В ряде случаев это приводит к гипербилирубинемической токсической энцефалопатии (*ядерная желтуха*).

16.10. Кровь как источник лекарственных препаратов

За последние годы обычными стали сложнейшие операции на сердце, крупных кровеносных сосудах, печени, легких. Эти операции требуют больших количеств донорской крови. Велика потребность в донорской крови и при таких состояниях, как ожоги, кровопотери, отравления, травмы и др.

В хирургической практике в качестве компонентов крови достаточно широко применяются эритроцитная масса, тромбоцитная масса, лейкоцитная масса и плазма крови. Для фракционирования крови и получения из нее клеточных элементов в больших количествах применяют методы плазмоцитофереза.

По терапевтической направленности различают препараты крови комплексного (растворы альбумина, плазма), иммунологического (γ -глобулин противокоревой, антистафилококковый, противостолбнячный, противогриппозный), антианемического (эригем, ферковен, гемостимулин, гематоген), фибринолитического (фибринолизин), гемостатического (фибриноген, антигемофильные препараты, тромбин, протромбиновый комплекс) действия.

Существует группа гемостатических средств, применяемых местно для остановки наружных кровотечений: тромбин, гемостатическая губка, фибринная пленка, биологический антисептический тампон и др. Основным действующим веществом этих средств является тромбин, вызывающий образование сгустка в результате превращения фибриногена в фибрин. Особенно эффективно применение препаратов для гемостаза на поврежденной поверхности паренхиматозных органов. В нейрохирургической практике фибринные пленки с успехом применяются для замещения дефицита твердой мозговой оболочки.

В ряде случаев, помимо донорской крови, применяют плазмозамещающие растворы. Ранее они назывались физиологическими растворами и кровезамещающими жидкостями. Плазмозамещающие растворы близки по составу к плазме крови и вводятся в организм в больших количествах (инфузионно) для поддержания жизнедеятельности организма.

Интеграция метаболизма

Наши тела являются интегрированной системой органов, каждый из которых обладает собственными потребностями питания и энергопотребления. Тем не менее, все ткани объединены общей системой кровообращения. Для поддержания организма в благополучном состоянии в кровотоке на постоянном уровне сохраняется концентрация ионов, липидов и углеводов. Это условие должно соблюдаться и в состоянии покоя, и во время активной работы, и после приема пищи.

Процессы, которые обеспечивают такое постоянство, многообразны. Как физическая активность, так и пища существенно изменяют поступление участников метаболизма в кровоток и их поглощение из кровотока. В регуляции этих процессов в соответствии с механизмами прямой и обратной связи принимают участие ферменты, регуляторы биосинтеза белка на уровне ядра клетки, клеточная сигнализация. Объединенные конечным результатом, все эти участники и механизмы составляют суть интеграции метаболизма.

17.1. Условия, обеспечивающие возможность интеграции метаболизма

Важнейшими составляющими интеграции метаболизма являются:

- общие промежуточные продукты в большей части метаболических путей и возможность взаимопревращений через общие метаболиты;
- общие коферменты и необходимость их постоянного взаимопревращения;
- общий путь катаболизма и единая система освобождения и использования энергии (дыхательная цепь);
- схожие механизмы регуляции;
- компартментализация.

Глюкозо-6-фосфат образуется в точке соединения и разветвления таких процессов, как депонирование глюкозы — синтез гликогена, использование запасенного энергетического материала — распад гликогена, синтез НАДФН·Н⁺ — пентозофосфатный путь, производство энергии — аэробный распад глюкозы (рис. 17.1).

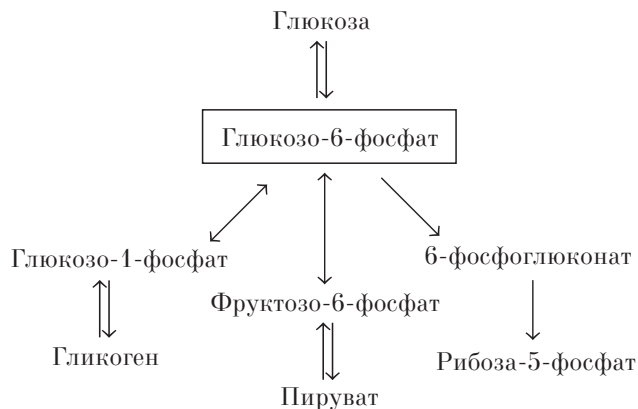


Рис. 17.1. Пути использования глюкозо-6-фосфат

Пируват начинает общий для углеводов, белков и жиров путь катаболизма и открывает для них вход в цитратный цикл, где образуются метаболиты, используемые для глюконеогенеза и синтеза ряда аминокислот. Пируват тоже может быть субстратом для этих синтезов (рис. 17.2).

Ацетил-КоА включает белки, жиры и углеводы в первую реакцию цитратного цикла, а также служит субстратом для синтеза кетонных тел. Кроме того, в период пищеварения он экспортируется в цитозоль в форме цитрата и используется для синтеза жирных кислот. Особенность метаболизма жирных кислот заключается в необратимости превращения ацетил-КоА в пируват и, следовательно, невозможности превращения жирных кислот в глюкозу.

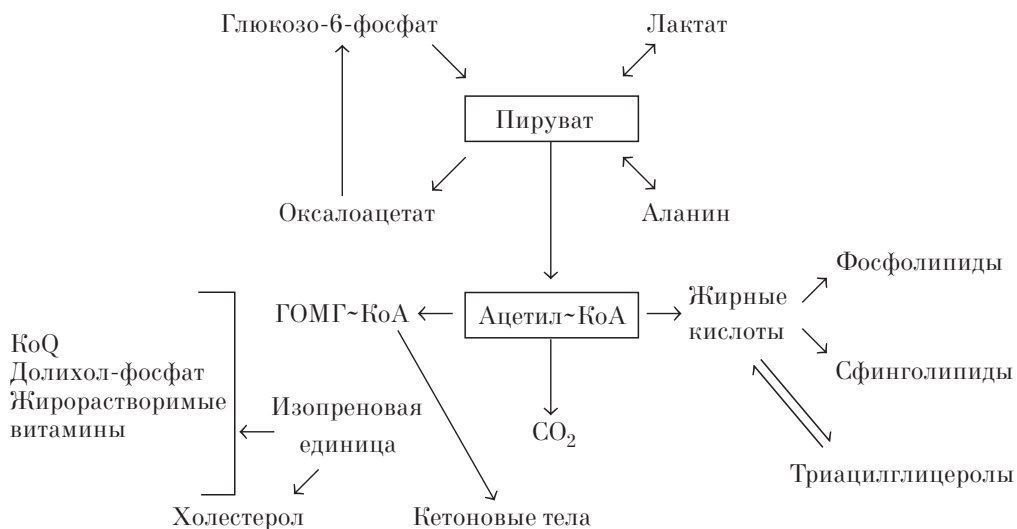


Рис. 17.2. Пути использования пирувата и ацетил-КоА

Катаболические процессы приводят к образованию АТФ, который используется в других внутриклеточных процессах, протекающих с потреблением энергии.

Окислительное расщепление с последующим синтезом АТФ связано с тканевым дыханием. Последнее протекает в митохондриях. В качестве коферментов обычно используются НАД⁺, ФМН и ФАД. Они попеременно восстанавливаются в ходе окислительно-восстановительных реакций, а затем окисляются.

Метаболические взаимопревращения и биосинтезы в основном связаны с цитозолем. НАДФН·H⁺, необходимый для реакций восстановления, образуется также в цитозоле в окислительном пентозофосфатном пути превращения глюкозы (рис. 17.3). Будучи в восстановленном состоянии, он используется во многих биосинтетических процессах (синтез жирных кислот, холестерина, стероидных гормонов, аминокислот). В результате происходит его превращение в окисленную форму.

Катаболические пути конвергентны. Это означает, что благодаря им из различных макромолекул, поступающих с пищей, образуются общие конечные продукты.

Биосинтетические пути дивергентны, благодаря им из небольшого количества предшественников образуется много разных продуктов.

В ходе окислительных путей катаболизма высвобождается энергия, которая запасается в виде АТФ. С этой целью осуществляется расщепление макромолекул, поступающих с пищей. Оно проходит в три стадии (рис. 17.4):

- 1) гидролиз макромолекул до их составляющих;
- 2) превращение составляющих в ацетил-КоА и образование небольшого количества АТФ и НАДН·H⁺;
- 3) окисление ацетил-КоА до воды и диоксида углерода с образованием большого количества АТФ.

В клетках контроль за этапами метаболизма осуществляется путем разделения метаболических процессов по отдельным отсекам (компартаментам). Примеры

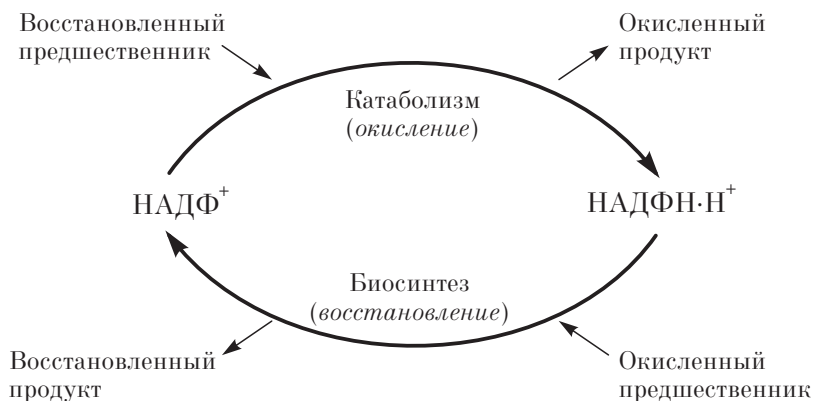


Рис. 17.3. Взаимопревращения НАДФ⁺ и НАДФН·H⁺ в метаболизме

такой компартментализации показаны на рис. 17.5. Гликолиз, пентозофосфатный путь и синтез жирных кислот происходят в цитозоле, а окисление жирных кислот, цикл трикарбоновых кислот и окислительное фосфорилирование — в митохондриях. Судьба некоторых молекул определяется тем, где они

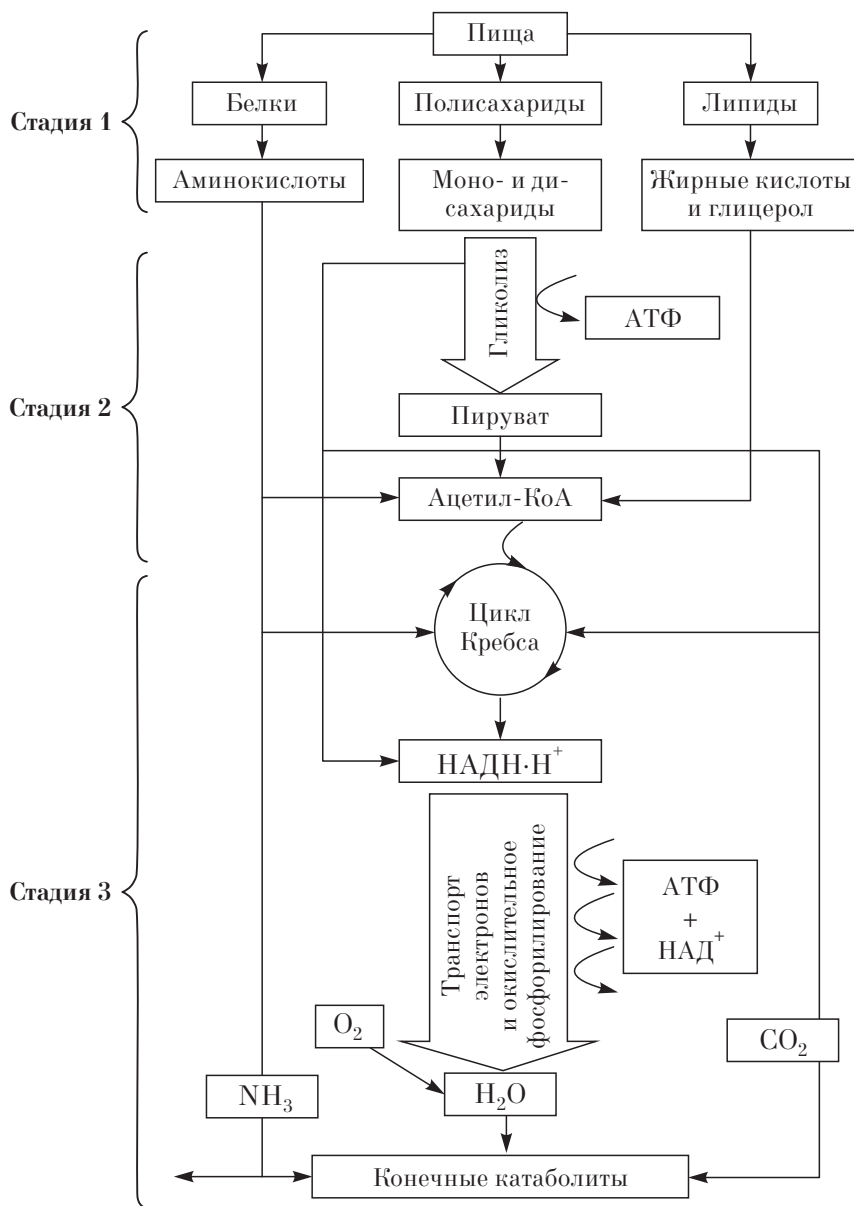


Рис. 17.4. Схема общего пути катаболизма и единой системы освобождения и использования энергии



Рис. 17.5. Компартиментализация метаболических путей

находятся — в цитозоле или митохондриях. Например, в митохондриях жирные кислоты быстро расщепляются, тогда как в цитоплазме они этерифицируются или выделяются во внеклеточное пространство.

Принципиально важная особенность метаболических путей состоит в том, что их скорость определяется не законом действующих масс, а активностью ключевых ферментов. Поток молекул в большинстве метаболических путей определяется прежде всего количеством и активностью определенных ферментов.

Интеграцию метаболизма обеспечивают схожие механизмы регуляции этих параметров. Они сводятся:

- к обеспечению субстратами, так как ферментная реакция не может протекать с нормальной скоростью без достаточного количества субстрата;
- аллостерическим взаимодействиям (см. п. 3.7.1);
- ковалентной модификации структуры фермента, преимущественно к фосфорилированию (см. п. 3.7.3–3.7.4);
- изменению синтеза фермента за счет регуляторного воздействия на процесс транскрипции (см. п. 11.6).

Интеграция метаболизма обеспечивает жизнедеятельность организма как на краткосрочной, так и на долговременной основе. Решающим краткосрочным событием является поддержание на постоянном уровне концентрации глюкозы в крови, необходимой для бесперебойной работы мозга. Однако содержание глюкозы в крови и печени настолько мало, что его достаточно только на несколько минут жизни (табл. 17.1). Поэтому природа позаботилась о создании

резерва глюкозы в организме. Кроме того, обмен углеводов и липидов приспосабливается к окружающим условиям так, что уровень глюкозы резко не изменяется. Таким образом, интеграция метаболизма защищает нас от метаболической катастрофы.

Таблица 17.1

Запасы энергии у человека

Резерв	Количество, г	Обеспечение энергией		
		Голодание	Ходьба	Марафон
Жир	9000–15000	34 сут	11 сут	3 сут
Гликоген мышечный	350	14 ч	5 ч	70 мин
Гликоген печеночный	80	3,5 ч	70 мин	18 мин
Глюкоза внеклеточная (кровь)	20	40 мин	15 мин	4 мин
Белок	6000	15 сут	5 сут	1,3 сут

С другой стороны, глюкоза в крови не является каким-то инертным компонентом пищи. Она может оказывать токсическое действие. Постоянно повышенный уровень глюкозы ведет к гликозилированию белков и развитию слепоты, нейропатии, повреждению почек, как это имеет место при сахарном диабете. Высокая концентрация глюкозы в плазме крови приводит к увеличению уровня циркулирующих триацилглицеролов и развитию сердечно-сосудистых заболеваний. Интеграция метаболизма за счет гормонального контроля и регуляции уровня метаболитов предотвращает такое пролонгированное во времени побочное действие глюкозы.

Попытаемся разобраться в этом интеграционном процессе. Как отмечено выше (см. п. 4.1), наша физическая и умственная активность зависят от энергии, которая черпается из пищи, депонированных липидов и углеводов. Энергия, которая выделяется в ходе окисления этих соединений, вначале затрачивается на образование макроэргических фосфатных связей в составе АТФ. Затем АТФ или АДФ расщепляются до АМФ, и выделяющаяся в ходе этого энергия расходуется на совершение «работы». Следует принять во внимание то обстоятельство, что оборот АТФ протекает с высокой скоростью. В состоянии покоя каждый час обновляется половина образовавшегося АТФ. Фактически в работающих скелетных мышцах весь АТФ используется и регенерирует в течение нескольких минут.

17.2. Источники АТФ

В организме функционирует несколько механизмов образования АТФ, которые все вместе обеспечивают бесперебойное снабжение клеток источниками энергии.

Аденилаткиназная реакция. Протекает в клетках всех тканей. Аденилаткиназа катализирует перенос высокоэнергетического фосфата с одной молекулы АДФ на другую. В результате образуются молекулы АТФ и АМФ.



Уровень АМФ служит определяющим параметром, от которого зависит состояние равновесия между обменом углеводов и жирных кислот в различных физиологических ситуациях. Позже мы увидим, что АМФ является внутриклеточной сигнальной субстанцией, которая сопряжена с деятельностью специальной киназы, контролирующей поступление в клетку и последующий метаболизм жирных кислот. АМФ активирует распад гликогена, тем самым оказывая влияние на метаболизм углеводов.

Креатинкиназная реакция. В большинстве тканей организма содержится креатинфосфат (фосфокреатин). Он выполняет функцию резервного источника высокоэнергетического фосфата, который, будучи перемещен на АДФ, приводит к регенерации АТФ (рис. 17.6). Его количество в 3 раза превышает количество АТФ. К примеру, в мышцах концентрация АТФ составляет 5 ммоль/л, а концентрация креатинфосфата — около 17–20 ммоль/л.

При напряженной мышечной активности (спринтерский бег) резервы креатинфосфата иссякают за несколько секунд. Но этого короткого промежутка времени достаточно, чтобы мышцы смогли взрывообразно усилить свою работу.

Во время проведения олимпийских игр спринтеры способны пробежать 100 м практически на едином дыхании. Половину энергозатрат в этот период обеспечивает высокоэнергетический фосфат в составе креатинфосфата.

Анаэробный метаболизм. Еще одним источником пополнения АТФ в клетках служит анаэробный гликолиз. Напомним, что этот метаболический путь окисления глюкозы не требует кислорода и заканчивается образованием пировата или лактата. Скорость синтеза АТФ в ходе гликолиза вдвое ниже, чем с участием креатинфосфата и креатинкиназы. Энергетический выход окисле-

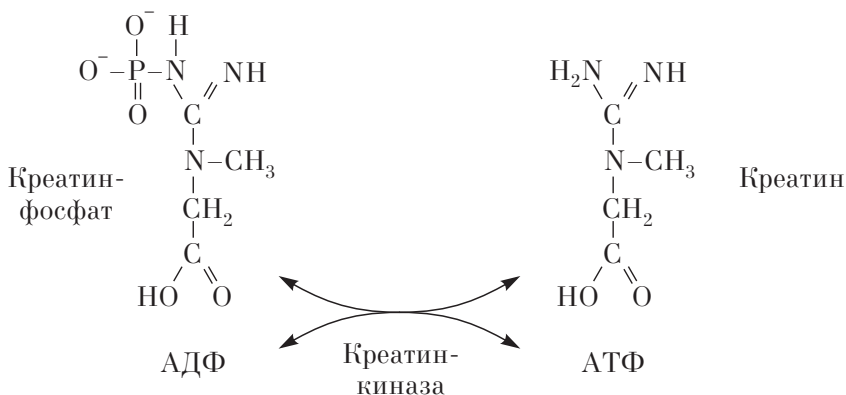


Рис. 17.6. Взаимосвязь креатинфосфата и АТФ

ния одной молекулы глюкозы в этих условиях невелик и составляет 2 молекулы АТФ.

Вместе с тем гликолиз — очень быстрый процесс. Ценность его заключается в том, что он обеспечивает образование большого количества АТФ за короткий промежуток времени. Липиды в анаэробных условиях не могут подвергаться окислению и давать энергию. Остаются глюкоза и гликоген (источник глюкозы).

В условиях интенсивной мышечной работы и активно протекающего гликолиза мышцы быстро расходуют свой гликоген и глюкоза в больших количествах поступает из кровотока. Если бы анаэробный гликолиз в этих условиях оставался основным поставщиком АТФ, быстро развилась бы гипогликемия и нарушение функции ЦНС. Этого не происходит, так как большая часть клеток организма способна к сопряжению поглощения кислорода с синтезом АТФ.

Аэробный метаболизм. Большинство клеток в организме содержат митохондрии, которые способны полностью окислять углеводы, липиды и некоторые аминокислоты до углекислого газа и воды: из этих соединений, поступающих в организм с пищей, в митохондриях образуется общий промежуточный метаболит ацетил-КоА. Приблизительно 30 % энергии, высвобождаемой в процессе полного аэробного окисления ацетил-КоА, расходуется на образование АТФ. При этом кислород восстанавливается и участвует в образовании воды в качестве побочного продукта. Оставшиеся 60 % энергии, которая выделяется в ходе окисления ацетил-КоА, рассеивается в виде тепла.

