



УЧЕБНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Для студентов
медицинских институтов

Т.Т. Березов
Б.Ф. Коровкин

Биологическая ХИМИЯ

УЧЕБНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Для студентов медицинских институтов

Т.Т. Березов
Б.Ф. Коровкин

Биологическая ХИМИЯ

Под редакцией

академика АМН СССР С. С. ДЕБОВА

ИЗДАНИЕ ВТОРОЕ,
ПЕРЕРАБОТАННОЕ И ДОПОЛНЕННОЕ

Допущено Главным управлением учебных заведений
Министерства здравоохранения СССР
в качестве учебника для студентов
медицинских институтов



Москва
«Медицина» 1990

ББК 28.902
Б48
УДК 577.1(075.8)

Рецензент Е. А. СТРОЕВ, проф., зав. кафедрой биоорганической и биологической химии Рязанского медицинского института им. акад. *И. П. ПАВЛОВА*.

Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф.

Б48 Биологическая химия: Учебник/Под ред. акад. АМН СССР С. С. Дебова. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 1990. — 528 с.: ил. — (Учеб. лит. Для студ. мед. ин-тов).

ISBN 5-225-01515-8

Во втором издании учебника (первое вышло в 1982 г.) с учетом новейших достижений в области биохимии и молекулярной биологии изложены сведения о структурных и функциональных особенностях белков, нуклеиновых кислот, углеводов и липидов. Охарактеризованы основные пути биосинтеза и трансформации этих биополимеров, механизмы ферментативного катализа и его регуляции. Большое внимание уделено рассмотрению вопросов биохимии и патобиохимии органов и тканей человека.

Б $\frac{4107000000 - 155}{039(01) - 90}$ 71 - 89

ББК 28.902

© Издательство «Медицина», Москва, 1982

ISBN 5-225-01515-8

© Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин, 1990

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	9
Введение	13
Глава 1. ХИМИЯ БЕЛКОВ	16
Функции белков	17
Содержание белков в органах и тканях	19
Методы выделения и очистки белков	20
Гомогенизация биологического материала	20
Экстракция белков	20
Фракционирование и очистка белков	22
Очистка белков от низкомолекулярных примесей	27
Определение гомогенности белков	28
Аминокислотный состав белков	28
Классификация аминокислот	29
Общие свойства аминокислот	32
Физико-химические свойства белков	37
Молекулярная масса белков	38
Форма белковых молекул	40
Денатурация белков	40
Изоэлектрическая и изоонная точки белков	42
Структурная организация белков	42
Первичная структура белка	44
Вторичная структура белка	51
Третичная структура белка	54
Четвертичная структура белка	57
Классификация белков	60
Химия простых белков	61
Природные пептиды	63
Глава 2. ХИМИЯ СЛОЖНЫХ БЕЛКОВ	65
Хромопротеины	65
Гемопроотеины	65
Флавопротеины	71
Нуклеопротеины	71
Липопротеины	73
Фосфопротеины	74
Гликопротеины	75
Металлопротеины	76
Глава 3. ХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	77
Химический состав нуклеиновых кислот	78
Структура нуклеиновых кислот	81
Первичная структура нуклеиновых кислот	85
Вторичная структура нуклеиновых кислот	87
Третичная структура нуклеиновых кислот	89
Глава 4. ФЕРМЕНТЫ	92
Понятие о ферментах	92
Краткая история развития учения о ферментах	93
Химическая природа ферментов	95
Строение ферментов	97
Активный центр ферментов	99
Изоферменты	102
Мультимолекулярные ферментные системы	104

Механизм действия ферментов	105
Кинетика ферментативных реакций	108
Основные свойства ферментов	112
Факторы, определяющие активность ферментов	115
Влияние концентраций субстрата и фермента на скорость ферментативной реакции	116
Активирование и ингибирование ферментов	116
Регуляция активности ферментов	122
Определение активности ферментов	124
Внутриклеточная локализация ферментов	126
Классификация и номенклатура ферментов	126
Список ферментов	128
Применение ферментов	129
Проблемы медицинской энзимологии	131
Глава 5. ВИТАМИНЫ	133
История развития витаминологии и общие представления о витаминах	133
Методы определения витаминов	136
Классификация витаминов	136
Витамины, растворимые в жирах	138
Витамины группы А	138
Распространение в природе и суточная потребность	140
Витамины группы D	140
Распространение в природе и суточная потребность	142
Витамины группы К	143
Распространение в природе и суточная потребность	145
Витамины группы Е	145
Распространение в природе и суточная потребность	147
Витамины, растворимые в воде	147
Витамин В ₁	147
Распространение в природе и суточная потребность	149
Витамин В ₂	149
Распространение в природе и суточная потребность	150
Витамин РР	151
Распространение в природе и суточная потребность	152
Витамин В ₆	152
Распространение в природе и суточная потребность	153
Биотин (витамин Н)	154
Распространение в природе и суточная потребность	155
Фолиевая кислота	155
Распространение в природе и суточная потребность	157
Витамин В ₁₂	157
Распространение в природе и суточная потребность	160
Пантотеновая кислота (витамин В ₃)	160
Распространение в природе и суточная потребность	161
Витамин С	162
Распространение в природе и суточная потребность	163
Витамин Р	163
Витаминоподобные вещества	164
Парааминобензойная кислота	164
Витамин В ₁₅	165
Инозит	165
Коэнзим Q (убихинон)	166
Витамин U	166
Липоевая кислота	167
Холин	168
Антивитамины	168
Глава 6. ГОРМОНЫ	170
Общее понятие о гормонах	170
Номенклатура и классификация гормонов	173
Пептидные и белковые гормоны	174
Гормоны гипоталамуса	174
Гормоны гипофиза	176
Вазопрессин и окситоцин	177
Меланокортостимулирующие гормоны (МСГ, меланотропины)	178
Адренкортикотропный гормон (АКТГ, кортикотропин)	179

Соматотропный гормон (гормон роста, соматотропин, СТГ)	179
Лактотропный гормон (лактотропин, пролактин)	180
Тиреотропный гормон (ТТГ, тиреотропин)	180
Гонадотропные гормоны (гонадотропины)	181
Липотропные гормоны (ЛТГ, липотропины)	181
Гормоны паращитовидных желез (паратгормон)	182
Гормоны щитовидной железы	183
Гормоны поджелудочной железы	186
Инсулин	186
Глюкагон	188
Гормоны надпочечников	189
Гормоны мозгового вещества надпочечников	189
Стероидные гормоны	191
Гормоны коркового вещества надпочечников	191
Химическое строение, биосинтез и биологическое действие кортикостероидов	191
Половые гормоны	195
Женские половые гормоны	196
Мужские половые гормоны	197
Простагландины	199
Гормоны вилочковой железы (тимуса)	202

Глава 7. ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ 204

О превращении химической энергии в организме	205
Некоторые аспекты биоэнергетики	206
Питание – составная часть обмена веществ	208
Анаболизм и катаболизм – основные процессы обмена веществ	208
Методы изучения обмена веществ	210
Основные положения регуляции обмена веществ	212

Глава 8. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ 213

История развития учения о биологическом окислении	213
Современные представления о биологическом окислении	215
Пиридинзависимые дегидрогеназы	215
Флавиновые ферменты	216
Кофермент Q	218
Цитохромы	219
Митохондрии и окислительное фосфорилирование	221
Механизм окислительного фосфорилирования	223
Микросомальное окисление	224

Глава 9. ХИМИЯ И ОБМЕН УГЛЕВОДОВ 226

Химия углеводов	226
Классификация углеводов	227
Моносахариды	227
Основные реакции моносахаридов, продукты реакций и их свойства	231
Олигосахариды	234
Полисахариды	235
Обмен углеводов	238
Переваривание и всасывание углеводов	238
Синтез гликогена	240
Распад гликогена и освобождение глюкозы (гликогенез)	242
Гликолиз	244
Гликогенолиз	251
Спиртовое брожение	251
Включение других углеводов в процесс гликолиза	252
Глюконеогенез	255
Аэробный метаболизм пирувата	259
Окислительное декарбоксилирование пирувиноградной кислоты	260
Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса)	261
Эффект Пастера	267
Пентозофосфатный путь окисления углеводов	268
Регуляция углеводного обмена	273
Нарушения углеводного обмена	273

Глава 10. ХИМИЯ И ОБМЕН ЛИПИДОВ	276
Классификация, химическое строение и некоторые свойства липидов	276
Жирные кислоты	276
Нейтральные жиры	278
Воска	279
Фосфолипиды	280
Сфинголипиды	282
Стероиды	284
Обмен липидов	286
Роль липидов в питании	286
Переваривание и всасывание липидов	286
Промежуточный обмен липидов	292
Внутриклеточный липолиз	292
Окисление жирных кислот	293
Современные представления об окислении жирных кислот	293
Окисление ненасыщенных жирных кислот	297
Окисление жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов	298
Метаболизм кетоновых тел	298
Биосинтез липидов	300
Синтез высших жирных кислот в организме	301
Образование ненасыщенных жирных кислот	305
Биосинтез триглицеридов	305
Биосинтез фосфолипидов	307
Биосинтез холестерина	309
Регуляция липидного обмена	313
Нарушения липидного обмена	314
Липосомы	316
Глава 11. ОБМЕН ПРОСТЫХ БЕЛКОВ	318
Динамическое состояние белков тела	319
Факторы, определяющие состояние белкового обмена	320
Азотистый баланс	321
Нормы белка в питании	322
Биологическая ценность белков	322
Белковые резервы	325
Парентеральное белковое питание	325
Переваривание белков	326
Эндопептидазы	327
Переваривание белков в желудке	331
Переваривание белков в кишечнике	332
Всасывание продуктов распада белков	332
Превращение аминокислот под действием микрофлоры кишечника	333
Судьба всосавшихся аминокислот	335
Транспорт аминокислот через клеточные мембраны	336
Промежуточный обмен аминокислот в тканях	337
Общие пути обмена аминокислот	337
Дезаминирование аминокислот	337
Трансаминирование аминокислот	340
Декарбоксилирование аминокислот	345
Обезвреживание аммиака в организме	350
Орнитиновый цикл мочевинообразования	351
Специфические пути обмена некоторых аминокислот	354
Обмен глицина и серина	354
Обмен серосодержащих аминокислот	356
Обмен фенилаланина и тирозина	358
Обмен триптофана	360
Обмен дикарбоновых аминокислот	360
Патология азотистого обмена	364
Глава 12. ОБМЕН СЛОЖНЫХ БЕЛКОВ	369
Обмен нуклеиновых кислот	369
Биосинтез пуриновых нуклеотидов	370
Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов	373
Биосинтез нуклеиновых кислот	377
Биосинтез ДНК	377
Биосинтез РНК	383

Биогенез транспортных РНК	386
Биогенез рибосомных РНК	387
Синтез РНК на матрице РНК	387
Распад нуклеиновых кислот	390
Распад пуриновых нуклеозидов	392
Распад пиримидиновых нуклеозидов	393
Обмен хромопротеинов	394
Биосинтез гемоглобина	395
Распад гемоглобина в тканях (образование желчных пигментов)	396
Глава 13. БИОСИНТЕЗ БЕЛКА	399
Трансляция и общие требования к синтезу белка в бесклеточной системе	401
Рибосомы	402
Аминоацил-тРНК-синтетазы	403
Транспортные РНК	403
Матричная РНК	405
Природа генетического кода	406
Этапы синтеза белка	408
Активирование аминокислот	409
Процессы трансляции	409
Транспорт синтезированных белков через мембраны	414
Синтез митохондриальных белков	414
Постсинтетическая модификация белков	415
Регуляция синтеза белка	417
Ингибиторы синтеза белка	420
Глава 14. ВЗАИМОСВЯЗЬ ОБМЕНА БЕЛКОВ, ЖИРОВ И УГЛЕВОДОВ	423
Глава 15. ПЕЧЕНЬ	427
Химический состав печени	427
Роль печени в углеводном обмене	428
Роль печени в липидном обмене	430
Роль печени в белковом обмене	431
Детоксикация различных веществ в печени	432
Роль печени в пигментном обмене	434
Желчь	436
Глава 16. КРОВЬ	438
Химический состав крови	438
Белки плазмы крови	439
Характеристика основных белковых фракций	441
Отдельные наиболее изученные и интересные в клиническом отношении белки плазмы	445
Ферменты плазмы (сыворотки) крови	446
Небелковые азотистые компоненты крови	448
Безазотистые органические компоненты крови	449
Электролитный состав плазмы крови	449
Клетки крови	452
Буферные системы крови и кислотно-основное равновесие	452
Буферные системы крови	453
Нарушения кислотно-основного равновесия	456
Дыхательная функция крови	458
Перенос кислорода кровью	458
Различные формы гипоксии	461
Перенос углекислого газа кровью от тканей к легким	462
Система свертывания крови	464
Современные представления о свертывании крови	465
Факторы плазмы крови	465
Факторы тромбоцитов	467
Противосвертывающая система крови	470
Фибринолиз	470
Глава 17. ПОЧКИ И МОЧА	473
Особенности строения почек	473
Механизм образования мочи	473
Роль почек в поддержании кислотно-основного равновесия	478

Некоторые особенности обмена веществ почечной ткани в норме и при патологии	480
Общие свойства и составные части мочи	481
Общие свойства мочи	481
Химический состав мочи	482
Органические вещества мочи	483
Неорганические (минеральные) компоненты мочи	485
Патологические компоненты мочи	486
Глава 18. НЕРВНАЯ ТКАНЬ	488
Структура нейрона	488
Строение миелина	490
Химический состав мозга	491
Белки	491
Липиды	493
Углеводы	493
Адениновые нуклеотиды и креатинфосфат	494
Минеральные вещества	494
Особенности метаболизма нервной ткани	494
Дыхание	494
Обмен глюкозы и гликогена	495
Обмен лабильных фосфатов (макроэргов)	495
Обмен белков и аминокислот	496
Обмен липидов	497
Химические основы возникновения и проведения нервных импульсов	497
Роль медиаторов в передаче нервных импульсов	498
Механизмы памяти	501
Пептиды и болевые реакции	502
Спинномозговая жидкость	502
Глава 19. МЫШЕЧНАЯ ТКАНЬ	504
Морфологическая организация поперечнополосатой мышцы	504
Химический состав поперечнополосатой мышцы	506
Мышечные белки	507
Небелковые азотистые экстрактивные вещества	509
Безазотистые вещества	510
Некоторые особенности химического состава состава сердечной мышцы и гладкой мускулатуры	510
Изменение химического состава мышечной ткани в онтогенезе	511
Функциональная биохимия мышц	511
Источники энергии мышечной деятельности	511
Механизм мышечного сокращения	513
Биохимические изменения в мышцах при патологии	515
Глава 20. СОЕДИНИТЕЛЬНАЯ ТКАНЬ	518
Межклеточный органический матрикс соединительной ткани	519
Коллаген	519
Эластин	520
Протеогликаны	521
Гликозаминогликаны (мукополисахариды)	521
Образование и катаболизм протеогликанов	525
Биохимические изменения соединительной ткани при старении и некоторых патологических процессах	526
Глава 21. КОСТНАЯ ТКАНЬ	527
Химический состав костной ткани	527
Формирование кости	529
Факторы, оказывающие влияние на метаболизм костной ткани	531
Основные группы заболеваний кости	532
Рекомендуемая литература	534
Предметный указатель	535

ПРЕДИСЛОВИЕ

На протяжении всей истории человечества естествоиспытатели и философы искали пути к открытию и познанию сущности и происхождения жизни. Однако многие вопросы этой вечной проблемы живого до сих пор не решены, несмотря на крупнейшие открытия таких фундаментальных естественных наук, как математика, физика и химия. Неоспоримо положение, что для познания огромного разнообразия форм жизни и ее сущности первостепенное значение имеет определение «химической индивидуальности» живого организма. Биологическая химия достигла огромных успехов в изучении химического состава живых организмов (включая человека) и природы химических процессов, происходящих как в целостном организме, так и в изолированных органах и тканях на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. Последние два — три десятилетия ознаменовались рядом выдающихся открытий в биологической химии и в некоторых ее разделах — энзимологии, биохимической генетике, молекулярной биологии, биоэнергетике и др., выдвинувших ее в разряд фундаментальных научных дисциплин и сделавших мощным орудием решения многих важных проблем биологии и медицины.

Дальнейшее развитие биологии и медицины почти невозможно без применения методологических принципов современной биологической химии. Установление способов хранения и передачи генетической информации и принципов структурной организации белков и нуклеиновых кислот, расшифровка механизмов биосинтеза этих полимерных молекул, а также молекулярных механизмов трансформации энергии в живых системах, установление роли биомембран и субклеточных структур несомненно способствуют более глубокому проникновению в сокровенные тайны жизни и выяснению связи между структурой индивидуальных химических компонентов живой материи и их биологическими функциями. Овладение этими закономерностями и основополагающими принципами биологической химии не только способствует формированию у будущего врача диалектико-материалистического понимания процессов жизни, но и дает ему новые, ранее недоступные возможности активного вмешательства в патологические процессы. Этими обстоятельствами диктуется необходимость изучения биологической химии студентами медицинских институтов.

Главная цель учебника — дать общие представления о фундаментальных достижениях биологической химии в изучении химических основ жизни. Поскольку в формировании физиолого-биохимического мышления будущего врача большую роль играет знание строения (структуры) и роли химических компонентов в осуществлении физиологических функций, первая часть учебника посвящена рассмотрению химического состава живых организмов. В частности, даны современные представления о принципах структурной организации белков, нуклеиновых кислот и ферментов, методах изолирования и очистки белков, определения их первичной структуры и молекулярной массы, а также применении достижений энзимологии в медицине. Значительно большее внимание, помимо строения, уделено биологической роли витаминов, в частности коферментным функциям, а также практическому значению антивитаминов и антиметаболитов. Существенно расширена глава о гормонах; включены новые разделы, касающиеся структуры и функции гормонов гипофиза, рилизинг-факторов и простагландинов.

Учитывая накопленный опыт преподавания биологической химии в I Московском ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени медицинском институте им. И. М. Сеченова, Военно-медицинской ордена Ленина Краснознаменной академии

им. С. М. Кирова и ордена Дружбы Народов Университета дружбы народов им. П. Лумумбы, а также пожелания многих преподавателей, авторы рассматривают структуру и функцию углеводов и липидов совместно с их обменом во второй части учебника — в разделе «Обмен веществ». Такой подход можно считать вполне оправданным еще и потому, что студенты лучше усваивают материал при одновременном изучении химии и обмена углеводов и липидов после изучения биоэнергетических аспектов биологического окисления. Последнему вопросу посвящена отдельная глава.

Исключительная важность раздела «Синтез белка» для понимания и объяснения многих проявлений жизни побудила авторов выделить в самостоятельную главу эту стремительно развивающуюся ветвь биохимии белка. Широко освещена биохимия ряда органов и тканей человека. Вместе с тем не дается отдельно обмен воды и минеральных веществ, поскольку многие вопросы, касающиеся значения воды и роли минеральных веществ в процессе жизнедеятельности, освещены в разделах биохимии почек и мочи, печени, крови.

В связи с возрастающим значением биохимии для практики здравоохранения особое внимание уделено регуляции и патологии обмена углеводов, жиров, белков и аминокислот, включая наследственные дефекты обмена, а также изложению практического использования биохимических тестов для постановки диагноза заболевания, выбора метода лечения и проверки его эффективности.

Учебник иллюстрирован рисунками, схемами и таблицами, частично разработанными авторами и частично заимствованными из других источников, некоторые из которых были переработаны или упрощены.

За просмотр отдельных глав рукописи и ценные замечания авторы считают своим долгом принести благодарность академикам АН СССР С. Е. Северину и А. Е. Браунштейну, академикам АМН СССР В. Н. Ореховичу, А. Н. Климову, Ю. А. Панкову, а также профессорам Ю. Б. Филипповичу, Л. М. Гиномдану и Г. С. Хачатряню.

Авторы будут весьма признательны за критические замечания, полезные советы и пожелания по содержанию данного учебника.

Предисловие ко второму изданию

Во втором издании учебника «Биологическая химия» авторы стремились отразить почти все новейшие достижения этой весьма быстро развивающейся науки после выхода в свет первого издания в 1982 г. Основываясь на многочисленных пожеланиях, предложениях и критических замечаниях советских исследователей, преподавателей, студентов и иностранных коллег, частично опубликованных в журналах «Биохимия», «Украинский биохимический журнал», «Biochemical Education» (1983, 1984 гг.), благодарные авторы, солидарные в одних случаях и не согласные с рядом предложений в других, предлагают на суд научной и педагогической общественности и студентов данное издание.

В учебнике нашли отражение современные представления о структуре и функциях молекул белков, нуклеиновых кислот, углеводов и липидов. Разделы по химии биополимеров, как и ферментов, витаминов и гормонов объединены по просьбе большинства рецензентов в первой части учебника. В главах, посвященных витаминам, гормонам и ферментам, представлены новые сведения о биологической роли и механизме действия этих соединений. Опушены данные о первичной структуре ряда пептидных и белковых гормонов, зато приведены новейшие результаты по биогенезу простагландинов и родственных соединений: простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов. В главе «Ферменты» подробно рассмотрены проблемы медицинской энзимологии, включая некоторые вопросы инженерной энзимологии.

Существенно переработаны в свете новых данных главы, посвященные обмену

веществ. Учитывая все возрастающее значение биохимии для медицины, особое внимание уделено регуляции и патологии обмена углеводов, липидов, белков и аминокислот, включая наследственные нарушения обмена. Обстоятельно изложены многие вопросы, которым не всегда уделялось в курсе биологической химии (особенно в учебниках по биологической химии, переведенных с английского языка) должное внимание. Это касается, в частности, особенностей химического состава и процессов метаболизма в норме и патологии таких специализированных тканей, как кровь, печень, почки, нервная, мышечная и соединительная ткани.

Авторы стремились максимально облегчить восприятие материала, ориентируясь на сжатое, четкое и доступное изложение многочисленных сведений современной биологической химии и перспектив ее дальнейшего развития. Углубленному изучению и усвоению предмета будет, очевидно, способствовать, кроме того, богатый иллюстративный материал в виде сводных таблиц, схем метаболических циклов, графиков и рисунков, большей частью оригинальных, составляющих единое целое с текстом.

Главы 1—6 и 11—14 написаны Т. Т. Березовым, а главы 7—10 и 15—21 — Б. Ф. Коровкиным.

Критические замечания, пожелания и предложения по содержанию второго издания учебника будут встречены авторами с благодарностью.

Т. БЕРЕЗОВ, Б. КОРОВКИН

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ААП — аланинаминопептидаза
АДФ — аденозиндифосфат
АДГ — антидиуретический гормон
АКТГ — адренокортикотропный гормон (кортикотропин)
АлАТ — аланинаминотрансфераза
АМК — аминокислоты, сокращенные названия отдельных АМК см. в табл. 1.3
АМФ — аденозинмонофосфат
цАМФ — циклический аденозин-3',5'-монофосфат
АПБ — ацилпереносающий белок
АсАТ — аспаратаминотрансфераза
АТФ — аденозинтрифосфат
АТФаза — аденозинтрифосфатаза
ВТМ — вирус табачной мозаики
ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
ГАМК — γ -аминомасляная кислота
ГДФ — гуанозиндифосфат
ГМФ — гуанозинмонофосфат
цГМФ — циклический аденозин-3',5'-монофосфат
ГТФ — гуанозинтрифосфат
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза — дезоксирибонуклеаза
ДНП — дезоксирибонуклеопротены
ДОФА — диоксифенилаланин
Дофамин — диоксифенилэтиламин
ДСН — додецилсульфат натрия
ДФФ — диизопропилфторфосфат
ДЭАЭ — диэтиламиноэтил
ИМФ — инозинмонофосфат
КоА — кофермент(коэнзим)А
КоQ — кофермент(коэнзим)Q (убихинон)
ЛДГ — лактатдегидрогеназа
ЛПВП — липопротеины высокой плотности
ЛПНП — липопротеины низкой плотности
ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности
МАО — моноаминоксидаза
НАД(или НАД⁺) — окисленный никотинамидадениндинуклеотид
НАДН₂(или НАДН + Н⁺) — восстановленный никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ(или НАДФ⁺) — окисленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НАДФН₂(или НАДФН + Н⁺) — восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ПВК — пировиноградная кислота
ПФ — пиридоксальфосфат
РДФ — рибонуклеотиддифосфат
РНК — рибонуклеиновая кислота
РНКаза — рибонуклеаза
мРНК — матричная РНК
рРНК — рибосомная РНК
тРНК — транспортная РНК
РНП — рибонуклеопротены
СДГ — сукцинатдегидрогеназа
ТГФК — тетрагидрофолиевая кислота
ТДФ — тимидиндифосфат
ТМФ — тимидинмонофосфат
ТПФ — тиаминпирофосфат
ТТФ — тимидинтрифосфат
УДФ — уридиндифосфат
УДФГ — уридиндифосфатглюкоза
УДФГК — уридиндифосфоглюкуроновая кислота
УМФ — уридинмонофосфат
УТФ — уридинтрифосфат
ФАД — окисленный флавинадениндинуклеотид
ФАДН₂ — восстановленный флавинадениндинуклеотид
ФАФС — 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат
ФДНБ — фтординитробензол
ФМН — окисленный флавиномононуклеотид
ФМНН₂ — восстановленный флавиномононуклеотид
Ф_н — фосфат неорганический, Р — остаток фосфорной кислоты
ФРПФ — 5-фосфорибозил-1-пирофосфат
ФФ_н — пирофосфат неорганический
ЦДФ — цитидиндифосфат
ЦМФ — цитидинмонофосфат
ЦТК — цикл трикарбоновых кислот (Кребса)
ЦТФ — цитидинтрифосфат
ЩУК — щавелевоуксусная кислота (оксалоацетат)
ЭДТА — этилендиаминтетраацетат

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая химия — наука, изучающая химическую природу веществ, входящих в состав живых организмов, их превращения, а также связь этих превращений с деятельностью органов и тканей. Из этого определения вытекает, что биохимия складывается как бы из трех частей: статической биохимии, занимающейся преимущественно анализом химического состава организмов, динамической биохимии, изучающей всю совокупность превращений веществ и энергии в организме, и функциональной биохимии, исследующей химические процессы, лежащие в основе различных проявлений жизнедеятельности. При этом разделы статической, динамической и функциональной биохимии неразрывно связаны между собой и являются частями одной и той же науки — современной биологической химии.

В зависимости от объекта исследования биохимию условно подразделяют на биохимию человека и животных, биохимию растений и биохимию микроорганизмов. Несмотря на биохимическое единство всего живого, в животных и растительных организмах существуют и коренные различия, прежде всего в характере обмена веществ. Обмен веществ, или метаболизм, — совокупность всех химических реакций, протекающих в организме, направленных на сохранение и самовоспроизведение живых систем. Известно, что растения строят сложные вещества своего тела (углеводы, жиры, белки) из таких простых веществ, как вода, углекислый газ и минеральные вещества, причем энергия, необходимая для этой синтетической деятельности, потребляется за счет поглощения солнечных лучей (фотосинтез). Напротив, животные организмы нуждаются в пище, состоящей не только из воды и минеральных компонентов, но и из сложных веществ органической природы — белков, жиров, углеводов. У животных проявления жизнедеятельности и синтез веществ, входящих в состав тела, обеспечиваются за счет химической энергии, освобождающейся при распаде или окислении сложных органических соединений. Растения, не использующие для своей жизнедеятельности вещества органической природы, называются аутоотрофными организмами, животные же являются гетеротрофными организмами. Среди микроорганизмов встречаются как аутоотрофный, так и гетеротрофный типы обмена веществ. Кроме того, микроорганизмы характеризуются наличием химических веществ и реакций, не встречающихся у животных и растений.

Современная биохимия как самостоятельная наука сложилась на рубеже XIX и XX веков. До этого времени вопросы, рассматриваемые ныне биохимией, изучались с разных сторон органической химией и физиологией. Постепенное накопление фактического материала о составе наиболее сложных природных соединений началось с развитием в Европе в средние века алхимии. Однако фактические данные, полученные алхимиками, трудно отделить от совершенно неправильных обобщений и представлений, господствовавших в науке в то время. В XVI—XVII веках воззрения алхимиков получили дальнейшее развитие в трудах ятрохимиков (от греч. *iатros* — врач). Одним из виднейших представителей ятрохимии был немецкий врач и естествоиспытатель Т. Парацельс, который выдвинул весьма прогрессивное положение о тесной связи химии с медициной. Он считал, что в основе жизнедеятельности человека лежат химические процессы и причиной всякого заболевания служит нарушение хода химических процессов в организме, поэтому для лечения болезни следует прибегать к химическим средствам.

Однако в целом познание закономерностей химических и ферментативных процессов, лежащих в основе жизнедеятельности организма, оказалось для ятрохимиков непосильной задачей. Это объясняется прежде всего отсутствием в то время знаний основных законов физики и химии, неразработанностью методов элементарного анализа органических соединений. Кроме того, ятрохимики, так же как и алхимики, по своему мировоззрению были метафизиками и придерживались виталистических взглядов.

В XVII—XVIII веках широкое признание среди ученых получила теория горючего начала — флогистона, сформулированная немецким химиком и врачом Г. Шталем. Несмотря на ошибочность основных положений, теория флогистона (объяснявшая процессы горения выделением из горючего тела особого невесомого вещества) сыграла в истории науки положительную роль, так как способствовала развитию экспериментального направления в химии. Опровержение этой теории связано с работами М. В. Ломоносова и А. Лавуазье, открывших и утвердивших в науке закон сохранения материи (массы). Кроме того, А. Лавуазье показал, что при дыхании, как и при горении органических веществ, поглощается кислород и выделяется углекислый газ.

С середины XVIII века начинается период открытия и выделения большого числа новых органических веществ растительного и животного происхождения. Крупным событием второй половины XVIII века стали исследования Л. Спалланцини по физиологии пищеварения, которые положили начало изучению ферментов пищеварительных соков. Русский химик К. С. Кирхгоф описал в 1814 г. ферментативный процесс осахаривания крахмала под влиянием вытяжки из проросших семян ячменя. К середине XIX века были найдены и другие ферменты: амилаза слюны, пепсин желудочного сока, трипсин сока поджелудочной железы. Й. Берцелиус ввел в химию понятие о катализе и катализаторах, к числу последних были отнесены все известные в то время ферменты. В 1839 г. Ю. Либих выяснил, что в состав пищи входят белки, жиры и углеводы, являющиеся главными составными частями животных и растительных организмов.

Сокрушительный удар по витализму был впервые нанесен работами Ф. Вёлера, которому удалось в 1828 г. получить химическим путем мочевины — один из конечных продуктов азотистого обмена у человека и животных. В письме к своему учителю Й. Берцелиусу Ф. Вёлер писал: «Я должен вам заявить, что могу делать мочевины, не нуждаясь при этом в почках и вообще в животных, будь это человек или собака». Вскоре последовал и ряд других блестящих работ — синтез уксусной кислоты, осуществленный А. Кольбе (1845), жиров — М. Бертло (1854), углеводов — А. М. Бутлеровым (1861). Эти работы неопровержимо продемонстрировали ошибочность и необоснованность виталистических представлений.

В борьбе с витализмом очень важную роль сыграли исследования о природе брожения. Изучая брожение, Л. Пастер пришел к ошибочному выводу, что брожение — биологический процесс, в котором обязательно участвуют живые дрожжевые клетки. Автором чисто химической теории брожения был Ю. Либих, однако его теория была недостаточно разработана, имела умозрительный характер и не полностью объясняла ряд экспериментально установленных фактов. Вот почему столь важное значение имело получение строгих доказательств возможности брожения, не связанного с жизнедеятельностью клеток. Ясность была внесена, когда русский врач М. М. Манассеина (1871) и особенно четко немецкий ученый Э. Бухнер (1897) доказали способность бесклеточного дрожжевого сока вызывать алкогольное брожение. Накопление большого количества сведений относительно химического состава растительных и животных организмов и химических процессов, протекающих в них, привело к попыткам систематизации этих знаний в учебных руководствах: учебниках И. Зимона (1842) и Ю. Либиха (1847). В России первый учебник физиологической химии был издан А. И. Ходневым (1847).

Во второй половине XIX века на медицинских факультетах многих русских и зарубежных университетов были учреждены специальные кафедры медицинской, или физиологической, химии. В России первые кафедры медицинской химии были организованы в 1863 г. в Казанском университете А. Я. Данилевским и в Московском университете А. Д. Булыгинским. В 1892 г. начала функционировать кафедра физиологической химии в Военно-медицинской (Медико-хирургической) академии в Петербурге. Эту кафедру возглавлял А. Я. Данилевский. Создание кафедр физиологической химии в высших учебных заведениях было обусловлено тем, что во второй половине

XIX века биологическая химия стала выделяться в самостоятельную науку, имеющую свой предмет и методы исследования.

Подлинный расцвет биологической химии наступил в XX веке, когда важные открытия во многих ее областях следовали одно за другим.

Последние годы характеризуются развитием методологических принципов и методических приемов исследования живой природы и накоплением фактических данных, позволивших начать изучение и объяснение метаболических процессов в биологии на молекулярном уровне.

Одним из пяти приоритетных фундаментальных направлений научных исследований, сформулированных и изложенных в совместной комплексной научно-технической программе ряда восточноевропейских стран на период до 2000 года является биотехнология, которой придается исключительное значение. Усилия ученых будут сосредоточены на создании и производстве препаратов для медицины (гормонов, ферментов, моноклональных антител, биоактивных пептидов, вакцин, интерферона, простагландинов и др.), сельского хозяйства (регуляторов роста растений, феромонов для борьбы с вредителями сельскохозяйственных растений), промышленности (пищевые и вкусовые добавки) и т. д.

В соответствии с планами АН СССР и АМН СССР перед биологической наукой на период до 2000 года поставлена задача обеспечения преимущественного развития исследований по следующим основным направлениям: разработка методов генетической и клеточной инженерии, создание на их основе новых процессов для биотехнологических производств с целью получения принципиально новых пород животных, форм растений с ценными признаками; разработка новых методов и средств диагностики, лечения и профилактики наследственных заболеваний; разработка научных основ инженерной энзимологии; разработка и внедрение новых биокатализаторов (в том числе иммобилизованных) и оптимизация с их помощью биотехнологических процессов получения химических и пищевых продуктов; исследования структуры и функции биомолекул клетки; изучение молекулярных и клеточных основ иммунологии, а также генетики микроорганизмов и вирусов, вызывающих заболевания человека и животных, создание методов и средств диагностики, лечения и профилактики этих заболеваний; исследования молекулярно-биологических механизмов канцерогенеза, природы онкогенов и онкобелков, их роли в малигнизации клеток; создание на этой основе методов диагностики и лечения опухолевых заболеваний человека; исследования проблем биоэнергетики, питания, психики, а также молекулярных основ памяти и деятельности мозга.

Таким образом, можно наметить следующие главные направления развития исследований в области биологической химии на ближайшую и отдаленную перспективу, так называемые горизонты биохимии. К их числу относятся следующие проблемы, которые ждут своего решения.

1. Дифференцировка клеток высших организмов (эукариот).
2. Организация и механизм функционирования генома.
3. Регуляция действия ферментов и теория энзиматического катализа.
4. Процессы узнавания на молекулярном уровне.
5. Молекулярные основы соматических и наследственных заболеваний человека.
6. Молекулярные основы злокачественного роста.
7. Молекулярные основы иммунитета.
8. Рациональное питание.
9. Молекулярные механизмы памяти.
10. Биосинтез белка.
11. Биологические мембраны и биоэнергетика.

Основное назначение биологической химии сводится к тому, чтобы решать на молекулярном уровне задачи фундаментальные, общebiологические, включая проблему зависимости человека от экосистемы, которую необходимо не только понять, но и защищать и научиться разумно ею пользоваться.

Мир самого сложного — жизнь.

Н. Н. СЕМЕНОВ

Живой организм характеризуется высшей степенью упорядоченности составляющих его ингредиентов и уникальной структурной организацией, обеспечивающей как его фенотипические признаки, так и многообразие биологических функций. В этом структурно-функциональном единстве организмов, составляющем сущность жизни, белки (белковые тела) играют важнейшую роль, не заменяемую другими органическими соединениями.

Белки — высокомолекулярные азотсодержащие органические вещества, молекулы которых построены из остатков аминокислот. Название протеины (от греч. *protos* — первый, важнейший), по-видимому, более точно отражает первостепенное биологическое значение этого класса веществ. Принятые в отечественной литературе названия белки и белковые вещества связаны с обнаружением в тканях животных и растений веществ, имеющих сходство с белком куриного яйца.

С развитием биохимии полное экспериментальное подтверждение получило основополагающее философско-теоретическое представление Ф. Энгельса о сущности жизни: «Повсюду, где мы встречаем жизнь, мы находим, что она связана с каким-либо белковым телом, и повсюду, где мы встречаем какое-либо белковое тело, не находящееся в процессе разложения, мы без исключения встречаем и явления жизни»¹.

С гениальным предвидением Ф. Энгельс, опираясь на сравнительно небольшие достижения современного ему естествознания, сформулировал широко известное положение о природе жизни: «Жизнь есть способ существования белковых тел»²...

Действительно, и в наше время, когда абсолютно достоверно установлено, что наследственная информация сосредоточена в молекуле ДНК клеток любых живых организмов, не вызывает сомнения, что только белки являются теми молекулярными инструментами, при помощи которых генетическая информация реализуется. Без белков, в частности ферментов, ДНК не может реплицироваться, не может самовоспроизводить себя, т. е. лишена способности передавать генетическую информацию.

Живая природа характеризуется рядом свойств, отличающих ее от неживой природы, и почти все эти свойства связаны с белками. Прежде всего для живых организмов характерны широкое разнообразие белковых структур и их высокая упорядоченность; последняя существует во времени и в пространстве. Удивительная способность живых организмов к воспроизведению себе подобных также связана с белками. Сократимость, движение — непрменные атрибуты живых систем — имеют прямое отношение к белковым структурам мышечного аппарата. Наконец, жизнь немыслима без обмена веществ, постоянного обновления составных частей живого организма, т. е. без процессов анаболизма и катаболизма (этого удивительного единства противоположностей живого), в основе которых лежит деятельность каталитически активных белков — ферментов.

Таким образом, белки (белковые вещества) составляют основу и структуры и функции живых организмов. По образному выражению одного из основоположников

¹ Маркс К., Энгельс Ф. Соч. 2-е изд., т. 20, с. 83.

² Маркс К., Энгельс Ф. Соч. 2-е изд., т. 20, с. 82.

молекулярной биологии Ф. Крика, белки важны прежде всего потому, что они могут выполнять самые разнообразные функции, причем с необыкновенной легкостью и изяществом. Подсчитано, что в природе встречается примерно $10^{10} - 10^{12}$ различных белков, обеспечивающих существование около 10^6 видов живых организмов различной сложности организации, начиная от вирусов и кончая человеком. Из этого огромного количества природных белков известны точное строение и структура ничтожно малой части — не более 2500. Каждый организм характеризуется уникальным набором белков. Фенотипические признаки и многообразие функций обусловлены специфичностью объединения этих белков, во многих случаях в виде надмолекулярных и мультимолекулярных структур, в свою очередь определяющих ультраструктуру клеток и их органелл.

В клетке *E. coli* содержится около 3000 различных белков, а в организме человека насчитывается свыше 50 000 разнообразных белков. Самое удивительное, что все природные белки состоят из большого числа сравнительно простых структурных блоков, представленных мономерными молекулами — аминокислотами, связанными друг с другом в полипептидные цепи. Природные белки построены из 20 различных аминокислот. Поскольку эти аминокислоты могут объединяться в самой разной последовательности, то они могут образовать громадное количество разнообразных белков. Число изомеров, которое можно получить при всевозможных перестановках указанного числа аминокислот в полипептиде исчисляется огромными величинами. Так, если из двух аминокислот возможно образование только двух изомеров, то уже из четырех аминокислот теоретически возможно образование 24 изомеров, а из 20 аминокислот — $2,4 \cdot 10^{18}$ разнообразных белков.

Нетрудно предвидеть, что при увеличении числа повторяющихся аминокислотных остатков в белковой молекуле число возможных изомеров возрастает до астрономических величин. Ясно, что природа не может позволить случайных сочетаний аминокислотных последовательностей, и для каждого вида характерен свой специфический набор белков, определяемый, как теперь известно, наследственной информацией, закодированной в молекуле ДНК живых организмов. Именно информация, содержащаяся в линейной последовательности нуклеотидов ДНК, определяет линейную последовательность аминокислот в полипептидной цепи синтезируемого белка. Образовавшаяся линейная полипептидная цепь сама теперь оказывается наделенной функциональной информацией, в соответствии с которой она самопроизвольно преобразуется в определенную стабильную трехмерную структуру. Таким образом, лабильная полипептидная цепь складывается, скручивается в пространственную структуру белковой молекулы, причем не хаотично, а в строгом соответствии с информацией, содержащейся в аминокислотной последовательности.

Учитывая важнейшую роль белков в живой природе, а также то, что белки составляют почти половину сухой массы живого организма и наделены рядом уникальных функций, а в познании структуры и функций белков лежит решение многих важных проблем биологии и медицины, изучение курса биохимии в медицинских вузах обычно начинают с этого класса органических веществ.

ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

Белки выполняют множество самых разнообразных функций, характерных для живых организмов, с рядом из которых мы познакомимся при дальнейшем изучении курса. Здесь же будут перечислены главные и в некотором смысле уникальные биологические функции белков, не свойственные или лишь частично присущие другим классам биополимеров.

Каталитическая функция. Все известные в настоящее время биологические катализаторы — ферменты — являются белками. К 1988 г. было идентифицировано более 2100 ферментов. Эта функция белков является уникальной, определяющей скорость химических реакций в биологических системах.

Питательная (резервная) функция. Эту функцию осуществляют так называемые резервные белки, являющиеся источниками питания для развития плода, например белки яйца (овальбумины). Основным белком молока (казеин) также выполняет главным образом питательную функцию. Ряд других белков несомненно используется в организме в качестве источника аминокислот, которые в свою очередь являются предшественниками биологически активных веществ, регулирующих процессы обмена веществ.

Транспортная функция. Дыхательная функция крови, в частности перенос кислорода, осуществляется молекулами гемоглобина — белка эритроцитов. В транспорте липидов принимают участие альбумины сыворотки крови. Ряд других сывороточных белков образует комплексы с жирами, медью, железом, тироксином, витамином А и другими соединениями, обеспечивая их доставку в соответствующие органы-мишени.

Защитная функция. Основную функцию защиты в организме выполняет иммунная система, которая обеспечивает синтез специфических защитных белков-антител в ответ на поступление в организм бактерий, токсинов или вирусов. Высокая специфичность взаимодействия антител с антигенами (чужеродными веществами) по типу белок-белок способствует узнаванию и нейтрализации биологического действия антигенов. Защитная функция белков проявляется и в способности ряда белков крови к свертыванию. Свертывание белка плазмы крови фибриногена приводит к образованию сгустка крови, что предохраняет от потери крови при ранениях.

Сократительная функция. В акте мышечного сокращения и расслабления участвует множество белковых веществ. Однако главную роль в этих жизненно важных процессах играют актин и миозин — специфические белки мышечной ткани. Сократительная функция присуща не только мышечным белкам, но и белкам цитоскелета, что обеспечивает тончайшие процессы жизнедеятельности клеток (расхождение хромосом в процессе митоза).

Структурная функция. Белки, выполняющие структурные функции, занимают по количеству первое место среди других белков тела человека. Среди них важнейшую роль играет коллаген в соединительной ткани, кератин в волосах, ногтях, коже, эластин в сосудистой стенке и др. Большое значение имеют комплексы белков с углеводами в формировании ряда секретов — мукоидов, муцина и т. д. В комплексе с липидами (в частности, фосфолипидами) белки участвуют в образовании биомембран клеток.

Гормональная функция. Обмен веществ в организме регулируется разнообразными механизмами. В этой регуляции важное место занимают гормоны, вырабатываемые в железах внутренней секреции. Ряд гормонов представлен белками или полипептидами, например гормоны гипофиза, поджелудочной железы и др.

Можно назвать еще некоторые жизненно важные функции белков, в частности способность сохранять онкотическое давление в клетках и крови, буферные свойства, поддерживающие физиологическое значение рН внутренней среды, и др.

Таким образом, из этого далеко не полного перечня основных функций белков видно, что указанным биополимерам принадлежит исключительная и разносторонняя роль в живом организме. Если попытаться вычленить главное, решающее свойство, которое обеспечивает многогранность биологических функций белков, то следовало бы назвать способность белков строго избирательно, специфически соединяться с широким кругом разнообразных веществ. В частности, эта высокая специфичность белков обеспечивает взаимодействие ферментов с субстратами, антител с антигенами, транспортных белков крови с переносимыми молекулами других веществ и т. д. В случае ферментов это взаимодействие основано на принципе биоспецифического узнавания, завершающегося связыванием фермента с соответствующей молекулой, что содействует протеканию химической реакции. Высокой специфичностью действия наделены также белки, которые составляют молекулярную основу таких процессов, как дифференцировка и деление клеток, развитие живых организмов, обеспечивающее их биологическую индивидуальность.

СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ

Наиболее богаты белковыми веществами ткани и органы животных. Источником белка являются также микроорганизмы и растения. Большинство этих белков хорошо растворимы в воде. Однако некоторые органические вещества, выделенные из хряща, волос, ногтей, рогов, костной ткани — нерастворимые в воде — также были отнесены к белкам, поскольку по своему химическому составу оказались близки к белкам мышечной ткани, сыворотки крови, яйца. Количественное содержание белков в различных тканях и органах человека приведено в табл. 1.1¹.

Таблица 1.1. Содержание белков в органах и тканях человека

Органы и ткани	Содержание белков, %		Органы и ткани	Содержание белков, %	
	от массы сухой ткани	от общего белка тела		от массы сухой ткани	от общего белка тела
Кожа	63	11,5	Селезенка	84	0,2
Кости (твердые ткани)	20	18,7	Почки	72	0,5
Зубы (твердые ткани)	18	0,1	Поджелудочная железа	47	0,1
Поперечнополосатые мышцы	80	34,7	Пищеварительный тракт	63	1,8
Мозг и нервная ткань	45	2,0	Жировая ткань	14	6,4
Печень	57	3,6	Остальные ткани:		
			жидкие	85	1,4
Сердце	60	0,7	плотные	54	14,6
Легкие	82	3,7	Все тело	45	100

В мышцах, легких, селезенке, почках на долю белков приходится более 70—80% сухой массы, а во всем теле человека — 45% сухой массы. В отличие от животных тканей в растениях содержится значительно меньше белков (табл. 1.2).

Таблица 1.2. Содержание белков в органах животных и в растениях

Органы и ткани животных	Содержание белков, % (от массы свежей ткани)	Органы и ткани растений	Содержание белков, % (от массы свежей ткани)
Мышцы	18—23	Семена	10—13
Печень	18—19	Стебли	1,5—3
Селезенка	17—18	Листья	1,2—3
Почки	16—18	Корни	0,5—3
Легкие	14—15	Фрукты	0,3—1
Мозг	7—9		

Для изучения химического состава, строения и свойств белков их обычно выделяют или из жидких тканей, или из богатых белками органов животных, например сыворотки крови, молока, мышц, печени, кожи, волос, шерсти. Элементный состав белков в пересчете на сухое вещество представлен 50—54% углерода, 21—23% кислорода, 6,5—7,3% водорода, 15—17% азота и до 0,5% серы. В составе некоторых белков открываются также в небольших количествах фосфор, железо, марганец, магний, йод и др.

Таким образом, помимо углерода, кислорода и водорода, входящих в состав почти

¹ Ряд таблиц и рисунков учебника заимствован из руководства «Биологическая химия» под ред. Б. И. Збарского, И. И. Иванова, С. Р. Мардашева (М., 1972) и учебника Ю. Б. Филипповича «Основы биохимии» (М., 1985).

всех органических полимерных молекул, обязательным компонентом белков является азот, в связи с чем белки принято обозначать как азотсодержащие органические вещества. Содержание азота более или менее постоянно во всех белках (в среднем 16%), поэтому иногда определяют количество белка в биологических объектах по количеству белкового азота.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ

Для подробного исследования физико-химических и биологических свойств белков, а также для изучения их химического состава и строения непременным условием является получение белков из природных источников в химически индивидуальном гомогенном состоянии. Последовательность операций по выделению белков обычно сводится к измельчению биологического материала (гомогенизация), извлечению белков, точнее переводу белков в растворенное состояние (экстракция), и особенно выделению исследуемого белка из смеси других белков, т. е. очистке и получению индивидуального белка.

Белковые вещества весьма чувствительны к повышению температуры и действию многих химических реагентов (органических растворителей, кислот, щелочей), поэтому обычные методы органической химии, применяемые для изолирования того или иного вещества из смеси (нагревание, перегонка, возгонка, кристаллизация и др.), в данном случае неприемлемы. Белки в этих условиях теряют некоторые весьма существенные природные (нативные) свойства, в частности растворимость, биологическую активность, подвергаясь денатурации. Были разработаны эффективные методы выделения белков в мягких условиях, при низкой температуре (не более 4 °С), с применением щадящих нативную структуру химических реагентов.

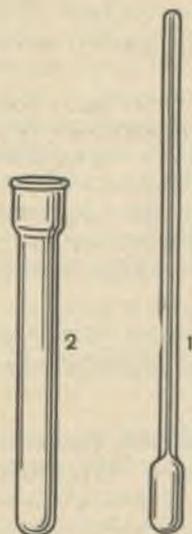
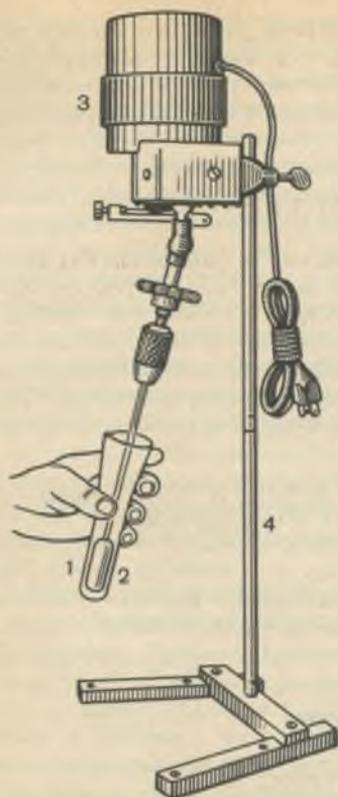
Гомогенизация биологического материала

Перед выделением белков из биологических объектов (органы и ткани животных, микроорганизмы, растения) исследуемый материал тщательно измельчают до однородного гомогенного состояния, т. е. подвергают дезинтеграции вплоть до разрушения клеточной структуры. Эту процедуру, называемую гомогенизацией, проводят при помощи ножевых гомогенизаторов типа Уорринга или пестикового гомогенизатора Поттера – Эльвегейма. Для выделения ряда белков из плотных животных и растительных объектов часто используют валковые или шаровые мельницы (рис. 1.1). Успешно применяется также метод попеременного замораживания и оттаивания ткани, в основе «разрушающего» действия которого лежит разрывание клеточной оболочки, вызванное кристаллами льда. Для дезинтеграции тканей используют ультразвук, прессы (пропускание замороженного биоматериала через мельчайшие отверстия стального пресса под высоким давлением) и метод «азотной бомбы», при котором клетки (в частности, микробные) сначала насыщают азотом под высоким давлением, затем резко сбрасывают давление, и выделяющийся газообразный азот как бы «взрывает» клетки.

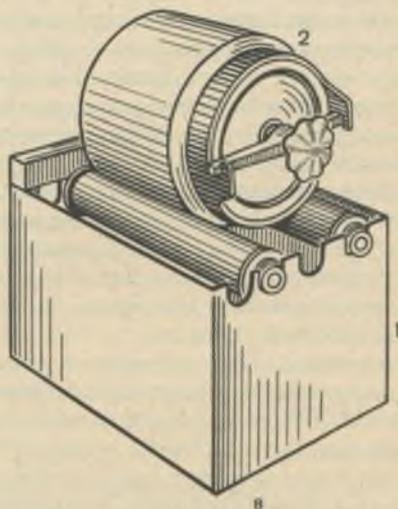
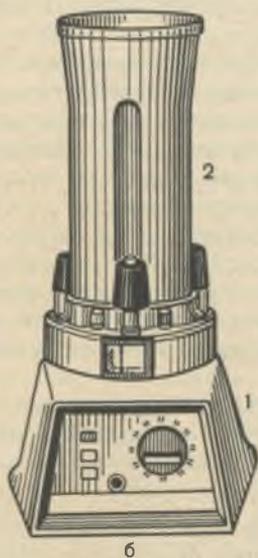
Экстракция белков

Современные методы измельчения тканей обычно сочетаются с одновременной экстракцией белков из гомогенатов тканей. Большинство белков тканей хорошо растворимы в 8–10% растворах солей. При экстракции белков широко применяются различные буферные смеси с определенными значениями рН среды, органические растворители, а также неионные детергенты – вещества, разрушающие гидрофобные взаимодействия между белками и липидами и между белковыми молекулами.

Из органических соединений, помимо давно применяемых водных растворов глицерина, широко используются (особенно для целей солиubilизации) слабые растворы



а



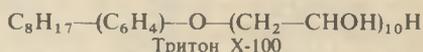
в

Рис. 1.1. Лабораторное оборудование.

а — пестиковый ручной гомогенизатор: 1 — пестик; 2 — корпус; 3 — мотор; 4 — штатив;
 б — механический гомогенизатор; в — шаровая мельница: 1 — корпус с электродвигателем
 и пусковым устройством; 2 — камера для измельчения материала.

сахарозы. На растворимость белков при экстракции большое влияние оказывает рН среды, поэтому в белковой химии применяются фосфатные, цитратные, боратные буферные смеси, со значениями рН от кислых до слабощелочных, которые способствуют как растворению, так и стабилизации белков. Особенно широкое распространение получили трис-буферные системы, представляющие собой смеси 0,2 М раствора трис-(оксиметил)-аминометана ($\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ (сокращенно обозначаемого «трис») с 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты в разных соотношениях. Для выделения белков сыворотки крови используются способы их осаждения этанолом (метод Кона), ацетоном, бутанолом и их комбинации. Почти все органические растворители разрывают белково-липидные связи, способствуя лучшей экстракции белков.

С целью получения белков в чистом, гомогенном состоянии из биологического материала применяют различные детергенты, способствующие расщеплению белково-липидных комплексов и разрыву белково-белковых связей. В частности, для освобождения белков (ферментов), прочно связанных с биомембранами митохондрий или других субклеточных структур, применяются тритон X-100, додецилсульфат натрия и дезоксихолат натрия.



Следует, однако, иметь в виду, что детергенты, вызывая разрыв белково-белковых связей, разрушают олигомерную (четвертичную) структуру белков.

Фракционирование и очистка белков

После достижения полной экстракции белков, т. е. перевода белков в растворенное состояние, приступают к разделению, фракционированию смеси белков на индивидуальные белки. Для этого применяют разнообразные методы: высаливание, тепловую денатурацию, осаждение органическими растворителями, хроматографию, электрофорез, распределение в двухфазных системах, кристаллизацию и др.

Растворение белков в воде связано с гидратацией каждой молекулы, что приводит к образованию вокруг белковой глобулы водных (гидратных) оболочек, состоящих из ориентированных в определенной форме в пространстве молекул воды. По химическим и физическим свойствам вода, входящая в состав гидратной оболочки, отличается от чистого растворителя. В частности, температура замерзания ее составляет -40°C . В этой воде хуже растворяются сахара, соли и другие вещества. Растворы белков отличаются крайней неустойчивостью, и под действием разнообразных факторов, нарушающих гидратацию, белки легко выпадают в осадок. Поэтому при добавлении к раствору белка любых водоотнимающих средств (спирт, ацетон, концентрированные растворы нейтральных солей щелочных металлов), а также под влиянием физических факторов (нагревание, облучение и др.) наблюдается дегидратация молекул белка и их выпадение в осадок.

Высаливание. При добавлении солей щелочных и щелочноземельных металлов происходит осаждение белков из раствора. Обычно белок не теряет способности растворяться вновь в воде после удаления солей методами диализа или гель-хроматографии. Высаливанием белков обычно пользуются в клинической практике при анализе белков сыворотки крови и других биологических жидкостей, а также в препаративной энзимологии для предварительного осаждения балластных белков или выделения исследуемого фермента. Поскольку различные белки высаливаются из растворов при разных концентрациях нейтральных растворов сульфата аммония, этот метод нашел широкое применение в клинике для разделения глобулинов (выпадают в осадок при 50% насыщении) и альбуминов (выпадают при 100% насыщении).

На величину высаливания белков оказывает влияние не только природа и кон-

центрация соли, но и рН среды и температура. Считается, что главную роль при этом играет валентность ионов. Действие разных ионов принято сравнивать не по молярной концентрации соли, а по так называемой ионной силе (μ), которая равна половине суммы произведений концентрации каждого иона (c) на квадрат его валентности (V):

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c \cdot V^2.$$

Более тонкое разделение белков плазмы крови человека на фракции достигается при применении различных концентраций этанола при низкой (от -3 до -5°C) температуре по методу Кона. В этих условиях белки сохраняют свои нативные свойства. Указанным методом часто пользуются для получения отдельных фракций крови, используемых в качестве кровезаменителей. На рис. 1.2 представлена диаграмма фракционирования белков плазмы крови человека.

В последнее время наибольшее распространение получили хроматографические и электрофоретические методы разделения белков.

Хроматография. Принцип метода хроматографии, разработанный в 1903 г. русским ученым М. С. Цветом, основан на способности пигментов (или любых других окрашенных и неокрашенных веществ) специфически адсорбироваться на адсорбенте, заключенном в колонку¹. Вследствие этого происходит разделение анализируемых веществ и их концентрирование в строго определенном слое адсорбента. Дальнейшая работа заключается в применении подходящих элюентов, которые при пропускании через колонку, ослабляют силы адсорбции и выносят с током раствора индивидуальные вещества, последовательно собираемые в коллекторе фракций (принцип сорбции — десорбции).

Чрезвычайно эффективным средством фракционирования белков из смеси оказался метод колоночной хроматографии с гидроксипатитом, различными ионообменными смолами и производными целлюлозы в качестве носителей.

При выделении и очистке белков используют четыре основных типа хроматографии: адсорбционную, распределительную, ионообменную и аффинную (хроматографию по средству) — в соответствии с разными физическими и химическими механизмами, лежащими в основе каждого из них. Хроматография широко применяется не только для выделения белков, но и для разделения множества других органических и неорганических веществ, входящих в состав живых организмов.

Адсорбционная хроматография. Разделение компонентов смеси (образца) основано на их различной сорбируемости на твердом адсорбенте. В качестве адсорбентов используют активированный древесный уголь, гель фосфата кальция, оксиды алюминия или кремния. Адсорбент в виде суспензии с растворителем (чаще всего буферным раствором) вносят в стеклянную вертикальную трубку (колонку) и равномерно в ней упаковывают. Образец в небольшом объеме растворителя наносят



Рис. 1.2. Диаграмма фракционирования белков плазмы крови человека этанолом (по Кону).

¹ Это выдающееся открытие русского ученого достойно оценено мировой научной общественностью. Вот, например, что писал в 1948 г. швейцарский ученый П. Каррер: «Никакое другое открытие не оказало такого огромного влияния и так не расширило возможности исследования химика-органика, как хроматографический анализ Цвета. Исследования в области витаминов и гормонов, каротиноидов и многочисленных других природных соединений никогда не могли бы развиваться так быстро и дать такие большие результаты, если бы они не были основаны на новом методе, который, вместе с тем, позволил установить факт наличия в природе разнообразия родственных соединений».

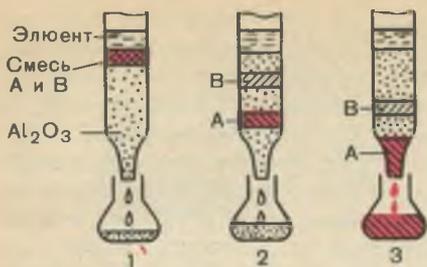


Рис. 1.3. Адсорбционная хроматография (схема).

1 — нанесение на колонку перед началом опыта; 2 — середина опыта; 3 — окончание опыта.

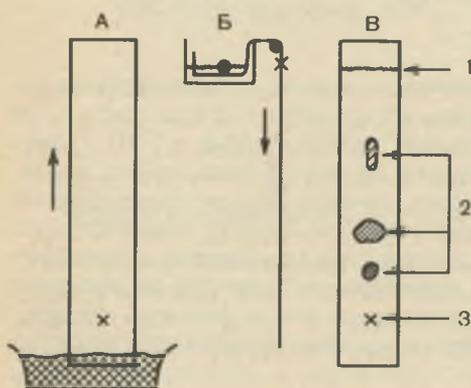


Рис. 1.4. Хроматография на бумаге (схема).

А — восходящая хроматография; Б — нисходящая хроматография (вид сбоку); В — хроматограмма с разделенными и окрашенными веществами: 1 — фронт растворителя; 2 — разделенные вещества; 3 — место нанесения образца.

кислота — вода в определенных соотношениях). При движении растворителя в силу капиллярности по бумаге происходит разделение компонентов смеси. Проявленную хроматограмму высушивают и местоположение каждого из разделяемых веществ определяют химическими или физико-химическими методами.

Ионообменная хроматография. Ионообменные смолы являются полимерными органическими соединениями, содержащими функциональные группы, способные вовлекаться в ионный обмен. Различают положительно заряженные анионообменники, представленные органическими основаниями и аминами, и отрицательно заряженные катионообменники, содержащие фенольные, сульфо- или карбоксильные группы.

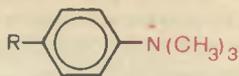
Из сильно- и слабоосновных анионообменников чаще используют производные полистирола и целлюлозы, несущие следующие функциональные группы:

на колонку, и компоненты разделяемой смеси адсорбируются на адсорбенте. Затем приступают к стадии освобождения (десорбции) компонентов из колонки, применяя подходящие элюенты. На рис. 1.3 показано разделение двух разных веществ (А и В), перемещающихся по колонке с разной скоростью. Сбор фракций осуществляют при помощи автоматического коллектора фракций.

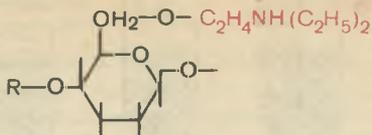
Распределительная хроматография. В отличие от адсорбционной твердая фаза служит только опорой (основой) для стационарной жидкой фазы. Распределительная хроматография, как и адсорбционная, может осуществляться на колонках, в которых в качестве стационарной фазы применяют влажный крахмал или силикагель. Образец растворяют в подходящем растворителе, затем наносят на колонку; разделяемые вещества, подвергающиеся многократному распределению между неподвижной стационарной фазой (водный слой) и движущейся фазой органического растворителя, с разной скоростью перемещаются ко дну колонки. Собранные при помощи коллектора фракции пробы, содержащие одно вещество, объединяют вместе для выделения этого вещества в чистом виде.

Разновидностью распределительной хроматографии является хроматография на бумаге, широко используемая в биохимических лабораториях, в том числе клинических, для разделения пептидов, аминокислот и других веществ. В качестве стационарной фазы при этом служит вода, адсорбированная целлюлозными цепями фильтровальной бумаги.

На рис. 1.4 представлена схема, иллюстрирующая восходящую и нисходящую распределительную хроматографию на бумаге. Образец помещается на одном конце бумажной полосы, и этим же концом бумагу погружают в подходящую смесь органических растворителей (например, бутанол — уксусная



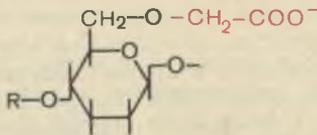
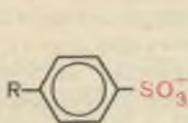
Триметиламинополистирол



Диэтиламиноэтилцеллюлоза
(ДЭАЭ-целлюлоза)

Аналогичные функциональные группы содержат триэтиламиноэтил (ТЭАЭ)- и аминоэтил (АЭ)-целлюлозы.

Катионообменники представлены сульфированными полистиролами и карбоксиметилцеллюлозой, имеющими следующие функциональные группы:



В зависимости от заряда разделяемых белков используют подходящую ионообменную смолу, с функциональными группами которой обменивается часть белков и задерживается на колонке, в то время как другие беспрепятственно выходят с колонки. «Осажденные» на колонке белки снимают с колонки, применяя более концентрированные солевые растворы или изменяя рН элюента.

Новейшие методы ионообменной хроматографии, в частности высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), широко используются в фармакологии (при создании и определении лекарственных веществ), в клинической биохимии (при определении биологически активных веществ в физиологических жидкостях), в биотехнологических процессах и производствах и других областях; они позволяют определять вещества в нано-, пико- и фемтограммных количествах.

Аффинная хроматография (или хроматография по сродству). Основана на принципе избирательного взаимодействия белков (или других макромолекул) с закрепленными (иммобилизованными) на носителе специфическими веществами — лигандами, которыми могут быть субстраты или коферменты (когда выделяют какой-либо фермент), антигены (или антитела), гормоны или рецепторы и т. д. При этом благодаря высокой специфичности белков к иммобилизованному лиганду, связанному с носителем (которым заполняют хроматографическую колонку), присоединяется только один какой-либо белок из смеси. Снятие с колонки этого белка осуществляют элюированием буферными смесями с измененным рН или измененной ионной силой, а также введением в состав элюента детергентов, ослабляющих связи между белками и лигандами. Несомненным достоинством этого метода является возможность одноэтапно выделить заданный белок или другой биополимер высокой степени чистоты. При помощи аффинной хроматографии, например, удалось сравнительно легко выделить очищенные препараты аминоксил-тРНК-синтетаза на полиакрилгидридагаровом геле, к которому в качестве лигандов были присоединены определенные тРНК (транспортные РНК).

Гель-хроматография и я. В препаративных целях, особенно при очистке белков от примесей, широко используют метод молекулярных сит, или гель-хроматографию. При обработке эпихлоргидрином полисахарида декстрана¹ образуются различной

¹ Декстран является полисахаридом, синтезируемым микроорганизмами. Сефадекс — коммерческий препарат, свое название получил от начальных слогов трех слов: separation (разделение), Pharmacia (наименование фармацевтической фирмы в Швеции), dextran (декстран). Наряду с сефадексом используют для целей разделения белков и других биомолекул также сефарозу, сефакрил, биогели, молселект, акрилекс и др.

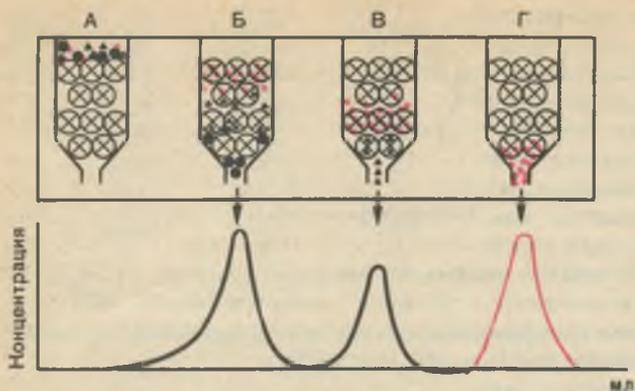


Рис. 1.5. Гель-хроматография на колонке с сефадексом (схема). Большие светлые кружки с крестиками — зерна сефадекса; малые черные и красные кружки и треугольники — белки с различной молекулярной массой; А — колонка в начале работы; Б, В, Г — колонка в различные периоды времени. На графике элюции четко видно разделение белковых компонентов.

степени выраженности поперечные связи, приводящие к формированию крупных гидрофильных зерен, нерастворимых в воде и называемых сефадексами. Благодаря большому сродству к воде зерна сильно набухают в водной среде с образованием геля, которым заполняют хроматографическую колонку. Разделение веществ этим методом основано на том, что большие молекулы не проникают во внутреннюю водную фазу геля, являющуюся стационарной, и остаются снаружи, двигаясь вместе с подвижной фазой вниз вдоль колонки; небольшие молекулы, напротив, свободно диффундируют внутрь зерен, образуя равновесную систему между подвижной и стационарной фазами, и соответственно с меньшей скоростью движутся вдоль колонки (рис. 1.5). Обычно момент появления веществ в вытекающем из колонки с сефадексом элюенте выражают формулой:

$$V = V_0 + K \cdot V_i,$$

где V — объем элюирующей жидкости вещества с данным K , мл; V_0 — свободный объем колонки или общий объем внешнего растворителя (вне зерен геля), мл; V_i — объем растворителя внутри геля, мл; K — коэффициент распределения для растворенного вещества между растворителем внутри зерен геля и окружающим растворителем. Если анализируемую пробу, содержащую одно растворенное вещество с $K = 1$ и второе с $K = 0$, внести в колонку с сефадексом, то второе вещество появится в элюирующей жидкости сразу же после выхода из колонки V_0 , а первое — только после выхода объема $V_0 + V_i$. Поскольку белки, обладающие большой молекулярной массой и размерами молекулы, не диффундируют внутрь зерен сефадекса, они первыми вымываются из колонки после выхода свободного объема колонки V_0 , в то время как все остальные вещества (включая низкомолекулярные примеси) вымываются после выхода объема, равного $V_0 + K \cdot V_i$. Метод нашел широкое применение в препаративной энзимологии. С помощью сефадекса можно разделить белки с разной молекулярной массой.

Электрофорез. Метод свободного электрофореза, детально разработанный лауреатом Нобелевской премии А. Тизелиусом, основан на различии в скорости движения белков (подвижности белков) в электрическом поле, которая определяется величиной заряда белка при определенных значениях рН и ионной силы раствора.

В последнее время более широкое распространение получили методы зонального электрофореза белков на различных носителях, в частности на твердых поддерживающих средах: гелях крахмала и полиакриламида, целлюлозе. Преимущества их по сравнению с методом свободного электрофореза в том, что исключается размывание границы белок — растворитель в результате диффузии и конвекции, не требуется налаживания сложной аппаратуры для определения положения границы, а для анализа необходимо небольшое количество белка (подробно эти методы и

соответствующая аппаратура рассматриваются в практических руководствах по биохимии).

Одним из наиболее распространенных методов фракционирования белков (как и методов оценки гомогенности) является диск-электрофорез (от англ. discontinuous — прерывистый, перемежающийся) в полиакриламидном геле, при котором используют пары буферных растворов с различными значениями pH и различной степени пористости геля. Следует указать на высокую разрешающую способность диск-электрофореза. Если при электрофорезе белков сыворотки крови человека на бумаге открываются всего 6 фракций, то при электрофорезе в крахмальном геле — 10, а в полиакриламидном геле — до 18 разных белковых фракций.

Для выявления белков при электрофорезе в гелях их обрабатывают одним из следующих красителей: бромфеноловым синим, амидо черным 10 В, кислотным синим 83, кумасси бриллиантовым голубым R-250 и др. Интенсивность окраски и соответственно относительное содержание каждой белковой фракции обычно определяют денситометрически путем прямого сканирования на денситометре. В последние годы стали применять методы электрофореза белков с градиентом концентрации геля, что значительно повышает разрешающую способность, в особенности при фракционировании белков с высокой молекулярной массой, превышающей 50 000 — 100 000 Да.

Весьма перспективными методами разделения белков (как и определения ряда физико-химических свойств) оказались разные варианты метода изоэлектрического фокусирования, изотахофореза, основанные на проведении электрофореза в поддерживающих средах (на колонке или в тонком слое) с градиентом pH. При этом точное местоположение на колонке каждого белка из смеси определяется значением его изоэлектрической точки, т.е. состоянием, при котором суммарный электрический заряд белковой частицы при данном значении pH равен нулю. При работе методом изоэлектрического фокусирования применяют смеси синтетических полиаминополикарбонновых кислот (амфолины) для создания градиента pH в диапазоне от 3,0 до 10,0.

Очистка белков от низкомолекулярных примесей

Применение в определенной последовательности ряда из перечисленных выше методов позволяет получить белок в очищенном состоянии, не лишенный, однако, некоторых примесей солей. Для полного освобождения белков от низкомолекулярных примесей в настоящее время используют методы диализа, гель-хроматографии, кристаллизации, ультрафильтрации. При диализе используются полупроницаемые мембраны (целлофан, коллодийная пленка), диаметр пор которых варьирует в широких пределах. Белки, как правило, не диффундируют через такую мембрану, в то время как низкомолекулярные вещества легко проникают через нее в окружающую среду.

Метод кристаллизации белков основан на достижении критической точки начала осаждения белка из раствора сульфата аммония при медленном повышении температуры. Уже получены сотни кристаллических белков¹. Однако не всякий кристаллический белок является гомогенным, поскольку при одной и той же концентрации раствора сульфата аммония могут кристаллизоваться близкие по размерам и массе разные белки.

Наилучшие результаты при освобождении белков от низкомолекулярных примесей дают гель-хроматография и ультрафильтрация. Последняя основана на продавливании растворов белка через специальные мембраны, задерживающие белковые молекулы, что позволяет не только освободить белковые растворы от низкомолекулярных примесей, но и концентрировать их.

¹ Первый кристаллический фермент (уреаза) был получен Д. Самнером в 1926 г.

Определение гомогенности белков

На заключительном этапе выделения и очистки белков исследователя всегда интересует вопрос о гомогенности полученного белка. Нельзя оценивать гомогенность индивидуального белка только по одному какому-либо физико-химическому показателю. Для этого пользуются разными критериями. Из огромного числа хроматографических, электрофоретических, химических, радио- и иммунохимических, биологических и гравитационных методов наиболее достоверные результаты при определении гомогенности белка дают ультрацентрифугирование, диск-электрофорез в полиакриламидном геле, изоэлектрическое фокусирование, иммунохимические методы и определение растворимости белка. Действительно, если белок движется при диск-электрофорезе в виде одной узкой полосы и если в этой зоне сосредоточена его биологическая активность (ферментативная, гормональная, токсическая и т. д.), то эти данные с большой долей вероятности могут свидетельствовать об однородности исследуемого белка. Для строгого доказательства гомогенности белка требуется одновременное использование нескольких методов.

В основе иммунохимического метода контроля гомогенности исследуемого белка лежит реакция преципитации его с соответствующей антисывороткой, полученной от иммунизированных этим белком животных.

Не потерял своего значения и метод определения растворимости белка. Этот метод, предложенный еще Д. Нортропом¹, основан на правиле фаз Гиббса, согласно которому растворимость чистого вещества при данных условиях опыта зависит только от температуры, но не зависит от количества вещества, находящегося в твердой фазе. Метод может быть выполнен сравнительно легко и быстро в микромасштабах. Обычно определяют растворимость увеличивающегося количества исследуемого белка при постоянном количестве растворителя.

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ

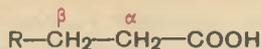
Несмотря на то что первая аминокислота (глицин) была выделена А. Браконно еще в 1820 г. из кислотного гидролизата желатина, полный аминокислотный состав белков был расшифрован только к 30-м годам XX века. Большую роль в этом сыграли исследования Н. Н. Любавина, который в 1871 г. установил, что под действием ферментов пищеварительных соков белки расщепляются на аминокислоты. Из этих исследований были сделаны два важных вывода: во-первых, в состав белков входят аминокислоты, во-вторых, методами гидролиза может быть изучен химический, в частности аминокислотный, состав белков.

Для изучения аминокислотного состава белков пользуются сочетанием (или одним из них) кислотного (HCl), щелочного ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) и реже ферментативного гидролиза². Установлено, что при гидролизе чистого белка, не содержащего примесей, освобождается 20 различных α -аминокислот. Все другие открытые в тканях животных, растений и микроорганизмов аминокислоты (более 300) существуют в природе в свободном состоянии или в виде коротких пептидов или комплексов с другими органическими веществами.

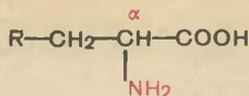
α -Аминокислоты представляют собой производные карбоновых кислот, у которых один водородный атом, у α -углерода, замещен на аминогруппу ($-\text{NH}_2$), например:

¹ В лаборатории Нортропа в 1930—1931 гг. впервые получены в химически индивидуальном и кристаллическом состоянии пепсин, химотрипсин и трипсин.

² Поскольку при кислотном и щелочном гидролизе белков наблюдается почти полный распад триптофана и цистеина, для их определения предложены специальные методы.



Жирная кислота

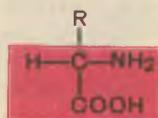


α -Аминокислота

Следует подчеркнуть, что все аминокислоты, входящие в состав природных белков, являются α -аминокислотами, хотя аминогруппа в свободных аминокарбоновых кислотах может находиться, как увидим ниже, в β -, γ -, δ - и ϵ -положениях.

Классификация аминокислот

Все встречающиеся в природе аминокислоты обладают общим свойством — амфотерностью (от греч. *amphoteros* — двусторонний), т. е. каждая аминокислота содержит как минимум одну кислотную и одну основную группу. Общий тип строения α -аминокислот может быть представлен в следующем виде:



Как видно из общей формулы, аминокислоты будут отличаться друг от друга химической природой радикала R, представляющего группу атомов в молекуле аминокислоты, связанную с α -углеродным атомом и не участвующую в образовании пептидной связи при синтезе белка. Почти все α -амино- и α -карбоксильные группы участвуют в образовании пептидных связей белковой молекулы, теряя при этом свои специфические для свободных аминокислот кислотно-основные свойства. Поэтому все разнообразие особенностей структуры и функции белковых молекул связано с химической природой и физико-химическими свойствами радикалов аминокислот. Именно благодаря им белки наделены рядом уникальных функций, не свойственных другим биополимерам, и обладают химической индивидуальностью.

Аминокислоты классифицируют на основе химического строения радикалов, хотя были предложены и другие принципы. Различают ароматические и алифатические аминокислоты, а также аминокислоты, содержащие серу или гидроксильные группы. Часто классификация основана на природе заряда аминокислоты. Если радикал нейтральный (такие аминокислоты содержат только одну амино- и одну карбоксильную группу), то они называются нейтральными аминокислотами. Если же аминокислота содержит избыток амино- или карбоксильных групп, то она называется соответственно основной или кислотной аминокислотой.

Современная рациональная классификация аминокислот основана на полярности радикалов, т. е. способности их к взаимодействию с водой. Она включает 4 класса аминокислот: 1) неполярные (гидрофобные); 2) полярные (гидрофильные) незаряженные; 3) отрицательно заряженные; 4) положительно заряженные при физиологических значениях pH (табл. 1.3). В представленной классификации аминокислот приведены наименования, структурные формулы, сокращенные обозначения и однобуквенные символы аминокислот, принятые в отечественной и иностранной литературе, а также значения изоэлектрической точки (pI).

Перечисленные аминокислоты присутствуют в разных количественных соотношениях и последовательностях в тысячах белков, хотя отдельные индивидуальные белки и не содержат полный набор всех этих аминокислот. Помимо наличия в боль-

Таблица 1.3. Классификация аминокислот, входящих в состав белков

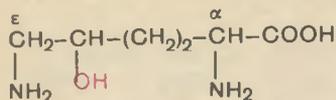
Название	Структура	Сокращенное обозначение	pI
Неполярные (гидрофобные) аминокислоты			
L-Аланин	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Ала (Ala) A ¹	6,02
L-Валин	$\begin{matrix} \text{H}_3\text{C} \\ \text{H}_3\text{C} \end{matrix} \text{CH}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Вал (Val) V	5,97
L-Лейцин	$\begin{matrix} \text{H}_3\text{C} \\ \text{H}_3\text{C} \end{matrix} \text{CH}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Лей (Leu) L	5,97
L-Изолейцин	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Иле (Ile) I	6,02
L-Метионин	$\begin{matrix} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \\ \text{S}-\text{CH}_3 \end{matrix} \text{CH}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Мет (Met) M	5,75
L-Пролин	$\begin{matrix} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{matrix}$	Про (Pro) P	6,10
L-Фенилаланин ²	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Фен (Phe) F	5,88
L-Триптофан	$\text{C}_8\text{H}_7\text{NH}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Трп (Trp) W	5,88
Полярные (гидрофильные) незаряженные аминокислоты			
L-Глицин	$\text{H}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Гли (Gly) G	5,97
L-Серин	$\begin{matrix} \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{matrix} \text{CH}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Сер (Ser) S	5,88
L-Треонин	$\text{CH}_3-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Тре (Tre) T	6,53

Название	Структура	Сокращенное обозначение	pI
L-Цистеин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \qquad \quad \\ \text{SH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Цис (Cys) C	5,02
L-Тирозин	$\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH}$ $ $ NH_2	Тир (Tyr) Y	5,65
L-Аспарагин	$\text{O}=\text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH}$ $ \qquad \quad $ $\text{NH}_2 \quad \text{NH}_2$	Асп (Asp) N	5,41
L-Глутамин	$\text{O}=\text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH}$ $ \qquad \quad $ $\text{NH}_2 \quad \text{NH}_2$	Глн (Gln) Q	5,65
Отрицательно заряженные (кислые) аминокислоты			
L-Аспарагиновая кислота	$\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH}$ $ $ NH_2	Асп (Asp) D	2,97
L-Глутаминовая кислота	$\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH}$ $ $ NH_2	Глу (Glu) E	3,22
Положительно заряженные (основные) аминокислоты			
L-Лизин	$\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH}$ $ \qquad \quad $ $\text{NH}_2 \quad \text{NH}_2$	Лиз (Lys) K	9,74
L-Аргинин	$\begin{array}{c} \text{HN} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ / \qquad \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Арг (Arg) R	10,76
L-Гистидин	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH}$ $ $ NH_2	Гис (His) H	7,58

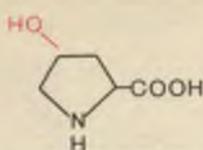
¹ Однобуквенные символы часто применяются для изображения первичной структуры белков и для вычислений с помощью ЭВМ.

² Для удобства обозначения атомы С и Н в кольцевых структурах часто не приводятся.

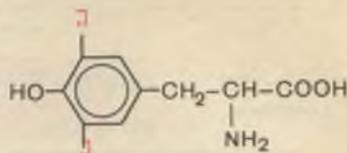
шинстве природных белков двадцати аминокислот, в некоторых белках обнаружены производные аминокислот¹: оксипролин, оксилизин, дийодтирозин, фосфосерин и фосфотреонин (последние две аминокислоты будут представлены ниже, см. главу 2).



Оксилизин

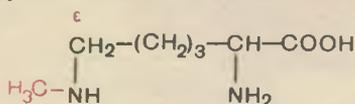


Оксипролин



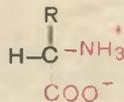
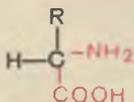
3,5-Дийодтирозин

Первые две аминокислоты содержатся в белке соединительной ткани – коллагене, а дийодтирозин является основой структуры гормонов щитовидной железы. В мышечном белке миозине обнаружен также ε-N-метиллизин:



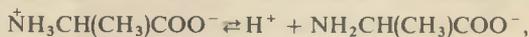
Общие свойства аминокислот

Кислотно-основные свойства. Кислотно-основные свойства аминокислот определяют многие физико-химические и биологические свойства белков. На этих свойствах основаны, кроме того, почти все методы выделения и идентификации аминокислот. Аминокислоты легко растворимы в воде. Они кристаллизуются из нейтральных водных растворов в форме биполярных (амфотерных) ионов (цвиттерионов), а не в виде недиссоциированных молекул (последнюю структуру приводят для удобства представления, однако все аминокислоты при физиологических значениях pH имеют структуру цвиттериона).



Цвиттерион

При растворении кристаллической аминокислоты, например аланина, в воде она может реагировать или как кислота (донор протона):



или как основание (акцептор протона):



Если радикалы аминокислот нейтральные, то они почти не оказывают влияния на диссоциацию α-карбоксильной или α-аминогруппы, и величины рК (отрицательный логарифм константы диссоциации) остаются относительно постоянными. Вследствие этого кривые диссоциации почти всех нейтральных аминокислот накладываются друг на друга и могут быть рассмотрены на примере аланина.

Если к раствору аланина (например, 0,1 М) в воде постепенно прибавлять сильную

¹ Эти аминокислоты образуются после завершения синтеза белка в рибосоме клеток в результате постсинтетической химической модификации.

кислоту (0,1 М раствор HCl) или сильную щелочь (0,1 М раствор NaOH), то получим кривую титрования аланина, типичную для всех нейтральных аминокислот (рис. 1.6).

Кажущиеся величины pK' для α -карбоксильной и α -аминогрупп (т.е. значения pH, при котором эти группы в среднем наполовину диссоциированы) довольно сильно различаются, составляя $pK_1 = 2,34$ и $pK_2 = 9,69$. При низком значении pH (ниже pK_1') почти все молекулы аланина являются полностью протонированными и несут положительный заряд. Другими словами, при высокой концентрации водородных ионов в растворе тенденция к диссоциации водорода из структуры аланина оказывается незначительной. Из кривой титрования видно, что точка перехода между ветвями кривой располагается при pH 6,02. Это означает, что при данном значении pH суммарный (или средний) электрический заряд молекулы аланина равен нулю и она не перемещается в электрическом поле ни к аноду, ни к катоду (изоэлектрическое состояние). Такое значение pH получило название изоэлектрической точки и обозначается pI . Изоэлектрическая точка аминокислот, не содержащих дополнительных кислотных или основных групп, представляет собой среднее арифметическое между двумя значениями pK'

$$pI = \frac{pK^{COOH} + pK^{NH_2}}{2},$$

соответственно для аланина $pI = \frac{2,34 + 9,69}{2} = 6,02$.

Изоэлектрическая точка ряда других аминокислот, содержащих дополнительные кислотные или основные группы (аспарагиновая и глутаминовая кислоты, лизин, аргинин, тирозин и др.), зависит, кроме того, от кислотности или основности радикалов этих аминокислот. Для лизина, например, pI должна вычисляться из полусуммы значений pK' для α - и ϵ - NH_2 -групп. Из сказанного следует, что в интервале pH от 4,0 до 9,0 почти все аминокислоты существуют преимущественно в форме цвиттерионов с протонированной аминогруппой и диссоциированной карбоксильной группой. Укажем также, что при физиологических значениях pH 6,9–7,4 аминокислоты (за исключением гистидина) не обладают измеримой буферной емкостью. Эту способность они приобретают только при значениях pH, близких к величинам их pK (т.е. в интервалах pH 1,7–3,2 и 8,6–10,8).

Стереохимия аминокислот. Важным свойством аминокислот, освобождающихся в процессе гидролиза природных белков в условиях, исключающих рацемизацию, является их оптическая активность. Будучи растворенными в воде (или HCl), они способны вращать плоскость поляризованного луча (исключение составляет глицин). Это свойство связано с наличием в молекуле всех природных аминокислот (за исключением глицина) в α -положении асимметрического атома углерода (т.е. атома углерода, все четыре валентные связи которого заняты различными заместителями). Величины удельного вращения вправо или влево являются количественной характеристикой оптической активности, и для большинства аминокислот $[\alpha]_D^{25}$ составляют от 10 до 30°; примерно половина аминокислот белков оказалась правовращающими, они обозначаются знаком «+» (Ала, Иле, Глу, Лиз и др.), чуть меньше половины – левовращающими (Фен, Трп, Лей и др.), они обозначаются знаком «-». Отметим также, что все эти аминокислоты принадлежат к L-ряду, а величина и знак оптического вращения зависят от природы радикалов аминокислот и значения pH раствора, в котором измеряют оптическое вращение.

Стереохимию аминокислот принято оценивать не по оптическому вращению, а

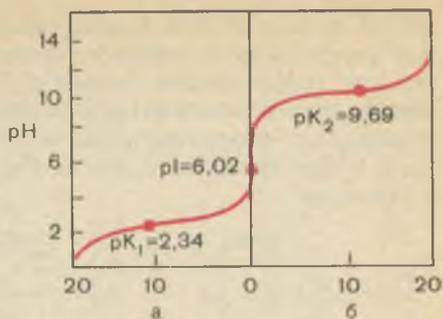


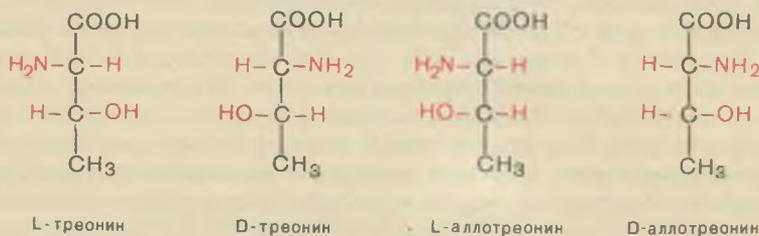
Рис. 1.6. Кривые, полученные при титровании 0,1 М раствора аланина 0,1 М раствором HCl (а) и 0,1 М раствором NaOH (б).

исходя из абсолютной конфигурации всех четырех замещающих групп, расположенных вокруг асимметрического атома углерода в вершинах модели тетраэдра. Абсолютную конфигурацию аминокислот принято соотносить стереохимически с соединением, произвольно взятым для сравнения, а именно с глицериновым альдегидом, также содержащим асимметрический атом углерода. Ниже представлены L- и D-стереоизомеры глицеринового альдегида. Рядом показаны пространственные конфигурации L- и D-аланина:



Все аминокислоты, образующиеся при гидролизе природных белков в условиях, исключающих рацемизацию, принадлежат к L-ряду. Таким образом, природные аминокислоты имеют пространственное расположение, аналогичное конфигурации L-глицеринового альдегида. Следует еще раз подчеркнуть, что символы L и D означают принадлежность данной аминокислоты по своей стереохимической конфигурации к L- или D-ряду, в то время как знаки (+) или (-) указывают на направление изменения плоскости поляризации светового луча.

В числе белковых аминокислот имеются две аминокислоты (треонин и изолейцин), которые содержат по два асимметрических атома углерода. Следовательно, если не в природе, то во всяком случае в лаборатории возможно получить четыре стереоизомерные формы этих аминокислот¹. Для треонина известны все четыре изомера. Если обозначить условно символом L выделенный из природных белков треонин, то его зеркальное отображение называют D-треонином. Два других изомера, получивших наименование диастереоизомеров, или аллоформ, также могут иметь L- и D-формы. Структурные конфигурации всех четырех стереоизомеров треонина можно представить следующими формулами:



Выше было указано, что в белковой молекуле D-аминокислоты не обнаружены², однако в живой природе они широко распространены. Так, D-изомеры глутаминовой кислоты, аланина, валина, фенилаланина, лейцина и ряда других открыты в клеточной стенке бактерий; в составе некоторых антибиотиков, в частности актиномицинов, бацитрацина, грамицидинов А, S, содержатся аминокислоты D-конфигурации.

¹ При чисто химическом (но не ферментативном) синтезе аминокислот в лаборатории обычно образуется оптически неактивная смесь L- и D-изомеров, обозначаемых как DL-аминокислоты, или рацематы.

² D-аминокислоты, очевидно, не играют важной физиологической роли в организме животных и человека, хотя в органах и тканях содержатся весьма активные ферменты, катализирующие их распад (см. Промежуточный обмен аминокислот в тканях); L- и D-аминокислоты отличаются, кроме того, по вкусу: первые — горькие, вторые — сладкие.

Таблица 1.4. Аминокислотный состав некоторых белков

Название	Сальмин	Гистон (печень теленка)	Казеин	Альбумин (сыворо-тки чело-века)	γ-Глобу-лин (чело-века)	Пепсин	Инсу-лин	Колла-ген
Аланин	1,1	7,6	3,2	—	—	—	4,5	9,5
Глицин	2,9	5,8	2,0	1,6	4,2	6,4	4,3	27,2
Валин	3,1	5,5	7,2	7,7	9,7	7,1	7,7	3,4
Лейцин	0	9,1	9,2	11,0	9,3	10,4	13,2	
Изолейцин	1,6	4,6	6,1	1,7	2,7	10,8	2,8	5,6
Пролин	5,8	3,4	10,6	5,1	8,1	5,0	2,5	15,1
Фенилаланин	0	3,5	5,0	7,8	4,6	6,4	8,8	2,5
Тирозин	0	3,9	6,3	4,7	6,8	8,5	13,0	1,0
Триптофан	0	—	1,2	0,2	2,9	2,4	0	0
Серин	9,1	4,1	6,3	3,3	11,4	12,2	5,2	3,4
Треонин	0	6,4	4,9	4,6	8,4	9,6	2,1	2,3
Цистеин + цистин	0	—	0,3	6,3	3,1	2,1	12,5	0
Метионин	0	0,9	2,8	1,3	1,1	1,7	—	0,8
Аргинин	85,2	14,8	4,1	6,2	4,8	1,0	3,1	8,6
Гистидин	0	2,3	3,1	3,5	2,5	0,9	4,9	0,7
Лизин	0	11,7	8,2	12,3	8,1	0,9	2,5	4,5
Аспарагиновая кис-лота	0	5,5	7,1	9,0	8,8	16,0	6,8	6,3
Глутаминовая кисло-та	0	10,3	22,4	17,0	11,8	11,9	18,6	11,3
Амидный азот	0	0,7	1,6	0,9	1,1	1,3	1,4	0,7

Аминокислотный состав (качественный и количественный) сотен белков, полученных из разных источников, выяснен. Табл. 1.4 дает представление о процентном содержании аминокислотных остатков в некоторых природных белках.

При анализе табл. 1.4 виден ряд закономерностей. На долю дикарбоновых аминокислот и их амидов в большинстве белков приходится до 25–27% всех аминокислот. Эти же аминокислоты вместе с лейцином и лизином составляют около 50% всех аминокислот. В то же время на долю таких аминокислот, как цистеин, триптофан, гистидин приходится не более 1,5–3,5%. В протаминах и гистонах отмечено высокое содержание основных аминокислот, аргинина и лизина, оно достигает 26,4 и 85,2% (см. Химия простых белков).

Химические реакции для обнаружения аминокислот и определение аминокислот в гидролизатах белков. В курсе органической химии подробно изложено множество химических реакций, характерных для α-амино и α-карбоксильных групп аминокислот (ацилирование, алкилирование, нитрование, эстерификация и др.). Здесь же будут рассмотрены общие цветные реакции для обнаружения индивидуальных аминокислот и аминокислот, входящих в состав белков, основанные на химической природе радикалов аминокислот. Эти реакции суммированы в табл. 1.5 (по Г. Малеру и Ю. Кордесу).

Для открытия в биообъектах и количественного определения аминокислот весьма успешно применяется реакция их с нингидрином. На первой стадии реакции образуется восстановленный нингидрин за счет окислительного дезаминирования аминокислот (параллельно происходит и декарбоксилирование аминокислот):

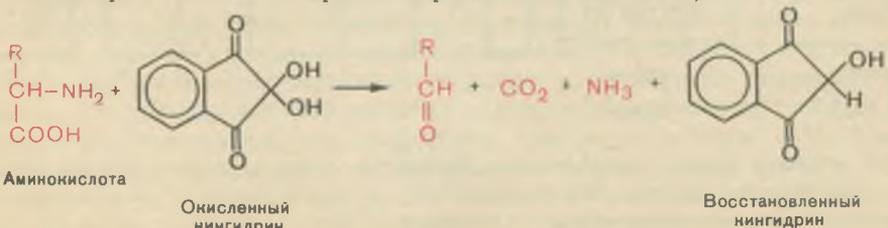
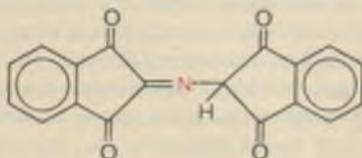


Таблица 1.5. Реакции, используемые для идентификации и полуколичественного определения аминокислот и белков

Название	Реактивы	Определяемая аминокислота	Окраска
Реакция Миллона	HgNO ₃ в азотной кислоте в присутствии азотистой кислоты	Тирозин	Красная
Ксантопротеиновая реакция	Кипящая концентрированная азотная кислота	Фенилаланин, Тирозин	Желтая
Реакция Гопкинса — Кола	Глиоксиловая кислота в концентрированной серной кислоте	Триптофан	Сине-фиолетовая
Реакция Эрлиха	<i>n</i> -Диметиламинобензальдегид в концентрированной хлористоводородной кислоте	Триптофан	Синяя
Реакция Сакагучи	α -Нафтол и гипохлорит натрия	Аргинин	Красная
Нитропруссидная реакция	Нитропруссид натрия в разбавленном растворе аммиака	Цистеин	»
Реакция Салливана	1,2-Нафтохинон-4-сульфонат натрия и бисульфит натрия	Цистеин	Красная
Реакция Паули	Диазотированная сульфаниловая кислота в щелочном растворе	Гистидин	»
Реакция Фолина — Чиокалтеу	Фосфомолибденово-вольфрамовая кислота	Тирозин	Синяя

На второй стадии образовавшийся аммиак реагирует с эквимольными количествами окисленного и восстановленного нингидрина, образуя сине-фиолетовый продукт, интенсивность окраски которого (при 570 нм) пропорциональна количеству аминокислоты:



На основе нингидриновой реакции были разработаны методы количественного определения аминокислот, в частности метод распределительной хроматографии на бумаге, впервые внедренный в 1944 г. (А. Мартин и Р. Синдж). Эта же реакция используется благодаря своей высокой чувствительности в автоматическом анализаторе аминокислот. Впервые такой прибор сконструировали Д. Шпакман, С. Мур и У. Стейн (рис. 1.7).

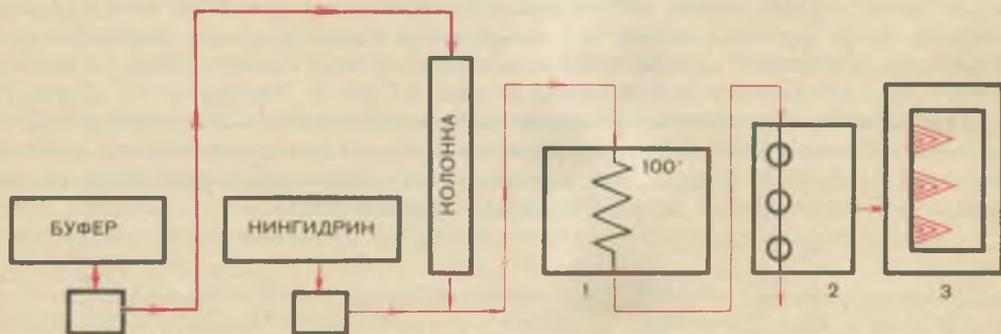
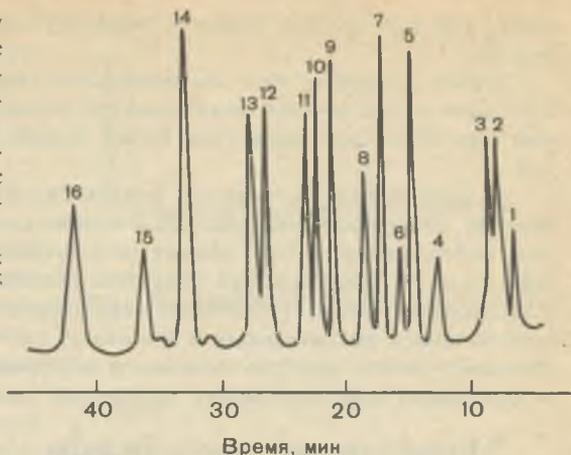


Рис. 1.7. Работа автоматического анализатора аминокислот (принципиальная схема по Шпакману, Муру и Стейну).

1 — смеситель; 2 — фотоэлектроколориметр; 3 — самописец.

Рис. 1.8. ВЭЖХ аминокислот по Цеху и Вольтеру. Разделение на колонке (3×250 мм), наполненной ионообменной смолой — полистиролдивинилбензолом; концентрация аминокислот — 500 пмоль/л, реактив для детектирования — флюорескамин, образующий с аминогруппой сильно флюоресцирующее соединение.

1-Асп; 2-Тре; 3-Сер; 4-Глу; 5-Гли; 6-Ала; 7-Цис; 8-Вал; 9-Мет; 10-Иле; 11-Лей; 12-Тир; 13-Фен; 14-Лиз; 15-Гис; 16-Арг.



После разведения смеси аминокислот в колонках, заполненных специальными ионообменными смолами (сульфополистирольным катионитом), ток элюента из колонки поступает в смеситель, туда же поступает раствор нингидрина: интенсивность образующейся окраски автоматически измеряется на фотоэлектроколориметре и регистрируется самописцем. Этот метод нашел широкое применение в клинической практике при исследовании крови, мочи, спинномозговой жидкости; с его помощью за 2—3 ч можно получить полную картину качественного состава аминокислот в биологических жидкостях и выявить наличие в них необычных азотсодержащих веществ, что имеет важное диагностическое и прогностическое значение в клинике.

Автоматические анализаторы аминокислот все время совершенствуются, повышается чувствительность методов и скорость проведения анализа. Так, в современных приборах высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) удается проводить анализ гидролизата белка за 45 мин, определяя при этом концентрацию аминокислот порядка пикомолей (рис. 1.8).

Смесь аминокислот может быть успешно разделена также методом электрофореза на бумаге. При рН 6,0 возможно хорошее разделение кислых и основных аминокислот с нейтральными. В этом случае отрицательно заряженные (кислые) аминокислоты будут двигаться к аноду, а положительно заряженные — к катоду. Нейтральные аминокислоты остаются на линии старта. Для разделения их электрофорез обычно проводят при рН 1,8—2,0, когда все они мигрируют к аноду с незначительным, но уловимым различием в подвижности. После электрофореза местоположение аминокислот на электрофореграмме выявляют с помощью химических реакций, а после элюции окрашенных продуктов определяют их количественно.

Физико-химические свойства белков

Наиболее характерными физико-химическими свойствами белков являются: высокая вязкость растворов, незначительная диффузия, способность к набуханию в больших пределах, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, низкое осмотическое давление и высокое онкотическое давление, способность к поглощению УФ-лучей при 280 нм (это последнее свойство, обусловленное наличием в белках ароматических аминокислот, используется для количественного определения белков).

Белки, как и аминокислоты, амфотерны благодаря наличию свободных NH_2 - и COOH -групп и характеризуются соответственно всеми свойствами кислот и оснований. В зависимости от реакции среды и соотношения кислых и основных аминокислот белки в растворе несут или отрицательный, или положительный заряд, перемещаясь к

аноду или катоду. Это свойство используется при очистке белков методом электрофореза.

Белки обладают явно выраженными гидрофильными свойствами. Их растворы обладают очень низким осмотическим давлением, высокой вязкостью и незначительной способностью к диффузии. Белки способны к набуханию в очень больших пределах.

С коллоидным состоянием белков связан ряд характерных свойств, в частности явление светорассеяния, лежащее в основе количественного определения белков методом нефелометрии. Этот эффект используется, кроме того, в современных методах микроскопии биологических объектов. Молекулы белка не способны проходить через полупроницаемые искусственные мембраны (целлофан, пергамент, коллодий), а также биомембраны растительных и животных тканей, хотя при органических поражениях, например почек, капсула почечного клубочка (Шумлянскогo — Боумена) становится проницаемой для альбуминов сыворотки крови, и они появляются в моче.

Молекулярная масса белков

Белки относятся к высокомолекулярным соединениям, в состав которых входят сотни и даже тысячи аминокислотных остатков, объединенных в макромолекулярную структуру. Молекулярная масса белков колеблется от 6000 (нижний предел) до 1 000 000 Да и выше в зависимости от количества отдельных полипептидных цепей в составе единой молекулярной структуры белка. Такие полипептидные цепи получили название субъединиц. Их молекулярная масса также варьирует в широких пределах: от 6000 до 100 000 и более дальтон.

Поскольку аминокислотный состав и последовательность аминокислот выяснены для многих белков (более 2500), стало возможным вычисление химическим путем их молекулярной массы с высокой точностью. Однако для огромного количества разнообразных белков, встречающихся в природе, химическое строение не выяснено, поэтому основными методами определения молекулярной массы все еще остаются физико-химические методы (гравиметрические, осмометрические, вискозиметрические, электрофоретические, оптические и др.). Из них практически наиболее часто используются методы седиментационного анализа, гель-хроматографии и электрофореза.

Определение молекулярной массы белков методами седиментационного анализа проводят в ультрацентрифугах¹, в которых удается создать центробежные ускорения (g), превышающие в 200 000 и более раз ускорение земного притяжения; обычно вычисляют молекулярную массу по скорости седиментации молекул белка или седиментационному равновесию. По мере перемещения молекул от центра к периферии образуется резкая граница растворитель — белок (регистрируемая автоматически). Оптические свойства растворителя и белка используются при определении скорости седиментации; последнюю выражают через константу седиментации s , которая зависит как от массы, так и от формы белковой частицы:

$$s = \frac{v}{\omega^2 \cdot r},$$

где v — скорость перемещения границы растворитель — белок, см/с; ω — угловая скорость ротора, рад/с; r — расстояние от центра ротора до середины ячейки с раствором белка, см. Константа седиментации имеет размерность времени (ее выражают в секундах). Величина константы седиментации (s), равная $1 \cdot 10^{-13}$ с, условно принята за единицу и названа сведбергом (S). Значения констант седиментации большинства белков лежат в пределах 1–50 S, хотя в ряде случаев эти значения превышают 100 S.

¹ Впервые ультрацентрифуга была сконструирована шведским биохимиком Т. Сведбергом. Прибор был снабжен оптической приставкой, способной периодически через равные промежутки времени фотографировать процесс осаждения (седиментации) белковых частиц.

Для вычисления молекулярной массы (M), помимо константы седиментации, необходимы дополнительные сведения о плотности растворителя и белка и другие согласно уравнению Сведберга:

$$M = \frac{R \cdot T \cdot s}{D(1 - \bar{v}\rho)},$$

где R — газовая постоянная, эрг/(моль · град); T — абсолютная температура (по шкале Кельвина); s — константа седиментации; ρ — плотность растворителя; \bar{v} — парциальный удельный объем молекулы белка; D — коэффициент диффузии.

Поскольку определение молекулярной массы белков методом ультрацентрифугирования требует много времени и, кроме того, использования сложной и дорогостоящей аппаратуры, в последние годы разработаны два более простых метода (гель-хроматографический и электрофоретический). При использовании метода гель-хроматографии в первую очередь требуется откалибровать колонку. Для этого через колонку с сефадексом пропускают несколько белков с известными молекулярными массами и строят график, откладывая значения логарифмов молекулярной массы против их элюционных объемов, которые находят, как показано на рис. 1.9. Известно, что между \log молекулярной массы белка, имеющим сферическую форму, и элюционным объемом существует прямая зависимость. Поэтому не составляет труда определить молекулярную массу исследуемого белка, зная объем его элюции.

Второй разновидностью этого метода является тонкослойная гель-хроматография. Длина пробега белка (в миллиметрах) через тонкий слой сефадекса находится в логарифмической зависимости от молекулярной массы белка. Подобная зависимость для ряда белков представлена на рис. 1.10.

Метод гель-хроматографии, кроме простоты и быстроты, имеет еще то преимущество, что не требуется выделять белок в чистом виде, так как примеси других белков не мешают определению, поскольку каждый из них проходит через колонку со свойственной ему скоростью, определяемой молекулярной массой. Это обстоятельство широко используется в энзимологии, когда оказывается возможным определение молекулярной массы даже очень небольшого количества фермента в присутствии других белков, не обладающих аналогичной каталитической активностью.

При применении метода диск-электрофореза в полиакриламидном геле для определения молекулярной массы белков также строят график зависимости между логарифмом молекулярной массы калибровочных белков и подвижностью белковых частиц в полиакриламидном геле, а затем, определив подвижность исследуемого белка, по графику находят его массу (рис. 1.11). Электрофорез проводят в присутствии детергента — додецилсульфата натрия, так как только в этом случае наблюдается прямая пропорциональная зависимость между молекулярной массой и подвиж-

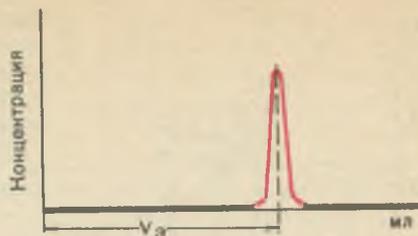


Рис. 1.9. Измерение объема элюции (V_e).

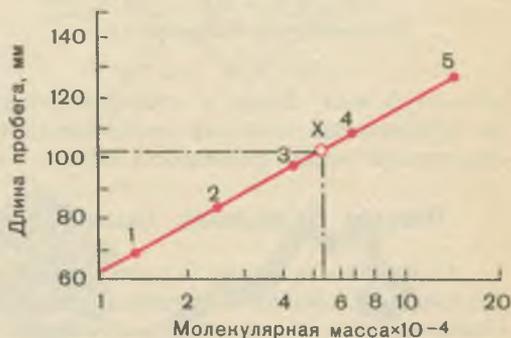


Рис. 1.10. Зависимость между длиной пробега белковых частиц при гель-хроматографии в тонком слое сефадекса Г-150 (сверхтонкого) и их молекулярными массами (в полулогарифмической системе координат).

1 — рибонуклеаза; 2 — химоотрипсиноген; 3 — яичный альбумин; 4 — сыровоточный альбумин; 5 — γ -глобулин; X — белок с неизвестной молекулярной массой.

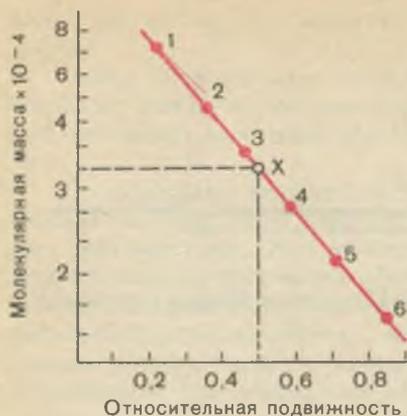


Рис. 1.11. Зависимость между молекулярной массой и относительной подвижностью белка при диск-электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (в полупологарифмической системе координат).

1 — сывороточный альбумин; 2 — яичный альбумин; 3 — пепсин; 4 — химотрипсиноген; 5 — миоглобин; 6 — цитохром с; X — белок с неизвестной молекулярной массой.

ностью белков. Белки с четвертичной структурой при этих условиях распадаются на субъединицы, поэтому метод находит широкое применение для определения молекулярной массы субъединиц белка.

Форма белковых молекул

О величине и форме белковых молекул раньше судили по данным ультрацентрифугирования, двойного лучепреломления и диффузии. Эти данные указывали на существование в природе глобулярных (шарообразных) и фибриллярных (нитевидных) белков. В настоящее время общие представления о форме белковых молекул в основном подтвердились, однако только современные методы исследования позволили установить детали пространственной конфигурации (трехмерной структуры) белковых молекул. Благодаря применению методов сканирующей микроскопии и рентгеноструктурного анализа (высокого разрешения, порядка 0,2–0,3 нм) удалось в деталях расшифровать не только полную пространственную структуру, соответственно форму, но и степень асимметрии белковых молекул во всех трех измерениях. Оказалось, что даже глобулярные белки крови (гемоглобин, альбумины и глобулины) являются асимметричными в указанных измерениях. Следует отметить, что не только физико-химические, но и биологические свойства белков (в свободном или в связанном друг с другом или с другими биополимерами состоянии) определяются их пространственной структурой.

Денатурация белков

Природные белковые тела наделены определенной строго заданной пространственной конфигурацией и обладают рядом характерных физико-химических и биологических свойств при физиологических значениях температуры и pH среды. Под влиянием различных физических и химических факторов белки подвергаются свертыванию и выпадают в осадок, теряя нативные свойства. Таким образом, под денатурацией следует понимать нарушение общего плана уникальной структуры нативной молекулы белка, приводящее к потере характерных для нее свойств (растворимости, электрофоретической подвижности, биологической активности и т. д.). Большинство белков денатурируют при нагревании их растворов выше 50–60 °С. Внешние проявления денатурации сводятся к потере растворимости, особенно в изoeлектрической точке, повышению вязкости белковых растворов, увеличению количества свободных функциональных SH-групп и изменению характера рассеивания рентгеновских лучей. Наиболее характерным признаком денатурации является резкое снижение или полная потеря белком его биологической активности (каталитической,

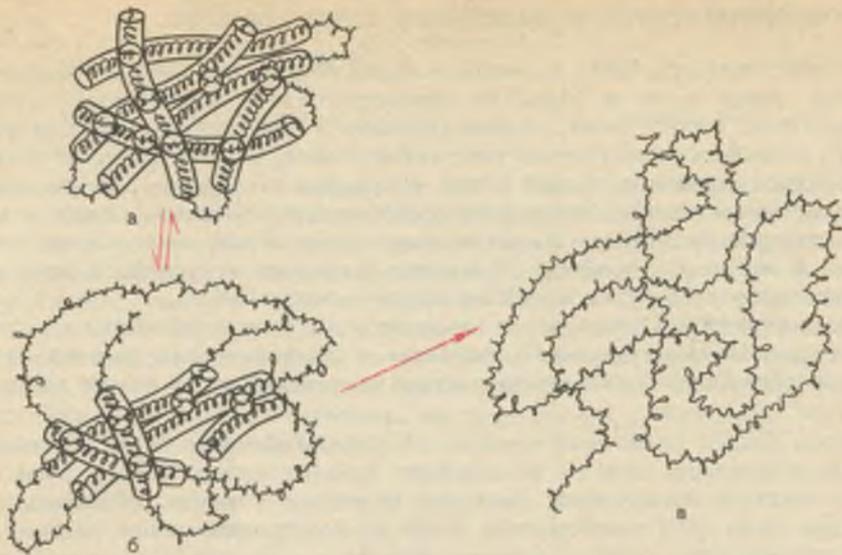


Рис. 1.12. Схематическое изображение денатурации белковой молекулы.

а — исходное состояние; б — начинающееся обратимое нарушение молекулярной структуры; в — необратимое разворачивание полипептидной цепи.

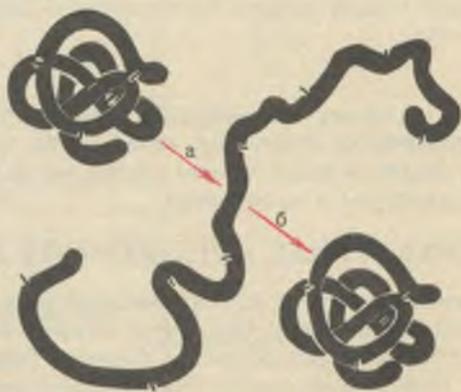


Рис. 1.13. Денатурация и ренатурация рибонуклеазы (по Анфинсену).

а — разворачивание (мочевина + меркаптоэтанол); б — повторное свертывание.

антигенной или гормональной). При денатурации разрушаются в основном нековалентные (в частности, водородные) связи и дисульфидные мостики и не затрагиваются пептидные связи самого остова полипептидной цепи. При этом разворачиваются глобулы нативных белковых молекул и образуются случайные и беспорядочные структуры (рис. 1.12). При непродолжительном действии и быстром устранении денатурирующего агента возможна ренатурация белка с полным восстановлением исходной структуры и нативных свойств его молекулы (рис. 1.13), включая биологическую активность.

Для практических целей иногда используют процесс денатурации в мягких условиях, например при получении ферментов или других биологически активных белковых препаратов в условиях низких температур в присутствии солей и при соответствующем значении рН¹. При лиофилизации белков (высушивание в вакууме путем возгонки влаги из замороженного состояния) для предотвращения денатурации часто пользуются химическими веществами (простые сахара, глицерин, органические анионы).

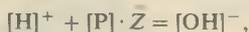
¹ Процесс денатурации используется в медицинской практике: при отравлениях сулемой или другими солями тяжелых металлов пострадавшему в качестве «противоядия» дают пить молоко или раствор яичного белка.

Изоэлектрическая и изоионная точки белков

В изоэлектрической точке суммарный заряд белков, обладающих амфотерными свойствами, равен нулю и белки не перемещаются в электрическом поле. Зная аминокислотный состав белка, можно определить приближенно изоэлектрическую точку (рI); рI является характерной константой белков. Изоэлектрическая точка большинства белков животных тканей лежит в пределах от 5,5 до 7,0, что свидетельствует о частичном преобладании кислых аминокислот. Однако в природе имеются белки, у которых значения изоэлектрических точек лежат при крайних значениях рН среды. В частности, величина рI пепсина (фермента желудочного сока) равна 1, а сальмина (основного белка из молок семги) — почти 12.

В изоэлектрической точке белки наименее устойчивы в растворе и легко выпадают в осадок. Изоэлектрическая точка белка в сильной степени зависит от присутствия в растворе ионов солей, в то же время на ее величину не влияет концентрация белка.

В химии белков существует понятие об изоионной точке белка. Раствор белка называется изоионным, если он не содержит никаких других ионов, кроме ионизированных остатков аминокислот белковой молекулы и ионов, образующихся при диссоциации воды. Для освобождения белка от посторонних ионов обычно пропускают его раствор через колонку, наполненную смесью анионо- и катионообменников. Изоионной точкой данного белка принято называть значение рН изоионного раствора этого белка:



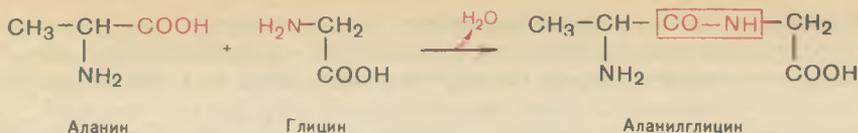
где [P] — молярная концентрация белка; \bar{Z} — средний заряд молекулы. Согласно этому уравнению, изоионная точка белка зависит от его концентрации. Очевидно поэтому белок, за исключением случая, когда рI равна 7, не может быть одновременно изоэлектрическим и изоионным.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВ

Выяснение структурной организации белков считается одной из главных проблем современной биохимии. Оно имеет важное научно-практическое значение для понимания огромного разнообразия функций белков, выполняемых ими в живых организмах. Белковые молекулы представляют собой продукт полимеризации 20 различных мономерных молекул (аминокислот), соединенных не хаотично, а в строгом соответствии с кодом белкового синтеза (см. главу 13). Вопрос о том, каким образом соединяются между собой многие десятки и сотни аминокислот в белковой молекуле, был предметом пристального внимания многих лабораторий мира, занимавшихся химией белка.

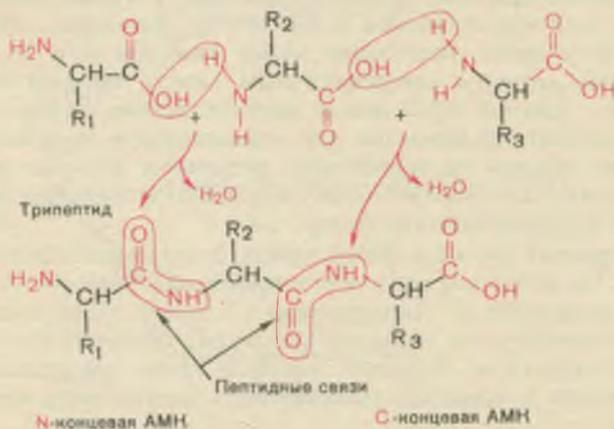
Впервые А. Я. Данилевский (1888), изучая биуретовую реакцию, высказал предположение о существовании во всех белковых веществах одинаковых групп атомов, аналогичных биурету $NH_2-CO-NH-CO-NH_2$. Идея о том, что и «самый тип соединения групп в разных белковых веществах одинаков», была выражена в виде схемы: $Y-B-R-\boxed{NH-CO}-R-B-Y$, где Y, B, R означали различные группировки. Таким образом, А. Я. Данилевский первым указал на связь $NH-CO-$, позднее получившую название пептидной связи, как на наиболее вероятный способ соединения аминокислот в белковой молекуле.

Однако только Э. Фишер (1902) сформулировал полипептидную теорию строения, согласно которой белки представляют собой сложные полипептиды, в которых отдельные аминокислоты связаны друг с другом пептидными связями, возникающими при взаимодействии α -карбоксильных $COOH-$ и $\alpha-NH_2-$ групп аминокислот. На примере взаимодействия аланина и глицина образование пептидной связи и дипептида можно представить следующим уравнением:



Аналогичным способом к дипептиду могут присоединяться и другие аминокислоты с образованием три-, тетра-, пентапептида и т. д., вплоть до крупной молекулы полипептида (белка). Наименование пептидов складывается из названия первой N-концевой аминокислоты со свободной NH₂-группой (с окончанием -ил, типичным для ацилов), названий последующих аминокислот (также с окончаниями -ил) и полного названия C-концевой аминокислоты со свободной COOH-группой. Например, пентапептид из 5 аминокислот может быть обозначен полным наименованием: глицил-аланил-серил-цистеинил-аланин или сокращенно Гли-Ала-Сер-Цис-Ала¹.

Образование трипептида, например, из трех разных аминокислот может быть представлено в виде следующей схемы:



Химический синтез полипептидов и современные физико-химические методы исследования белков полностью подтвердили существование пептидных связей в структуре белка. Получены следующие экспериментальные доказательства полипептидной теории строения белка.

1. В природных белках сравнительно мало титруемых свободных COOH- и NH₂-групп, поскольку абсолютное их большинство находится в связанном состоянии, участвуя в образовании пептидных связей; титрованию доступны в основном свободные COOH- и NH₂-группы у C- и N-концевых аминокислот пептида.

2. В процессе кислотного или щелочного гидролиза белка образуется стехиометрическое количество титруемых COOH- и NH₂-групп, что свидетельствует о распаде определенного числа пептидных связей.

3. Под действием протеолитических ферментов (протеиназ) белки расщепляются на строго определенные фрагменты, называемые полипептидами, с концевыми аминокислотами, соответствующими избирательности действия протеиназ. Структура некоторых таких фрагментов неполного гидролиза доказана последующим химическим их синтезом.

¹ Синтез полипептидов (белков) в клетках живых организмов протекает значительно сложнее с участием нуклеиновых кислот, и этот процесс детально рассматривается в главе 13.

4. Биуретовую реакцию (сине-фиолетовое окрашивание в присутствии раствора сульфата меди в щелочной среде) дают как биурет, содержащий пептидную связь, так и белки, что также является доказательством наличия в белках аналогичных связей.

5. Анализ рентгенограмм кристаллов белков подтверждает полипептидную структуру белков. Таким образом, рентгеноструктурный анализ при разрешении 0,15–0,2 нм позволяет «увидеть» картину расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи и пространственную ее ориентацию (конформацию).

6. Существенным подтверждением полипептидной теории строения белка является возможность синтеза чисто химическими методами полипептидов и белков с уже известным строением: инсулина — 51 аминокислотный остаток, лизоцима — 121 аминокислотный остаток, рибонуклеазы — 124 аминокислотных остатка¹. Синтезированные белки обладают биологической активностью и физико-химическими свойствами, аналогичными таковым природных белков.

Поскольку пептидные связи играют исключительную роль как в «архитектуре», так и в функции белков, следует указать на некоторые особенности строения полипептидной цепи. Во-первых, это касается своеобразия расположения атомов углерода и азота, находящихся примерно в одной плоскости, и атомов водорода и радикалов, направленных к этой плоскости под углом 109°28'. Во-вторых, это относится к своеобразию пептидной связи. Расстояние между атомами С и N в пептидной связи (равное 0,132 нм) является промежуточным между простой (одинарной) связью (связью —С—N—, равной 0,147 нм) и двойной связью (связью —С=N—, равной 0,125 нм), что создает предпосылки для осуществления таутомерных превращений. Наконец, следует указать на своеобразие радикалов, которые являются полифункциональными и, как было указано выше, определяют и структуру (пространственную), и многообразие функций молекул белка.

Выяснив в деталях способы связей между отдельными аминокислотами в полипептидной цепи, мы подходим вплотную к проблеме структуры белка. Получили подтверждение представления К. Линдерстрёма—Ланга о существовании четырех уровней структурной организации белковой молекулы: первичной, вторичной, третичной и четвертичной структуры. Техника белковой химии разработана настолько хорошо, что позволяет в принципе расшифровать структурную организацию любого белка.

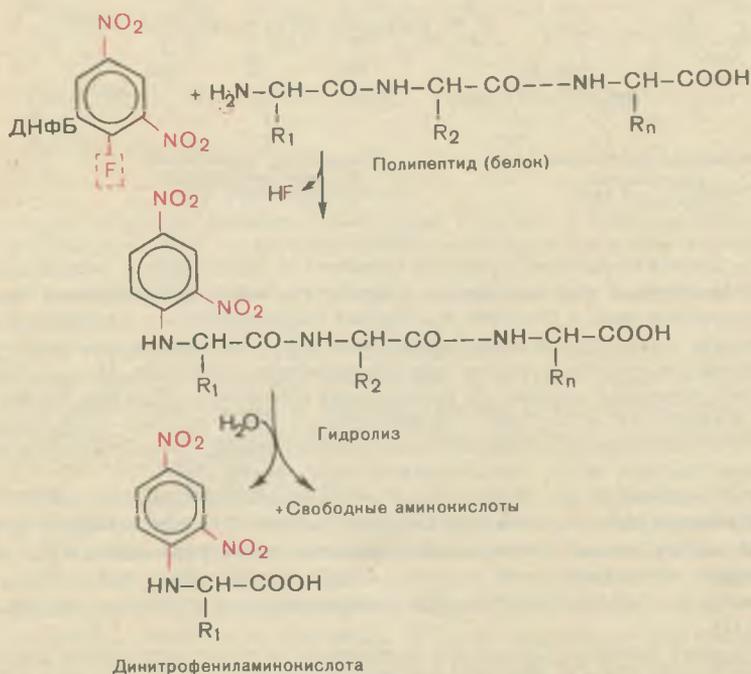
Первичная структура белка

К настоящему времени расшифрована первичная структура около 2500 разных белков, что является несомненным достижением биохимии. Однако это число ничтожно мало, если учесть, что в природе имеется около 10^{12} разнообразных белков. Под первичной структурой подразумевают порядок, последовательность расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Зная первичную структуру, можно точно написать структурную формулу белковой молекулы, если она представлена одной полипептидной цепью. Если в состав белка входит несколько полипептидных цепей, то задача определения первичной структуры несколько сложнее, так как необходимо предварительное разъединение этих цепей. Ниже представлена последовательность операций при определении первичной структуры отдельной, химически гомогенной полипептидной цепи.

¹ Полный синтез рибонуклеазы осуществлен одновременно и независимо друг от друга Б. Меррифилом и Р. Хиршманом. Этот метод реализован в автоматическом синтезаторе пептидов.

В первую очередь для небольшой части белка выясняют аминокислотный состав, точнее, соотношение каждой из 20 аминокислот в образце гомогенного белка. Эту процедуру осуществляют методами гидролиза, затем приступают к определению природы концевых аминокислот полипептидной цепи, содержащей одну свободную NH_2 -группу и одну свободную COOH -группу.

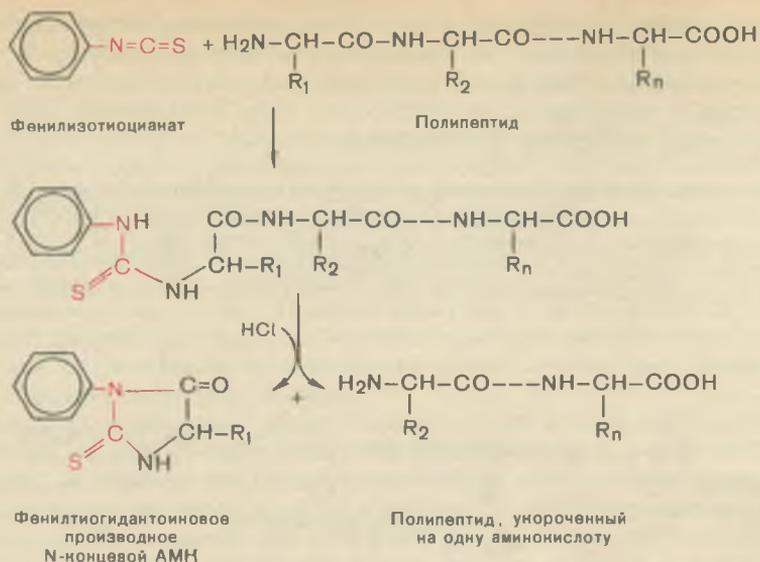
Для определения природы N-концевой аминокислоты предложен ряд методов, в частности метод Сэнгера (F. Sanger), основанный на реакции арилирования полипептида 1-фтор-2,4-динитробензолом (ФДНБ), что приводит к образованию окрашенного в желтый цвет 2,4-динитрофенильного производного N-концевой аминокислоты¹. Раствор полипептида обрабатывают ФДНБ, который взаимодействует со свободной H_2 -группой N-концевой аминокислоты пептида.



После кислотного гидролиза продукта реакции — динитрофенилпептида N-концевая аминокислота окажется связанной с реактивом в виде 2,4-динитрофениламинокислоты (стабильной при гидролизе). В отличие от других свободных аминокислот она желтого цвета. Ее идентифицируют методом хроматографии.

Значительно большее распространение для определения N-концевой аминокислоты получил фенилтиогидаптоиновый метод Эдмана благодаря своей высокой чувствительности и возможности многократного применения в одной и той же пробе. Фенилизотиоцианат реагирует со свободной α - NH_2 -группой N-концевой аминокислоты полипептида с образованием фенилтиокарбамоилпептида.

¹ За разработку этого метода Ф. Сэнгер был удостоен Нобелевской премии (1958). В 1980 г. он был удостоен второй раз Нобелевской премии вместе с У. Гилбертом и П. Бергом за разработку метода определения первичной структуры нуклеиновых кислот.



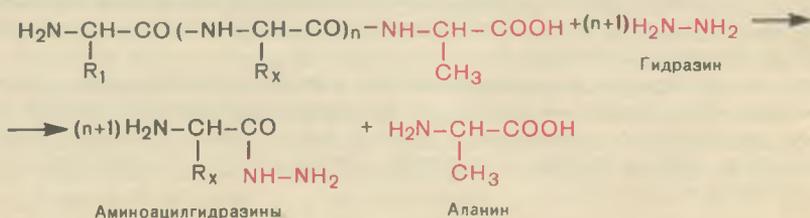
Обработка продукта реакции кислотой приводит к циклизации и освобождению фенилтиогидантоина N-концевой аминокислоты, природу которого устанавливают хроматографически, и формированию новой (второй) N-концевой аминокислоты у полипептида.

Эту процедуру ступенчатого расщепления пептида с N-конца можно повторять многократно, идентифицируя последовательно одну аминокислоту за другой. Метод Эдмана используется в качестве химической основы для определения первичной структуры белков и пептидов; он реализован в специальном приборе — секвенаторе (от англ. sequence — последовательность), работающем в автоматическом режиме и позволяющем определить последовательность аминокислот с N-конца пептида до 50–60 аминокислотных остатков.

Кроме этих реактивов, для определения чередования аминокислот используют цианат калия и 1-диметиламинафтил-5-сульфонилхлорид (дансил). Для этих же целей иногда используют ферменты экзопептидазы, в частности аланин- и лейцинаминопептидазы, которые осуществляют разрыв пептидной связи с того конца полипептида, где имеется свободная NH_2 -группа, вызывая освобождение N-концевой аминокислоты (механизм действия экзопептидаз; см. главу 11).

Для определения природы C-концевой аминокислоты часто используют ферментативные методы. Обработка полипептида карбоксипептидазой, которая осуществляет разрыв пептидной связи с того конца пептида, где содержится свободная COOH -группа, приводит к освобождению C-концевой аминокислоты, природа которой может быть идентифицирована методом хроматографии.

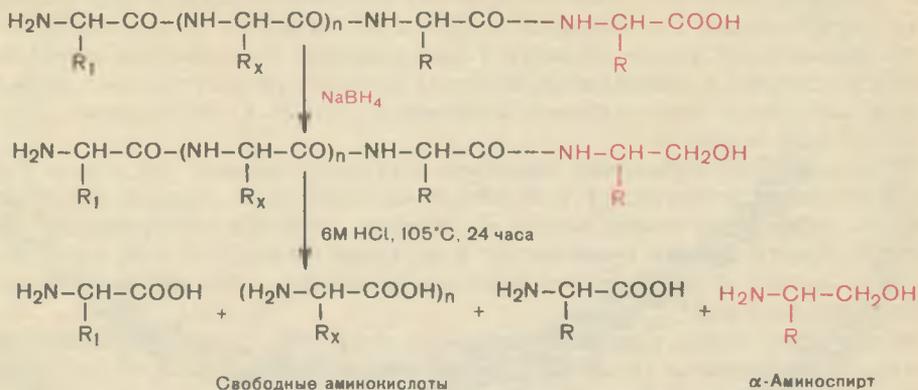
Предложен также химический метод Акабори (S. Akabori), который основан на гидразинолизе полипептида:



Гидразин, вызывая распад чувствительных к нему пептидных связей полипептида, реагирует со всеми аминокислотами, за исключением C-концевой аминокислоты, поскольку ее карбоксильная группа не участвует в образовании пептидной связи. При этом образуется смесь аминоацилгидразинов и свободной C-концевой аминокислоты. Последнюю после обра-

ботки всей смеси ФДНБ отделяют и идентифицируют хроматографически, для чего образовавшиеся динитрофенилпроизводные ацилгидразинов предварительно экстрагируют уксусноэтиловым эфиром.

С-концевую аминокислоту идентифицируют также путем обработки полипептида восстанавливающим агентом, например боргидридом натрия. В простейшей форме эту процедуру можно представить в следующем виде:



Видно, что в указанных условиях только одна, а именно С-концевая аминокислота будет превращаться в α -аминоспирт, легко идентифицируемый методом хроматографии.

Таким образом, при помощи указанных выше методов определяют N- и С-концевые аминокислоты.

Следующий этап работы связан с определением чередования (последовательности) аминокислот внутри полипептидной цепи. Для этого сначала проводят избирательный, частичный (химический и ферментативный) гидролиз полипептидной цепи на короткие пептиды (олигопептиды), последовательность аминокислот в которых может быть точно определена.

Химические методы избирательного и неполного гидролиза основаны на применении таких химических реактивов, которые вызывают селективный распад пептидных связей, образованных определенными аминокислотами, оставляя незатронутыми остальные пептидные связи. К этим избирательно гидролизующим веществам относятся бромциан (по остаткам метионина), гидроксиламин (по связям между остатками аспарагиновой кислоты и глицина), N-бромсукцинимид (по остаткам триптофана). Поскольку метионина в составе белков содержится обычно меньше, чем других аминокислот, обработка бромцианом предпочтительнее, так как при этом образуется небольшое количество пептидов, первичную структуру которых определяют по описанным выше методам, всякий раз начиная с определения природы N- и С-концевых аминокислот.

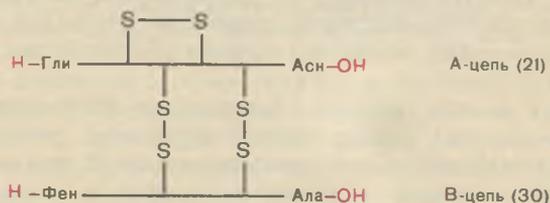
Ферментативные методы гидролиза основаны на избирательности действия протеолитических (вызывающих распад белков) ферментов, расщепляющих пептидные связи, образованные определенными аминокислотами. В частности, пепсин ускоряет гидролиз связей, образованных остатками фенилаланина, тирозина и глутаминовой кислоты, трипсин — аргинина и лизина, химотрипсин — триптофана, тирозина и фенилаланина. Ряд других ферментов, например папаин, субтилизин, проназа и другие бактериальные протеиназы, также используются для осуществления неполного гидролиза белка. В результате полипептидная цепь расщепляется на мелкие пептиды (содержащие иногда всего несколько аминокислот), которые отделяют друг от друга сочетанными электрофоретическими и хроматографическими методами, получая своеобразные пептидные карты. Далее определяется чередование аминокислот в каждом индивидуальном пептиде. Завершается работа воссозданием первичной структуры полной полипептидной цепи на основании определения последовательности аминокислот в отдельных пептидах.

Метод составления пептидных карт, получивший образное название «отпечатков пальцев», используется при определении сходства или различия гомологических белков по первичной структуре. Белок инкубируют с каким-либо протеолитическим ферментом. Часто порции белка инкубируют как с пепсином, так и с трипсином. При этом вследствие гидролиза строго определенных пептидных связей образуется смесь коротких пептидов, легко разделяемых методом хроматографии в одном направлении и методом электрофореза в другом под углом 90° от первого (пептидная карта). Дальнейшая задача сводится к установлению последовательности расположения аминокислот в каждом из выделенных пептидов (фенилтиогидантоиновым или другими методами), сопоставлению полученных данных и установлению первичной структуры всей молекулы.

О возможности применения рентгеноструктурного анализа для определения последовательности аминокислот в белковой молекуле было сказано выше. Укажем также на совершенно новый подход к решению этой важной проблемы — определение последовательности аминокислот в белковой молекуле с использованием для этой цели данных о нуклеотидной последовательности кодонов в матричных рибонуклеиновых кислотах¹.

В настоящее время выяснение первичной структуры белков является вопросом времени и технического оснащения лабораторий. Полностью выяснена первичная структура многих природных белков. Первым из них был инсулин, содержащий 51 аминокислотный остаток (Сэнгер, 1954). Самым крупным белком с выясненной первичной структурой был иммуноглобулин, в четырех полипептидных цепях которого насчитывается 1300 аминокислотных остатков. За эту работу Дж. Эдельман и Р. Портер были удостоены Нобелевской премии (1972).

Расшифрованы первичные структуры миоглобина человека (153 аминокислотных остатка), α -цепи (141) и β -цепи (146) гемоглобина человека, цитохрома *c* из сердечной мышцы человека (104), лизоцима молока человека (130), химотрипсиногена быка (245) и многих других белков, в том числе ферментов и токсинов. На рис. 1.14 представлена последовательность аминокислотных остатков проинсулина. Видно, что молекула инсулина (выделена темными кружками), состоящая из двух цепей (А—21 и В—30 аминокислотных остатков), образуется из своего предшественника — проинсулина (84 аминокислотных остатка), представленного одной полипептидной цепью, после отщепления от него пептида, состоящего из 33 аминокислотных остатков. Строение молекулы инсулина (51 аминокислотный остаток) схематически можно представить следующим образом:



Между цепями А и В и внутри А-цепи инсулина образуются дисульфидные ($-S-S-$) связи. Выяснена первичная структура более 18 инсулинов, выделенных из разных источников. Близкими по первичной структуре оказались инсулины из поджелудочной железы человека, свиньи и кашалота. Единственным отличием инсулина человека является нахождение треонина в положении 30 В-цепи вместо аланина.

¹ Описана первичная структура многих белков, ферментов, в частности репликазы фага MS2 (544 аминокислотных остатков), установленная этим методическим приемом.