Аэробное окисление — наиболее эффективный, хотя и относительно медленный, путь образования «полезной энергии».

Повышенная масса тела стала в современных условиях реальной глобальной угрозой здоровью людей. Накопление жира, особенно центрального характера, сопряжено с развитием гипертонической болезни, сахарного диабета 2-го типа и сердечно-сосудистых заболеваний. Было бы заманчиво для предотвращения подобных явлений переключить использование энергопродуцирующих субстратов с углеводов на липиды. Но в действительности это оказывается нереальным. Ткани обладают субстратной специализацией. Метаболизм в мозге полностью зависит от глюкозы крови, так как жирные кислоты не проникают через гематоэнцефалический барьер. Эритроциты не содержат митохондрии, поэтому в них могут протекать только анаэробные метаболические процессы. Соответственно, единственным энергопродуцирующим субстратом для них является глюкоза крови.

Вместе с тем, концентрация глюкозы в крови должна строго контролироваться. Много глюкозы токсично для организма, мало — развивается нарушение деятельности ЦНС. Поэтому уровень глюкозы в плазме крови в состоянии натощак должен поддерживаться в интервале 4-5 ммоль/л и не должен превышать 10 ммоль/л после еды. Достигается такой контроль с помощью гормонов. Основными среди них являются инсулин, глюкагон, адреналин, гормон роста. Другие гормоны контролируют аппетит, т.е. потребление пищи, и секрецию вышеназванных «ключевых» гормонов.

17.3. Контроль липолиза в адипоцитах и внутриклеточного катаболизма жирных кислот

Липолиз в адипоцитах стимулируют адреналин, норадреналин, гормон роста и глюкагон. Происходит это по общему механизму, когда после связывания гормона с рецептором активируется аденилатциклаза и увеличивается концентрация цАМФ, которая, в свою очередь, активирует протеинкиназу А. Затем фосфорилируется гормоночувствительная липаза, происходит расщепление триацилглицеролов и высвобождение в кровоток жирных кислот. Инсулин препятствует этому фосфорилированию за счет снижения образования цАМФ, а также за счет активации протеинфосфатазы, которая катализирует дефосфорилирование гормоночувствительной липазы.

В последнее время выяснилось, что на самом деле все обстоит несколько сложнее. Только активации гормоночувствительной липазы недостаточно, чтобы начался липолиз. Для перемещения липазы на поверхность жировой капли необходим специальный цитозольный белок — *перилипин*. Он активируется путем фосфорилирования при участии протеинкиназы А. Таким образом, от активности этих белков (перилипина и гормоночувствительной липазы) зависит уровень свободных жирных кислот, связанных с альбумином в плазме крови. Концентрация комплекса альбумин — жирные кислоты, в свою очередь, определяет интенсивность метаболизма жирных кислот.

17.3.1. Контроль поглощения и окисления жирных кислот

Метаболизм жирных кислот в разных тканях различается. В главной «химической фабрике» нашего организма — печени — происходит как синтез, так и окисление жирных кислот. В клетках скелетных мышц синтез жирных кислот не происходит, но активно протекает их окисление.

Метаболические процессы, вовлеченные в обмен жирных кислот, распределены между двумя компартментами. Первоначальная активация жирных кислот происходит в цитозоле и заключается в образовании ацил-КоА. Далее ацил, остаток жирной кислоты, перемещается в матрикс митохондрий, где сосредоточены ферменты, катализирующие β -окисление жирных кислот. Механизм этого перемещения и его регуляция подробно рассмотрены в п. 7.5.3. Главная особенность этого перемещения заключается в том, что оно ингибируется малонил-КоА.

Образование малонил-КоА происходит в цитозоле, из поступающего туда из митохондрий ацетил-КоА. Для этого осуществляется реакция карбоксилирования. Ингибитором фермента, который катализирует эту реакцию, является АМФК (АМФ-киназа) или АМФ-активируемая протеинкиназа. Механизм ингибирования заключается в том, что АМФК катализирует фосфорилирование ацетил-КоА-карбоксилазы. Таким образом, увеличенная концентрация

АМФ запускает окисление жирных кислот и следующий за этим синтез АТФ в митохондриях. В то же время усиленное окисление жирных кислот замедляет окисление углеводов.

Напомним, что АМФ образуется в ходе расщепления АТФ. Всякий раз, когда использование энергии превышает синтез АТФ, концентрация АМФ нарастает. В мышцах это инициирует активацию АМФК и останавливает работу ацетил-КоА-карбоксилазы. Тем самым снижается концентрация малонил-КоА и усиливается окисление жирных кислот в митохондриях. Растет образование молекул АТФ.

17.3.2. Сберегающее влияние окисления жирных кислот на углеводы

Запасы углеводов в организме ограничены. При их истощении любая продолжающаяся интенсивная работа привела бы к гипогликемии со всеми ее последствиями. Но этого не происходит, поскольку активация окисления жирных кислот сопровождается снижением использования углеводов в митохондриях.

Ключевым механизмом здесь является регуляция работы пируватдегидрогеназы (ПДГК). Напомним, что этот комплекс включает 3 фермента и 5 кофакторов. Конечный продукт метаболического пути окислительного декарбоксилирования пирувата — ацетил-КоА — ингибирует работу комплекса. В ходе β -окисления жирных кислот образуется много ацетил-КоА, который не позволяет утилизировать пируват, образовавшийся из глюкозы или гликогена.

Инсулину также принадлежит важная роль, поскольку он контролирует фосфорилирование ПДГК. Этот полиферментный комплекс активен в дефосфорилированном состоянии, а инсулин активирует протеинфосфатазу, которая катализирует отщепление от него остатка фосфорной кислоты. Тем самым ПДГК контролируют факторы, происхождение которых связано с приемом пищи (в кровотоке изменяется уровень гормонов) и физической работой (образуется много ацетил-КоА).

Катаболизм углеводов также контролирует сопряженная пара бифункционального фермента фосфофруктокиназа — фруктозодифосфатфосфатаза. Глюкоза крови является основным источником энергии для многих тканей. В обычных условиях от нее полностью зависят клетки крови и мозга. Их метаболизм замкнут на этот субстрат, в то время как резервы углеводов в них отсутствуют. Даже в скелетных мышцах, где значительная часть энергетических потребностей удовлетворяется за счет окисления жирных кислот, при интенсивной работе используются главным образом углеводы. Они так активно поглощаются из кровотока, что возникает опасность развития гипогликемии и на этой основе — потери сознания.

При использовании глюкозы в качестве источника энергии основным контролирующим механизмом является реакция превращения фруктозо-6-фос-

фата во фруктозо-1,6-дифосфат (см. п. 6.7.1). Это самая медленная реакция гликолиза. Ее катализирует фосфофруктокиназа-1 (ФФК-1), активность последней ингибируется АТФ, а стимулируется продуктом расщепления АТФ — АМФ. Рост концентрации АМФ сопровождается подъемом активности ФФК-1.

Активность ФФК-1 также чувствительна к цитрату. Цитрат, образуясь в митохондриях при накоплении там ацетил-КоА, перемещается в цитозоль. Здесь он встраивается в аллостерический центр ФФК-1 и ингибирует ее. Таким образом, интенсивное окисление жирных кислот в перерывах между приемами пищи не только ингибирует пируватдегидрогеназу и окисление пирувата в митохондриях, но и снижает образование пирувата из глюкозы, являясь источником ацетил-КоА и, следовательно, цитрата.

С другой стороны, активность ФФК-1 стимулирует по аллостерическому механизму продукт деятельности бифункционального фермента — фруктозо-2,6-дифосфат (см. п. 6.7.1). Работу бифункционального фермента контролируют гормоны. Те гормоны, которые усиливают гликолиз (инсулин), увеличивают наработку фруктозо-2,6-дифосфата за счет дефосфорилирования бифункционального фермента. Гормоны, которые способствуют фосфорилированию фосфофруктокиназы-2 в составе бифункционального фермента (адреналин, глюкагон, норадреналин), уменьшают уровень фруктозо-2,6-дифосфата и тем самым стимулируют глюконеогенез.

17.4. Центральная роль АМФК в поддержании энергетического баланса

АМФ-киназа (АМФК) является своеобразным энергетическим сенсором в клетке. При высоком энергетическом состоянии клетки (большое количество АТФ) АМФК неактивна. В случае пониженного энергетического состояния (высокий уровень АМФ) АМФК активируется по аллостерическому механизму и катализирует фосфорилирование белков, задействованных в образовании и потреблении АТФ. В качестве аллостерического активатора АМФК выступает АМФ, а АТФ является аллостерическим ингибитором и вытесняет АМФ из аллостерического центра. Таким образом, активность АМФК определяет конкуренция между АТФ и АМФ. Активация АМФК «включает» метаболические пути синтеза АТФ и «выключает» метаболические пути, ответственные за потребление АТФ, такие как биосинтез и клеточный рост.

Молекула фермента АМФК представляет собой гетеротример, состоящий из α -, β - и γ -полипептидных цепей (субъединиц). α -Субъединица является каталитической, на ее N-конце находится типичный для серин/треониновых киназ каталитический домен, на C-конце — домен, функция которого — связывание с β - и γ -субъединицами. γ -Субъединица является регуляторной, на ней находятся два аллостерических центра для связывания АМФ и АТФ. Соединение АМФ с АМФК усиливает активность фермента в 1000 раз.

Активация АМФК ведет к фосфорилированию многих ключевых ферментов энергетического метаболизма. В частности, таким путем активируется фруктозо-2,6-дифосфатаза в составе бифункционального фермента в клетках печени. Фосфорилирование ФФК-2 в составе этого же фермента при участии протеинкиназы А снижает образование фруктозо-2,6-дифосфата (см. п. 6.7.1). В мышечных клетках, в том числе в клетках сердечной мышцы, имеется изофермент ФФК-2. Его фосфорилирование при участии АМФК, наоборот, активирует этот фермент и способствует образованию фруктозо-2,6-дифосфата, усиливая гликолитическое расщепление глюкозы.

Фосфорилирование некоторых других ферментов под влиянием АМФК снижает их активность. К ним относятся ферменты, которые катализируют метаболические пути, потребляющие энергию (гликогенсинтаза (см. п. 6.6.1), ацетил-КоА-карбоксилаза — ключевой фермент биосинтеза жирных кислот, 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктаза — катализирует ключевую реакцию биосинтеза холестерина, см. п. 7.5.1). Кроме того, АМФК фосфорилирует факторы транскрипции, что приводит к снижению экспрессии генов, кодирующих ферменты — участники биосинтетических процессов, и увеличению экспрессии «катаболических» генов.

Благодаря таким свойствам, АМФК играет центральную роль в энергетическом балансе многоклеточных организмов. В скелетных мышцах этот фермент активируется гормонами адипонектином и лептином. Механическая работа также активирует мышечную АМФК. Будучи активной, АМФК стимулирует в скелетных мышцах поглощение глюкозы, окисление жирных кислот, ферменты и транскрипционные факторы митохондрий, вовлеченные в процессы энергопродукции.

В клетках печени действие АМФК направлено на снижение потребления АТФ за счет замедления синтеза жирных кислот, холестерина и глюконеогенеза. Метформин (широко используемый лекарственный препарат для лечения диабета 2-го типа) снижает уровень глюкозы посредством ингибирования в печени глюконеогенеза. Этот эффект достигается за счет активации АМФК. В то же время АМФК блокирует секрецию инсулина β -клетками поджелудочной железы.

АМФК также оказывает влияние на так называемое «пищевое поведение», проявляя свою активность в гипоталамусе — основном регуляторе поглощения пищи.

17.5. Гормональная регуляция энергетического метаболизма

Активность ферментов, упомянутых в предыдущих параграфах, находится под строгим гормональным контролем. Гормоны регулируют активность ферментов, тем самым обеспечивая адаптацию процесса энергопродукции

в различные периоды после приема пищи, а также в ответ на внешние воздействия.

Инсулин. Увеличение концентрации глюкозы в кровотоке стимулирует секрецию инсулина поджелудочной железой. В результате:

- увеличивается поглощение глюкозы из кровотока скелетными мышцами;
- ингибируется глюконеогенез и гликогенолиз в печени, стимулируется поглощение ею глюкозы;
- ингибируется липолиз в жировой ткани.

Мышечная ткань и печень не просто поглощают глюкозу. Здесь она вовлекается в образование гликогена. В скелетных мышцах глюкоза используется в качестве субстрата для «аэробного гликолиза». Приблизительно 25 % углеводов пищи используется в качестве источника энергии в скелетных мышцах.

Рост концентрации инсулина в крови продолжается в течение 1 ч после приема пищи и затем быстро прекращается. Колебания уровня глюкозы в плазме крови происходят в противоположном направлении, а влияние его на метаболизм противоположно инсулину.

После приема пищи инсулин за счет снижения интенсивности липолиза замедляет высвобождение в кровоток жирных кислот из адипоцитов. Мышцы же поглощают жирные кислоты из плазмы крови пропорционально их концентрации в крови. С другой стороны, уровень свободных (неэстерифицированных) жирных кислот в плазме крови имеет обратную корреляционную связь с чувствительностью тканей к инсулину. У людей с повышенной массой тела и ожирением в сыворотке крови постоянно увеличена концентрация жирных кислот.

Как уже отмечалось ранее, свободные жирные кислоты тормозят активирующее действие инсулина на поглощение клетками глюкозы. Это позволяет сделать вывод, что свободные жирные кислоты причастны к развитию устойчивости клеток к действию инсулина и, тем самым, к развитию сахарного диабета 2-го типа.

Адреналин. Когда организм оказывается в стрессовой ситуации, сигналы из мозга инициируют высвобождение из мозгового вещества надпочечников адреналина и норадреналина. Оба эти гормона усиливают сердечный выброс и кровяное давление. Вследствие этого растет доставка кислорода в ткани. Адреналин связывается с рецепторами, расположенными в мембране миоцитов, адипоцитов и гепатоцитов. В гепатоцитах посредством каскада цАМФ-зависимого фосфорилирования адреналин стимулирует глюконеогенез и расщепление гликогена, одновременно инактивируя гликогенсинтазу. Расщепление гликогена сопровождается выходом глюкозы в кровоток. Адреналин стимулирует гликолиз в клетках мышечной ткани за счет увеличения образования фруктозо-2,6-дифосфата (см. п. 6.7.1) и увеличивает мобилизацию жирных кислот из жировой ткани.

Глюкагон. Секреция его в кровоток растет в ответ на снижение уровня глюкозы. Он стимулирует гликогенолиз и глюконеогенез в печени, ингибирует

синтез гликогена и гликолиз. Связываясь с рецепторами в адипоцитах, глюкагон активирует жиromобилизующую липазу, которая катализирует расщепление триацилглицеролов на глицерол и жирные кислоты. Все эти регуляторные влияния на метаболизм вызваны опосредованным цАМФ каскадом фосфорилирования белков.

Кортизол. Этот стероидный гормон секретируется из коркового слоя надпочечников в кровоток в ответ на длительную стрессовую ситуацию (тревожное состояние, страх, боль, инфекции, длительно сохраняющийся низкий уровень глюкозы в крови). Мишенями для него являются мышцы, печень, жировая ткань. Кортизол воздействует на активность ферментов за счет изменения экспрессии кодирующих их генов. В жировой ткани кортизол стимулирует высвобождение жирных кислот из триацилглицеролов. В мышцах кортизол стимулирует расщепление белков до аминокислот, которые в печени используются в глюконеогенезе. Кортизол стимулирует глюконеогенез за счет увеличения концентрации пируваткарбоксилазы (один из ключевых ферментов) в гепатоцитах.

17.6. Особенности метаболических путей в отдельных органах и системах

В многоклеточных организмах имеются органнe системы, осуществляющие специфические функции. Для этого в каждом органе имеется свой специализированный комплекс метаболических путей, которые делают возможным выполнение этих функций. Тем не менее, ткани организма работают как единое целое, обеспечивая поддержание энергетического гомеостаза, т.е. поддержание в кровотоке достаточного количества источников энергии.

17.6.1. Мозг

Мозг имеет две важнейшие особенности метаболизма.

Во-первых, в нем чрезвычайно развиты метаболические пути, зависящие от кислорода. В состоянии покоя у взрослого человека мозг использует 20 % поступающего в организм кислорода, хотя масса самого мозга составляет только 2 % массы всего тела. Примечательно, что эта закономерность не зависит от умственной активности и сохраняется даже во время сна.

Во-вторых, в мозге отсутствуют значительные энергетические резервы — нет гликогена, резервов расходуемого белка или липидов. В норме мозг использует в качестве энергетического источника только глюкозу, поэтому он полностью зависит от ее поступления из крови. Нарушение этого процесса даже на короткий период времени (например, при инсульте) чревато необратимыми изменениями функции этого органа.

Клетки мозга используют глюкозу для синтеза АТФ посредством тканевого дыхания. Поддержание за счет этого процесса высокого уровня АТФ необходимо для обеспечения постоянной работы Na^+/K^+ -АТФазы, локализованной в плазматической мембране клеток. Тем самым в клетках поддерживается мембранный потенциал, который необходим для передачи нервного импульса.

Во время продолжительного голодания запасы гликогена в организме исчерпываются. Тогда мозг приобретает способность использовать в качестве источника энергии β -гидроксibuтират за счет его расщепления до ацетил-КоА и последующего окисления в цикле трикарбоновых кислот. β -Гидроксibuтират образуется в печени в ходе β -окисления жирных кислот и образования большого количества ацетил-КоА. Мозг лишен возможности использовать свободные жирные кислоты или липиды крови в качестве источника энергии, однако косвенно это происходит за счет образования в печени β -гидроксibuтирата.

Еще одним потенциальным источником энергии во время длительного голодания является глюкоза, образовавшаяся в ходе глюконеогенеза в печени. Для этих целей используются безазотистые остатки аминокислот, которые поступают в печень в результате расщепления белков мышц. Учитывая, что расщепление белка происходит в ущерб функции мышц, приобретенная способность клеток мозга использовать β -гидроксibuтират носит адаптивный характер, направленный на защиту мышц от потери белка.

17.6.2. Мышцы

В состоянии покоя на обеспечение метаболических процессов в мышцах расходуется до 30 % поглощенного кислорода. Во время максимального напряжения скелетных мышц эта цифра может составлять до 90 %. Метаболизм в мышцах преимущественно направлен на образование АТФ в качестве источника энергии для обеспечения мышечного сокращения и расслабления. Мышечное сокращение происходит, когда импульс, передаваемый двигательными нервными окончаниями, вызывает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных компартментов (поперечных трубочек и саркоплазматического ретикулума). Ca^{2+} выходит в саркоплазму и связывается там с тропонином С. Последний является регуляторным белком, инициирующим цепь событий, в результате которых толстые нити миозина скользят вдоль тонких нитей актина. Это механическое перемещение требует затраты энергии гидролиза АТФ. В результате мышца укорачивается. Расслабление происходит, когда ионы кальция закачиваются обратно в саркоплазматический ретикулум под действием Ca^{2+} -транспортирующей мембранной АТФазы.

За счет гидролиза одной молекулы АТФ переносятся два катиона Ca^{2+} . Количество АТФ, затраченного на расслабление, приблизительно такое же, как на сокращение.

Поскольку мышечное сокращение не непрерывный процесс и происходит при необходимости, метаболизм в мышцах призван обеспечить такую эпизо-

дичность. В состоянии покоя мышцы используют в качестве энергетических источников свободные жирные кислоты, глюкозу или кетоновые тела. При этом АТФ образуется за счет окислительного фосфорилирования. В покое-щихся мышцах содержится также около 2 % от мышечной массы гликогена и 0,08 % креатинфосфата. В ходе использования АТФ для мышечного сокращения образующийся АДФ может регенерировать в АТФ под влиянием фермента креатинкиназы и расщепления креатинфосфата.

Во время интенсивной мышечной работы (например, при спринтерском беге на 100 м) имеющегося количества креатинфосфата достаточно, чтобы обеспечить образование АТФ, необходимого для мышечного сокращения в течение 4 с. В дальнейшем, когда запасы креатинфосфата исчерпаны, единственным источником энергии становится гликоген. В ходе его фосфоролиза образуется глюкозо-6-фосфат, который расходуется на образование АТФ посредством гликолиза. В отличие от лимоннокислого цикла и окислительного фосфорилирования, гликолиз способен практически мгновенно увеличить в 2000 раз окисление глюкозо-6-фосфата. Для этого требуются Ca^{2+} и гормон адреналин.

Использование креатина в качестве пищевой добавки. У человека массой 70 кг в организме содержится около 120 г креатина. Он поступает в организм с мясной пищей и синтезируется в клетках из своих предшественников (аргинина, глицина и метионина); 95 % креатина сосредоточено в скелетных и гладких мышцах, 70 % его находится там в виде креатинфосфата.

Ежедневное добавление в пищу 20–30 г креатина в течение 4–21 дня может увеличивать содержание креатина в мышцах на 50 %, в особенности у людей с изначально низкой концентрацией этого вещества. Ежедневное добавление в пищу 2 г креатина способно поддерживать повышенный его уровень в организме. Исследования показали, что добавление в пищу креатина улучшает спортивные результаты, связанные с очень интенсивной и кратковременной мышечной работой (например, в тяжелой атлетике). При длительном мышечном напряжении (например, бег на длинные дистанции) добавки креатина не приносят эффекта.