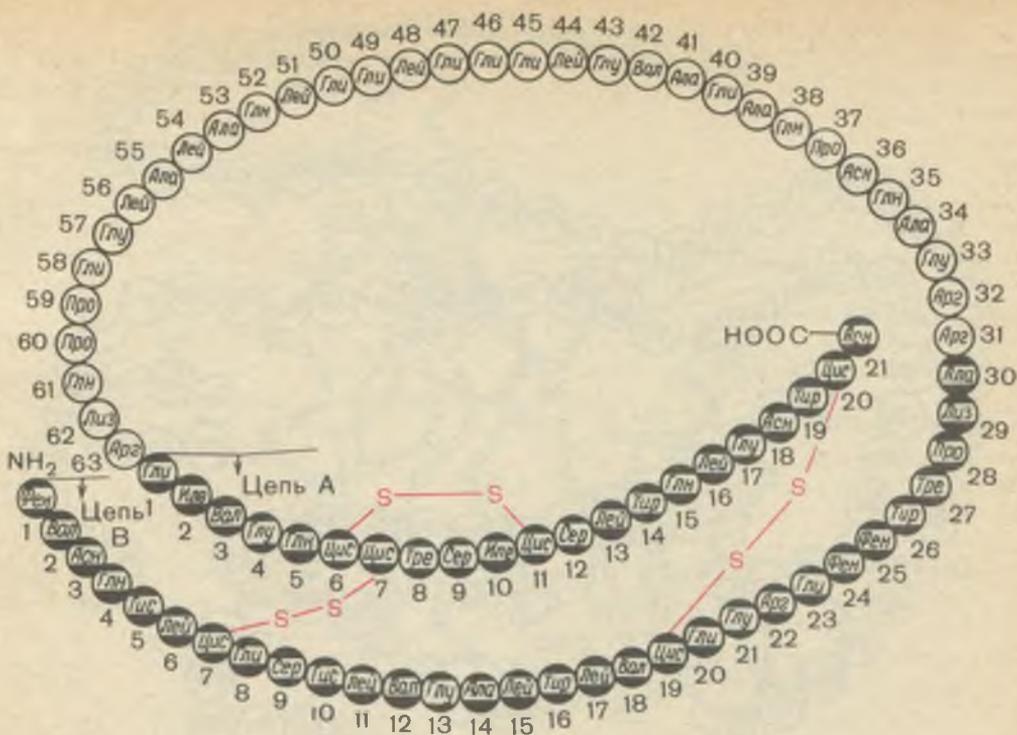


Рис. 1.14. Структура проинсулина.

Вторым белком, первичная структура которого расшифрована С. Муром и У. Стейном, является рибонуклеаза (рис. 1.15) из поджелудочной железы, катализирующая расщепление РНК. Фермент состоит из 124 аминокислотных остатков с N-концевым лизином и C-концевым валином; между остатками цистеина образуются дисульфидные ($-S-S-$) связи в четырех участках.

Полностью расшифрована последовательность аминокислот полипептидной цепи фермента лизоцима, имеющего важное защитное и медицинское значение, так как он вызывает лизис ряда бактерий, расщепляя основное вещество их клеточной оболочки. Лизоцим белка куриного яйца содержит 129 аминокислот (рис. 1.16) с N-концевым лизином и C-концевым лейцином.

В нашей стране установлена первичная структура многих белков и полипептидов, в том числе крупного белка РНК-полимеразы (в частности, последовательности ее β - и β' -субъединиц, 1342 и 1407 аминокислотных остатков соответственно¹, фактора элонгации G из *E. coli* (701 аминокислота) (Ю. А. Овчинников и др.), фермента — аспаратаминотрансферазы, состоящей из 412 аминокислотных остатков (А. Е. Браунштейн, Ю. А. Овчинников и др.), леггемоглобина, белка L25 из рибосом *E. coli*, нейротоксинов из яда кобры (Ю. А. Овчинников и др.), пепсиногена и пепсина (В. М. Степанов и др.), α -липотропина и лактогенного гормона быка (Н. А. Юдаев, Ю. А. Панков) и др.

Исследования первичной структуры α - и β -цепей гемоглобина способствовали выяснению структуры необычных, так называемых аномальных гемоглобинов, встре-

¹ Следует указать, что в молекуле ДНК-зависимой РНК-полимеразы содержатся, помимо указанных β - и β' -, также α - и α' -субъединицы и σ -фактор, первичная структура которых пока не расшифрована, хотя известно общее количество аминокислот (~ 5000), входящих в состав этого гигантского белка.

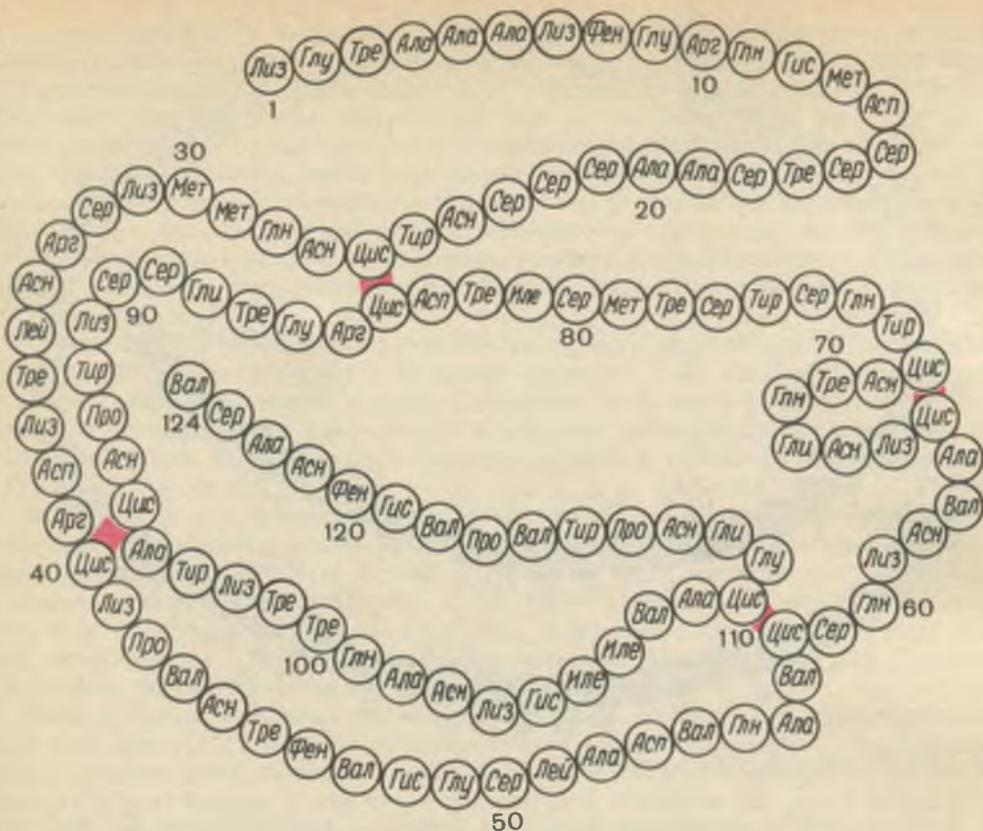


Рис. 1.15. Первичная структура РНКазы. Цветом выделены четыре дисульфидные связи.

чающихся в крови больных гемоглобинопатиями. Иногда развитие болезни, как и изменение пространственной структуры гемоглобина человека, обусловлено заменой лишь одной какой-либо аминокислоты в структуре β -цепей (реже α -цепей) гемоглобина (см. главу 2).

Анализ данных по первичной структуре белков позволяет сделать следующие общие выводы.

1. Стабильность первичной структуры обеспечивается в основном главновалентными пептидными связями; возможно участие и небольшого числа дисульфидных связей.

2. В полипептидной цепи могут быть обнаружены разнообразные комбинации аминокислот; в полипептидах относительно редки повторяющиеся последовательности.

3. Каждый индивидуальный гомогенный белок характеризуется уникальной первичной структурой; частота замены аминокислот приводит не только к структурным перестройкам, но и к изменениям физико-химических свойств и биологических функций.

4. В некоторых ферментах, обладающих близкими свойствами встречаются идентичные пептидные структуры (последовательности аминокислот), в особенности в областях их активных центров. Этот принцип структурного подобия наиболее типичен для ряда протеолитических ферментов — трипсина, химотрипсина и др. (см. главу 4).

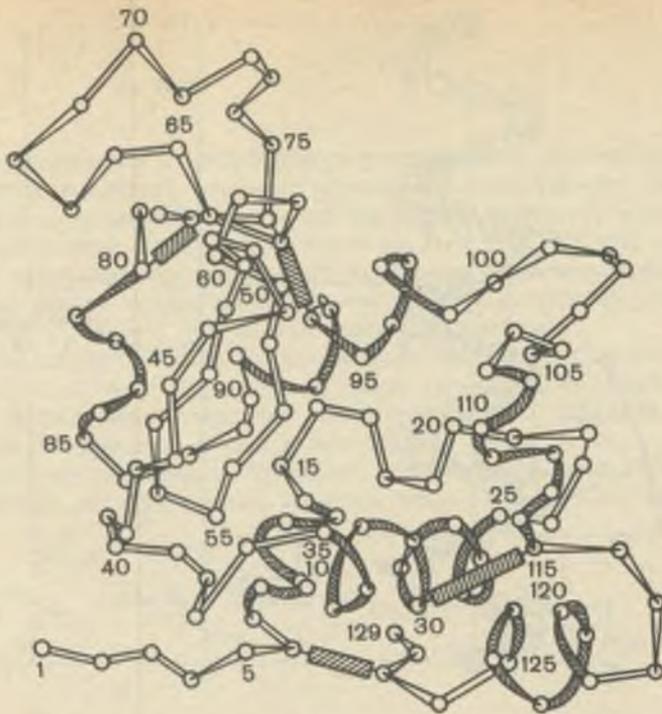


Рис. 1.16. Первичная структура полипептидной цепи лизоцима (схема).

Вторичная структура белка

Первые рентгенограммы белков, полученные еще в 30-х годах У. Астбюри, а затем Л. Полингом и Р. Кори, указывали на наличие в белках наряду с линейной полипептидной цепью также участков, определенным образом скрученных.

Под вторичной структурой белка подразумевают конфигурацию полипептидной цепи, т. е. способ свертывания, скручивания (складывания, упаковки) полипептидной цепи в спиральную или какую-либо другую конформацию. Процесс этот протекает не хаотично, а в соответствии с программой, заложенной в первичной структуре. Подробно изучены две основные конфигурации полипептидных цепей, отвечающих структурным требованиям и экспериментальным данным: α -спирали и β -структуры.

Благодаря исследованиям Л. Полинга¹ наиболее вероятным типом строения глобулярных белков принято считать α -спираль, модель и схема которой представлены на рис. 1.17. Закручивание полипептидной цепи происходит по часовой стрелке (правый ход спирали), что обусловлено L-аминокислотным составом природных белков. Движущей силой в возникновении α -спиралей (так же как и β -структур) является способность аминокислот к образованию водородных связей. В структуре α -спиралей открыт ряд закономерностей. На каждый виток (шаг) спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка. Шаг спирали (расстояние вдоль оси) равен 0,54 нм на виток, а на один аминокислотный остаток приходится 0,15 нм. Угол подъема спирали равен 26° ; через 5 витков спирали (18 аминокислотных остатков) структурная кон-

¹ За открытие тонкой структуры белков при помощи рентгеноструктурного анализа нативных белков и синтезированных полипептидов Л. Полинг удостоен Нобелевской премии (1954).

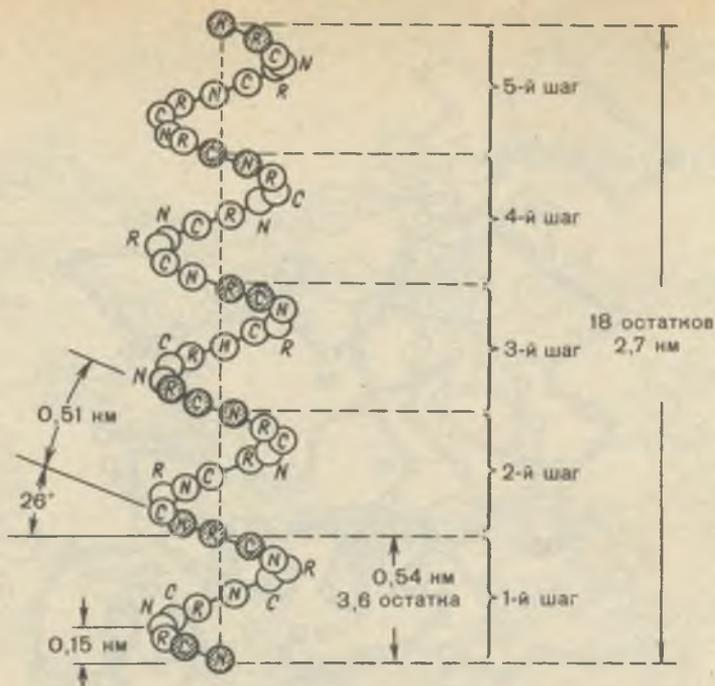


Рис. 1.17. Структура и параметры α -спирали.

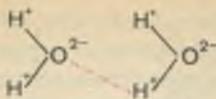
фигурация полипептидной цепи повторяется. Это означает, что период повторяемости (или идентичности) α -спиральной структуры составляет 2,7 нм.

Для каждого белка характерна определенная степень спирализации его полипептидной цепи. Степень спирализации устанавливают путем измерения удельного вращения плоскости поляризованного света. Изменение последнего находится в прямой зависимости от степени спирализации белковой молекулы. Не все глобулярные белки спирализованы на всем протяжении полипептидной цепи. В молекуле белка α -спиральные участки чередуются с линейными. В частности, если α - и β -цепи гемоглобина спирализованы, например, на 75%, то лизоцим — на 42%, а пепсин — всего на 30%.

Таким образом, стабильность вторичной структуры в основном обеспечивается водородными связями (определенный вклад вносят и главновалентные связи — пептидные и дисульфидные). Что же представляют собой водородные связи?

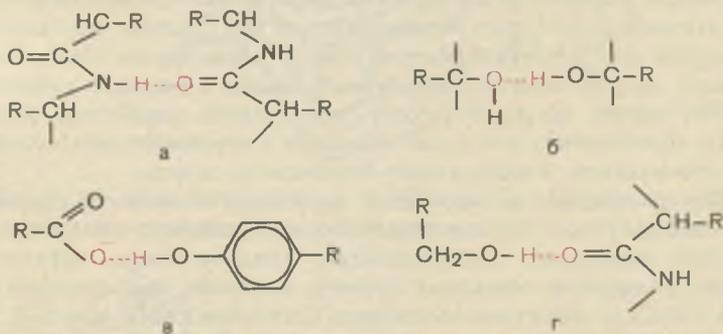
По современным представлениям, водородная связь включает не только электростатические силы притяжения между полярными группами (взаимодействие атомов водорода с электроотрицательными элементами: кислородом, азотом, хлором), но и электронные связи такого же типа, как в ряде комплексных соединений. Водородные связи, являясь нековалентными, отличаются малой прочностью. Так, если для разрыва химических межатомных связей необходимо затратить от 84 до 8400 кДж, то для разрыва одной водородной связи требуется затратить всего лишь 6,3 кДж на 1 моль. Однако, поскольку в белковой молекуле число водородных связей очень велико, они в сумме обеспечивают скручивание полипептидной цепи в спиральную структуру, сообщая ей компактность и жесткость.

Механизм возникновения водородных связей в элементарной форме может быть представлен на примере взаимодействия двух молекул воды (диполи). В диполе воды, как известно, избыток положительных зарядов связан с атомами водорода, а избыток отрицательных — с атомом кислорода.



Благодаря особенностям строения атома водорода при достаточном сближении двух молекул воды возникает электростатическое взаимодействие между атомом кислорода одной молекулы и атомом водорода второй молекулы воды. Следствием этого является ослабление связи между атомами Н и О в каждой молекуле воды и соответственно возникновение новой, непрочной связи (отмечена пунктиром) между атомом водорода первой молекулы и атомом кислорода второй молекулы воды. Эту непрочную связь принято обозначать водородной связью.

В белковой молекуле наиболее важные водородные связи образуются между ковалентно связанным атомом водорода, несущим частичный положительный заряд, и отрицательно заряженным ковалентно связанным атомом кислорода. Ниже представлены примеры водородных связей в белковой молекуле между: а) пептидными цепями; б) двумя гидроксильными группами; в) ионизированной COOH -группой и OH -группой тирозина; г) OH -группой серина и пептидной связью.



В зависимости от химической природы атома-акцептора водородные связи отличаются друг от друга степенью прочности. О количестве водородных связей в белковой молекуле судят по данным изотопного метода, в частности по времени обмена атомов водорода, участвующих в образовании водородной связи, на дейтерий (при обработке белка тяжелой водой D_2O , в которой вместо обычного водорода содержится его тяжелый изотоп — дейтерий).

Другой тип конфигурации полипептидных цепей, обнаруженный в белках волос, шелка, мышц и других фибриллярных белках, получил название β -структуры. В этом случае две или более линейные полипептидные цепи, расположенные параллельно, прочно связываются водородными связями, образуя структуру типа складчатого слоя (рис. 1.18).

В природе существуют белки, строение которых, однако, не соответствует ни β -, ни α -структурам. Типичным примером таких белков является коллаген — фибриллярный белок, составляющий основную массу соединительной ткани в организме человека и животных (см. главу 20).

Методами рентгеноструктурного анализа в настоящее время доказано существование еще двух уровней структурной организации

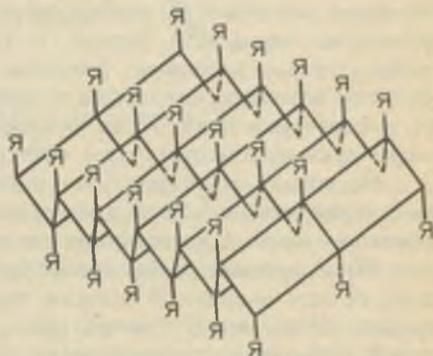


Рис. 1.18. β -Структура полипептидных цепей.

белковой молекулы, оказавшихся промежуточными между вторичной и третичной структурами. Это так называемые надвторичные структуры и структурные домены. Первые представляют собой агрегаты полипептидных цепей, обладающих собственной вторичной структурой и образующихся в некоторых белках в результате их термодинамической или кинетической стабильности. Так, в глобулярных белках открыты ($\beta\alpha\beta$)-элементы (представленные двумя параллельными β -цепями, связанными сегментом α), $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -элементы (представленные двумя сегментами α -спирали, вставленными между тремя параллельными β -цепями) и др. В глобулярных белках иногда содержатся неодинаковые структурные домены, выполняющие разные функции, как и однотипные домены в пределах одного мономерного белка, образующиеся, вероятнее всего, как результат влияния генов в первом случае или дупликации генов, во втором.

Третичная структура белка

Под третичной структурой белка подразумевают пространственную ориентацию полипептидной спирали или способ укладки полипептидной цепи в определенном объеме. Поскольку ни первичная структура, ни типы спиралей или сочетания спиральных и линейных участков полипептидной цепи не дают представления об объеме, форме полипептидной цепи, перед исследователем всегда стоит необходимость определения трехмерной или пространственной конфигурации белка. Основную роль в решении этих задач сыграл рентгеноструктурный анализ с высокой разрешающей способностью. Этот метод успешно решает две главные проблемы химии белков: закономерности чередования, последовательности аминокислотных остатков в полипептиде и закономерности конфигурации белковой молекулы.

Межатомные расстояния в молекулах органических веществ составляют 0,1–0,2 нм, а максимальная разрешающая способность современных аппаратов равна 0,2 нм. Это не позволяет установить местоположение каждого атома, хотя вполне могут быть различимы отдельные сочетания атомов, особенно при введении в молекулу белков атомов тяжелых металлов (последние благодаря своей высокой электронной плотности используются в качестве точек отсчета при математической обработке рентгенограмм).

Первым белком, третичная структура которого была выяснена Дж. Кендрию на основании рентгеноструктурного анализа, явился миоглобин кашалота. Это сравнительно небольшой белок с молекулярной массой 16 700, содержащий 153 аминокислотных остатка (полностью выяснена первичная структура), представленный одной полипептидной цепью. Основная функция миоглобина — перенос кислорода в мышцах. Как видно из приведенной модели (рис. 1.19), полипептидная цепь миоглобина представлена в виде изогнутой трубки, компактно уложенной вокруг обозначенного красным цветом гема (небелкового компонента, содержащего железо; см. главу 2).

На протяжении последних четырех десятилетий в связи с повышением разрешающей способности рентгеноструктурного метода была расшифрована третичная структура около 250 белков, в том числе гемоглобина, пепсина, химотрипсина, рибонуклеазы, лизоцима, трипсина и его ингибитора, ряда фрагментов иммуноглобулинов человека, цитохрома с карбоангидразы человека, аспартатаминотрансферазы (в лаборатории акад. А. Е. Браунштейна), инсулина и многих других белков. Примеры трехмерной структуры некоторых из них представлены на рис. 1.20.

Поскольку рентгеноструктурный анализ позволяет определить конформацию и ход полипептидной цепи в пространстве, для каждого белка может быть построена объемная модель, отражающая местоположение линейных и спирализованных участков. При изучении глобулярных белков было показано, что пространственная структура белков в сильной степени зависит от ряда факторов, в частности от ионной силы и рН раствора, температуры и т. д. Новейшие методы дифракции рентгеновских лучей позволили расшифровать кристаллическую структуру около 60 ферментов.

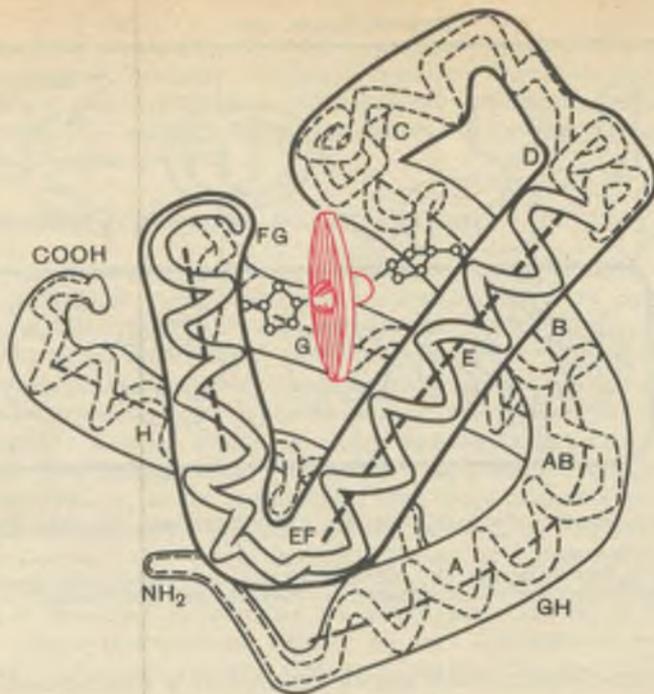


Рис. 1.19. Модель третичной структуры молекулы миоглобина (по Кендрью). Латинскими буквами обозначены структурные домены.

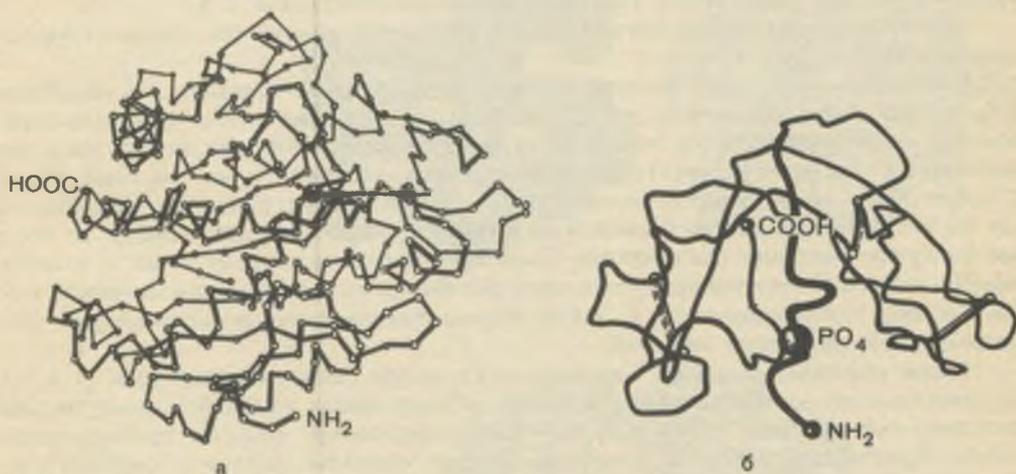


Рис. 1.20. Пространственная конфигурация некоторых ферментов.
а – карбоксипептидаза А; б – рибонуклеаза.

Для выяснения трехмерной структуры белков успешно применяются в последнее время также методы низкотемпературной вычислительной техники и математические методы определения объемной структуры на основании данных последовательностей аминокислот.

Какие силы стабилизируют третичную структуру белка? В настоящее время получены бесспорные доказательства, что в стабилизации пространственной струк-

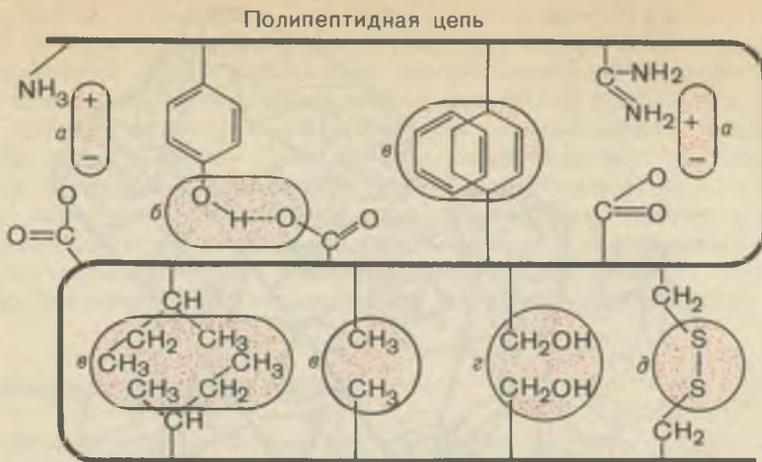


Рис. 1.21. Типы нековалентных связей, стабилизирующих третичную структуру белка.

а — электростатическое взаимодействие; б — водородная связь; в — гидрофобные взаимодействия неполярных групп; г — диполь-дипольные взаимодействия; д — дисульфидная (ковалентная) связь.

туры белков, помимо ковалентных связей (пептидные и дисульфидные связи), основную роль играют так называемые нековалентные связи. К этим связям относятся: водородные связи, электростатические взаимодействия заряженных групп, межмолекулярные ван-дер-ваальсовы силы, взаимодействия неполярных боковых радикалов аминокислот, так называемые гидрофобные взаимодействия и т. д.

Некоторые типы нековалентных связей, стабилизирующих третичную структуру, представлены на рис. 1.21.

По современным представлениям, третичная структура белка, после завершения его синтеза в рибосомах (см. главу 13), формируется совершенно автоматически и полностью предопределяется первичной структурой. Основной движущей силой в возникновении трехмерной структуры является взаимодействие радикалов аминокислот с молекулами воды. При этом неполярные гидрофобные радикалы аминокислот как бы погружаются внутрь белковой молекулы, образуя там сухие зоны, в то время как полярные радикалы оказываются ориентированными в сторону воды. В какой-то момент возникает термодинамически наиболее выгодная конформация молекулы в целом, и она стабилизируется. В такой форме белковая молекула характеризуется минимальной свободной энергией.

Таким образом, линейная, одномерная структура полипептидной цепи (т. е. последовательность аминокислотных остатков, обусловленная кодом белкового синтеза) наделена информацией другого типа — конформационной, которая предопределяет собой образование белковой молекулы строго заданной формы с определенным пространственным расположением отдельных ее частей. Другими словами, третичная, объемная структура белковой молекулы детерминирована аминокислотной последовательностью полипептидной цепи, а более конкретно — размером, формой и полярностью радикалов аминокислотных остатков. Эти представления могут служить основой для предсказания конформации белковой молекулы на основании аминокислотной последовательности.

В свою очередь трехмерная структура белковой молекулы также содержит информацию, но уже совершенно нового типа, а именно функциональную, которую акад. В. А. Энгельгардт назвал интрамолекулярной информацией. Как будет показано ниже, все биологические свойства белков (каталитические, гормональные, анти-

генные и др.) связаны с сохранностью их третичной структуры, которую принято называть нативной конформацией. Любые воздействия (термические, физико-химические), приводящие к нарушению этой конформации молекулы (разрыв водородных и других нековалентных связей), сопровождаются частичной или полной потерей белком его биологических свойств.

Четвертичная структура белка

Под четвертичной структурой подразумевают способ укладки в пространстве отдельных полипептидных цепей, обладающих одинаковой (или разной) первичной, вторичной и третичной структурой, и формирование единого в структурном и функциональном отношении макромолекулярного образования. Многие функциональные белки состоят из нескольких полипептидных цепей, соединенных не главновалентными связями, а нековалентными (аналогичными тем, которые обеспечивают стабильность третичной структуры). Каждая отдельно взятая полипептидная цепь, получившая название протомера (или субъединицы), чаще всего не обладает биологической активностью. Эту способность белок приобретает при определенном способе пространственного объединения входящих в его состав протомеров. Образовавшуюся молекулу принято называть олигомером (или мультимером). Олигомерные белки чаще построены из четного числа протомеров (от 2 до 4, реже от 6 до 8, 10, 12 и т. д.) с молекулярными массами в пределах от нескольких тысяч до 100 000 дальтон. В частности, молекула гемоглобина состоит из двух одинаковых α - и двух β -полипептидных цепей, т. е. представляет собой тетрамер. На рис. 1.22 представлены

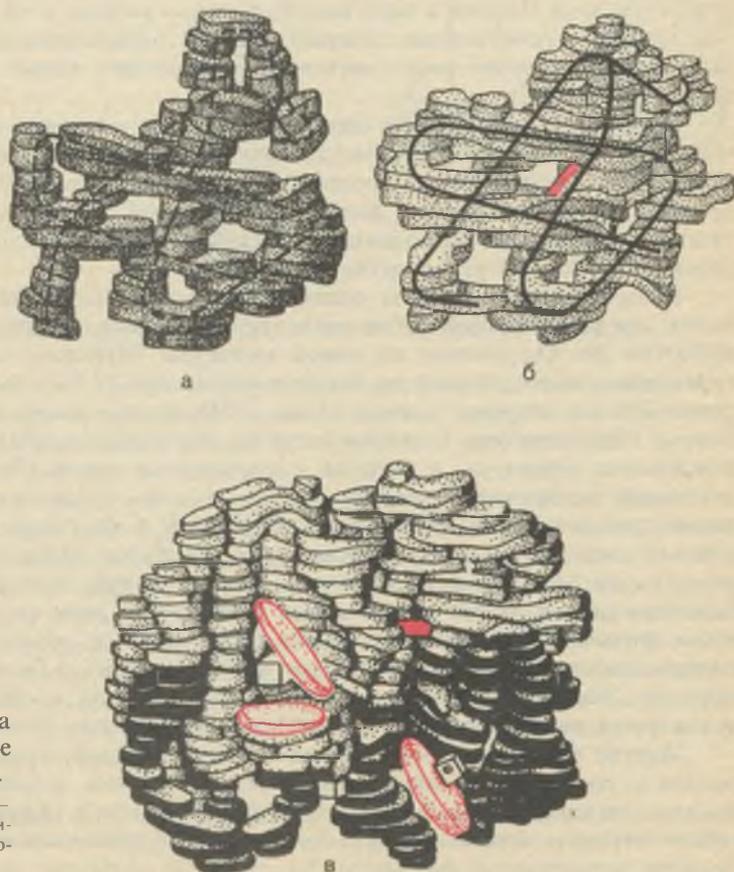


Рис. 1.22. Структура гемоглобина (красные диски — группы гема).

Модели субъединиц; а — β -цепи; б — α -цепи; в — олигомерная молекула гемоглобина.

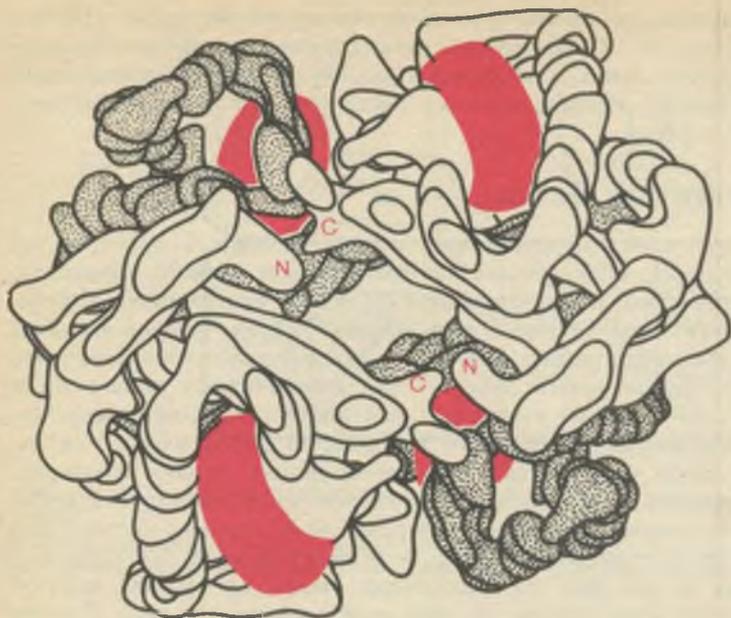


Рис. 1.23. Модель гемоглобина (по Перутцу).

α -Цепи — светлые; β -цепи — темные; группы гема — красные.

структуры α - и β -цепей и всей молекулы гемоглобина, а на рис. 1.23 хорошо видно, что молекула гемоглобина содержит четыре полипептидные цепи, каждая из которых окружает группу гема (пигмента, придающего крови ее характерный красный цвет; см. главу 2).

В определенных условиях (присутствие солей, мочевины или резкие изменения pH) молекула гемоглобина обратимо диссоциирует на две α - и две β -цепи. Эта диссоциация обусловлена разрывом водородных связей. После удаления солей или мочевины происходит автоматическая ассоциация исходной молекулы гемоглобина. Схематически эта обратимая диссоциация молекулы гемоглобина представлена на рис. 1.24, заимствованном из руководства В. Л. Кретовича.

Классическим примером олигомерной молекулы является вирус табачной мозаики, представляющий собой гигантскую молекулу с молекулярной массой около 40 000 000 Да. Он состоит из одной молекулы РНК (см. главу 3) и 2130 белковых субъединиц, масса каждой из которых составляет 17 500 Да. Длина вируса примерно равна 300 нм, ширина — около 17 нм. РНК вируса имеет спиралеобразную форму. Вокруг РНК нанизаны белковые частицы, образующие гигантскую надмолекулярную спиральную структуру, в которой насчитывается около 130 витков (рис. 1.25). Удивительной особенностью вируса является то, что после разъединения соответствующими приемами (добавление детергента) РНК и белковых субъединиц и последующего их смешивания (с предварительным удалением детергента) наблюдается полная регенерация четвертичной структуры, восстановление всех физических параметров и биологических функций (инфективная способность вируса). Подобная точность процесса спонтанной самосборки вируса обеспечивается, вероятнее всего, информацией, содержащейся в первичной структуре молекулы РНК и белковых субъединиц. Таким образом, последовательность аминокислот содержит в себе информацию, которая реализуется на всех уровнях структурной организации белков.

Многие ферменты также обладают четвертичной структурой, например фосфоорилаза а, состоящая из двух идентичных субъединиц, в каждой из которых имеется по две пептидные цепи. Вся молекула фосфоорилазы а, таким образом, представляет собой тетрамер. Отдельные субъединицы не обладают каталитической активностью. Вообще регуляторные ферменты (см. главу 4) обладают четвертичной олигомерной

Рис. 1.24. Обратимая диссоциация молекулы гемоглобина.

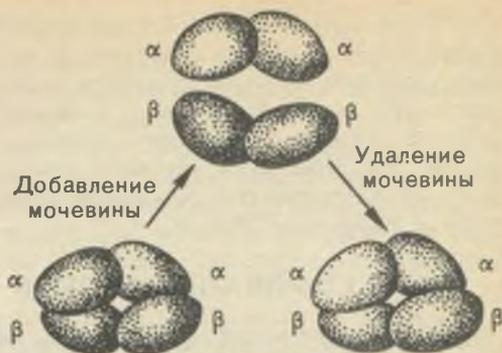
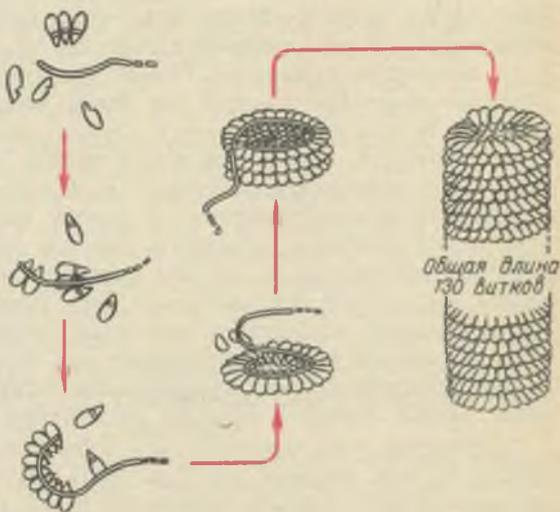


Рис. 1.25. Самосборка вируса табачной мозаики.



структурой. Они наделены функцией обеспечения в клетке требуемых скоростей химических реакций.

Наиболее изученным мультимерным ферментом является лактатдегидрогеназа (она катализирует обратимое превращение пировиноградной кислоты в молочную), содержащая два типа полипептидных цепей: Н — сердечный тип (от англ. heart — сердце) и М — мышечный тип (от англ. muscle — мышца) и состоящая из четырех субъединиц. Этот фермент благодаря различным сочетаниям субъединиц может существовать в пяти формах. Такие ферменты получили название изоферментов или в соответствии с новой классификацией множественных форм ферментов (см. главу 4).

К настоящему времени субъединичная структура обнаружена у нескольких сотен белков. Однако только для немногих белков, в том числе для молекулы гемоглобина, методом рентгеноструктурного анализа расшифрована четвертичная структура¹. Основными силами, стабилизирующими четвертичную структуру, являются нековалентные связи между контактными площадками протомеров, которые взаимодействуют друг с другом по типу комплементарности — универсальному принципу, свойственному живой природе.

¹ Установлена четвертичная структура ряда иммуноглобулинов, состоящих из легких и тяжелых полипептидных цепей, соединенных в отличие от других олигомерных белков дисульфидными связями.

Таким образом, имеются все основания для подтверждения мнения о существовании четырех уровней структурной организации белков. Более того, каждый индивидуальный белок характеризуется уникальной структурой, обеспечивающей уникальность его функций. Поэтому выяснение структуры разнообразных белков может служить ключом к познанию природы живых систем и соответственно сущности жизни. На этом пути научного поиска могут быть решены также многие проблемы наследственных заболеваний человека, в основе которых лежат дефекты структуры и биосинтеза белков.

КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

В настоящее время еще не разработана стройная система номенклатуры и классификации белков. Химия белков переживает период коренной ломки представлений по этим вопросам, и традиционная классификация белков на группы, основанная скорее на случайных показателях (физико-химических свойствах, форме молекул, локализации и происхождении, аминокислотном составе), уже не отвечает полностью возросшему уровню знаний в отношении их структуры и функций. Так как из огромного количества природных белков структура и функции расшифрованы для относительно небольшого числа (не более нескольких сотен) белков, то структура и функции белков пока не могут служить основой для их рациональной классификации. Пожалуй, только для одной группы белков, обладающих способностью катализировать химические реакции, т. е. ферментов, разработана стройная система номенклатуры и классификации, в основу которой положены типы катализируемых химических реакций и химическая природа реагирующих веществ. Однако полностью идентифицированные до сих пор ферменты также составляют незначительную долю белков (ферментов описано более двух тысяч). Поэтому функциональный принцип, рекомендуемый некоторыми авторами, очевидно, также не может служить универсальной основой для классификации всех белков. В частности, хорошо известен ряд белков, обладающих бифункциональной активностью (например, миозин, который наделен, кроме основной функции сокращения, также ферментативной активностью).

Учитывая необходимость для студента-медика основательно знать отдельные группы белков, которые могут служить предметом изучения в его будущей профессиональной деятельности (например, белки крови), ниже приводится старая классификация белков с краткой характеристикой новых данных по структуре, составу и свойствам отдельных представителей. Согласно этой классификации, обширный класс белковых веществ в зависимости от химического состава делят на простые и сложные белки¹.

Простые белки построены из аминокислот и при гидролизе распадаются соответственно только на аминокислоты. Сложные белки — это двухкомпонентные белки, которые состоят из какого-либо простого белка и небелкового компонента, называемого простетической группой. При гидролизе сложных белков, помимо свободных аминокислот, освобождаются небелковая часть или продукты ее распада.

Простые белки в свою очередь делятся на основании некоторых условно выбранных критериев на ряд подгрупп: протамины, гистоны, альбумины, глобулины, проламины, глютелины и др.

Классификация сложных белков основана на химической природе входящего в их состав небелкового компонента. В соответствии с этим различают: фосфопротеины (содержат фосфорную кислоту), хромопротеины (в состав их входят пигменты), нуклеопротеины (содержат нуклеиновые кислоты), гликопротеины (содержат углеводы), липопротеины содержат липиды и металлопротеины (содержат металлы).

¹ Деление белков на простые и сложные, по всей вероятности, является условным, поскольку многие традиционно рассматриваемые как простые белки (например, яичный альбумин) на самом деле оказываются сложными, так как содержат небелковый компонент, чаще всего углеводной или липидной природы или какой-либо металл (см. главу 2).

ХИМИЯ ПРОСТЫХ БЕЛКОВ

Протамины и гистоны. Данная группа белков отличается рядом характерных физико-химических свойств, своеобразием аминокислотного состава и представлена в основном белками с небольшой молекулярной массой. Протамины (группа простейших белков) обладают выраженными основными свойствами, обусловленными наличием в их составе от 60 до 85% аргинина; так, сальмин, выделенный из молок семги, состоит на 85% из аргинина. Высоким содержанием аргинина отличается другой хорошо изученный белок — клупеин, выделенный из молок сельди; из 30 аминокислот в нем на долю аргинина приходится 21 остаток. Расшифрована первичная структура клупеина.

Протамины хорошо растворимы в воде, изоэлектрическая точка их водных растворов находится в щелочной среде. По современным представлениям, протамины скорее всего являются пептидами, а не белками, поскольку их молекулярная масса не превышает 5000 дальтон. Они представляют белковый компонент в структуре нуклеопротеинов (сложных белков, содержащих ДНК).

Гистоны также являются белками основного характера, в состав которых входят лизин и аргинин. Основной характер этих белков менее выражен, поскольку содержание указанных аминокислот не превышает 20–30%; молекулярная масса их также несколько выше нижнего предела молекулярной массы белков. Эти белки в основном сосредоточены в ядрах клеток, в составе дезоксирибонуклеопротеинов, и играют важную роль в регуляции метаболической активности генома (см. главу 2).

Проламины и глютелины. Проламины и глютелины относятся к белкам растительного происхождения, отличающимся своеобразием аминокислотного состава и физико-химических свойств. В основном эти белки встречаются в семенах злаков (пшеница, рожь, ячмень и др.), составляя основную массу клейковины. Характерной особенностью проламинов является растворимость в 60–80% водном растворе этанола, в то время как все остальные белки в этих условиях обычно выпадают в осадок. Наиболее изучены оризенин (из риса), глютенин и глиадин (из пшеницы), зеин (из кукурузы), гордеин (из ячменя) и др. Установлено, что проламины содержат 20–25% глутаминовой кислоты и 10–15% пролина.

Альбумины и глобулины. Альбумины и глобулины относятся к белкам, широко распространенным в органах и тканях животных. Наиболее богаты этими белками сыворотка крови, молоко, яичный белок, мышцы и др. В плазме крови человека в норме содержится около 7% белков, представленных альбуминами и глобулинами. Альбумины и глобулины относятся к глобулярным белкам, различающимся по своей растворимости. В табл. 1.6 представлены критерии растворимости альбуминов и глобулинов.

Необходимо отметить, что само определение «альбумины» и «глобулины» основано на их растворимости в дистиллированной воде и полунасыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Однако, как показывают данные, приведенные в табл. 1.6, глобулины растворимы только в разбавленных солевых растворах, а во всех остальных случаях они нерастворимы. С другой стороны, в сыворотке крови имеются белки, относя-

Таблица 1.6. Некоторые свойства альбуминов и глобулинов

Растворитель	Альбумины	Глобулины
Дистиллированная вода	Растворимы	Нерастворимы
Слабые солевые растворы NaCl	»	Растворимы
Насыщенный раствор Na_2SO_4	»	Нерастворимы
Насыщенный раствор NaCl	»	»
Полунасыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	»	»
Насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Нерастворимы	»

щиеся в соответствии с классическим определением к глобулинам (в частности, β -лактоглобулин), которые растворимы в 50% растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Таким образом, принятая классификация не является строгой, она скорее является удобной.

Различная растворимость альбуминов и глобулинов сыворотки крови широко используется в клинической практике для их фракционирования и количественного определения. Соотношение альбуминов и глобулинов в норме в крови сохраняется на постоянном уровне и получило название белкового коэффициента. При многих заболеваниях это соотношение изменяется, поэтому определение белкового коэффициента в крови больных имеет важное практическое значение (см. главу 16).

Широкое распространение в клинике получило определение качественного состава и количества сывороточных белков методом электрофореза на бумаге и в полиакриламидном геле, позволяющим исследовать очень небольшие количества сыворотки крови. Принцип электрофореза был рассмотрен ранее; типичная электрофореграмма белков сыворотки крови, а также соотношение отдельных фракций представлены в главе 16. Отметим, что фракция альбуминов при электрофорезе на бумаге выглядит гомогенным белком, в то время как α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулины представляют собой сложные смеси белков, что доказано при иммуноэлектрофорезе и электрофорезе сывороточных белков в полиакриламидном геле.

Альбумины и глобулины отличаются друг от друга также по молекулярной массе — соответственно 40–70 тыс. и 150 тыс. дальтон и выше. Отличаются они и по содержанию аминокислоты глицина (около 1% у первых и 3,5% у вторых).

Из сыворотки крови не только выделен альбумин в чистом виде, но и определена первичная структура его молекулы, т. е. чередование всех 575 аминокислотных остатков, входящих в состав единственной полипептидной цепи. Этот белок имеет относительно низкую изоэлектрическую точку (4,7) и высокий отрицательный заряд при рН 8,6, благодаря чему он мигрирует с большой скоростью в электрическом поле к аноду. Принято считать, что примерно 75–80% осмотического давления белков сыворотки крови приходится на альбумины; кроме того, основную функцию их связывают с транспортом жирных кислот. Однако точная функция альбуминов не совсем ясна. Об этом свидетельствуют случаи, когда у некоторых людей в крови фактически отсутствуют альбумины (врожденная аномалия), и в то же время они практически здоровы.

Глобулины, представленные α_1 -фракцией, содержатся в крови в связанном с билирубином и с липопротеинами высокой плотности состоянии. Следует указать еще на особый гликопротеин, пока недостаточно изученный, концентрация которого резко повышается в сыворотке крови, когда в организме наблюдается быстрый рост некоторых тканей (например, рост опухоли). Этим объясняется повышенный интерес к указанному белку в онкологической практике. Глобулины, мигрирующие при электрофорезе в виде α_2 -фракции, содержат глобулин и неизвестный гликопротеин. β -Глобулины включают ряд важных в функциональном отношении белков. Это прежде всего трансферрин — белок, ответственный за транспорт железа.

β -Глобулином является также церулоплазмин — белок, транспортирующий ионы меди. Отсутствие этого белка приводит к развитию гепатоцеребральной дистрофии, при которой наблюдается отравление организма ионами свободной меди. В основе болезни лежит врожденный дефект синтеза церулоплазмينا. Наконец, во фракции β -глобулинов содержится протромбин, являющийся предшественником тромбина — белка, ответственного за превращение фибриногена крови в фибрин при свертывании крови.

Фракция γ -глобулинов является наиболее гетерогенной. Известно разнообразие антител, каждое из которых обладает особенной первичной структурой. Они электрофоретически открываются главным образом в γ -глобулиновой и частично в β_2 -глобулиновой фракции. Циркулирующее в сыворотке крови «главное антитело» получило название иммуноглобулина G, обозначаемого IgG с s = 7S. Полностью расшифрована первичная структура четырех полипептидных цепей этого белка, в том

числе двух легких цепей, содержащих по 216 аминокислот, и двух тяжелых цепей, содержащих по 450 аминокислот. В структуре этого белка имеются участки со стабильной последовательностью аминокислот (С-концевые области) и участки с варьирующей последовательностью аминокислот (N-концевые области) в разных антителах в зависимости от химической природы и аминокислотной последовательности антигенов. Кроме того, идентифицированы IgM (представляющий собой пентамер молекулы IgG с $s = 19S$, который, хотя и присутствует в сыворотке крови, в значительных количествах содержится в слюне и молозиве) и, наконец, IgE. Все эти иммуноглобулины различаются по молекулярной массе, составу и последовательности аминокислотных остатков и выполняют соответственно разные биологические функции (см. главу 16).

ПРИРОДНЫЕ ПЕПТИДЫ

В последние годы значительно повысился интерес к структуре и функциям встречающихся в организме низкомолекулярных пептидов, обладающих рядом специфических функций. Мнение о том, что пептиды могут играть роль промежуточных продуктов на пути синтеза белка, не подтвердилось, поскольку, как будет показано в главе 13, этот процесс во всех клетках у всех живых организмов осуществляется *de novo* матричным путем.

Природные пептиды, наделенные биологической активностью, в зависимости от характера действия и происхождения принято делить на четыре группы: 1) пептиды, обладающие гормональной активностью (вазопрессин, окситоцин, кортикотропин, глюкагон, кальцитонин, меланоцитстимулирующий гормон, рилизинг-факторы гипоталамуса и др.; см. главу 6); 2) пептиды, принимающие участие в процессе пищеварения (в частности, гастрин и секретин; см. главу 11); 3) пептиды, имеющие своим источником α_2 -глобулиновую фракцию сыворотки крови (такие как ангиотензин, брадикинин и каллидин); 4) нейропептиды.

В последнее время выяснены некоторые закономерности синтеза физиологически активных пептидов из биологически инертных предшественников — белков, в результате процесса, называемого посттрансляционной модификацией (т. е. постсинтетических превращений белковой молекулы). Известно, например, что ангиотензины (представленные октапептидами), обладающие выраженными сосудосуживающими свойствами, образуются из присутствующего в сыворотке крови неактивного белка ангиотензиногена в результате последовательного действия ряда протеолитических ферментов (трипсина, ренина и особого фермента, участвующего в превращении неактивного ангиотензина I в активный ангиотензин II).

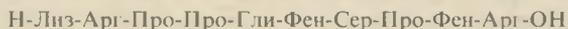


К группе вазоактивных (т. е. оказывающих влияние на тонус сосудов) пептидов относятся, кроме того, широко применяемые в медицинской практике брадикинин и каллидин.

Брадикинин представляет собой нонапептид:

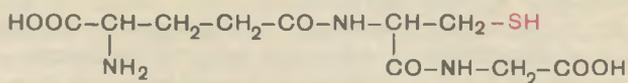


Каллидин представлен декапептидом, образующимся из неактивного плазменного белка кининогена, и отличается от брадикинина присутствием на N-конце еще одного аминокислотного остатка (Лиз):



Совсем недавно из экстрактов ткани предсердия (но не из желудочков сердца) человека и животных были выделены биологически активные пептиды, регулирующие тонус сосудистой системы и электролитный обмен. Физиологический эффект их оказался противоположным влиянию системы реннин-ангиотензин-альдостерон и выражается в сосудорасширяющем действии, усилении клубочковой фильтрации и стимуляции выведения натрия и хлоридов за счет угнетения их реабсорбции в канальцах. Эти пептиды получили название атриопептиды (от лат. atrio — предсердие); они построены из разного числа аминокислот (от 23 до 100), но обязательным условием для проявления биологического эффекта является наличие в молекуле 17-членной кольцевой структуры, образующейся за счет дисульфидной связи между остатками цистенна. Внутриклеточным посредником действия атриопептидов оказался циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), синтез которого происходит в результате активирования мембранного фермента гуанилатциклазы; действие аденилатциклазы, напротив, тормозится под влиянием атриопептидов.

В некоторых растительных и во всех животных тканях широко распространен низкомолекулярный трипептид глутатион, функции которого пока не выяснены достаточно полно, хотя он открыт сравнительно давно. Глутатион представляет собой γ -глутамил-цистеинил-глицин:



Глутатион

Поскольку цистеин является составной частью глутатиона, последний может находиться в восстановленной (SH) и в окисленной (S—S) формах (сокращенно обозначаемых Г-SH и Г-S-S-Г), что, по-видимому, имеет отношение к биологической роли глутатиона в организме.

Интерес к природным пептидам в значительной степени обусловлен необычно высокой их биологической активностью. Они оказывают мощное фармакологическое действие на множество физиологических функций организма. В то же время были замечены низкая стабильность и их быстрый распад в организме при физиологических значениях pH среды. Все это способствовало развитию исследований как в области препаративного выделения природных пептидов из органов и тканей (включая получение биологически активных пептидов из предшественников методами ограниченного протеолиза ряда хорошо известных гормонов), так и в области химического синтеза. Получение ряда биологически активных нейропептидов, в частности эндорфинов и энкефалинов, наделенных мощным обезболивающим действием, в сотни и тысячи раз превосходящим аналогичный эффект морфина, из гормонов гипофиза описано в главе 6. Из ткани мозга выделен δ -пептид сна; ряд других нейропептидов принимает участие в биохимических механизмах памяти, страха, обучения и т. д. Для повышения стабильности пептидов при введении в организм предприняты попытки синтеза пептидов, в которых один или несколько аминокислотных остатков L-ряда замещают остатками D-аминокислот. Подобная замена не вызывает снижения биоактивности, но защищает пептид от действия протеиназ тканей, способствуя пролонгированию действия препарата.

Сложные белки (прежнее название — протеиды) содержат два компонента — простой белок и небелковое вещество. Последнее называют простетической группой (от греч. *prostheo* — присоединяю, прибавляю). Простетические группы, как правило, прочно связаны с белковой молекулой. Ниже представлены сведения о химической природе и биологической роли некоторых сложных белков.

ХРОМОПРОТЕИНЫ

Хромопротеины состоят из простого белка и связанного с ним окрашенного небелкового компонента, откуда и произошло их название (от греч. *chroma* — краска). Среди хромопротеинов различают гемопроотеины (содержащие в качестве простетической группы железо), магний-порфирины и флавопротеины (содержащие производные изоаллоксазина). Хромопротеины наделены рядом уникальных биологических функций: они участвуют в таких фундаментальных процессах жизнедеятельности, как фотосинтез, дыхание клеток и целостного организма, транспорт кислорода и углерода, окислительно-восстановительные реакции, свето- и цветовосприятие и др.

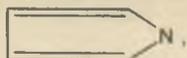
Таким образом, хромопротеины играют исключительно важную роль в процессах жизнедеятельности. Достаточно, например, подавить дыхательную функцию гемоглобина путем введения оксида углерода или утилизацию (потребление) кислорода в тканях путем введения синильной кислоты или ее солей (цианидов), ингибирующих ферментные системы клеточного дыхания, как моментально наступает смерть организма. При внимательном рассмотрении биологической роли отдельных хромопротеинов вырисовывается любопытная картина. Оказывается, хромопротеины являются непременными и активными участниками аккумуляирования солнечной энергии в зеленых растениях. Хлорофилл (магний-порфирин) вместе с белком обеспечивает фотосинтетическую активность растений, катализируя расщепление молекулы воды на водород и кислород (с поглощением солнечной энергии); гемопроотеины (железо-порфирины) катализируют обратную реакцию — образование молекулы воды, связанное с освобождением энергии.

Гемопроотеины

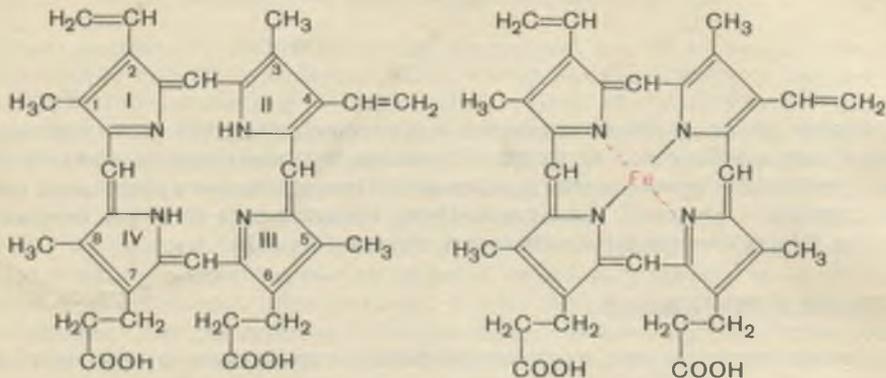
К группе гемопроотеинов относятся гемоглобин и его производные, миоглобин, хлорофиллсодержащие белки и ферменты (вся цитохромная система, каталаза и пероксидаза). Все они содержат в качестве небелкового компонента структурно сходные железо(или магний)-порфирины, но различные по составу и структуре белки, обеспечивая тем самым разнообразие их биологических функций. Рассмотрим более подробно химическое строение гемоглобина, наиболее важного для жизнедеятельности человека и животных соединения.

Гемоглобин в качестве белкового компонента содержит глобин, а небелкового — гем. Видовые различия гемоглобина обусловлены глобином, в то же время гем одинаков у всех видов гемоглобина.

В основе структуры протестической группы большинства гемсодержащих белков лежит порфириновое кольцо, являющееся в свою очередь производным тетрапиррольного соединения — порфина. Последний состоит из четырех замещенных пирролов:



соединенных между собой мегинновыми мостиками ($-\text{CH}=\text{}$). Незамещенный порфин называется порфин. В молекуле гема порфин представлен в виде протопорфина IX, содержащего четыре метильные группы ($-\text{CH}_3$), две винильные группы ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) и два остатка пропионовой кислоты. Протопорфин, присоединяя железо, превращается в гем¹.

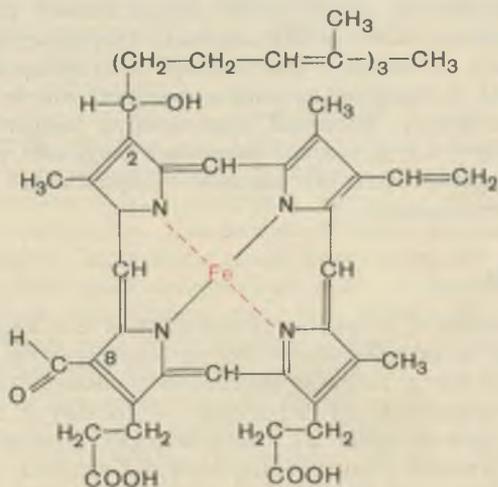


Протопорфин IX
(1,3,5,8-тетраметил-2,4-дивинил-
6,7-дипропионовокислый порфин)

Гем

Из формулы видно, что железо связано с двумя атомами азота молекулы протопорфина ковалентно и с двумя другими координационными связями, обозначенными пунктирными линиями. В зависимости от химической природы групп, находящихся в боковой цепи, порфирины классифицируются на этио-, мезо-, копро- и протопорфирины. Последние наиболее распространены в природе. Из возможных 15 изомеров протопорфиринов благодаря наличию трех разных заместителей самым распространенным оказался протопорфин IX.

Гем в виде гем-порфина является протестической группой не только гемоглобина и его производных, но и миоглобина, каталазы, пероксидазы и цитохромов b, c и c₁ (см. главу 8); в то же время в цитохромах a и a₃, входящих в состав интегрального комплекса, названного цитохромоксидазой, содержится гем a, называемый также формилпорфирином:



Гем a (формилпорфин)

¹ Структура гема была расшифрована в основном благодаря работам М. В. Ненцкого и Г. Фишера.

Гем а вместо метильной группы содержит формильный остаток (в 8-м положении) и вместо одной винильной группы (во 2-м положении) — изопреноидную цепь. Железо своими четырьмя связями образует комплекс с порфирином, а оставшиеся 5-я и 6-я координационные связи железа в молекулах гемоглобина и цитохромов связываются с белковыми компонентами по-разному. В частности, в гемоглобинах (и миоглобине) благодаря 5-й координационной связи железо соединяется с имидазольной группой гистидина белковой молекулы. Шестая координационная связь железа предназначена для присоединения кислорода (с образованием оксигемоглобина и оксимиоглобина) или других лигандов: СО, цианидов и др. В цитохромах, напротив, и 5-я и 6-я координационные связи железа соединены с остатками гистидина и метионина (а в цитохроме с — обе винильные группы еще и с остатками цистеина) белковой молекулы. Этим, вероятнее всего, могут быть объяснены функции железа в гемоглобине, валентность которого не изменяется при присоединении кислорода (в отличие от валентности железа в цитохромах): в гемоглобине и миоглобине железо остается двухвалентным независимо от присоединения или отдачи кислорода.

Структурная организация гемоглобина (и миоглобина) была описана в главе 1. Дж. Кендрью и М. Перутц расшифровали конформацию этих молекул (Нобелевская премия 1962 г.). Хотя дыхательная функция гемоглобина крови подробно рассматривается в курсе физиологии, следует указать на уникальную роль гемоглобина в транспорте кислорода от легких к тканям и углекислого газа от тканей к легким. Это важное проявление жизни — дыхание — основано на взаимодействии многих типов атомов в гигантской молекуле гемоглобина. Подсчитано, что в одном эритроците содержится около 340 000 000 молекул гемоглобина, каждая из которых состоит примерно из 10^3 атомов. Атом железа расположен в центре гема-пигмента, придающего крови характерный красный цвет. Каждая из четырех молекул гема «обернута» одной полипептидной цепью. В молекуле гемоглобина взрослого человека, обозначаемого HbA (от англ. adult — взрослый), содержатся четыре полипептидные цепи, которые вместе составляют белковую часть молекулы — глобин. Две из них, называемые α -цепями, имеют одинаковую первичную структуру и включают по 141 аминокислотному остатку. Две другие, обозначаемые β -цепями, также идентично построены и содержат по 146 аминокислотных остатков. Таким образом, вся молекула белковой части гемоглобина состоит из 574 аминокислот. Во многих положениях α - и β -цепи содержат одинаковые аминокислотные последовательности.

В дополнение к основному гемоглобину, HbA₁, в крови взрослого человека доказано существование мигрирующего с меньшей скоростью при электрофорезе гемоглобина HbA₂, также состоящего из четырех субъединиц: двух α - и двух σ -цепей. На долю HbA₂ приходится около 2,5% от всего гемоглобина. Известен, кроме того, фетальный гемоглобин (гемоглобин новорожденных), обозначаемый HbF и состоящий из двух α - и двух γ -цепей. Фетальный гемоглобин отличается от HbA₁ не только по составу аминокислот, но и по ряду физико-химических свойств: спектральным показателям, электрофоретической подвижности, устойчивости к щелочной денатурации и др. Кровь новорожденного ребенка содержит до 80% HbF, но к концу 1-го года жизни он почти целиком заменяется на HbA (и все же в крови взрослого человека открывается до 1,5% HbF от общего количества гемоглобина). Нельзя не отметить и тот факт, что последовательность аминокислот в γ - и σ -цепях гемоглобинов окончательно не расшифрована.

Установление первичной структуры субъединиц молекулы гемоглобина стимулировало исследования, связанные с расшифровкой структуры так называемых аномальных гемоглобинов. В крови человека в общей сложности открыто около 150 различных типов мутантных гемоглобинов. Появляются эти гемоглобины в крови вследствие мутаций генов. Аномальные гемоглобины, отличающиеся по форме, химическому составу и величине заряда, были выделены при помощи методов электрофореза и хроматографии. Передающиеся по наследству изменения чаще всего являются результатом мутации единственного триплета, приводящей к замене одной какой-либо аминокислоты в полипептидных цепях молекулы гемоглобина на другую. В большинстве случаев происходит замена кислой аминокислоты на основную или

Таблица 2.1. Замены аминокислот в аномальных гемоглобинах человека

Тип гемоглобина	Состав пептидных цепей	Нормальный остаток и его положение в цепи	Замена
A ₁	$\alpha_2\beta_2$		
A ₂	$\alpha_2\beta_2$		
C	$\alpha_2\beta_2$	Глу 6 в β -цепи	Лиз
D _{α}	$\alpha_2\beta_2$	Глу 23 в α -цепи	?
D _{β}	$\alpha_2\beta_2$	Лей 28 в β -цепи	Глу
E	$\alpha_2\beta_2$	Глу 26 в β -цепи	Лиз
F	$\alpha_2\gamma_2$		
G	$\alpha_2\beta_2$	Глу 43 в β -цепи	Ала
G _{pH}	$\alpha_2\beta_2$	Асп 68 в α -цепи	Лиз
H	β_4		
I	$\alpha_2\beta_2$	Лиз 16 в α -цепи	Асп
M	$\alpha_2\beta_2$	Вал 67 в β -цепи	Глу
O	$\alpha_2\beta_2$	Глу 116 в α -цепи	Лиз
S	$\alpha_2\beta_2$	Глу 6 в β -цепи	Вал

нейтральную (табл. 2.1) и, поскольку это замещение осуществляется в обеих полипептидных цепях одной из пар (α или β), образовавшийся аномальный гемоглобин будет отличаться от нормального величиной заряда и соответственно электрофоретической подвижностью.

В табл. 2.1 представлены некоторые типы аномальных гемоглобинов, составы их полипептидных цепей с указанием известной или вероятной локализации замены либо в α -, либо в β -цепях. Замены необычной аминокислотой в аномальных гемоглобинах имеют место как в α -, так и в β -цепях. Исключение составляет гемоглобин H, все 4 полипептида которого представлены β -цепями, идентичными по структуре β -цепям нормального гемоглобина A₁.

Следует указать, что некоторые мутации, вызывающие существенное изменение структуры и соответственно функции гемоглобина, оказываются летальными и инди-



Рис. 2.1. Нормальные и серповидные эритроциты.

видуумы с подобным нарушением гемоглобина умирают в раннем возрасте. Однако при ряде мутаций замена аминокислот не вызывает заметного изменения функции гемоглобина. В этих случаях болезнь протекает бессимптомно.

Болезни гемоглобинов (их насчитывают более 200) называют гемоглобинозами. Принято делить их на гемоглобинопатии, в основе развития которых лежит наследственное изменение структуры какой-либо цепи нормального гемоглобина (часто их относят также к «молекулярным болезням»), и талассемии, обусловленные нарушением синтеза какой-либо нормальной цепи гемоглобина. Различают также железодефицитные анемии.

Классическим примером наследственной гемоглобинопатии является серповидно-клеточная анемия, широко распространенная в странах Южной Америки, Африки и Юго-Восточной Азии. При этой патологии эритроциты в условиях низкого парциального давления кислорода принимают форму серпа (рис. 2.1). Гемоглобин S, как показали Л. Полинг и др., отличается по ряду свойств от нормального гемоглобина, в частности, после отдачи кислорода в тканях он превращается в плохо растворимую форму и начинает выпадать в осадок в виде веретенообразных кристаллоидов, названных тактоидами. Последние деформируют клетку и приводят к массивному гемолизу. Болезнь протекает остро, и дети часто погибают в раннем возрасте.

Химический дефект при серповидно-клеточной анемии был раскрыт В. Ингремом и сводится к замене единственной аминокислоты, а именно глутаминовой, в 6-м положении с N-конца на валин в β -цепях молекулы гемоглобина HbS (см. табл. 2.1, рис. 2.1). Это результат мутации в молекуле ДНК, кодирующей синтез β -цепи гемоглобина. Все остальные аминокислоты располагаются в той же последовательности и в таком же количестве, как и в нормальном гемоглобине HbA:

	1	2	3	4	5	6	7	8
HbA :	Вал	Гис	Лей	Тре	Про	Глу	Глу	Лиз...
HbS :	Вал	Гис	Лей	Тре	Про	Вал	Глу	Лиз...

Однако одной этой замены оказалось достаточно не только для нарушения формы эритроцита, но и для развития серповидно-клеточной анемии.

Талассемии, строго говоря, не являются гемоглобинопатиями. Это генетически обусловленное нарушение синтеза одной из нормальных цепей гемоглобина. Если угнетается синтез β -цепей, то развивается β -талассемия, при генетическом дефекте синтеза α -цепей развивается α -талассемия. При β -талассемии в крови наряду с HbA₁ появляется до 15% HbA₂ и резко повышается содержание HbF — до 15 — 60%. Болезнь характеризуется гиперплазией и разрушением костного мозга, поражением печени, селезенки, деформацией черепа и сопровождается тяжелой гемолитической анемией. Эритроциты при талассемии приобретают мишеневидную форму. Механизм изменения формы эритроцитов пока не удалось объяснить.

В медицинской практике часто прибегают к анализу кровяных пигментов, который основан на исследовании спектроскопических свойств гема гемоглобина, точнее, продуктов его окисления (хлорида гема или гематина, образующихся соответственно при обработке гемоглобина уксусной кислотой в присутствии хлорида натрия или введенными растворами щелочей). При восстановлении гематина сульфитом аммония в присутствии глобина образуется производное гемоглобина — гемохромоген, в котором денатурированный глобин соединен с гемом. Полученный комплекс имеет характерный спектр поглощения; этот метод широко применяется в судебно-медицинской практике при исследовании кровяных пятен.

Из многообразия производных гемоглобина, представляющих несомненный интерес для врача, следует прежде всего указать на оксигемоглобин — HbO₂ — соедине-

ние молекулярного кислорода с гемоглобином. Кислород присоединяется к гему гемоглобина при помощи координационных связей железа, причем валентность железа не меняется и железо остается двухвалентным. Такой гемоглобин называют оксигенированным. Неправомочно называть процесс присоединения кислорода к гемоглобину окислением, а HbO_2 — окисленным гемоглобином, так же как и диссоциацию оксигемоглобина (HbO_2), т. е. распад его на Hb и кислород, — восстановлением, а Hb — восстановленным, поскольку в обоих случаях изменения валентности железа в геме не происходит.

Помимо кислорода, гемоглобин легко соединяется и с другими газами, в частности с CO , NO и др. Так, при отравлении оксидом углерода гемоглобин прочно с ним связывается с образованием карбоксигемоглобина (HbCO). При этом из-за высокого сродства к CO гемоглобин теряет способность связывать кислород и наступает смерть от удушья, недостаточного снабжения тканей кислородом. Однако повышение парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе приводит к частичному вытеснению CO из связи с гемоглобином.

При отравлении оксидами азота, парами нитробензола и другими соединениями часть гемоглобина окисляется в метгемоглобин (HbOH), содержащий трехвалентное железо. Поскольку метгемоглобин также теряет способность к переносу кислорода от легких к тканям, то и в случаях метгемоглобинемии (вследствие отравления окислителями) в зависимости от степени отравления может наступить смерть от недостатка кислорода. Если вовремя оказать помощь, т. е. повысить парциальное давление кислорода (вдыхание чистого кислорода), то и в этом случае можно вывести больного из опасного состояния.

В заключение следует указать, что самым надежным методом качественного определения различных производных гемоглобина является исследование их спектров поглощения.

У беспозвоночных роль переносчика кислорода часто выполняют пигменты негеминовой природы — гемэритрин и гемоцианин. Они не относятся к гемосодержащим хромопротеинам, хотя в этих терминах содержится корень «гем». Эти белки, как и гемоглобин, несмотря на то, что выполняют одну и ту же функцию, сильно различаются между собой по молекулярной массе и четвертичной структуре, химической природе активного центра, характеру связывания железа (в случае гемэритрина) и меди (в случае гемоцианина) с кислородом и др. Эти отличия суммированы в табл. 2.2 (по Г. Эйхгорну).

Трансферрины (сидерофилины) — группа сложных белков, полученных из разных источников и характеризующихся способностью специфично, прочно и обратимо

Таблица 2.2. Сопоставление некоторых свойств белков — переносчиков кислорода

Свойства	Гемоглобин	Гемэритрин	Гемоцианин
Металл	Fe	Fe	Cu
Степень окисления металла в дезоксигенированном белке	II	II	I
Стехиометрия взаимодействия с кислородом	$\text{Fe} : \text{O}_2$	$2\text{Fe} : \text{O}_2$	$2\text{Cu} : \text{O}_2$
Цвет оксигенированного белка	Красный	Розово-фиолетовый	Синий
Цвет дезоксигенированного белка	Пурпурно-красный	Бесцветный	Бесцветный
Способ связи железа или меди с белком	Порфириновое кольцо	Радикалы аминокислотных остатков	Радикалы аминокислотных остатков
Молекулярная масса	65 000	108 000	400 000 — 20 000 000
Число субъединиц	4	8	Много

связывать ионы железа Fe (III) и других переходных металлов. Наиболее подробно из этой группы белков изучен трансферрин сыворотки крови. Функция трансферрина заключается в транспорте ионов железа в ретикулоциты, в которых осуществляется биосинтез гемоглобина. Система трансферрин – ретикулоцит считается весьма перспективной для изучения взаимодействия металла с белком и белковой молекулы с клеткой.

Флавопротеины

Флавопротеины содержат прочно связанные с белком простетические группы, представленные изоаллоксазиновыми производными – окисленными флавиномононуклеотидом (ФМН) и флавинадениндинуклеотидом (ФАД). Флавопротеины входят в состав оксидоредуктаз – ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции в клетке. Некоторые флавопротеины содержат ионы металлов. Типичными представителями флавопротеинов, содержащих также негемовое железо, являются ксантиноксидаза, альдегидоксидаза, СДГ, дигидрооротатдегидрогеназа, ацил-КоА-дегидрогеназа и транспортирующий электроны флавопротеин. На долю двух последних приходится до 80% митохондриальных флавопротеинов, выполняющих важную роль в биоэнергетике клетки (см. главу 8). Негемовое железо связывается с белковым компонентом, отличающимся от гемсодержащих хромопротеинов. Железо ковалентно связано с атомом серы остатка цистеина в белке. При кислотном гидролизе такого белка освобождаются железо и H_2S . Несмотря на структурные отличия от цитохромов, негемовые флавопротеины обладают аналогичной функцией в транспорте электронов благодаря способности переходить из окисленного в восстановленное состояние.

НУКЛЕОПРОТЕИНЫ

Нуклеопротеины состоят из белков и нуклеиновых кислот. Последние рассматриваются как простетические группы. В природе обнаружено два типа нуклеопротеинов, отличающихся друг от друга по составу, размерам и физико-химическим свойствам: дезоксирибонуклеопротеины (ДНП) и рибонуклеопротеины (РНП). Названия нуклеопротеинов отражают только природу углеводного компонента (пентозы), входящего в состав нуклеиновых кислот. У РНП углевод представлен рибозой, у ДНП – дезоксирибозой. Название «нуклеопротеины» связано с названием ядра клетки, однако ДНП и РНП содержатся и в других субклеточных структурах. Следовательно, речь идет о химически индивидуальном классе органических веществ, имеющих своеобразные состав, структуру и функции, независимо от локализации в клетке. Тем не менее доказано, что ДНП преимущественно локализованы в ядре, а РНП – в цитоплазме. В то же время ДНП открыты в митохондриях, а в ядрах и ядрышках обнаружены также высокомолекулярные РНП.

Пристальное внимание исследователей привлечено к структуре и функции макромолекул, включающих комплексы белков и нуклеиновых кислот. Этот особый интерес вызван тем, что многообразие жизненных проявлений непосредственно связано с этими полимерными молекулами. Биохимики имеют достаточно оснований для утверждения, что природа синтезированных в клетках белков зависит в первую очередь от природы ДНП, точнее ДНК, а свойства живых организмов, как и структурная организация субклеточных органелл, клеток и целостного организма, определяются свойствами синтезированных белков.

ДНК хранит наследственную информацию. Подтверждением этого положения служит явление трансформации, наблюдаемое у бактерий и открытое также в культуре клеек человека. Сущность этого явления заключается в превращении одного

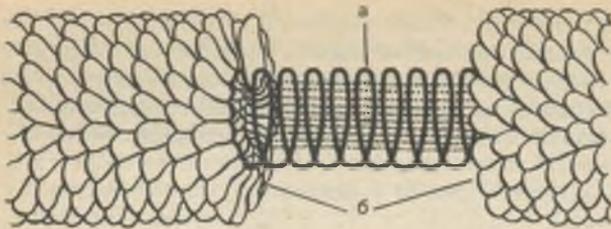


Рис. 2.2. Модель вируса частицы мозаичной болезни табака.

а — спираль РНК; б — субъединицы белка.

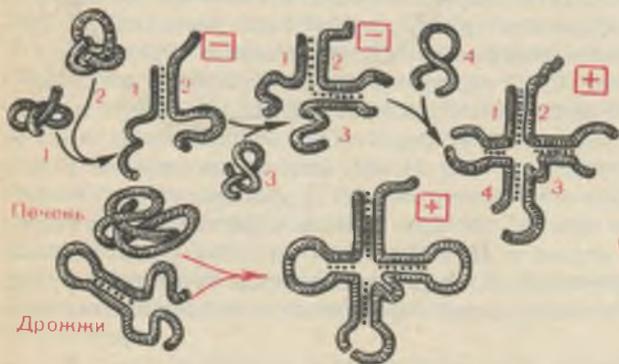


Рис. 2.3. Самосборка валиновой тРНК (по А. А. Баеву).

+ активное состояние, - неактивное состояние. Цифрами обозначены фрагменты молекулы тРНК.

метров. Вообще ДНК входит в состав моноклеосом, являющихся составной частью хромосомы. Таким образом, в состав хроматина входит 1 молекула ДНК, 5 различных классов белков — гистонов и так называемые негистоновые белки. Количество ДНК в ядре составляет до 6 пг (10^{-12} г) на 1 клетку животных. У *E. coli* содержание ДНК равно 0,01 пг.

Относительно белкового состава ДНП известно, что все 5 классов гистонов различаются по размерам, аминокислотному составу и величине заряда (всегда положительный). Так, различают гистоны, богатые лизином (Н1), молекулярная масса которых в среднем составляет 20 000, и богатые аргинином (молекулярная масса до 15 000). Они обозначаются следующими символами:

- Н1 — богатые лизином,
- Н2А — богатые аргинином и лизином,
- Н2В — умеренно богатые аргинином и лизином,
- Н3 — богатые аргинином,
- Н4 — богатые глицином и аргинином.

Природа негистоновых белков пока не выяснена. Предполагается, что в их состав входят сложные белки, ферменты, а также регуляторные белки. По своим свойствам последние отличаются от гистонов и представлены кислыми белками.

В различных нуклеопroteинах количество нуклеиновой кислоты колеблется в пределах от 40 до 65% (например, в рибосомах про- и эукариот). В вирусных нуклеопroteинах количество нуклеиновых кислот не превышает 2–5% от общей массы.

генетического типа клеток в другой путем изменения природы ДНК. Так, удалось получить штамм капсулированных и вирулентных пневмококков из исходного штамма, не обладающего этими признаками, путем внесения в среду ДНК, выделенной из капсулированного (и вирулентного) штамма. С нуклеопroteинами и соответственно нуклеиновыми кислотами непосредственно связаны, кроме того, такие биологические процессы, как митоз, мейоз, эмбриональный и злокачественный рост и др.

У большинства клеток эукариот, когда ядро находится в интерфазе, из ДНК и белковых молекул образуются так называемые филаменты, нити, имеющие меняющуюся толщину (в среднем около 10 нм, реже 2 нм). Оказывается, что толщина филаментов определяется наличием или отсутствием белков, окружающих двухспиральную структуру ДНК, а длина их — молекулярной массой ДНК. Известно, что 1 хромосома содержит 1 молекулу ДНК, имеющую длину несколько сантиметров.

Так, например, у вируса табачной мозаики (ВТМ) на долю РНК¹, правда с огромной молекулярной массой — около 2 000 000 Да, приходится всего около 2%. Остальная часть этой гигантской вирусной частицы приходится на долю однотипных белковых субъединиц (рис. 2.2). Ионная связь между РНК и белковыми молекулами ВТМ весьма непрочна и легко разрывается даже в мягких условиях, что позволяет отделить РНК от белка. Интересно, что после удаления разрывающего ионную связь агента, при смешивании этих продуктов происходят полная регенерация исходного ВТМ, восстановление всех его физических параметров и биологических свойств, включая способность поражать зеленый лист. Это явление самосборки, впервые открытое у ВТМ, в дальнейшем было обнаружено также у бактериофагов, представленных нуклеопротеинами. Аналогичным образом осуществляется самосборка валиновой тРНК (рис. 2.3). Акад. А. С. Спирин и одновременно М. Номура разделили 70S рибосомы (рибонуклеопротеины) на их составляющие и подобрали условия для самосборки полноценных функционирующих рибосом. В основе этого удивительного явления самосборки лежит, по-видимому, программа, содержащаяся в первичной структуре как белка, так и нуклеиновой кислоты и определяющая, какое количество и в какой последовательности должно присоединиться белковых молекул к единственной молекуле РНК (в случае ВТМ) или к 3 молекулам РНК (в рибосомах), чтобы обеспечить высокую точность реконструкции надмолекулярных структур.

ЛИПОПРОТЕИНЫ

В последние годы достигнут определенный прогресс в выяснении химической природы и структуры липопротеинов. Этот класс сложных белков состоит из белка и протетической группы, представленной каким-либо липидом. В частности, в составе липопротеинов открыты нейтральные жиры, свободные жирные кислоты, фосфолипиды, холестериды. Липопротеины широко распространены в природе, в растениях, тканях животных и у микроорганизмов и выполняют разнообразные биологические функции. Липопротеины входят в состав клеточной мембраны и внутриклеточных биомембран ядра, митохондрий, микросом (это структурированные липопротеины), а также присутствуют в свободном состоянии (главным образом в плазме крови). К липопротеинам относятся, кроме того, тромбoplastический белок ткани легких, липовителлин желтка куриного яйца, некоторые фосфолипиды молока и т. д. Установлено, что липопротеины участвуют в структурной, комплексной организации миелиновых оболочек, нервной ткани, хлоропластов, фоторецепторной и электронно-транспортной систем, палочек и колбочек сетчатки и др.

Липопротеины подразделяются на α -липопротеины (ЛПВП), β -липопротеины (ЛПНП), пре- β -липопротеины (ЛПОНП) и хиломикроны. Химическая природа и функция липопротеинов сыворотки крови подробно рассматриваются в главе 10.

Относительно механизма связывания белкового компонента с липидами имеются данные, что в образовании липопротеинов участвуют нековалентные силы различной природы, определяемые наличием или отсутствием у липидного компонента ионизированных групп атомов. Если в образовании липопротеина участвуют фосфолипиды, то между ними и белковой молекулой возникает ионный тип связи (рис. 2.4).

Доказано также существование гидрофобных взаимодействий между неполярными группами липидного компонента (например, радикалы жирных кислот) и белковой молекулы. Однако чаще в липопротеинах действуют комбинированно разные нековалентные силы, способствуя образованию в высшей степени упорядоченной двойной белково-липидной структуры биомембран.

¹ Растительные вирусы чаще всего содержат РНК, в то время как вирусы, поражающие клетки животных, содержат как РНК (вирус саркомы Рауса и др.), так и ДНК (вирус папилломы). Бактериофаги также содержат РНК или ДНК в комплексе с белками.

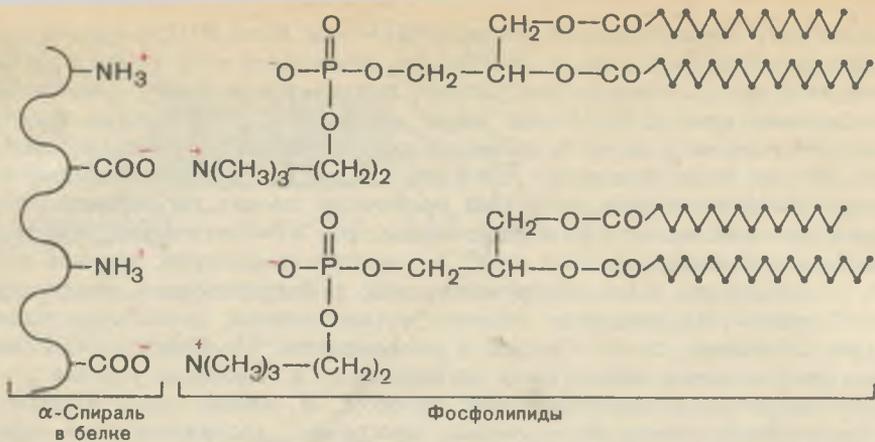
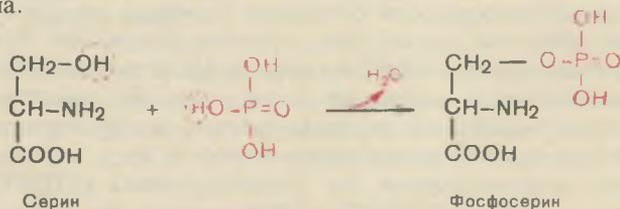


Рис. 2.4. Ионный тип связи между белками и фосфолипидами.

ФОСФОПРОТЕИНЫ

К белкам этого класса относятся казеиноген молока, в котором содержание фосфорной кислоты достигает 1%, вителлин, вителлинин и фосвитин, выделенные из желтка куриного яйца, овальбумин, открытый в белке куриного яйца, ихтулин, содержащийся в икре рыб, и др. Большое количество фосфопротеинов содержится в ЦНС. Фосфопротеины занимают особое положение в биохимии фосфорсодержащих соединений не только в результате своеобразия структурной организации, но и вследствие широкого диапазона функций в метаболизме. Характерной особенностью структуры фосфопротеинов является то, что фосфорная кислота оказывается связанной сложноэфирной связью с белковой молекулой через гидроксильные группы β-оксиаминокислот, главным образом серина и в меньшей мере треонина.



Новые данные свидетельствуют о том, что фосфопротеины в клетках синтезируются в результате посттрансляционной модификации, подвергаясь фосфорилированию при участии протеинкиназ. Этот процесс подробно рассматривается в главе 13. Таким образом, уровень фосфопротеинов в клетке зависит в значительной степени от регулирующего действия ферментов, катализирующих фосфорилирование (протеинкиназы) и дефосфорилирование (протеинфосфатазы). Укажем также, что фосфопротеины содержат органически связанный, лабильный фосфат, абсолютно необходимый для выполнения клеткой ряда биологических функций. С другой стороны, они являются ценными источниками энергетического и пластического материала в процессе эмбриогенеза и дальнейшего постнатального роста и развития организма.

Следует особо отметить, что ряд ключевых ферментов, регулирующих процессы внутриклеточного обмена веществ, также существует как в фосфорилированной, так и в дефосфорилированной формах. Этим подчеркивается значение фосфорилирования — дефосфорилирования в процессах химической модификации макромолекул.

ГЛИКОПРОТЕИНЫ

Простетические группы гликопротеинов представлены углеводами и их производными, весьма прочно связанными с белковой частью молекулы. Для определения химической природы углеводного компонента нативные гликопротеины из межклеточного вещества, сыворотки крови и других биологических жидкостей подвергают гидролизу. После этого в гидролизате обнаруживают наряду со свободными аминокислотами гексозамины (глюкозамин, галактозамин), глюкозу, маннозу, галактозу, ксилозу, арабинозу, глюкуроновую, уксусную и серную кислоты, нейраминовую и сиаловые кислоты и др. В состав простетических групп некоторых гликопротеинов входят гликозаминогликаны (прежнее название комплекса — мукополисахариды; синонимы: гликозаминопротеогликаны, протеогликаны), иногда встречающиеся в тканях и в свободном состоянии. К гликозаминогликанам относятся гиалуроновая и хондроитинсерная кислоты, химический состав, структура и функции которых подробно рассматриваются в главе 20. Связь между углеводным компонентом и белковой частью в разных гликопротеинах осуществляется через одну из трех аминокислот: аспарагин, серин или треонин.

Гиалуроновая кислота входит в состав внеклеточного основного вещества соединительной ткани, содержится в клеточных оболочках, а также в значительных количествах в синовиальной жидкости и стекловидном теле. Молекулярная масса ее колеблется от 10^5 до 10^7 дальтон. Полимерная линейная структура гиалуроновой кислоты обеспечивается регулярным чередованием дисахаридных единиц, состоящих из D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных $\beta(1 \rightarrow 3)$ -гликозидной связью (см. главу 9). Между собой эти структурные единицы дисахаридов соединены обычными $\beta(1 \rightarrow 4)$ -связями; последние разрываются при действии фермента гиалуронидазы.

Хондроитинсерная кислота также является полимерной молекулой внеклеточного основного вещества (молекулярная масса около 50 000 Да) и имеет аналогичную с гиалуроновой кислотой структуру, с тем единственным отличием, что вместо N-ацетил-D-глюкозамина в ее состав входит N-ацетил-D-галактозамин, к гидроксильной группе 4-го углеродного атома которого присоединена сульфатная группа¹.

К биологически активным гликопротеинам относятся открытые в последнее десятилетие и н т е р ф е р о н ы, синтезируемые в животных клетках в ответ на возбуждение экзогенным стимулятором; они наделены антивирусными и противоопухолевыми свойствами и оказывают клеточно- и иммунорегуляторное действие. Различаются интерфероны содержанием углеводных компонентов, разной последовательностью аминокислот, молекулярной массой и фармакологическим действием. В настоящее время не только выяснена первичная структура интерферонов (содержат около 160 аминокислотных остатков), но и методами генной инженерии синтезированы α -, β - и γ -интерфероны. Установлено, что после завершения синтеза белковой части молекулы происходит присоединение углеводного компонента, и затем полная молекула интерферона секретируется клеткой. Отличительными особенностями состава интерферонов являются высокое содержание гидрофобных аминокислот и наличие всего одного остатка пролина.

Из других гликопротеинов, выполняющих ряд важнейших биологических функций, следует отметить все белки плазмы крови (за исключением альбуминов), трансферрин, церулоплазмин, гонадотропный и фолликулостимулирующие гормоны, некоторые ферменты, а также гликопротеины в составе слюны (муцин), хрящевой и костной тканей и яичного белка (овомукоид). Следует отметить, что углеводные компоненты, помимо информативной функции, значительно повышают стабильность

¹ Иногда сульфатная группа связана сложноэфирной связью с 6-м атомом углерода ацетилгалактозамина.

молекул, в состав которых они входят, к различного рода химическим, физическим воздействиям и предохраняют их от действия протеиназ, определяя тем самым биологическую роль гликопротеинов. Являясь составной частью клеточной оболочки, гликопротеины участвуют, кроме того, в иммунологических реакциях, ионном обмене, процессах межклеточной адгезии и т. д.

МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ

К металлопротеинам относятся биополимеры, содержащие, помимо белка, ионы какого-либо одного или нескольких металлов. К таким белкам принадлежат, например, белки, содержащие негемовое железо, а также белки, координационно связанные с атомами металлов в составе сложных белков-ферментов.

Типичными представителями первых являются железосодержащие белки: ферритин, трансферрин и гемосидерин. Ферритин — высокомолекулярный водорастворимый белок с молекулярной массой 400 000, в котором содержание железа составляет от 17 до 23 % (в среднем 20 %). Он сосредоточен главным образом в селезенке, печени, костном мозге, выполняя роль депо железа в организме. Железо в ферритине находится в окисленной форме, в составе неорганического железосодержащего соединения: $(\text{FeO} \cdot \text{OH})_8 \cdot (\text{FeO} \cdot \text{O} \cdot \text{PO}_3\text{H}_2)$, причем цепи неорганического полимера $\text{O} = \text{Fe} - \text{OH} \dots \text{O} = \text{Fe} - \text{OH} \dots$, иногда содержащие фосфаты, находятся между пептидными цепями белковой части (называемой апоферритином), и атомы железа координационно связываются с атомами азота пептидных групп.

Трансферрин — растворимый в воде железопrotein (с молекулярной массой 90 000), гликопротеин, обнаруживаемый главным образом в сыворотке крови в составе β -глобулинов. Содержание железа в нем составляет 0,13 %. Предполагают, что атом железа соединяется с белком координационными связями с участием гидроксильных групп тирозина. Молекула трансферрина содержит 2 атома железа; трансферрин служит физиологическим переносчиком железа в организме.

Гемосидерин в отличие от ферритина и трансферрина является водонерастворимым железосодержащим белковым комплексом, состоящим, кроме того, на 25 % из нуклеотидов и углеводов. Он содержится главным образом в ретикулоэндотелиоцитах печени и селезенке. Биологическая роль гемосидерина изучена недостаточно.

Ко второй группе металлопротеинов относится ряд ферментов, для которых металл служит или мостиком между белковым компонентом и субстратом, или, что более вероятно, металл в них непосредственно выполняет каталитическую функцию. Имеющиеся данные о некоторых ферментах, активность которых зависит от присутствия ионов металлов, суммированы в табл. 2.3.

Таблица 2.3. Металлозависимые ферменты

Название фермента	Металл	Название фермента	Металл
Алкогольдегидрогеназа Карбоангидраза Карбоксипептидаза	Zn^{2+}	Аргиназа Фосфотрансферазы	Mn^{2+}
Фосфогидролазы Фосфотрансферазы		Тирозиназа Цитохромоксидаза	
Цитохромы Пероксидаза Каталаза	$\text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+}$	Фосфопируваткиназа АТФазы	$\text{K}^+, \text{Mg}^{2+}$ Na^+, K^+ $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$
Ферредоксин-НАДФ-оксидоредуктаза		Ксантинооксидаза Нитрогеназа Нитратредуктаза	

Трудно назвать в наше время область естествознания, которую не интересовала бы проблема структуры и функции нуклеиновых кислот. Несмотря на огромный прогресс, достигнутый в последние четыре десятилетия при изучении химического состава и строения нуклеиновых кислот, много проблем предстоит еще решить для выяснения зависимости между структурой и биологической ролью нуклеиновых кислот. Нет сомнения, что именно на этом пути научного поиска исследования нуклеиновых кислот будут сделаны открытия, имеющие огромное значение для биологии, медицины и всей науки о живом. Эпохальное открытие принципа комплементарности нуклеиновых кислот позволило проникнуть в тайны не только тонкой структуры этих биополимеров, но и механизмов синтеза и воспроизведения биологических макромолекул. Нуклеиновые кислоты выполняют ряд важных биологических функций, не свойственных другим полимерам, основными из которых являются следующие: обеспечение хранения и передачи наследственной информации и непосредственное участие в механизмах реализации этой информации путем программирования синтеза всех клеточных белков. Структурные компоненты нуклеиновых кислот выполняют, кроме того, функции кофакторов, аллостерических эффекторов, входят в состав коферментов, принимая тем самым непосредственное участие в обмене веществ, а также аккумуляции, переносе и трансформации энергии. Подробно функции нуклеиновых кислот будут рассмотрены в главе 13.

Методы выделения нуклеиновых кислот. При изучении химического состава и строения нуклеиновых кислот перед исследователем всегда стоит задача выделения их из биологических объектов. В главе 2 было указано, что нуклеиновые кислоты являются составной частью сложных белков — нуклеопротеинов, содержащихся во всех клетках животных, бактерий, вирусов, растений. Нуклеиновые кислоты обладают сильно выраженными кислыми свойствами (обусловленными остатками ортофосфорной кислоты в их составе) и при физиологических значениях рН несут отрицательный заряд. Этим объясняется одно из важных свойств нуклеиновых кислот — способность к взаимодействию по типу ионной связи с основными белками (гистонами), ионами металлов (преимущественно с Mg^{2+}), а также полиаминами (спермином, спермидином) и путресцином. Поэтому для выделения нуклеиновых кислот из комплексов с белками необходимо прежде всего разрушить эти сильные и многочисленные электростатические связи между положительно заряженными молекулами белков и отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот. Для этого измельченный путем гомогенизации биоматериал обрабатывают крепкими солевыми растворами (10% раствор хлорида натрия) с последующим осаждением нуклеиновых кислот этанолом. В настоящее время для выделения нуклеиновых кислот в нативном состоянии пользуются более мягким фенольным методом, основанным на обработке нейтрального забуференного раствора нуклеопротеинов фенолом. Обычно эту процедуру проводят в присутствии веществ, вызывающих денатурацию белкового компонента, например додецилсульфата (ДСН) или салицилата натрия, затем смесь подвергают центрифугированию. При этом денатурированный белок попадает в фенольную фазу, а нуклеиновые кислоты остаются в водной среде, из которой их осаждают на холоду добавлением 2–3 объемов этанола. Этим методом удается получить достаточно очищенные препараты нуклеиновых кислот.

Таким образом, способ получения нуклеиновых кислот из комплексов нуклео-протеинов можно представить в виде следующей схемы:



В настоящее время применяют ряд усовершенствованных методов разделения нуклеиновых кислот на фракции из суммарного препарата, полученного описанным выше методом. В их числе хроматография на геле фосфата кальция, ионообменная хроматография (в качестве адсорбентов применяют ДЭАЭ-целлюлозу, ДЭАЭ-сефадекс и др.), ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы, хроматография по сродству на белковых носителях, фильтрация через гели агарозы и сефарозы, гель-электрофорез и др.

После получения нуклеиновых кислот в чистом виде их подвергают гидролизу для изучения химического состава. Для этих целей используют ферментативные методы (экзо- и эндонуклеазы), а также чисто химические методы гидролиза, в частности нагревание нуклеиновых кислот с хлорной кислотой.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

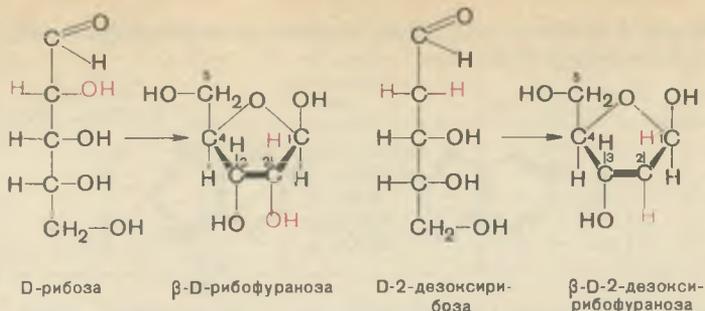
Нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) относятся к сложным высокомолекулярным соединениям, состоят из небольшого числа индивидуальных химических компонентов более простого строения. Так, при полном гидролизе нуклеиновых кислот (нагревание в присутствии хлорной кислоты) в гидролизате обнаруживаются пуриновые и пиримидиновые основания, углеводы (рибоза и дезоксирибоза) и фосфорная кислота¹:

ДНК	РНК
H_2PO_4	H_2PO_4
Дезоксирибоза	Рибоза
Аденин	Аденин
Гуанин	Гуанин
Цитозин	Цитозин
Тимин	Урацил

В молекуле ДНК углевод представлен дезоксирибозой, а в молекуле РНК — рибозой, отсюда и их названия: дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК) кислоты. Кроме того, они содержат фосфорную кислоту, по два пуриновых и по два пиримидиновых основания; отличия касаются только пиримидиновых оснований: в ДНК содержится тимин, а в РНК — урацил. В составе ДНК и РНК открыты так называемые минорные (экзотические) азотистые основания; строение некоторых из них приводится ниже.

Углеводы (рибоза и дезоксирибоза) в молекулах ДНК и РНК находятся в β -D-рибофуранозной форме:

¹ Поскольку в составе ДНК открыт также кремний в количестве 0,26—0,31%, предполагают, что он в нуклеиновых кислотах изоформен фосфору и способен включаться в полинуклеотидную последовательность.

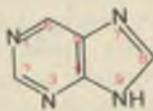


В составе некоторых фаговых ДНК обнаружена молекула глюкозы, которая соединяется гликозидной связью с 5-оксиметилцитозином.

В основе структуры пуриновых и пиримидиновых оснований лежат два ароматических гетероциклических соединения – пурин и пиримидин¹:



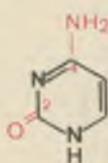
Пиримидин



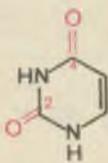
Пурин

Молекула пурина состоит из двух конденсированных колец: пиримидина и имидазола.

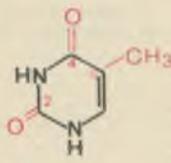
В составе нуклеиновых кислот встречаются три главных пиримидиновых основания: урацил, цитозин и тимин:



Цитозин

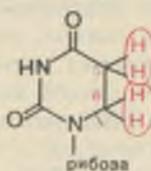


Урацил

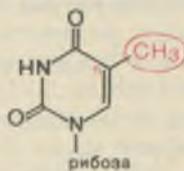


Тимин

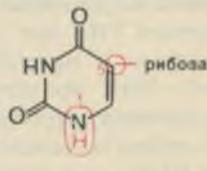
Помимо главных пиримидиновых оснований, в составе нуклеиновых кислот открыты минорные пиримидиновые основания, метил- и оксиметилцитозин, дигидроурацил, псевдоуридин, 1-метилурацил и др. Забегая несколько вперед, укажем, что только для тРНК список минорных оснований приближается к 50. На долю минорных оснований приходится до 10% всех нуклеотидов тРНК, что имеет, очевидно, важный физиологический смысл (защита молекулы РНК от действия гидролитических ферментов). Структурные формулы ряда минорных пиримидиновых оснований представлены ниже в форме нуклеозидов (соединений с углеводным компонентом):



Дигидроуридин



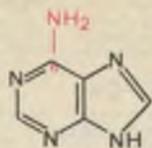
Риботимидин



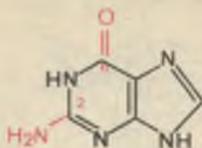
Псевдоуридин

¹ Для удобства представления структурных формул азотистых оснований и углеводов в дальнейшем будут опущены из структуры колец атомы С и Н.

Два пуриновых основания, постоянно встречающихся в гидролизатах нуклеиновых кислот, имеют следующее строение:

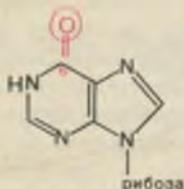


Аденин

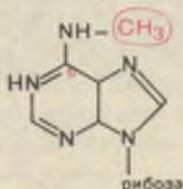


Гуанин

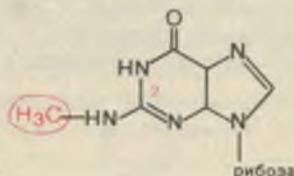
К минорным нуклеозидам пуринового ряда, обнаруживаемым в составе ДНК и РНК, относятся инозин, N⁶-метиладенозин, N²-метилгуанозин и др.



Инозин

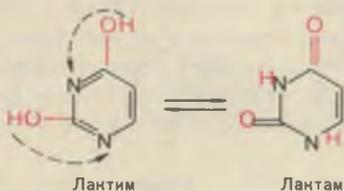


N⁶-Метиладенозин



N²-Метилгуанозин

Одним из важных свойств азотистых оснований (содержащих оксигруппы) является возможность их существования в двух таутомерных формах, в частности лактим- и лактамной формах, в зависимости от значения pH среды. Таутомерные превращения можно представить на примере урацила.



Оказалось, что в составе нуклеиновых кислот все оксипроизводные пуринов и пиримидинов находятся в лактамной форме.

Относительно локализации и количественного содержания нуклеиновых кислот в клетках получены определенные данные. Доказано, что количественное содержание ДНК в клетках одного и того же организма отличается удивительным постоянством и исчисляется несколькими пикограммами, однако в клетках разных видов живых организмов имеются существенные количественные различия в содержании ДНК. Хорошо известно также, что ДНК преимущественно сосредоточена в ядре, а в митохондриях и хлоропластах содержится только небольшой процент клеточной ДНК. В отношении РНК нет точных количественных данных, поскольку содержание ее в разных клетках в значительной степени определяется интенсивностью синтеза белка. На долю РНК приходится около 5–10% от общей массы клетки. Современная классификация различных типов клеточной РНК основывается на данных топографии, функции и молекулярной массе. В соответствии с этим различают три главных вида РНК: матричная (или информационная) РНК (мРНК) составляет 2–3% от всей клеточной РНК, рибосомная РНК (рРНК) – 80–85%, транспортная РНК (тРНК) – около 16%, отличающихся различным нуклеотидным составом и функцией. В табл. 3.1 приводятся свойства разных типов клеточной РНК (по А. Ленинджеру).

Таблица 3.1. Свойства РНК у *E. coli*

Типы РНК	Скорость седиментации (в ед. Сведберга S)	Молекулярная масса	Число нуклеотидных остатков	Процент от общей РНК
мРНК	6–25	250 000–1 000 000	75–3000	~2
тРНК	4	23 000–30 000	75–90	16
рРНК	5	~35 000	~120	82
рРНК	16	~550 000	~1500	
рРНК	23	~1 100 000	~3100	

Матричная РНК (мРНК) синтезируется в ядре на матрице ДНК, затем поступает в рибосому, выполняя матричную функцию при синтезе белка. По предположению акад. А. С. Спирина часть мРНК при поступлении из ядра в цитоплазму образует со специфическими РНК-связывающими белками комплексы, так называемые информсомы, способные к обратимой диссоциации; информсомы рассматриваются как транспортная форма мРНК, способствующая образованию полирибосом в цитоплазме. Транспортные РНК (тРНК) обладают небольшой молекулярной массой и содержатся в растворимой фракции цитоплазмы, выполняя функцию переноса аминокислот к месту белкового синтеза — рибосоме. Рибосомные РНК (рРНК), как видно из табл. 3.1, имеют разную и значительно большую молекулярную массу. Они локализируются в двух субчастицах рибосом 50S и 30S у *E. coli* и 60S и 40S в клетках животных (табл. 3.2). Видно, что 60S субчастица содержит три разных рРНК (5S, 5.8S и 28S рРНК), в то время как 40S субчастица содержит одну молекулу — 18S рРНК. Функция рРНК в белковом синтезе пока не выяснена.

Таблица 3.2. Состав рибосомных РНК эукариот

Размер субчастицы (в ед. Сведберга S)	Молекулярная масса субчастицы, Да	Размер РНК (в ед. Сведберга, S)	Молекулярная масса РНК, Да
60 (более 50 белков)	2,7 · 10 ⁶	5	35 000
		5,8	45 000
		28	1,5 · 10 ⁶
40 (более 30 белков)	1,3 · 10 ⁶	18	750 000

СТРУКТУРА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Для понимания ряда особенностей структуры ДНК важное значение имеют закономерности количественного содержания азотистых оснований, установленные впервые Э. Чаргаффом (1949) и названные правилами Чаргаффа. При анализе состава очищенной ДНК, выделенной из разных источников, оказалось:

- 1) молярная доля пуринов¹ равна молярной доле пиримидинов:

$$A + G = C + T \text{ или } \frac{A + G}{C + T} = 1;$$

- 2) количество аденина и цитозина равно количеству гуанина и тимина:

$$A + C = G + T \text{ или } \frac{A + C}{G + T} = 1;$$

¹ Здесь и далее пуриновые и пиримидиновые основания будут обозначены начальными буквами соответствующего названия.

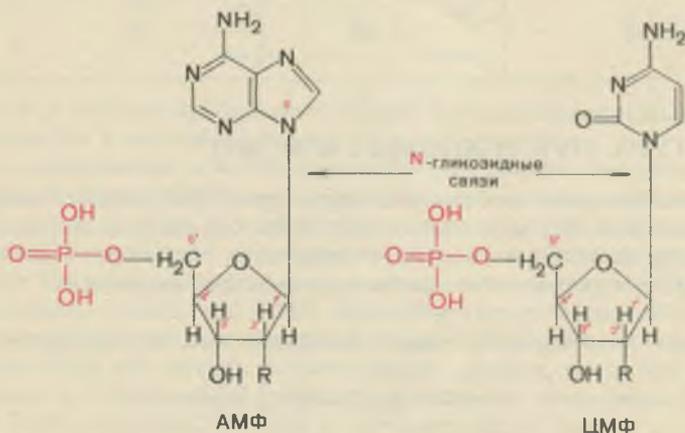
3) количество аденина равно количеству тимина, а количество гуанина равно количеству цитозина: $A = T$ и $G = C$; соответственно $\frac{A}{T} = 1$; $\frac{G}{C} = 1$;

4) кроме того, существенным для характеристики вида (таксономическое значение) оказался так называемый коэффициент специфичности, отражающий отношение $\frac{G + C}{A + T}$; это отношение часто выражают в молярных процентах $(G + C)$, или процентах ГЦ-пар. Для животных и большинства растений этот коэффициент ниже единицы (от 0,54 до 0,94), у микроорганизмов он колеблется в значительных пределах (от 0,45 до 2,57).

Данные, полученные А. Н. Белозерским и его учениками, свидетельствуют о существовании в природе АТ-типа ДНК (у хордовых и беспозвоночных животных, высших растений, ряда бактерий, дрожжевидных организмов) и ГЦ-типа ДНК (недрожжевидных грибов, актиномицетов, ряда бактерий и вирусов).

Известно, что структурной единицей нуклеиновых кислот являются мономерные молекулы, получившие название мононуклеотидов. Следовательно, нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды. Это продукты полимеризации мононуклеотидов, число и последовательность расположения которых в цепях ДНК и РНК определяются в строгом соответствии с программой, заложенной в молекуле матрицы (см. главу 12). Мононуклеотиды легко образуются при гидролизе ДНК и РНК в присутствии нуклеаз. Мононуклеотиды состоят из трех специфических компонентов: азотистого основания, углевода и фосфорной кислоты. В этой «триаде» мононуклеотида углевод занимает среднее положение. Соединения азотистого (любого) основания и углевода (пентозы), получившие название нуклеозидов, легко образуются из мононуклеотида при гидролитическом отщеплении фосфорной кислоты в присутствии щелочи или при участии специфических ферментов — нуклеотидаз.

Нуклеозиды содержат пуриновое или пиримидиновое основание, соединенное с углеводом N-гликозидной связью. В составе нуклеиновых кислот обнаруживаются только β-нуклеозиды. В качестве примера ниже представлены формулы двух мононуклеотидов — аденозин-5'-монофосфорной кислоты (АМФ) и цитидин-5'-монофосфорной кислоты (ЦМФ):



R у 2' углерода представлен H- или OH-группой в зависимости от типа нуклеиновой кислоты — ДНК или РНК. В образовании N-гликозидной связи в пуриновых нуклеотидах принимают участие N-9 пурина и C-1' пентозы, а в пиримидиновых нуклеотидах — N-1 пиримидина и C-1' пентозы. Для того, чтобы отличить углеродные атомы рибозы или дезоксирибозы от углеродных атомов, входящих в состав пуриновых

Таблица 3.3. Названия нуклеозидов и мононуклеотидов

Азотистые основания	Нуклеозиды (основание + углевод)	Мононуклеотиды (нуклеозиды + H_3PO_4)	Сокращенное обозначение
Пуриновые	Аденин	Аденозин	АМФ
	Гуанин	Гуанозин	ГМФ
Пиримидиновые	Урацил	Уридин	УМФ
	Цитозин	Цитидин	ЦМФ
	Тимин	Тимидин	ТМФ

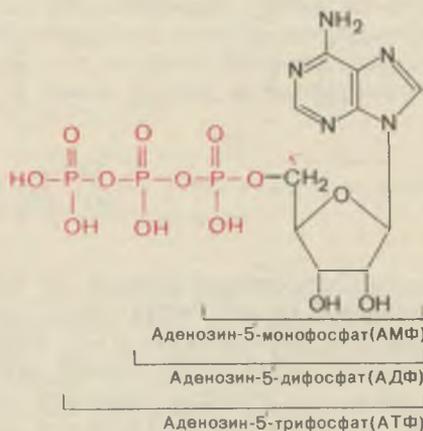
и пиримидиновых оснований, первые принято обозначать символом «штрих», например атомы у 3-го и 5-го углерода обозначаются С-3' и С-5' или, чаще, 3' и 5'.

Следует отметить, что среди продуктов ферментативного гидролиза ДНК и РНК обнаруживаются, помимо нуклеозид-5'-монофосфатов, также нуклеозид-3'-монофосфаты; положение фосфата всецело определяется местом разрыва фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами, что указывает на характер связи нуклеотидов через остаток фосфорной кислоты, соединяющий 3' и 5' углеродные атомы пентозы.

В табл. 3.3 представлены состав и названия (включая тривиальные и сокращенные обозначения) нуклеозидов и нуклеотидов (с тем добавлением, что в случае РНК они называются рибонуклеотидами, а в случае ДНК — дезоксирибонуклеотидами).

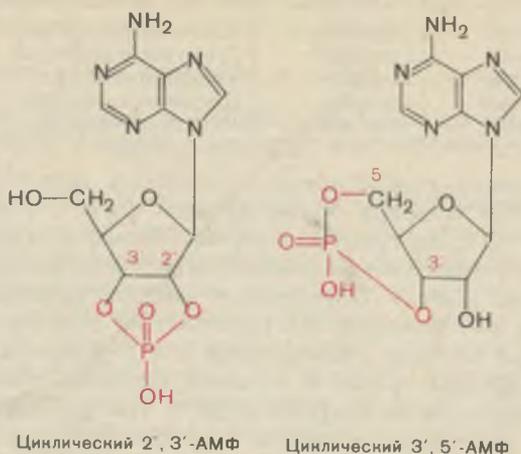
Мононуклеотиды и их производные, а также динуклеотиды присутствуют в клетках в свободном виде и играют важную роль в обмене веществ. В частности, нуклеотидную структуру имеют многие коферменты, включая коферменты оксидоредуктаз. Мононуклеотиды, присоединяя еще один остаток фосфата, образуют фосфоангидридную связь (наподобие связи, имеющейся в пирофосфате) и превращаются в нуклеозиддифосфаты; последние, присоединяя еще один остаток фосфата, образуют нуклеозидтрифосфаты.

Свободные нуклеозидтрифосфаты в клетках являются предшественниками ферментативного синтеза ДНК и РНК (см. главу 12). Одной из важнейших функций нуклеозидтрифосфатов и в особенности АТФ является участие в энергетическом обмене. Ниже представлена схема образования молекул нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатов (атомы водорода в кольце рибозы опущены):



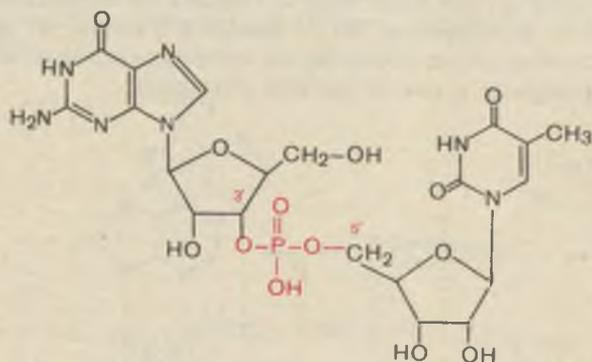
Необходимо указать на существование в организме еще двух типов фосфорных эфиров нуклеотидов: когда фосфат связывает 2 атома кислорода пентозного остатка в одном и том же нуклеотиде и когда фосфатный мостик объединяет два разных мононуклеотида. Примером первого являются циклические нуклеотиды 2',3'- и 3',5'-,

т. е. два возможных класса соединений, в которых кислородные атомы у С-2' и С-3' или у С-3' и С-5' участвуют в образовании циклической структуры:



Первое из этих соединений, 2',3'-АМФ, образуется в качестве промежуточного продукта распада рибонуклеиновых кислот, в то время как циклический 3',5'-АМФ является естественно встречающимся рибонуклеотидом, обладающим рядом уникальных функций и высокой биологической активностью в регуляции процессов обмена веществ.

В качестве примера, когда одна фосфатная группа связывает два разных рибонуклеотида, можно привести структуру гуанозилтимидинфосфата:

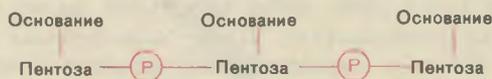


Это соединение хотя и не обнаружено в природе, но содержит тип связи, характерный для природных нуклеиновых кислот. Видно, что С-3' рибозы одного нуклеотида соединяется посредством фосфоэфирной связи с С-5' рибозы второго нуклеотида.

Помимо тех сокращенных названий и обозначений нуклеозидов и нуклеотидов, которые представлены в табл. 3.3, приняты буквенные обозначения нуклеозидов (и нуклеотидов), в частности для аденозина (и АМФ) — А, для гуанозина (и ГМФ) — Г, для цитидина (и ЦМФ) — Ц, для уридина (и УМФ) — У; для тимидина (и ТМФ) — Т. Пользуясь этими символами, приведенный выше дирибонуклеозидмонофосфат можно обозначить как Г—Т. Заметим, что как по структуре, так и по свойствам Г—Т и Т—Г будут сильно отличаться друг от друга (как и в случае дипептидов).

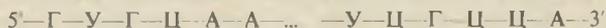
Первичная структура нуклеиновых кислот

Под первичной структурой нуклеиновых кислот понимают порядок, последовательность расположения мононуклеотидов в полинуклеотидной цепи ДНК и РНК. Она стабилизируется 3',5'-фосфодиэфирными связями. Поскольку молекулярная масса нуклеиновых кислот колеблется в широких пределах (от $2 \cdot 10^4$ до $10^{10} - 10^{11}$), установить первичную структуру всех известных РНК и особенно ДНК представляется задачей весьма сложной. Тем не менее во всех нуклеиновых кислотах (точнее, в одноцепочечной нуклеиновой кислоте) имеется один и тот же тип связи — 3',5'-фосфодиэфирная связь между соседними нуклеотидами. Эту общую основу структуры можно представить следующим образом:



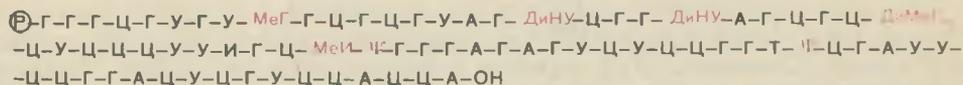
Установлено, что в образовании межнуклеотидной связи участвуют гидроксильные группы в 3'- и 5'-положениях остатков углевода.

К настоящему времени удалось определить первичную структуру почти всех тРНК, ряда молекул 5S рРНК, 16S рРНК *E. coli*, ряда вирусных РНК, в состав которых входят сотни и тысячи нуклеотидных остатков. Ниже приводится примерная схема последовательности нуклеотидов в молекуле РНК. Все клеточные РНК в основном состоят из одонитевой полинуклеотидной цепи:



Полинуклеотидная цепь молекулы РНК имеет на одном конце почти всегда свободный монофосфорный эфир, который принято обозначать как 5'-конец; на противоположном конце цепи такой фосфат отсутствует, а содержится нуклеотид со свободными 2'- и 3'-гидроксильными группами. Если подвергнуть щелочному гидролизу приведенную выше молекулу, то в качестве конечного нуклеотида будет обнаружен ГМФ со свободным фосфатом у 5'-конца и свободный аденозин в виде свободного нуклеозида у 3'-конца полинуклеотидной цепи.

В выяснении первичной структуры РНК решающую роль сыграли методы ступенчатого гидролиза, осуществленного в основном экзонуклеазами и заключающегося в последовательном отщеплении по одному мононуклеотиду с одного конца молекулы нуклеиновой кислоты. Ниже представлена первичная структура первой РНК, имеющей 77 нуклеотидов, для которой была расшифрована нуклеотидная последовательность в 1965 г. Р. Холли и сотр., а именно аланиновой тРНК:



где P — остаток фосфата; ψ — псевдоУМФ; MeГ — метилгуанин; ДиНУ — дигидроурацил; ДиМеГ — диметилгуанин; МеИ — метилиозин.

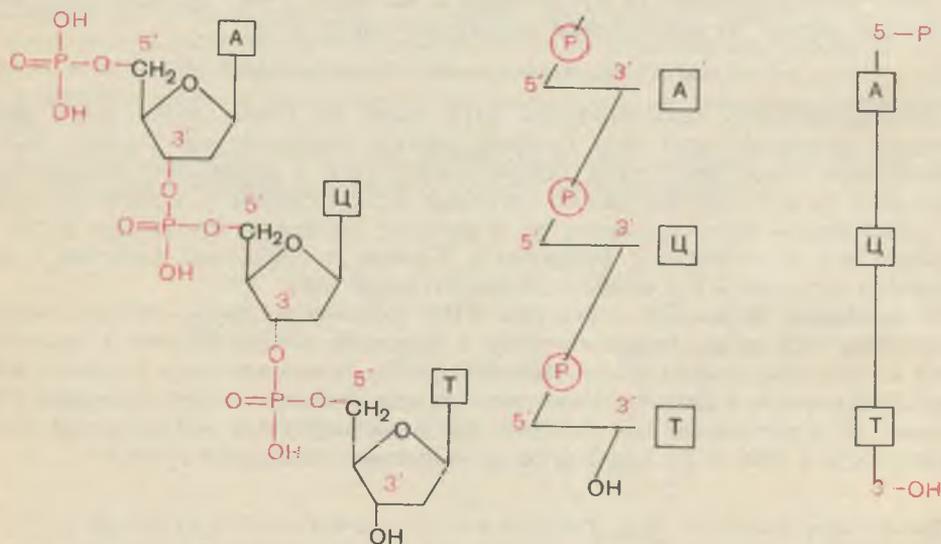
Следует особо указать на две весьма существенные особенности первичной структуры всех тРНК. Первая из них заключается в том, что 5'-концом всегда является гуаниловая (и редко цитидиловая) кислота, несущая свободный остаток фосфата у С-5', вторая особенность связана с наличием на противоположном конце молекулы остатков трех мононуклеотидов с одинаковой последовательностью — ЦЦА, причем остаток адениловой кислоты содержит свободную 3'-ОН-группу¹. Между

¹ О других особенностях структуры тРНК сказано в главе 12.

этим структурами в строго определенной последовательности располагаются все остальные нуклеотидные остатки, среди которых на долю минорных нуклеотидов приходится до 10%. Полинуклеотидная цепь разных типов тРНК содержит от 75 до 90 нуклеотидов.

В последние годы расшифрована первичная структура не только низкомолекулярных 5S рРНК разных бактерий и 5,8S рРНК клеток животных, но и высокомолекулярных 16S и 18S рРНК, насчитывающих до 1200–1500 нуклеотидных звеньев. Более того, в самое последнее время выяснена нуклеотидная последовательность 23S рРНК *E. coli* и 25S рРНК дрожжевой клетки. Предприняты исследования по определению первичной структуры высокомолекулярных (28S) рРНК клеток эукариот.

Первичную структуру какой-либо молекулы ДНК пока не удалось установить, поскольку молекулярная масса даже самой маленькой молекулы ДНК фагов и вирусов исчисляется миллионами дальтон. Пока расшифрована нуклеотидная последовательность только отдельных фрагментов одноцепочечной молекулы ДНК, в частности структура галактозного, лактозного и триптофанового оперонов вирусов или фагов, гена тирозиновой РНК, фрагментов ДНК бактериофага $\phi 1, \phi X174$ и др. Установлено, что во всех этих случаях нуклеотиды оказались связанными последовательно сложноэфирной связью остатка фосфата с 3'-гидроксильной группой дезоксирибозы, т. е. 3',5'-фосфодиэфирными мостиками, аналогично первичной структуре РНК. Ниже представлены три варианта схемы нуклеотидной последовательности ДНК:



В последнее время о первичной структуре ДНК (точнее, отдельных ее фрагментов) судят по ряду косвенных данных. Например, по степени сблоченности нуклеотидных звеньев в молекуле ДНК (определение сводится в конечном счете к выяснению числа и структуры отдельных фракций нуклеотидов, так называемых изоплитов), а также по кинетике реассоциации ДНК (метод позволяет выяснить наличие в молекуле повторяющихся последовательностей нуклеотидов). О первичной структуре ДНК судят, кроме того, по распределению минорных оснований (имеются данные о существовании подобной закономерности) и по обнаружению в ДНК и определению последовательности палиндромов («обратно бегущие» последовательности или перевертыши), которые обнаруживаются главным образом в местах рестрикции (см. главу 13). Большие надежды в определении первичной структуры ДНК исследователи возлагают на физические, химические (синтез генов), генетические и другие

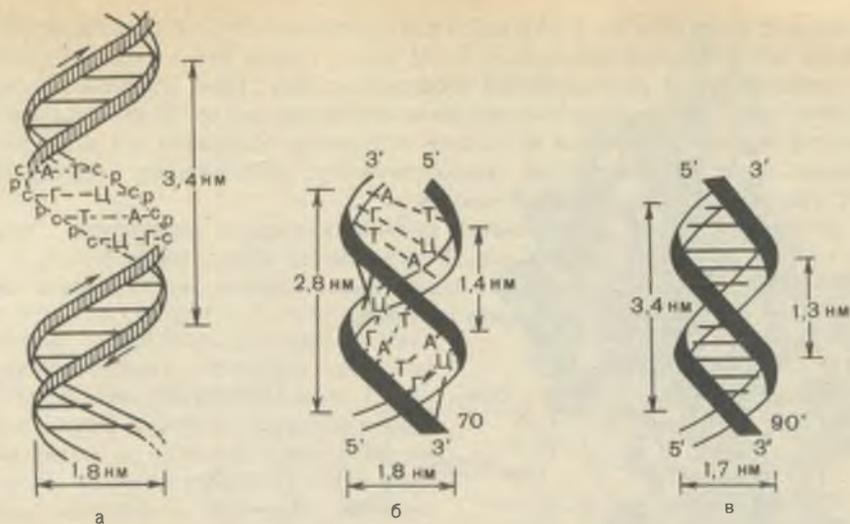


Рис. 3.1. Схематическое изображение двойной спирали ДНК.

а – по Уотсону и Крику; б – А-форма ДНК; в – В-форма ДНК; с – остаток дезоксирибозы; р – остаток фосфорной кислоты.

методы, а также методы выделения некоторых генов (или их фрагментов) из природных источников и синтеза генов на мРНК при участии фермента обратной транскриптазы. Для определения первичной структуры ДНК недавно предложен экспресс-метод, включающий применение двух ДНК-полимераз (полученных из *E. coli* и из бактериофага Т4). Однако во всех этих случаях определяется структура небольшого участка ДНК, поэтому полная расшифровка первичной структуры ДНК генома ждет своего решения¹.

Вторичная структура нуклеиновых кислот

В соответствии с моделью Дж. Уотсона и Ф. Крика, предложенной в 1953 г. на основании ряда аналитических данных, а также рентгеноструктурного анализа, молекула ДНК состоит из двух цепей, образуя правовращающую спираль, в которую обе полинуклеотидные цепи закручены вокруг одной и той же оси. Удерживаются цепи благодаря водородным связям, образующимся между их азотистыми основаниями (см. рис. 3.1). Обе цепи полинуклеотидов в биспиральной молекуле ДНК имеют строго определенное пространственное расположение, при котором азотистые основания находятся внутри, а фосфорильные и углеводные компоненты – снаружи².

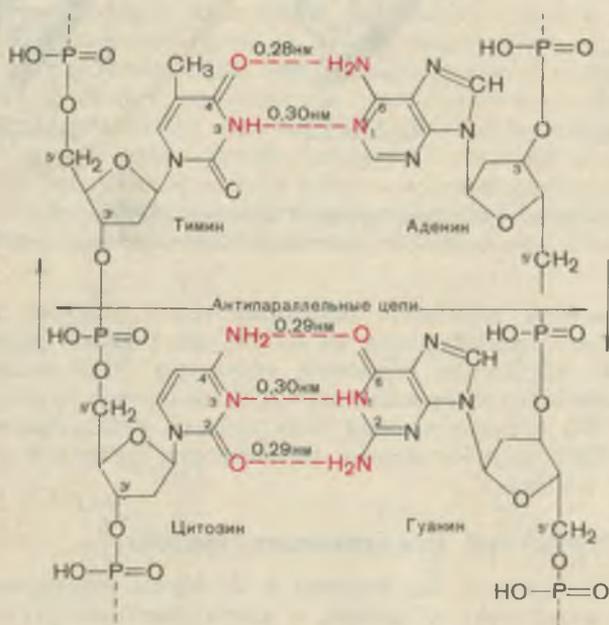
Детальный анализ всевозможных вариантов образования водородных связей между основаниями показал, что в биспиральной молекуле ДНК основания уложены парами: пурин из одной цепи и пиримидин из другой в соответствии с правилами Чаргаффа. Поскольку и ориентация оснований на плоскости не является, очевидно, произвольной, и так как основания в полинуклеотидах содержатся в лактамной форме, наиболее вероятными были признаны пары аденин – тимин и гуанин – цитозин. Следует указать, что этот способ спаривания получил в дальнейшем полное экспериментальное подтверждение. Избирательность взаимодействия А – Т и Г – Ц пар принято выражать термином комплементарность, а соответствующие азотистые осно-

¹ Недавно предприняты попытки изучить с помощью ЭВМ первичную структуру ДНК генома человека.

² За это открытие Дж. Уотсон и Ф. Крик вместе с М. Уилкинсом получили Нобелевскую премию в 1962 г.

вания называют комплементарными. Стабильность А–Т оснований обеспечивается двумя водородными связями, а Г–Ц пар – тремя, что в свою очередь определяется особенностями расположения функциональных групп азотистых оснований. Длина водородных связей между основаниями составляет около 0,3 нм. Таким образом, комплементарными оказываются не только отдельные основания, но и дезоксирибонуклеотидные цепи ДНК в целом, способствующие образованию весьма компактной структуры и стабилизации всей молекулы¹.

Обе цепи в молекуле ДНК имеют противоположную полярность. Это означает, что межнуклеотидная связь в одной цепи имеет направление 5' → 3', а в другой – 3' → 5'. Подобная направленность цепей имеет важное биологическое значение при репликации и транскрипции молекулы ДНК.



На модели ДНК (см. рис. 3.1) видно, что расстояние между витками (или шаг спирали) равно 3,4 нм. На этом участке укладываются 10 нуклеотидных остатков, размер одного нуклеотида составляет 0,34 нм; диаметр биспиральной молекулы равен 1,8 нм.

Необходимо указать, что конфигурация двойной спирали ДНК сильно меняется в зависимости от количественного содержания воды и ионной силы окружающей среды. Методами рентгеноструктурного анализа доказано существование по крайней мере четырех форм ДНК, названных А-, В-, С- и Т-формами. Конфигурация двух из них в простейшей форме представлена на рис. 3.1,б и в. Можно увидеть, что у А-формы наблюдается некоторое смещение пар оснований от оси молекулы к периферии, что отражается на размерах (2,8 нм – длина одного витка, в котором вместо 10 содержится 11 мононуклеотидов; меняется расстояние между нуклеотидами и др.). В настоящее время имеются основания считать, что между А- и В-формами ДНК осуществляются взаимные переходы. В-форма ДНК больше всего подходит к

¹ Данные, полученные в последние годы, свидетельствуют, что в стабилизации биспиральной структуры основную роль играют гидрофобные взаимодействия между комплементарными основаниями, стыкующимися в центре двойной спирали. Водородные связи, вероятнее всего, обеспечивают специфичность спаривания оснований.

Рис. 3.2. Молекулярная модель ДНК.

модели Уотсона и Крика. В этих переходах, которые могут быть вызваны растворителями или белками, очевидно, заключен определенный биологический смысл. Предполагается, что в А-форме ДНК выполняет роль матрицы в процессе транскрипции (синтез РНК на молекуле ДНК), а в В-форме — роль матрицы в процессе репликации (синтез ДНК на молекуле ДНК).

Менее охарактеризована вторичная структура матричных и рибосомных РНК. Относительно вторичной структуры тРНК наиболее вероятной представляется модель, предложенная Р. Холли, плоское изображение которой напоминает клеверный лист. В настоящее время, когда известна первичная структура тРНК, последовательность всех или почти всех природных тРНК как будто бы укладывается в эту схему «клеверного листа» (см. главу 12). При сравнении этих структур выявляется ряд закономерностей, несомненно имеющих определенный биологический смысл. Во всех тРНК имеются участки, взаимодействующие с рибосомами, места для связывания с аминокислотами и ферментами, а также специфическая последовательность трех нуклеотидов (триплет), называемая антикодоном, которая оказывается комплементарной тринуклеотидной последовательности мРНК (кодону), кодирующей включение в белковую молекулу определенной аминокислоты.

Третичная структура нуклеиновых кислот

На рис. 3.2 представлена молекулярная модель ДНК. Выделить нативную молекулу ДНК из большинства источников, в частности хромосом, чрезвычайно трудно из-за высокой чувствительности молекулы ДНК к нуклеазам тканей и гидродинамической

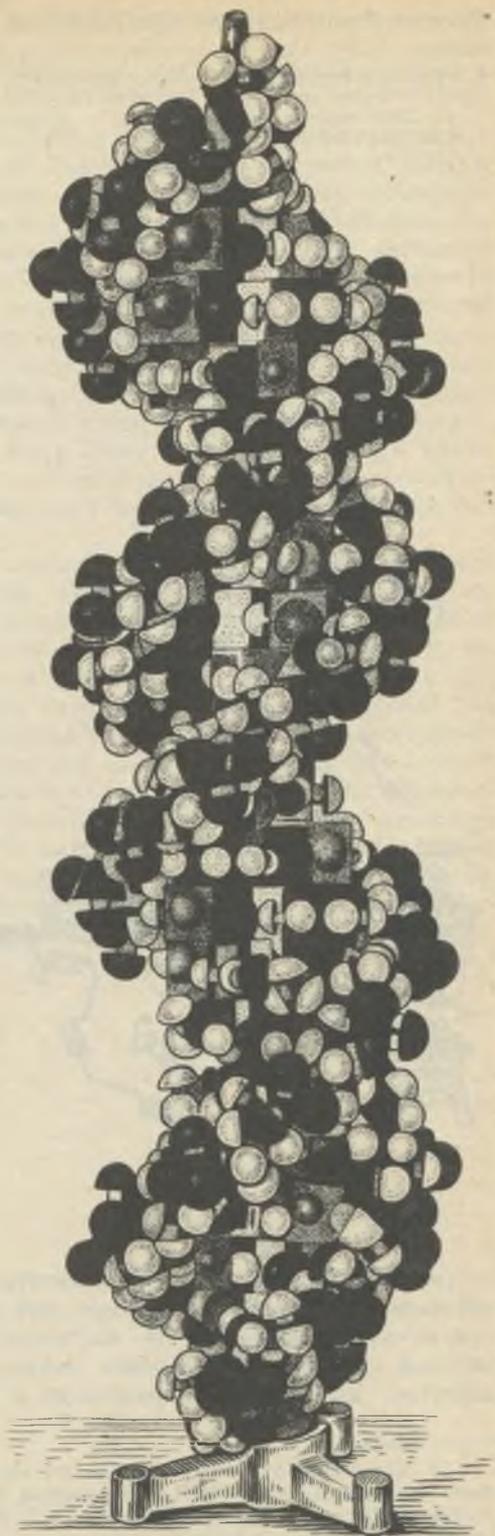


Рис. 3.3. Третичная структура ДНК (схема).

1 — линейная одноцепочечная ДНК — бактериофаг фХ174 и другие вирусы; 2 — кольцевая одноцепочечная ДНК вирусов и митохондрий; 3 — кольцевая двойная спираль ДНК.

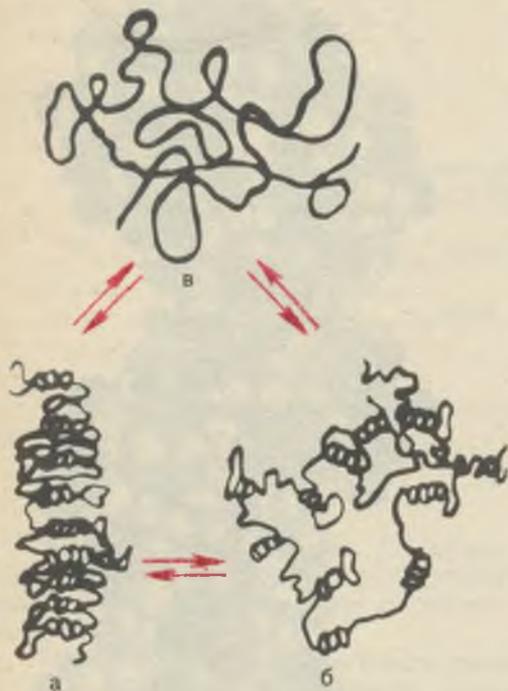
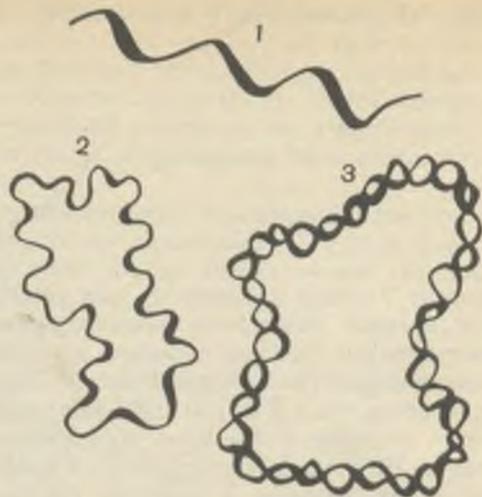


Рис. 3.4. Третичная структура рибосомной РНК в растворе в зависимости от ионной силы, температуры и рН среды (схема) (по А. С. Спирину и Л. П. Гавриловой).

а — компактная палочка; б — компактный клубок; в — развернутая цепь.

деструкции¹, поэтому удалось выделить в интактном (неповрежденном) виде только некоторые ДНК вирусов, митохондрий и хлоропластов. Исследования этих молекул при помощи физических (в частности, кристаллографических), физико-химических методов показали, что двойная спираль ДНК на некоторых участках может подвергаться дальнейшей спирализации с образованием суперспирали или открытой

¹ Был разработан швейцарский метод выделения нативной молекулы ДНК с использованием протеиназы К и ДСН. Выделенный из клеток почек обезьяны препарат ДНК имел необычно высокую молекулярную массу $2 \cdot 10^8$ Да. Однако даже в этом случае молекулярная масса на несколько порядков меньше, чем масса ДНК *in vivo*, исчисляемая $10^{10} - 10^{11}$ Да.

кольцевой формы. Оказалось также, что линейная ДНК может образоваться из кольцевой формы или существовать как таковая в природе. В некоторых вирусах обнаружены, кроме того, одноцепочечные ДНК линейной и кольцевой формы (рис. 3.3).

Образование кольцевой формы молекулы ДНК у бактерий или в митохондриях клеток животных часто вызвано ковалентным соединением их открытых концов. Известно, что суперспиральная (суперскрученная) структура обеспечивает экономную упаковку огромной молекулы ДНК в хромосоме: вместо 8 см длины, которую она могла бы иметь в вытянутой форме, в хромосоме человека молекула ДНК настолько плотно упакована, что ее длина укладывается в 5 нм. Степень суперспиральности (наличие супервитков) молекулы ДНК обычно удерживают по изменению константы седиментации в определенных условиях. Суперспирализация ДНК может быть нарушена разрывом в одной из цепей или обеих цепях двойной спирали под действием ДНКазы или при обработке интеркалирующими соединениями. Под интеркаляцией подразумевают встраивание плоских ароматических колец между стопками пар азотистых оснований ДНК. Интеркаляция может быть вызвана антибиотиками и красителями; в интактных клетках она может быть обусловлена ароматическими кольцами аминокислот, что имеет, очевидно, определенный биологический смысл в проблеме белково-нуклеинового узнавания.