Такие различия в значимости добавления креатина становятся понятны с точки зрения использования креатинфосфата в качестве субстрата креатинкиназы для регенерации АТФ из АДФ. Интенсивная мышечная работа очень быстро (менее чем за 2 с) истощает запасы АТФ. Креатинфосфат в мышцах позволяет восстановить уровень АТФ в течение нескольких дополнительных секунд, но не больше. Таким образом, использование креатина в качестве пищевой добавки должно быть индивидуальным и только после консультации с врачом.

Мышечная усталость — это неспособность мышц поддерживать сократительную способность необходимой интенсивности. При максимальном мышечном напряжении приступ усталости занимает около 20 с. Усталость — это не результат истощения резервов гликогена. Она вызвана снижением рН, так как во время гликолиза накапливаются протоны водорода. Превращение

1 молекулы глюкозы в 2 молекулы лактата в ходе гликолиза сопровождается высвобождением двух ионов H^+ . Значение рН может достигать 6,4. Предполагают, что при низком значении рН снижается активность ФФК-1. Вследствие этого интенсивность гликолиза снижается и образуется недостаточно АТФ, что и вызывает ощущение усталости. Одним из преимуществ этого механизма является то обстоятельство, что оставшееся количество АТФ в этот период не расходуется в фосфофруктокиназной реакции. Таким образом, предотвращается потеря клеткой всего имеющегося количества АТФ.

В состоянии натошак или при избыточной мышечной активности белок скелетных мышц разрушается до аминокислот и их безазотистые остатки могут использоваться в качестве источника энергии. Многие из них превращаются в пируват, который путем трансаминирования преобразуется в аланин. Он выходит в кровоток и транспортируется в печень. Там аланин опять превращается в пируват, который вовлекается в глюконеогенез. Однако этот путь слишком затратен для организма, поскольку мышцы теряют свой белок и, тем самым, свою функциональную способность. Поэтому мышечный белок представляет источник топлива последней очереди.

17.6.3. Сердце

В отличие от прерывающегося функционирования скелетных мышц, активность сердечной мышцы постоянна и ритмична. Для обеспечения такой деятельности сердце является полностью аэробным органом, клетки которого чрезвычайно богаты митохондриями (приблизительно половина объема цитоплазмы кардиомиоцитов занята митохондриями). В условиях нормальной работы основным энергетическим топливом для этих клеток служат жирные кислоты. В ходе их β -окисления образуется ацетил-КоА, который окисляется в цикле трикарбоновых кислот. В результате за счет окислительного фосфорилирования образуется много АТФ, обеспечивающего сокращение мышечных волокон.

Энергетические резервы сердечной мышцы минимальны. Там имеется сравнительно небольшое количество креатинфосфата и гликогена. Поэтому сердце должно непрерывно снабжаться кислородом и источниками энергии: свободными жирными кислотами, глюкозой или кетоновыми телами.

17.6.4. Жировая ткань

Жировая ткань широко распространена по всему организму: она окружает сосуды, находится в брюшной полости, молочных железах, формирует депо в подкожном жировом слое. Ранее единственной функцией жировой ткани считалось депонирование липидов. В настоящее время ее также рассматривают как эндокринный орган, ответственный за секрецию ряда гормонов, которые определяют формирование так называемого «пищевого поведения» и энергетического гомеостаза.

Основным структурно-функциональным компонентом жировой ткани являются *адипоциты*, которые потеряли способность к репликации. Однако их количество может расти, если увеличивается количество предшественников адипоцитов, обладающих пролиферативной способностью. Так происходит, например, при ожирении.

Триацилглицеролы, которые депонируются в адипоцитах в виде липидных включений, составляют 65 % массы жировой ткани. У взрослого человека массой 70 кг запасающихся таким образом липидов достаточно, чтобы поддерживать уровень расхода энергии 6000 кДж/сут в течение 3 месяцев. Этого вполне достаточно для обеспечения жизнедеятельности организма при условии, что он не испытывает недостатка в азоте, минеральных элементах и витаминах.

Для адипоцитов характерен высокий уровень метаболической активности, связанной с синтезом и распадом триацилглицеролов. Средний период их обновления составляет несколько суток. В адипоцитах активно функционирует тканевое дыхание за счет окисления глюкозы аэробным путем и последующего окислительного фосфорилирования. При высоком содержании в пище глюкоза превращается в адипоцитах в ацетил-КоА, который расходуется на синтез жирных кислот. Однако в период между приемами пищи основным источником жирных кислот для синтеза триацилглицеролов в адипоцитах выступает печень.

Особенностью этих клеток является отсутствие в них фермента глицеролкиназы, что делает невозможным образование таким путем глицерол-3-фосфата — второго (помимо жирных кислот) исходного субстрата для функционирующего здесь глицерофосфатного пути синтеза триацилглицеролов. Поэтому поступающая из кровотока глюкоза, подвергаясь гликолическому расщеплению, превращается в адипоцитах в дигидроксиацетон-3-фосфат, который, в свою очередь, подвергается действию фермента глицерол-3-фосфатдегидрогеназы и восстанавливается в глицерол-3-фосфат. Для обеспечения синтеза жирных кислот адипоциты нуждаются в НАДФН·Н⁺, источником которого является пентозофосфатный путь окисления глюкозы.

Таким образом, глюкоза играет решающую роль в метаболизме триацилглицеролов в адипоцитах. Если ее уровень достаточен, то за счет гликолиза образуется глицерол-3-фосфат и жирные кислоты, высвобождающиеся в ходе расщепления триацилглицеролов под действием жиромобилизующей липазы, используются для ресинтеза новых триацилглицеролов. Если же уровень глюкозы низок, то падает концентрация глицерол-3-фосфата и высвобождающиеся из триацилглицеролов жирные кислоты поступают в кровоток (см. п. 7.6.2).

Бурая жировая ткань. Как указывалось в п. 5.3.9, в организме новорожденных и у животных, впадающих в зимнюю спячку, обнаружена особая разновидность жировой ткани — *бурая жировая ткань*. Коричневую окраску ей придают многочисленные митохондрии, которые имеются в адипоцитах и богаты цитохромами. В митохондриях активно функционирует дыхательная цепь и, следовательно, идет интенсивное перемещение протонов в межмембранное

пространство. Однако здесь же имеется уникальный белок *термогенин* (разобщающий белок 1). Он создает своеобразные каналы во внутренней мембране митохондрий, через которые протоны из межмембранного пространства перемещаются в матрикс. Тем самым они не участвуют в синтезе АТФ, а энергия окисления (главным образом жирных кислот) расходуется на выделение тепла.

17.6.5. Печень

Печени принадлежит центральное место в межорганном метаболизме. Благодаря ее функционированию, в крови поддерживается необходимый уровень питательных веществ для использования их мозгом, мышцами и другими тканями. Этому способствует уникальное расположение печени в организме: все питательные вещества, подвергшиеся всасыванию в кишечнике (за исключением жирных кислот), попадают в воротную вену, а по ней — в печень.

Одной из основных функций печени является поддержание постоянного уровня глюкозы в крови. Это осуществляется путем поглощения или высвобождения глюкозы в ответ на изменение уровня глюкагона, адреналина и инсулина, равно как в ответ на изменение концентрации самой глюкозы в кровотоке. После принятия пищи, обогащенной углеводами, когда концентрация глюкозы в крови достигает 6 ммоль/л, глюкоза поступает в печень и превращается там в глюкозо-6-фосфат. Эту реакцию катализирует глюкокиназа (см. п. 6.5).

Противоположно миоцитам и адипоцитам, клетки печени проницаемы для глюкозы, поэтому инсулин не оказывает прямого влияния на ее поглощение. Поскольку концентрация глюкозы в крови в норме меньше K_M глюкокиназы, интенсивность фосфорилирования глюкозы в печени более или менее пропорциональна концентрации глюкозы в крови. Другие моносахариды, подвергшиеся всасыванию в кишечнике (фруктоза, галактоза, манноза), в печени также превращаются в глюкозо-6-фосфат (см. главу 6).

Натощак уровень глюкозы падает до 4 ммоль/л. Печень препятствует дальнейшему падению за счет расщепления гликогена и выхода глюкозы в кровь. Вдобавок лактат, продукт анаэробного расщепления глюкозы в мышцах, поступает в печень и используется там в глюконеогенезе, синтезе липидов.

В клетках печени идет активный липидный метаболизм. Жирные кислоты здесь могут иметь различную судьбу:

1) когда потребность в продуктах метаболизма как источнике топлива высока, жирные кислоты расщепляются до ацетил-КоА, из него синтезируются кетонные тела (п. 7.5.7), которые через кровоток поступают в периферические ткани;

2) когда потребность в источниках энергии — продуктах внутриклеточного метаболизма низкая, жирные кислоты используются для синтеза триацилглицеролов, фосфолипидов, которые в составе липопротеинов секретируются в кровоток (см. п. 7.4.3–7.4.5).

Поскольку интенсивность окисления жирных кислот зависит от их концентрации в клетке, следовало бы ожидать, что новосинтезированные в гепатоцитах жирные кислоты до того, как попадут в кровоток, могут подвергнуться реокислению. На самом деле окисление жирных кислот происходит в митохондриях, а синтез — в цитозоле. Карнитинацилтрансфераза I, один из компонентов системы, транспортирующей жирные кислоты в митохондрии, ингибируется малонил-КоА, ключевым промежуточным продуктом биосинтеза жирных кислот. Если потребности в метаболическом топливе низкие, новосинтезированные жирные кислоты не могут попасть в митохондрии для превращения в ацетил-КоА. Тогда источником ацетил-КоА для процессов биосинтеза в печени является окисление глюкозы.

Когда потребность в метаболическом топливе растет, то биосинтез жирных кислот замедляется, но они поступают в митохондрии для превращения в кетоновые тела. Образовавшиеся кетоновые тела печень не может использовать для удовлетворения своих энергетических потребностей, так как в гепатоцитах отсутствует фермент 3-кетоацил-КоА-трансфераза. При этом в крови падает уровень глюкозы, а в печени — активность глюкокиназы. В результате глюкоза не задерживается в клетках печени и идет «на экспорт». Тогда основным источником ацетил-КоА в этом органе становится не глюкоза, а жирные кислоты. Путем окисления этого ацетил-КоА в лимоннокислом цикле с последующим окислительным фосфорилированием в печени образуется АТФ.

Уровень аминокислот в плазме крови также регулируется печенью. Аминокислоты, высвобождающиеся в ходе переваривания белков либо образующиеся в результате расщепления белков мышц, с током крови воротной вены попадают в печень, где подвергаются катаболизму, в том числе переаминированию и дезаминированию (рис. 17.7). При этом безазотистые остатки большей

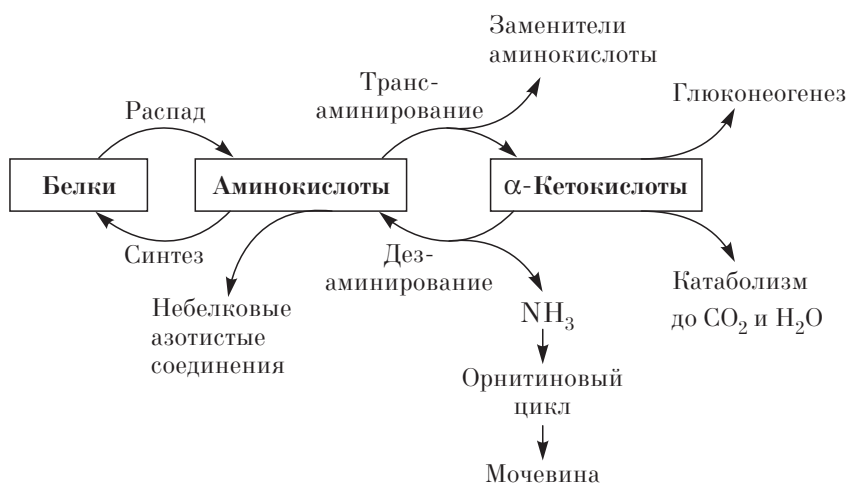


Рис. 17.7. Схема обмена аминокислот в печени

части аминокислот включаются в промежуточный метаболизм для синтеза глюкозы (глюконеогенез) либо используются для получения энергии, превращаясь в пируват (Ала, Сер) или в один из метаболитов ЦТК.

Некоторые аминокислоты в процессе катаболизма превращаются в ацетоацетат (Лиз, Лей) или ацетил-КоА (Тир, Фен, Трп, Иле, Тре) и могут использоваться в синтезе кетонных тел.

Аммиак, образующийся в реакциях метаболизма аминокислот в печени, а также возникающий в процессе гниения белков в толстом кишечнике, в гепатоцитах превращается в мочевины и таким образом обезвреживается.

Печень является единственным органом, который в больших количествах поставляет в кровь белки. За исключением иммуноглобулинов, синтезируемых лимфоцитами, в печени образуются все белки плазмы крови. К важнейшим из них относятся белки свертывающей системы крови (протромбин, фибриноген, факторы свертывания V, VII, IX, X, XI, XII), альбумины, α - и β -глобулины, в том числе транспортные белки (ферритин, церулоплазмин, транскортин, ретинолсвязывающий белок и др.), ферменты (липопротеинлипаза, холинэстераза, псевдохоллинэстераза). В печени синтезируются и небелковые азотсодержащие вещества (холин, креатин, никотинамид, нуклеотиды и т.д.).

Помимо вышеназванных, печень выполняет ряд других функций в организме. Наиболее важными среди них являются расщепление порфиринов (см. п. 16.9) и нуклеиновых кислот (см. п. 10.4–10.5), депонирование железа и катаболизм (деактивация) путем реакций окисления, восстановления, гидролиза, конъюгации и метилирования биологически активных соединений, таких как гормоны, яды, лекарственные вещества (см. п. 18.6).

Представленных сведений уже достаточно, чтобы представить межорганную метаболическую адаптацию к изменяющимся условиям в организме. Именно она определяет наши ощущения, поведение, потребности в любой период жизни. Попробуем в краткой форме проследить ее в связи с приемом пищи.

17.7. Межорганный метаболизм после приема пищи

После приема пищи в крови увеличивается концентрация глюкозы и инсулин высвобождается в кровоток, в то время как поступление туда глюкозы снижается (рис. 17.8). Всосавшиеся продукты переваривания компонентов пищи поступают в воротную вену и с током крови достигают печени.

Инсулин стимулирует поступление значительного количества глюкозы в клетки печени. В гепатоцитах он активирует гликолиз, за счет чего образуется АТФ. Оставшееся количество поступающей глюкозы превращается здесь в гликоген и триацилглицеролы.

В этот период в гепатоцитах идет активное образование из глюкозы жирных кислот и глицерола. Новосинтезированные триацилглицеролы в нормальных

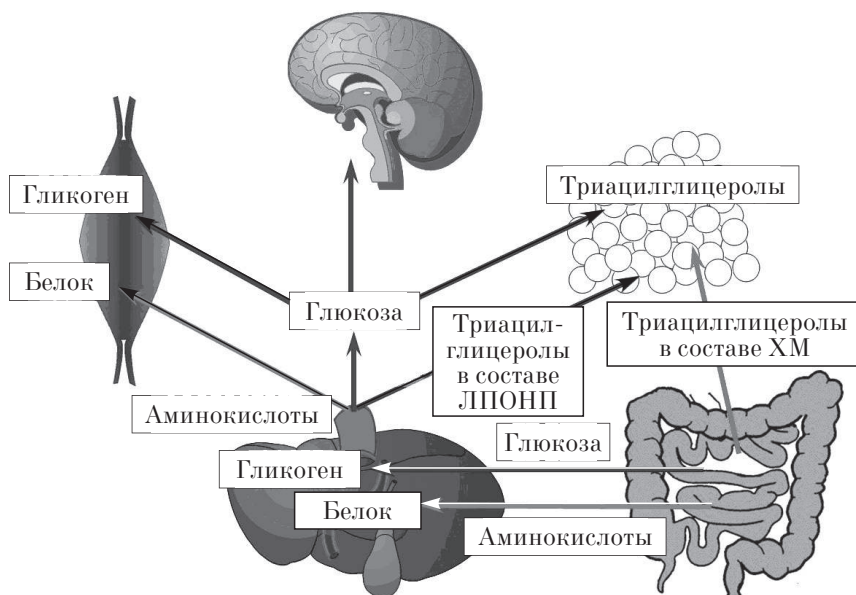


Рис. 17.8. Межорганные потоки метаболитов после приема пищи

условиях в печени не задерживаются. Вместе с фосфолипидами и холестерином они упаковываются здесь в ЛПОНП, которые поступают в кровоток.

В кровотоке из триацилглицеролов, содержащихся в ЛПОНП, высвобождаются жирные кислоты, часть из которых поглощается клетками различных тканей, но большая часть запасается в адипоцитах. Оставшаяся в кровотоке глюкоза также поступает в клетки периферических тканей. Инсулин стимулирует поглощение глюкозы миоцитами и адипоцитами, а также поглощение из кровотока жирных кислот адипоцитами. Глюкоза в жировой ткани идет на образование глицерола для последующего синтеза триацилглицеролов.

В энтероциты после приема пищи из просвета тонкого кишечника всасываются холестерол, жирные кислоты, моноацилглицеролы. Там осуществляется ресинтез триацилглицеролов и их упаковка с холестерином и фосфолипидами в транспортные формы — хиломикроны (ХМ). Через лимфатическую систему ХМ попадают в кровоток, где из них высвобождаются жирные кислоты. Эти жирные кислоты поглощаются клетками тканей, и прежде всего жировой. В жировой ткани поступающие жирные кислоты запасаются в составе триацилглицеролов. Остатки ХМ из крови поглощаются гепатоцитами.

Аминокислоты из просвета кишечника проникают в энтероциты, а оттуда — в кровяное русло. Из кровотока они попадают в клетки тканей, где используются для биосинтеза белка, гема, других соединений или расщепляются для энергетических нужд.

17.8. Межорганный метаболизм натошак

Через 1 час после еды уровень глюкозы в крови начинает падать. Начинает снижаться и концентрация инсулина, в то время концентрация глюкагона повышается. Такие гормональные изменения вызывают высвобождение источников энергии из депо (рис. 17.9).

Глюкагон стимулирует *гликогенолиз* — метаболический путь расщепления гликогена. Высвобождающаяся при этом глюкоза поступает в кровь. Глюкагон также стимулирует *глюконеогенез* — метаболический путь синтеза глюкозы из лактата, аланина и глицерола. По мере удлинения периода без приема пищи глюконеогенез становится всё более значительным для поддержания концентрации глюкозы в крови. Спустя 12–18 часов запасы гликогена в печени иссякают и глюконеогенез становится единственным источником восполнения глюкозы в кровотоке.

При расщеплении триацилглицеролов только глицерол может использоваться для образования глюкозы. Глюкагон в этот период стимулирует расщепление белков и катаболизм аминокислот. В результате образуется аммиак, который в печени превращается в мочевины, а углеводородные части аминокислот используются в глюконеогенезе.

Натошак возрастает значимость триацилглицеролов в качестве источников энергии. В то время как глицерол используется для глюконеогенеза, жирные кислоты подвергаются β -окислению, особенно в клетках скелетных мышц,

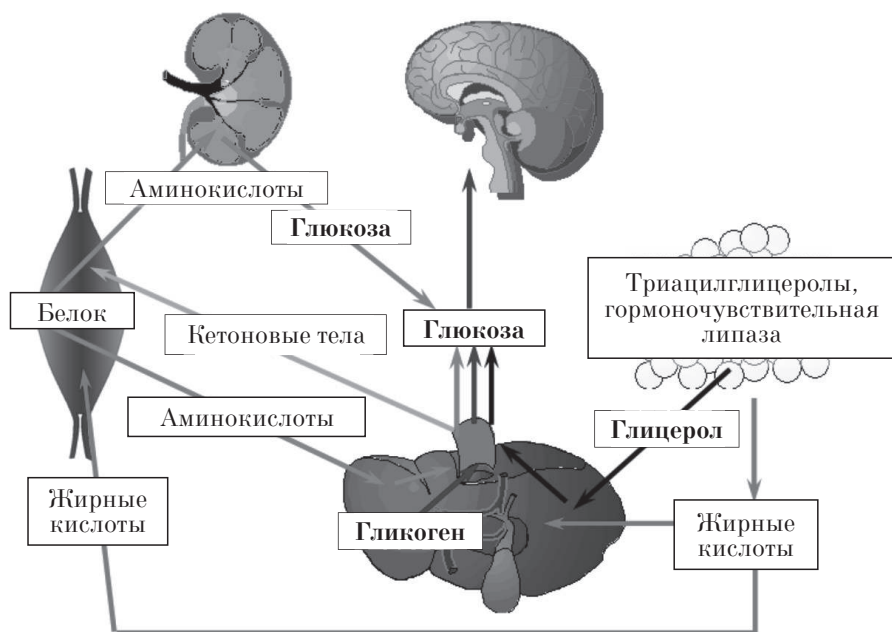


Рис. 17.9. Органная специализация метаболизма в состоянии натошак

сердечной мышцы. В клетках печени эти жирные кислоты используются для образования кетоновых тел, которые служат клеткам мышц и сердца в качестве энергетического источника, сохраняя глюкозу для клеток мозга.