Имеющиеся данные о структуре тРНК свидетельствуют о том, что нативные молекулы тРНК имеют примерно одинаковую третичную структуру, которая отличается от плоской структуры «клеверного листа» большей компактностью, образованной за счет складывания различных частей молекулы. Следует указать на существование у ряда вирусов (реовирус, вирус раневых опухолей растений и др.) природных двуцепочечных РНК, обладающих однотипной с ДНК структурой. Что касается одноцепочечных матричных и рибосомных РНК, то при физиологических значениях рН среды, ионной силы и температуры создаются условия для образования множества участков с двойной спиралью («шпильки») с дальнейшим формированием комплементарных участков, определяющих в известной степени жесткость их третичной структуры. В качестве примера на рис. 3.4 схематично представлена третичная структура рРНК. В настоящее время получены доказательства значимости ван-дер-ваальсовых (диполь-дипольных и лондоновских) связей между азотистыми основаниями в стабилизации общей пространственной конфигурации нуклеиновых кислот.

Глава 4

ФЕРМЕНТЫ

*«Современная биология говорит
на языке энзимологии»*

А. Е. БРАУНШТЕЙН

ПОНЯТИЕ О ФЕРМЕНТАХ

Ферменты, или энзимы, представляют собой высокоспециализированный класс веществ белковой природы, используемый живыми организмами для осуществления многих тысяч взаимосвязанных химических реакций, включая синтез, распад и взаимопревращения огромного множества и разнообразия химических соединений. Жизнь и многообразие ее проявлений — сложная совокупность химических реакций, катализируемых специфическими ферментами. И. П. Павлов считал ферменты «возбудителями всех химических превращений» у живых существ. Как известно, важнейшим свойством живого организма является обмен веществ, ускоряющим и направляющим аппаратом, основой молекулярных механизмов которого являются ферменты. «Вся тайна животной жизни, — писал Д. И. Менделеев, — заключается в непрерывных химических превращениях веществ, входящих в состав животных тканей».

В настоящее время теоретические и практические достижения энзимологии занимают ведущее место в решении многих проблем биохимии и молекулярной биологии, включая их сравнительное и эволюционное рассмотрение. «Под знаком молекулярной энзимологии, — говорил на III Всесоюзном биохимическом съезде (1974) А. Е. Браунштейн, — развивается и встречное течение — реконструкция или интеграция, восходящая от молекулярного яруса к высшим уровням структурно-функциональной организации живого и пронизывающая весь комплекс актуальных проблем биологии и медицины».

Ферменты обеспечивают осуществление таких важнейших процессов жизнедеятельности, как реализация наследственной информации, биоэнергетика, синтез и распад биомолекул, способствуя тем самым проникновению в суть и сокровенные тайны того загадочного явления, которое мы называем жизнью. Этими обстоятельствами может быть объяснено пристальное внимание исследователей к проблемам структуры, функций и молекулярных механизмов действия ферментов.

Ферменты отличаются рядом характерных особенностей от неорганических катализаторов. Прежде всего ферменты чрезвычайно эффективны и проявляют в миллионы раз более высокую каталитическую активность в условиях умеренной температуры (температура тела), нормального давления и в области близких к нейтральным значений рН среды.

Ферменты отличаются высокой специфичностью действия в отношении как химической природы субстрата, так и типа реакции, т. е. каждый фермент катализирует в основном только определенную химическую реакцию. Для каждого фермента характерны специфическая последовательность расположения аминокислотных остатков и пространственная конформация. Существенной особенностью ферментов является также то, что их активность в клетках строго контролируется как на генетическом уровне, так и посредством определенных низкомолекулярных соединений: субстратов и продуктов реакций, катализируемых этими же ферментами. Таким образом, молекула фермента характеризуется уникальностью структуры, которая и определяет уникальность ее функции.

Учение о ферментах выделено в самостоятельную науку — энзимологию. Термин «энзим» (от греч. *en zyme* — в дрожжах), так же как и «фермент» (от лат. *fermentatio* — брожение), означает процесс, связанный с выделением газов, брожением.

В настоящее время учреждены специальные научно-исследовательские институты по изучению ферментов, существует ряд специальных журналов, созываются национальные и международные симпозиумы и конференции, посвященные проблемам энзимологии. Наука о ферментах интенсивно развивается в тесной связи со многими науками, в частности с органической, неорганической и физической химией, физиологией, токсикологией, микробиологией, генетикой, фармакологией и др. Таким образом, эта область знаний находится на стыке химических, биологических и медицинских наук.

Энзимология в ее современном физико-химическом и молекулярном понимании решает две главные неразрывно связанные между собой проблемы, касающиеся, с одной стороны, структурной макромолекулярной организации ферментов, с другой — природы химических взаимодействий, лежащих в основе ферментативного катализа. По этим вопросам накопление экспериментальных данных и развитие теоретических представлений происходит настолько быстро, что любой учебник к моменту выхода в свет уже не отражает достаточно полно современное состояние вопроса о структуре и функции ферментов.

Важно подчеркнуть, что изучение ферментов имеет огромное значение для любой фундаментальной и прикладной области биологии, а также для многих практических отраслей химической, пищевой и фармацевтической индустрии, занятых приготовлением катализаторов, антибиотиков, витаминов и многих других биологически активных веществ, используемых в народном хозяйстве и медицине. На рис. 4.1 представлены основные области биологии и медицины, в которых идеи и методы энзимологии нашли широкое применение. В фармакологии действие многих лекарственных препаратов основано на определенном, хотя зачастую еще не выявленном, механизме взаимодействия их с ферментами. Успехи общей и молекулярной энзимологии способствуют развитию новой ее ветви — медицинской энзимологии, цепи и задачи, методологические подходы которой связаны с решением проблем энзимопатологии, энзимодиагностики и энзимотерапии. Наука о питании базируется на точных знаниях поэтапного расщепления питательных веществ под влиянием ферментов пищеварительного аппарата, на количественный и качественный состав которых существенно влияет характер поступающих с пищей веществ. Многие проблемы наследственной патологии человека тесно связаны с дефектами или полным отсутствием синтеза специфических ферментов. Проблемы клеточного роста и развития, дифференцировки, физиологических функций (движение, перемещение в пространстве, транспорт веществ, процессы возбуждения и торможения и др.) определяются в большой степени работой биокатализаторов, включая их биосинтез и инактивацию. Таким образом, есть все основания для подтверждения положения, что не только современная биология, как отмечал акад. А. Е. Браунштейн, но и медицина «говорит на языке энзимологии».

КРАТКАЯ ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ УЧЕНИЯ О ФЕРМЕНТАХ

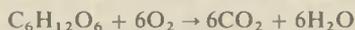
Явление брожения и переваривания известно с незапамятных времен, однако зарождение учения о ферментах (энзимологии) относится к первой половине XIX века. Первое научное представление о ферментах было дано в 1814 г. петербургским ученым К. С. Кирхгофом, который показал, что не только проросшие зерна ячменя, но и экстракты из солода способны осахаривать крахмал с превращением его в мальтозу. Вещество, извлекаемое из проросшего ячменя и обладающее способностью превращать крахмал в мальтозу, получило название амилазы. Ю. Либих и Ф. Велер открыли агент, расщепляющий амигдалин, содержащийся в эфирном масле горького миндаля. Действующий агент, содержащийся в миндале, был назван эмульсином. В



Рис. 4.1. Значение ферментов и энзимологии в биологии и медицине (по Грину).

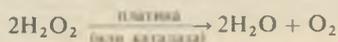
последующие годы были описаны другие ферменты, в частности пепсин и трипсин, вызывающие гидролиз белков в желудочно-кишечном тракте.

Наибольшее внимание исследователей привлекали процессы окисления в организме. Уже был известен феномен химического катализа, означающий, что многие реакции *in vitro* протекают быстро и энергично в присутствии ничтожных количеств примесей, как будто не участвующих в реакции. Так, была установлена большая каталитическая роль ряда неорганических веществ. Горение глюкозы на воздухе, например, происходит очень медленно, если же добавить немного солей лития (или золы, также содержащей ничтожные количества лития), то горение идет весьма интенсивно:



Известно, что в живых организмах «горение» (а точнее окисление) углеводов также протекает быстро и до тех же конечных продуктов обмена, т. е. CO_2 и H_2O , с выделением (и накоплением) энергии. Однако это «горение» происходит при относительно низкой температуре, без пламени, и что особенно интересно, в присутствии воды. Разумеется, в этих необычных условиях без действия ферментов, получивших наименование биологических катализаторов, не было бы окисления углеводов. Забегая несколько вперед, укажем, что в процессе превращения (окисления) глюкозы в организме до CO_2 и H_2O участвует последовательно около 15 различных ферментов (см. главу 9).

Биологические катализаторы, т. е. ферменты, как оказалось, не вызывают в отличие от неорганических катализаторов каких-либо побочных реакций и не осуществляют реакций, невозможных по термодинамическим условиям; и те, и другие катализаторы только ускоряют химические реакции, обычно протекающие очень медленно. В качестве примера можно привести реакцию расщепления перекиси водорода на кислород и воду, медленно протекающую и в отсутствие катализатора. В присутствии мелкоизмельченной платины эта реакция протекает с более высокой скоростью:



Эту же реакцию можно провести намного быстрее в присутствии фермента каталазы, содержащейся, в частности, в эритроцитах, причем образуются те же конечные продукты распада перекиси водорода.

Таким образом, можно считать установленным, что ферменты катализируют ряд химических реакций, аналогичных химическим реакциям, катализируемым неорганическими веществами. Более того, считается установленным, что любую из протекающих в живых организмах (или клетках) химическую реакцию можно в принципе осуществить вне организма (или клетки), если экспериментатору удастся выделить соответствующий фермент (или систему ферментов), катализирующий данную реакцию, и создать оптимальные условия для его действия.

Горизонты энзимологии. В литературе появились работы, прогнозирующие дальнейшее развитие энзимологии на ближайшие 10–15 лет. Перечислим основные направления исследований энзимологии будущего. Во-первых, это исследования более тонких деталей молекулярного механизма действия и принципов работы ферментов в соответствии с законами классической органической химии и квантовой механики, а также разработка на этой основе теории ферментативного катализа. Во-вторых, это изучение ферментов на более высоких уровнях (надмолекулярном и клеточном) структурной организации живых систем, причем не столько отдельных ферментов, сколько ферментных комплексов в сложных системах. В-третьих, исследование механизмов регуляции активности и синтеза ферментов и вклада химической модификации в действие ферментов. В-четвертых, будут развиваться исследования в области создания искусственных низкомолекулярных ферментов (синзимов – синтетических аналогов ферментов), наделенных аналогично нативным ферментам высокой специфичностью действия и каталитической активностью, но лишенных побочных антигенных свойств. В-пятых, исследования в области инженерной энзимологии (белковой инженерии), создание «гибридных» катализаторов, сочетающих свойства ферментов, антител и рецепторов, а также создание биотехнологических реакторов с участием индивидуальных ферментов или полиферментных комплексов, обеспечивающих получение и производство наиболее ценных материалов и средств для народного хозяйства и медицины.

ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА ФЕРМЕНТОВ

В настоящее время получены неопровержимые экспериментальные доказательства белковой природы ферментов¹. Трудно сейчас представить, что не только Р. Вильштеттер еще в 1926 г. отрицал принадлежность ферментов к белкам или к какому-либо известному классу органических веществ, но и совсем недавно высказывались сомнения на этот счет. Поводом для сомнения являлись опыты, в которых, хотя и были получены ферментативно активные растворы, но белок не мог быть обнаружен при помощи качественных цветных реакций. Объясняется это тем, что концентрация фермента при высокой удельной активности оказывалась ниже пороговой чувствительности химического теста на белок.

О белковой природе ферментов говорит факт инактивирования (потери активности) ферментов брожения при кипячении, установленный еще Л. Пастером. При кипячении наступает необратимая денатурация белка-фермента. Фермент при этом теряет присущее ему свойство катализировать химическую реакцию. Точно так же белки при кипячении денатурируются и теряют свои биологические свойства (антигенные, гормональные, каталитические). Под влиянием различных физических и химических факторов (воздействие УФ- и рентгеновского излучения, ультразвука, осажде-

¹ Единственным исключением из этого положения является обнаружение у молекулы пре-рРНК ферментативной активности, получившей название рибозима, катализирующей самосплайсинг, т. е. отщепление интронных последовательностей (см. главу 12).

ние минеральными кислотами, щелочами, алкалоидными реактивами, солями тяжелых металлов и др.) происходит денатурация ферментов, так же как и белков.

Ферменты при гидролизе, как и белки, распадаются на аминокислоты, что, бесспорно, служит веским доказательством белковой природы ферментов¹.

Интересные данные, указывающие на белковую природу ферментов, были получены в лаборатории И. П. Павлова. При определении переваривающей способности желудочного сока была обнаружена прямая зависимость между этой способностью и количеством белка в соке. Отсюда было сделано заключение, что пепсин желудочного сока является белком.

Вескими доказательствами белковой природы фермента являются его получение в чистом виде и выделение в форме кристаллов белка. К настоящему времени получено более 200 кристаллических ферментов и структура многих из них изучена детально при помощи современных методов химии белков и молекулярной физики [методами рентгеноструктурного анализа, ядерного магнитного резонанса (ЯМР), электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и др.].

Ферменты, как и все белки, обладают рядом свойств, характерных для высокомолекулярных соединений: амфотерностью (могут существовать в растворе в виде анионов, катионов и амфионов), электрофоретической подвижностью благодаря наличию в них положительных и отрицательных зарядов, а в изоэлектрической точке не обнаруживают подвижности в электрическом поле. Ферменты не способны к диализу через полупроницаемые мембраны. При помощи диализа их растворы обычно можно освободить от низкомолекулярных примесей. Как белки они легко осаждаются из водных растворов при низких температурах методами высаливания или осторожным добавлением ацетона, этанола и других веществ, не теряя при этом своих каталитических свойств.

Подобно белкам, ферменты имеют большую молекулярную массу — от десятков тысяч до нескольких миллионов дальтон (табл. 4.1).

Таблица 4.1. Молекулярная масса ферментов

Фермент	Молекулярная масса, Да	Фермент	Молекулярная масса, Да
Рибонуклеаза	13 700	Лактатдегидрогеназа	140 000
Цитохром с	15 000	Альдолаза	142 000
Трипсин	23 800	Каталаза	248 000
Пепсин	32 000	Глутаматдегидрогеназа	336 000
Гексокиназа	45 000	Уреаза	480 000
Щелочная фосфатаза	80 000	Пируватдегидрогеназа (комплекс)	4 500 000

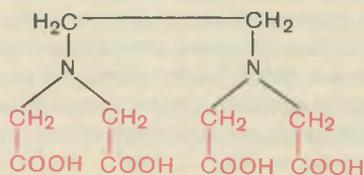
Ферменты обладают высокой специфичностью действия, что также доказывает их белковую природу, поскольку белки в иммунологическом отношении отличаются крайне высокой специфичностью. Наконец, прямым доказательством белковой природы ферментов является лабораторный синтез первого фермента — рибонуклеазы, осуществленный в 1969 г. в лаборатории Б. Меррифилда в Нью-Йорке². Этот автоматический синтез на твердой фазе состоял в последовательном включении всех 124 аминокислотных остатков в строгом соответствии с последовательностью аминокислот (с первичной структурой) естественного фермента — рибонуклеазы поджелу-

¹ Некоторые ферменты, помимо белковой части, содержат небелковый компонент, образующий молекулу сложного белка.

² Полную первичную структуру панкреатической рибонуклеазы расшифровали в 1955 г. С. Мур и У. Стейн.

дочной железы¹. Искусственно синтезированный фермент не отличался от природной рибонуклеазы по химическим, каталитическим и иммунологическим тестам.

Принимая во внимание перечисленные выше обстоятельства, при получении ферментов в чистом виде и при их хранении следует учитывать одно важное свойство белков, а именно стабильность, которая определяется рядом факторов. Одним из общих правил при работе с ферментами является оптимальная температура, обычно соответствующая температуре тела, а для препаративных целей — использование температуры около 0°C. Следует, однако, иметь в виду, что имеется несколько ферментов, весьма чувствительных к пониженной температуре, в частности митохондриальный фермент, катализирующий распад АТФ, при 0°C подвергается инактивации, в то время как при комнатной температуре он остается стабильным. Большинство ферментов сохраняют стабильность при рН около 6,0—8,0, хотя имеются исключения. Для препаративных целей часто прибегают к обезвоживанию фермента (удалению воды) в вакууме из замороженного раствора (этот метод получил название лиофилизации). Осаждение из раствора ферментов спиртом или ацетоном также проводят при низкой температуре, поскольку при комнатной температуре эти процедуры приводят к почти полной потере энзиматической активности. Для стабилизации фермента часто пользуются хелатообразующими агентами, например к ферменту добавляют этилендиаминтетраацетат (ЭДТА):



ЭДТА может связывать нежелательные примеси (содержащиеся в реактивах следы ионов тяжелых металлов: меди, свинца, ртути и др.), оказывающие тормозящий эффект на активность. Одним из неперменных условий сохранения стабильности ферментов является хранение их в высушенном или замороженном состоянии (в условиях холода). Многие ферменты стабильны в виде суспензии в концентрированных растворах сульфата аммония.

СТРОЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

В природе существуют как простые, так и сложные ферменты. Первые целиком представлены полипептидными цепями и при гидролизе распадаются исключительно на аминокислоты. Примерами такого рода ферментов (простых белков) являются гидролитические ферменты, в частности пепсин, трипсин, папаин, уреазы, лизоцим, рибонуклеаза, фосфатаза и др. Большинство природных ферментов относятся к классу сложных белков, содержащих, помимо полипептидных цепей, какой-либо небелковый компонент (кофактор), присутствие которого является существенным для энзиматической активности. Кофакторы могут иметь различную химическую природу и отличаться по прочности связи с полипептидной цепью. Если константа диссоциации сложного фермента настолько мала, что в растворе все полипептидные цепи оказываются связанными со своими кофакторами и не разделяются при выделении и очистке, то такой фермент получает название холофермента (холоэнзима), а кофактор — протетической группы, рассматривающейся как интегральная часть

¹ Недавно осуществлен искусственный синтез второго фермента — лизоцима, состоящего из 118 аминокислот.

молекулы фермента. Полипептидную часть фермента принято называть апоферментом.

В литературе до сих пор употребляются и другие наименования компонентов сложных ферментов, в частности фермент-протеид, белковый компонент, кофермент. Под коферментом часто подразумевают дополнительную группу, легко отделяемую от апофермента при диссоциации. Предполагается, что между простетической группой и полипептидной цепью существует ковалентная связь, как, например, в молекуле ацетилкоэнзим-А-карбоксилазы, в которой кофактор биотин ковалентно связан с апоферментом посредством амидной связи (см. главу 5). С другой стороны, химические связи между кофакторами и пептидными цепями могут быть относительно слабыми (например, водородные связи, электростатические взаимодействия и др.). В таких случаях при выделении ферментов наблюдается полная диссоциация обеих частей, и изолированный белковый компонент оказывается лишенным ферментативной активности, пока не будет добавлен извне недостающий кофактор. Именно к подобным изолированным низкомолекулярным органическим веществам применим термин «кофермент»; типичными представителями коферментов являются витамины В₁, В₂, В₆, РР, содержащие коферменты. Известно также, что и простетические группы, и коферменты активно включаются в химические реакции, выполняя функции промежуточных переносчиков электронов, атомов водорода или различных групп, например амино, ацетильных, карбоксильных.

Следует подчеркнуть, что разницу между простетической группой и коферментом нельзя абсолютизировать, поскольку в одних случаях, например у оксидазы D-аминокислот, кофактор, представленный ФАД, может быть легко отделен от белковой части путем диализа. Тот же кофактор прочно связан ковалентно с ферментами тканевого дыхания, выполняя функции простетической группы.

Многие двухвалентные металлы (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}), как будет показано ниже, также выполняют роль кофакторов, хотя их не относят ни к коферментам, ни к простетическим группам. Однако имеется ряд примеров, когда ионы металлов прочно связаны с белковой молекулой, выполняя функции простетической группы. В частности, очищенный фермент, катализирующий окисление аскорбиновой кислоты (витамина С) в дезоксиаскорбиновую кислоту, содержит 8 атомов меди на молекулу; все они настолько прочно связаны с белковой молекулой, что даже не обмениваются ионообменными смолами и не отделяются методом диализа. Более того, методами электронного парамагнитного резонанса показано участие ионов меди в промежуточном переносе электронов. Интересно отметить, что ионы меди также наделены каталитической активностью при окислении аскорбиновой кислоты, однако эта активность повышается во многие тысячи раз, когда ионы меди соединяются с апоферментом в единый комплекс холофермента.

Данные о важнейших коферментах и простетических группах ферментов, включая их наименование, природу витамина, входящего в их состав, и характер выполняемой биохимической функции, будут рассмотрены детально в главе 5.

Получены доказательства кофакторной функции в ферментативных реакциях ряда биологически активных соединений, не относящихся к витаминам: HS-глутатиона, АТФ, липоевой кислоты, производных нуклеозидов (уридинфосфат, цитидинфосфат, фосфоаденозинфосфосульфат), порфиринсодержащих веществ и др. Сюда же могут быть отнесены тРНК, которые в составе ферментов аминоксил-тРНК-синтеза принимают активное участие в переносе аминокислот в рибосомы, где осуществляется синтез белка (см. главу 13).

Следует отметить одну отличительную особенность двухкомпонентных ферментов, заключающуюся в том, что ни кофактор отдельно (включая большинство коферментов), ни сам по себе апофермент каталитической активностью не обладают, и только их объединение в единое целое, протекающее не хаотично, а в соответствии с программой их структурной организации, обеспечивает быстрое протекание химической реакции.

Активный центр ферментов

При изучении механизма химической реакции, катализируемой ферментами, исследователя всегда интересует не только определение промежуточных и конечных продуктов и выяснение отдельных стадий реакции, но и природа тех функциональных групп в молекуле фермента, которые обеспечивают специфичность действия фермента на данный субстрат (или субстраты) и высокую каталитическую активность. Речь идет, следовательно, о точном знании геометрии и третичной структуры фермента, а также химической природы того участка (или участков) молекулы фермента, который обеспечивает высокую скорость каталитической реакции. Так как участвующие в ферментативных реакциях молекулы субстратов часто имеют небольшие размеры по сравнению с молекулами ферментов, было высказано предположение, что при образовании фермент-субстратных комплексов в непосредственный контакт с молекулой субстрата, очевидно, вступает ограниченная часть аминокислот пептидной цепи. Отсюда возникло представление об «активном центре» фермента. Под активным центром подразумевают уникальную комбинацию аминокислотных остатков в молекуле фермента, обеспечивающую непосредственное взаимодействие ее с молекулой субстрата и прямое участие в акте катализа (рис. 4.2). Установлено, что у сложных ферментов в состав активного центра входят также простетические группы.

В активном центре условно различают так называемый каталитический центр, непосредственно вступающий в химическое взаимодействие с субстратом, и связывающий центр, или контактную («якорную») площадку, которая обеспечивает специфическое сродство к субстрату и формирование его комплекса с ферментом. В свою очередь молекула субстрата также содержит функционально различные участки, например субстраты эстераз или протеиназ — одну специфич-

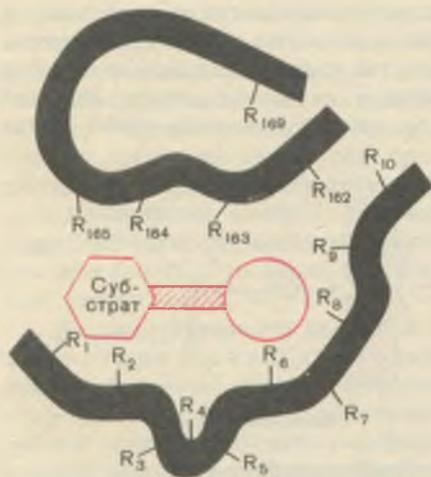


Рис. 4.2. Активный центр фермента (схема по Малеру и Кордесу).

Темные полосы — участки полипептидной цепи фермента; R — аминокислотные остатки и их порядковые номера (начиная с N-конца).

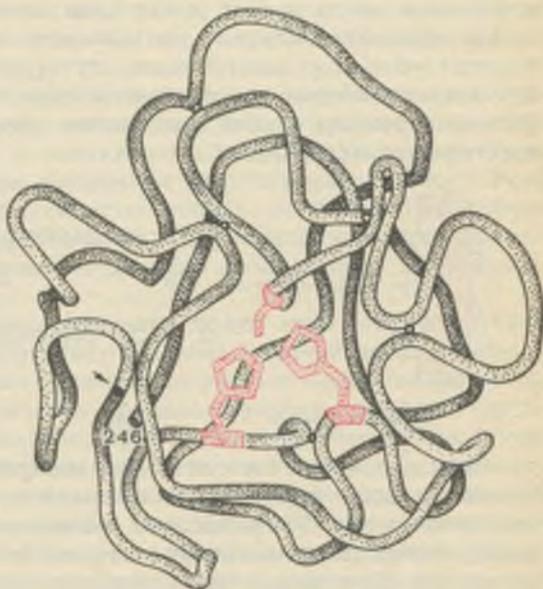


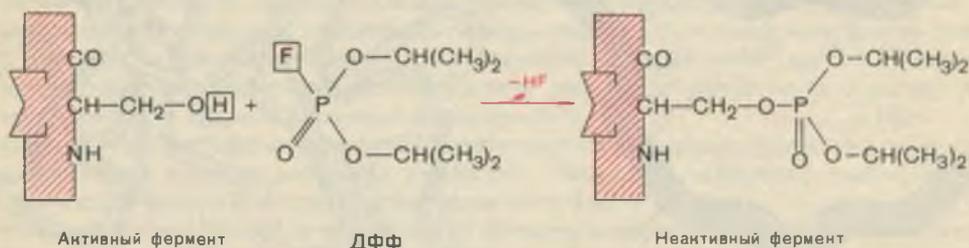
Рис. 4.3. Гипотетическая модель третичной структуры молекулы предшественника хитотрипсина (по Нейрату); цветом выделены остатки серина и гистидина; стрелкой обозначено место отщепления N-концевого участка полипептидной цепи.

ческую связь (или группу атомов), подвергающуюся атаке со стороны фермента, и один или несколько участков, избирательно связываемых ферментом.



Получены экспериментальные доказательства наличия в активном центре химотрипсина двух остатков гистидина и остатка серина, схематически представленных в трехмерной структурной модели предшественника этого фермента (рис. 4.3). Выявление химической природы и вероятной топографии групп активного центра является проблемой первостепенной важности; она сводится к определению природы аминокислот, их последовательности и взаиморасположения в активном центре. Для идентификации аминокислотных остатков используют ряд приемов: применение специфических ингибиторов ферментов (часто это субстратоподобные вещества или аналоги коферментов), методов мягкого (ограниченного) гидролиза в сочетании с химической модификацией, включающей избирательное окисление, связывание, замещение остатков аминокислот и др.

При помощи методов ингибиторного анализа были сделаны попытки установить общность активных центров у ферментов, относящихся к разным группам. В частности, при применении ДФФ (принадлежащего к типу так называемых нервных ядов) имеет место полное выключение активного центра холинэстеразы — фермента, катализирующего гидролиз ацетилхолина на холин и уксусную кислоту. Оказалось, что этот ингибитор имеет близкое структурное сходство с ацетилхолином и подобно ему взаимодействует с ОН-группой остатка серина в активном центре. Вызывая фосфорилирование серина в активном центре ряда других ферментов, ДФФ также инактивирует их действие:



Показано, кроме того, что ДФФ избирательно фосфорилирует в каждом чувствительном к нему ферменте только один остаток серина, наделенный функциональной активностью. Учитывая этот механизм действия ДФФ, сделаны попытки определения природы аминокислот в окружении «каталитического» остатка серина у ряда ферментов. Полученные результаты представлены в табл. 4.2.

Из табл. 4.2 видно, что ферменты, сходные по типу действия, хотя и различаются специфичностью, могут иметь почти одинаковую последовательность аминокислот в тех участках, которые примыкают к остатку серина, несущему функционально активную гидроксильную группу. Существенное значение этой группы серина для акта катализа было доказано, кроме того, химическим ее блокированием или удалением, когда эстеразы полностью лишались ферментативной активности.

Таблица 4.2. Последовательность аминокислотных остатков, расположенных вокруг серина в молекулах ряда эстераз и протеиназ (по Малеру и Кордесу)

Фермент	Последовательность остатков аминокислот вокруг серина
Химотрипсин	Гли-Асп-Сер-Гли-Гли
Трипсин	Гли-Асп-Сер-Гли-Про-Вал
Тромбин	Асп-Сер-Гли
Эластаза	Асп-Сер-Гли
Бутирилхолинэстераза	Гли-Глу-Сер-Ала
Ацетилхолинэстераза	Глу-Сер-Ала
Алиэстераза печени	Гли-Глу-Сер-Ала-Гли-Гли
Щелочная фосфатаза (<i>E. coli</i>)	Тре-Асп-Сер-Ала-Сер-Ала
Субтилизин (<i>B. subtilis</i>)	Гли-Тре-Сер-Мет-Ала
Протеаза (<i>Aspergillus orizae</i>)	Тре-Сер-Мет-Ала
Фосфоглюкомутаза	Тре-Ала-Сер-Гис-Асп
Фосфоорилаза	Гли-Иле-Сер-Вал-Арг

Предполагается, что формирование активного центра фермента начинается уже на ранних этапах синтеза белка-фермента (см. главу 13) на рибосоме, когда линейная одномерная структура пептидной цепи превращается в трехмерное тело строго определенной конфигурации.

Образовавшийся белок приобретает функциональную (в частности, каталитическую) информацию. Любые воздействия, приводящие к денатурации, т. е. нарушению третичной структуры, приводят к искажению или разрушению структуры активного центра и соответственно потере ферментом каталитических свойств. Если при подходящих внешних условиях удастся восстановить нативную трехмерную структуру белка-фермента (ренатурировать его), то восстанавливается и его каталитическая активность. Это было показано впервые на примере рибонуклеазы поджелудочной железы.

Помимо активного центра, в молекуле фермента может присутствовать также аллостерический центр (или центры) (от греч. *allos* — другой, иной и *steros* — пространственный, структурный), представляющий собой участок молекулы фермента, с которым связываются определенные, обычно низкомолекулярные вещества (называемые эффекторами или модификаторами), молекулы которых отличаются по строению от субстратов. Присоединение эффектора к аллостерическому центру приводит к изменению третичной и часто также четвертичной структуры молекулы фермента и соответственно конфигурации активного центра, вызывая снижение или повышение энзиматической активности. Ферменты, активность которых контролируется состоянием как активного, так и аллостерического центров, получили название аллостерических ферментов¹. Отличительной особенностью аллостерических ферментов

¹ Ряд авторов рекомендуют пользоваться термином регуляторный центр (регуляторный фермент) вместо аллостерического для ферментов, обладающих регуляторными функциями, поскольку в этом случае якобы отпадает необходимость уточнения наличия на поверхности фермента особого центра для связывания эффектора.

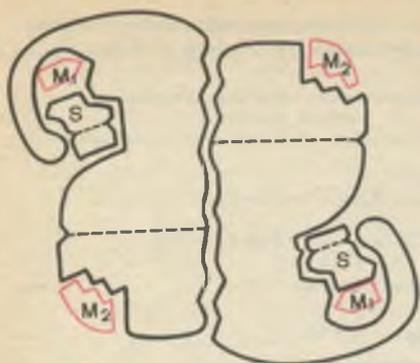


Рис. 4.4. Схематическое изображение аллостерического фермента, состоящего из двух протомеров, соединенных по типу гетерологической (голова — хвост) ассоциации (по Кошленду).

S — субстрат; M_1 — модификатор, связывающийся в активном центре; M_2 — модификатор, связывающийся в аллостерическом центре (эффектор).

тов является наличие в молекуле олигомерного фермента нескольких активных центров и нескольких аллостерических регуляторных центров, пространственно удаленных друг от друга. Схематически аллостерический фермент представлен на рис. 4.4, где каждый из двух симметрично построенных протомеров содержит один активный центр, связывающий субстрат (S), и один аллостерический центр, связывающий эффектор (M_2), т. е. по два центра на молекуле фермента. Получены доказательства, что для субстрата аллостерические ферменты, помимо активного центра, содержат и так называемые эффекторные центры; и хотя при связывании с эффекторным центром субстрат не подвергается каталитическому превращению, однако он влияет на каталитическую эффективность активного центра. Подобные взаимодействия между центрами, связывающими лиганды одного типа, принято обозначать гомотропными взаимодействиями, а взаимодействия между центрами, связывающими лиганды разных типов, — гетеротропными взаимодействиями.

ИЗОФЕРМЕНТЫ

Изоферменты — это множественные формы фермента, отличающиеся друг от друга по сродству, максимальной скорости катализируемой реакции (активности) или регуляторным свойствам.

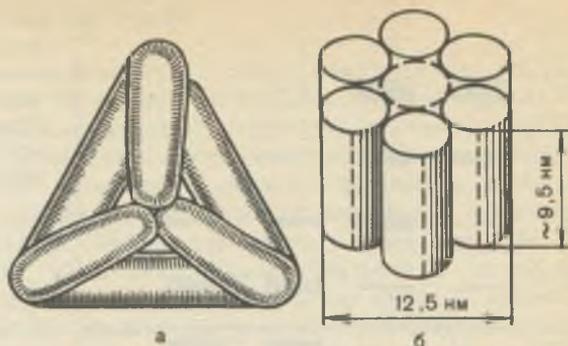
В живой природе имеются ферменты, молекулы которых состоят из двух и более субъединиц, обладающих одинаковой или разной первичной, вторичной и третичной структурой. Субъединицы нередко называют протомерами, а объединенную олигомерную молекулу — мультимером (см. главу 1). Схематически строение некоторых ферментов-мультимеров и способы связи протомеров представлены на рис. 4.5.

Считается, что процесс олигомеризации придает субъединицам белков повышенную стабильность и устойчивость по отношению к действию денатурирующих агентов, включая нагревание, влияние протеиназ. Однако на нынешнем этапе наших знаний нельзя ответить однозначно на вопрос о существенности четвертичной структуры для каталитической активности ферментов, поскольку пока отсутствуют методы, позволяющие в мягких условиях разрушить только лишь четвертичную структуру. Применяемые обычно на практике методы жесткой обработки (экстремальные значения pH, высокие концентрации гаунидинхлорида или мочевины) приводят к разрушению не только четвертичной структуры, но и вторичной и третичной структур стабильного олигомерного фермента, протомеры которого оказываются денатурированными и как следствие этого лишены биологической активности.

Следует указать на отсутствие ковалентных, главновалентных связей между субъединицами. Связи между последними в основном являются нековалентными, поэтому такие ферменты довольно легко диссоциируют на протомеры. Удивительной особенностью таких ферментов является зависимость активности всего комплекса от способа упаковки между собой отдельных субъединиц. Если генетически различимые

Рис. 4.5. Модели строения некоторых олигомерных ферментов.

а — молекула глутаматдегидрогеназы, состоящая из 6 протомеров (общая мол. м. 336 000 Да); б — молекула РНК-полимеразы; в — половина молекулы каталазы; г — молекулярный комплекс пируватдегидрогеназы.



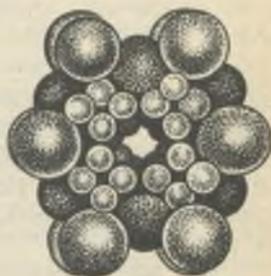
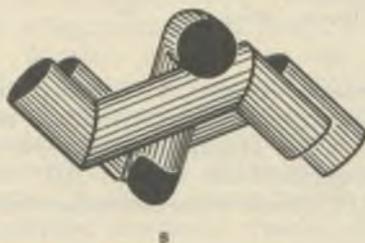
субъединицы могут существовать более чем в одной форме, то соответственно и фермент, образованный из двух или нескольких типов субъединиц, сочетающихся в разных количественных пропорциях, может существовать в нескольких сходных, но не одинаковых формах.

Подобные разновидности фермента и получили название изоферментов (изоэнзимов или, реже, изозимов). В частности, если фермент, как в рассмотренном ранее случае ЛДГ, состоит из четырех субъединиц двух разных типов — Н и М, то активный фермент может представлять собой одну из следующих комбинаций: НННН, НННМ, ННММ, НМММ и ММММ или соответственно H_4 , H_3M , H_2M_2 , HM_3 , M_4 , соответствующую изоферментам ЛДГ₁, ЛДГ₂, ЛДГ₃, ЛДГ₄ и ЛДГ₅.

Причем в одних случаях субъединицы имеют почти идентичную структуру и каждая из них содержит каталитически активный участок (например, β-галактозидаза, состоящая из 4 субъединиц). В других случаях субъединицы оказываются неидентичными. Примером последних может служить триптофансинтаза, состоящая из двух субъединиц, каждая из которых наделена собственной энзиматической активностью. Однако, только будучи объединенными в макромолекулярную структуру, обе субъединицы проявляют триптофансинтазную активность.

Термин множественные формы фермента применим к белкам, катализирующим одну и ту же реакцию, и встречающимся в природе в организмах одного вида. Термин изофермент применим только к тем множественным формам ферментов, которые появляются вследствие генетически обусловленных различий в первичной структуре белка (но не к формам, образовавшимся в результате модификации одной первичной последовательности).

Одним из наиболее изученных ферментов, множественность форм которого детально изучена методом гель-электрофореза, является ЛДГ, катализирующая обратимое превращение пирувиноградной кислоты в молочную. Пять изоферментов ЛДГ образуются из 4 субъединиц примерно одинакового размера, но двух разных типов. Поскольку Н-протомеры несут более выраженный отрицательный заряд при рН 7,0–9,0, чем М-протомеры, изофермент, состоящий из 4 субъединиц Н-типа (H_4), будет мигрировать при электрофорезе с наибольшей скоростью в электрическом поле к положительному электроду (аноду). С наименьшей скоростью будет двигаться к аноду изофермент M_4 , в то время как остальные изоферменты будут занимать промежуточные позиции. Следует подчеркнуть, что изоферменты ЛДГ, обладая почти



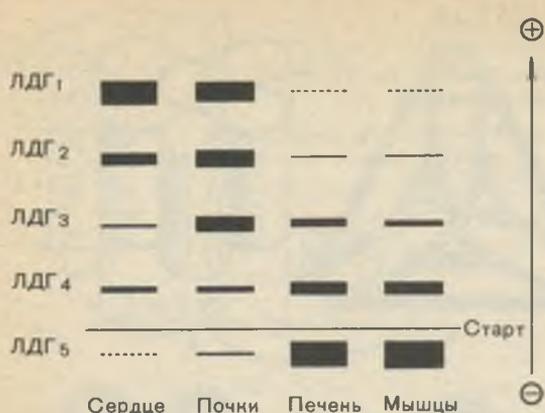


Рис. 4.6. Распределение и относительные количества изоферментов ЛДГ в различных органах. Экстракты нанесены на линию, отмеченную надписью «Старт». При выбранных условиях опыта (рН) четыре изофермента ЛДГ движутся к аноду, а один (ЛДГ₅) — к катоду.

одинаковой ферментативной активностью, отличаются по ряду физико-химических свойств: молекулярной массе, электрофоретической подвижности, отношению к активаторам и ингибиторам и др. Однако для каждой ткани в норме характерно свое соотношение форм (изоферментный спектр) ЛДГ. Например, в сердечной мышце преобладает H_4 , т. е. ЛДГ₁, а в скелетных мышцах и печени — M_4 (ЛДГ₅), как это видно на рис. 4.6.

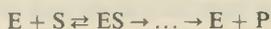
Эти обстоятельства широко используют в клинической практике, поскольку изучение картины появления изоферментов ЛДГ (и ряда других ферментов) в сыворотке крови может представить интерес для дифференциальной диагностики органических и функциональных поражений органов и тканей. По изменению содержания изоферментов в сыворотке крови можно судить как о топографии патологического процесса, так и о степени поражения органа или ткани.

МУЛЬТИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ

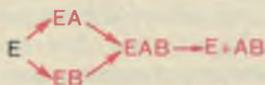
Особую группу ферментов составляют надмолекулярные (или мультимолекулярные) ферментные комплексы, в состав которых входят не субъединицы (в каталитическом отношении однотипные протомеры), а разные ферменты, катализирующие последовательные ступени превращения какого-либо субстрата. Отличительными особенностями подобных мультиферментных комплексов являются не только прочность ассоциации ферментов, но и определенная последовательность прохождения промежуточных стадий, продиктованная порядком расположения каталитически активных (различных) белков в пространстве («путь» превращения в пространстве и времени). Типичными примерами подобных мультиферментных комплексов являются пируватдегидрогеназа и α -кетоглутаратдегидрогеназа, катализирующие окислительное декарбоксилирование пировиноградной и α -кетоглутаровой кислот в животных тканях (см. главу 9), и синтетаза высших жирных кислот (см. главу 10). Молекулярные массы этих комплексов в зависимости от источника их происхождения варьируют от $2,3 \cdot 10^6$ до $10 \cdot 10^6$ Да. Ассоциация отдельных ферментов в единый недиссоциирующий комплекс имеет определенный биологический смысл и ряд преимуществ. В частности, при этом резко сокращаются расстояния, на которые молекулы промежуточных веществ должны перемещаться при действии изолированных ферментов. Ряд таких мультиферментных комплексов, иногда называемых ферментными ансамблями, структурно связан с какой-либо органеллой (рибосомы, митохондрии) или с биомембраной и составляет высокоорганизованные системы, обеспечивающие жизненно важные функции, например тканевое дыхание (перенос электронов от субстратов к кислороду через систему дыхательных ферментов).

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

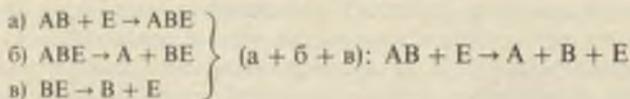
Проблема структуры и функции ферментов, а также механизма их действия почти ежегодно подробно обсуждается на многих международных симпозиумах и конгрессах. Важное место отводится рассмотрению структуры активных центров, конкретному механизму действия различных типов ферментов, общей теории энзиматического катализа. До установления химической природы ферментов гипотезы о механизме действия ферментов опирались на исследования кинетики и модельные опыты химического гомогенного катализа. Повышение скорости химических реакций под действием ферментов объясняли: а) активированием субстрата в результате образования адсорбционных или молекулярных, обратимо диссоциирующих фермент-субстратных комплексов; б) за счет цепных механизмов реакций с участием радикалов или возбужденных молекул. Оказалось, что цепные механизмы реакции не играют существенной роли в биологическом катализе. После установления химической природы ферментов подтвердилось представление, выдвинутое более 70 лет назад В. Анри, Л. Михаэлисом и М. Ментен, о том, что при энзиматическом катализе фермент (E) соединяется (в принципе обратимо) со своим субстратом (S), образуя нестойкий промежуточный фермент-субстратный комплекс (ES), который в конце реакции распадается с освобождением фермента (E) и продуктов реакции (P). Михаэлис не только постулировал образование промежуточного фермент-субстратного (ES)-комплекса, но и рассчитал влияние концентрации субстрата на скорость реакции. В процессе реакции различают несколько стадий: присоединение молекулы субстрата к ферменту, преобразование первичного промежуточного соединения в один или несколько последовательных (переходных) комплексов и протекающее в одну или несколько стадий отделение конечных продуктов реакции от фермента. Сказанное можно схематически проиллюстрировать следующими примерами:



В реакциях анаболизма, например $A + B \rightarrow AB$, фермент может соединяться как с одним, так и с другим субстратом или обоими субстратами:



В реакциях катаболизма, например $AB \rightarrow A + B$:



На рис. 4.7 представлена схема образования промежуточного фермент-субстратного комплекса. Если фермент в активном центре содержит кофермент, то предполагается образование тройного комплекса (рис. 4.8).

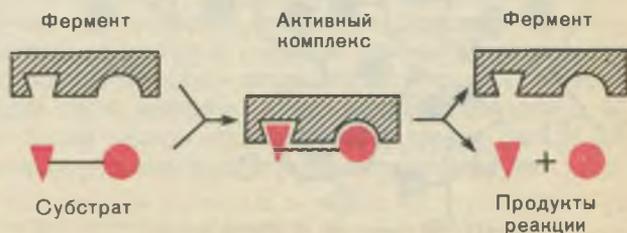


Рис. 4.7. Образование нестойкого фермент-субстратного комплекса (схема).

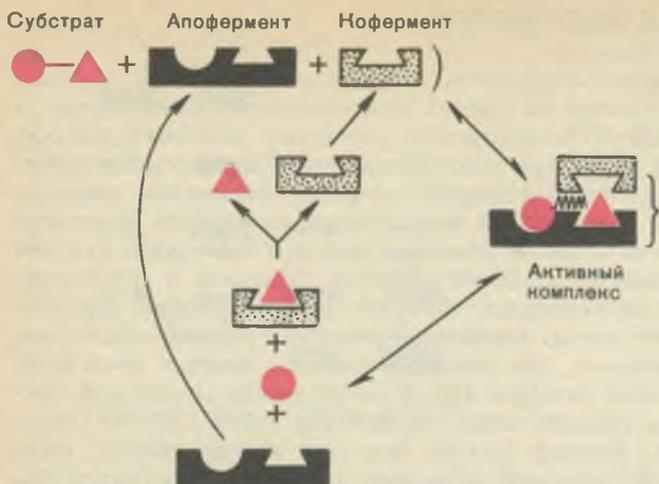


Рис. 4.8. Функция кофермента (по А. Кантарову и Б. Шепартцу).

Фермент вступает во взаимодействие с субстратом на очень короткий период, поэтому долгое время не удавалось показать образование такого комплекса. Прямые доказательства существования фермент-субстратного комплекса были получены в лабораториях Д. Кейлина и Б. Чанса. В настоящее время экспериментальные и математические методы кинетики, термодинамики и статической механики химических реакций позволяют определить для ряда ферментативных реакций кинетические и термодинамические показатели, в частности константы диссоциации промежуточных фермент-субстратных комплексов, константы скорости и равновесия их образования.

В образовании фермент-субстратных комплексов участвуют водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия, а также в ряде случаев ковалентные, координационные связи (примерная схема таких связей представлена на рис. 4.9). Информация о природе связей между субстратом и связывающим участком активного центра фермента может быть получена методами ЭПР и ЯМР, а также методами УФ- и ИК-спектроскопии. Для каталитической активности фермента существенное значение имеет пространственная структура, в которой жесткие участки α -спиралей чередуются с гибкими, эластичными линейными отрезками, обеспе-

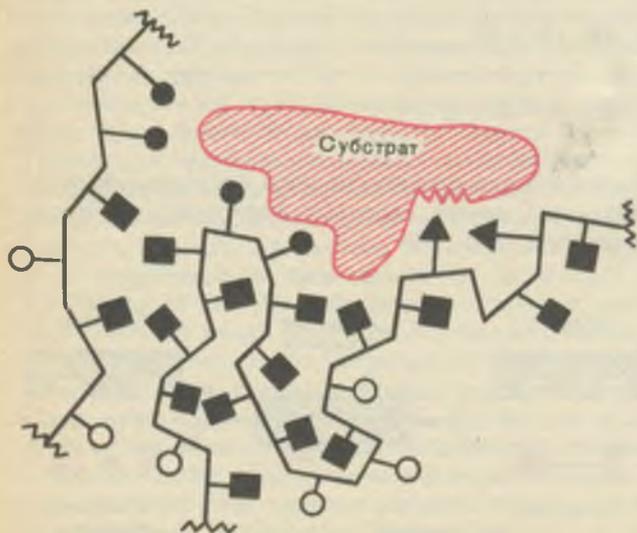


Рис. 4.9. Образование нековалентных связей между ферментом и субстратом (схема).

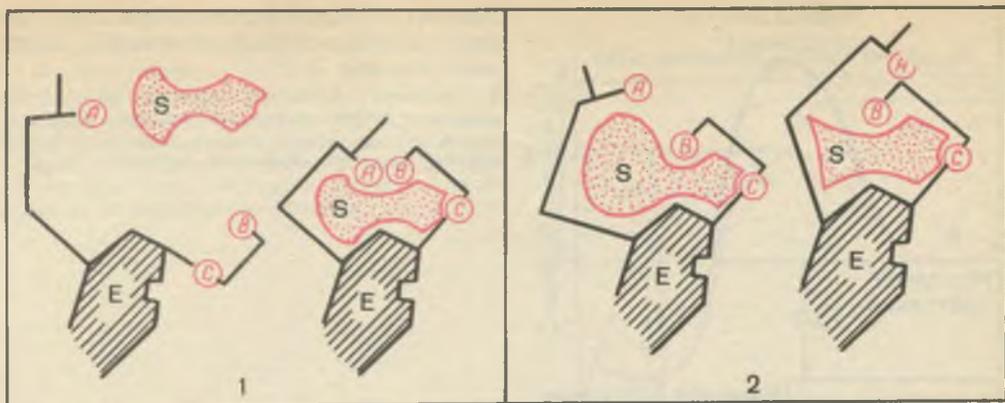


Рис. 4.10. Изменения структуры активного центра фермента, вызванные субстратом (схема по Кошленду).

А, В, С – функциональные группы активного центра; 1 – активный комплекс; 2 – неактивный комплекс.

чивающими динамические изменения белковой молекулы фермента. Этим изменениям придается большое значение в некоторых теориях ферментативного катализа. Так, согласно гипотезе «индуцированного», или «вынужденного», соответствия Д. Кошленда каталитически активная конфигурация молекулы фермента и соответственно активного центра может в определенных случаях возникать лишь в момент присоединения субстрата в результате его деформирующего воздействия. Подобная деформация представлена на рис. 4.10. Из рисунка видно, что присоединение субстрата (S) к ферменту (E), вызывая соответствующие изменения конформации активного центра, в одних случаях приводит к образованию активного комплекса, в других – к образованию неактивного комплекса из-за нарушения пространственного расположения функциональных групп активного центра в промежуточном комплексе. В настоящее время получены экспериментальные доказательства нового положения о том, что постулированное Д. Кошлендом «индуцированное соответствие» субстрата и фермента создается не обязательно изменениями конформации белковой молекулы, но также геометрической и электронно-топографической перестройкой молекулы субстрата.

В каталитическом процессе существенное значение имеют точное соответствие между ферментом и субстратом, а также термодинамические и каталитические преимущества подобного соответствия. Гипотеза «индуцированного соответствия» предполагает существование между ферментом и субстратом не только пространственной или геометрической комплементарности, но и электростатического соответствия, обусловленного спариванием противоположно заряженных групп субстрата и активного центра фермента. Точное соответствие обеспечивает образование эффективного комплекса между субстратом и ферментом.

Подобно другим катализаторам, ферменты, с термодинамической точки зрения, ускоряют химические реакции за счет снижения энергии активации¹. Энергией активации называется энергия, необходимая для перевода всех молекул моля вещества в активированное состояние при данной температуре. Другими словами, это энергия, необходимая для запуска химической реакции, без которой реакция не начинается, несмотря на ее термодинамическую вероятность. Фермент снижает энергию активации путем увеличения числа активированных молекул, которые становятся реакционноспособными на более низком энергетическом уровне (рис. 4.11). Из рисунка видно, что ферментативная реакция имеет более низкую энергию акти-

¹ Величину энергии активации обычно выражают в джоулях на моль (Дж/моль).



Рис. 4.11. Энергетический механизм ферментативной и неферментативной химических реакций.

S — исходный субстрат; P — продукт; $\Delta E_{нф}$ — энергия активации неферментативной реакции; $\Delta E_{ф}$ — энергия активации ферментативной реакции; ΔG — стандартное изменение свободной энергии.

вазии. Следует отметить, что как катализируемая ферментом, так и не катализируемая им реакция независимо от ее пути имеет одинаковую величину стандартного изменения свободной энергии (ΔG).

Зависимость между константой равновесия и изменением свободной энергии реагирующих веществ математически принято выражать формулой: $\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K$, где R — газовая постоянная; T — абсолютная температура в кельвинах; $\ln K$ — натуральный логарифм константы равновесия; ΔG — стандартное изменение свободной энергии (Дж/моль). Из представленного уравнения вытекает, что при высоком значении K величина ΔG оказывается отрицательной. Подобные реакции сопровождаются уменьшением свободной энергии. При низком значении K величина ΔG оказывается положительной. Если константа равновесия равна единице, то изменение свободной энергии будет равно нулю и реакция легко обратима.

Для измерения константы равновесия и величины свободной энергии какой-либо химической реакции, например реакции взаимопревращения глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат, катализируемой ферментом фосфоглюкомутазой, определяют количество глюкозо-6-фосфата и количество глюкозо-1-фосфата при достижении химического равновесия. В состоянии равновесия количество глюкозо-6-фосфата оказывается в 19 раз больше количества глюкозо-1-фосфата. Отсюда константа равновесия K равна 19. Подставляя эту цифру в уравнение, получаем: $\Delta G = -7329$ Дж/моль. Это означает, что при превращении 1 моля глюкозо-1-фосфата в 1 моль глюкозо-6-фосфата при 25°C происходит уменьшение свободной энергии системы на 7329 Дж.

Таким образом, в механизме ферментативного катализа ведущую роль играют промежуточные фермент-субстратные комплексы, образование которых определяется тонкой структурой активного центра и уникальной структурой всей молекулы фермента, обеспечивающими высокую каталитическую активность и специфичность действия биокатализаторов.

Кинетика ферментативных реакций

Одним из характерных проявлений жизни является удивительная способность живых организмов кинетически регулировать химические реакции, подавляя стремление к достижению термодинамического равновесия. Ферментативная кинетика занимается исследованием закономерностей влияния химической природы реагирующих веществ (фермента, субстратов) и условий их взаимодействия (концентрации, pH среды, температуры, присутствия активаторов или ингибиторов) на скорость ферментативной реакции. Главной целью изучения кинетики ферментативных реакций является получение информации, которая может способствовать пониманию механизма действия фермента.

Рис. 4.12. Теоретический график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата при постоянной концентрации фермента.

а — реакция первого порядка (при $[S] < K_m$ скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата); б — реакция смешанного порядка; в — реакция нулевого порядка, когда $v = V_{max}$ и скорость реакции не зависит от концентрации субстрата.

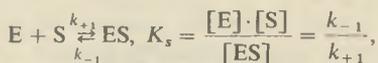


Общие принципы кинетики химических реакций применимы и к ферментативным реакциям. Известно, что любая химическая реакция характеризуется константой термодинамического равновесия. Она выражает состояние химического равновесия, достигаемого системой, и обозначается K_p . Так, для реакции:



константа равновесия равна произведению концентраций образующихся веществ, деленному на произведение концентраций исходных веществ. Значение константы равновесия обычно находят из соотношения констант скоростей прямой (k_{+1}) и обратной (k_{-1}) реакций, т. е. $K_p = k_{+1}/k_{-1}$. В состоянии равновесия скорость прямой реакции $v_{+1} = k_{+1}[A] \cdot [B]$ равна скорости обратной: $v_{-1} = k_{-1}[C] \cdot [D]$, т. е. $v_{+1} = v_{-1}$ соответственно, $k_{+1}[A] \cdot [B] = k_{-1}[C] \cdot [D]$ или $\frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]}$; отсюда $\frac{k_{+1}}{k_{-1}} = K_p$.

Таким образом, константа равновесия равна отношению констант скоростей прямой и обратной реакций. Величину, обратную константе равновесия, принято называть субстратной константой, или, в случае ферментативной реакции, константой диссоциации фермент-субстратного комплекса, и обозначать символом K_s . Так, в реакции:



т. е. K_s равна отношению произведения концентрации фермента и субстрата к концентрации фермент-субстратного комплекса или отношению констант скоростей обратной и прямой реакций. Следует отметить, что константа K_s зависит от химической природы субстрата и фермента и определяет степень их сродства. Чем ниже значение K_s , тем выше сродство фермента к субстрату.

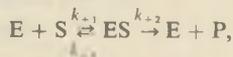
При изучении кинетики ферментативных реакций следует учитывать одну важную особенность этих реакций (не свойственную обычным химическим реакциям), связанную с явлением насыщения фермента субстратом. При низкой концентрации субстрата зависимость скорости реакции от концентрации субстрата (рис. 4.12) является почти линейной и подчиняется кинетике первого порядка. Это означает, что скорость реакции $S \rightarrow P$ прямо пропорциональна концентрации субстрата $[S]$ и в любой момент времени (t) определяется следующим кинетическим уравнением:

$$v = - \frac{d[S]}{dt} = k' [S],$$

где $[S]$ — молярная концентрация субстрата S ; $-d[S]/dt$ — скорость убыли субстрата; k' — константа скорости реакции, которая в данном случае имеет размерность, обратную единице времени (мин^{-1} или с^{-1}).

При высокой концентрации субстрата скорость реакции максимальна и становится постоянной и не зависящей от концентрации субстрата $[S]$. В этом случае реакция подчиняется кинетике нулевого порядка: $v = k''$ (при полном насыщении фермента субстратом) и целиком определяется концентрацией фермента. Различают, кроме того, реакции второго порядка, скорость которых пропорциональна произведению концентраций двух реагирующих веществ. В определенных условиях при нарушении пропорциональности говорят иногда о реакциях смешанного порядка (см. рис. 4.12).

Изучая явление насыщения, Л. Михаэлис и М. Ментен разработали общую теорию ферментативной кинетики. Они исходили из предположения, что ферментативный процесс осуществляется в виде следующей химической реакции:



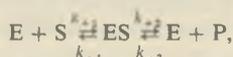
т. е. фермент E вступает во взаимодействие с субстратом S с образованием промежуточного комплекса ES , который далее распадается на свободный фермент и продукт реакции P . Математическая обработка на основе закона действующих масс дала возможность вывести уравнение, названное в честь авторов уравнением Михаэлиса — Ментен, выражающее количественное соотношение между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_s + [S]},$$

где v — наблюдаемая скорость реакции при данной концентрации субстрата $[S]$; K_s — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, моль/л; V_{\max} — максимальная скорость реакции при полном насыщении фермента субстратом.

Из уравнения Михаэлиса — Ментен следует, что при высокой концентрации субстрата и низком значении K_s скорость реакции является максимальной, т. е. $v = V_{\max}$ (реакция нулевого порядка, см. рис. 4.12); при низкой концентрации субстрата, напротив, скорость реакции оказывается пропорциональной концентрации субстрата в каждый данный момент (реакция первого порядка).

Следует указать, что уравнение Михаэлиса — Ментен в его классическом виде не учитывает влияния на скорость ферментативного процесса продуктов реакции, например в реакции:



и носит несколько ограниченный характер. Поэтому были предприняты попытки усовершенствовать его. Так было предложено уравнение Бриггса — Холдейна:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]},$$

где K_m представляет собой константу Михаэлиса, являющуюся экспериментально определяемой величиной. Она может быть представлена следующим уравнением

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad \text{или} \quad K_m = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} + \frac{k_{+2}}{k_{+1}}.$$

В числителе представлены константы скоростей распада комплекса ES в двух направлениях (в сторону исходных E и S и в сторону конечных продуктов реакции

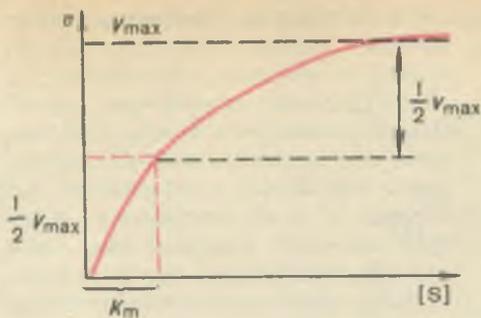


Рис. 4.13. Кривая уравнения Михаэлиса — Ментен; гиперболическая зависимость начальных скоростей катализируемой ферментом реакции от концентрации субстрата.

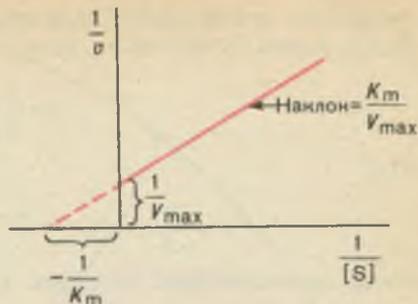


Рис. 4.14. График Лайнуивера — Бэрка.

Е и Р). Отношение k_{-1}/k_{+1} представляет собой константу диссоциации фермент-субстратного комплекса K_s , тогда:

$$K_m = K_s + \frac{k_{+2}}{k_{+1}}.$$

Отсюда вытекает важное следствие, что константа Михаэлиса всегда больше, чем константа диссоциации фермент-субстратного комплекса K_s , на величину k_{+2}/k_{+1} .

Для определения численного значения K_m обычно находят ту концентрацию субстрата, при которой скорость ферментативной реакции v составляет половину от максимальной V_{max} , т. е. если $v = \frac{1}{2}V_{max}$, то, подставляя значение v в уравнение Бриггса — Холдейна, получаем:

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]},$$

разделив обе части уравнения на V_{max} , получим:

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \text{ или } K_m + [S] = 2[S]; \text{ откуда: } K_m = [S].$$

Таким образом, константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата (моль/л), при которой скорость данной ферментативной реакции составляет половину от максимальной¹. Определение величины K_m имеет важное значение при выяснении механизма действия эффекторов на активность ферментов и т. д. Константу Михаэлиса можно вычислить из графика, представленного на рис. 4.13. Отрезок на оси абсцисс, соответствующий скорости, равной половине максимальной, будет представлять собой K_m .

Следует указать, что пользоваться графиком, построенным в прямых координатах зависимости начальной скорости реакции (v_0) от начальной концентрации субстрата $[S_0]$, неудобно, поскольку максимальная скорость (V_{max}) является в данном случае асимптотической величиной и определяется недостаточно точно.

Для более удобного графического представления экспериментальных данных Г. Лайнуивер и Д. Бэрк преобразовали уравнение Бриггса — Холдейна по методу двойных обратных величин, исходя из того принципа, что если существует

¹ Экспериментальные значения K_m для большинства ферментативных реакций с участием одного субстрата лежат обычно в пределах $10^{-2} - 10^{-5}$ М.

равенство между двумя какими-либо величинами, то и обратные величины также будут равны. В частности, если

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}, \text{ то } \frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} \cdot [S]}$$

или

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} \cdot [S]},$$

после преобразования получаем уравнение:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{\max}},$$

которое получило название уравнения Лайнуивера — Бэрка. Это уравнение прямой линии: $y = ax + b$. Если теперь в соответствии с этим уравнением построить график в координатах $1/v(y)$ от $1/[S](x)$, то получим прямую линию (рис. 4.14), тангенс угла наклона которой будет равен величине K_m/V_{\max} ; отрезок, отсекаемый прямой от оси ординат, представляет собой $1/V_{\max}$ (обратную величину максимальной скорости); если продолжить прямую линию за ось ординат, тогда на оси абсцисс отсекается отрезок, соответствующий обратной величине константы Михаэлиса $-1/K_m$ (см. рис. 4.14). Следует подчеркнуть, что значения V_{\max} , как и K_m , определяются более точно по сравнению с графиком, построенным в прямых координатах, при построении графика по методу двойных обратных величин, поэтому метод нашел широкое применение в современной энзимологии. Предложены также аналогичные графические способы определения K_m и V_{\max} в координатах зависимости v от $v/[S]$ и $[S]/v$ от $[S]$.

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

К ферментам применимы три основных критерия, характерных и для неорганических катализаторов. В частности, они остаются неизменными после реакции¹, т. е. освобождаясь, могут вновь реагировать с новыми молекулами субстрата (хотя нельзя исключить побочных влияний условий среды на активность фермента). Ферменты оказывают свое действие в ничтожно малых концентрациях (например, одна молекула фермента реннина, содержащегося в слизистой оболочке желудка теленка, створаживает около 10^6 молекул казеиногена молока за 10 мин при 37°C). Наличие либо отсутствие фермента или любого другого катализатора не оказывает влияния на величину константы равновесия и изменение свободной энергии (ΔG). Катализаторы лишь повышают скорость, с которой система приближается к термодинамическому равновесию, не сдвигая точки равновесия. Химические реакции с высокой константой равновесия и отрицательной величиной ΔG принято называть экзергоническими. Реакции с низкой константой равновесия и соответственно положительной величиной ΔG (они обычно не протекают спонтанно) называются эндергоническими. Для начала и завершения этих реакций необходим приток энергии извне. Однако в живых системах экзергонические процессы сопряжены с эндергоническими реакциями, обеспечивая последние необходимым количеством энергии.

Ферменты, являясь белками, обладают рядом характерных для этого класса органических соединений свойств, отличающихся от свойств неорганических катализаторов.

¹ В настоящее время доказано, что некоторые ферменты в конце химической реакции подвергаются модификации и даже распаду, а не освобождаются в неизменном виде, как постулировал Л. Михаэлис.

Термолабильность ферментов. Скорость химических реакций зависит от температуры, поэтому катализируемые ферментами реакции также чувствительны к изменениям температуры. Скорость химической реакции повышается в 2 раза при повышении температуры на 10°C . Однако вследствие белковой природы фермента тепловая денатурация при повышении температуры будет снижать эффективную концентрацию фермента с соответствующим снижением скорости реакции. Так, при температуре, не превышающей $45-50^{\circ}\text{C}$, скорость реакции увеличивается согласно теории химической кинетики. При температуре выше 50°C на скорость реакции большое влияние начинает оказывать тепловая денатурация белка-фермента, приводящая к полному прекращению ферментативного процесса (рис. 4.15).

Таким образом, термолабильность, или чувствительность к повышению температуры, является одним из характерных свойств ферментов, резко отличающих их от неорганических катализаторов. В присутствии последних скорость реакции возрастает экспоненциально при повышении температуры (см. кривую а на рис. 4.15). При 100°C почти все ферменты утрачивают свою активность (исключение составляет, очевидно, только один фермент мышечной ткани — миокиназа, которая выдерживает нагревание до 100°C). Оптимальной для действия большинства ферментов теплокровных животных является температура 40°C . При низких температурах (0°C и ниже) ферменты, как правило, не разрушаются, хотя активность их падает почти до нуля. Во всех случаях имеет значение время воздействия соответствующей температуры. В настоящее время для пепсина, трипсина и ряда других ферментов доказано существование прямой зависимости между скоростью инактивации фермента и степенью денатурации белка. Следует отметить, что на термолабильность ферментов определенное влияние оказывают концентрация субстрата, рН среды и другие факторы.

Зависимость активности ферментов от рН среды. Ферменты обычно наиболее активны в пределах узкой зоны концентрации водородных ионов, соответствующей для животных тканей в основном выработанным в процессе эволюции физиологическим значениям рН среды $6,0-8,0$. При графическом изображении на кривой колоколообразной формы имеется определенная точка, при которой фермент проявляет максимальную активность; эту точку называют оптимумом рН среды для действия данного фермента (рис. 4.16). При определении зависимости активности фермента от кон-

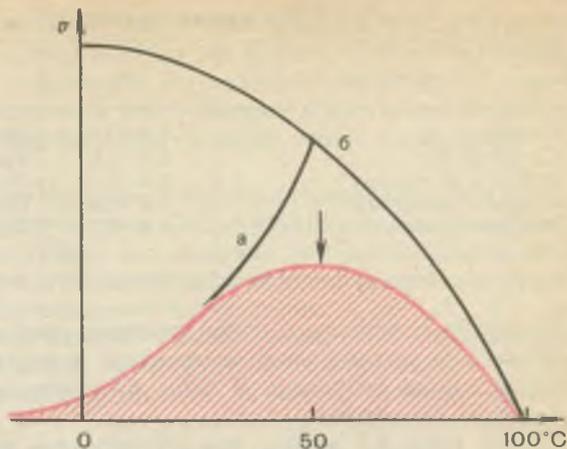


Рис. 4.15. Влияние температуры на скорость катализируемой ферментом реакции.

а — повышение скорости реакции как функция температуры; б — снижение скорости реакции как функция денатурации белка-фермента; стрелка указывает оптимум температуры.

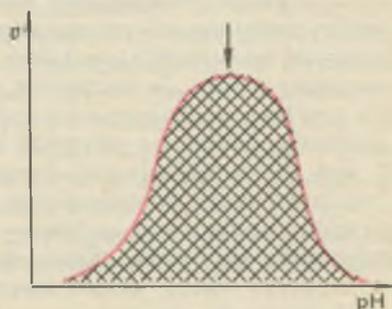


Рис. 4.16. Влияние рН на скорость катализируемой ферментом реакции (стрелка указывает оптимум рН).

Таблица 4.3. Оптимальные значения рН для некоторых ферментов

Фермент	рН	Фермент	рН
Пепсин	1,5–2,5	Каталаза	6,8–7,0
Катепсин В	4,5–5,0	Уреаза	7,0–7,2
Амилаза из солода	4,9–5,2	Липаза панкреатическая	7,0–8,5
Сахараза кишечная	5,8–6,2	Трипсин	7,5–8,5
Амилаза слюны	6,8–7,0	Аргиназа	9,5–10,0

центрации водородных ионов реакцию проводят при разных значениях рН среды, обычно при оптимальной температуре и наличии достаточно высоких (насыщающих) концентраций субстрата. В табл. 4.3 приводятся оптимальные значения рН среды для ряда ферментов.

Из табл. 4.3 видно, что рН-оптимум действия ферментов лежит в пределах физиологических значений. Исключение составляет пепсин, рН-оптимум которого равен 2,0 (при рН 6,0 он не активен и не стабилен). Объясняется это тем, что пепсин входит в состав желудочного сока, содержащего свободную соляную кислоту, которая создает оптимальную кислую среду для действия этого фермента. С другой стороны, рН-оптимум аргиназы лежит в сильно щелочной зоне (около 10,0); такой среды нет в клетках печени, следовательно, *in vivo* аргиназа функционирует, по-видимому, не в своей оптимальной зоне рН среды.

Согласно современным представлениям, влияние изменений рН среды на молекулу фермента заключается в воздействии на состояние и степень ионизации кислотных и основных групп (в частности, COOH-группы дикарбоновых аминокислот, SH-группы цистеина, имидазольного азота гистидина, NH₂-группы лизина и др.). При разных значениях рН среды активный центр может находиться в частично ионизированной или неионизированной форме, что сказывается на третичной структуре белка и соответственно формировании активного фермент-субстратного комплекса. Имеет значение, кроме того, состояние ионизации субстратов и кофакторов.

Специфичность ферментов. Ферменты обладают высокой специфичностью действия. Это свойство часто существенно отличает их от неорганических катализаторов. Так, мелко измельченные платина и палладий могут катализировать восстановление (с участием молекулярного водорода) десятков тысяч химических соединений различной структуры. Высокая специфичность ферментов обусловлена, как было упомянуто выше, конформационной и электростатической комплементарностью между молекулами субстрата и фермента и уникальной структурой активного центра фермента, обеспечивающими «узнавание», высокое сродство и избирательность протекания одной какой-либо реакции из тысячи других химических реакций, осуществляющихся одновременно в живых клетках.

В зависимости от механизма действия различают ферменты с относительной (или групповой) специфичностью и абсолютной специфичностью. Так, для действия некоторых гидролитических ферментов наибольшее значение имеет тип химической связи в молекуле субстрата. Например, пепсин расщепляет белки животного и растительного происхождения, хотя они могут существенно отличаться друг от друга как по химическому строению и аминокислотному составу, так и по физико-химическим свойствам. Однако пепсин не расщепляет углеводы или жиры. Объясняется это тем, что местом действия пепсина является пептидная —CO—NH—связь. Для действия липазы, катализирующей гидролиз жиров на глицерин и жирные кислоты, таким местом является сложноэфирная связь. Аналогичной групповой специфичностью обладают трипсин, химотрипсин, пептидазы, ферменты, гидролизующие α-гликозидные связи (но не β-гликозидные связи, имеющиеся в целлюлозе) в полисахаридах и т. д. Обычно эти ферменты участвуют в процессе пищеварения,

и их групповая специфичность, вероятнее всего, имеет определенный биологический смысл. Аналогичной относительной специфичностью обладают также некоторые внутриклеточные ферменты, например гексокиназа, катализирующая в присутствии АТФ фосфорилирование почти всех гексоз, хотя одновременно в клетках имеются и специфические для каждой гексозы ферменты, выполняющие такое же фосфорилирование.

Абсолютной специфичностью действия называют способность фермента катализировать превращение только единственного субстрата. Любые изменения (модификации) в структуре субстрата делают его недоступным для действия фермента. Примерами таких ферментов могут служить аргиназа, расщепляющая в естественных условиях (в организме) аргинин, уреаза, катализирующая распад мочевины, и др.

Имеются экспериментальные доказательства существования так называемой стереохимической специфичности, обусловленной существованием оптически изомерных L- и D-форм или геометрических (*цис*- и *транс*-) изомеров химических веществ. Так, известны оксидазы L- и D-аминокислот, хотя в природных белках обнаружены только L-аминокислоты. Каждый из видов оксидаз действует только на свой специфический стереоизомер¹.



Наглядным примером стереохимической специфичности является бактериальная аспаратдекарбоксилаза, катализирующая отщепление CO₂ только от L-аспарагиновой кислоты с превращением ее в L-аланин. Стереоспецифичность проявляют ферменты, катализирующие и синтетические реакции. Так, из аммиака и α-кетоглутарата во всех живых организмах синтезируется L-изомер глутаминовой кислоты, входящей в состав природных белков. Если какое-либо соединение существует в форме *цис*- и *транс*-изомеров с различным расположением групп атомов вокруг двойной связи, то, как правило, только один из этих геометрических изомеров может служить в качестве субстрата для действия фермента. Например, фумараза катализирует превращение только фумаровой кислоты (*транс*-изомер), но не действует на малеиновую кислоту (*цис*-изомер):



Таким образом, благодаря специфичности действия ферменты обеспечивают протекание с высокой скоростью лишь определенных реакций из огромного разнообразия возможных превращений в микропространстве клеток и целом организме, регулируя тем самым интенсивность обмена веществ.

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Рассмотрим кратко факторы, определяющие скорость реакций, катализируемых ферментами, и вопросы об активировании и ингибировании ферментов.

Как известно, скорость любой химической реакции уменьшается со временем, однако кривая зависимости скорости ферментативных реакций от времени (см.

¹ Имеется, однако, небольшая группа ферментов – рацемазы, катализирующие изменение стереической конфигурации субстрата. Так, бактериальная аланин-рацемаза обратимо превращает как L-, так и D-аланин в оптически неактивную смесь обоих изомеров: DL-аланин (рацемат).

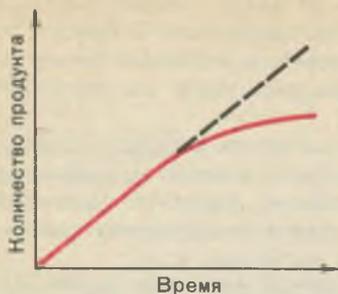


Рис. 4.17. Зависимость скорости ферментативной реакции от времени.

рис. 4.17) не имеет обычно той общей формы, которая характерна для гомогенных химических реакций. Уменьшение скорости ферментативных реакций во времени может быть обусловлено угнетающим действием продуктов реакции, уменьшением степени насыщения фермента субстратом (поскольку по мере протекания реакции концентрация субстрата снижается), частичной инактивацией фермента при заданных температуре и pH среды. Следует учитывать, кроме того, влияние скорости обратной реакции, которая может оказаться существенной по мере увеличения концентрации продуктов ферментативной реакции. Учитывая эти обстоятельства, при исследовании скорости ферментативных реакций в тканях и биологических жидкостях обычно определяют начальную скорость реакции в условиях, когда скорость ферментативной реакции приближается к линейной (в том числе при достаточно высокой для насыщения фермента концентрации субстрата).

Влияние концентраций субстрата и фермента на скорость ферментативной реакции

Из приведенного выше материала вытекает важное заключение, что одним из наиболее существенных факторов, определяющих скорость ферментативной реакции, является концентрация субстрата. При постоянной концентрации фермента скорость реакции постепенно увеличивается, достигая определенного максимума (см. рис. 4.12 и 4.13), когда дальнейшее увеличение количества субстрата практически уже не оказывает влияния на скорость реакции; в этих случаях принято считать, что субстрат находится в избытке, а фермент полностью насыщен. Ограничивающим фактором в последнем случае становится концентрация фермента.

Скорость любой ферментативной реакции непосредственно зависит от концентрации фермента. На рис. 4.18 представлена зависимость между скоростью реакции и повышающимися количествами фермента в присутствии насыщающих концентраций субстрата. Существующая линейная зависимость между этими величинами показывает, что скорость реакции пропорциональна количеству присутствующего фермента.

Активирование и ингибирование ферментов

Скорость ферментативной реакции, т. е. активность фермента, определяется также присутствием в среде активаторов и ингибиторов: первые увеличивают скорость реакции и иногда модифицируют ее, вторые тормозят реакцию. Среди химических соединений, оказывающих влияние на активность ферментов, встречаются разнооб-

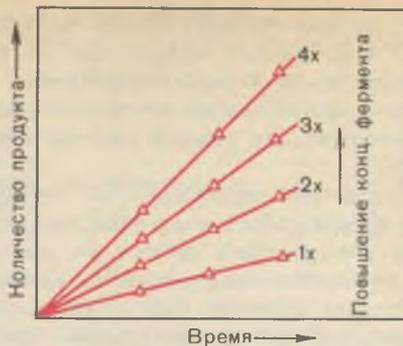


Рис. 4.18. Влияние концентрации фермента на скорость реакции в присутствии насыщающих концентраций субстрата.

Таблица 4.4. Ферменты, активируемые металлами

Фермент	Металл	Фермент	Металл
Цитохромы	Fe	Амилаза	Ca
Каталаза	»	Липаза	»
Пероксидаза	»	Карбоангидраза	Zn
Триптофанооксидаза	»	Лактатдегидрогеназа	»
Гомогентизиказа	»	Уриказа	»
Аскорбатоксидаза	Cu	Карбоксипептидаза	»
Тирозиназа	»	Пируваткарбоксилаза	Mg
Фенолоксидаза	»	Фосфатазы	»
Ксантинооксидаза	Mo	Фосфоглюкокиназа	»
Нитратредуктаза	»	Аргиназа	Mn
Альдегидоксидаза	»	Фосфоглюкомутаза	»
Некоторые пептидазы	Co	Холинэстераза	»

разные вещества. Так, соляная кислота активирует действие пепсина, желчные кислоты — панкреатической липазы; некоторые тканевые ферменты (оксидоредуктазы, катепсины, аргиназа), растительная протеиназа папаин и другие в значительной степени активируются соединениями, содержащими свободные SH-группы (глутатион, цистеин), а некоторые также витамином С. Особенно часто в качестве активаторов служат (выступают) ионы двухвалентных и иногда одновалентных металлов. Получены доказательства, что около одной четверти всех известных ферментов для проявления полной каталитической активности нуждаются в присутствии металлов. Многие ферменты вообще не активны в отсутствие металлов. Так, при удалении цинка угольная ангидраза практически лишена ферментативной активности; более того, для действия этого фермента цинк не может быть заменен никаким другим металлом. Известны ферменты, действие которых активируется рядом металлов, в частности енолаза активируется Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ . В табл. 4.4 приведены примеры участия металлов в действии некоторых ферментов¹.

Относительно роли металлов в активирующем действии ферментов имеющиеся данные свидетельствуют о том, что в ряде случаев ионы металлов (Co^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}) выполняют функции простетических групп ферментов или служат акцепторами и донорами электронов или выступают в качестве электрофилов или нуклеофилов, сохраняя реактивные группы в необходимой ориентации. В других случаях они способствуют присоединению субстрата к активному центру и образованию фермент-субстратного комплекса. Например, ионы Mg^{2+} через отрицательно заряженную фосфатную группу обеспечивают присоединение монофосфорных эфиров органических веществ к активному центру фосфатаз, катализирующих гидролиз этих соединений. В ряде случаев металл соединяется с субстратом, образуя истинный субстрат, на который действует фермент. В частности, ионы Mg^{2+} активируют креатинфосфокиназу благодаря образованию истинного субстрата — магниевой соли АТФ. Наконец, имеются экспериментальные доказательства прямого участия металлов (например, ионов Ca^{2+} в молекуле амилазы слюны) в формировании и стабилизации активного центра и всей трехмерной структуры молекулы фермента. Следует отметить также, что металлы нередко выступают в роли аллостерических модуляторов (эффекторов, см. рис. 4.22). Взаимодействуя с аллостерическим центром, подобный металл (эффектор) способствует образованию наиболее выгодной пространственной конфигурации фермента и активного фермент-субстратного комплекса.

Анионы при физиологических концентрациях обычно неэффективны или оказывают небольшое активирующее влияние на ферменты. Исключение составляют пеп-

¹ Обычно трудно провести границу между металлоферментами (металл связан прочно с белком и незаменим) и ферментами, активируемыми металлами (последние лишь ускоряют реакцию и легко диссоциируют).

син, некоторые оксидоредуктазы, активируемые анионами, а также амилаза слюны, катализирующая гидролиз крахмала, активность которой повышается при действии ионов хлора, и аденилатциклаза, которая активируется анионами галогенов.

Ингибиторами принято называть вещества, вызывающие частичное или полное торможение реакций, катализируемых ферментами. Недавно открыты антиферменты (антиэнзимы), представляющие собой белки (или полипептиды), действующие как ингибиторы ферментов. К подобным веществам относятся, например, ингибитор трипсина соевых бобов и сывороточный антитрипсин. Они образуют труднодиссоциируемые комплексы с соответствующими ферментами. Иногда ингибитор может входить в состав сложных ферментов, например протеинкиназы и протеинфосфатазы, катализирующих процессы фосфорилирования — дефосфорилирования в живых организмах. Однако до сих пор не выяснено, являются ли подобные антиферменты истинными ингибиторами или регуляторными субъединицами, в частности, какова разница в назначении регуляторной (R) субъединицы в составе протеинкиназы и ингибиторной (I) субъединицы в составе протеинфосфатазы.

Ферменты являются белками, поэтому любые агенты, вызывающие денатурацию белка (нагревание, кислоты, щелочи, соли тяжелых металлов), приводят к инактивации фермента. Однако подобное инактивирование относительно неспецифично. Оно не связано с механизмом действия ферментов. Гораздо большую группу составляют так называемые специфические ингибиторы, которые оказывают свое действие на один какой-либо фермент или группу родственных ферментов. Исследование этих ингибиторов имеет важное значение по ряду причин. Во-первых, ингибиторы могут дать ценную информацию о природе активного центра фермента, а также его функциональных групп и химических связей, обеспечивающих образование фермент-субстратного комплекса. Известны вещества, специфически связывающие ту или иную группу в молекуле фермента, выключая ее из сферы химической реакции. Так, йодацетат $\text{ICH}_2\text{—COOH}$, его амид и этиловый эфир, парахлормеркурибензоат $\text{C}_6\text{H}_4\text{—COOH}$ и другие реагенты сравнительно легко вступают в химическую связь с некоторыми SH-группами ферментов. Если такие группы имеют существенное значение для акта катализа, то добавление подобных ингибиторов приводит к полной потере активности фермента:



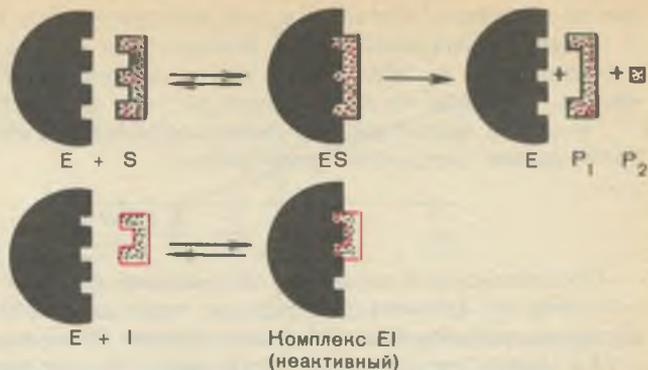
Действие ряда других ферментов (холинэстераза, трипсин и химотрипсин) сильно тормозится некоторыми фосфорорганическими соединениями, например ДФФ, вследствие блокирования ключевой гидроксильной группы серина в активном центре. Во-вторых, ингибиторы нашли широкое применение в энзимологии при исследовании природы множественных форм ферментов и изоферментов, отличающихся не столько по электрофоретической подвижности, сколько по различию чувствительности к одному и тому же ингибитору.

При помощи ингибиторов, выключающих отдельные стадии многоступенчатого метаболического процесса, могут быть точно установлены последовательность химических реакций и природа участвующих ферментов. Таким образом, при применении йодацетата, фторида и других ингибиторов был расшифрован гликолитический путь окислительно-восстановительных превращений глюкозы до молочной кислоты в мышечной ткани, насчитывающий 11 стадий с участием 11 ферментов и 10 промежуточных метаболитов.

С ингибированием ферментов связан механизм действия многих токсинов и ядов на организм. Так, известно, что при отравлениях синильной кислотой смерть наступает вследствие полного торможения дыхательных ферментов (цитохромоксидазы), в особенности клеток мозга. Токсическое влияние на организм человека и животных некоторых инсектицидов обусловлено торможением активности холинэстеразы — фермента, играющего первостепенную роль в деятельности нервной системы.

Рис. 4.19. Действие конкурентного ингибитора (схема по В. Л. Кретовичу).

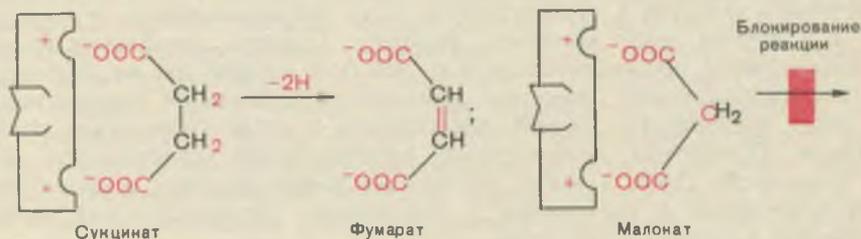
E – фермент; S – субстрат; P₁ и P₂ – продукты реакции; I – ингибитор.



Рациональная химиотерапия – направленное применение лекарственных препаратов в медицине – должна основываться на точном знании механизма действия этих препаратов на биосинтез ферментов, сами ферменты или их регуляцию в организме. Иногда для лечения некоторых болезней используют избирательные ингибиторы. Так, ингибитор трипсина, химотрипсина и калликреина – трасилол – широко применяется для лечения острого панкреатита. Избирательное ингибиторное действие некоторых природных и синтетических соединений (так называемых антиметаболитов) на ферменты служит основой для разработки эффективных методов синтеза химиотерапевтических препаратов. Этот путь открывает широкие возможности для регуляции синтеза ферментов и интенсивности метаболизма.

Типы ингибирования. Различают обратимое и необратимое ингибирование. Если молекула ингибитора вызывает стойкие изменения или модификацию функциональных групп фермента, то такой тип ингибирования называется **необратимым**. Чаще, однако, имеет место **обратимое** ингибирование, поддающееся количественному изучению на основе уравнения Михаэлиса – Ментен. Обратимое ингибирование в свою очередь разделяют на конкурентное и неконкурентное, в зависимости от того, удастся или не удастся преодолеть торможение ферментативной реакции путем увеличения концентрации субстрата.

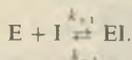
Конкурентное ингибирование может быть вызвано веществами, имеющими структуру, похожую на субстрат, но несколько отличающуюся от структуры истинного субстрата. Классическим примером подобного типа ингибирования является торможение сукцинатдегидрогеназы (СДГ) малоновой кислотой. Этот фермент катализирует окисление путем дегидрирования янтарной кислоты (сукцината) в фумаровую:



Если в среду добавить малонат (ингибитор), то в результате структурного сходства его с истинным субстратом сукцинатом (наличие двух таких же ионизированных карбоксильных групп) он будет реагировать с активным центром с образованием фермент-ингибиторного комплекса, однако при этом переноса водорода от малоната не происходит. Так как структуры субстрата (сукцинат) и ингибитора (малонат)

все же несколько отличаются, они конкурируют за связывание с активным центром, и степень торможения будет определяться соотношением концентраций малоната и сукцината, а не абсолютной концентрацией ингибитора. Этот тип ингибирования иногда называют ингибированием по типу метаболического антагонизма (рис. 4.19).

В общей форме реакция взаимодействия ингибитора с ферментом может быть представлена следующим уравнением:

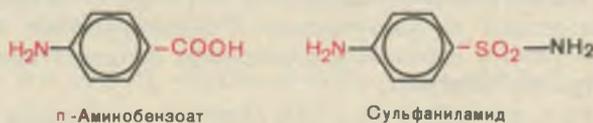


Образовавшийся комплекс, называемый фермент-ингибиторным комплексом (EI), в отличие от фермент-субстратного комплекса (ES) не распадается с образованием продуктов реакции. Константу диссоциации EI-комплекса, или ингибиторную константу (K_i), можно, следуя теории Михаэлиса – Ментен, определить как отношение констант обратной и прямой реакций:

$$K_i = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]},$$

т. е. ингибиторная константа прямо пропорциональна произведению концентрации фермента и ингибитора и обратно пропорциональна концентрации EI-комплекса.

Метод конкурентного торможения нашел широкое применение в медицинской практике. Известно, например, что для лечения некоторых инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями, применяют сульфаниламидные препараты. Оказалось, что эти препараты имеют структурное сходство с парааминобензойной кислотой, которую бактериальная клетка использует для синтеза фолиевой кислоты, являющейся составной частью ферментов бактерий. Благодаря этому структурному сходству сульфаниламид блокирует действие фермента путем вытеснения парааминобензойной кислоты из комплекса с ферментом, синтезирующим фолиевую кислоту, что ведет к торможению роста бактерий.



Некоторые аналоги витамина B₆ и фолиевой кислоты, в частности дезоксипиридоксин и аминоптерин (см. главу 5), действуют как конкурентные, так называемые коферментные ингибиторы (или антивитамины), тормозящие многие биохимические процессы в организме.

Неконкурентное ингибирование вызывается веществами, не имеющими структурного сходства с субстратами и часто связывающимися не с активным центром, а в другом месте молекулы фермента. Степень торможения во многих случаях определяется продолжительностью действия ингибитора на фермент. При данном типе ингибирования благодаря образованию стабильной ковалентной связи фермент часто подвергается полной инактивации, и тогда торможение становится необратимым. Примерами необратимого ингибирования (инактивации) является действие йодацетата, ДФФ, а также диэтил-*л*-нитрофенилфосфата и синильной кислоты, заключающееся в связывании и выключении функциональных групп или ионов металлов в молекуле фермента.

Для выяснения вопроса о типе ингибирования пользуются уравнениями Михаэлиса – Ментен, Лайнуивера – Бэрка или другими, например уравнением Эди – Хофсти:

$$v = -K_m(v/[S]) + V_{max}$$

и соответствующими графиками в прямолинейных координатах.

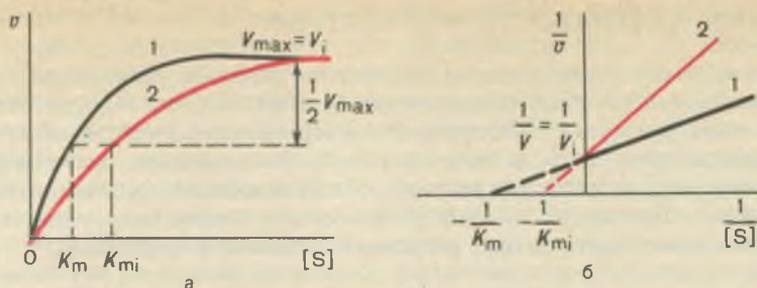


Рис. 4.20. Графики зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии конкурентного ингибитора.

а — в координатах v от $[S]$; б — в координатах $1/v$ от $1/[S]$; V и V_i — максимальные скорости реакции, K_m и K_{mi} — константа Михаэлиса соответственно в отсутствие (1) и в присутствии (2) ингибитора.

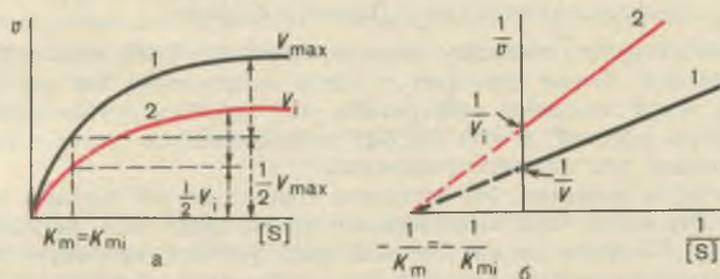


Рис. 4.21. Графики зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии неконкурентного ингибитора. Обозначения те же, что на рис. 4.20.

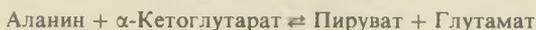
На рис. 4.20 видно, что при конкурентном типе ингибирования ингибитор увеличивает значение K_m (на величину, равную разнице в длине отрезков, отсекаемых на оси абсцисс), не оказывая влияния на максимальную скорость. Это означает, что при достаточно высокой концентрации субстрата $[S]$ ингибитор вытесняется молекулами субстрата из комплекса EI . При неконкурентном ингибировании (рис. 4.21) ингибитор снижает величину максимальной скорости. Если при этом величина K_m не уменьшается, то говорят о полностью неконкурентном ингибировании. Подобный тип ингибирования имеет место при образовании неактивных, труднодиссоциирующих комплексов EI и (или) EIS . Часто, однако, имеет место смешанный тип ингибирования (иногда называемый частично неконкурентным типом), при котором снижение V_{max} сочетается с одновременным увеличением K_m . Это означает, что комплекс EI сохраняет частичную активность, т. е. способность к образованию промежуточного тройного комплекса EIS , в котором субстрат подвергается замедленному каталитическому превращению. В редких случаях степень торможения активности фермента может увеличиваться с повышением концентрации субстрата; для этого типа торможения был предложен довольно неточный термин **бесконкурентное ингибирование**. Один из механизмов такого торможения обусловлен возможностью соединения ингибитора с комплексом ES с образованием неактивного или медленно реагирующего тройного комплекса ESI .

Таким образом, при графическом анализе скоростей ферментативных реакций как функции концентраций субстрата может быть получена ценная информация по кинетике ферментативных реакций, освещающая возможный механизм ферментативного катализа.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Одним из уникальных свойств живых организмов является удивительная сбалансированность катаболических (биodeградативных) и анаболических (биосинтетических) процессов. При этом в клетках одновременно совершаются процессы синтеза, распада и взаимопревращения сотен и тысяч разнообразных веществ, которые регулируются множеством регуляторных механизмов, обеспечивающих постоянство внутренней среды организма. Некоторые из этих регуляторных механизмов, среди которых важная роль принадлежит механизмам регуляции активности ферментов, будут рассмотрены ниже.

Влияние закона действия масс. В катализируемой ферментом обратимой химической реакции, например: $A + B \rightleftharpoons C + D$ концентрация компонентов реакции и соответственно направление реакции будут регулироваться влиянием закона действия масс. Оно, в частности, может быть показано в обратимой реакции трансминирования, катализируемой ферментом аланинаминотрансферазой:



Этот тип регуляции играет, очевидно, лишь ограниченную роль, поскольку в реальных условиях реакция обычно протекает в одном направлении, так как образовавшиеся продукты могут оказаться субстратами для действия других ферментов и выводиться из сферы реакции; в этих случаях устанавливается скорее устойчивое (стационарное) состояние, чем истинное равновесие.

Изменение количества фермента. На бактериях хорошо изучен феномен индуцированного синтеза ферментов при выращивании их на среде, где единственным источником углерода и энергии служит тот или иной углевод, например глюкоза. Замена глюкозы в среде на лактозу приводит к индуцированному или адаптивному (после небольшого периода лаг-фазы) синтезу фермента галактозидазы (программированному лактозным геном, см. главу 13), расщепляющей лактозу на глюкозу и галактозу. В животных тканях подобный быстрый синтез ферментов наблюдается сравнительно реже, и механизм, индуцирующий синтез, изучен только для небольшого числа ферментов (тирозинтрансминазы, серин- и треониндегидратазы, триптофанпирролазы и др.). Однако при поступлении в организм некоторых ядов, канцерогенных веществ, алкалоидов, инсектицидов наблюдается резкое увеличение через несколько дней активности (соответственно количества) ферментов — гидроксилаз эндоплазматической сети клеток печени, окисляющих чужеродные вещества в нетоксичные для организма продукты. С другой стороны, описаны случаи, когда под действием подобных гидроксилаз чужеродные вещества превращаются в организме в более токсичные соединения. Это явление, обратное детоксикации, получило название летального синтеза.

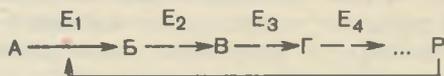
Проферменты. Протеолитические ферменты желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы синтезируются в неактивной форме, в виде проферментов (зимогенов). Регуляция в этих случаях сводится к превращению проферментов в активные ферменты под влиянием специфических агентов. Так, трипсин синтезируется в поджелудочной железе в форме трипсиногена. Последний превращается в активный трипсин в кишечнике в результате аутокатализа или под действием других протеиназ (см. главу 11). Превращение неактивного пепсиногена в активный пепсин осуществляется аутокаталитически в результате ограниченного протеолиза в присутствии соляной кислоты и также связано с отщеплением от профермента специфического ингибитора полипептидной природы. Синтез протеиназ в неактивной форме и ряда других неактивных белков-предшественников имеет, очевидно, определенный биологический смысл, предотвращая разрушение клеток органов, в которых образуются проферменты.

Химическая модификация фермента. Некоторые белки при формировании третичной структуры подвергаются постсинтетической модификации (см. главу 1). Оказалось,

что ключевые ферменты энергетического обмена — фосфорилаза, гликогенсинтаза и др. — также контролируются путем фосфорилирования и дефосфорилирования, осуществляемого специфическими ферментами — протеинкиназой и протеинфосфатазой, уровень активности которых в свою очередь регулируется гормонами. Уровень активности ключевых ферментов обмена углеводов и соответственно интенсивность и направленность самих процессов обмена определяются соотношением фосфорилированных и дефосфорилированных форм этих ферментов. Химическая постсинтетическая модификация ферментов включает, кроме того, процессы ограниченного протеолиза, метилирования, гликозилирования и другие, обеспечивая тем самым микроскопический тип регуляции активности ферментов и соответственно физиологическую скорость процессов обмена веществ.

Регуляция активности ферментов по принципу обратной связи. Во многих строго биосинтетических реакциях основным типом регуляции скорости многоступенчатого ферментативного процесса является ингибирование по принципу обратной связи, когда конечный продукт биосинтетической цепи подавляет активность фермента, катализирующего первую стадию.

Предположим, что в клетках осуществляется многоступенчатый биосинтетический процесс, каждая стадия которого катализируется собственным ферментом:



Скорость подобной суммарной последовательности реакций в значительной степени определяется концентрацией конечного продукта (P), накопление которого выше допустимого уровня оказывает мощное ингибирующее действие на первую стадию процесса, соответственно на фермент E_1 .

Впервые существование подобного механизма контроля активности ферментов метаболитами было показано у *E. coli* при исследовании синтеза изолейцина и ЦТФ. Оказалось, что изолейцин, являющийся конечным продуктом, избирательно подавляет активность треониндегидратазы, катализирующей первое звено процесса превращения треонина в изолейцин, насчитывающего пять ферментативных реакций. Аналогично ЦТФ как конечный продукт биосинтетического пути оказывает ингибирующий эффект на первый фермент (аспартаткарбамоилтрансферазу), регулируя тем самым свой собственный синтез. Этот тип ингибирования получил название ингибирования по принципу обратной связи или ретроингибирования. Существование его доказано во всех живых организмах, и в настоящее время он рассматривается как один из ведущих типов регуляции активности ферментов и клеточного метаболизма в целом¹.

С другой стороны, в амфиболических процессах, выполняющих одновременно биосинтетические и биodeградативные функции², доказано существование регуляции как по типу ретроингибирования, так и макроэргическими соединениями — индикаторами энергетического состояния клетки. Для амфиболических процессов уникальным типом регуляции, свойственным только им, является, кроме того, активация предшественником, когда первый метаболит в многоступенчатом пути активирует фермент, катализирующий последнюю стадию. Так, доказано активирующее влияние глюкозо-6-фосфата, являющегося предшественником гликогена, на фермент гликогенсинтазу.

¹ Скорость реакции (как и активность ферментов) в чисто биodeградативных (катаболических) процессах регулируется промежуточными продуктами, являющимися индикаторами энергетического состояния клетки (пуриновые нуклеотиды, пирофосфат, неорганический фосфат и др.).

² К амфиболическим процессам относят такие центральные пути обмена, как гликолиз, гликогенолиз, цикл трикарбоновых кислот, гексозомонофосфатный путь, трансминирование аминокислот.

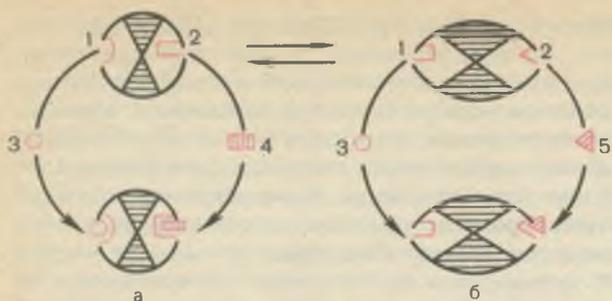


Рис. 4.22. Взаимодействие аллостерического фермента с субстратом и эффекторами (схема).

а — активный комплекс; б — неактивный комплекс; 1 — активный центр; 2 — аллостерический центр; 3 — субстрат; 4 — положительный эффектор; 5 — отрицательный эффектор.

Подобные типы ингибирования конечным продуктом и активирования первым продуктом свойственны аллостерическим (регуляторным) ферментам, когда эффектор, структурно отличаясь от субстрата, связывается в особом (аллостерическом) центре молекулы фермента, пространственно удаленном от активного центра. Взаимопревращения активного и неактивного аллостерического фермента в упрощенной форме, а также конформационные изменения, наблюдаемые при присоединении субстрата и эффекторов, представлены на рис. 4.22. Присоединение отрицательного эффектора к аллостерическому центру вызывает значительные изменения конфигурации активного центра молекулы фермента, в результате чего фермент теряет сродство к своему субстрату (образование неактивного комплекса).

Аллостерические взаимодействия проявляются в характере кривых зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата или эффектора, в частности в S-образности этих кривых (отклонение от гиперболической кривой Михаэлиса — Ментен). Это означает, что связывание одной молекулы субстрата облегчает связывание второй молекулы в активном центре, способствуя тем самым увеличению скорости реакции. Кроме того, для аллостерических регуляторных ферментов характерна нелинейная зависимость скорости реакции от концентрации фермента.

Другие типы регуляции активности ферментов. Существует ряд других механизмов, контролирующих скорость метаболических процессов и активность внутриклеточных ферментов. Абсолютное количество присутствующего в клетке фермента регулируется скоростью его синтеза и распада. К регуляторным механизмам могут быть отнесены также конкуренция ферментов за общий субстрат, выключение активности одного из изоферментов (у множественных форм ферментов), влияние концентраций кофакторов и явление компартиментализации. Механизм компартиментализации играет, по-видимому, важную биологическую роль, пространственно разъединяя с помощью биомембран ферменты со своими субстратами (например, лизосомальные ферменты: протеиназы, фосфатазы, рибонуклеазы и другие гидролитические ферменты, с цитоплазматическими веществами, на которые они действуют). Кроме того, этот механизм позволяет разделить несовместимые в одно и то же время метаболические процессы. Примером последних могут быть пути синтеза жирных кислот, протекающие в основном в растворимой фракции цитоплазмы, и пути распада жирных кислот, сосредоточенные в митохондриях.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Определение количественного содержания ферментов в биологических объектах представляет известные трудности, поскольку, за редким исключением, ферменты в тканях присутствуют в ничтожно малых концентрациях. Поэтому о количестве ферментов судят по скорости катализируемой реакции в определенных, согласованных условиях измерения. При оптимальных условиях температуры, рН среды и полном насыщении фермента субстратом скорость катализируемой реакции пропорциональна

концентрации фермента. О скорости ферментативной реакции судят или по скорости убыли субстрата, или по скорости образования продукта реакции. Для выражения концентрации фермента и количественной оценки его активности Комиссия по ферментам Международного биохимического союза рекомендовала стандартную международную единицу (Е или U): за единицу активности любого фермента принимается то количество его, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 микромоля субстрата в минуту (мкмоль/мин). В связи с введением Международной системы единиц (СИ) предложено новое определение ферментной единицы катал (кат, kat); 1 кат есть каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью, равной 1 моль в 1 с (1 моль/с). Отношение международной единицы (Е) к каталу можно выразить следующим образом: $1 \text{ кат} = 1 \text{ моль} \cdot \text{с}^{-1} = 60 \text{ моль} \times \text{мин}^{-1} = 60 \cdot 10^6 \text{ мкмоль} \times \text{мин}^{-1} = 6 \cdot 10^7 \text{ Е}$; или $1 \text{ Е} = = 1 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} = = (1/60) \text{ мкмоль} \cdot \text{с}^{-1} = = (1/60) \text{ мккат} = 16,67 \text{ нкат}$. Таким образом, 1 Е фермента соответствует 16,67 нкат.

Рекомендовано, кроме того, проведение измерения единиц фермента при 25 °С, оптимальном рН и концентрации субстрата, превышающей концентрацию насыщения. В этих случаях скорость соответствует нулевому порядку реакции в отношении субстрата и будет зависеть только от концентрации фермента.

Для выражения активности в практической работе с ферментами часто пользуются производными понятиями удельной и молярной активности. Удельную активность фермента принято выражать числом единиц ферментативной активности на 1 мг белка (или числом каталов на 1 кг активного белка). Число молекул субстрата, подвергающихся превращению одной молекулой фермента в секунду, принято называть числом оборотов, или молярной активностью (молярная каталитическая активность выражается в каталах на 1 г-моль фермента). Одна молекула каталазы эритроцитов способна, например, расщепить в 1 с 44 000 молекул перекиси водорода¹.

¹ Для того чтобы 1 атом неорганического железа, также катализирующий распад H_2O_2 , расщепил такое число молекул H_2O_2 , которое расщепляет каталаза в 1 с, потребовалось бы несколько лет. Этот пример является наглядным доказательством одного из главных свойств ферментов — их высокой каталитической активности.

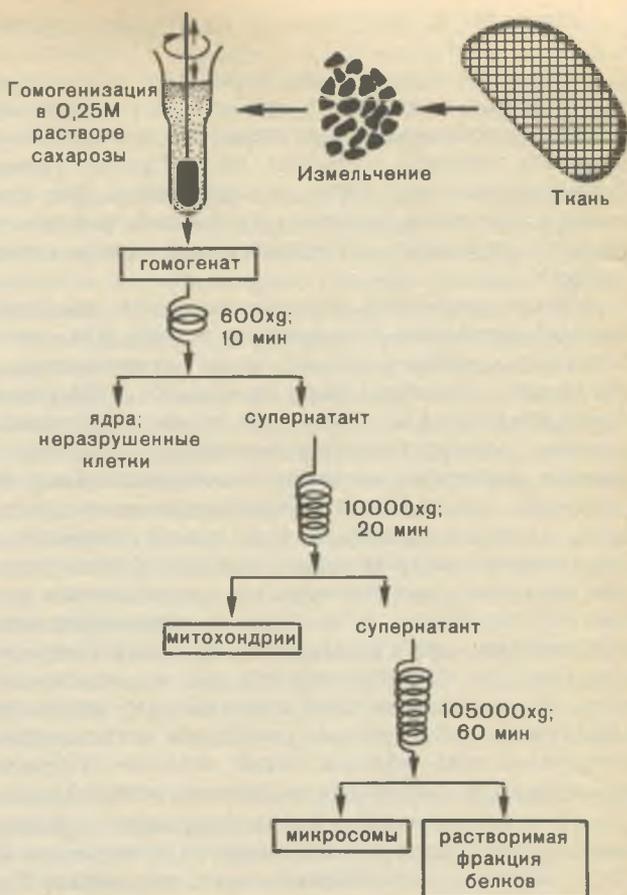


Рис. 4.23. Дифференциальное центрифугирование гомогенатов ткани печени (схема).

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Вопрос о локализации ферментов в структурных образованиях клетки (ядро, митохондрии, лизосомы и др.) является чрезвычайно важным, особенно в препаративной энзимологии, когда перед исследователем поставлена задача изолировать и выделить фермент в чистом виде. Сравнительно легко обнаружить локализацию фермента методами цито- и гистохимии. Для этого тонкие срезы органа инкубируют с соответствующими субстратами, и после инкубации локализацию продукта реакции открывают добавлением подходящих реактивов по развитию специфической окраски.

В препаративной энзимологии чаще пользуются методом дифференциального центрифугирования гомогенатов тканей. Для этого сначала разрушают клеточную структуру с помощью подходящего дезинтегратора и полученную квазиоднородную (гомогенизированную) массу подвергают дифференциальному центрифугированию при температуре 0—4 °С. Примерная схема дифференциального центрифугирования гомогенатов в высокоскоростных центрифугах представлена на рис. 4.23¹. Обычно распределение ферментов изучают в последовательных индивидуальных фракциях, изолированных при дробном центрифугировании гомогенатов, в частности во фракции ядер, которую получают при низкой скорости центрифугирования, во фракции митохондрий, которая осаждается при средней скорости центрифугирования, во фракции микросом (или рибосом), для изолирования которой требуется высокая скорость центрифугирования, и, наконец, в оставшейся прозрачной надосадочной жидкости (супернатант), представляющей собой растворимую фракцию цитоплазмы. Следует отметить, что фракция митохондрий не является гомогенной, поскольку из нее удастся изолировать частицы, известные как лизосомы, размер которых занимает промежуточное место между размерами митохондрий и микросом. В свою очередь микросомальная фракция также является гетерогенной, поскольку она происходит в основном из элементов эндоплазматической сети неоднородного строения.

При помощи метода фракционирования в центрифугах было показано, что ядерная фракция печени и почек содержит незначительное число ферментов, хотя известно, что в ядрах осуществляется синтез некоторых белков. Основным местом синтеза белка, как теперь установлено, является фракция рибосом цитоплазмы. Показано, кроме того, что ферменты гликолиза сосредоточены преимущественно в растворимой фракции цитоплазмы, в то время как цитохромоксидаза и ферменты цикла Кребса локализованы во фракции митохондрий. С митохондриями связаны также ферменты, катализирующие окислительное фосфорилирование и распад жирных кислот. Ферменты, катализирующие биосинтез жирных кислот, наоборот, содержатся в растворимой фракции цитоплазмы.

Для изолирования и выделения ферментов из биологических объектов в чистом (гомогенном) состоянии используется весь арсенал методов выделения белков в индивидуальном виде, который был подробно рассмотрен выше (см. главу 1).

КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

Современная классификация и номенклатура ферментов была разработана Комиссией по ферментам Международного биохимического союза и утверждена на V Международном биохимическом конгрессе в 1961 г. в Москве².

¹ Символом *g* на рис. 4.23 обозначена величина ускорения силы тяжести ($\text{см}/\text{с}^2$); например, 10 000*g* означает, что центробежное ускорение в месте расположения ячейки в роторе ультрацентрифуги превышает ускорение силы тяжести в 10 000 раз.

² В работе Комиссии принимали участие крупнейшие энзимологи мира, в том числе от нашей страны акад. А. Е. Браунштейн.

Необходимость систематики номенклатуры диктовалась прежде всего стремительным ростом числа вновь открываемых с каждым годом ферментов, которым разные исследователи присваивали названия по своему усмотрению. Более того, для одного и того же фермента подчас употребляли два или несколько названий, что вносило путаницу в номенклатуру. Некоторые названия ферментов вообще не отражали тип катализируемой реакции.

До 1961 г. не было единой классификации ферментов. Трудности заключались в том, что разные исследователи за основу классификации ферментов брали различные принципы. Комиссией были рассмотрены три принципа, которые могли служить основой для классификации ферментов и их обозначения. Первый принцип — химическая природа фермента, т. е. принадлежность к флавопротеинам, пиридоксальфосфат-протеинам, гемопроотеинам, металлопротеинам и т. д. Однако этот принцип не мог служить общей основой для классификации, так как только для небольшого числа ферментов известны простетические группы, доступные идентификации и прямому определению. Вторым принцип — химическая природа субстрата, на который действует фермент; по этому принципу трудно классифицировать фермент, так как в качестве субстрата могут служить разнообразные соединения внутри определенного класса веществ (белки, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты) и бесчисленное множество промежуточных продуктов обмена. В основу принятой классификации положен третий принцип — тип катализируемой реакции, который является специфичным для действия любого фермента; этот принцип логично использовать в качестве основы для классификации и номенклатуры ферментов.

Таким образом, тип катализируемой химической реакции в сочетании с названием субстрата (субстратов) и служит основой для систематического наименования ферментов. Согласно этой классификации ферменты делят на шесть главных классов: 1) оксидоредуктазы; 2) трансферазы; 3) гидролазы; 4) лиазы; 5) изомеразы; 6) лигазы (синтазы).

Оксидоредуктазы. К классу оксидоредуктаз относят ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления. Систематические названия их составляют по форме «донор: акцептор оксидоредуктаза», например лактат: НАД⁺ оксидоредуктаза для ЛДГ.

Различают следующие основные оксидоредуктазы: аэробные дегидрогеназы или оксидазы, катализирующие перенос протонов (электронов) непосредственно на кислород, анаэробные дегидрогеназы, ускоряющие перенос протонов (электронов) на промежуточный субстрат, но не на кислород, цитохромы, катализирующие перенос только электронов. К этому классу относятся также гемсодержащие ферменты каталаза и пероксидаза, катализирующие реакции с участием перекиси водорода.

Трансферазы. К классу трансфераз относят ферменты, катализирующие реакции межмолекулярного переноса различных атомов, групп атомов и радикалов. Наименование их составляется по форме: «донор: транспортируемая группа — трансфераза».

Различают трансферазы, катализирующие перенос одноуглеродных остатков, ацильных, гликозильных, альдегидных или кетонных, нуклеотидных остатков, азотистых групп, остатков фосфорной и серной кислот и др. Например: метил- и формилтрансферазы, ацетилтрансферазы, аминотрансферазы, фосфотрансферазы и др.

Гидролазы. В класс гидролаз входит большая группа ферментов, катализирующих расщепление внутримолекулярных связей органических веществ при участии молекулы воды. Наименование их составляется по форме: «субстрат — гидролаза». К ним относятся: эстеразы — ферменты, катализирующие реакции гидролиза и синтеза сложных эфиров гликозидазы, ускоряющие разрыв гликозидных связей, фосфатазы и пептидгидролазы, катализирующие гидролиз фосфоангидридных и пептидных связей амидазы, ускоряющие разрыв кислотнo-ангидридных связей, отличных от пептидных, и др.

Лиазы. К классу лиаз относят ферменты, катализирующие разрыв C—O, C—S, C—N и других связей, а также обратимые реакции отщепления различных групп

от субстратов не гидролитическим путем; эти реакции сопровождаются образованием двойной связи или присоединением групп к месту двойной связи. Ферменты обозначаются термином: «субстрат — лиазы». Например, фумарат-гидратаза (систематическое название: L-малат-гидролиаза) катализирует обратимое отщепление молекулы воды от яблочной кислоты с образованием фумаровой кислоты. В эту же группу входят декарбоксилазы (карбоксо-лиазы), амидин-лиазы и др.

Изомеразы. К классу изомераз относят ферменты, катализирующие различные типы реакций изомеризации. Систематическое название их составляется с учетом типа реакции: «субстрат — цис-транс-изомераза». Если изомеризация включает внутримолекулярный перенос группы, фермент получает название мутазы.

К классу изомераз относят рацемазы и эпимеразы, действующие на аминокислоты, углеводы и их производные, внутримолекулярные оксидоредуктазы, катализирующие взаимопревращения альдоз и кетоз, внутримолекулярные трансферазы, переносящие ацильные, фосфорильные и другие группы, и т. д.

Лигазы (синтетазы). К классу лигаз относят ферменты, катализирующие синтез органических веществ из двух исходных молекул с использованием энергии распада АТФ (или другого нуклеозидтрифосфата). Систематическое название их составляют по форме: «X: Y лигаза», где через X и Y обозначаются исходные вещества. В качестве примера можно назвать L-глутамат: аммиак лигазу (глутаминсинтетазу), при участии которой из глутаминовой кислоты и аммиака в присутствии АТФ синтезируется глутамин.

СПИСОК ФЕРМЕНТОВ

На основании разработанной системы, которая служит основой как для классификации, так и для нумерации (индексации) ферментов, Международная комиссия подготовила также Классификацию ферментов (КФ) с включением списка ферментов, первоначально состоявшего к 1961 г. примерно из 900 ферментов. В списке ферментов (см. Номенклатуру ферментов, 1979) насчитывалось уже 2142 индивидуальных фермента; к настоящему времени их идентифицировано еще больше. В списке для каждого фермента, помимо номера (шифра), приводятся систематическое (рациональное) название, рекомендуемое (рабочее) название, химическая реакция, которую катализирует данный фермент, а также примечания о специфичности действия. Присвоение номера для каждого фермента рекомендуется проводить по четырехзначному шифру.

Таким образом, шифр каждого фермента содержит четыре цифры, разделенные точками, и составляется по следующему принципу. Первая цифра указывает номер одного из шести главных классов ферментов. Вторая цифра означает подкласс, характеризующий основные виды субстратов, участвующих в данном типе химических превращений. Например, у трансфераз вторая цифра указывает на природу той группы, которая подвергается переносу, у гидролаз — на тип гидролизуемой связи и т. д. Эти подклассы в свою очередь делятся на более частные подгруппы (обозначаемые подподклассами), отличающиеся химической природой соединений (доноров или акцепторов), участвующих в данной подгруппе реакций. Номер, точнее цифра, подподкласса ставится на третьем месте в шифре фермента. У гидролаз, например, эта цифра уточняет тип гидролизуемой связи, а у лиаз — тип отщепляемой группы и т. д. Первые три цифры кода точно определяют тип фермента. Наконец, все ферменты, относящиеся к данному подподклассу, получают порядковый номер в алфавитном порядке, который ставится на четвертом месте в шифре.

Таким образом, каждый фермент, характеризующийся постоянной совокупностью четырех цифр, имеет соответствующий шифр, под которым он внесен в список ферментов. В качестве примера в табл. 4.5 приводятся два фермента из списка.

Таблица 4.5. Фрагмент из списка ферментов

Шифр	Рекомендуемое (рабочее) название	Реакция	Систематическое название	Примечания о специфичности и другие зависимости
КФ 1.1.1.27	Лактатдегидрогеназа	L-лактат + НАД ⁺ = пируват + НАДН ₂	L-лактат: НАД ⁺ -оксидоредуктаза	Окисляет и другие оксимонокарбоновые кислоты
КФ 2.6.1.5	Тирозинаминотрансфераза	L-тирозин + 2-оксоглутарат = 4-оксифенилпируват + L-глутамат	L-тирозин: 2-оксоглутарат аминотрансфераза	Протеин пиридоксальфосфата. Фенилаланин может действовать вместо тирозина

Следует особо отметить, что Международную классификацию ферментов нельзя считать абсолютно совершенной, поскольку она в некоторых отношениях не соответствует общепринятой в органической химии классификации химических реакций, несмотря на то, что ферменты катализируют по существу те же реакции.

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Обладая высокой степенью избирательности, ферменты используются живыми организмами для осуществления с высокой скоростью огромного разнообразия химических реакций; они сохраняют свою активность не только в микропространстве клетки, но и вне организма. Ферменты нашли широкое применение в таких отраслях промышленности, как хлебопечение, пивоварение, виноделие, чайное, кожевенное и меховое производства, сыроварение, кулинария (для обработки мяса) и т. д. В последние годы ферменты стали применять и в тонкой химической индустрии для осуществления таких реакций органической химии, как окисление, восстановление, дезаминирование, декарбоксилирование, дегидратация, конденсация, а также для разделения и выделения изомеров аминокислот L-ряда (при химическом синтезе образуются рацемические смеси L- и D-изомеров), нашедших применение в промышленности, сельском хозяйстве, медицине. Следует подчеркнуть, что овладение тонкими механизмами действия ферментов, несомненно, предоставит неограниченные возможности получения в огромных количествах и с большой скоростью полезных веществ в лабораторных условиях почти со 100% выходами.

В настоящее время развивается новая отрасль науки — промышленная энзимология, являющаяся основой биотехнологии. Фермент, ковалентно присоединенный («пришитый») к любому органическому или неорганическому полимерному носителю (матрице), называют иммобилизованным. Техника иммобилизации ферментов допускает решение ряда ключевых вопросов энзимологии: обеспечение высокой специфичности ферментов и повышение их стабильности, простоту в обращении и возможность повторного использования и применения в синтетических реакциях в потоке. Применение подобной техники в промышленности получило название инженерной энзимологии. Имеется ряд примеров, свидетельствующих об огромных возможностях инженерной энзимологии в различных областях промышленности, медицины, сельского хозяйства. В частности, иммобилизованную β-галактозидазу, присоединенную к магнитному стержню-мешалке, используют для уменьшения содержания молочного сахара в молоке, т. е. решают проблему непереносимости лактозы. Обработанное таким образом молоко, кроме того, хранится в замороженном состоянии значительно дольше и не подвергается загустеванию.

Разработаны проекты получения пищевых продуктов из целлюлозы, превращения ее с помощью иммобилизованных ферментов — целлюлаз — в глюкозу, которую можно превратить в пищевой продукт — крахмал. С помощью ферментной технологии в принципе можно также получить продукты питания, в частности углеводы,

из жидкого горючего (нефти), расщепив его до глицеральдегида и далее при участии ферментов синтезировав из него глюкозу и крахмал. Имеет несомненно большое будущее моделирование при помощи инженерной энзимологии процесса фотосинтеза, т. е. природного процесса фиксации CO_2 ; помимо иммобилизованных ферментов, этот жизненно важный для всего человечества процесс потребует применения ряда специфических иммобилизованных коферментов.

Ниже представлена схема непрерывного процесса получения аминокислоты аланина и регенерации кофермента в модельной системе, в которую исходный субстрат (молочная кислота) подается при помощи насоса в камеру-реактор, содержащий иммобилизованные на декстране НАД^+ и две НАД -зависимые дегидрогеназы: лактат- и аланиндегидрогеназы; с противоположного конца реактора продукт реакции — аланин — удаляется с заданной скоростью методом ультрафильтрации:



Подобные реакторы нашли применение в фармакологической промышленности, например при синтезе антиревматоидного препарата преднизолона из гидрокортизона. Кроме того, они могут служить моделью для применения их с лечебной целью, поскольку при помощи иммобилизованных ферментов и коферментов можно направленно осуществлять сопряженные химические реакции (включая биосинтез незаменимых метаболитов), корректирующие наследственные пороки обмена. Таким образом, при помощи этого нового методологического подхода наука делает свои первые шаги в области «синтетической биохимии».

Не менее важным направлением исследований является иммобилизация клеток и создание методами генотехники (генноинженерного конструирования) промышленных штаммов микроорганизмов — продуцентов витаминов и незаменимых аминокислот. В качестве примера медицинского применения достижений биотехнологии можно привести иммобилизацию клеток щитовидной железы для определения тиреотропного гормона в биологических жидкостях или тканевых экстрактах. На очереди — создание биотехнологического способа получения некалорийных сладостей, т. е. пищевых заменителей сахара, которые могут создавать ощущение сладости, не неся в себе лишних калорий. Одним из подобных перспективных веществ является аспартам, который представляет собой метиловый эфир дипептида — аспартилфенилаланина. Аспартам почти в 300 раз слаще сахара, безвреден и в организме расщепляется на естественно встречающиеся свободные аминокислоты: аспарагиновую кислоту (аспартат) и фенилаланин. Аспартам, несомненно, найдет широкое применение как в медицине, так и в пищевой промышленности (в США, например, он уже используется не только для детского питания, но и добавляется вместо сахара в диетическую кока-колу). Для производства аспартама методами генотехники получают не только свободную аспарагиновую кислоту и фенилаланин (предшественники), но и бактериальный фермент, катализирующий биосинтез этого дипептида.

Значение инженерной энзимологии, как и вообще биотехнологии, сильно возрастет в будущем. По подсчетам специалистов продукция всех биотехнологических процессов в химической, фармацевтической, пищевой промышленности, медицине и сельском хозяйстве в течение одного года в мире будет исчисляться десятками миллиардов

долларов к 2000 г. В нашей стране уже к 1990—1995 гг. будет налажено получение методом генной инженерии L-треонина и витамина В₂. Предполагается производство уже к 1990 г. ряда ферментов, антибиотиков, α_1 , β -, γ -интерферонов; проходят клинические испытания генноинженерные препараты инсулина и гормона роста. Гибридной техникой налажен в нашей стране выпуск реактивов для осуществления иммуоферментных методов определения многих химических компонентов в биологических жидкостях.

Проблемы медицинской энзимологии

Успехи энзимологии находят все большее применение в медицине, в частности во многих аспектах профилактики, диагностики и лечения заболеваний. Успешно развивается новое направление энзимологии — медицинская энзимология, имеющая свои цели и задачи, специфические методологические подходы и методы исследования. Медицинская энзимология развивается по трем главным направлениям, хотя возможности применения достижений энзимологии в медицине теоретически безграничны, особенно в области энзимопатологии, имеющей целью исследование ферментативной активности в норме и при патологии. Многие наследственные пороки обмена, как оказалось, являются результатом дефекта определенного фермента. Так, галактоземия — наследственное заболевание, при котором наблюдается ненормально высокая концентрация галактозы в крови, развивается в результате наследственного дефекта синтеза фермента — гексозо-1-фосфат-уридилтрансферазы, катализирующего превращение галактозы в легко метаболизируемую глюкозу. Причиной другого наследственного заболевания — фенилкетонурии, сопровождающейся расстройством психической деятельности, является потеря клетками печени способности синтезировать фермент, катализирующий превращение фенилаланина в тирозин (см. главу 11).

Второе направление медицинской энзимологии, получившее название энзимодиагностики, развивается как по пути использования ферментов в качестве избирательных реагентов для открытия и количественного определения нормальных или аномальных химических веществ в сыворотке крови, моче, желудочном соке и др. (например, открытие при помощи ферментов глюкозы, белка или других веществ в моче, в норме в ней не обнаруживаемых), так и по пути открытия и количественного определения самих ферментов в биологических жидкостях при патологии. Оказалось, что ряд ферментов появляется в сыворотке крови при распаде клеток (отсюда их название — некротические ферменты); для диагностики органических и функциональных поражений органов и тканей широко применяются отдельные ферментные тесты, выгодно отличающиеся от других химических диагностических тестов, используемых в клинике, высокой чувствительностью и специфичностью; сейчас известно около двух десятков тестов, основанных на количественном определении активности ферментов (и изоферментов) главным образом в крови (реже в моче), а также в биоптатах. Следует, однако, отметить, что из огромного числа ферментов (более 2000), открытых в природе (частично и в организме человека), в диагностической энзимологии используется лишь ограниченный набор ферментов и для весьма небольшого числа болезней (гепатиты, инфаркт миокарда, органические поражения печени и др.). Так, уровень липазы, амилазы, трипсина и химотрипсина резко увеличен при диабете, злокачественных поражениях поджелудочной железы, болезнях печени и др. Резко повышается в сыворотке крови уровень аминотрансфераз, креатинкиназы (и ее изоформ) и лактатдегидрогеназы (и ее изоформ) при инфаркте миокарда; умеренно повышено их содержание при поражениях тканей мозга и печени. Определяют, кроме того, активность кислой фосфатазы (уровень повышен при карциноме предстательной железы), щелочной фосфатазы, холинэстеразы и некоторых других органоспецифических ферментов (например, гистидазы, урокинаказы, глицинамидинотрансферазы) в сыворотке крови при патологии костной ткани, печени, мета-

статических карциномах и т. д. Получены доказательства, что органы и ткани человека характеризуются специфическим ферментным и изоферментным спектром, подверженным не только индивидуальным, но и суточным колебаниям. Существует большой градиент концентрации ферментов между внутриклеточными и внеклеточными частями тела. Поэтому любые, даже незначительные повреждения клеток (а иногда и функциональные расстройства) приводят к выделению ферментов во внеклеточное пространство, откуда они поступают в кровь. Механизм гиперферментемии до конца не расшифрован. Степень повышения содержания внутриклеточных ферментов в плазме крови находится в прямой зависимости от природы повреждающего воздействия, времени действия и степени повреждения органов. В оценке ферментных тестов для диагностических целей особое значение имеет знание периода полужизни в плазме крови каждого из диагностических ферментов, что делает важным выбор точного времени ферментного анализа крови. Весьма существенным является также знание особенностей распределения (топографии) ферментов в индивидуальных органах и тканях, как и их внутриклеточной локализации.

Третье направление медицинской энзимологии — энзимотерапия, т. е. использование ферментов и регуляторов действия ферментов в качестве лекарственных средств, пока имеет небольшую историю. До сих пор работы в этом направлении почти не выходят за рамки эксперимента. В клинике применяются пепсин, трипсин, химотрипсин и их смеси (абомин, химопсин) при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Помимо протеиназы, ряд других ферментов, в частности РНКазы, ДНКазы, гиалуронидазы, коллагеназы, эластазы, отдельно или в смеси с протеиназами используются для обработки ран, воспалительных очагов, ожогов, устранения отеков, гематом, келоидных рубцов (туберкулез легких). Ферменты применяются также для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, растворения сгустка крови; в нашей стране, например, для этих целей создан первый в мире препарат иммобилизованной стрептокиназы. Калликреины — ферменты кининовой системы — используются для снижения кровяного давления.

Важной и многообещающей областью энзимотерапии является применение ингибиторов ферментов. Так, естественные ингибиторы протеиназы нашли применение в терапии острых панкреатитов, артритов, аллергических заболеваний, при которых имеет место активация протеолиза и фибринолиза, сопровождающаяся образованием vasoактивных кининов. Предпринимаются попытки применения ферментов для лечения злокачественных опухолей человека, например аспарагиназы и L-глутамин (аспарагин)азы при лимфолейкозах. Эти ферменты разрушают глутамин и аспарагин, являющиеся незаменимыми факторами для роста лейкозных клеток, поскольку последние оказались лишенными способности синтезировать эти амиды.

Идея применения ферментов в терапии (фармакология ферментов) всегда казалась заманчивой. Однако их лабильность, нежелательные антигенные свойства и трудности доставки к пораженным органам и тканям существенно ограничивали возможности использования ферментных препаратов. Разработка методов иммобилизации ферментов наметила пути предотвращения указанных трудностей.

В последнее время интенсивно разрабатываются методы направленного транспорта ферментов, заключенных в своеобразные микроконтейнеры (тени эритроцитов, липосомы и др.), к внешней поверхности которых могут быть прикреплены адресные (векторные) белковые молекулы (например, иммуноглобулины — антитела против специфических компонентов органа или ткани-мишени, в частности опухоли). Иммобилизованные ферменты в качестве лекарственных средств начали применять в специальных колонках для экстракорпоральной перфузии крови (типа «искусственной почки»). Такое лечение полностью исключает нежелательные воздействия на организм чужеродного белка и может проводиться в течение длительного времени.

Таким образом, области применения ферментов в медицине действительно безграничны. Рассмотренные выше примеры ясно показывают, какие перспективы уже сегодня открывает перед будущими врачами медицинская энзимология.

Глава 5

ВИТАМИНЫ

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ВИТАМИНОЛОГИИ И ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ВИТАМИНАХ

Учение о витаминах — витаминология — в настоящее время выделено в самостоятельную науку, хотя еще 100 лет назад считали, что для нормальной жизнедеятельности организма человека и животных вполне достаточно поступления белков, жиров, углеводов, минеральных веществ и воды. Однако практика и опыт показали, что для нормального роста и развития организма человека и животных одних этих веществ недостаточно. История путешествий и мореплаваний, наблюдения врачей указывали на существование особых болезней, непосредственно связанных с неполноценным питанием, хотя оно как будто содержало все известные к тому времени питательные вещества. Некоторые болезни, обусловленные недостатком в питании каких-либо веществ, носили даже эпидемический характер. Так, широкое распространение в XIX веке получило заболевание, названное цингой (или скорбутом); летальность достигала 70—80%. Примерно в это же время большое распространение, особенно в странах Юго-Восточной Азии и Японии, получило заболевание бери-бери. В Японии около 30% всего населения было поражено этой болезнью. Японский врач К. Такаки пришел к заключению, что в мясе, молоке и свежих овощах содержатся какие-то вещества, предотвращающие заболевание бери-бери. Позже голландский врач К. Эйкман, работая на о. Ява, где основным продуктом питания был полированный рис, заметил, что у кур, получавших тот же полированный рис, развивалось заболевание, аналогичное бери-бери у человека. Когда К. Эйкман переводил кур на питание неочищенным рисом, наступало выздоровление. На основании этих данных он пришел к выводу, что в оболочке риса (рисовых отрубях) содержится неизвестное вещество, обладающее лечебным эффектом. И действительно, приготовленный из шелухи риса экстракт оказывал лечебное действие на людей, больных бери-бери. Эти наблюдения свидетельствовали, что в оболочке риса содержатся какие-то питательные вещества, которые необходимы для обеспечения нормальной жизнедеятельности организма человека.

Развитие учения о витаминах, однако, справедливо связывают с именем отечественного врача Н. И. Лунина, открывшего новую главу в науке о питании. Он пришел к заключению, что, кроме белков (казеина), жиров, молочного сахара, солей и воды, животные нуждаются в каких-то еще неизвестных веществах, незаменимых для питания. В своей работе «О значении минеральных солей для питания животных» (1880) Н. И. Лунин писал: «Представляет большой интерес исследовать эти вещества и изучить их значение для питания». Это важное научное открытие в дальнейшем было подтверждено работами Ф. Гопкинса (1912). Поскольку первое вещество, выделенное К. Функом (1912) в кристаллическом виде из экстрактов оболочек риса, которое предохраняло от развития бери-бери, оказалось органическим соединением, содержащим аминогруппу, К. Функ предложил называть эти неизвестные вещества витаминами (от лат. *vita* — жизнь), т. е. аминами жизни. Действительно, витамины оказались обязательными дополнительными пищевыми факторами и, хотя некоторые из них не содержат аминогруппу и вообще азот, термин «витамины» прочно укоренился в биологии и медицине.

В определении понятия «витамины» до сих пор существуют разногласия, поскольку имеется ряд примеров, когда витамины оказываются незаменимыми факторами питания для человека, но не для некоторых животных. В частности, известно, что цинга развивается у человека и морских свинок, но не возникает у крыс, кроликов и других животных при отсутствии витамина С, т. е. в последнем случае витамин С не является пищевым или незаменимым фактором. С другой стороны, некоторые аминокислоты (см. главу 11), как и ряд растительных ненасыщенных жирных кислот (линолевая, линоленовая и др.), оказались незаменимыми для человека, поскольку они не синтезируются в его организме. Однако в последнем случае перечисленные вещества не относят к витаминам, так как витамины отличаются от всех других органических пищевых веществ двумя характерными признаками: 1) не включаются в структуру тканей; 2) не используются организмом в качестве источника энергии.

Таким образом, витамины — пищевые факторы, которые, присутствуя в небольших количествах в пище, обеспечивают нормальное протекание биохимических и физиологических процессов путем участия в регуляции обмена целостного организма. Нарушения нормального процесса обмена часто связаны с недостаточным поступлением витаминов в организм, полным отсутствием их в потребляемой пище или нарушениями их всасывания, транспорта и т. д. В результате развиваются авитаминозы — болезни, возникающие на почве полного отсутствия в пище или полного нарушения усвоения какого-либо витамина, и гиповитаминозы, обусловленные недостаточным поступлением витаминов с пищей или плохим их усвоением. Практически у человека встречается именно эта форма заболевания, т. е. состояние относительной недостаточности витамина. В некоторых районах стран Азии, Африки и Южной Америки, где население употребляет однообразную, преимущественно растительную пищу, встречаются иногда случаи полного авитаминоза. В литературе описаны также патологические состояния, связанные с поступлением чрезмерно больших количеств витаминов в организм (гипервитаминозы). Эти заболевания встречаются реже, чем гиповитаминозы, однако описаны случаи гипервитаминозов А, D, К и др.

Следует отметить, что многие расстройства обмена веществ при авитаминозах обусловлены, как теперь установлено, нарушениями деятельности или активности ферментных систем, поскольку многие витамины входят в состав простетических групп ферментов. На связь витаминов с ферментами впервые в 1922 г. указал акад. Н. Д. Зелинский. Он считал, что витамины регулируют обмен веществ не непосредственно, а опосредованно через ферментные системы, в состав которых они входят. Эта точка зрения в настоящее время подтвердилась.

Открытие витаминов сыграло исключительную роль в профилактике и лечении многих инфекционных заболеваний. Так как бактерии для своего роста и размножения тоже нуждаются в присутствии многих витаминов для синтеза коферментов, введение в организм структурных аналогов витаминов, называемых антивитаминами, приводит к гибели микроорганизмов. Антивитамины обычно блокируют активные центры ферментов, вытесняя соответствующее производное витаминов (кофермент) из активного центра, и вызывают конкурентное ингибирование ферментов. К антивитаминам в широком смысле относят вещества, способные вызывать после введения в организм животных классическую картину гипо- или авитаминоза.

Причины гипо- и авитаминозов у человека и животных обычно делят на экзогенные и эндогенные. К первым относится недостаточное поступление витаминов или полное отсутствие их в пище; следовательно, недостаточное и неполное питание чаще всего является причиной развития экзогенных авитаминозов. В число эндогенных причин, которые, по-видимому, являются более существенными, входят: а) повышенная потребность в витаминах при некоторых физиологических и патологических состояниях (беременность, лактация, тиреотоксикоз, кахексические заболевания и др.); б) усиленный распад витаминов в кишечнике вследствие развития в нем

микрофлоры; в) нарушение процесса всасывания витаминов в результате поражения секреторной и моторной функций кишечника при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, когда относительная недостаточность витаминов развивается даже при полноценном питании; г) болезни печени, поджелудочной железы, вызывающие закупорку общего желчного протока и сопровождающиеся нарушением всасывания жиров, продуктов их распада — жирных кислот и соответственно жирорастворимых витаминов; в этих случаях также развиваются вторичные, или эндогенные, авитаминозы.

Таким образом, знание закономерностей развития гипо- и авитаминозов, клинической картины этих состояний, как и знание биологической роли витаминов, необходимо для лечащего врача; это же определяет его тактику при разработке способов предотвращения и лечения гиповитаминозов. Если авитаминоз (гиповитаминоз) развивается на экзогенной почве, то вводят недостающий витамин с пищей или чистый его препарат. Если же причина эндогенная, то, помимо лечения основного заболевания, параллельно вводят соответствующий витамин парентерально, т. е. минуя кишечный тракт.

Нельзя не согласиться с мнением ряда ведущих витаминологов (Р. Гаррис, К. Скривер, В. Б. Спиричев и др.), что болезни, связанные с недостаточным потреблением витаминов, стали в настоящее время благодаря «рационализации питания» редкостью и являются проблемой скорее социально-экономической, чем медицинской. В то же время в последние два десятилетия описано большое количество ранее неизвестных врожденных заболеваний, клиническая картина которых напоминает типичные авитаминозы. Они развиваются в раннем детском возрасте независимо от обеспеченности организма всеми известными витаминами. Иногда болезнь удается излечить мегавитаминной терапией, т. е. введением количеств соответствующего витамина, в 50—100 раз превышающих физиологические потребности (так называемые витаминзависимые состояния). В других случаях болезнь не удается устранить даже путем применения высоких доз витаминов (витамины резистентные состояния). Они протекают очень тяжело и часто приводят к смерти больного. Так, описаны случаи витамин D-резистентного рахита, витамин D-зависимого рахита, тиаминзависимой мегалобластической анемии, пиридоксинзависимого судорожного синдрома и пиридоксинзависимой анемии, пернициозной анемии и др.