17.9. Межорганный метаболизм при голодании

При длительном голодании практически весь белок в организме вовлекается в катаболические превращения. Это происходит приблизительно через 4–5 суток после приема пищи. В этот период мышцы перестают потреблять кетоновые тела в качестве источника энергии и полагаются исключительно на жирные кислоты, которые высвобождаются из жировой ткани. Это способствует увеличению концентрации кетоновых тел в кровотоке. Мозг, наоборот, начинает использовать кетоновые тела в качестве источника энергии.

Потребность в глюкозе остается. Она требуется для энергетических целей в эритроцитах. Интенсивность образования глюкозы в печени за счет глюконеогенеза уже снижается. Это позволяет сохранить мышечную ткань, так как здесь снижается катаболизм белков. В результате уменьшения высвобождения аминокислот снижается интенсивность мочевинообразования.

В период голодания важное место принадлежит жировой ткани. Длительность выживания зависит от количества депонированных липидов, поскольку мобилизуемые из их состава жирные кислоты в это время используются в качестве источника энергии всеми тканями организма, за исключением эритроцитов. Когда запасы триацилглицеролов иссякают, единственным источником энергии становятся белки. Вскоре количество белков настолько уменьшается, что перестают функционировать такие жизненно важные органы, как сердце и почки.

Приведенные в этой главе сведения показывают, что для существования или адаптации организма к окружающей среде важнейшим условием является динамическое взаимодействие самых разных молекулярных процессов. В результате идет сбалансированное и бесперебойное снабжение организма энергией и пластическим материалом, осуществляется обезвреживание и выведение из организма токсичных продуктов.

Отсюда, если исходить из представлений о том, что развитие патологий — нарушение адаптации, вытекает очень важное обстоятельство: любое развитие патологического процесса сопровождается изменением взаимодействия метаболических путей, которое неизбежно приводит к изменению (нарушению) функций внутренних органов и тканей.

Воздействие на эти изменения и возвращение к нормальному состоянию — важнейшая задача фармации.

Заключение. Биологическая трансформация лекарственных веществ и других ксенобиотиков

В контексте фармацевтического образования биологическая биохимия объединяет сведения о механизме действия и способах биотрансформации природных и чужеродных веществ в организме и является основой для изучения фармацевтической, токсикологической химии, фармацевтической технологии, фармакологии и фармакотерапии.

Как совокупность биохимических знаний и методов, фармацевтическая биохимия включает в себя:

- механизмы и локализацию действия лекарственных веществ (ЛВ) на системном, органном, тканевом, клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях;
- пути и способы осуществления количественной оценки ЛВ и их метаболитов в организме;
- оценку эффективности лекарственных средств (ЛС) на основе изучения их метаболизма;
- разработку новых и эффективных ЛС;
- разработку принципов анализа, производства, стандартизации и контроля качества ЛС.

В достижении этих знаний биохимия тесно сотрудничает с фармацевтической химией — в вопросах обоснования биохимических методов стандартизации и контроля качества, анализа и синтеза лекарственных веществ; с фармацевтической технологией — в области обоснования лекарственных форм для данного лекарственного средства и возможных комбинаций различных лекарственных веществ; с фармакологией и токсикологией — в вопросах изучения метаболизма лекарственных веществ и механизмов их действия.

Лекарственное вещество — это отдельное химическое соединение или биологически активное вещество, которое при введении в организм способно предотвратить возникновение заболевания, изменить течение патологического процесса, нормализовать функцию.

Лекарственное средство — вещество природного или синтетического происхождения или смесь веществ в виде лекарственной формы (таблетки, капсулы, раствор), разрешенное к применению для лечения, профилактики или диагностики болезней.

Все лекарственные средства делят на *природные* (биогенные) и *чужеродные* (ксенобиотики). Природные являются естественными продуктами живых организмов (аминокислоты, глюкоза, жирные кислоты, витамины, гормоны и др.). К ксенобиотикам относятся лекарственные средства, химические вещества, используемые в промышленной и сельскохозяйственной деятельности.

18.1. Биохимические методы, используемые в стандартизации и контроле качества лекарственных средств

Стандартизация и контроль качества являются важным аспектом деятельности фармацевтической службы.

Под *стандартизацией* лекарственных средств понимают разработку и применение унифицированных требований и методов исследования лекарственных форм (стандартов). Стандартизация лекарственных средств является, как правило, основным гарантом их высокого качества при серийном производстве и обеспечивает эффективность и безопасность применения.

Стандартами качества на субстанции, лекарственные средства и лекарственное растительное сырье в фармацевтической промышленности являются *фармакопейные статьи*. Общая фармакопейная статья включает перечень нормируемых показателей или методов испытания для конкретной лекарственной формы, описание физических, физико-химических, химических, биохимических, биологических, микробиологических методов анализа ЛС, требование к используемым реактивам, титрованным растворам, индикаторам.

Контроль качества лекарственного средства предполагает установление соответствия качества ЛС утвержденным нормативным документам. В мировой практике одним из важнейших документов, определяющих требования к производству и контролю качества лекарственных средств для человека и животных, являются *Правила производства лекарственных средств* (Good Manufacturing Practice for Medicinal Products, GMP).

Государственная система контроля качества предусматривает наблюдение за экспериментальными (доклиническими) и клиническими испытаниями новых лекарственных препаратов и их внедрением. На каждом из этих этапов проводятся различные биохимические исследования. Так, в соответствии с частными фармакопейными статьями для стандартизации гормональных препаратов, сердечных гликозидов, антибиотиков используют не только химические, но и биологические способы стандартизации. Дело в том, что определяя химическим методом, например, содержание гормона в образце препарата, невозможно дать оценку его биологической активности.

Биологическая стандартизация проводится на животных, изолированных органах, культурах микроорганизмов с помощью методов, позволяющих

оценивать биологическую активность данного препарата. Так, например, активность препаратов сердечных гликозидов определяется по их способности вызывать систолическую остановку сердца у лягушек, кошек, голубей. Об активности инсулина судят по снижению уровня глюкозы в крови у кроликов, питуитрина — по сокращению гладкой мускулатуры матки морской свинки. При стандартизации антибиотиков определяют концентрацию, в которой они угнетают рост тест-микробов. При использовании перечисленных методов активность испытываемого препарата сопоставляется со стандартным, обладающим постоянной активностью, выражаемой в условных единицах действия (ЕД).

Для стандартизации и оценки качества ЛС применяются спектрофотометрические методы, флуоресцентный анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, позволяющие оценить состав лекарственного препарата, его подлинность, количественное содержание действующего вещества. Используются и такие биохимические методы, как радиоиммунный, иммуноферментный и хемилюминесцентный анализ, аффинная хроматография, основанные на специфическом белок-лигандном взаимодействии (фермент — субстрат, антиген — антитело, лиганд — рецептор).

18.2. Пути введения лекарственных средств.

Всасывание

Применение лекарственных средств начинается с их введения в организм или нанесения на поверхность тела. Пути введения ЛС:

- энтеральный — **через пищеварительный тракт** (*пероральный, сублингвальный, ректальный*);
- парентеральный — **минуя пищеварительный тракт** (*ингаляционный, интраназальный, трансдермальный, инъекционный* (подкожный, внутримышечный, внутривенный, внутриартериальный), *внутрисуставной, внутривенно-спинальным, под оболочки мозга* (субарахноидальный, субдуральный, субокципитальный)).

От путей введения зависит скорость развития эффекта, его выраженность, продолжительность, а в отдельных случаях и характер действия.

Вещества, поступающие в организм различными путями, подвергаются всасыванию, транспорту, распределению, метаболизму и выведению. Весь комплекс этих событий представляет сферу интересов одного из разделов фармакологии — *фармакокинетики*.

Всасывание (абсорбция) — процесс поступления ЛВ в кровеносную или лимфатическую систему из места его введения. Всасывание происходит при всех путях введения ЛС, за исключением внутривенного и внутриартериального.

Для того чтобы произошло всасывание, действующее вещество должно высвободиться из лекарственной формы и перейти в раствор в жидкостях

организма. Для всасывания лекарственных веществ используются все известные механизмы переноса веществ через мембраны (см. п. 8.2).

Путем *пассивной диффузии* всасывается 95 % всех лекарственных веществ. Всасывание происходит в ротовой полости, в желудке, в тонком кишечнике и прямой кишке, а также с поверхности кожи. Многие ЛС хорошо всасываются путем пассивной диффузии из легких. Особенно это относится к вдыханию газообразных средств для общего наркоза и к ЛС в виде ингаляций или аэрозолей (β -адреномиметики, глюкокортикостероиды).

Перенос через мембрану гидрофильных эндогенных веществ и ксенобиотиков, в том числе ЛС и их метаболитов, осуществляют трансмембранные белки — транспортеры органических анионов и катионов. К субстратам транспортеров органических анионов и катионов относят диуретики, β -лактамные антибиотики, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), статины, противовирусные и противоопухолевые средства.

Путем *активного транспорта* всасываются аминокислоты, сахара, гидрофильные полярные молекулы, неорганические ионы, пиримидины, тиамин, рибофлавин, сердечные гликозиды. Активный транспорт подразумевает энергетические затраты для перемещения ЛС через клеточную мембрану, часто против градиента концентрации. Активный транспорт характеризуется избирательностью к определенным соединениям, конкуренцией веществ за один транспортный механизм, насыщаемостью.

Путем *фильтрации* через заполненные молекулами воды поры в мембране всасываются мелкие гидрофильные молекулы (например, мочевины).

Путем *пиноцитоза* в растворенном виде в клетку могут поступать белки, нуклеиновые кислоты, витамин В₁₂ (в комплексе с внутренним фактором Кастла).

Факторы, влияющие на всасывание. Формы выпуска ЛС могут оказывать существенное влияние на его растворимость и дальнейшее всасывание. В настоящее время широко используются лекарственные формы, обеспечивающие постепенное высвобождение и всасывание действующего вещества, что позволяет пролонгировать его действие. К ним относятся таблетки с многослойным покрытием, трансдермальные системы и др.

Всасывание ЛС зависит от физико-химических свойств вещества, в особенности от степени его ионизации в просвете ЖКТ. Ионизированные формы всасываются медленнее, чем неионизированные. Изменение pH среды приводит к сдвигу степени ионизации растворенных молекул. Если ЛВ — слабая кислота, то снижение pH среды (подкисление) ведет к повышению концентрации неионизированных форм и усиливает процесс транспорта. Жирорастворимые ЛС всасываются быстрее, чем водорастворимые.

Одним из факторов, влияющих на всасывание, является путь введения ЛС. При сублингвальном пути введения всасывание начинается довольно быстро, препараты оказывают общее действие, минуя печеночный барьер, и не контактируют с ферментами и соляной кислотой желудочного сока. При пероральном

введении ЛС скорость всасывания небольшая, биодоступность, как правило, невелика, так как всасывается только часть введенного препарата. Кроме того, многие препараты разрушаются в кислой среде желудка или гидролизуются ферментами желудочно-кишечного тракта. Поэтому при пероральном введении доза ЛВ выше соответствующих доз для инъекционного введения.

Растворимость и степень ионизации ЛС зависят также от pH желудочного и кишечного сока (pH в желудке 1,5–2, в тонком кишечнике — 5–7, в прямой кишке — 7–8). При снижении pH лучше всасываются слабые кислоты (ацетилсалициловая кислота, барбитураты), так как в кислой среде они находятся в менее ионизированной форме. Напротив, повышение pH (при ахлогидрии) облегчает всасывание слабых оснований и задерживает всасывание слабых кислот.

Меньшая кислотность желудочного сока у детей раннего возраста (pH около 5,0) также оказывает влияние на всасывание способных к диссоциации ЛС в желудке. Быстрее, чем у взрослых людей, всасываются органические основания, а органические кислоты всасываются медленнее.

Скорость опорожнения желудка и перистальтика определяют быстроту попадания ЛС в тонкий кишечник, где происходит всасывание большинства ЛС. Факторы, замедляющие опорожнение желудка, способствуют снижению скорости всасывания большинства ЛС, и наоборот. Усиление кровотока способствует всасыванию веществ.

Взаимодействие лекарственных веществ с компонентами пищи может инактивировать их. Так, например, алкалоиды образуют нерастворимые соли с танином чая. Этанол нарушает всасывание тиамина, но ускоряет всасывание, потенцируя действие ряда нейро- и психотропных ЛВ.

18.3. Транспорт лекарственных веществ в кровотоке

Абсорбированное лекарственное вещество поступает в кровеносное русло. Большинство ЛВ в крови лишь частично находятся в свободном виде, остальная часть связана с белками крови. Фракция свободного (несвязанного) вещества в крови через определенный промежуток времени после его введения относительно исходной дозы характеризует его *биодоступность*.

Различают *специфические* (глобулины: липопроотеины, γ -глобулины, кислый α_1 -гликопротеин) и *неспецифические* (альбумины) *транспортные системы крови*. Белки крови могут связывать различные вещества за счет своих активных центров. Скорость и прочность связывания зависят от конформации и степени комплементарности (соответствия) этих центров и молекул веществ, а также от характера возникающих при взаимодействии связей (ковалентные, ионные, водородные, гидрофобные).

Альбумин составляет около 55 % от всех белков, содержащихся в плазме крови. Он обладает универсальной способностью связывать и транспортировать по крови плохо растворимые в воде низкомолекулярные вещества. К веществам, связываемым сывороточным альбумином, относятся билирубин, липидные гормоны, жирные кислоты, соли желчных кислот, триптофан, индол, пиридоксальфосфат, лекарственные вещества (варфарин, фенобутозон, клофибрат, пенициллин, сульфамиды и др.).

В составе молекулы сывороточного альбумина человека имеется 109 катионных и 120 анионных аминокислотных остатков. При pH 7,4 альбумин имеет отрицательный заряд. Тем не менее, сывороточный альбумин преимущественно связывает анионы, а не катионы. Центр связывания анионных лигандов состоит из двух частей: гидрофобного кармана (полости), образованного боковыми цепями неполярных аминокислотных остатков, и катионного центра, расположенного в этой полости или вблизи нее. На поверхности альбумина находится несколько центров связывания (рис. 18.1). Например, одна молекула альбумина может одновременно связать от 25 до 50 молекул билирубина.

Глобулины, как специфические транспортеры, переносят преимущественно эндогенные вещества. Тироксин, например, образует комплекс с тироксинсвязывающим глобулином; кортизол, кортикостерон и прогестерон — с транскортином; тестостерон и эстрадиол — с секс-стероидсвязывающим глобулином; ионы железа — с трансферрином, ионы меди — с церулоплазмином, гемоглобин — с гаптоглобином. Липопротеины переносят витамины А и Е.

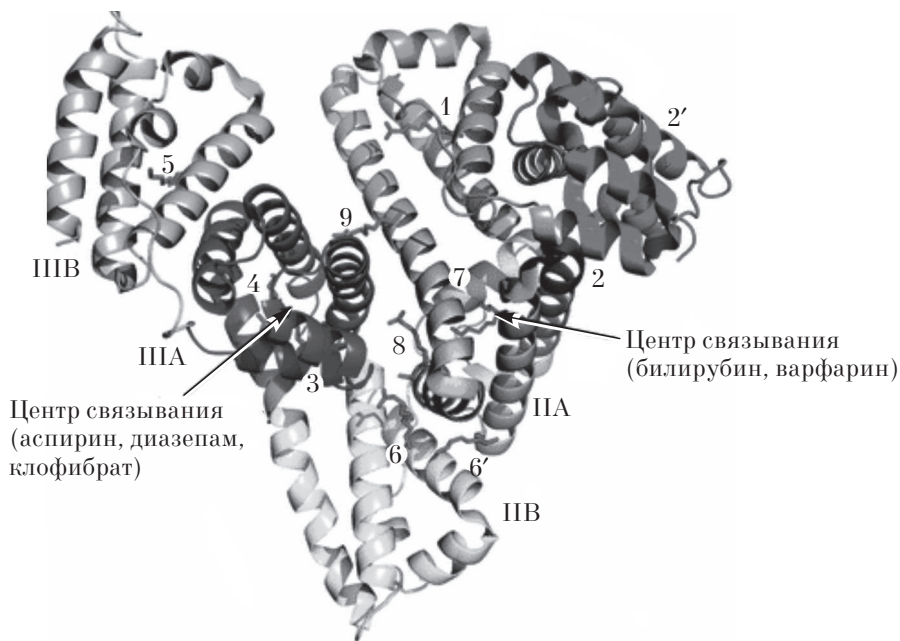


Рис. 18.1. Специфические центры связывания в молекуле альбумина человека

Транспорт веществ осуществляют и *белки клеток крови*. Так, с белками эритроцитов связываются витамины В₂, РР, хинидин, аминазин, с лейкоцитами — витамин С, с тромбоцитами — серотонин.

Лекарственные средства могут конкурировать друг с другом за центры связывания, а также взаимодействовать с одним или с несколькими белками. Например, тетрациклин в организме связан с альбуминами (14 %), липопротеинами (38 %), другими белками крови (8 %). Поэтому, когда речь идет о связывании препарата с белками крови, имеют в виду суммарное связывание данного ЛС с белками. В большинстве случаев белок играет роль депо, регулирующего баланс между связанным лекарственным веществом и его активной формой.

Связанное с белками крови ЛВ не взаимодействует с рецепторами, ферментами и теряет способность проникать через мембраны, что оказывает существенное влияние на фармакокинетику и фармакологический эффект препарата.

Снижение способности белков крови связывать ЛВ отмечено у пожилых людей. Большое влияние на взаимодействие белков крови с ЛВ оказывают хронические заболевания почек и печени, что в первую очередь связано с качественными изменениями альбуминов и, в ряде случаев, глобулинов. Поэтому при назначении стандартных доз препаратов таким пациентам наблюдают увеличение концентрации ЛВ в плазме крови и развитие побочных эффектов. Напротив, повышение уровня белков в сыворотке крови, в частности кислых α_1 -гликопротеинов (при инфаркте миокарда, болезни Крона, воспалительных заболеваниях), усиливает связывание многих ЛВ, что приводит к уменьшению их эффективности.

18.4. Распределение лекарственных веществ в органах и тканях

В организме лекарственное вещество распределяется между кровью, межклеточной жидкостью и клетками тканей. Большинство ЛС распределяется неравномерно. Это зависит от относительного сродства молекул ЛВ к биомакромолекулам различных органов и тканей. Так, тиопентал натрия (средство для внутривенного наркоза) на 90 % депонируется в жировой ткани, щитовидная железа накапливает соединения йода, костная ткань — тетрациклины. Сульфаниламиды образуют прочные комплексы с белками плазмы, что обеспечивает продолжительное действие этих препаратов (до 24 ч). При большом сродстве ЛВ к тканевым белкам его концентрация в крови ниже, чем в тканях. Например, многие противовоспалительные препараты (диклофенак, фенилбутазон) имеют высокое сродство к белкам синовиальной жидкости, поэтому уже через 12 ч в плазме крови их практически нет, в то время как содержание их в воспаленном суставе остается высоким.

Существенное влияние на характер распределения веществ оказывают биологические барьеры, такие как стенки капилляров, клеточные мембраны, гематоэнцефалический и плацентарный барьеры. Значительно затруднено прохождение многих веществ через *гематоэнцефалический барьер (ГЭБ)*. Это связано с особенностями строения капилляров мозга: их эндотелий не имеет пор, через которые в обычных капиллярах проходят многие вещества. Определенное значение имеют и глиальные элементы, выстилающие наружную поверхность эндотелия и играющие роль дополнительной липидной мембраны. Через гематоэнцефалический барьер плохо проходят полярные соединения. Липофильные молекулы проходят в ткань мозга легко. При воспалении мозговых оболочек проницаемость ГЭБ повышается.

Плацентарный барьер регулирует переход веществ из крови матери к плоду и обратно. Через плацентарный барьер проходят липофильные соединения, этиловый спирт, хлоралгидрат, газообразные анестетики общего действия, барбитураты, сульфамиды, морфин, героин. Полярные, ионизированные вещества плохо проникают через плаценту.

Распределение лекарственного вещества в организме характеризуется фармакокинетическим показателем — *объемом распределения*:

$$V_d = A/[D]_p,$$

где A — общее количество ЛВ в организме, $[D]_p$ — концентрация ЛВ в плазме.

Для соединений, хорошо проникающих в органы и ткани и накапливающихся в жировых депо, характерно высокое значение V_d . Напротив, если вещество находится в крови, V_d имеет низкие значения.

18.5. Взаимодействие лекарственных веществ с клеточными рецепторами

На рубеже XIX–XX вв. П. Эрлихом было предсказано существование на поверхности клеток специальных белковых структур (рецепторов), определяющих их избирательную чувствительность к ЛВ. Это предположение легло в основу теории рецепции, значительно опередившей свое время, поскольку лишь спустя десятилетия была выяснена химическая природа рецепторов и определены биохимические принципы их функционирования. Теперь рецепторная теория стала методологической основой поиска новых ЛС с направленным действием.

Рецепторы, обеспечивающие проявление действия веществ, называют *специфическими*. Вещества, которые при взаимодействии со специфическими рецепторами вызывают в них изменения, приводящие к биологическому эффекту, называют *агонистами*. Вещества, связывающиеся с рецепторами, но не вызывающие их стимуляции, называют *антагонистами*.

Взаимодействие «вещество – рецептор» осуществляется за счет межмолекулярных связей (водородные, ионные, ковалентные, гидрофобные и дипольные взаимодействия). В зависимости от прочности связи «вещество – рецептор» различают обратимое действие (характерно для большинства веществ) и необратимое (в случае ковалентной связи).

Как уже указывалось (п. 13.7), выделяют следующие типы мембранных рецепторов:

1) рецепторы, сопряженные с ионными каналами (н-холинорецепторы, ГАМК-рецепторы, глутаминовые, глициновые рецепторы и др.);

2) 7-ТМС-рецепторы, сопряженные с эффектором через G-белки, ферменты (аденилатциклазу, фосфолипазу C) и вторичные посредники (цАМФ, ИТФ, ДАГ, Ca^{2+});

3) 1-ТМС-рецепторы:

- с гуанилатциклазной активностью;
- с тирозинкиназной активностью;
- не обладающие ферментативной активностью и ассоциированные с тирозинкиназами;

4) внутриклеточные рецепторы (растворимые цитозольные или ядерные белки), контролируют транскрипцию ДНК.

Рецепторы, ионные каналы, ферменты, транспортные системы, гены являются мишенью действия лекарственных веществ.

18.6. Метаболизм лекарственных веществ в организме

Большинство лекарственных веществ подвергается в организме биотрансформации. В неизменном виде выделяются высокогидрофильные ионизированные соединения. Из липофильных веществ исключение составляют средства для ингаляционного наркоза, основная часть которых не вступает в химические реакции в организме. Они выводятся легкими в том же виде, в каком были введены.

Метаболизм (биологическая трансформация веществ) включает все химические изменения, происходящие с веществом в организме. Все реакции биологической трансформации ксенобиотиков, в том числе ЛВ, относят к одной из двух категорий, которые обозначают как *фазы метаболизма*:

- I фаза — модификация структуры ксенобиотика;
- II фаза — конъюгация ксенобиотика.

В результате метаболизма веществ, с одной стороны, повышается их растворимость в воде, что способствует выведению из организма с мочой, а с другой — изменяется фармакологическая активность или токсичность веществ. Реакции метаболизма могут приводить к полной потере активности или токсичности вещества или наоборот — активировать и усиливать токсичность. В ряде случаев появляется новый токсический эффект.

18.6.1. Первая фаза метаболизма лекарственных веществ

Метаболическая трансформация (I фаза метаболизма лекарственных веществ) включает несинтетические реакции, такие как окисление, восстановление, гидролиз. Метаболическая трансформация происходит за счет присоединения или освобождения гидроксильных ($-\text{OH}$), сульфгидрильных ($-\text{SH}$) или аминогрупп ($-\text{NH}_2$). В результате вещество становится более гидрофильным.

В метаболизме ЛВ принимают участие ферменты почек, легких, кожи и ЖКТ, но наиболее активны ферменты печени. Основной вклад в биотрансформацию ксенобиотиков вносит эндоплазматическая сеть. Поэтому часто говорят о микросомном пути метаболизма того или иного ксенобиотика. Если ксенобиотик подвергается метаболическим превращениям в лизосомах, пероксисомах, митохондриях, цитозоле, то говорят о «немикросомном» пути.

Микросомное окисление — совокупность реакций I фазы биотрансформации ксенобиотиков и эндогенных соединений, происходящих при участии ферментных систем эндоплазматического ретикулума и цитохрома P_{450} .

Цитохром P_{450} представляет собой гемопrotein — комплекс белка с ковалентно связанным гемом, обеспечивающим присоединение кислорода (рис. 18.2). Белковая часть представлена одной полипептидной цепью. Молекулярная масса цитохрома P_{450} около 50000 Да. Он способен образовывать комплекс с монооксидом углерода. Этот комплекс имеет максимум поглощения света при длине волны 450 нм, отсюда название «цитохром P_{450} ».

Цитохромы P_{450} являются мембранными белками, которые синтезируются на полирибосомах и включаются в липидный бислой с помощью сигнальных последовательностей аминокислот. Они объединены в группу ферментов (цитохром P_{450} -зависимые монооксигеназы), осуществляющих окисление стероидов, жирных кислот, ретиноидов, желчных кислот, биогенных аминов, лейкотриенов, а также экзогенных соединений, в том числе лекарственных веществ с участием донора электрона $\text{НАДФН}\cdot\text{H}^+$ и молекулярного кислорода. Цитохром P_{450} наиболее эффективно катализирует окисление неполярных соединений с алифатическими или ароматическими кольцами. В печени цитохром P_{450} также участвует в окислении спиртов до соответствующих альдегидов.

Система ферментов микросомального окисления представляет собой $\text{НАДФН}\cdot\text{H}^+$ -зависимую монооксигеназную цепь переноса электронов и протонов (рис. 18.3). В большинстве случаев донором электронов для этой цепи служит $\text{НАДФН}\cdot\text{H}^+$, источником которого является пентозофосфатный цикл.

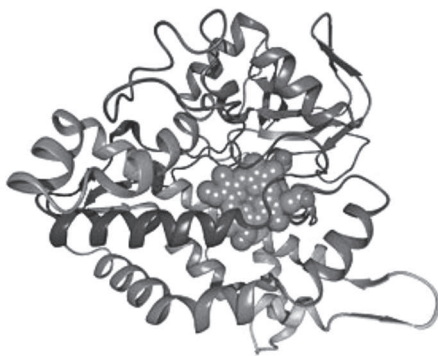


Рис. 18.2. Цитохром P_{450}

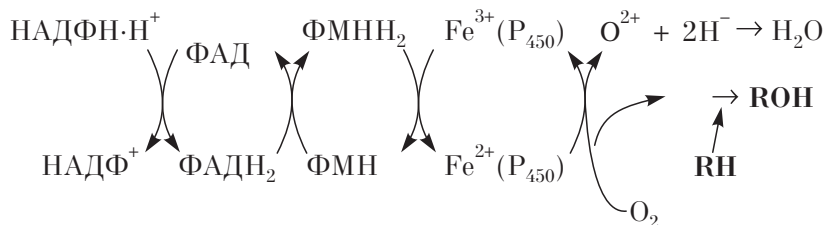
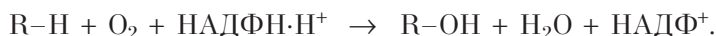


Рис. 18.3. Схема монооксигеназной цепи окисления соединений в микросомах

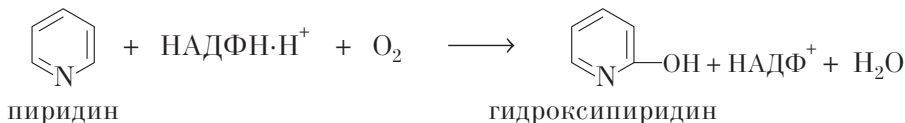
Флавопротеин (НАДФН·Н⁺-цитохром Р₄₅₀ — оксидоредуктаза) осуществляет перенос протонов и электронов с НАДФН·Н⁺ на коферменты флавинадениндинуклеотид (ФАД) и флавинмонокнуклеотид (ФМН). С ФМНН₂ электроны транспортируются на цитохром Р₄₅₀, а протоны — в окружающую среду. Цитохром Р₄₅₀ переносит электроны на кислород, в результате один атом молекулы кислорода О₂ включается в окисляемое вещество R—H, образуя гидроксильную группу вещества R—ОН, а другой атом, связывая два протона водорода из среды, образует воду (О²⁻ + 2Н⁺ → Н₂О).

Таким образом, реакции с участием цитохром Р₄₅₀-зависимых монооксигеназ приводят к гидроксилированию веществ. Схема реакции гидроксилирования вещества R—H имеет вид

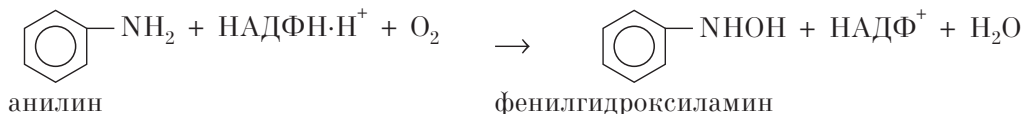


Оксигеназные реакции, катализируемые цитохромом Р₄₅₀, весьма разнообразны. Одна из самых распространенных реакций окисления ксенобиотиков — *окислительное деалкилирование*, сопровождающееся окислением алкильной группы, присоединенной к атомам N, O или S. Другой распространенный тип реакций — *гидроксилирование* циклических соединений (ароматических, предельных и гетероциклических углеводородов). Ферменты семейства Р₄₅₀ могут также катализировать реакции гидроксилирования алифатических соединений, N-окисления, окислительного дезаминирования, сульфокисления и эпоксидирования:

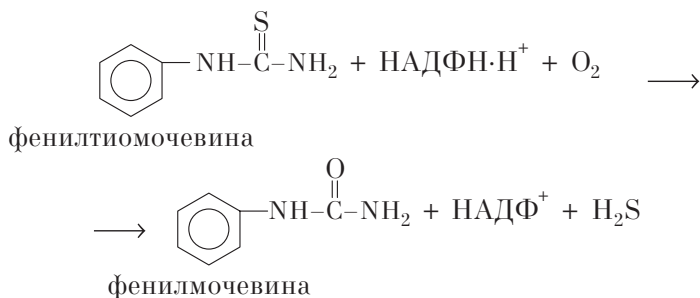
- гидроксилирование гетероциклических соединений



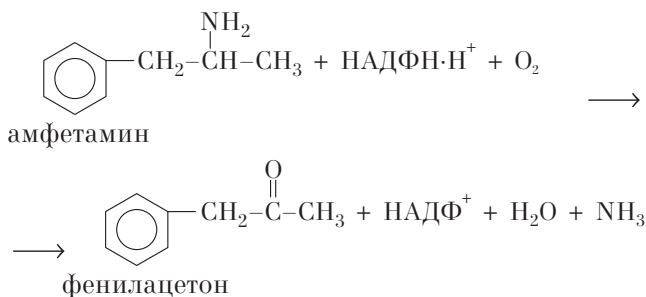
- N-окисление с образованием N-оксидов и N-гидроксиламинов (аминазин, морфин, ацетиламинофлюорен)



- S-окисление и десульфирование (аминазин, тиобарбитал)



- окислительное дезаминирование (амфетамин)



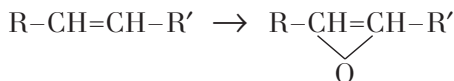
- удаление групп; деалкилирование по N (морфин, лидокаин, атропин, диазепам)



- удаление групп; деалкилирование по O (кодеин, фенацетин, кофеин, папаверин)



- дегалогенизация (хлороформ, метоксифлуран, галотан); эпексидирование.



Цитохромы P₄₅₀ появились более трех миллиардов лет назад. Они обнаружены как у растений, так и у животных. В настоящее время известно множество изоформ (более 1000) цитохрома P₄₅₀, которые явились результатом процессов дупликации, конверсии и мутации генов.

Номенклатура цитохромов строится на основе анализа их аминокислотных последовательностей. У человека выявлено 57 генов системы цитохрома P₄₅₀. Цитохромы P₄₅₀, имеющие более 40 % идентичных аминокислотных последовательностей, объединяют в одно семейство, а имеющие более 55 % гомологии — в одно подсемейство. Семейство обозначается арабскими цифрами,

подсемейство — заглавными буквами. Например: CYP2D6, где CYP — аббревиатура цитохрома P₄₅₀, 2 — обозначает семейство, D — подсемейство, 6 — обозначает конкретный фермент/ген.

Наибольшее количество изоферментов цитохрома P₄₅₀ определяют в гепатоцитах. Однако изоферменты цитохрома P₄₅₀ обнаруживают и в других органах, например в кишечнике и почках, легких и надпочечниках, головном мозге и коже, а также в плаценте и миокарде.

18.6.2. Изоферменты цитохрома P₄₅₀, осуществляющие биологическую трансформацию лекарственных веществ

В организме человека метаболизм лекарственных веществ осуществляют главным образом цитохромы P₄₅₀: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4.

CYP1A2 обнаруживается преимущественно в печени. Метаболизирует теофиллин, фенацетин, кофеин и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ).

CYP2C9 метаболизирует нестероидные противовоспалительные средства, фенитоин и варфарин.

CYP2C19 локализуется в гепатоцитах и катализирует реакции 5-гидроксилирования пиридинового кольца. Активно метаболизирует трициклические антидепрессанты (амитриптилин), ингибиторы МАО, антиконвульсанты и антиэпилептические средства (диазепам, фенобарбитал), ингибиторы протонной помпы (омепразол, лансопразол), НСПВ (диклофенак и индометацин), варфарин, пропранолол, циклофосфамид, прогестерон.

Изоформы CYP2C9 и CYP2C19 обладают генетическим полиморфизмом.

CYP2D6 локализуется преимущественно в печени, обеспечивает биологическую трансформацию около 20 % всех известных ЛС, в том числе нейролептиков, антидепрессантов, транквилизаторов, β-адреноблокаторов. В отличие от других изоферментов цитохрома, индукторов для CYP2D6 не существует.

CYP2E1 обнаруживается в печени. Субстратами для него являются кофеин, этанол, нитрозамины, бензол, анилин, алифатические хлоруглеводороды, средства для ингаляционного наркоза (галотан). CYP2E1 и CYP1A2 совместно катализируют реакцию превращения ацетаминофена (парацетамола) в N-ацетилбензохинонимин, оказывающий гепатотоксическое действие. Кроме того, CYP2E1 в эндотелиоцитах, гладкой мускулатуре кровеносных сосудов и макрофагах участвует в процессе окисления ЛПНП. Окисленные ЛПНП стимулируют образование пенистых клеток, способствуя формированию атером.

CYP3A4 является одним из самых важных для фармацевтической биохимии цитохромов, так как он опосредует биотрансформацию около 60 % лекарственных препаратов, в том числе иммунодепрессантов, средств, применяемых при химиотерапии опухолей (циклофосфамид, винбластин), противогрибковых средств (клотримазол, кетоконазол), макролидов (klarитромицин,

эритромицин), трициклических антидепрессантов, опиоидных анальгетиков (кодеин, метадон, фентанил), бензодиазепинов, статинов (аторвастатин), блокаторов кальциевых каналов и др. Кроме этого, CYP3A4 участвует в реакциях синтеза эндогенных стероидов (холестерола, тестостерона, прогестерона и кортизола).

18.6.3. Окисление лекарственных веществ немикросомными ферментами

Окисление веществ вне микросом клеток печени проходит с участием ферментов — дегидрогеназ (алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы), флавиномоноксигеназ, оксидаз (оксидазы D- и L-аминокислот, ксантиноксидазы, моноаминоксидазы, диаминоксидазы).

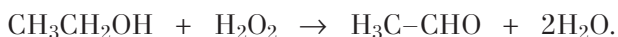
Метаболизм этанола. Основную роль в метаболизме этанола и алифатических спиртов играет цинксодержащий НАД⁺-зависимый фермент алкогольдегидрогеназа (АДГ), локализуемая преимущественно в цитозоле и митохондриях клеток печени (95 %). АДГ катализирует обратимую реакцию, направление которой зависит от концентрации ацетальдегида и соотношения НАДН·Н⁺/НАД⁺ в клетке:



Увеличенное образование НАДН·Н⁺ ингибирует метаболические пути, которые протекают с участием НАД⁺ (цикл Кребса, глюконеогенез, окисление жирных кислот). Образование большого количества ацетил-КоА при катаболизме этанола способствует синтезу жирных кислот и одновременно угнетает их β-окисление. В печени тем самым создаются условия для синтеза триацилглицеролов, которые там накапливаются. Это еще одно патогенетическое звено развития жировой дистрофии печени и затем — цирроза. Указанные события имеют место при длительном поступлении значительного количества этанола в организм.

Вследствие накопления НАДН·Н⁺ тормозится глюконеогенез (ингибируется превращение лактата в пируват). Развивается лактатацидемия и ацидоз. Подавление глюконеогенеза способствует развитию гипогликемии. Развитие гипогликемии создает угрозу необратимого поражения центральной нервной системы.

Второстепенную роль в окислении этанола играет каталаза, находящаяся в пероксисомах цитоплазмы и митохондрий клеток печени. Этот фермент расщепляет примерно 2 % этанола, но при этом утилизирует пероксид водорода:



Ацетальдегид, образовавшийся из этанола, окисляется до уксусной кислоты двумя ферментами: ФАД-зависимой альдегидоксидазой и НАД-зависимой ацетальдегиддегидрогеназой (АлДГ). Ацетальдегид очень реакционноспособное

соединение. Он может неферментативно ацетилировать SH-, NH₂-группы белков и других соединений в клетке, нарушая их функции.

Незначительную роль в метаболизме небольших количеств алкоголя играет цитохром P₄₅₀-зависимая микросомная этанолокисляющая система (МЭОС), локализованная в мембране гладкого ЭПР гепатоцитов. МЭОС индуцируется этанолом, другими спиртами, барбитуратами и приобретает существенное значение при злоупотреблении этими веществами.

Кроме основной реакции, цитохром P₄₅₀ катализирует образование активных форм кислорода (O₂⁻, H₂O₂), которые стимулируют перекисное окисление липидов.

18.6.4. Восстановление лекарственных веществ

Восстановлению подвергаются отдельные ЛС (левомецетин, нитразепам, хлоралгидрат, нитробензол). Происходит это под действием нитроредуктаз и азоредуктаз (рис. 18.4).

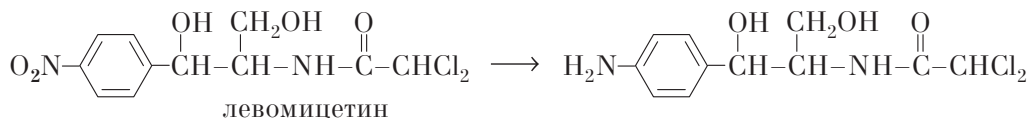


Рис. 18.4. Восстановление нитрогруппы в аминогруппу

18.6.5. Гидролиз лекарственных веществ

Гидролиз осуществляется в основном немикросомальными ферментами (эстеразами, амидазами, фосфатазами) в плазме крови и тканях. При этом вследствие присоединения воды происходит разрыв эфирных, амидных и фосфатных связей в молекулах. Гидролизу подвергаются сложные эфиры — ацетилхолин, новокаин, атропин, ацетилсалициловая кислота и амиды (новокаи-намид) (рис. 18.5).

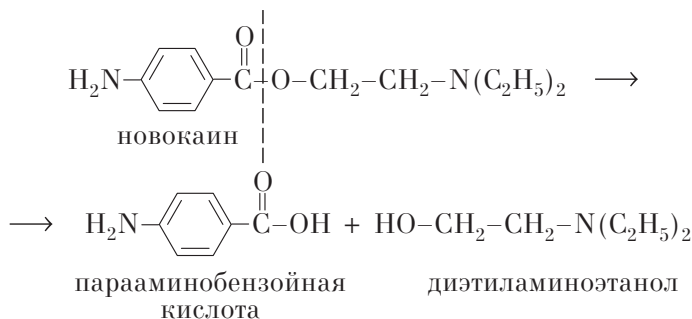


Рис. 18.5. Гидролиз новокаина

18.6.6. Изменение фармакологической активности лекарственных веществ в результате метаболизма

Метаболиты, которые образуются в результате несинтетических реакций, могут в отдельных случаях обладать более высокой активностью, чем исходные соединения. Примером повышения активности в процессе метаболизма является использование предшественников лекарств — *пролекарств*. Например, салазопиридазин (препарат, который применяется для лечения язвенного колита) под действием фермента азоредуктазы кишечника превращается в сульфапиридазин и 5-аминосалициловую кислоту, обладающие антибактериальным и противовоспалительным действием.

Ингибитор ангиотензин превращающего фермента (АПФ) эналаприл при приеме внутрь превращается в печени под влиянием карбоксиэстеразы в активное вещество — эналаприлат. Следует отметить, что эналаприлат при введении внутрь всасывается лишь на 10 %, а эналаприл на 60 %.

Химические превращения некоторых лекарств в организме приводят к изменению характера их активности. Например, ипразид — антидепрессант, в результате дезалкилирования превращается в изониазид (обладает противотуберкулезным действием).

Некоторые ксенобиотики в результате модификации структуры могут приобретать новые свойства и оказывать побочное действие на другие клетки (мутагенное, канцерогенное, иммунодепрессивное, аллергическое и т.д.). Так, эпоксиды, образовавшиеся при микросомальном окислении, являются канцерогенами. Они обладают высокой химической активностью и могут участвовать в реакциях неферментативного алкилирования ДНК, РНК, белков. Химические модификации этих молекул могут привести к перерождению нормальной клетки в опухолевую.

Однако в большинстве случаев образование в молекуле гидрофильных функциональных групп вызывает инактивацию или детоксификацию веществ.