Накопившиеся фактические клинические данные и подробные генетические и биохимические исследования позволили отнести подобные заболевания к врожденным нарушениям обмена и функций витаминов, которые уже описаны для тиамина, пиридоксина, биотина, фолиевой кислоты, витамина В₁₂, никотиновой кислоты, витаминов А, D, Е, К и др. В настоящее время имеется достаточно оснований считать, что причиной развития этих болезней являются генетические дефекты, связанные с нарушениями или всасывания витаминов в кишечнике, или их транспорта к органам-мишеням, или, наконец, с нарушениями превращений витаминов в коферменты (или в активные формы — в случае витаминов группы D). Имеются также доказательства наследственного дефекта синтеза белковой части фермента (апофермента) в развитии некоторых врожденных расстройств обмена и функций витаминов, а также нарушения взаимодействия (связи) кофермента (или активной формы витамина) со специфическим белком — апоферментом, т. е. дефект формирования холофермента.

Поскольку клиническая картина врожденных нарушений обмена и функций витаминов мало или почти не отличается от истинной картины алиментарного авитаминоза и ряда наследственных дефектов обмена, своевременное проведение дифференциальной диагностики и патогенетической терапии представляется задачей исключительной важности. В зависимости от причины дефекта терапевтические подходы включают заместительную терапию, парентеральное введение высоких доз соответствующего витамина (мегавитаминная терапия) при врожденном нарушении его всасывания или транспорта, введение кофермента и т. д.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНОВ

Современные методы определения витаминов в биологических объектах делят на физико-химические и биологические.

При взаимодействии витаминов с рядом химических соединений наблюдаются характерные цветные реакции, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации витаминов в исследуемом растворе. Поэтому витамины можно определять фотоколориметрически, например витамин В₁ — при помощи диазореактива и т. д. Эти методы позволяют судить как о наличии витаминов, так и о количественном содержании их в исследуемом пищевом продукте или органах и тканях животных и человека. Для выяснения обеспеченности организма человека каким-либо витамином часто определяют соответствующий витамин или продукт его обмена в сыворотке крови, моче или биопсийном материале. Однако эти методы могут быть применены не во всех случаях. Встречаются трудности при подборе специфического реактива для взаимодействия с определенным витамином. Некоторые витамины обладают способностью поглощать оптическое излучение только определенной части спектра. В частности, витамин А имеет специфичную полосу поглощения при 328–330 нм. Измеряя коэффициент поглощения спектрофотометрически, можно достаточно точно определить количественное содержание витаминов в исследуемом объекте. Для определения витаминов В₁, В₂ и других применяют флюорометрические методы. Используют и титриметрические методы. Например, витамин С определяют, титруя его раствор в кислой среде 2,6-дихлорфенолиндофенолом.

Биологические методы основаны на определении того минимального количества витамина, которое при добавлении к искусственной диете, лишенной только данного изучаемого витамина, предохраняет животное от развития авитаминоза или излечивает его от уже развившейся болезни. Это количество витамина условно принимают за единицу (в литературе известны «голубиные», «крысиные» единицы). Большое место в количественном определении ряда витаминов — фолиевой, парааминобензойной кислот и др. — в биологических жидкостях, в частности в крови, занимают микробиологические методы, основанные на измерении скорости роста бактерий; последняя пропорциональна концентрации витамина в исследуемом объекте. Количество витаминов принято выражать, кроме того, в миллиграммах, микрограммах, международных единицах (МЕ).

КЛАССИФИКАЦИЯ ВИТАМИНОВ

Современная классификация витаминов не является совершенной; она основана на физико-химических свойствах (в частности, растворимости), химической природе и имеет буквенные обозначения. В зависимости от растворимости различают жирорастворимые и водорастворимые витамины. В приведенной ниже классификации витаминов, помимо буквенного наименования, в скобках дается обозначение основного биологического эффекта, иногда с приставкой «анти», указывающей на способность данного витамина предотвращать или устранять развитие соответствующего заболевания; далее приводится номенклатурное химическое название каждого витамина.

Витамины, растворимые в жирах

1. Витамин А (антисерофталмический); ретинол
2. Витамин D (антирахитический); кальциферолы
3. Витамин Е (антистерильный, витамин размножения); токоферолы
4. Витамин К (антигеморрагический); нафтохиноны

Витамины, растворимые в воде

1. Витамин В₁ (антиневритный); тиамин
2. Витамин В₂ (витамин роста); рибофлавин
3. Витамин В₆ (антидерматитный, адермин); пиридоксин
4. Витамин В₁₂ (антианемический); кобаламин
5. Витамин РР (антипеллагрический); ниацин, никотинамид
6. Витамин В_с (антианемический); фолиевая кислота
7. Витамин В₃ (антидерматитный); пантотеновая кислота

8. Витамин Н (антисеборейный, фактор роста бактерий, дрожжей и грибов); биотин
9. Витамин С (антискорбутный); аскорбиновая кислота
10. Витамин Р (капилляроукрепляющий, витамин проницаемости); биофлавоноиды

Помимо этих двух главных групп витаминов, различают группу разнообразных химических веществ, некоторые из которых частично синтезируются в организме, но обладают витаминными свойствами; для человека и ряда животных эти вещества принято объединять в группу витаминоподобных. К ним относят холин, липоевую кислоту, витамин В₁₅ (пангамовая кислота), оротовую кислоту, инозит, убихинон, парааминобензойную кислоту, карнитин, линолевую и линоленовую кислоты, витамин U (противоязвенный фактор) и ряд факторов роста птиц, крыс, цыплят, тканевых культур. Поскольку типичные картины авитаминозов встречаются довольно редко, очевидно, нет необходимости в подробном описании клинической картины гипо- и авитаминозов. Более подробно будут представлены сведения о биологической роли тех витаминов, механизм действия которых уже расшифрован.

В табл. 5.1. приведены известные к настоящему времени сведения о суточной потребности, природе активной формы и физиологической роли витаминов.

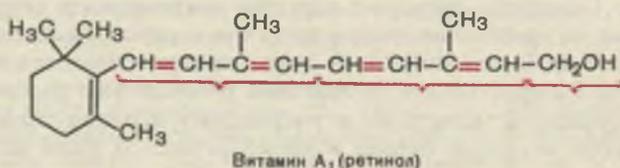
Таблица 5.1. Природа биокаталитической функции витаминов

Витамин	Впервые описан	Рекомендуемая суточная потребность для человека, мг	Активная (или коферментная) форма	Биохимическая функция (или тип катализируемой реакции)
<i>Жирорастворимые витамины</i>				
А (ретинол)	1913	2,7	Ретиналь	Зрительный процесс
Д (кальциферолы)	1922	0,01—0,025	1,25-Диоксихолекальциферол	Обмен кальция и фосфора
Е (токоферол)	1922	5,0	—	Транспорт электронов (защита мембранных липидов)
К (филлохинон, менахинон)	1935	1,0	—	Перенос электронов (кофактор в реакциях карбоксилирования)
<i>Водорастворимые витамины</i>				
В ₁ (тиамин)	1926	1,2	Тиаминпирофосфат (ТПФ)	Декарбоксилирование α-кетокислот; перенос активного альдегида (транскетолаза)
В ₂ (рибофлавин)	1932	1,7	Флавинадениндинуклеотид (ФАД), флавиномононуклеотид (ФМН)	Дыхание, перенос водорода
РР (никотинамид, никотиновая кислота)	1937	18	НАД, НАДФ	Дыхание, перенос водорода
В ₆ (пиридоксин)	1934	2	Пиридоксальфосфат (ПФ)	Трансаминирование и декарбоксилирование аминокислот
В ₁₂ (кобаламин)	1948	0,003	Дезоксиаденозил (или метил-) кобаламин	Кофермент ряда метаболических реакций переноса алкильных групп; метилирование гомоцистеина
В _с (фолиевая кислота)	1941	1—2,2	Тетрагидрофолиевая кислота	Транспорт одноуглеродных групп
В ₃ (пантотеновая кислота)	1933	3—5	Коэнзим А (Кофермент А)	Транспорт ацильных групп
Н (биотин)	1935	0,25	Биоцитин (ε-N-биотиниллизин)	Кофермент реакций карбоксилирования (транспорт СО ₂)
С (аскорбиновая кислота)	1925	75	—	Восстанавливающий кофактор для ряда монооксигеназ; гидроксигирование пролина; катаболизм тирозина

ВИТАМИНЫ, РАСТВОРИМЫЕ В ЖИРАХ

Витамины группы А

Витамин А (ретинол, антиксерофтальмический витамин) хорошо изучен. Известны три витамина группы А: А₁, А₂ и цис-форма витамина А₁, названная неовитаминном А. С химической точки зрения ретинол представляет собой циклический непредельный одноатомный спирт, состоящий из шестичленного кольца (β-иона), двух остатков изопрена и первичной спиртовой группы.



Витамин А₂ отличается от витамина А₁ наличием дополнительной двойной связи в кольце β-иона. Все три формы витаминов группы А существуют в виде стереоизомеров, однако только некоторые из них обладают биологической активностью. Витамины группы А хорошо растворимы в жирах и жирорастворителях: бензоле, хлороформе, эфире, ацетоне и др. В организме они легко окисляются при участии специфических ферментов с образованием соответствующих *цис*- и *транс*-альдегидов, получивших название ретиналей (ретиненов), т. е. альдегидов витамина А. В организме витамин А может откладываться про запас в печени в форме более устойчивых сложных эфиров с уксусной или пальмитиновой кислотой.

Характерными симптомами недостаточности витамина А у человека и животных являются, помимо торможения роста, потеря массы тела и общее истощение организма, специфические поражения кожи, слизистых оболочек и глаз. В первую очередь поражается эпителий кожи, что сопровождается пролиферацией и патологическим ороговением его; процесс сопровождается развитием фолликулярного гиперкератоза, кожа усиленно шелушится, становится сухой. В результате начинаются вторичные гнойные и гнилостные процессы. При авитаминозе А поражается также эпителий слизистой оболочки всего желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы и дыхательного аппарата. Характерно поражение глазного яблока — ксерофтальмия, т. е. развитие сухости роговой оболочки глаза (от греч. xeros — сухой, ophthalmos — глаз), являющееся следствием закупорки слезного канала, эпителий которого также подвергается ороговению. Глазное яблоко не омывается слезой, которая, как известно, обладает бактерицидным свойством. Вследствие этого развиваются воспаления конъюнктивы, отек, изъязвление и размягчение роговой оболочки. Этот комплекс поражений обозначают термином кератомалация (от греч. keras — рог, malatia — распад); она развивается очень быстро, иногда в течение нескольких часов. Распад и размягчение роговой оболочки связаны с развитием гнойного процесса, поскольку гнилостные микроорганизмы при отсутствии слезной жидкости быстро развиваются на поверхности роговицы.

К наиболее ранним и специфическим симптомам авитаминоза А (гиповитаминоза А) относится куриная, или ночная, слепота (гемералопия). Она выражается в потере остроты зрения, точнее, способности различать предметы в сумерках, хотя больные днем видят нормально.

Помимо гипо- и авитаминозов, описаны случаи гипервитаминоза А при употреблении в пищу печени белого медведя, тюленя, моржа, в которой содержится много свободного витамина А. Характерные проявления гипервитаминоза А — воспа-

ление глаз, гиперкератоз, выпадение волос, общее истощение организма. Этому сопутствуют, как правило, потеря аппетита, головные боли, диспепсические явления (тошнота, рвота), бессонница. Гипервитаминоз может развиваться также и у детей в результате приема больших количеств рыбьего жира и препаратов витамина А. Описано развитие острого гипервитаминоза у детей после приема высоких доз витамина А, при этом повышается его содержание в крови.

Биологическая роль. Витамин А оказывает влияние на барьерную функцию кожи, слизистых оболочек, проницаемость клеточных мембран и биосинтез их компонентов, в частности определенных гликопротеинов. Действие витамина А в этих случаях связывают с его вероятной причастностью к синтезу белка. Существует предположение, что благодаря наличию двойных связей в молекуле витамин А может участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, поскольку он способен образовывать перекиси, которые в свою очередь повышают скорость окисления других соединений.

Более подробно выяснено значение витамина А в процессе светоощущения. В этом важном физиологическом процессе выдающуюся роль играет особый хромолипопротеин — сложный белок родопсин, или зрительный пурпур, являющийся основным светочувствительным веществом сетчатки, в частности палочек, занимающих ее периферическую часть. Установлено, что родопсин состоит из липопротеина опсина и протетической группы, представленной альдегидом витамина А₁ (ретиналь); связь между ними осуществляется через альдегидную группу витамина и свободную ε-NH₂-группу белка с образованием шиффова основания. На свету родопсин расщепляется на белок опсин и ретиналь; последний превращается в *транс*-форму; с этими превращениями каким-то образом связана трансформация энергии световых лучей в зрительное возбуждение — процесс, который до сих пор остается загадкой. В темноте происходит обратный процесс — синтез родопсина, требующий наличия активной формы альдегида — 11-*цис*-ретинаяля, который может синтезироваться из *цис*-ретинола или *транс*-ретинаяля, или *транс*-формы витамина А при участии специфических дегидрогеназы и изомеразы. Более подробно цикл превращений родопсина в сетчатке глаза на свету и в темноте можно представить в виде схемы:

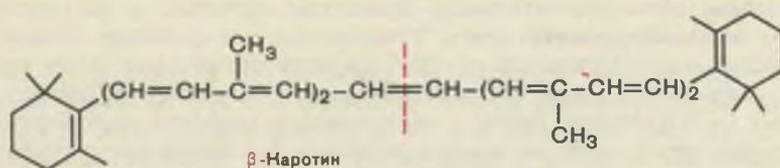


Таким образом, под действием кванта света родопсин через ряд промежуточных продуктов («оранжевый» и «желтый» белки) распадается на опсин и алло-*транс*-ретинаяль, представляющий собой неактивную форму альдегида витамина А. Имеются указания, что алло-*транс*-ретинаяль может частично превращаться в активный 11-*цис*-ретинаяль под влиянием света (на схеме — пунктирная стрелка). Однако главным путем образования 11-*цис*-ретинаяля является ферментативное превращение *транс*-

формы витамина А в *цис*-форму (под действием изомеразы) и последующее окисление ее при участии алкогольдегидрогеназы¹.

Распространение в природе и суточная потребность

Витамин А широко распространен. Наиболее богаты этим витамином следующие продукты животного происхождения: печень крупного рогатого скота и свиней, яичный желток, цельное молоко, сметана, сливки. Особенно много свободного витамина А в жирах печени морского окуня, трески, палтуса; в частности, в жире печени морского окуня содержание витамина А доходит до 35%. Источниками витамина А для человека являются также красно-мякотные овощи (морковь, томаты, перец и др.), в которых витамин А содержится в виде провитаминов — каротинов, выделенных впервые из моркови (от лат. *carota* — морковь). Известны три типа каротинов: α -, β - и γ -каротины, отличающиеся друг от друга по химическому строению и биологической активности. Наибольшей биологической активностью обладает β -каротин, поскольку он содержит два β -иононовых кольца и при распаде в организме из него образуются две молекулы витамина А.



При окислительном распаде α - и γ -каротинов образуется только по одной молекуле витамина А, поскольку эти провитамины содержат по одному β -иононовому кольцу. Расщепление каротинов на молекулы витамина А преимущественно осуществляется в кишечнике под действием специфического фермента β -каротин-диоксигеназы (хотя не исключена возможность аналогичного превращения и в печени). Это расщепление происходит в присутствии кислорода; при этом образуются две молекулы ретиналя, которые под действием специфической кишечной редуктазы восстанавливаются в витамин А. Степень усвоения каротинов и свободного витамина А зависит как от содержания жиров в пище, так и от наличия свободных желчных кислот, являющихся абсолютно необходимыми соединениями для всасывания продуктов распада жиров.

Суточная потребность в витамине А для взрослого человека составляет в среднем 2,7 мг витамина А или от 2 до 5 мг β -каротина. Основным органом, в котором частично откладывается витамин А у человека, является печень, содержащая в норме около 20 мг этого витамина на 100 г ткани.

Витамины группы D

Витамин D (кальциферол, антирахитический витамин) существует в виде нескольких соединений, отличающихся по химическому строению и биологической активности. Для человека и животных активными препаратами считаются витамины D₂ и D₃, хотя в литературе известен и витамин D₄ (дигидроэргокальциферол). В природных

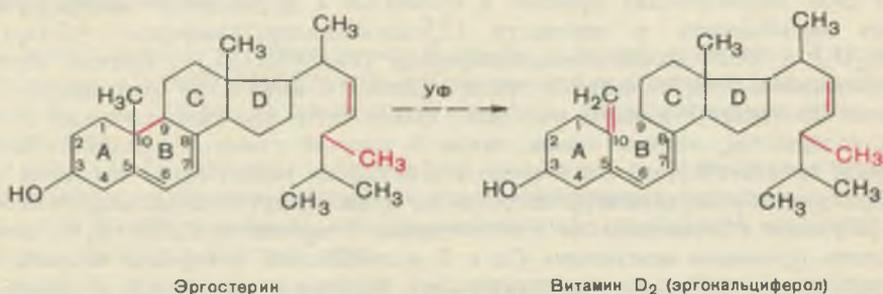
¹ Поглощенный фотон уже через несколько пико(милли)секунд вызывает образование ряда промежуточных продуктов фотолиза, различающихся по спектрам поглощения [прелюмиродопсин (543 нм), люмиродопсин (497 нм), метародопсин I (480 нм) и метародопсин II (380 нм)]; последний в течение нескольких секунд гидролизуеться на опсин и *транс*-ретиноаль.

За цветовое зрение ответственным является второй тип фоторецепторных клеток сетчатки — колбочки; хромофорная часть последних также представлена 11-*цис*-ретиноалем, однако при взаимодействии с различными группировками на поверхности белковой молекулы опсина подобный комплекс становится способным воспринимать различные цвета.

продуктах содержатся преимущественно провитамины D₂ и D₃, соответственно — эргостерин и холестерин.

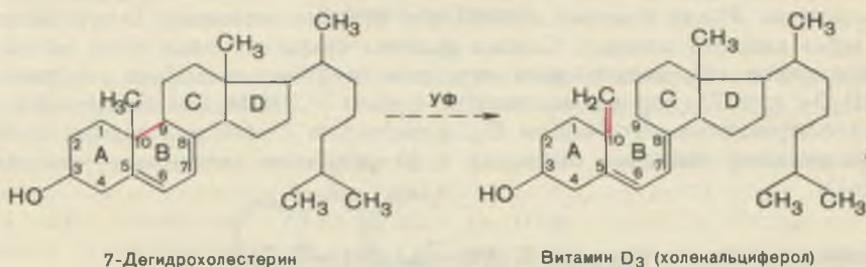
В 1924 г. А. Гесс и М. Вейншток и независимо Г. Стинбок из растительных масел и продуктов питания после воздействия УФ-излучением с длиной волны 280—310 нм получили активный препарат, предотвращающий развитие рахита у детей. Оказалось, что активное начало связано с каким-то стеринном, который был идентифицирован с эргостерином и назван витамином D₁. В 1932 г. А. Виндаус выделил эргостерол из дрожжей и показал, что истинным витамином D является не эргостерин, а продукт его превращения, образующийся при УФ-облучении, который был обозначен витамином D₂, или кальциферолом. В 1956 г. Международная комиссия по химической номенклатуре предложила для витамина D₂ новое название — эргокальциферол.

С химической точки зрения эргостерин представляет собой одноатомный ненасыщенный циклический спирт, в основе структуры которого лежит конденсированная кольцевая система циклопентанпергидрофенантрена; под действием УФ-излучения эргостерин через ряд промежуточных продуктов (люмистерин, тахистерин) превращается в витамин D₂:



Как видно, витамин D₂ образуется из эргостерина в результате разрыва между 9-м и 10-м углеродными атомами кольца В под действием УФ-излучения.

В 1936 г. в лаборатории А. Виндауса был выделен активный в отношении рахита препарат из рыбьего жира и назван витамином D₃. Выяснилось, кроме того, что предшественником витамина D₃ является не эргостерин, а холестерин. А. Виндаус в 1937 г. выделил из поверхностных слоев кожи свиньи 7-дегидрохолестерин, который при УФ-облучении превращался в активный витамин D₃:



Следует отметить, что благодаря наличию холестерина и 7-дегидрохолестерина в составе липидов кожи человека имеется возможность синтеза витамина D₃ при солнечном облучении или облучении лампой ультрафиолетового излучения поверхности тела. Этим приемом широко пользуются при лечении рахита у детей.

Витамины D₂ и D₃ представляют собой бесцветные кристаллы с температурой плавления 115—117°C, нерастворимые в воде, но хорошо растворимые в жирах, хлороформе, эфире и других жирорастворителях.

Недостаток витамина D в рационе детей приводит к возникновению широко известного заболевания — рахита, в основе развития которого лежат изменения фосфорно-кальциевого обмена и нарушение отложения в костной ткани фосфата кальция. Поэтому основные симптомы рахита связаны с нарушением нормального процесса остеогенеза. Развивается остеомаляция — размягчение костей. Кости становятся мягкими и под тяжестью тела принимают уродливые O- или X-образные формы. На костно-хрящевой границе ребер отмечаются своеобразные утолщения — так называемые рахитические четки. У детей при рахите относительно большая голова и увеличенный живот. Развитие последнего симптома обусловлено гипотонией мышц. Нарушение процесса остеогенеза при рахите сказывается также на развитии зубов — задерживается появление первых зубов и развитие дентина. Для авитаминоза D взрослых характерной особенностью является развитие остеопороза вследствие вымывания уже отложившихся солей; кости становятся хрупкими, что часто приводит к переломам.

Биологическая роль. Значение витамина D начинает проясняться в последнее время. Получены доказательства, что при физиологических условиях кальциферолы функционально инертны. По данным Г. де Лука и сотр., витамин D выполняет свои биологические функции в организме в форме образующихся из него активных метаболитов, в частности 1,25-дихидроксиолекальциферола [обозначается $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] и 24,25-дихидроксиолекальциферола [$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$]¹, причем если гидроксирование в 25-м положении осуществляется в печени, то этот процесс в 1-м положении протекает в почках; показано, кроме того, что специфическая 1α -гидроксилаза содержится, помимо почек, также в костной ткани и плаценте. Имеются бесспорные доказательства, что именно эти активные метаболиты, выполняя скорее гормональную, чем биокаталитическую роль, функционируют в системе гомеостатической регуляции обмена кальция и остеогенеза. В частности, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ участвует в регуляции процессов всасывания Ca и P в кишечнике, резорбции костной ткани и реабсорбции Ca и P в почечных канальцах. Процессы остеогенеза и ремоделирования костной ткани, напротив, регулируются $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Методом ауторадиографии показано накопление $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в ядерном аппарате клеток органов-мишеней (почки, мозг, поджелудочная железа, гипофиз, молочная железа); в то же время он не обнаруживается в печени, селезенке, скелетной и сердечной мышцах, способствуя синтезу мРНК, соответственно Ca-связывающих белков и гормонов, регулирующих обмен кальция. Подтвердилось предположение о существовании специфического внутриклеточного белка, являющегося рецептором кальциферолов. Показано, кроме того, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ вызывает дифференцировку некоторых лейкозных клеток, что, по-видимому, указывает на возможную связь между витаминами группы D и опухолевым ростом. Это не означает, однако, что функции витаминов D осуществляются только через ядерный аппарат. Совсем недавно открыты новые пути метаболизма витаминов группы D, включающие окисление в 23-м положении с образованием $23,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ или 23-гидроксилированной формы $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Более того, 24- и 26-гидроксилированные метаболиты D_3 , в частности 1-оксипроизводные последних, по биологическому действию оказались в 10 раз более активными, чем нативный $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

Распространение в природе и суточная потребность

Наибольшее количество витамина D_3 содержится в продуктах животного происхождения: сливочном масле, желтке яиц, печени и в жирах, а также в рыбьем жире, который широко использовался для профилактики и лечения рахита. Из растительных продуктов наиболее богаты витамином D_2 растительные масла (подсолнеч-

¹ Предшественником этих метаболитов является 25-оксидолекальциферол, который считается основной циркулирующей (транспортной) формой всех кальциферолов.

ное, оливковое и др.); много витамина D₂ в дрожжах. Для профилактики рахита в детском возрасте, помимо полноценного питания, включающего масло, молоко, жиры, мясо и другие продукты, рекомендуется УФ-облучение поверхности кожи (солнечное облучение, лампы ультрафиолетового облучения), а также продуктов растительного происхождения, способствующие обогащению их витамином D.

Суточная потребность в витамине D для детей колеблется от 10 до 25 мкг (500–1000 МЕ) в зависимости от возраста, физиологического состояния организма, соотношений солей фосфора и кальция в рационе и др. Для взрослого человека достаточно минимального количества витамина D.

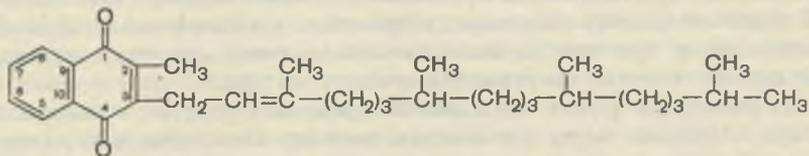
Случаи гипервитаминоза D у людей наблюдаются при «ударной» терапии рахита и некоторых дерматозов (волчанка). Гипервитаминоз был отмечен после приема более 1 500 000 МЕ витамина D в сутки. Прием очень больших доз витамина D может вызвать смертельный исход. У экспериментальных животных гипервитаминоз сопровождается увеличением отложения гидроксилapatита в костях и некоторых внутренних органах. У собак, например, отмечена кальцификация почек. Однако все эти симптомы исчезают после прекращения приема витамина.

Витамины группы К

Согласно номенклатуре биологической химии, к группе витаминов К относятся два типа хинонов с боковыми цепями, представленными изопреноидными звеньями: витамины К₁ и К₂¹. В основе циклической структуры обоих витаминов лежит кольцо 1,4-нафтохинона.

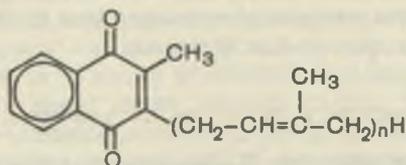
Для витамина К₁ сохранено название филохинон, а для витаминов группы К₂ введено название менахинон с указанием числа изопреновых звеньев²; в частности, для витамина К₂ рекомендовано название менахинон-6, где цифра 6 указывает число изопреновых звеньев в боковой цепи.

Витамин К₁ (филлохинон) впервые был изолирован из люцерны; это производное 2-метил-1,4-нафтохинона, содержащего в положении 3 фитильный радикал, имеющий 20 атомов углерода:



Витамин К₁(филлохинон)

Витамин К₂ открыт в растениях и у животных и содержит в боковой цепи от 6 до 9 изопреновых единиц.



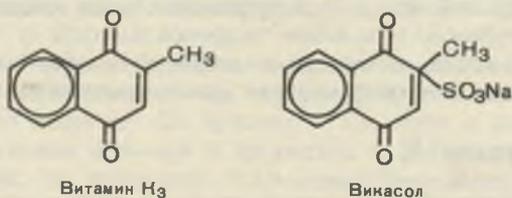
Витамин К₂ (менахинон; n=6,7 или 9)

¹ За открытие витамина К Э. Дойзи и Х. Дам получили Нобелевскую премию в 1943 г.

² При обозначении длины боковой изопреновой цепи за основу берут число изопреновых звеньев, а не число углеродных атомов.

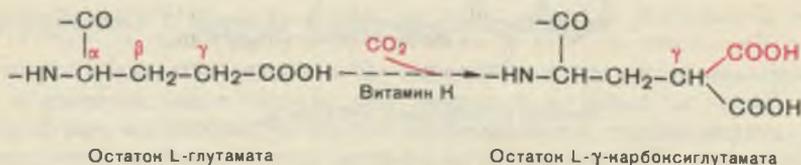
Витамин К₁ представляет собой светло-желтую жидкость, неустойчивую при нагревании в щелочной среде и при облучении; витамин К₂ — желтые кристаллы, также неустойчив. Оба препарата нерастворимы в воде, но хорошо растворимы в органических растворителях: бензоле, хлороформе, ацетоне, гексане и др.

Помимо витаминов К₁ и К₂, некоторые производные нафтохинона обладают витаминными свойствами и высокой антигеморрагической активностью, например синтетический аналог витамина К, лишенный боковой цепи в положении 3, обозначается витамином К₃ (менадион, или 2-метил-1,4-нафтохинон). Поскольку витамин К₃ нерастворим в воде, на его основе были синтезированы десятки растворимых в воде производных, одно из которых нашло широкое применение в медицинской практике — это синтезированная А. В. Палладиным натриевая соль бисульфитного производного витамина К₃ — викасол:



Витамин К является антигеморрагическим фактором, определенным образом связанным со свертыванием крови. Поэтому при авитаминозе К возникают самопроизвольные паренхиматозные и капиллярные кровотечения (носовые кровотечения, внутренние кровоизлияния). Кроме того, любые поражения сосудов (включая хирургические операции) при авитаминозе К могут привести к обильным кровотечениям. У человека авитаминоз К встречается реже, чем другие авитаминозы. Объясняется это двумя обстоятельствами: во-первых, смешанная пища довольно богата витамином К (поскольку витамины группы К синтезируются в зеленых растениях и некоторыми микроорганизмами); во-вторых, синтезируемого кишечной микрофлорой количества витамина К вполне достаточно для предотвращения авитаминоза. Авитаминоз обычно развивается при нарушении процесса всасывания жиров в кишечнике. У грудных детей часто возникают обильные подкожные кровотечения и кровоизлияния; они наблюдаются и при так называемом геморрагическом диатезе, являющемся следствием недостаточности свертывания крови у матери.

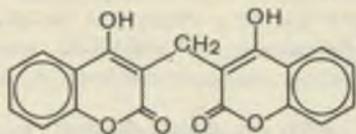
Биологическая роль. Витамин К принимает участие в синтезе протромбина в печени, очевидно, через ферментную систему. Получены доказательства, что витамин К необходим как стимулятор биосинтеза в печени минимум четырех белков-ферментов, участвующих в сложном процессе свертывания крови: факторов II, VII, IX, X. В частности, имеются данные, что в молекуле указанных факторов обязательно присутствуют остатки карбоксиглутаминовой кислоты; в молекуле активного протромбина таких остатков оказалось 10. Показано, что γ -карбоксилирование остатка глутаминовой кислоты в молекуле белков протекает посттрансляционно при участии γ -глутамилкарбоксилазы, требующей наличия витамина К. В этой реакции витамин К выполняет, по-видимому, кофакторную функцию.



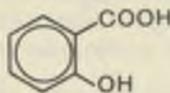
Реакция постсинтетического карбоксилирования γ -карбоксильной группы глутамата играет, кроме того, важную роль в связывании ионов Ca^{2+} с молекулой белка,

поскольку при этом образуются дополнительные отрицательно заряженные ионы карбоксильных групп. Укажем также, что биотин не участвует в этой реакции карбоксилирования.

Одним из мощных антивитаминов К является природное вещество д и к у м а р о л (дикумарин), введение которого вызывает резкое снижение в крови протромбина и ряда других белковых факторов свертывания крови и соответственно кровотечения. Аналогичным свойством обладает, кроме того, салициловая кислота.



Дикумарол



Салициловая кислота

Способность дикумарола снижать свертываемость крови в дальнейшем стали использовать для лечения болезней человека, характеризующихся повышенной свертываемостью крови. В частности, при тромбозах, тромбофлебитах дикумарол, способствуя разжижению сгустка крови, оказывает эффективное действие. В случае возникновения кровотечения после введения дикумарола больным назначают препараты витамина К.

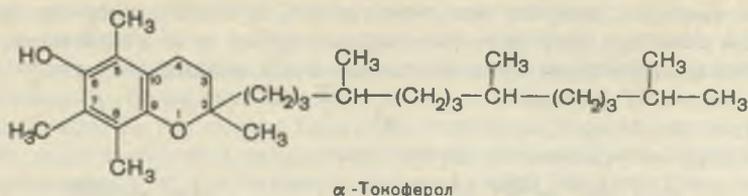
Распространение в природе и суточная потребность

Наиболее богаты витамином К растения, в частности зеленые листья каштана, крапивы, люцерны; к растительным продуктам, богатым витамином К, следует отнести капусту, шпинат, тыкву, зеленые томаты, арахисовое масло, ягоды рябины и т. д. В животных продуктах, кроме печени свиньи, он почти не содержится. Суточная потребность в витамине К для человека точно не установлена, поскольку он синтезируется микроорганизмами кишечника; считается достаточным количество около 1 мг.

Витамины группы Е

В начале 20-х годов Г. Эванс показал, что в смешанной пище содержится вещество, которое абсолютно необходимо для нормального размножения животных. Так, у крыс, содержащихся на синтетической диете, включающей молоко, препараты железа и дрожжи (в качестве источника витаминов группы В), развивалось бесплодие. Добавление к такой диете листьев салата полностью излечивало животных от бесплодия. Активное вещество, предохраняющее от бесплодия, было выделено из масла пшеничных зародышей и хлопкового масла и названо витамином Е, или токоферолом (от греч. tokos — потомство, phero — несу). Вскоре был осуществлен и химический синтез. В настоящее время известно 7 природных соединений, обладающих биологической активностью витамина Е. Все они выделены в чистом виде из растительных масел или получены синтетическим путем и обозначаются соответственно: α -, β -, γ -, δ -токоферолы и 8-метилтокотриенол.

С химической точки зрения токоферолы представляют собой производные 2-метил-2(4', 8', 12'-триметилтридецил)-хроман-6-ола, или токола¹. Ниже представлена структура α -токоферола (5, 7, 8-триметилтокола).



Различные токоферолы отличаются друг от друга числом и расположением метильных групп в бензольном кольце. Они представляют собой бесцветные маслянистые жидкости, хорошо растворимые в жирах (маслах) и жирорастворителях, весьма устойчивые к нагреванию, но быстро разрушающиеся под действием УФ-излучения.

Изменения в организме человека при авитаминозе Е изучены недостаточно, поскольку с растительными маслами человек получает достаточное количество витамина Е. Недостаточность его отмечена в некоторых тропических странах, где основным источником пищи являются углеводы, тогда как жиры употребляются в незначительных количествах. Препараты витамина Е нашли применение в медицинской практике. Они иногда предотвращают самопроизвольные (или привычные) аборт у женщины. У экспериментальных животных, в частности крыс, недостаточность витамина Е вызывает нарушение эмбриогенеза и дегенеративные изменения репродуктивных органов, что приводит к стерильности. У самок в большей степени поражается плацента, чем яйцники, не нарушен процесс оплодотворения яйца, но очень скоро плод рассасывается. У самцов происходит атрофия половых желез, приводящая к полной или частичной стерильности. К специфическим проявлениям недостаточности витамина Е относятся также мышечная дистрофия, жировая инфильтрация печени, дегенерация спинного мозга. Следствием дегенеративных и дистрофических изменений мышц является резкое ограничение подвижности животных; в мышцах резко снижается количество миозина, гликогена, калия, магния, фосфора и креатина и, наоборот, повышается содержание липидов и хлорида натрия.

Биологическая роль. Существует прямая связь между витамином Е и тканевым дыханием и обратная связь между этим витамином и степенью окисления липидов.

Как теперь стало известно, токоферолы выполняют в организме две главные метаболические функции. Они являются наиболее активными и возможно главными жирорастворимыми антиоксидантами, предохраняя от окисления полиненасыщенные жирные кислоты, и играют специфическую, пока еще не полностью раскрытую роль в обмене селена. Селен, как известно, является интегральной частью глутатионпероксидазы, обеспечивающей защиту мембран от разрушающего действия пероксидных радикалов. Биологическая роль витамина Е сводится, таким образом, к предотвращению аутоокисления липидов биомембран и возможному снижению потребности в глутатионпероксидазе, необходимой для разрушения образующихся в клетке перекисей. Участие токоферолов в механизме переноса электронов и протонов, как и в регуляции процесса транскрипции генов, и их роль в метаболизме убихинонов пока недостаточно выяснены.

¹ Токотриенолы и токолы имеют почти одинаковую структуру; отличаются тем, что первые содержат вместо полностью гидрированной ненасыщенную изопреноидную боковую цепь.

Распространение в природе и суточная потребность

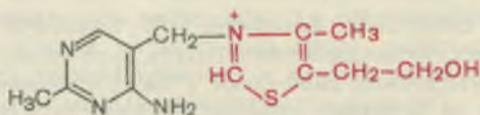
Витамины группы Е относятся к весьма распространенным в природе соединениям. Важнейшими источниками витамина Е для человека являются растительные масла (подсолнечное, хлопковое, соевое, кукурузное и др.), а также салат, капуста и семена злаков; из продуктов животного происхождения витамин Е содержится в мясе, сливочном масле, яичном желтке и др. Поскольку витамин Е откладывается в организме во многих тканях (мышцы, поджелудочная железа, жировая ткань), развитие авитаминоза или гиповитаминоза Е почти не наблюдается, даже если этот витамин не поступает с пищей в течение нескольких месяцев. Подобным же образом можно объяснить трудности определения суточной потребности в витамине Е, которая по приблизительным подсчетам составляет около 5 мг.

ВИТАМИНЫ, РАСТВОРИМЫЕ В ВОДЕ

Условно можно считать, что отличительной особенностью витаминов, растворимых в воде, является участие большинства из них в построении молекул коферментов (см. табл. 5.1), представляющих собой низкомолекулярные органические вещества небелковой природы, называемые также простетическими группами и принимающие вместе с белковым компонентом (апоферментом) непосредственное участие в каталитических реакциях. Коферментная роль с достоверностью доказана для следующих витаминов и витаминоподобных веществ: В₁, В₂, В₆, В₁₂, РР, биотина, фолиевой, парааминобензойной, пантотеновой и липоевой кислот, а также жирорастворимого коэнзима Q. Поскольку почти все они в организме человека и животных не синтезируются, недостаточное содержание или полное отсутствие этих витаминов в пище приводит к существенным нарушениям процессов обмена веществ и к развитию соответствующего синдрома, характерного для данного гипо- или авитаминоза.

Витамин В₁

Витамин В₁ (тиамин, антиневритный), как было указано выше, был первым кристаллическим витамином, выделенным К. Функом в 1912 г. Позже был осуществлен его химический синтез. Наряду с аминогруппой витамин В₁ содержит атом серы, поэтому он был назван т и а м и н о м. В химической структуре его содержатся два кольца — пиримидиновое и тиазоловое, соединенных метиленовой связью.

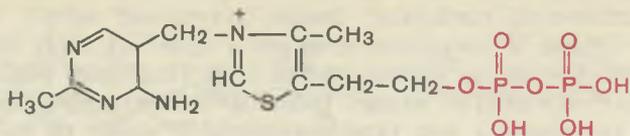


Витамин В₁

Тиамин хорошо растворим в воде. Водные растворы тиамин в кислой среде выдерживают нагревание до высоких температур без снижения биологической активности. В нейтральной и особенно в щелочной среде витамин В₁, наоборот, быстро разрушается при нагревании. Этим объясняется частичное или даже полное разрушение тиамин при кулинарной обработке пищи, например выпечке теста с добавлением гидрокарбоната натрия или карбоната аммония. При окислении тиамин образует тиохром, дающий синюю флюоресценцию при УФ-облучении. На этом свойстве тиамин основано его количественное определение.

Витамин В₁ легко всасывается в кишечнике, но не накапливается в тканях и не обладает токсичными свойствами. Избыток пищевого тиамин быстро выводится с мочой. В превращении витамина В₁ в его активную форму — тиаминпирофосфат (ТПФ), часто называемый также тиаминдифосфатом, участвует специфический АТФ-

зависимый фермент — тиаминпирофосфокиназа, содержащаяся главным образом в печени и ткани мозга. Опытами с меченым ^{32}P АТФ доказан перенос на тиамин целиком пирофосфатной группы в присутствии фермента. ТПФ имеет следующее строение:



Тиаминпирофосфат (тиаминдифосфат)

Если витамин B_1 поступает с пищей в виде ТПФ, то пирофосфатная группа отщепляется от него под действием кишечных пирофосфатаз.

При отсутствии или недостаточности тиамина развивается тяжелое заболевание — бери-бери, широко распространенное в ряде стран Азии и Индокитая, где основным продуктом питания является рис. Следует отметить, что недостаточность витамина B_1 встречается и в европейских странах, где она известна как симптом Вернике, проявляющийся в виде энцефалопатии, или синдром Вейса с преимущественным поражением сердечно-сосудистой системы. Специфические симптомы связаны с преимущественными нарушениями деятельности сердечно-сосудистой и нервной систем, а также желудочно-кишечного тракта. В настоящее время пересматривается точка зрения, что бери-бери у человека является следствием недостаточности только витамина B_1 . Более вероятно, что это заболевание представляет собой комбинированный или полиавитаминоз, при котором организм испытывает недостаток также в рибофлавине, пиридоксине, витаминах РР, С и др. Однако на животных и добровольцах получен экспериментальный авитаминоз B_1 и в зависимости от преобладания тех или иных симптомов различают ряд клинических типов недостаточности, в частности полиневритную (или сухую) форму бери-бери, при которой на первый план выступают нарушения со стороны периферической нервной системы. При так называемой отечной форме бери-бери преимущественно поражается сердечно-сосудистая система, хотя отмечаются также явления полиневрита. И, наконец, различают остро протекающую кардиальную форму болезни, называемую пернициозной, которая приводит к летальному исходу в результате развития острой сердечной недостаточности. В связи с внедрением в медицинскую практику кристаллического препарата тиамина летальное резко сократилась и наметились рациональные пути лечения и профилактики этого заболевания.

К наиболее ранним симптомам авитаминоза B_1 относятся нарушения моторной и секреторной функций желудочно-кишечного тракта, выражающиеся в потере аппетита, замедлении перистальтики (атония) кишечника, а также изменении психики, заключающиеся в потере памяти на недавние события, склонности к галлюцинациям; отмечаются изменения деятельности сердечно-сосудистой системы: одышка, сердцебиение, боли в области сердца. При дальнейшем развитии авитаминоза выявляются симптомы поражения периферической нервной системы (дегенеративные изменения нервных окончаний и проводящих пучков), выражающиеся в расстройстве чувствительности, ощущении покалывания, онемения и болей по ходу нервов. Эти поражения завершаются контрактурами, атрофией и параличами нижних, а затем и верхних конечностей. В этот же период развиваются явления сердечной недостаточности (учащение ритма, сверлящие боли в области сердца). Биохимические нарушения при авитаминозе B_1 проявляются в развитии отрицательного азотистого баланса, выделении в повышенных количествах с мочой аминокислот и креатина, накоплении в крови и в тканях α -кетокислот, а также пентозосахаров. Содержание тиамина и ТПФ в сердечной мышце и печени у больных бери-бери в 5–6 раз ниже нормы.

Биологическая роль. Экспериментально доказано, что витамин B_1 в форме ТПФ является составной частью минимум четырех ферментов, участвующих в проме-

жучоном обмене веществ. Так, известно, что ТПФ входит в состав двух сложных ферментных систем — пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназных комплексов, катализирующих окислительное декарбоксилирование пировиноградной и α -кетоглутаровой кислот. В составе транскетолазы ТПФ участвует в переносе гликоль-альдегидного радикала от кетосахаров на альдосахара (см. главу 9).

ТПФ является коферментом дегидрогеназы γ -оксикетоглутаровой кислоты. Приведенные примеры, вероятно, не ограничивают биологические функции тиамина. В частности, ТПФ участвует в окислительном декарбоксилировании глиоксильной кислоты и α -кетокислот, образующихся при распаде аминокислот с разветвленной боковой цепью.

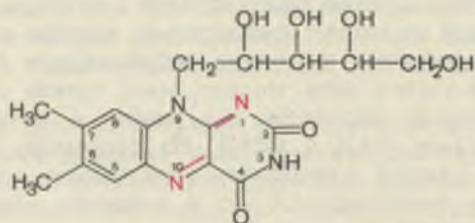
Распространение в природе и суточная потребность

Витамин В₁ широко распространен в природе. Основное количество его человек получает с растительной пищей. Большое количество витамина В₁ содержится в дрожжах, пшеничном хлебе из муки грубого помола, оболочке и зародышах семян хлебных злаков, сое, фасоли, горохе, меньше — в картофеле, моркови, капусте. Из продуктов животного происхождения наиболее богаты витамином В₁ печень, почки, мозг. Некоторые бактерии, населяющие кишечник животных, способны синтезировать достаточное количество тиамина, например количества витамина В₁, синтезированного микрофлорой кишечника коров, оказывается вполне достаточно для покрытия потребностей организма. Рекомендуемые Институтом питания АМН СССР нормы суточного потребления тиамина для отдельных групп населения составляют от 1,2 до 2,2 мг.

Витамин В₂

Витамин В₂ (рибофлавин) впервые был выделен из молока и ряда других пищевых продуктов. В зависимости от источника получения витамин В₂ называли по-разному, хотя по существу это было одно и то же соединение: лактофлавин (из молока), гепатофлавин (из печени), овофлавин (из белка яиц), вердофлавин (из растений). Химический синтез витамина В₂ был осуществлен в 1935 г. Р. Куном. Растворы витамина В₂ имеют оранжево-желтую окраску и характеризуются желто-зеленой флюоресценцией.

В основе молекулы рибофлавина лежит гетероциклическое соединение — изоаллоксазин (сочетание бензольного, пиразинового и пиримидинового колец), к которому в положении 9 присоединен пятиатомный спирт рибитол. Химическое название «рибофлавин» отражает наличие рибитола и желтой окраски препарата¹; рациональное название его 6,7-диметил-9-D-рибителизоаллоксазин:



Рибофлавин

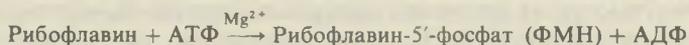
¹ Желтый цвет присущ только окисленной форме препарата; рибофлавин в восстановленной форме — бесцветное соединение.

Рибофлавин хорошо растворим в воде, устойчив в кислых растворах, но легко разрушается в нейтральных и щелочных растворах. Он весьма чувствителен к видимому и УФ-излучению и сравнительно легко подвергается обратимому восстановлению, присоединяя водород по месту двойных связей и превращаясь в бесцветную лейкоформу. Это свойство рибофлавина легко окисляться и восстанавливаться лежит в основе его биологического действия в клеточном метаболизме.

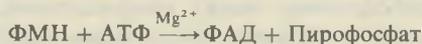
Клинические проявления недостаточности рибофлавина лучше всего изучены на экспериментальных животных. Помимо остановки роста, выпадения волос (алопеция), характерных для большинства авитаминозов, специфичными для авитаминоза В₂ являются воспалительные процессы слизистой оболочки языка (глоссит), губ, особенно у углов рта, эпителия кожи и др. Наиболее характерны изменения со стороны глаз: кератиты (воспалительные процессы и усиленная васкуляризация роговой оболочки), катаракта (помутнение хрусталика). При авитаминозе В₂ у людей развивается общая мышечная слабость и слабость сердечной мышцы.

Биологическая роль. Рибофлавин входит в состав флавиновых коферментов, в частности ФМН и ФАД¹, являющихся в свою очередь простетическими группами ферментов-флавопротеинов. Различают два типа химических реакций, катализируемых этими ферментами. К первому относятся реакции, в которых фермент осуществляет прямое окисление с участием кислорода, т. е. дегидрирование (отщепление электронов и протонов) исходного субстрата или промежуточного метаболита. К ферментам этой группы относятся оксидазы L- и D-аминокислот, глицинооксидаза, альдегидоксидаза, ксантинооксидаза и др. Вторая группа реакций, катализируемых флавопротеинами, характеризуется переносом электронов и протонов не от исходного субстрата, а от восстановленных пиридиновых коферментов. Ферменты этой группы играют главную роль в биологическом окислении. В каталитическом цикле изоаллоказинового остатка ФАД и ФМН подвергается обратимому восстановлению с присоединением атомов водорода к N¹ и N¹⁰.

ФМН синтезируется в организме животных из свободного рибофлавина и АТФ при участии специфического фермента — рибофлавинкиназы:



Образование ФАД в тканях также протекает при участии специфического АТФ-зависимого фермента ФМН-аденилилтрансферазы. Исходным веществом для синтеза является ФМН:



Распространение в природе и суточная потребность

Рибофлавин достаточно широко распространен в природе. Он содержится почти во всех животных тканях и растениях; сравнительно высокие концентрации его обнаружены в дрожжах. Из пищевых продуктов рибофлавином богаты хлеб (из муки грубого помола), семена злаков, яйца, молоко, мясо, свежие овощи и др.; в молоке он содержится в свободном состоянии, а в печени и почках животных прочно связан с белками в составе ФАД и ФМН. Из организма человека и животных рибофлавин выделяется с мочой в свободном виде. Суточная потребность взрослого человека в рибофлавине составляет 1,7 мг; в пожилом возрасте и при тяжелой физической работе эта потребность возрастает.

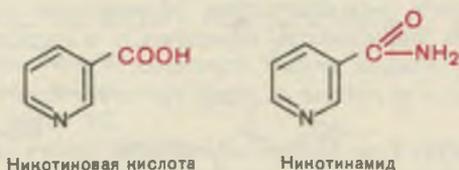
¹ Структурные формулы ФМН и ФАД и молекулярные механизмы их действия в составе специфических ферментов представлены в главе 8.

Витамин РР

Витамин РР (никотиновая кислота, никотинамид, ниацин) получил также название антипеллагрического витамина (от итал. preventive pellagra — предотвращающий пеллагру), поскольку его отсутствие является причиной заболевания, называемого пеллагрой.

Никотиновая кислота известна давно, однако только в 1937 г. она была выделена К. Эльвегеймом из экстракта печени и было показано, что введение никотиновой кислоты (или ее амида — никотинамида) или препаратов печени предохраняет от развития или излечивает от пеллагры. Ранее в 1904 г. А. Гарден и У. Юнг установили, что для превращения глюкозы в этанол в бесклеточном экстракте дрожжей необходимо присутствие легкодиализуемого кофактора, названного козимазой. Химический состав аналогичного кофактора из эритроцитов млекопитающих был расшифрован в 1934 г. О. Варбургом и У. Кристианом; он оказался производным амида никотиновой кислоты.

Никотиновая кислота представляет собой соединение пиридинового ряда, содержащее карбоксильную группу (никотинамид отличается наличием амидной группы).



Витамин РР малорастворим в воде (порядка 1%), но хорошо растворим в водных растворах щелочей. Никотиновая кислота кристаллизуется в виде белых игл.

Наиболее характерными признаками авитаминоза РР, т. е. пеллагры (от итал. pelle agra — шершавая кожа), являются поражения кожи (дерматиты), желудочно-кишечного тракта (диарея) и нарушения нервной деятельности (деменция).

Дерматиты чаще всего симметричны и поражают те участки кожи, которые подвержены влиянию прямых солнечных лучей: тыльную поверхность кистей рук, шею, лицо; кожа становится красной, затем коричневой и шершавой. Поражения кишечника выражаются в развитии анорексии, тошноты, болей в области живота, поноса. Диарея приводит к обезвоживанию организма. Слизистая оболочка толстого кишечника сначала воспаляется, затем изъязвляется. Специфичными для пеллагры являются стоматиты, гингивиты, поражения языка со вздутием и трещинами. Поражения мозга выражаются в головных болях, головокружениях, повышенной раздражимости, депрессии и других симптомах, включая психозы, психоневрозы, галлюцинации и др. Симптомы пеллагры особенно резко выражены у больных с недостаточным белковым питанием. Установлено, что это объясняется недостатком триптофана, который является предшественником никотинамида, частично синтезируемого в тканях человека и животных, а также недостатком ряда других витаминов (пиридоксина; см. главу 11).

Биологическая роль. Витамин РР входит в состав НАД и НАДФ, являющихся коферментами большого числа обратимо действующих в окислительно-восстановительных реакциях дегидрогеназ (формулы приведены в главе 8).

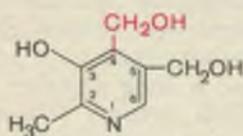
Показано, что ряд дегидрогеназ используют только НАД или НАДФ, другие могут катализировать окислительно-восстановительные реакции в присутствии любого из них. В процессе биологического окисления НАД и НАДФ выполняют роль промежуточных переносчиков электронов и протонов между окисляемым субстратом и флавиновыми ферментами (молекулярные механизмы участия пиридиновых нуклеотидов в этом процессе подробно рассматриваются в главе 8).

Распространение в природе и суточная потребность

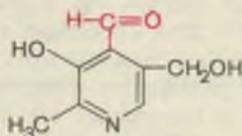
Никотиновая кислота также относится к витаминам, широко распространенным в растительных и животных организмах. Для человека основными источниками никотиновой кислоты и ее амида являются рис, хлеб, картофель, мясо, печень, почки, морковь и другие продукты. Суточная потребность для взрослого человека составляет 18 мг.

Витамин В₆

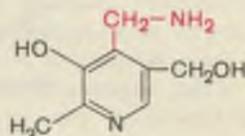
Витамин В₆ (пиридоксин, антидерматитный) как самостоятельный независимый пищевой фактор был открыт П. Дьерди в 1934 г. в результате того, что в отличие от известных уже к тому времени водорастворимых витаминов В₁, В₂ и РР он устранял особую форму дерматита конечностей у крыс, названного акродинией. Впервые витамин В₆ был выделен в 1938 г. из дрожжей и печени и вскоре после этого был синтезирован химически. Он оказался производным 3-оксипиридина, в частности 2-метил-3-окси-4,5-диоксиметилпиридина. Термином «Витамин В₆», по рекомендациям Международной комиссии по номенклатуре биологической химии, обозначают все три производных 3-оксипиридина, обладающие одинаковой витаминной активностью: пиридоксин (пиридоксол), пиридоксаль и пиридоксамин:



Пиридоксин
(пиридоксол)



Пиридоксаль



Пиридоксамин

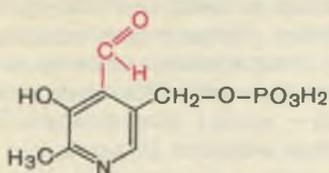
Как видно, производные 3-оксипиридина отличаются друг от друга природой замещающей группы в положении 4 пиридинового ядра. Витамин В₆ хорошо растворим в воде и этаноле. Водные растворы весьма устойчивы по отношению к кислотам и щелочам, однако они чувствительны к влиянию света в нейтральной зоне рН среды.

Недостаточность витамина В₆ наиболее подробно изучена на крысах, у которых самым характерным признаком является акродиния, или специфический дерматит с преимущественным поражением кожи лопаток, хвоста, носа и ушей. Отмечаются повышенное шелушение кожи, выпадение шерсти, изъязвление кожи конечностей, заканчивающееся развитием гангрены пальцев. Эти явления не поддаются лечению витамином РР, но быстро проходят при введении пиридоксина. При более глубоком авитаминозе В₆ у собак, свиней, крыс и кур отмечаются эпилептиформные припадки с дегенеративными изменениями в ЦНС.

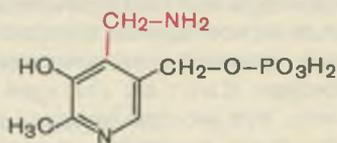
У человека недостаточность витамина В₆ встречается реже, хотя некоторые пеллагроподобные дерматиты, не поддающиеся лечению никотиновой кислотой, легко проходят при введении пиридоксина. У грудных детей описаны дерматиты, поражения нервной системы (включая эпилептиформные припадки), обусловленные недостаточным содержанием пиридоксина в искусственной пище. Недостаточность пиридоксина часто наблюдается у больных туберкулезом, которым вводят с лечебной целью изониазид, оказавшийся, как и дезоксипиридоксин, антагонистом витамина В₆.

Из биохимических нарушений при недостаточности витамина В₆ следует отметить гомоцистинурию и цистатиониурию, а также нарушения обмена триптофана, выражающиеся в повышении экскреции с мочой ксантуреновой кислоты и снижении количества экскретируемой кинуреновой кислоты (см. главу 11).

Биологическая роль. Оказалось, что хотя все три производные 3-оксипиридина наделены витаминными свойствами, коферментные функции выполняют только фосфорилированные производные пиридоксала и пиридоксамина.

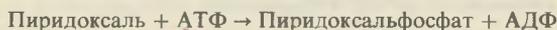


Пиридоксальфосфат



Пиридоксаминфосфат

Фосфорилирование пиридоксала и пиридоксамина является ферментативной реакцией, протекающей при участии специфических киназ. Синтез пиридоксальфосфата, например, катализирует пиридоксалькиназа, которая наиболее активна в ткани мозга. Эту реакцию можно представить следующим уравнением:



Кроме того, доказано, что в животных тканях происходят взаимопревращения пиридоксальфосфата и пиридоксаминфосфата, в частности в реакциях трансаминирования аминокислот (см. главу 11).

Следует отметить, что в выяснение биологической роли витамина В₆ и пиридоксальфосфата в азотистом обмене существенный вклад внесли А. Е. Браунштейн, С. Р. Мардашев, Э. Снелл, Д. Мешлер, А. Майстер и др. Сейчас известно более 20 пиридоксальных ферментов, катализирующих ключевые реакции азотистого метаболизма во всех живых организмах. Так, доказано, что пиридоксальфосфат является протетической группой аминотрансфераз, катализирующих обратимый перенос аминогруппы (NH₂-группы) от аминокислоты на α-кетокислоту, и декарбоксилаз аминокислот, осуществляющих необратимое отщепление СО₂ от карбоксильной группы аминокислот с образованием биогенных аминов. Установлена, кроме того, коферментная роль пиридоксальфосфата в энзиматических реакциях неокислительного дезаминирования серина и треонина, окисления триптофана, кинуренина, превращения серосодержащих аминокислот, взаимопревращения серина и глицина (см. главу 11), а также в синтезе δ-аминолевулиновой кислоты, являющейся предшественником молекулы гема гемоглобина и др. Пиридоксин относится к витаминам, коферментная роль которых изучена наиболее подробно. В последние годы число вновь открытых пиридоксальных ферментов быстро увеличивалось. Вследствие широкого участия пиридоксальфосфата в процессах обмена при недостаточности витамина В₆ отмечаются разнообразные нарушения метаболизма аминокислот.

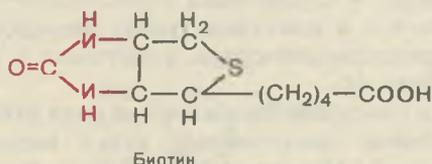
Распространение в природе и суточная потребность

Витамин В₆ широко распространен в продуктах растительного и животного происхождения. Основными источниками витамина В₆ для человека служат: хлеб, горох, фасоль, картофель, мясо, почки, печень и др. Во многих продуктах животного происхождения пиридоксин химически связан с белком, но в желудочно-кишечном тракте под действием ферментов он легко освобождается. Суточная потребность в пиридоксине для человека точно не установлена, поскольку он синтезируется микрофлорой кишечника в количествах, частично покрывающих потребности в нем организма. Косвенные расчеты показывают, что взрослый человек должен получать в сутки около 2 мг витамина В₆.

Биотин (витамин Н)

В 1916 г. в опытах на животных было показано токсичное действие сырого яичного белка; употребление печени или дрожжей снимало этот эффект. Фактор, предотвращающий развитие токсикоза, был назван витамином Н. Позже было установлено, что в дрожжевом экстракте, печени и желтке куриного яйца содержится пищевой фактор, отличный от всех других известных к этому времени витаминов. Этот фактор стимулирует рост дрожжей и азотфиксирующих бактерий *Rhizobium*, в связи с чем он и получил название биотин (от греч. *bios* — жизнь), или коэнзим R. В 1940 г. было установлено, что все три названия (биотин, витамин Н и коэнзим R) относятся к одному и тому же химически индивидуальному соединению. Что касается вещества, выделенного из сырого яичного белка, то им оказался гликопротеин — белок основного характера, названный авидином; этот белок обладает способностью связывать биотин с образованием нерастворимого в воде комплекса. Этот комплекс не расщепляется в желудочно-кишечном тракте, поэтому биотин не подвергается всасыванию, хотя и содержится в пищевых продуктах.

Биотин был впервые выделен в 1935 г. из яичного желтка. Молекула биотина является циклическим производным мочевины, а боковая цепь представлена валериановой кислотой:



Карбонильная группа биотина связывается с ϵ -аминогруппой лизина, образуя ϵ -N-биотиниллизин (б и о ц и т и н), обладающий биологической активностью.

Клинические проявления недостаточности биотина у человека изучены недостаточно. Это объясняется тем, что бактерии кишечника обладают способностью синтезировать биотин в необходимых количествах. Недостаточность его проявляется в случае употребления большого количества сырого яичного белка или приема сульфаниламидных препаратов и антибиотиков, подавляющих рост бактерий в кишечнике. У человека при недостаточности биотина отмечают воспалительные процессы кожи (дерматиты), сопровождающиеся усиленной деятельностью сальных желез, выпадением волос, поражением ногтей, часто отмечаются боли в мышцах, усталость, сонливость, депрессия, а также анорексия и анемия. Однако все эти явления обычно проходят через несколько дней после ежедневного введения биотина. У крыс недостаточность биотина, вызванная введением с пищей сырого яичного белка, вызывает явления острого дерматита, облысение и параличи.

Биологическая роль. Биотин подробно изучен благодаря работам Ф. Линена. Известные коферменты биотина катализируют два типа реакций:

1) реакции карбоксилирования (с участием CO_2 или HCO_3^-), сопряженные с распадом АТФ



2) реакции транскарбоксилирования (протекающие без участия АТФ), при которых субстраты обмениваются карбоксильной группой:



Получены доказательства двухстадийного механизма этих реакций с образованием промежуточного комплекса (карбоксибиотинилфермента).

К реакциям первого типа относятся, например, ацетил-КоА и пируваткарбоксилазные реакции:



Пируваткарбоксилаза является высокоспецифичным ферментом, катализирующим уникальную реакцию усвоения CO_2 в организме животных. Сущность реакции сводится к пополнению запасов оксалоацетата (щавелевоуксусная кислота) в лимоннокислом цикле Кребса (так называемые «анаплеротические», «пополняющие» реакции), т. е. его синтезу из CO_2 и пирувата:



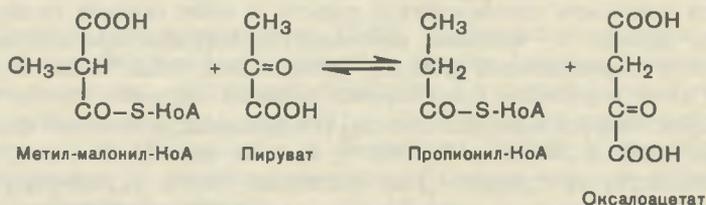
Реакция протекает в две стадии: на первой стадии, связанной с затратой энергии, CO_2 подвергается активированию, т. е. ковалентному связыванию с биотином в активном центре фермента (Е-биотин):



На второй стадии CO_2 из комплекса переносится на пируват с образованием оксалоацетата и освобождением фермента:



Примером второго типа реакций является метилмалонил-оксалоацетат-транскарбоксилазная реакция, катализирующая обратимое превращение пировиноградной и щавелевоуксусной кислот:



Реакции карбоксилирования и транскарбоксилирования имеют важное значение в организме при синтезе высших жирных кислот, белков, пуриновых нуклеотидов (соответственно нуклеиновых кислот) и др.

Распространение в природе и суточная потребность

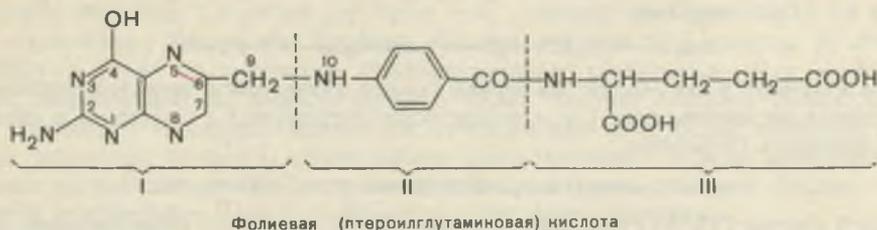
Биотин содержится почти во всех продуктах животного и растительного происхождения, главным образом в связанной форме. Богаты этим витамином печень, почки, молоко, желток яйца. В растительных продуктах (картофель, лук, томат, шпинат) биотин находится как в свободном, так и в связанном состоянии. Для человека и животных важным источником является биотин, синтезируемый микрофлорой кишечника. Суточная потребность взрослого человека в биотине равна приблизительно 0,25 мг.

Фолиевая кислота

Фолиевая (птероилглутаминовая) кислота в зависимости от вида животных или штамма бактерий, нуждающихся для нормального роста в присутствии этого пищевого фактора, получала различные названия: фактор роста *L. casei*, витамин М, необходимый для нормального кроветворения у обезьян, витамин В₉, фактор роста цыплят (индекс «с» от англ. chicken — цыпленок). В 1941 г. фолиевая кислота была выделена из зеленых листьев растений, в связи с чем и получила свое окончательное название (от лат. folium — лист). Еще до установления химического строения фолиевой

кислоты было показано, что для роста некоторых бактерий необходимо присутствие в питательной среде парааминобензойной кислоты. Добавление структурных аналогов ее, в частности сульфаниламидных препаратов, наоборот, оказывало тормозящее действие на рост бактерий. В настоящее время установлено, что это ростстимулирующее действие парааминобензойной кислоты обусловлено включением ее в состав молекулы фолиевой кислоты.

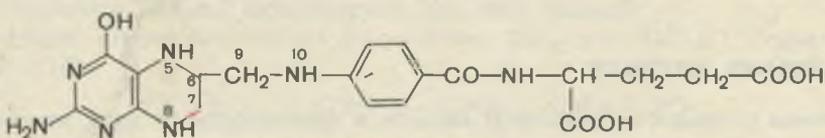
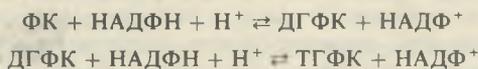
Фолиевая кислота состоит из трех структурных единиц: остатка птеридина (I), парааминобензойной (II) и L-глутаминовой¹ (III) кислот, имеет следующую структуру:



Фолиевая кислота ограниченно растворима в воде, но хорошо растворима в разбавленных растворах спирта; имеет характерные спектры поглощения в УФ-области.

Недостаточность фолиевой кислоты трудно вызвать даже у животных без предварительного подавления в кишечнике роста микроорганизмов, которые синтезируют ее в необходимых количествах; это достигается введением антибиотиков и скармливанием животным пищи, лишенной фолиевой кислоты. У обезьян фолиевая недостаточность сопровождается развитием специфической анемии, у крыс сначала развивается лейкопения, а затем анемия. У человека наблюдается картина макроцитарной анемии, весьма близкая к пернициозной анемии, являющейся следствием недостаточности витамина В₁₂, хотя нарушения со стороны нервной системы отсутствуют. Иногда отмечается диарея. Имеются доказательства, что при недостаточности фолиевой кислоты нарушается процесс биосинтеза ДНК в клетках костного мозга, в которых в норме осуществляется эритропоэз. Как следствие этого в периферической крови появляются молодые клетки — мегалобласты с меньшим содержанием ДНК.

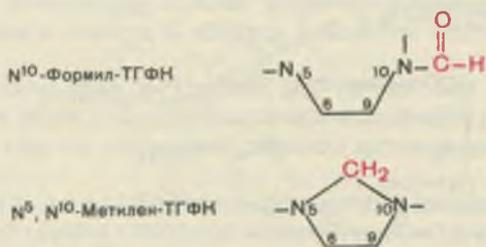
Биологическая роль. Коферментные функции фолиевой кислоты связаны не со свободной формой витамина, а с восстановленным его птеридиновым производным. Восстановление сводится к разрыву двух двойных связей и присоединению четырех водородных атомов в положениях 5, 6, 7 и 8 с образованием тетрагидрофолиевой кислоты (ТГФК); оно протекает в две стадии в животных тканях при участии специфических ферментов, содержащих восстановленный НАДФ. На первой стадии при участии фолатредуктазы образуется дигидрофолиевая кислота (ДГФК), которая при участии второго фермента — дигидрофолатредуктазы — восстанавливается в ТГФК:



5,6,7,8-Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФН)

¹ У бактерий количество глутаминовой кислоты в молекуле витамина достигает 3—6 остатков, соединенных между собой γ-глутамильными связями.

Доказано, что коферментные функции ТГФК непосредственно связаны с переносом одноуглеродных групп, первичными источниками которых в организме являются β -углеродный атом серина, α -углеродный атом глицина, углерод метильных групп метионина, холина, 2-й углеродный атом индольного кольца триптофана, 2-й углеродный атом имидазольного кольца гистидина, а также формальдегид, муравьиная кислота и метанол. К настоящему времени открыто шесть одноуглеродных групп, включающихся в разнообразные биохимические превращения в составе ТГФК: формильная ($-\text{CHO}$), метильная ($-\text{CH}_3$), метиленовая ($-\text{CH}_2-$), метенильная ($-\text{CH}=\text{}$), оксиметильная ($-\text{CH}_2\text{OH}$) и формиминогруппа ($-\text{CH}=\text{NH}$). Выяснено, что присоединение этих фрагментов к ТГФК является ферментативной реакцией ковалентного связывания их с 5-м или 10-м атомом азота (или с обоими атомами вместе). В качестве примера приводятся отдельные функциональные группы в активных участках ТГФК:



Имеются данные, что производные ТГФК участвуют в переносе одноуглеродных фрагментов при биосинтезе метионина и тимина (перенос метильной группы), серина (перенос оксиметильной группы), образовании пуриновых нуклеотидов (перенос формильной группы) и т. д. (см. главы 11 и 12). Поскольку перечисленные вещества играют исключительно важную роль в биосинтезе белков и нуклеиновых кислот, становятся понятными те глубокие нарушения обмена, которые наблюдаются при недостаточности фолиевой кислоты.