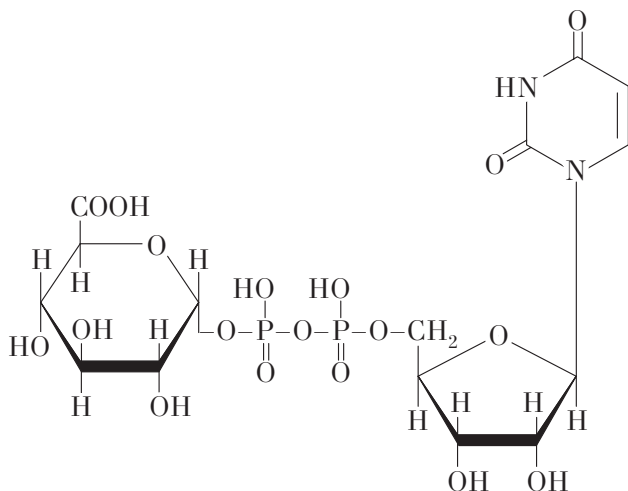
18.6.7. Вторая фаза метаболизма лекарственных веществ

После завершения I фазы ЛВ переходят во II фазу — *конъюгацию*. Для вступления в нее молекула должна обладать химически активным радикалом (группировкой), к которому может присоединиться конъюгирующая молекула. Если активные радикалы присутствуют в молекуле лекарственного вещества изначально, то реакция соединения может осуществляться, минуя превращения I фазы.

Как уже упоминалось выше, в результате реакций II фазы происходит присоединение к веществу или его метаболитам химических группировок или молекул эндогенных соединений, при этом образуются полярные, хорошо растворимые в воде конъюгаты, легко выводимые с мочой или с желчью.

К основным видам конъюгации относятся глюкуронирование, ацетилирование, сульфатирование, метилирование, глутатионирование. Все ферменты, функционирующие во II фазе обезвреживания ксенобиотиков, принадлежат к классу трансфераз. Они характеризуются широкой субстратной специфичностью.

Глюкуронирование — наиболее важная реакция II фазы метаболизма лекарственных веществ. Оно заключается в присоединении к субстрату УДФ-глюкуроновой кислоты.



УДФ-глюкуроновая кислота

В реакции конъюгации с УДФ-глюкуроновой кислотой вступают субстраты, содержащие гидроксильные, карбоксильные, карбамоильные, тиоловые, карбонильные и нитрогруппы. Катализируют реакцию ферменты УДФ-глюкуронилтрансферазы (УДФ-ГТ). Различают более двадцати изоферментов УДФ-ГТ, локализованных в эндоплазматической сети клеток печени, в почках, пищеварительном тракте, коже. Степень экспрессии изоферментов УДФ-глюкуронилтрансферазы в различных органах неодинакова.

Глюкуронированию подвергаются эндогенные соединения (билирубин, стероидные гормоны, биогенные амины, тироксин, трийодтиронин) и ксенобиотики (токоферолы, морфин, парацетамол, хлорамфеникол, пестициды, фенолы) (рис. 18.6).

Конъюгация с глюкуроновой кислотой придает конъюгированному соединению большую полярность, водорастворимость и усиливает его экскрецию.

Ацетильная конъюгация (ацетилирование) представляет собой присоединение к веществу ацетильного остатка с помощью ацетил-КоА (рис. 18.7). Катализ осуществляют ферменты *ацетилтрансферазы*. Субстраты ацетилирования — ЛС и метаболиты, содержащие amino- или нитрогруппу (серотонин, гистамин, изониазид, сульфаниламиды).

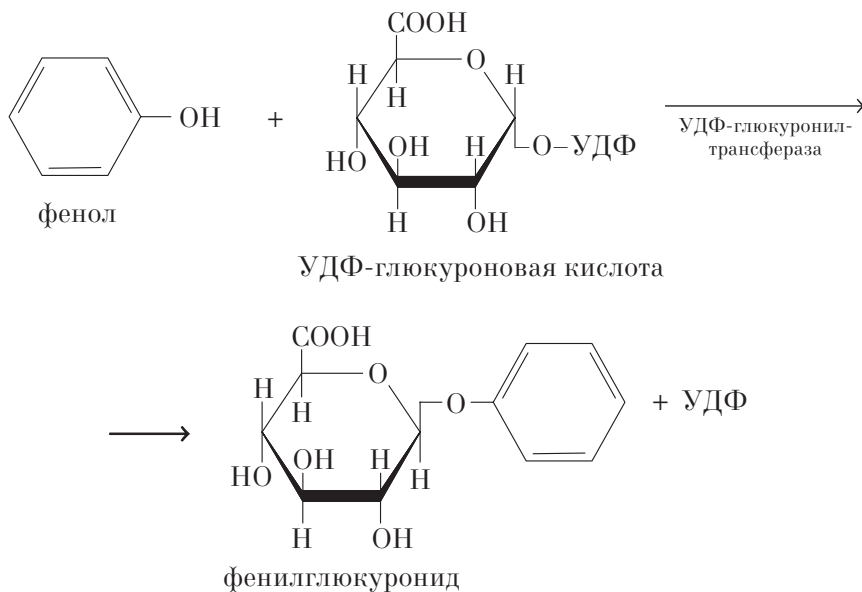


Рис. 18.6. Реакция конъюгации фенола

Реакция ацетилирования необходима для синтеза жирных кислот, стероидов, функционирования цикла Кребса. Ацетильная конъюгация происходит в печени, слизистой кишечника и в ретикулоэндотелиальных клетках селезенки и легких.

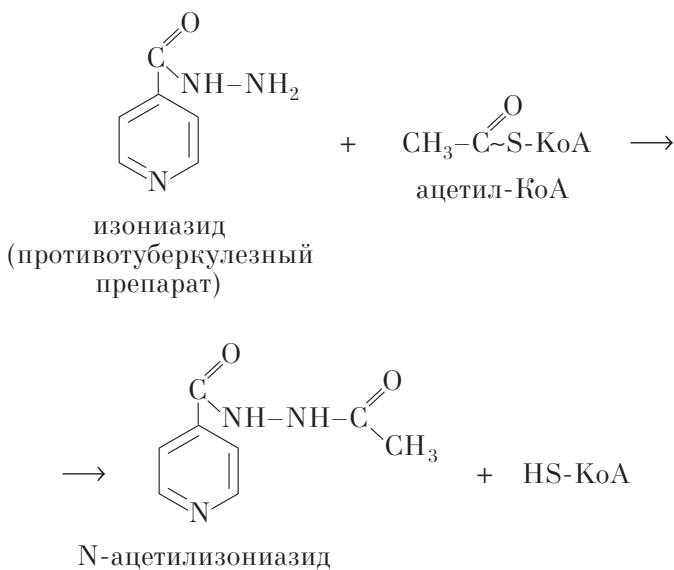


Рис. 18.7. Ацетилирование изониазида

Сульфатирование — реакция присоединения к субстрату остатка серной кислоты, при этом образуются сложные эфиры серной кислоты (рис. 18.8). В качестве кофермента реакции сульфатирования выступает 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат (ФАФС). Реакции катализируют *сульфотрансферазы*. Ферменты локализуются в цитозоле. В организме человека в настоящее время идентифицировали около 40 изоферментов сульфотрансферазы. Сульфатная конъюгация происходит главным образом в печени.

Сульфатированию в организме человека подвергаются эндогенные токсические продукты гниения белков в кишечнике (индол, скатол, фенол), а также стероиды, токоферолы, нафтохиноны, гормоны щитовидной железы, катехоламины и ЛС (тербуталин, пероральные контрацептивы). Как правило, это циклические соединения, имеющие свободные гидроксильные или аминные группы.

Процесс *метильной конъюгации* (*метилирование*) наиболее интенсивен в печени. Конъюгирующим веществом в этих реакциях являются метильные группы, источником которых служит S-аденозилметионин (активная форма метионина). Реакции протекают с участием *метилтрансфераз*.

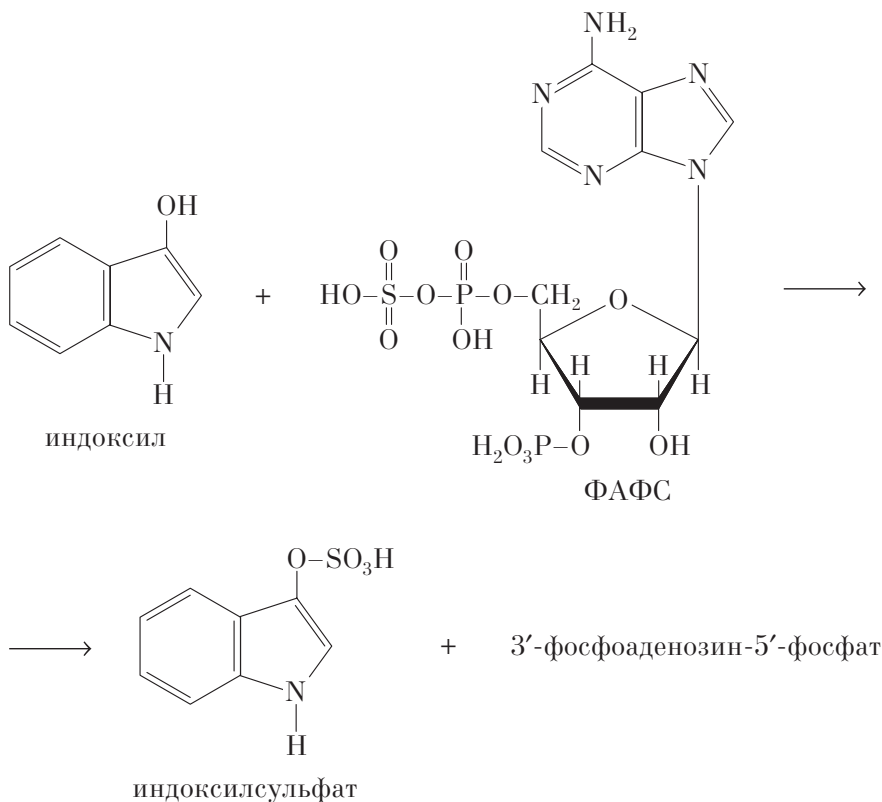


Рис. 18.8. Сульфатирование индоксила

Метильной конъюгации подвергаются соединения, содержащие NH_2 -группу или азот в гетероцикле, гидроксильные или сульфгидрильные группы, т.е. происходит N-, O-, S-метилирование (рис. 18.9). Ксенобиотики, подвергающиеся метилированию, — фенолы, полифенолы, амины, тиолы, гетероциклические соединения типа пиридина, никотината, унитиола, кокаина.

Конъюгации с глутатионом (глутатионирование) подвергаются ксенобиотики с различной химической структурой: эпоксиды, гидроксилмины, алифатические и ароматические соединения. В результате реакции образуются цистеиновые конъюгаты. Среди ЛВ конъюгации с глутатионом подвергаются этакриновая кислота и гепатотоксичный метаболит парацетамола — N-ацетилбензохинонимин, превращающийся при этом в нетоксичное соединение.

Катализируют реакции конъюгации с глутатионом ферменты *глутатион-трансферазы*, которые представляют собой большое семейство как растворимых, так и мембранносвязанных белков. В настоящее время выделено пять изоферментов глутатионтрансферазы.

В большинстве случаев в результате реакций II фазы ксенобиотики полностью утрачивают биологическую активность. Однако иногда происходит

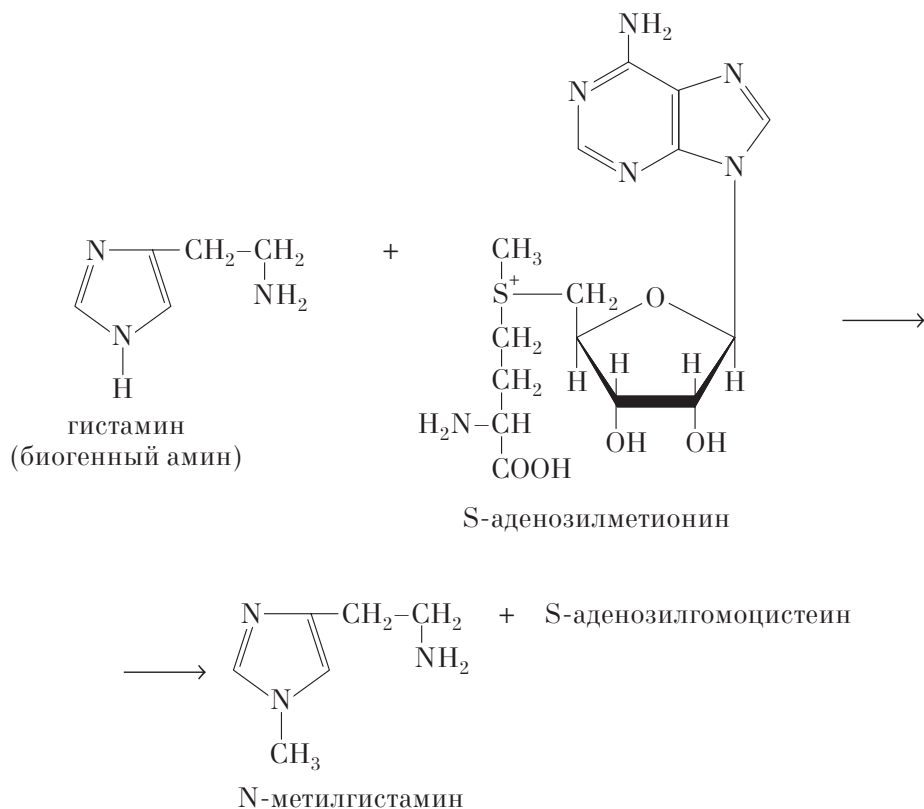


Рис. 18.9. Метилирование гистамина

образование активных метаболитов. Например, глюкуронирование морфина приводит к образованию морфин-6-глюкуронида, обладающего значительным анальгезирующим эффектом.

18.7. Индивидуальные особенности биотрансформации лекарственных веществ

Скорость биотрансформации ЛВ зависит от многих факторов: активности ферментов метаболизма, пола, возраста, состояния организма, одновременного применения других ЛС, характера питания.

Генетические особенности. Индивидуальные различия в метаболизме ряда препаратов и в реакциях на препараты объясняют генетическим полиморфизмом, т.е. существованием в популяции изоформ некоторых ферментов биотрансформации. Это позволяет выделять группы индивидуумов, различающиеся по активности того или иного изофермента метаболизма:

1) «экстенсивные» метаболизаторы (extensive metabolism, EM) — лица с нормальной скоростью метаболизма ЛС; к этой группе принадлежит большинство населения;

2) «медленные» метаболизаторы (poor metabolism, PM) — лица со сниженной скоростью метаболизма определенных ЛС. Они имеют мутации гена, кодирующего тот или иной фермент, результатом чего является снижение ферментативной активности или полное ее отсутствие. Так, например, недостаточность холинэстеразы плазмы крови (фермент гидролизует карбоксиэфиры) приводит к резкому удлинению действия миорелаксанта дитилина. При недостаточности фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы развивается желтуха и нарушаются реакции конъюгации не только билирубина, но и других соединений. В результате многие ЛС становятся токсичными для организма в обычных дозировках. Известны примеры атипичных реакций на вещества (идиосинкразия);

3) «быстрые» метаболизаторы (ultraextensive metabolism, UM) — лица с повышенной скоростью метаболизма определенных ЛС. Имеющиеся у них мутации гена повышают метаболизующую активность фермента. Таким пациентам требуются более высокие дозы ЛС для достижения терапевтического эффекта.

Полиморфизм характерен и для генов, кодирующих транспортеры ЛС.

Влияние гормонов. Половые гормоны, йодтиронины и кортизол являются индукторами синтеза глутатионтрансфераз. Катехоламины повышают активность глутатионтрансферазы путем фосфорилирования через аденилатциклязную систему.

Пол. У мужчин активность микросомальных ферментов выше, чем у женщин, так как синтез этих ферментов стимулируется мужскими половыми гор-

монами. Женский организм более чувствителен к никотину, стрихнину, снотворным препаратам.

Возраст. Чувствительность к ЛС меняется в зависимости от возраста. Так, новорожденные более чувствительны к некоторым веществам, влияющим на ЦНС (в частности, к морфину). Токсичен для детей левомицетин. Это объясняется тем, что в печени у новорожденных малоактивны ферменты (УДФ-глюкуронилтрансферазы и др.). Активность ферментов печени снижается в пожилом и старческом возрасте, вследствие чего уменьшается скорость метаболизма многих ЛС.

Состояние организма. При гипертиреозе повышается чувствительность миокарда к адреналину. Изменяется фармакокинетика ЛС во время беременности, при ожирении. Действие сердечных гликозидов проявляется только на фоне сердечной недостаточности.

18.8. Влияние факторов внешней среды

Индукторы ферментов биотрансформации. Под *индукцией фермента биотрансформации* понимают абсолютное увеличение его количества и (или) активности вследствие воздействия определенного химического вещества, в частности ЛС. Индукции могут подвергаться как ферменты I фазы (изоферменты цитохрома P₄₅₀) и II фазы биотрансформации (УДФ-глюкуронилтрансфераза и др.), так и транспортеры ЛС (гликопротеин Р).

В настоящее время известно более 250 химических соединений, вызывающих индукцию ферментов биотрансформации. К числу этих индукторов относят барбитураты, полициклические ароматические углеводороды, спирты, кетоны и некоторые стероиды. Все индукторы имеют ряд общих признаков. Они являются липофильными соединениями и служат субстратами для цитохрома P₄₅₀. При одновременном назначении с индукторами других ЛС (глюкокортикоидов или пероральных контрацептивов) повышается скорость метаболизма последних и снижается их фармакологическая активность.

Металлы являются индукторами синтеза глутатиона и низкомолекулярного белка металлотионеина. За счет имеющихся в составе этих соединений SH-групп металлы связываются.

Влияние алкоголя на метаболизм ЛС. При хроническом алкоголизме окисление этанола ускоряется на 50–70 % за счет гипертрофии ЭПР и индукции CYP2E1 (изофермент цитохрома P₄₅₀). Кроме того, этанол конкурирует с лекарственными веществами за связывание с CYP2E1, вызывая гиперчувствительность к некоторым принятым одновременно с ним лекарственным препаратам. Так, даже однократный прием алкоголя на фоне применения непрямого антикоагулянта (варфарина) повышает риск кровотечений. Гепатотоксическое действие парацетамола усиливается на фоне применения алкоголя (увеличивается

интенсивность окисления цитохромом P₄₅₀ и образование гепатотоксического метаболита N-ацетилбензохинонимина).

Влияние курения. У курящих людей индукцию цитохрома (CYP1A1) вызывают полициклические ароматические углеводороды (основной компонент смол сигаретного дыма). В свою очередь, интенсивное окисление полициклических ароматических углеводородов системой цитохрома (CYP1A1) превращает их в канцерогены (бенз(а)пирены и нитрозамины), способствующие развитию злокачественных новообразований. Этим объясняют высокий риск развития рака легких у курильщиков.

Зависимость метаболизма ЛС от пищевых факторов обусловлена тем, что в пище могут содержаться индукторы, ингибиторы и предшественники кофакторов ферментов лекарственного метаболизма.

Продукты, повышающие секрецию соляной кислоты (томаты, фруктовые соки, кофеинсодержащие напитки), способны приводить к уменьшению всасывания эритромицина и полусинтетических пенициллинов (ампициллин, оксациллин, амоксициллин).

При потреблении овощей, богатых витамином К (шпинат, салат, цветная и брюссельская капуста, брокколи, калина, зеленые томаты, рябина), снижается антикоагулянтное действие варфарина.

Применение антидепрессантов из группы ингибиторов МАО совместно с продуктами, богатыми симпатомиметиком тирамином (сыр, соевый соус, копченая колбаса, бананы, авокадо, изюм, пиво), способствует выбросу норадреналина из симпатических окончаний. Больных, принимающих ингибиторы МАО, следует предупредить о строгом соблюдении соответствующей диеты.

18.9. Выведение лекарственных веществ из организма

От процессов экскреции (выведения) зависят продолжительность действия и скорость элиминации ЛВ. В процессе выделения участвуют главным образом, почки, гепатобилиарная система, легкие и кишечник. Ксенобиотики из организма могут выводиться в неизменном виде или в виде метаболитов, конъюгатов и химических комплексов с другими биомолекулами (табл. 18.1).

Таблица 18.1

Основные пути выведения лекарственных средств из организма

Путь выведения	Механизмы выведения	Лекарственные средства
С мочой	Клубочковая фильтрация, активная канальцевая секреция	Большинство ЛС в свободной форме
С желчью	Активный транспорт, пассивная диффузия, пиноцитоз	Пенициллины, тетрациклины, стрептомицин, хинин, стрихнин, четвертичные аммониевые соединения
Через кишечник	Пассивная диффузия, желчная секреция	Доксициклин, ионизированные органические кислоты

Окончание табл. 18.1

Путь выведения	Механизмы выведения	Лекарственные средства
Со слюной	Пассивная диффузия, активный транспорт	Салицилаты, бензодиазепины, пенициллины, сульфаниламиды, этанол
С выдыхаемым воздухом	Пассивная диффузия	Средства для ингаляционного наркоза, этанол, камфора, йодиды, эфирные масла
С потом	Пассивная диффузия	Некоторые сульфаниламиды
С материнским молоком	Пассивная диффузия, активный транспорт	Непрямые антикоагулянты, антибиотики, соли лития, карбомазепин, мерказолил

На выведение лекарств почками в определенной степени влияет рН мочи. Так, при кислой реакции мочи улучшается выделение щелочных соединений (алкалоидов) и затрудняется выделение лекарств кислого характера (барбитуратов, сульфаниламидов и т.д.). Назначением хлорида аммония можно «подкислить» мочу и тем самым ускорить выделение с мочой оснований, а гидрокарбонат натрия или другие соединения, которые изменяют реакцию мочи на щелочную, будут способствовать выделению из организма веществ кислого характера.

18.10. Биофармацевтический анализ и методы изучения метаболизма лекарственных веществ

Биофармацевтический анализ — новое направление фармацевтической химии. Его задачей является разработка способов выделения, очистки, идентификации и количественного определения ЛВ и их метаболитов в таких биологических жидкостях, как моча, слюна, кровь, плазма или сыворотка крови и др. Исследование фармакокинетики ЛВ подразумевает изучение механизмов всасывания, транспорта, выведения, биологической доступности и процессов метаболизма. Особенно важно определять в биологических жидкостях концентрацию ЛВ, когда они, наряду с терапевтическим эффектом, проявляют токсичность. Необходимо также контролировать содержание ЛВ в биологических жидкостях больных, страдающих желудочно-кишечными заболеваниями и заболеваниями печени и почек, так как при таких заболеваниях изменяются процессы всасывания, нарушаются метаболические превращения, замедляется выведение ЛВ из организма.

Биологические жидкости — очень сложные объекты для выполнения анализа. Они представляют собой многокомпонентные смеси, включающие большое число неорганических и органических соединений различной химической структуры (микроэлементы, аминокислоты, полипептиды, белки, ферменты и др.). Их концентрация колеблется от 10 мг/мл до нескольких нанограммов.

Всякий биологический объект очень динамичная система. Ее состояние и химический состав зависят от индивидуальных особенностей организма, воздействия факторов внешней среды (состав пищи, физическая и психическая нагрузка и т.д.). Всё это усложняет выполнение биофармацевтического анализа, так как на фоне столь большого количества сложных по химическому строению органических веществ нужно определять нередко очень малые концентрации ЛВ.

Процесс выполнения биофармацевтического анализа включает несколько последовательно выполняемых стадий: экстракцию из биологической жидкости, разделение, идентификацию и количественное определение ЛВ или его метаболитов. Для определения в биологических жидкостях терапевтических и токсических доз ЛП используют широкий спектр методов исследования.

Спектрофотометрические исследования в УФ и видимой областях спектра наиболее часто используют для определения ЛС и его метаболитов. Метод отличается точностью и простотой.

По сравнению со спектрофотометрией, чувствительность *флуориметрического метода* выше в 10 раз. Поэтому с помощью флуориметрических методик можно подвергать биофармацевтическому анализу ЛВ, суточные дозы которых составляют несколько миллиграммов.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) широко применяется в биофармацевтическом анализе ввиду высокой разрешающей способности и чувствительности. Она отличается простотой выполнения, однако при анализе сложных смесей, содержащих большое число компонентов, этот метод не всегда позволяет достигнуть нужного эффекта. Более перспективно использование ТСХ в сочетании с такими методами, как планиметрия и денситометрия. ТСХ нередко сочетают со спектрофотометрическим и флуориметрическим измерениями (хроматоспектрофотометрия, хроматофлуоресценция).

Метод *масс-спектрометрии* отличается высокой разрешающей способностью, в десятки раз превышающей другие методы. Известны различные варианты масс-спектрометрии. Один из них основан на применении масс-спектрометрии с низкой энергией ионизирующих электронов после предварительного выделения фракции биологической жидкости экстракцией или бумажной хроматографией.

Газожидкостная хроматография (ГЖХ) ввиду высокой чувствительности, хорошей воспроизводимости и точности стоит на одном из первых мест среди физико-химических методов, используемых для анализа ЛВ и их метаболитов в биологических жидкостях. До выполнения анализа методом ГЖХ необходимо предварительно осуществить многократную экстракцию (чаще эфиром, хлороформом или этилацетатом) и реэкстракцию ЛВ или его метаболитов. Метод позволяет определять ЛВ при содержании от 10 нг/мл в биологической пробе.

Высокоэффективная (высокоскоростная) жидкостная хроматография (ВЭЖХ) отличается от ГЖХ тем, что позволяет испытывать соединения, обладающие термической неустойчивостью и молекулярной массой более 400.

Для этих соединений исключается фаза перевода в летучие производные. В последние годы созданы системы для ВЭЖХ, позволяющие из 0,5 мл мочи в одну стадию без предварительной экстракции получить до 150 пиков индивидуальных веществ.

Метод *хромато-масс-спектрометрии* подразумевает комбинированное применение газожидкостного хроматографа и масс-спектрометра в одном приборе. Суть метода заключается в том, что масс-спектрометр используется как высокочувствительный детектор к газовому хроматографу. Основное достоинство метода — большая чувствительность, достигающая нескольких пикограммов. Высокая специфичность позволяет анализировать неразделенные компоненты этих смесей, а высокая чувствительность дает возможность определять метаболиты ЛВ, применяемых в очень малых терапевтических дозах.

Для определения малых концентраций ЛВ и их метаболитов в крови, моче, тканях, а также для изучения метаболизма и проведения фармакокинетических исследований применяют *иммунохимические методы*. Они основаны на высокочувствительной и специфичной реакции антител с гаптенами (соответствующими низкомолекулярными биологически активными соединениями) и на способности гаптена, содержащего специально введенную метку, конкурировать за активный центр антитела.

Метаболизм лекарственного вещества можно исследовать *in vivo*. Используя метод *перфузии*, в изолированный орган можно вводить лекарственное вещество и выяснять путь его превращения с помощью анализа выходящей из органа жидкости. Проведение исследования в тонком кишечнике, печени, сердце, почках способствует пониманию роли этих органов в метаболизме. Информативность метода перфузии органов в изучении метаболизма сильно возросла после разработки методик, в которых меченный изотопом метаболит вводится в течение очень короткого периода, после чего метаболизм резко останавливают путем быстрого замораживания ткани. Таким способом удается выяснить распределение изотопа среди множества родственных метаболитов в течение нескольких секунд после его введения и через последующие фиксированные интервалы времени.

Большие возможности в биофармацевтическом анализе открывает применение радиоактивных изотопов. Сущность *метода меченых атомов* заключается в том, что в организм в составе органических соединений вводятся радиоактивные изотопы ряда элементов (например, водород ^3H , углерод ^{14}C , фосфор ^{32}P , йод ^{131}I , сера ^{35}S). Искусственные радиоактивные изотопы, кроме тяжелого водорода, по химическим свойствам и биологическому действию почти не отличаются от природных элементов, но в отличие от них, благодаря радиоактивности, легко могут быть обнаружены в организме.

Использование препарата с радиоактивной меткой дает возможность оценить всё количество связанных с ним материалов в комплексной смеси эндогенных веществ в биологических образцах. В последние годы стали применять стабильные изотопы, абсолютно безвредные для живого организма в количествах,

необходимых для эксперимента. Стабильные изотопы можно долго хранить, так как они (в отличие от радиоактивных изотопов) не распадаются.

Радиохимические методы отличаются высокой чувствительностью и в сочетании с хроматографией дают возможность выявить все вещества с радиоактивной меткой. Использование меченых молекул позволяет установить распределение и локализацию введенного ЛВ и метаболитов во всех системах организма с большой специфичностью и чувствительностью. В результате можно получить четкое представление о процессе транспорта и выведения из организма этих веществ.

Рекомендуемая литература

Биологическая химия : учебник / А.Д. Таганович [и др.]. Минск, 2016.

Биохимическая фармакология / под ред. П.В. Сергеева, Н.Л. Шимановского. М., 2010.

Биохимия / под ред. Е.С. Северина. М., 2016.

Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинжера. В 3 т. Т. 1. Лаборатория базовых знаний / Д. Нельсон. М., 2012.

Berg, J.M. Biochemistry / J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. N-Y., 2012.

Palmer, M. Biochemical pharmacology / M. Palmer [et al.]. New Jersey. 2012.

Marks' basic medical biochemistry : a clinical approach / M. Lieberman, A. Marks, A. Peet. Baltimore. 2013.

Предметный указатель

А

- Абзимы 112
Аденилатциклаза 202
S-Аденозил-Мет см. *S-Аденозилметионин*
S-Аденозилметионин 256, 335, 341, 640
Аденозинмонофосфат (АМФ) 347
 циклический 348
Аденозинтрифосфат 77, 138
Адипоциты 224, 615
Адреналин 77, 202, 207, 214, 224, 272, 335, 340, 428, 435, 456, 458, 567, 569, 572, 580, 605, 606, 610
Адренокортикотропный гормон 431
Адренорецепторы 342, 451, 539
Азотистый баланс 309–312
Активность фермента 88–93, 131, 191
Аланин 25, 27, 328
Аланиновая трансаминаза 325
Алкалоз 532, 537, 539, 585
Алкогольдегидрогеназа 75, 77, 80, 216, 506, 635
Альбинизм 107
Альбумины 22, 48, 254, 289, 442, 519, 544, 552, 560, 594, 595, 597
Альдегиддегидрогеназа 506, 635
Альдолаза 108, 205
Альдостерон 428, 430, 469–470
 α -Амилаза 75, 94, 108, 111, 191
Аминоацил-тРНК 392
Аминоацил-тРНК-синтетаза 389, 391, 392
Аминокислоты 24
 активированные 389, 391
 алифатические 27
 ароматические 27
 буферная система 29
 всасывание 316
 гликогенные 211
 декарбоксилирование 335–342
 заменяемые 310
 изоэлектрическая точка 28
 кетогенные 334
 классификация 25
 незаменимые 310, 481
 нейтральные 28, 316
 непротеиногенные 24
 протеиногенные 24
 разделение 55–56
 свойства 26
 серосодержащие 27
 спектральные свойства 29
 стереоизомеры 29
Аминолевулиновая кислота 591
 δ -Аминолевулиновой кислоты синтаза 591
Амины биогенные 311, 511
Аммиак 27, 190, 309, 320, 327–329
АМФ см. *Аденозинмонофосфат*
Анализ иммуноферментный 62–63, 624
Ангиотензины 32, 458, 469
Андрогены 433, 466, 473–474
Анемия
 макроцитарная 513
 мегалобластическая 366
 серповидноклеточная 415
Антивитамины 487
Антикоагулянты 577–579
Антиоксидантная система 160
 неферментативная 161
 ферментативная 160
Антиплазмин 320, 581–582
Антителя 15, 23, 56, 62–67
Антитрипсин 313, 421, 423, 561, 577, 582
Антитромбин III 577, 582
АПБ см. *Белок ацилпереносящий*
Апобелки (аполипопротеины) 45
Апотомический путь 196
Апоферритин 550
Арахидоновая кислота 229, 277, 282
Аргиназа 80, 90, 330, 555
Аргинин 25, 26, 33, 80, 316, 330, 352
Аргининосукцинат 330
Аргининосукцинатлиаза 330

Аргининянтарная кислота 330
АсАТ 324–326
Аспарагин 25–27, 45, 132, 328
Аспартат 326, 330
Аспирин 99, 282
Атеросклероз 261, 336, 422
АТФ см. *Аденозинтрифосфат*
Ca²⁺-АТФаза 459
АХАТ 250, 257
Ацетальдегид 126, 216, 635
Ацетальдегиддегидрогеназа 126
Ацетил-КоА 101, 121, 129
Ацетил-КоА-карбоксилаза 271, 519
Ацетилхолин 78, 96, 459, 502
Ацетоацетат 283
Ацетоацетил-КоА 283, 334
Ацетон 49, 285; см. также *Тела ацетоновые (кетонные)*
Ацидоз 215–216, 328, 532, 538, 539, 585–586
Ацилглицеролы 229–232
 функции 231–232
Ацилирование 250
Ацил-КоА 125, 146, 153, 248, 250, 286
Ацилтрансфераза 75, 250, 286

Б

Белки
 выделение 49
 высаливание 49
 G-белки 450
 гидроксилирование 396
 гликозилирование 254
 глобулярные 48, 296
 интегральные 144, 297
 конформация 44
 модификация 396
 молекулярная масса 22
 негистоновые 352
 обмен 309
 осаждение 49
 переваривание 313
 плазмы крови 560
 пренилирование 396
 простые 45, 309

 разделение 51, 58
 свойства 46
 структура вторичная 36–38
 структура надвторичная 38
 структура первичная 34
 структура третичная 39
 структура четвертичная 42
 сульфатирование 638, 640
 точка изоэлектрическая 47
 фосфорилирование 46
 функции 22
 ценность биологическая 479
 электрофорез 58
Белковая потребность 310
Белковое питание 310
Белковые факторы
 свертывания крови 15
Белок ацилпереносающий 273
Белок-репрессор 381, 397
Бери-бери 486, 502
Бесплодие 493
Билирубин 595
Биогенные амины 19, 511, 638
Биологическое окисление 123
Биомембраны 296
Биосинтез белка 138, 598, 619
Биотин 518
Биофлавоноиды 161, 163
Биоэнергетика 134
1,3-Бифосфоглицерат 207
Блот-анализ 406
Болезнь Паркинсона 42
Брожение 74
 спиртовое 197, 216
Буферные системы 530, 545, 583

В

Вазопрессин 532–533
Валин 25, 27
Вестерн-блоттинг 63, 405–406
Взаимодействие
 водородное 41
 гидрофобное 39, 41
 ионное 41
 электростатическое 39

Викасол 497
 Витаминоподобные вещества 524
 Витамины 478
 А 488–493
 аскорбиновая кислота 520–523
 В₁ 501–503
 В₂ 504–505
 В₆ 510–512
 В₉ 512–515
 В₁₂ 515–518
 D 498–500
 Е 493–496
 К 496–497
 классификация 487
 пантотеновая кислота 507–510
 Н 518–519
 РР 505–507
 Внеклеточная жидкость 530
 Внеклеточный матрикс 446
 Водный обмен 530
 Воски 232
 Восстановительный путь 217
 Вторичные посредники 452–453
 Высаливание 49
 Высшие спирты 226
 жирные 239

Г

Галактоза 238, 298, 616
 ГАМК см. *Кислота γ-аминомасляная*
 Ганглиозиды 227, 237, 238
 Гаптоглобин 561, 563
 Гастрин 32, 459
 Гексокиназа 111, 196, 213
 Гель 59
 Гель-фильтрация 57
 Гель-электрофорез 62
 Гем 43, 591
 Гемоглобин 43
 распад 594
 свойства буферные 584
 четвертичная структура 43, 44
 Гемолитическая анемия 591
 Гемосидероз 551
 Гемостаз 567

коагуляционный 571
 сосудисто-тромбоцитарный 569
 Гемофилия 107, 423
 Гены
 мутация 72, 415, 535, 642
 оператор 397, 398
 регулятор 397
 структурные 380
 транскрипция 377
 экспрессия 269, 386, 397, 477
 Гепарин 187–188, 577
 Гепатит 30, 67, 332
 Гиалуроновая кислота 187
 Гидроксизин 45
 Гидроксипролин 27, 45, 310
 Гидролазы 75, 78
 Гидролиз 24, 31, 36, 67
 Гипераммониемия 332–333
 Гипервитаминозы 477, 486, 488, 493,
 496, 499
 Гипергликемия 217, 224–225
 Гиперкалиемиа 538, 539
 Гипернатриемия 536
 Гипертиреоз 439, 476, 643
 Гиповитаминоз 154, 245, 486
 Гипогликемия 225, 605
 Гипокалиемиа 539
 Гипокальциемиа 545
 Гипоксия 154, 592
 Гипонатриемия 537
 Гипоталамус 33, 341, 458, 467, 482
 Гипофиз 32, 71, 225, 430, 440, 467
 Гистамин 27, 77–78, 337–338
 Гистидин 26–27, 43–44, 46, 159,
 310, 323
 Гистоны 352–353
 Гликоген 183, 185
 биосинтез 196, 198–200
 распад 200–203
 Гликогенолиз 196, 200
 Гликогенсинтаза 199
 Гликогенфосфорилаза 201
 Гликозаминогликаны 186–187
 Гликозилирование 254, 437
 Гликолиз 196, 203

Гликолипиды 237, 296
Гликолитическая оксидоредукция 205–206
Гликопротеины 45, 178, 189, 298
Гликохолевая кислота 243
Глицерол 121, 135, 216, 229, 233
Глицерофосфолипиды 233, 235, 246
Глобулины 48, 560, 627
Глутамат 309, 317, 321, 325–326
Глутаматдегидрогеназа 108, 321
Глутамин 25–27, 327
Глутаминовая кислота 26, 30, 326, 335
Глутатион 32, 82, 161, 220, 317
Глутатионпероксидаза 161, 553
Глутатионредуктаза 566
Глюкагон 32, 202, 207, 214, 224, 272, 428, 610, 620
Глюкоза 181
 окисление анаэробное 197
 окисление аэробное 208
 транспорт 193
 фосфорилирование 195
Глюкозный транспортер 194
Глюкозо-1-фосфат 198, 200
Глюкозо-6-фосфат 101, 114, 195–196
Глюкозо-6-фосфатаза 201, 211, 212
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 506
Глюкозурия 225
Глюкокиназа 196, 616
Глюкокортикоиды 214, 224, 430, 466
Глюконеогенез 210–215
Глюкуроновый путь 221–223
ГМФ см. *Гуанозинмонофосфат*
Гомоцистеин 513, 517, 523
Гормон(ы) 426
 адренокортикотропный 440
 белково-пептидной природы 428, 439
 гипофиза 71
 гонадотропины 428
 железы щитовидной 442, 474
 β -липотропин 440
 половые 442
 производные аминокислот 428

 стероидные 269
 тиреотропин 428
График Лайнуивера – Берка 92
Грелин 482
Группа простетическая 46, 79
Гуанилатциклазы 444, 464
Гуанин 346
Гуанозинмонофосфат (ГМФ) 347
 циклический 444

Д

Дегидрогеназы 76
 пиридинзависимые 124
 флавинзависимые 125
Дезаминирование аминокислот 312
 внутримолекулярное 329
 восстановительное 329
 гидролитическое 329
 непрямое 323
 окислительное 321, 329
 прямое 322
Дезоксирибоза 180, 347
Декарбоксилазы 335
 аминокислот 511
Декарбоксилирование
 глутамата 335–336
 окислительное 127, 209
 пирувата 127, 209
Декстрины 191
2,3-Дифосфоглицерат 207, 587
Додецилсульфат натрия 59
Домены 38
Дыхание тканевое 139

Е

Единицы активности 88
Еноил-КоА-гидратаза 292
Енолаза 206

Ж

Железа
 паращитовидная 440, 544, 546
 поджелудочная 103

щитовидная 151–152, 219, 224,
386, 396, 429, 435–439

Железо 547

гемовое 548

негемовое 548

Желтуха 595

гемолитическая 595

механическая 596

паренхиматозная 596

Желудочный сок 33, 90, 191, 279

Желчные кислоты 240, 242

Желчные пигменты 595

Жирные кислоты см. *Кислоты*
жирные

Жировая ткань 614

З

Зонд 64, 405, 407, 410

И

Изоаллоксазин 46, 125

Изолейцин 25, 27, 481

Изомеразы 75

Изопрен 241

Изоферменты 105

Иммуноглобулины 22, 564

Иммуноферментный анализ см. *Ана-*
лиз иммуноферментный

Иммуноэлектрофорез 63

Ингибирование 95

конкурентное 95

неконкурентное 98

необратимое 94

обратимое 94

Ингибиторы 94

матричных синтезов 400

свертывания крови 577

трипсина 316

ферментов 94

Инозитол-1,4,5-трифосфат 235, 459

Инсулин 71, 118, 195, 199, 200, 202,
223, 224, 269, 287, 428, 440, 461

Интегрины 445–446

Интерлейкин 280

Интроны 385–386

ИТФ см. *Инозитол-1,4,5-трифосфат*

Й

Йод 555

Йодсодержащие гормоны 435–439

К

Калий 537–539

Кальмодулин 455, 460

Кальций 543

фактор свертывания крови 568

Кальцитонин 435, 544

Кальцитриол 433, 498, 544

Карбамоилфосфат 330, 366

Карбгемоглобин 588

Карбоангидраза 46

Карбоксилирование 132, 175, 294,
396

Карбоксипептидазы 70, 312, 315

Карнитин 24, 290–291, 524

Каротины 165, 241, 489

Катаболизм 117–120, 121–123, 127

Каталаза 46, 77, 160, 322

Катализ 85–87

Каталитический участок 97

Катехоламины 429, 435

Кератансульфаты 187

Кератомалиция 493

α -Кетоглутарат 118, 130–133, 145,
321, 324–326, 329

α -Кетокислоты 325, 511

Кетонемия 285

Кетоновые тела см. *Тела ацетоновые*
(кетонные)

Кетонурия 285

Киназа фосфоорилазы 201

Кислород 155–157

Кислота(ы)

адениловая 347, 508

δ -аминолевулиновая 591, 593

γ -аминомасляная 336

арахидоновая см. *Арахидоновая*
кислота

- ацетилсалициловая 522, 586, 596
гиалуроновая 187
гликохолевая 243
глутаминовая см. *Глутамат*
глюкуроновая 177, 188, 222
молочная 207, 215, 315
мочевая 332, 356, 357
нейраминавая 183, 298
оротовая 346, 364
пальмитиновая 229, 276
пантотеновая 507
парааминобензойная 512, 636
пировиноградная см. *Пируват*
рибонуклеиновая см. *РНК*
салициловая 177
тетрагидрофолиевая 362, 513
УДФ-глюкуроновая 221, 223
уксусная 183, 530
уридиловая 348
фолиевая 256, 512; см. также *Витамин B₉*
фосфатидная 233, 286
фосфорная 233, 237
фумаровая см. *Фумарат*
хенодезоксихолевая 242–243
холевая 242–243
щавелевоуксусная см. *Оксалоацетат*
яблочная 154
янттарная 154, 336
Кислотно-основное состояние 583–586
Кислоты жирные 227
активирование 286
биосинтез 270
всасывание 247–248
высшие 228
насыщенные 228
незаменимые 479
ненасыщенные 228
 β -окисление 291–293
окисление 290
транспорт в крови 254
Клеточное ядро 19
Клетчатка 183, 193
Клонирование 409
Кобаламин 84, 500, 515–518;
см. также *Витамин B₁₂*
Кобальт 515, 556
Код 389
Кодон 390
Коллаген 22, 27, 40, 48
Компартментализация 299, 598
Комплекс
дыхательной цепи 131, 139, 143
 α -кетоглутаратдегидрогеназный
130–132
пируватдегидрогеназный 127, 129
фермент-субстратный 86, 101
Комплементарность 41, 370
Константа Михаэлиса 91–92
Кортизол 428, 430–431, 466, 611
Кортиколиберин 456
Кортикостероиды 23, 442
Кортикотропин см. *Гормон адрено-кортикотропный*
Кофермент А 83
Кофермент(ы) 79, 81–84
Коэнзим
А 127–128, 290, 291, 508
Q 142, 144, 268
Креатин 138, 332, 524, 560
Креатинин 332, 560
Креатинкиназа 76, 108, 604
Креатинфосфат 134, 138, 545, 604
Кретинизм 476
Кровотечение 562, 567, 569
Кровь
клетки 566–567
плазма 559
свертывание 279, 572
состав 559
Ксенобиотики 156, 623, 637, 641
Кэп 384
Кэпирование 384
- Л**
- Лактаза 191
Лактат 106, 196, 203, 207, 211, 215
Лактатдегидрогеназа 42, 106, 207

ЛДГ см. *Лактатдегидрогеназа*
 Лейкотриены 277–278, 280
 Лейкоциты 558, 567
 Лейцин 25, 27, 30, 481
 Лекарственное вещество 622
 Лекарственное средство 622
 Лекарственный препарат 18, 96, 154
 Лептин 32, 482–483, 484
 Лецитин см. *Фосфатидилхолин(ы)*
 Лиазы 75
 Либерины 32
 Лигазы 75
 Лизин 26–27, 46
 Лизосомы 20, 318
 Лизоцим 38, 490
 Липаза 103, 109, 242, 245
 Липиды 226
 классификация 226–227
 неомыляемые 226, 239
 омыляемые 226
 переваривание 242–250
 Липогенез 293
 Липолиз 255, 279, 285, 288, 606
 Липопротеинлипаза 236, 254, 618
 Липопротеины 45
 номенклатура 252
 структура 251
 Липосомы 307–308
 ЛХАТ 259–260

М

Магний 541–542
 Макроглобулин α_2 313, 560, 562, 563
 Макроэлементы 535–547
 Макроэрги 135
 Малат 130, 131, 145, 211, 330
 Малатдегидрогеназа 106, 131, 211, 330
 Малонат 95, 153
 Малонил-КоА 270–272
 Мальтаза 191–192
 Мальтоза 180, 182, 191
 МАО см. *Моноаминоксидаза(ы)*
 Марганец 554–555

Мевалонат 263–267
 Медь 551–552
 Межвитаминные взаимоотношения 523
 Меланин 552
 Мелатонин 160, 428
 Мембраны 19, 100
 Метаболизм 113–122
 интеграция 598–618
 межорганный 618–621
 Метаболом 116–117
 Метаболомика 116–117
 Металлопротеины 46
 Метгемоглобин 590
 Метилирование 84, 353, 396, 640–641
 Метилкобаламин 515, 517
 S-Метилметионин 524
 Метилтрансферазы 78, 342
 Метионин 25, 27, 30, 255
 Метод(ы) анализа 15
 аминокислотной последовательности 70
 С-концевой 70
 N-концевой 68
 определения аминокислоты 67–71
 Эдмана 69
 Микросомное окисление 155, 631
 Микросомы 276
 Микроэлементы 479, 481, 526, 547
 Микседема 476
 Минералокортикоиды 466
 Минеральные вещества 481, 535
 Миоглобин 43–45
 Митохондрии 19–20
 дыхание 139
 ингибиторы 152–153
 мембраны 20, 144
 Мицеллы 236, 247–248, 528
 Молекулярная биология 345
 блот-анализ 406
 методы 403–425
 Молекулярная инженерия 111
 Моноаминоксидаза(ы) 342, 511, 552
 Моноацилглицеролы 229, 247–248

Мононуклеотиды 345, 348–349
Моноксигеназы 77, 155, 631
Моносахариды 179
Моча 66, 645
Мочевая кислота 160
 синтез 356–358
Мукополисахариды 186
Мутация 411

Н

Надпочечники 430, 432
Насосы протонные 148
Натрий 535–536
Никотинамидадениндинуклеотид
 82–83
Норадреналин 288, 335, 340–342
Нуклеиновые кислоты
 структура 349–355
 функции 354
Нуклеозиды 347, 368
Нуклеопротейны 45, 356
Нуклеосомы 352–353
Нуклеотидазы 356
Нуклеотиды 348

О

Оболочка гидратная 48–49
β-Окисление 290, 291, 293–294
Окисление
 биологическое 123
 микросомальное 155, 631
 свободное 151
Оксалоацетат 122, 129, 131, 211
Оксигемоглобин 585, 587
Оксигеназы 76–77
Оксидаза(ы) 76–77
Оксид азота 157, 453, 465–466
Оксидоредуктазы 75–76
Оксидоредукция гликолитическая
 205–206
Окситотин 32–33, 459
Олигосахариды 181–183
Оперон 379, 397–399
Орнитин 24, 330

Оротидинмонофосфат 364, 365–366
Основания азотистые 346, 368
 минорные 346
 пиримидиновые 346
 пуриновые 346
Остеопороз 189, 472, 499

П

Паратирин 429, 440, 456, 545
Пектин 190, 193
Пеллагра 486, 507
Пентозофосфатный путь 217–221
Пепсин 22, 74, 90, 312, 313–314
Пепсиноген 313–316
Пептидная связь 35
Переаминирование 323–326
Переокисное окисление липидов 158,
 636
Пероксисомы 299, 322, 395
Пигменты 595
 желчные 595
Пиридоксальфосфат 82, 335, 500,
 510
Пиридоксин 500, 510
Пируват 118
 в синтезе глюкозы см. *Глюконеогне-
 нез*
 декарбоксилирование см. *Декарбок-
 силирование окислительное*
Пируватдегидрогеназа 77, 128
Пируватдекарбоксилаза 216
Пируваткарбоксилаза 132, 211, 213,
 335, 519
Пируваткиназа 206, 213–215
Плазмида 407–408
Плазмин 575, 577, 580–582
Плазминоген 562, 580–582
Пластохинон 82, 168–169, 171–172
Пластоцианин 171
Подагра 97, 357
Поджелудочная железа 103, 314
Полиаденилирование 384
Полиамины 563
Полипептиды 31, 645
Полирибосомы 631

Полисахариды 183
 Полиурия 535, 539
 Порфирины 515
 Правило Чаргаффа 351
 Праймер 369–372, 414, 416
 Прегненолон 430
 Принцип комплементарности 100, 351, 369, 385, 389
 Провитамины 232, 240, 486, 489
 Прогестерон 430, 432–433, 471
 Проинсулин 396, 420, 429, 440–441
 Прокарбокси-peптидаза 315
 Прокариоты
 оперон 379–380
 рибосомы 354
 Пролин 24–25, 27, 156
 Промотор 379, 382
 Простагландины 277–278, 280
 Простациклины 232, 278, 280
 Протеиназы 75, 312, 571
 Протеинкиназа(ы) 454
 А 103, 454
 В 199–200, 450
 С 455
 кальций/кальмодулинзависимая 455
 цАМФ-зависимая 454
 Протеогликаны 179, 186–187
 Протеолиз 104
 ингибиторы 319–320
 ограниченный 100, 105, 312
 тотальный 312, 318
 Протромбин 45, 396, 562, 568, 571
 Процессинг 372, 384, 395

Р

Реакция(и) химическая(ие) 22
 экзергоническая 85, 114
 эндергоническая 85, 114
 Регуляция 99
 Репарация 374–377
 Репликация 369, 372
 Репрессоры 381, 382, 397–398, 447
 Ресинтез 248
 триацилглицеролов 248–249
 фосфолипидов 251

Рестриктазы 109, 403–405, 407, 412
 Ретикулоциты 550, 591, 594
 Ретровирусы 387, 407
 Рецепторы 443
 1-ТМС 444
 7-ТМС 444–445
 адгезионные 445
 внутриклеточные 447–448
 ионного канала 446
 мембранные 444, 450
 Рибитол 504
 Рибоза 180
 Рибозимы 74, 387, 394
 Рибонуклеаза 111, 396
 Рибосомы 20, 87, 354, 389
 Рибофлавин 125, 154, 504–505
 РНК 354
 биосинтез см. *Транскрипция*
 информационная 354–355
 рибосомная 354
 сплайсинг 384
 структура вторичная 355
 транскрипция см. *Транскрипция*
 транспортная 354–355
 РНКаза см. *Рибонуклеаза*
 РНК-полимераза 378
 Родопсин 490–491

С

Сахараза 191
 Сахароза 182
 Свободные радикалы кислорода 157, 159, 162
 Связь
 водородная 50
 гликозидная 45, 181–183, 186–187
 дисульфидная 35, 40, 60, 396
 ионная 45, 50
 ковалентная 36, 40, 79
 фосфодиэфирная 349–350
 Секвенатор 70
 Селен 161, 553–554
 Селеноцистеин 439
 Серин 25, 45, 99
 Серотонин 27, 339–340

Синдром Вернике 503
Синдром Лёша – Нихана 359
НО-Синтаза 465
Синтез белка 400
ингибиторы 400–401
Синтез жирных кислот 270–276
Система(ы)
аденилатциклазная 533
гемостаза 567
крови буферные 583–585
противосвертывающая 576
ренин-ангиотензин-альдостероновая 469
фибринолитическая 579–582
Сквален 241, 267
Скорбут см. *Цинга*
Сок желудочный см. *Желудочный сок*
Соляная кислота 24, 313, 315
Соматолиберин 458
Соматостатин 33, 458, 482
Соматотропин 420, 428
Сорбитол 197, 217
Сорбитолдегидрогеназа 217
Специфичность действия 80–81
абсолютная 80
групповая 80
относительная 80
стереохимическая 80
субстратная 82
Спирты высшие см. *Высшие спирты*
Стероиды 93, 110, 164, 239–240, 265
Стрептокиназа 111, 580, 581–582
Структуры
надвторичная 38
надмолекулярная 183
Субъединица 42
Сукцинат 95, 122, 130, 131–133, 145, 153
Сукцинатдегидрогеназа 95–96, 131, 153, 504
Сукцинил-КоА 130–133, 284
Сульфатиды 296
Сульфолипиды 227, 237
Сульфотрансферазы 640

Супероксиддисмутаза 46, 160, 552, 566
Сурфактант легких 236
Сфингозин 233, 237–238
Сфинголипиды 599
Сфингомиелины 237, 296, 524

Т

Таурин 243
ТГФК см. *Кислота тетрагидрофолиевая*
Тела ацетоновые (кетонные) 284–285, 560, 613
Теломераза 373–374
Теломеры 373–374, 387
Теория специфичности ферментов
Кошланда 81
Фишера 80
Терпены 240–241
Тестостерон 432, 443
Тетрагидробиоптерин 339
Тиамин см. *Витамин В₁*
Тилакоиды 167, 171, 173
Тимин 346, 348, 360
Тирамин 644
Тиреотропин 45, 178, 189, 428
Тирозин 25, 27, 30, 80, 177, 339
Тирозинкиназа 445, 461–463, 630
Тироксин 23, 27, 152, 224, 428, 435, 439, 476
Тиролиберин 33
Тканевое дыхание см. *Дыхание тканевое*
 α -Токоферол 161–162, 493
Трансаминазы 324–325, 337
Транскортин 23, 442, 627
Транскриптон 379–380, 382, 385, 399
Транскрипция 377
инициация 380–382
регуляция 397–398
транспортная 354–355
Трансляция 388–394
Транспорт
кислорода 587–591
лекарственных веществ 626–628

углекислого газа 587–591
 электронов 137, 144, 146, 148, 167, 168, 170
 Трансферазы 75, 77–78
 Трансферрин 45, 46, 160, 521, 548–549
 Треонин 25, 27, 29, 46, 80, 323
 Триацилглицеролы
 биосинтез 286–287
 гидролиз 289
 β-моноацилглицерольный 248–250
 путь глицеролфосфатный 248–250
 ресинтез 249
 Трипсин 71, 78, 90, 105, 312
 Триптофан 25, 27, 29, 80, 156, 177, 339, 481, 506
 Тромбин 74, 320, 396, 570, 573–575, 577
 Тромбоксан(ы) 159, 232, 277–280
 Тромбоциты 279, 559, 566, 569

У

Убиквитин 319, 467
 Убихинол см. *Коэнзим Q*
 Углеводы 178
 классификация 179–189
 переваривание 191–193
 Ультрацентрифугирование 52–53
 Уравнение
 Лайнуивера – Берка 92
 Михаэлиса – Ментен 91

Ф

ФАД см. *Флавинадениндинуклеотид*
 Фактор VIII 423
 Фактор(ы) белковые
 инициации 389, 392
 Кастла внутренний 516, 625
 свертывания крови 15, 562, 568, 572
 терминации 389, 394
 элонгации 389
 ФАФС см. *3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат*

Фенилаланин 25, 27, 29, 80, 177, 339–341, 481
 Фенилкетонурия 423
 Ферменты 74
 аллостерические 79, 100
 влияние температуры 89
 гибридные 111–112
 единицы активности 88
 классификация 75
 конформация 81
 механизм действия 85–86
 молекулярная активность 86
 рН-оптимум 105
 органоспецифичность 106
 протеолитические 33, 111, 312
 регуляция активности 100
 специфичности действия 80
 формы множественные см. *Изоферменты*
 Ферредоксин 111, 168, 170, 172
 Ферредоксин-НАДФ⁺-оксидоредуктаза 168–169, 170
 Ферритин 46, 162, 548–550
 Фибрин 105, 571
 Фибриноген 45, 178, 421, 560, 562, 568–574, 580
 Фибринолиз 103, 312, 562, 568, 578–579
 Фибробласты 423
 Фибронектин 63, 298, 318, 446, 575
 Фикобилины 166, 168
 Филлохинон 168–169, 497
 Фитол 165, 295
 Флавинадениндинуклеотид (ФАД) 46, 82, 154
 Флавинмононуклеотид (ФМН) 46, 82
 Флавопротеины 46, 125, 152, 158, 168, 170, 632
 Фолиевая кислота см. *Витамин B₉*
 Фолиевые коферменты 513
 Фосфатаза
 глюкозо-6-фосфата 212–213
 кислая 108
 щелочная 63, 90, 109, 236, 499

Фосфатидилинозитол(ы) 227
биомембран 235
Фосфатидилсерин(ы) 234
Фосфатидилхолин(ы) 227, 234, 235
биосинтез 249
Фосфатидилэтаноламин 234
биосинтез 250
3'-Фосфоаденозин-5'-фосфосульфат
(ФАФС) 640
2-Фосфоглицерат 206
3-Фосфоглицерат 138, 167, 206, 212,
335
3-Фосфоглицериновый альдегид 167,
219
Фосфоглюкомутаза 198, 201
6-Фосфоглюконатдегидрогеназы 218,
221, 506
Фосфоенолпируват 134–136, 206,
212–214
Фосфоенолпируваткарбоксикиназа
211–214, 224
Фосфолипаза(ы)
А₁ 246
А₂ 19, 234, 246, 278, 282
С 103, 246, 278, 459
D 246
Фосфолипиды 45, 227, 233–237
Фосфопротеины 46
Фосфор 545–547
5-Фосфорибозил-1-пирофосфат 361
Фосфоорилаза(ы) 201–202
Фосфорилирование
окислительное 137, 148, 198
разобщители 151
субстратное 131, 137
фотосинтетическое 137, 172–173
Фосфорная кислота 237
Фосфосерин 256, 462
Фотосинтез 163–177
Фотосистема I 167, 168–171, 175
Фотосистема II 167, 168–171
Фрагменты Оказаки 372
Фруктоза 181–183, 192, 197, 216,
217, 616

Фруктозо-1,6-дифосфат 205, 207,
212–214, 608
Фруктозо-1,6-дифосфатаза 211–215,
224
Фруктозо-2,6-дифосфат 205, 213,
608–610
Фруктозо-6-фосфат 135, 197, 205,
208, 213, 219
Фтор 556–557
Фумараза 131, 331
Фумарат 130, 131, 326, 330, 362

Х

Хиломикроны 188, 251–256, 260,
263
Химотрипсин 74, 312, 314–316, 320
Химотрипсиноген 314
Хлориды 540–541
Хлоропласты 166–168, 172–175, 235
Хлорофиллы 82, 164, 165
а 168
b 168
Холестерол
биосинтез 265–270
свободный 251, 257, 265
эфир 246, 251–261, 264, 430
Холецистокинин 315, 459, 482
Холин 27, 96, 233–234, 237, 246,
250
Хондроитинсульфат 188, 223, 522
Хроматография 53
адсорбционная 53
аффинная 52, 56, 624
высокоэффективная 58
ионообменная 54
распределительная 53
Хромопротеины 46, 490

Ц

цАМФ см. Аденозинмонофосфат
(АМФ) циклический
цГМФ см. Гуанозинмонофосфат
(ГМФ) циклический
ЦДФ-холин 84, 250, 348

Центрифугирование см. *Ультрацентрифугирование*

Цереброзиды 227, 237

Церулоплазмин 521, 550, 552, 561, 563

Цикл

Кальвина 116, 170, 175–177

Кори 215

пентозофосфатный 116, 175, 221

трикарбоновых кислот 20, 116, 129–133

Цинга 486, 522

Цинк 399, 551, 552–553

Цистеин 25, 27, 30, 35, 39, 141, 208, 273–275, 323

Цитидинмонофосфат 348

Цитозин 346, 348, 353, 373, 375

Цитохромоксидаза 143, 552

Цитохромы 46, 143–144, 146, 153, 156, 168, 633

Цитрат 101, 130, 131, 205, 213, 271, 334, 608

Цитрат-синтаза 129, 131, 133

Цитруллин 24, 330–332

Ш

Шапероны 40

Щ

Щелочная фосфатаза см. *Фосфатаза щелочная*

Щитовидная железа см. *Железа щитовидная*

Э

Эйкозаноиды 158, 232, 277–281, 282, 428

Эластаза 78, 105, 312, 320

Эластин 22, 261, 552

Электрофорез 58

в полиакриламидном геле 52

на бумаге 59

Эмульгирование липидов 242

Эндонуклеазы 356

рестрикционные 404

Эндопептидазы 312

Эндоплазматическая сеть 18, 20, 631

Эндорфины 31, 440

Эндоцитоз 20, 254, 256, 304

Энзимодиагностика 108

Энзимопатии 106–107

Энтерокиназа 316

Энтероциты 121, 193, 247–249, 251, 313, 315, 357, 548

Эпифиз 27

Эргокальциферол 239, 487, 498

Эритромицин 190, 401, 635, 644

Эритроциты 161, 194, 220, 553, 559, 566, 575, 584, 591

Эстрадиол 433, 471, 627

Эстрогены 433, 443, 466, 471, 592;
см. также *Гормоны половые*

Эстрон 471

Этанол 49, 216, 220, 300, 336, 479, 501, 504, 508, 635, 643

Этаноламин 233–235, 246

Эукариоты 273, 354, 378–382, 384–385, 391, 394, 399

Я

Ядро клетки 19, 474

Учебное издание

Таганович Анатолий Дмитриевич
Девина Елена Анатольевна
Олецкий Эдуард Иванович

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Учебное пособие

Ответственный за выпуск *Л.В. Демид*

Подписано в печать 03.09.2018. Формат 70×100 ¹/₁₆.
Усл. печ. л. 53,87. Уч.-изд. л. 44,21. Тираж 500 экз. Заказ

Общество с ограниченной ответственностью «Новое знание».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/276 от 23.12.2015.

Пр. Пушкина, д. 15а, Минск, Республика Беларусь.
Почтовый адрес: а/я 79, 220050, Минск, Республика Беларусь.
Телефон/факс: (10-375-17) 360-20-02; e-mail: nk@wnk.biz

<http://wnk.biz>



Отпечатано в ОАО «Можайский полиграфический комбинат».
143200, г. Можайск, ул. Мира, 93
www.oaomprk.ru, www.oaomnk.rф, тел.: 8-495-745-84-28, 8-49638-20-685

ИЗДАТЕЛЬСТВО



“НОВОЕ ЗНАНИЕ”

Для записей

Наши координаты:
в Минске: (+375-17) 360-20-02, e-mail: sale@wnk.biz

<http://wnk.biz>