В медицинской практике (в частности, в онкологии) нашли применение некоторые синтетические аналоги (антагонисты) фолиевой кислоты. Так, 4-аминоптерин используется в качестве препарата, тормозящего синтез нуклеиновых кислот и соответственно развитие лейкозов у детей.

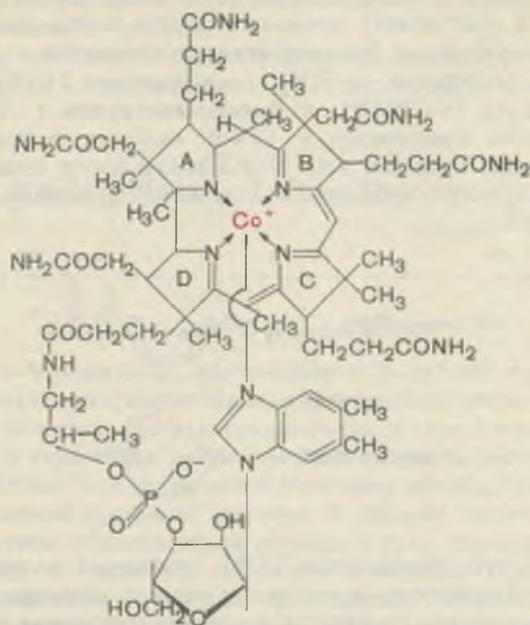
Распространение в природе и суточная потребность

Вещества, обладающие активностью фолиевой кислоты, широко распространены в природе. Богатыми источниками их являются зеленые листья растений и дрожжи. Эти вещества содержатся также в печени, почках, мясе и других продуктах. Многие микроорганизмы кишечника животных и человека синтезируют фолиевую кислоту в количествах, достаточных для удовлетворения потребностей организма в этом витамине. Суточная потребность в свободной фолиевой кислоте для взрослого человека составляет 1–2 мг.

Витамин B_{12}

Витамин B_{12} (кобаламин, антианемический витамин) был выделен из печени в кристаллическом виде в 1948 г. Задолго до этого было известно, что в печени животных содержится особое вещество, регулирующее процесс кроветворения и оказывающее лечебный эффект при пернициозной (злокачественной) анемии у людей. Одна-

ко только в 1955 г. Д. Ходжкин¹ расшифровала его структуру и пространственную конфигурацию, главным образом при помощи физических методов исследования. На основании этих данных, а также результатов изучения химического состава для витамина В₁₂ было предложено следующее строение:



Витамин В₁₂(нобаламин)

В молекуле витамина В₁₂ центральный атом кобальта соединен с атомами азота четырех восстановленных пиррольных колец, образующих порфириноподобное корриновое ядро, и с атомом азота 5,6-диметилбензимидазола². Кобальтсодержащая часть молекулы витамина представляет собой планарную (плоскостную) фигуру; по отношению к ней перпендикулярно расположен нуклеотидный лиганд, который, помимо 5,6-диметилбензимидазола, содержит рибозу и остаток фосфата у 3-го атома углерода. Вся структура получила название кобаламин. Были получены производные витамина В₁₂, содержащие ОН-группу (оксикобаламин), хлор (хлоркобаламин), Н₂О (аквакобаламин) и азотистую кислоту (нитриткобаламин). Из природных источников были выделены, кроме того, аналоги В₁₂, которые вместо 5,6-диметилбензимидазола содержали 5-оксибензимидазол, или аденин, 2-метиладенин, гипоксантин и метилгипоксантин. Все они обладали меньшей биологической активностью, чем кобаламин. Обычно витамин В₁₂ выделяют из микробной массы или животных тканей, используя растворы, содержащие ионы цианида, которые выполняют роль шестого лиганда кобальта. Однако цианокобаламин метаболически не активен. В состав В₁₂-кофакторов вместо CN входит аденозин или метильная группа.

У человека и животных недостаток витамина В₁₂ приводит к развитию злокачественной макроцитарной, мегалобластической анемии. Помимо нарушения кроветворной функции, для авитаминоза В₁₂ специфичны также расстройство деятельности нервной системы и резкое снижение кислотности желудочного сока. Оказалось, что

¹ Дороти Ходжкин была присуждена Нобелевская премия (1964) за расшифровку структуры витамина В₁₂ методом рентгеноструктурного анализа. Она избрана иностранным членом АН СССР.

² Это единственный витамин, содержащий в своей молекуле металл.

для активного процесса всасывания витамина V_{12} в кишечнике обязательным условием является наличие в желудочном соке особого белка — гастромукопротеина (транскоррина), получившего название внутренний фактор Касла, который специфически связывает витамин V_{12} в новый сложный комплекс. И только в таком, связанном с транскоррином, виде витамин V_{12} всасывается в кишечнике. Поэтому нарушение синтеза внутреннего фактора в слизистой оболочке желудка приводит к развитию авитаминоза V_{12} даже при наличии в пище достаточного количества кобаламина. В подобных случаях витамин с лечебной целью обычно вводят парентерально или с пищей, но в сочетании с нейтрализованным желудочным соком, в котором содержится внутренний фактор. Подобный метод лечения эффективен при пернициозной анемии. Это указывает на существование определенной связи между развитием злокачественной анемии у человека и нарушением функции желудка. Можно, вероятно, утверждать, что хотя пернициозная анемия является следствием авитаминоза V_{12} , но развивается она на почве органических поражений желудка, приводящих к нарушению синтеза в клетках слизистой оболочки желудка внутреннего фактора Касла.

Витамин V_{12} используется в клинике не только для лечения пернициозной анемии, но и других ее форм — мегалобластических анемий с неврологическими нарушениями, которые обычно не поддаются лечению другими витаминами, в частности фолиевой кислотой.

Биологическая роль. Выявлены ферментные системы, в составе которых в качестве простетической группы участвуют не свободный витамин V_{12} , а так называемые V_{12} -коферменты, или кобамидные коферменты. Последние отличаются тем, что содержат два типа лигандов: метильную или 5'-дезоксаденозильную группу. Соответственно различают метилкобаламин (CH_3-V_{12}) и дезоксиадеинозилкобаламин. Превращения свободного витамина V_{12} в V_{12} -коферменты, протекающие в несколько этапов, осуществляются в организме при участии специфических ферментов в присутствии в качестве кофакторов ФАД, восстановленного НАД, АТФ и глутатиона. Впервые V_{12} -коферменты были выделены Г. Баркером и сотр. в 1958 г. из микроорганизмов; позже было доказано их существование в тканях животных.

Химические реакции, в которых витамин V_{12} принимает участие как кофермент, условно делят на две группы в соответствии с его химической природой. К первой группе относятся реакции трансметилирования, в которых метилкобаламин выполняет роль промежуточного переносчика метильной группы (сюда относятся реакции синтеза метионина и ацетата).

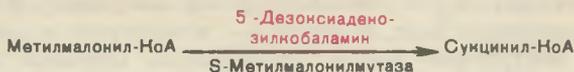
Синтез метионина требует, помимо гомоцистеина, наличия N^5 -метил-ТГФК и восстановленного ФАД и протекает по уравнению:



Фермент, катализирующий эту реакцию, был открыт в печени человека и ряда животных, а также у микроорганизмов. Получены доказательства, что механизм реакции включает перенос метильной группы $N^5-CH_3-ТГФК$ на активный центр фермента с образованием метил- V_{12} -фермента и последующий перенос этой группы на гомоцистеин. Блокирование этой реакции, наблюдаемое при авитаминозе V_{12} , приводит к накоплению $N^5-CH_3-ТГФК$ и соответственно к выключению из сферы химических реакций еще одного важного кофермента.

Вторая группа реакций при участии V_{12} -коферментов заключается в переносе водорода в реакциях изомеризации. Например, глутаматмугазная реакция (взаимопревращения глутаминовой и β -метиласпарагиновой кислот), метилмалонилмугазная реакция (обратимое превращение метилмалонил-коэнзима А в сукцинил-коэнзим А), глицерол- и диолдегидратазные реакции, ферментативные реакции восстановления

рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов и др. В организме человека из указанных процессов открыта только реакция изомеризации метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА:



Следует подчеркнуть, что реакция изомеризации метилмалонил-КоА требует наличия 5'-дезоксиаденозилкобаламина, в то время как реакция метилирования (см. выше) нуждается в метилкобаламине. Этими обстоятельствами могут быть объяснены некоторые биохимические симптомы витамин В₁₂-недостаточности, в частности метилмалонилацидурия и гомоцистинурия. Кроме того, описаны болезни, обусловленные наследственными дефектами синтеза только дезоксиаденозилкобаламина или обоих В₁₂-коферментов; в этих случаях даже 1000-кратная доза витамина В₁₂ не оказывала лечебного эффекта. В настоящее время высказывается предположение о более широком участии В₁₂-коферментов в ферментативных реакциях трансметилирования, дезаминирования (например, этаноламиндезаминазная реакция) и др. Предстоит, однако, приложить немало усилий, чтобы выяснить конкретный механизм действия витамина В₁₂ на процесс кроветворения. Положительный эффект при лечении пернициозной анемии полусырой печенью обусловлен, как стало известно, наличием витамина В₁₂; хотя следует указать, что большего лечебного эффекта можно добиться при одновременном введении внутреннего фактора слизистой желудка.

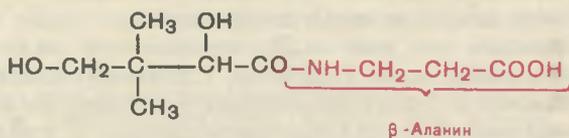
Распространение в природе и суточная потребность

Витамин В₁₂ является единственным витамином, синтез которого осуществляется исключительно микроорганизмами; ни растения, ни ткани животных этой способностью не обладают. Основные источники витамина В₁₂ для человека — мясо, говяжья печень, почки, рыба, молоко, яйца. Главным местом накопления витамина В₁₂ в организме человека является печень, в которой содержится до нескольких миллиграммов витамина; в печень он поступает из пищи или может синтезироваться микрофлорой кишечника при условии доставки с пищей кобальта. Суточная потребность в витамине В₁₂ для взрослого человека составляет 0,003 мг.

Пантотеновая кислота (витамин В₃)

Этот витамин впервые был открыт в 1933 г. Р. Уильямсом и соавт. в составе «биоса» — группы веществ природного происхождения, стимулирующих рост дрожжей. Он оказался чрезвычайно широко распространенным во всех живых объектах (микроорганизмы, растения, ткани животных), в связи с чем было предложено название пантотеновая кислота (от греч. pantoten — повсюду). В 1938 г. эти же авторы выделили ее из дрожжей и печени в высокоочищенном состоянии в форме кристаллической кальциевой соли, а в 1940 г. была расшифрована ее структура, подтвержденная химическим синтезом.

В химическом отношении пантотеновая кислота является комплексным соединением β-аланина и 2,4-диокси-3,3-диметилмасляной кислоты:



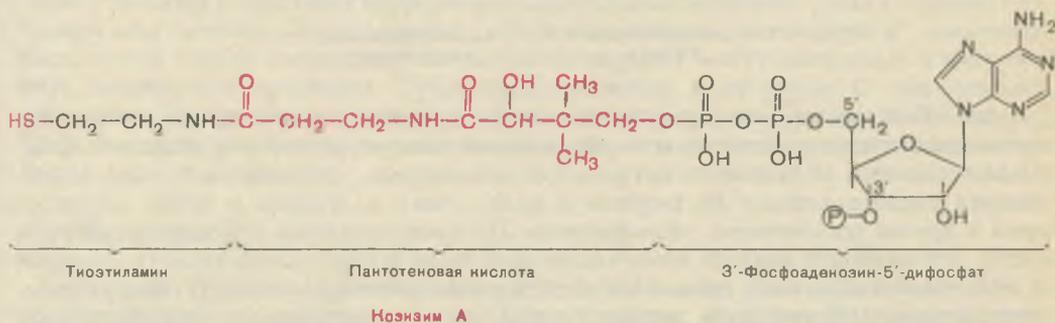
Пантотеновая кислота

Пантотеновая кислота представляет собой вязкую светло-желтую жидкость, хорошо растворимую в воде; она малоустойчива и легко гидролизуется по месту пептидной связи под действием слабых кислот и щелочей.

При недостаточности или отсутствии пантотеновой кислоты у человека и животных развиваются дерматиты, поражения слизистых оболочек, дистрофические изменения желез внутренней секреции (в частности, надпочечников) и нервной системы (невриты, параличи), изменения в сердце и почках, депигментация волос, шерсти, прекращение роста, потеря аппетита, истощение, алопеция. Все это многообразие клинических проявлений пантотеновой недостаточности свидетельствует об исключительно важной биологической роли ее в метаболизме.

Биологическая роль. Пантотеновая кислота входит в состав кофермента или коэнзима А (КоА). Название «коэнзим А» (кофермент ацилирования) связано с тем, что это соединение участвует в ферментативных реакциях, катализирующих как активирование, так и перенос ацетильного радикала — CH_3CO ; позже оказалось, что КоА активирует и переносит также другие кислотные остатки (ацилы). В результате образования ацил-КоА происходит активация карбоновой кислоты, которая поднимается на более высокий энергетический уровень, создающий выгодные термодинамические предпосылки для ее использования в реакциях, протекающих с потреблением энергии.

Строение КоА расшифровал Ф. Линен. В основе его структуры лежит остаток 3'-фосфоаденозин-5'-дифосфата, соединенный с остатком пантотеновой кислоты, карбонильная группа которой в свою очередь связана с остатком тиозиламина.



Поскольку реакционноспособным участком молекулы КоА в биохимических реакциях является SH-группа, было принято сокращенное обозначение КоА в виде SH-КоА. О важнейшем значении КоА в обмене веществ свидетельствует обязательное непосредственное участие его в основных биохимических процессах, окисление и биосинтез высших жирных кислот, окислительное декарбоксилирование α -кетокислот (пируват, α -кетоглутарат), биосинтез нейтральных жиров, фосфолипидов, стероидных гормонов, гема гемоглобина, ацетилхолина, гиппуровой кислоты и др.

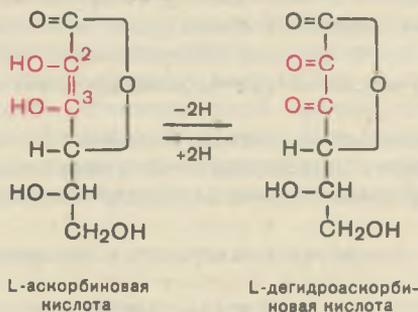
Распространение в природе и суточная потребность

Выше было указано на широкое, повсеместное распространение пантотеновой кислоты в природе. Основными пищевыми источниками ее для человека являются печень, яичный желток, дрожжи и зеленые части растений. Пантотеновая кислота синтезируется, кроме того, микрофлорой кишечника. Суточная потребность в пантотеновой кислоте для взрослого человека составляет 3–5 мг.

Витамин С

Витамин С (аскорбиновая кислота, антискорбутный витамин) получил название антискорбутного, антицинготного фактора, предохраняющего от развития цинги — болезни, принимавшей в средние века характер эпидемии. Причину болезни долго не могли распознать, и только в 1907—1912 гг. были получены неоспаримые экспериментальные доказательства (на морских свинках, также подверженных, подобно людям, заболеванию цингой) прямой зависимости между развитием цинги и недостаточностью или отсутствием в пище витамина С.

По химической структуре аскорбиновая кислота представляет собой лактон кислоты со структурой, близкой структуре L-глюкозы; окончательно строение витамина С было установлено после синтеза его из L-ксилозы. Аскорбиновая кислота является сильной кислотой; кислый характер ее обусловлен наличием двух обратимо диссоциирующих енольных гидроксиллов у 2-го и 3-го углеродных атомов.



Аскорбиновая кислота содержит два асимметричных атома углерода в 4-м и 5-м положениях, что дает возможность образования четырех оптических изомеров. Природные изомеры, обладающие витаминной активностью, относятся к L-ряду. Аскорбиновая кислота хорошо растворима в воде, хуже — в этаноле и почти нерастворима в других органических растворителях. Из представленных структурных формул видно, что наиболее важным химическим свойством аскорбиновой кислоты является ее способность обратимо окисляться в дегидроаскорбиновую кислоту, образуя окислительно-восстановительную систему, связанную с отщеплением и присоединением электронов и протонов. Окисление может быть вызвано различными факторами, в частности кислородом воздуха, метиленовым синим, перекисью водорода и др. Этот процесс, как правило, не сопровождается снижением витаминной активности. Дегидроаскорбиновая кислота, однако, является менее стойким соединением и в слабощелочной и даже в нейтральной средах подвергается превращению в дикетогулоновую кислоту, лишенную биологической активности. Поэтому при кулинарной обработке пищи в присутствии окислителей часть витамина С разрушается.

Аскорбиновая кислота оказалась необходимым пищевым фактором для человека, обезьян и морских свинок. Все другие животные не нуждаются в пищевом витамине С, поскольку он легко синтезируется в печени из углеводов. Наиболее характерным признаком недостаточности витамина С является потеря организмом способности депонировать межклеточные «цементирующие» вещества, что вызывает поражения сосудистых стенок и опорных тканей. У морских свинок, например, некоторые специализированные, высокодифференцированные клетки (фибробласты, остеобласты, одонтобласты) теряют способность синтезировать коллаген в кости и дентине зуба. Нарушено, кроме того, образование гликопротеингликанов, отмечены геморрагические явления и специфические изменения костной и хрящевой тканей.

У человека при недостаточности витамина С также отмечают потерю массы тела, общая слабость, одышка, боли в сердце, сердцебиение. При цинге в первую

ными о положительном влиянии Р-витаминных препаратов, как и аскорбиновой кислоты, на профилактику и лечение цинги, ревматизма, ожогов и др. Эти данные указывают на тесную функциональную связь витаминов С и Р в окислительно-восстановительных процессах организма, образующих единую систему; об этом косвенно свидетельствует лечебный эффект, оказываемый комплексом витамина С и биофлавоноидов, названным аскорудином.

Основными источниками витамина Р для взрослого человека являются те же растительные продукты питания (в частности, овощи и фрукты), в которых содержится много витамина С. Витаминная промышленность выпускает ряд препаратов с Р-витаминной активностью: чайные катехины, рутин, кверцетин, гесперидин, нарингин и др. Суточная потребность в витамине Р не установлена.

ВИТАМИНОПОДОБНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Парааминобензойная кислота

История открытия и изучения парааминобензойной кислоты как необходимого фактора размножения микроорганизмов тесно связана с развитием химиотерапии, в частности с началом практического применения сульфаниламидных препаратов. Ростстимулирующий фактор был выделен из экстрактов дрожжей в чистом виде и идентифицирован с парааминобензойной кислотой следующего строения:

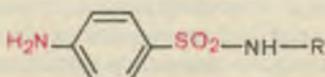


п-Аминобензойная кислота

Выше было указано, что витаминные свойства парааминобензойной кислоты связаны, по-видимому, с тем, что она входит в состав молекулы фолиевой кислоты. Парааминобензойная кислота представляет собой кристаллическое вещество, плохо растворимое в воде, хорошо — в спирте и эфире. Химически стойкая, она не разрушается при автоклавировании, выдерживает кипячение в кислой и щелочной средах. В парааминобензойной кислоте нуждаются, кроме микроорганизмов (хотя некоторые из них, например микобактерии туберкулеза, способны сами синтезировать ее), также животные. Доказано, что парааминобензойная кислота необходима для нормального процесса пигментации волос, шерсти, перьев и кожи. Показано также активирующее влияние этого витамина на действие тирозиназы — ключевого фермента при биосинтезе меланинов кожи, определяющих ее нормальную окраску.

В медицине широко используются структурные аналоги парааминобензойной кислоты, в частности сульфаниламиды, обладающие антибактериальными свойствами. Предполагается, что сульфаниламидные препараты вследствие структурного сходства¹ могут конкурентно замещать парааминобензойную кислоту в ферментных системах микроорганизмов с последующей остановкой их роста и размножения. Коферментные функции этой кислоты не установлены, но, являясь составной частью коферментов фолиевой кислоты, парааминобензойная кислота тем самым участвует во многих процессах обмена.

¹ Общий тип строения сульфаниламидных препаратов можно представить в следующем виде:

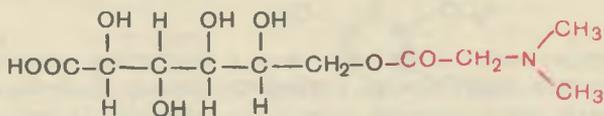


Источниками парааминобензойной кислоты для человека являются печень, почки, мясо, дрожжи; меньше ее содержится в молоке, куриных яйцах, картофеле, хлебе, шпинате, моркови.

Витамин В₁₅

Витамин В₁₅ (пангамовая кислота) впервые обнаружен в 1950 г. в экстрактах печени быка; позже он был выделен из многих семян растений, откуда и произошло его название (от греч. pan — всюду, gami — семя). Ни авитаминоз, ни гипервитаминоз В₁₅ у человека не описаны, хотя препараты его применяются в медицине при некоторых заболеваниях, связанных с нарушениями процесса обмена (в частности, реакций трансметилирования). Препараты пангамовой кислоты дают хороший лечебный эффект при жировом перерождении печени и некоторых формах кислородного голодания.

С химической точки зрения пангамовая кислота представлена эфиром глюконовой кислоты и диметилглицина:



Пангамовая кислота

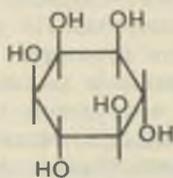
Биологическая роль витамина В₁₅ изучена недостаточно. Имеются указания об участии его в биосинтезе холина, метионина и креатина как источника метильных групп.

Пищевыми источниками витамина В₁₅ для человека являются печень, семена растений, дрожжи и др. Суточная потребность в нем для человека не установлена.

Инозит

В опытах на мышах было показано, что при отсутствии в пище этого водорастворимого фактора, помимо остановки роста, отмечаются своеобразная потеря шерстного покрова и жировая инфильтрация печени с отложением холестерина. Добавление в пищу животных экстрактов из печени устраняло эти явления. Вещество, оказывающее лечебное действие, было названо фактором против алопеции и позже идентифицировано с фосфорным эфиром инозита; витаминными свойствами обладает также фитин — соль инозитфосфорной кислоты.

Инозит представляет собой циклический шестиатомный спирт циклогексана:



Инозит

Инозит обнаружен в липидах мозга. Биологическая роль инозита, вероятнее всего, связана с обменом фосфоглицеридов. Этим объясняется его липотропный эффект, т. е. тормозящее действие на развитие дистрофии печени у животных, находящихся на безбелковой диете, и у человека при злокачественных новообразованиях. Необходимость инозита как незаменимого пищевого фактора для крыс и мышей, как и специфическое липотропное действие, хотя и продемонстрированы

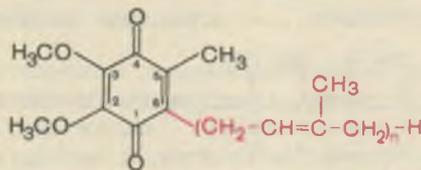
довольно убедительно, однако его витаминные свойства для других животных и человека нельзя считать окончательно установленными.

Инозит довольно широко распространен в природе. Много его в печени, мясе, молоке, хлебе из муки грубого помола, овощах и фруктах.

Коэнзим Q (убихинон)

Коэнзим (или кофермент Q, КоQ) относится к чрезвычайно широко распространенным коферментам; отсюда его второе название «убихинон» («вездесущий хинон»). И действительно, убихинон был открыт во всех живых клетках — растений, животных, грибов, микроорганизмов. Внутри клеток убихинон локализован, по-видимому, исключительно в митохондриях или аналогичных им мембранных структурах бактерий.

По химической природе убихинон представляет собой 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон с изопреновой цепью в 6-м положении.



Убихинон

Число остатков изопрена в боковой цепи убихинона из разных источников варьирует от 6 до 10, что обозначается: КоQ₆ или КоQ₇ и т. д. В митохондриях клеток человека и животных встречается убихинон только с 10 изопреновыми звеньями. Как и близкие к нему по структуре витамины К и Е, убихинон нерастворим в воде. В хлоропластах растений было открыто близкое к убихинону соединение плаستيхинон, который отличается строением бензольного кольца, где вместо двух метоксильных остатков содержится две метильные группы и отсутствует СН₃-группа у 5-го углеродного атома.

К настоящему времени выяснена основная коферментная роль КоQ₁₀. Он оказался обязательным компонентом дыхательной цепи (см. главу 8), осуществляя в митохондриях перенос электронов от мембранных дегидрогеназ (в частности, НАДН-дегидрогеназы дыхательной цепи, СДГ и т. д.) на цитохромы. Таким образом, если никотинамидные коферменты переносят водород между водорастворимыми ферментами, то КоQ₁₀ благодаря своей растворимости в жирах осуществляет такой перенос в гидрофобной митохондриальной мембране. Плаستيхиноны выполняют аналогичную функцию переносчиков при транспорте электронов в процессе фотосинтеза.

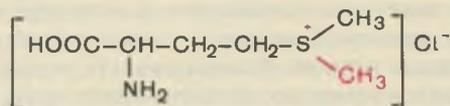
В организме человека КоQ может синтезироваться из мевалоновой кислоты и продуктов обмена фенилаланина и тирозина. По этой причине КоQ нельзя отнести к классическим витаминам, однако при некоторых патологических состояниях, развивающихся как следствие неполноценности питания, КоQ становится незаменимым фактором. Так, например, у детей, получавших с пищей недостаточное количество белка, развивается анемия, не поддающаяся лечению известными средствами (витамин В₁₂, фолиевая кислота и др.). В этих случаях препараты КоQ дают хорошие результаты. КоQ оказался также эффективным средством при лечении мышечной дистрофии (в том числе генетической ее формы) и сердечной недостаточности.

Витамин U

Витамин U (S-метилметионин, противоязвенный фактор) был впервые обнаружен в 1950 г. в сырых овощах, парном молоке и печени. Поскольку сок сырых овощей (например, капусты) предотвращал или задерживал у цыплят развитие язвы

желудка, индуцированной введением алкалоида цинкофена, было высказано предположение, что язвенная болезнь вызывается недостатком особого пищевого фактора, содержащегося в овощах и относящегося, очевидно, к витаминам. Активное начало было предложено называть витамином U (от лат. *ulcus* — язва). В настоящее время витамин U выделен из капустного сока в кристаллическом виде; осуществлен также его химический синтез. Препарат оказался в 1000 раз более активным при лечении язвенной болезни, чем исходный капустный сок; уже через 2–3 дня после приема его значительно ослабевают боли, а через 15–20 дней рентгенологически почти не обнаруживаются органические изменения слизистой оболочки желудка.

Витамин U оказался по своей химической природе S-метилметионином:



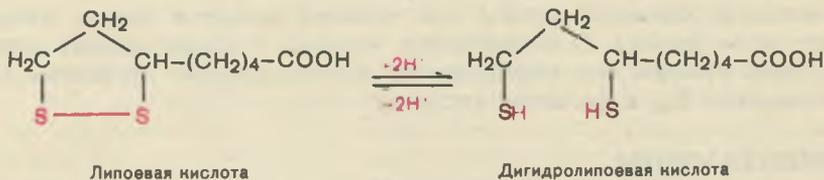
Витамин U (метилметионинсульфония хлорид)

Витамин U хорошо растворим в воде; при 100°C легко разрушается, особенно в нейтральной и щелочной средах; устойчив в кислой среде. Относительно биологической роли витамина U известно, что у крыс он полностью заменяет потребности в метионине (как незаменимой аминокислоте); показано его участие в синтезе метионина, холина и креатина; бактерии используют его также в качестве донора метильных групп.

Источниками витамина U для человека являются свежая капуста, зелень петрушки и репы, морковь, лук, перец, зеленый чай, бананы, фрукты, сырое молоко и др.

Липоевая кислота

В 50-е годы в дрожжах и ткани печени был открыт фактор роста молочно-кислых бактерий, не относящийся ни к одному из известных витаминов; некоторые виды стрептококков также нуждались в нем как в факторе роста. В кристаллическом виде этот фактор был идентифицирован с α-липоевой (1,2-дитиолан-3-валериановой) кислотой:

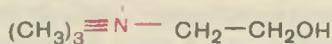


Как видно из этих формул, липоевая кислота может существовать в окисленной (—S—S—) и восстановленной (SH-) формах, благодаря чему реализуются ее коферментные функции. В частности, липоевая кислота играет незаменимую роль в окислении и переносе ацильных групп в составе многокомпонентных ферментных систем. Основная функция ее — прямое участие в окислительном декарбоксилировании в тканях α-кетокислот (пировиноградной и α-кетоглутаровой кислот, см. главу 9). Липоевая кислота служит протетической группой наряду с тиаминпирофосфатом и КоА сложной мультиферментной пируват- и кетоглутарат-дегидрогеназной систем. Однако до сих пор отсутствуют точные сведения о механизмах биосинтеза липоевой кислоты не только в тканях животных, но и в растениях и у микроорганизмов.

Холин

Впервые холин был выделен А. Стрекером из желчи в 1892 г. и тогда же получил свое название. Однако биологическая роль холина стала известна значительно позже, когда было показано, что холин является структурным компонентом более сложного органического фосфорсодержащего соединения — фосфатидилхолина, или лецитина (см. главу 10), открытого в яичном желтке и ткани мозга. Было доказано, что особая роль лецитина как пищевого фактора обусловлена холином, а не фосфорсодержащим его компонентом. Последующие опыты показали, что исключение холина из диеты животных приводит к ожирению печени. Добавление его к пище, наоборот, способствует рассасыванию этого жира. Дальнейшие исследования показали, что холин в организме человека и животных синтезируется в достаточных количествах и не может быть истинным пищевым фактором, однако в определенных условиях, например при недостатке белка в пище, развивается вторичная холиновая недостаточность. Вследствие указанных причин холин был отнесен к группе витаминоподобных веществ, или «частичных витаминов».

По структуре холин представляет собой аминоэтиловый спирт, содержащий у атома азота три метильные группы:



Холин

Хорошо растворим в воде и спирте. В организме животных синтезируется не свободный холин, а холин в составе фосфолипидов. Донорами метильных групп являются метионин (в составе S-аденозилметионина) или серин и глицин (при синтезе метильных групп). Вследствие этого при белковой недостаточности (которая в свою очередь может быть связана с дефицитом белка в пище или эндогенного происхождения) развиваются симптомы холиновой недостаточности: жировая инфильтрация печени, геморрагическая дистрофия почек, нарушение процесса свертывания крови (нарушение синтеза V фактора свертывания — акцелерина) и др.

Имеющиеся сведения о механизме действия холина свидетельствуют, что он является прежде всего составной частью биологически активного ацетилхолина — медиатора нервного импульса; кроме того, холин принимает участие в реакциях трансметилирования при биосинтезе метионина, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, фосфолипидов и т. д.

Основными источниками холина для человека являются печень, почки, мясо, рыбные продукты, капуста. О потребностях человека в холине точных данных нет. В значительной степени они определяются обеспеченностью организма пищевым белком, витамином B₁₂ и фолиевой кислотой.

АНТИВИТАМИНЫ

В настоящее время антивитамины принято делить на две группы: 1) антивитамины, имеющие структуру, сходную со строением нативного витамина, и оказывающие действие, основанное на конкурентных взаимоотношениях с ним; 2) антивитамины, вызывающие модификацию химической природы витаминов или затрудняющие их всасывание, транспорт, что сопровождается снижением или потерей биологического эффекта витаминов. Таким образом, термином «антивитамины» обозначаются любые вещества, вызывающие независимо от механизма их действия снижение или полную потерю биологической активности витаминов.

Структуроподобные антивитамины по существу представляют собой антиметаболиты и при взаимодействии с апоферментом образуют неактивный ферментный комплекс со всеми вытекающими отсюда последствиями.

Помимо структуроподобных аналогов витаминов, введение которых обуславливает развитие истинных авитаминозов, различают антивитамины биологического происхождения, в том числе ферменты и белки, вызывающие расщепление или связывание молекул витаминов, лишая их физиологического действия. К ним относятся, например, тиаминазы I и II, вызывающие распад молекулы витамина В₁, аскорбатоксидаза, катализирующая разрушение витамина С, белок авидин, связывающий биотин в биологически неактивный комплекс.

Большинство этих антивитаминов применяются как лечебные средства со строго направленным действием на некоторые биохимические и физиологические процессы. В частности, из антивитаминов жирорастворимых витаминов используются дикумарол, варфарин и тромексан (антагонисты витамина К) в качестве антисвертывающих препаратов. Хорошо изученными антивитаминами тиамина являются окситиамин, пири- и неопиритиамин, рибофлавина — атербин, акрихин, галактофлавин, изорибофлавин (все они конкурируют с витамином В₂ при биосинтезе коферментов ФАД и ФМН), пиридоксина — дезоксипиридоксин, циклосерин, изониазид, оказывающий антибактериальное действие на микробактерии туберкулеза. Антивитаминами фолиевой кислоты являются амино- и аметоптерины, витамина В₁₂ — производные 2-аминометилпропанол-В₁₂, никотиновой кислоты — изониазид и 3-ацетилпиридин, парааминобензойной кислоты — сульфаниламидные препараты; все они нашли широкое применение в качестве противоопухолевых или антибактериальных средств, тормозя синтез белка и нуклеиновых кислот в клетках.

Глава 6

ГОРМОНЫ

ОБЩЕЕ ПОНЯТИЕ О ГОРМОНАХ

Учение о гормонах выделено в самостоятельную науку — эндокринологию. Современная эндокринология изучает химическую структуру гормонов, образующихся в железах внутренней секреции, зависимость между структурой и функцией гормонов, механизмы их действия, физиологию и патологию эндокринной системы¹. Учреждены специализированные научно-исследовательские институты, лаборатории, научные журналы; созываются международные конференции, симпозиумы и конгрессы, посвященные проблемам эндокринологии. Эндокринология в наши дни превратилась в одну из самых бурно развивающихся разделов биологической науки. Она имеет свои цели и задачи, специфические методологические подходы и методы исследования. В нашей стране головным научным учреждением, объединяющим исследования по этим проблемам, является Всесоюзный эндокринологический научный центр АМН СССР.

Гормоны относятся к биологически активным веществам, определяющим в известной степени состояние физиологических функций целостного организма, макро- и микроструктуру органов и тканей и скорость протекания биохимических процессов. Таким образом, гормоны — вещества органической природы, вырабатывающиеся в специализированных клетках желез внутренней секреции, поступающие в кровь и оказывающие регулирующее влияние на обмен веществ и физиологические функции. В это определение необходимо внести соответствующие коррективы в связи с обнаружением типичных гормонов млекопитающих у одноклеточных (например, инсулина у микроорганизмов) или возможностью синтеза гормонов соматическими клетками в культуре ткани (например, лимфоцитами, под действием факторов роста).

Одной из удивительных особенностей живых организмов является их способность сохранять постоянство гомеостаза при помощи механизмов саморегуляции, в осуществлении (координации) которых одно из главных мест принадлежит гормонам. У высших животных координированное протекание всех биологических процессов не только в целостном организме, но и в микропространстве отдельной клетки и даже в отдельном субклеточном образовании (митохондрии, микросомы) определяется нейрогуморальными механизмами, сложившимися в процессе эволюции. При помощи этих механизмов организм воспринимает разнообразные изменения окружающей и внутренней среды, тонко регулируя интенсивность процессов обмена. В регуляции этих процессов, в осуществлении последовательности протекания множества реакций гормоны занимают промежуточное звено между нервной системой и действием ферментов, которые непосредственно регулируют скорость обмена веществ. Гормоны вызывают либо быструю (срочную) ответную реакцию, повышая активность имеющихся в тканях ферментов, либо, что более характерно, например для стероидных гормонов, медленную реакцию, связанную с синтезом ферментов *de novo*. Получены до-

¹ Исследования последних лет убеждают, что эндокринная система включает не только железы внутренней секреции, но и ряд других гормональных систем, которые вырабатывают гормоны и регулируются нейроэндокринной системой или действуют автономно.

казательства, что стероидные гормоны оказывают влияние на генетический аппарат клетки, вызывая синтез соответствующей мРНК, которая, поступив в рибосому, служит матрицей для синтеза молекулы фермента. Предполагается, что и другие гормоны (имеющие белковую природу) опосредованно через фосфорилирование негистоновых белков могут оказывать влияние на гены, контролируя тем самым скорость синтеза соответствующих ферментов. Таким образом, любые нарушения синтеза или распада гормонов, вызванные разнообразными причинными факторами, включая заболевания эндокринных желез (состояния гипо- или гиперфункции), приводят к изменению нормального синтеза ферментов и соответственно к нарушению метаболизма.

Зарождение науки об эндокринных железах и гормонах относится к 1855 г., когда Т. Аддисон впервые описал бронзовую болезнь, связанную с поражением надпочечников и сопровождающуюся специфической пигментацией кожных покровов. Клод Бернар ввел понятие о железах внутренней секреции, т. е. органах, выделяющих свой секрет непосредственно в кровь. Позже Ш. Броун-Секар показал, что недостаточность действия желез внутренней секреции приводит к развитию болезней и что экстракты, полученные из этих желез, оказывают хороший лечебный эффект. В настоящее время имеются бесспорные доказательства, что почти все заболевания желез внутренней секреции (тиреотоксикоз, сахарный диабет и др.) развиваются как результат нарушения молекулярных механизмов регуляции процессов обмена, вызванных недостаточным или, наоборот, избыточным синтезом соответствующих гормонов в организме человека.

Термин «гормон» (от греч. *hormao* – возбуждаю, побуждаю) был введен в 1905 г. У. Бейлиссом и Э. Старлингом при изучении открытого ими в 1902 г. гормона секретина, вырабатывающегося в двенадцатиперстной кишке и стимулирующего выработку сока поджелудочной железы и отделение желчи. К настоящему времени открыто более сотни различных веществ, наделенных гормональной активностью, синтезирующихся в железах внутренней секреции и регулирующих процессы обмена веществ. Специфические особенности биологического действия гормонов можно выразить следующими положениями: а) гормоны оказывают свое биологическое действие в ничтожно малых концентрациях (от 10^{-6} до 10^{-12} М); б) гормональный эффект реализуется через белковые рецепторы и внутриклеточные вторичные посредники (мессенджеры); в) не являясь ни ферментами, ни коферментами, гормоны в то же время осуществляют свое действие путем увеличения скорости синтеза ферментов *de novo* или путем изменения скорости ферментативного катализа; г) действие гормонов в целостном организме определяется в известной степени контролирующим влиянием ЦНС; д) железы внутренней секреции и продуцируемые ими гормоны составляют единую систему, тесно связанную при помощи механизмов прямой и обратной связи.

Под влиянием разнообразных внешних и внутренних раздражителей возникают импульсы в специализированных весьма чувствительных рецепторах. Импульсы затем поступают в ЦНС, отсюда в гипоталамус, где синтезируются первые биологически активные гормональные вещества, обладающие «дистантным» действием и называемые рилизинг-факторами. Особенностью рилизинг-факторов является то, что они не поступают в общий ток крови, а через поральную систему сосудов достигают специфических клеток гипофиза, оказывая стимулирующее (или тормозящее) действие на биосинтез и выделение тропных гормонов гипофиза, которые с током крови приносятся в соответствующую эндокринную железу, стимулируя выработку необходимого гормона. Этот гормон затем оказывает действие на органы и ткани, вызывая соответствующие химические и физиологические ответные реакции целостного организма. Наименее изученным до недавнего времени оставался последний этап этой своеобразной дуги – действие гормонов на внутриклеточный обмен. В настоящее время получены доказательства, что это действие осуществляется через так называемые гормональные рецепторы, под которыми понимаются химические структуры соответствующих тканей-мишеней, содержащие высокоспецифические участки (углевод-

ные фрагменты гликопротеинов и ганглиозидов) для связывания гормонов; результатом подобного связывания является инициация рецепторами специфических биохимических реакций, обеспечивающих реализацию конечного эффекта соответствующего гормона. Рецепторы гормонов белковой и пептидной природы расположены на наружной поверхности клетки (на плазматической мембране), в то время как рецепторы гормонов стероидной природы локализованы в цитоплазме и ядре. Общим признаком всех рецепторов независимо от локализации является наличие строгого пространственного и структурного соответствия между рецептором и соответствующим гормоном.

В понимании механизма биологического действия большинства гормонов белковой природы решающую роль сыграли исследования Э. Сазерленда и открытие циклического эфира аденозинмонофосфата, сокращенно обозначаемого 3',5'-цАМФ (или цАМФ); последний служит вторичным посредником в реализации гормонального эффекта внутри клетки-мишени. Существенная особенность гипотезы вторичного посредника (первичным считается сам гормон) заключается в допущении, что гормон не проникает в клетку и что его действие ограничивается взаимодействием на мембране со специфическим рецептором, вызывая активирование мембранно-связанного фермента — аденилатциклазы, которая катализирует образование цАМФ, и тем самым изменение скорости внутриклеточных процессов (образование цАМФ см. главу 3). Однако конкретный механизм активирования аденилатциклазы после образования гормон-рецепторного комплекса неясен¹. Известно только, что одна молекула связанного с рецептором гормона приводит к образованию около 500 молекул цАМФ (в покое концентрация цАМФ в клетке незначительна и составляет от 10^{-7} до 10^{-6} М). В свою очередь цАМФ реализует свой эффект через внутриклеточный фермент — протеинкиназу, которая может существовать в двух формах. В отсутствие цАМФ протеинкиназа представлена в виде комплекса, состоящего из двух каталитических (C_2) и двух регуляторных (R_2) субъединиц, с молекулярными массами 49 000 и 38 000 Да соответственно; в этой форме фермент не активен. В присутствии цАМФ протеинкиназный комплекс обратимо диссоциирует на одну R_2 -субъединицу и две свободные каталитические субъединицы; последние обладают ферментативной активностью, фосфорилируя и соответственно изменяя активность других белковых ферментов. Сказанное можно проиллюстрировать следующей схемой:



¹ Получены доказательства, что информация от рецептора гормона на аденилатциклазу переносится через особый регуляторный G-белок (он связывает гуаниннуклеотиды), встроенный в мембрану. Этот белок существует в двух формах: в комплексе с ГТФ он оказывает активирующее действие на аденилатциклазу; в комплексе с ГДФ, напротив, — ингибирующий эффект, причем сам белок наделен ГТФазной активностью. Активирование аденилатциклазы в ряде клеток требует не только присутствия G-белка в ГТФ-форме, но и наличия комплекса ионов Ca^{2+} с Са-связывающим белком, называемым кальмодулином (молекулярная масса 17 000 Да). С другой стороны, концентрация цАМФ контролируется фосфодиэстеразой, катализирующей гидролитический распад цАМФ до свободного и неактивного АМФ. В свою очередь активность фосфодиэстеразы определяется комплексом ионов Ca^{2+} с кальмодулином. Учитывая эти данные, а также тот факт, что ионы Ca^{2+} в цитоплазме контролируют множество функций клеток, они рассматриваются наряду с цАМФ как вторичные посредники.

Относительно общего механизма действия стероидных гормонов имеющиеся данные свидетельствуют о том, что их эффект реализуется через специфические цитоплазматические рецепторы — белки (с константой седиментации от 4S до 8S); стероид-белковые комплексы подвергаются далее транслокации при помощи специальных транспортных белков в клеточное ядро и связываются с хроматином (хроматин-связывающий центр включает, помимо ДНК, негистоновые белки). Изменяя экспрессию генов ДНК, эти ядерно-стероидные комплексы оказывают влияние на синтез специфической мРНК; синтез новой или дополнительной молекулы мРНК сопровождается индукцией синтеза соответствующего белка *de novo*.

Таким образом, главное отличие в механизме действия двух классов гормонов (см. ниже классификацию) заключается в том, что действие пептидных гормонов и производных аминокислот в основном направлено на постсинтетические (посттрансляционные) события в клетках, в то время как стероидные гормоны (и возможно инсулин и тироксин) действуют на геном, изменяя транскрипцию генов. Это обобщение, однако, не является абсолютным и здесь возможны разные модификации, описанные ниже при рассмотрении отдельных гормонов.

НОМЕНКЛАТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ ГОРМОНОВ

Химическая природа почти всех известных гормонов выяснена в деталях (включая первичную структуру белковых и пептидных гормонов), однако до настоящего времени не разработаны общие принципы их номенклатуры. Поскольку химические наименования многих гормонов, основанные на их точной химической структуре, были бы очень громоздкими, более распространены тривиальные названия гормонов. Принятая номенклатура указывает на источник гормона (например, инсулин от лат. *insula* — островок) или отражает его функцию (например, пролактин, вазопрессин). Для некоторых гормонов гипофиза (лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов), а также для всех гипоталамических гормонов разработаны новые рабочие названия.

Аналогичное положение существует и в отношении классификации гормонов. Во-первых, гормоны классифицируют в зависимости от места их природного синтеза, в соответствии с которым различают гормоны гипоталамуса, гипофиза, щитовидной железы, надпочечников, поджелудочной железы, половых желез, зубной железы и др. Однако подобная анатомическая классификация недостаточно совершенна, поскольку некоторые гормоны или синтезируются не в тех железах внутренней секреции, из которых они секретируются в кровь (например, гормоны задней доли гипофиза, вазопрессин и окситоцин синтезируются в гипоталамусе, откуда переносятся в заднюю долю гипофиза), или синтезируются и в других железах (например, частичный синтез половых гормонов имеет место в коре надпочечников, синтез простагландинов происходит не только в предстательной железе, но и в других органах) и т. д. С учетом этих обстоятельств были предприняты попытки создания классификации гормонов, основанной на их химической природе. Наиболее приемлемой следует, очевидно, признать классификацию Н. А. Юдаева. В соответствии с этой классификацией все гормоны делят на пять групп.

1. Сложные белки — гликопротеины; к ним относятся: фолликулостимулирующий, лютеинизирующий, тиреотропный гормоны и др.

2. Простые белки: пролактин, соматотропный гормон (соматотропин, гормон роста), инсулин и др.

3. Пептиды: кортикотропин (АКТГ), глюкагон, кальцитонин, соматостатин, вазопрессин, окситоцин и др.

4. Производные аминокислот: катехоламины, тиреоидные гормоны, мелатонин и др.

5. Стероидные соединения и производные жирных кислот (простагландины). Стероиды составляют большую группу гормональных веществ; к ним относятся гормоны

коры надпочечников (кортикостероиды), половые гормоны (андрогены и эстрогены), 1,25-диоксихолекальциферол и др.

Нетрудно видеть, что первые три группы гормонов могут быть объединены в одну общую группу пептидных и белковых гормонов.

Таким образом, ниже будут рассмотрены химическое строение, функции, механизм действия и пути биосинтеза и распада основных групп гормонов, подразделяющихся в соответствии с классификацией, в основе которой лежит химическая природа гормонов.

ПЕПТИДНЫЕ И БЕЛКОВЫЕ ГОРМОНЫ

ГОРМОНЫ ГИПОТАЛАМУСА

Гипоталамус служит местом непосредственного взаимодействия высших отделов ЦНС и эндокринной системы. Природа связей, существующих между ЦНС и эндокринной системой, стала выясняться в последние десятилетия, когда из гипоталамуса были выделены первые гуморальные факторы, оказавшиеся гормональными веществами с чрезвычайно высокой биологической активностью. Потребовалось немало труда и экспериментального мастерства для того, чтобы доказать, что эти вещества¹ образуются в нервных клетках гипоталамуса, откуда по системе портальных капилляров достигают гипофиза, регулируя секрецию гипофизарных гормонов, точнее их освобождение (и, возможно, биосинтез); эти вещества получили наименование сначала нейрогормонов, а затем релизинг-факторов (от англ. release — освобождать), или л и б е р и н о в; вещества с противоположным действием, т. е. угнетающие освобождение (и, возможно, биосинтез) гипофизарных гормонов, получили название ингибирующих факторов, или с т а т и н о в. Таким образом, гормонам гипоталамуса принадлежит ключевая роль в физиологической системе гормональной регуляции многосторонних биологических функций отдельных органов, тканей и целостного организма.

К настоящему времени в гипоталамусе открыто семь стимуляторов (либерины) и три ингибитора (статины) секреции гормонов гипофиза, а именно: кортиколиберин, тиреолиберин², люлиберин, фоллилиберин, соматолиберин, пролактолиберин, меланолиберин, соматостатин, пролактостатин и меланостатин. В чистом виде выделены пять гормонов, для которых установлена пептидная структура, подтвержденная химическим синтезом.

Большие трудности при получении гормонов гипоталамуса в чистом виде объясняются чрезвычайно низким содержанием их в исходной ткани. Так, для выделения всего 1 мг тиреолиберина потребовалось переработать 7 т гипоталамусов, полученных от 5 млн овец.

Следует отметить, что не все гормоны гипоталамуса, по-видимому, строго специфичны в отношении одного какого-либо гипофизарного гормона. В частности, для тиреолиберина показана способность освобождать, помимо тиреотропина, также пролактин, а для люлиберина, помимо лютеинизирующего гормона, — также фолликулостимулирующий.

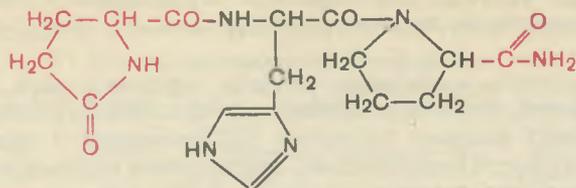
Относительно химического строения гормонов гипоталамуса установлено, что все они являются низкомолекулярными пептидами, так называемыми олигопептидами необычного строения, хотя точный аминокислотный состав и первичная структура

¹ Впервые Р. Гиймену и Э. Шалли удалось в начале 70-х годов выделить из ткани гипоталамуса вещества, которые оказывали регулирующее действие на функцию гипофиза. Эти авторы за открытие так называемых сверхгормонов совместно с Р. Ялоу, разработавшей радиоиммунологический метод определения пептидных гормонов, были удостоены в 1977 г. Нобелевской премии.

² Здесь и далее в названиях препаратов щитовидной железы употребим также корень тиро-

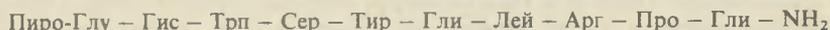
выяснены не для всех. Ниже представлены полученные к настоящему времени данные о химической природе шести из известных десяти гормонов гипоталамуса.

1. **Тиреолиберин** (Пиро-Глу – Гис – Про – NH₂):



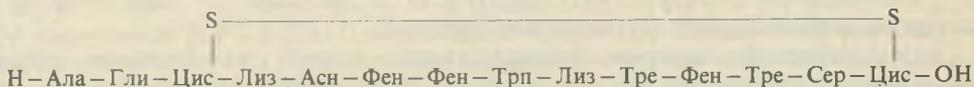
Тиреолиберин представлен трипептидом, состоящим из пироглутаминовой (циклической) кислоты, гистидина и пролинамида, соединенных пептидными связями; в отличие от классических пептидов он не содержит свободных NH₂- и COOH-групп у N- и C-концевых аминокислот.

2. **Люлиберин** является декапептидом, состоящим из 10 аминокислот в последовательности:



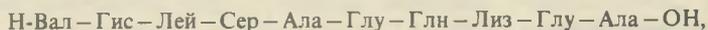
Концевая С-аминокислота представлена глицинамидом.

3. **Соматостатин** является циклическим тетрадекапептидом (состоящим из 14 аминокислотных остатков)¹:



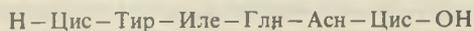
Отличается этот гормон от двух предыдущих, помимо циклической структуры, тем, что не содержит на N-конце пироглутаминовой кислоты; дисульфидная связь образуется между двумя остатками цистеина в 3-м и 14-м положениях. Следует отметить, что синтетический линейный аналог соматостатина также наделен аналогичной биологической активностью, что свидетельствует о несущественности дисульфидного мостика природного гормона. Помимо гипоталамуса, соматостатин обнаружен в других отделах головного мозга, а также в поджелудочной железе, клетках кишечника; он обладает широким спектром биологического действия, в частности показано прямое действие его на клеточные элементы панкреатических островков (островков Лангерганса) и аденогипофиза.

4. **Соматолиберин** из природных источников не выделен, однако осуществлен химический синтез декапептида:



который стимулировал синтез и секрецию гормона роста гипофиза (соматотропина).

5. **Меланолиберин** по своей химической структуре оказался аналогичен структуре открытого кольца гормона окситоцина (без трипептидной боковой цепи) следующего строения:



6. **Меланостатин** (меланотропинингибирующий фактор) представлен или трипептидом – Пиро-Глу – Лей – Гли – NH₂, или пентапептидом следующей последовательности: Пиро-Глу – Гис – Фен – Арг – Гли – NH₂. Следует отметить, что меланолиберин оказывает стимулирующее действие, а меланостатин, напротив, ингибирующее действие на синтез и секрецию меланотропина в передней доле гипофиза.

¹ В написании аминокислотных последовательностей полипептидов в настоящее время принято обозначать N-конец символом Н, а С-конец – ОН.

Помимо перечисленных гипоталамических гормонов, интенсивно изучалась химическая природа другого гормона — кортиколиберина. Активные препараты его были выделены как из ткани гипоталамуса, так и из задней доли гипофиза; существует мнение, что последняя может служить депо гормонов вазопрессина и окситоцина. Предполагается, что кортиколиберин является полипептидом, но точная его структура пока не выяснена.

Местом синтеза гипоталамических гормонов, вероятнее всего, являются нервные окончания гипоталамуса, поскольку именно там отмечена наибольшая концентрация гормонов и биогенных аминов; последние рассматриваются наряду с гормонами периферических желез внутренней секреции, действующих по принципу обратной связи, в качестве основных регуляторов секреции и синтеза гормонов гипоталамуса. Механизм биосинтеза тиреолиберина, осуществляющегося скорее всего нерибосомальным путем, включает участие SH-содержащей синтетазы или комплекса ферментов, катализирующих циклизацию глутаминовой кислоты в пироглутаминовую, образование пептидной связи и амидирование пролина в присутствии глутамината. Существование подобного механизма биосинтеза с участием соответствующих синтетаз допускается также в отношении люлиберина и соматолиберина.

Пути инактивации гормонов гипоталамуса изучены недостаточно. Период полураспада тиреолиберина в крови крысы составляет 4 мин. Инактивация наступает как при разрыве пептидной связи (под действием экзо- и эндопептидаз сыворотки крови крысы и человека), так и при отщеплении амидной группы в молекуле пролинамида. В гипоталамусе человека и ряда животных открыт, кроме того, специфический фермент — пироглутамилпептидаза, катализирующая отщепление от тиреолиберина и люлиберина молекулы пироглутаминовой кислоты.

Гипоталамические гормоны непосредственно влияют на секрецию (точнее, освобождение) «готовых» гормонов и биосинтез этих гормонов *de novo*. Доказано, что цАМФ участвует в передаче гормонального сигнала. Показано существование в плазматических мембранах клеток гипофиза специфических аденогипофизарных рецепторов, с которыми связываются гормоны гипоталамуса, после чего через систему аденилатциклазы и мембранных комплексов $\text{Ca}^{2+} - \text{АТФ}$ и $\text{Mg}^{2+} - \text{АТФ}$ освобождаются ионы Ca^{2+} и цАМФ; последний действует как на освобождение, так и на синтез соответствующего гормона гипофиза путем активирования соответствующей протеинкиназы.

Для выяснения механизма действия релизинг-факторов, включая их взаимодействие с соответствующими рецепторами, большую роль сыграли структурные аналоги тиреолиберина и люлиберина; некоторые из них обладают даже более высокой гормональной активностью и пролонгированным действием, чем природные гормоны гипоталамуса. Однако предстоит еще большая работа по выяснению химического строения уже открытых релизинг-факторов и расшифровке механизма их действия.

Гормоны гипофиза

В гипофизе синтезируется ряд биологически активных гормонов белковой и пептидной природы. В зависимости от места синтеза различают гормоны передней, задней и промежуточной долей гипофиза. В передней доле вырабатываются в основном белковые и полипептидные гормоны, называемые тропными гормонами (или тропинами) вследствие их стимулирующего действия на ряд других эндокринных желез. В частности, гормон, стимулирующий секрецию гормонов щитовидной железы, получил название тиреотропин. В табл. 6.1 суммированы данные, касающиеся принятых названий гормонов передней и задней долей гипофиза, их молекулярной массы и основных синдромов, развивающихся при недостаточной или избыточной продукции гормона.

В последние годы из ткани мозга животных было выделено более 50 пептидов, получивших название нейропептидов и определяющих в известной степени поведенческие реакции. Показано, что эти вещества влияют на некоторые формы поведения, процессы обучения и запоминания, регулируют сон и снимают, подобно морфину, боль.

Таблица 6.1. Гормоны гипофиза и основные клинические синдромы, развивающиеся при нарушении их секреции

Гормон	Молекулярная масса, Да	Избыток	Недостаточность
<i>Гормоны передней доли гипофиза</i>			
Гормон роста (соматотропин)	21 500	Акромегалия (чрезмерный рост)	Карликовость (низкорослость)
Кортикотропин (АКТГ)	4500	Синдром Иценко – Кушинга	Вторичная гипофункция коры надпочечников
Тиреотропин	28 000	Гипертиреоз	Вторичный гипотиреоз
Пролактин	23 500	Аменорея; бесплодие, галакторея	Отсутствие лактации
Фолликулостимулирующий гормон (фоллитропин)	34 000	Преждевременное половое созревание	Вторичная гипофункция половых желез; бесплодие
Лютеинизирующий гормон (лютропин)	28 500	То же	То же
Липотропин	11 800	Истощение	Ожирение
<i>Гормоны задней доли гипофиза</i>			
Вазопрессин	1070	—	Несахарный диабет
Окситоцин	1070	—	—

Так, выделенный β-эндорфин (31 аминокислотный остаток с выясненной последовательностью) оказался почти в 30 раз активнее морфина в качестве обезболивающего средства. Ряд других пептидов оказывает снотворное действие, а 16-членный пептид, вызывающий у крыс страх перед темнотой, был назван скотофобинем. Выделен полипептид амелетин, который, наоборот, отучает крыс бояться резкого звука электрического звонка. Работы в этом направлении интенсивно ведутся во многих лабораториях и вполне возможно, что скоро будут выделены и соответственно синтезированы искусственно для каждой формы поведения соответствующие нейропептиды, включая пептиды памяти.

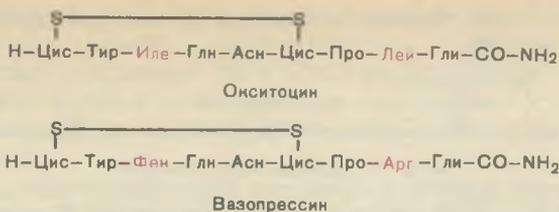
Ниже приводятся данные о структуре и функциях важнейших гормонов гипофиза и других желез внутренней секреции, имеющих белковую и пептидную природу.

Вазопрессин и окситоцин

К гормонам задней доли гипофиза вазопрессин и окситоцин относят условно, поскольку синтезируются они в особых нейронах гипоталамуса, откуда переносятся разными нейронами в заднюю долю гипофиза и поступают непосредственно в кровь.

Эти гормоны синтезируются рибосомальным путем, причем одновременно в гипоталамусе синтезируются три белка: н е й р о ф и з и н I, II, III, функция которых заключается в нековалентном связывании окситоцина и вазопрессина и транспорте этих гормонов в нейросекреторные гранулы гипоталамуса; в виде комплексов нейрофизин – гормон они далее мигрируют вдоль аксона и достигают задней доли гипофиза, где после диссоциации комплекса свободный гормон секретируется в кровь. Нейрофизины также выделены в чистом виде и выяснена первичная структура двух из них (92 и 97 аминокислотных остатков соответственно); это богатые цистеином белки, содержащие по 7 дисульфидных связей.

Химическое строение обоих гормонов было расшифровано классическими работами В. дю Виньо и соавт., впервые выделивших эти гормоны из задней доли гипофиза и осуществивших их химический синтез. Оба гормона представляют собой нонапептиды следующего строения:



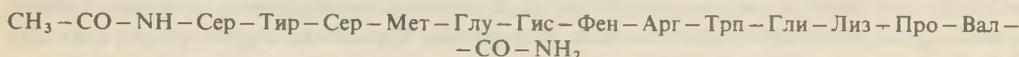
Вазопрессин отличается от окситоцина двумя аминокислотами: он содержит в положении 3 от N-конца фенилаланин вместо изолейцина и в положении 8 аргинин вместо лейцина. Указанная последовательность девяти аминокислот характерна для вазопрессина человека, обезьяны, лошади, крупного рогатого скота, овцы и собаки; в молекуле вазопрессина из гипофиза свиньи вместо аргинина в положении 8 содержится лизин, откуда и название «л и з и н - в а з о п р е с с и н». У всех позвоночных, за исключением млекопитающих, идентифицирован, кроме того, вазотоцин; этот гормон, состоящий из кольца с S—S мостиком окситоцина и боковой цепью вазопрессина, был синтезирован химически В. дю Виньо задолго до выделения природного гормона. Высказывается предположение, что эволюционно все нейрогипофизарные гормоны произошли от одного общего предшественника, а именно аргинин-вазотоцина, из которого путем одиночных мутаций триплетов генов образовались модифицированные гормоны.

Основной биологический эффект окситоцина у млекопитающих связан со стимуляцией сокращения гладкой мускулатуры матки при родах и сокращения мышечных волокон, расположенных вокруг альвеол молочных желез, вызывающего секрецию молока. Вазопрессин стимулирует сокращение гладкой мускулатуры сосудов, оказывая сильное вазопрессорное действие, однако основная роль его сводится к регуляции водного обмена. Вазопрессин оказывает в небольших концентрациях (0,2 нг на 1 кг массы тела) мощное антидиуретическое действие — стимулирует обратный ток воды через мембраны почечных канальцев. В норме он контролирует осмотическое давление плазмы крови и водный баланс организма человека. При патологии, в частности атрофии задней доли гипофиза, развивается несахарный диабет — заболевание, характеризующееся выделением чрезвычайно больших количеств жидкости с мочой. При этом нарушен обратный процесс всасывания воды в канальцах почек.

Относительно механизма действия нейрогипофизарных гормонов известно, что гормональные эффекты, в частности вазопрессина, реализуются через аденилатцикломальную систему. Однако конкретный механизм действия вазопрессина на транспорт воды в почках пока остается неясным.

Меланоцитстимулирующие гормоны (МСГ, меланотропины)

Меланотропины синтезируются и секретируются в кровь промежуточной долей гипофиза. Выделены и расшифрованы первичные структуры двух типов гормонов — α- и β-меланоцитстимулирующие гормоны (α-МСГ и β-МСГ). Оказалось, что у всех исследованных животных α-МСГ состоит из 13 аминокислот, расположенных в одинаковой последовательности:



Видно, что N-концевой серин ацетилирован, а C-концевая аминокислота представлена валинамидом.

Состав и структура β-МСГ оказались более сложными. У большинства животных молекула β-МСГ состоит из 18 остатков аминокислот, кроме того, имеются видовые различия, касающиеся природы аминокислоты в положениях 2, 6 и 16 полипептидной

цепи гормона. β -МСГ, выделенный из промежуточной доли гипофиза человека, оказался 22-членным пептидом, удлинненным на 4 аминокислотных остатка с N-конца:

Н — Ала — Глу — Лиз — Лиз — Асп — Глу — Гли — Про — Тир — Арг — Мет — Глу — Гис — Фен — Арг —
— Трп — Гли — Сер — Про — Про — Лиз — Асп — ОН

Физиологическая роль меланотропинов заключается в стимулировании меланиногенеза у млекопитающих и увеличении количества пигментных клеток (меланоцитов) в кожных покровах земноводных. Возможно также влияние МСГ на окраску меха и секреторную функцию сальных желез у животных.

Адренокортикотропный гормон (АКТГ, кортикотропин)

Еще в 1926 г. было установлено, что гипофиз оказывает стимулирующее влияние на надпочечники, повышая секрецию гормонов коркового вещества. Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют, что этим свойством наделен АКТГ, вырабатываемый базофильными клетками аденогипофиза. АКТГ, помимо основного действия, — стимуляции синтеза и секреции гормонов коры надпочечников — обладает жиромобилизующей и меланоцитстимулирующей активностью.

Молекула АКТГ содержит 39 аминокислотных остатков у всех видов животных; первичная структура АКТГ свиньи и овцы была расшифрована еще в 1954–1955 гг. Приводим уточненное строение АКТГ человека:

Н — Сер — Тир — Сер — Мет — Глу — Гис — Фен — Арг — Трп — Гли — Лиз — Про — Вал — Гли — Лиз —
— Лиз — Арг — Арг — Про — Вал — Лиз — Вал — Тир — Про — Асп — Ала — Гли — Глу — Асп — Гли —
— Сер — Ала — Глу — Ала — Фен — Про — Лей — Глу — Фен — ОН

Различия в структуре АКТГ овцы, свиньи и быка касаются только природы 31-го и 33-го остатков аминокислот, однако все они наделены почти одинаковой биологической активностью, как и АКТГ гипофиза человека. В молекуле АКТГ, как и других белковых гормонов, хотя и не открыты активные центры наподобие активных центров ферментов, однако предполагается наличие двух активных участков пептидной цепи, один из которых ответствен за связывание с соответствующим рецептором, другой — за гормональный эффект.

Имеющиеся данные относительно механизма действия АКТГ на синтез стероидных гормонов свидетельствуют о существенной роли аденилатциклазной системы; предполагается, что АКТГ вступает во взаимодействие со специфическими рецепторами на внешней поверхности клеточной мембраны (рецепторы представлены белками в комплексе с другими молекулами, в частности с сиаловой кислотой). Сигнал затем передается на фермент аденилатциклазу, расположенную на внутренней поверхности клеточной мембраны, которая катализирует распад АТФ и образование цАМФ. Последний активирует протеинкиназу, которая в свою очередь с участием АТФ осуществляет фосфорилирование холинэстеразы, превращающей эфиры холестерина в свободный холестерин, который поступает в митохондрии надпочечников, где содержатся все ферменты, катализирующие превращение холестерина в кортикостероиды.

Соматотропный гормон (гормон роста, соматотропин, СТГ)

Гормон роста был открыт в экстрактах передней доли гипофиза еще в 1921 г., однако в химически чистом виде он был получен только в 1956–1957 гг. СТГ синтезируется в ацидофильных клетках передней доли гипофиза. К настоящему времени полностью выяснена первичная структура белковой молекулы СТГ человека, быка и овцы. СТГ человека состоит из 191 аминокислоты и содержит две дисульфидные связи; N- и C-концевые аминокислоты представлены фенилаланином.

СТГ обладает широким спектром биологического действия, оказывая влияние на

все клетки организма. Он усиливает биосинтез белка, ДНК, РНК и гликогена и в то же время способствует мобилизации жиров из депо и распаду высших жирных кислот и глюкозы в тканях. Помимо активации процессов ассимиляции, сопровождающихся увеличением размеров тела, стимуляцией роста скелета, СТГ координирует и регулирует скорость протекания обменных процессов. Кроме того, СТГ человека и приматов (но не других животных) обладает измеримой лактогенной активностью. Предполагается, что многие биологические эффекты этого гормона осуществляются через особый белковый фактор, образующийся в печени под влиянием гормона. Этот фактор был назван сульфурющим или тимидиловым фактором, поскольку он стимулирует включение сульфата в хрящи, тимидина в ДНК, уридина в РНК и пролина в коллаген. По своей природе этот фактор оказался пептидом с молекулярной массой 8000 Да. Учитывая его биологическую роль, он получил наименование соматомедина, т. е. медиатора действия СТГ в организме.

СТГ регулирует процессы роста и развития всего организма, что подтверждается клиническими наблюдениями. Так, при гипофизарной карликовости (патология, связанная с врожденным недоразвитием гипофиза) отмечается пропорциональное недоразвитие всего тела, в том числе скелета, хотя существенных отклонений в развитии психической деятельности не наблюдается. У взрослого человека также развивается ряд нарушений, связанных с гипо- или гиперфункцией гипофиза. В клинике известно заболевание акромегалия (от греч. *akros* — конечность, *megas* — большой), характеризующееся непропорционально интенсивным ростом отдельных частей тела, например рук, ног, подбородка, надбровных дуг, носа, языка. Болезнь вызвана, по-видимому, опухолевым поражением передней доли гипофиза.

Лактотропный гормон (лактотропин, пролактин)

Пролактин считается одним из наиболее «древних» гормонов гипофиза, поскольку его удается обнаружить в гипофизе низших наземных животных (у которых отсутствуют молочные железы), а также получить лактогенный эффект у млекопитающих. Помимо основного действия (стимуляция развития молочных желез и лактации) пролактин имеет важное биологическое значение — стимулирует рост внутренних органов, секрецию желтого тела, оказывает ренотропное, эритропоэтическое и гипергликемическое действие и др.

Расшифрована структура пролактина из гипофиза овцы, быка и человека. Это крупный белок, представленный одной полипептидной цепью с тремя дисульфидными связями, состоящий из 199 аминокислот; видовые отличия в последовательности аминокислот касаются по существу 2—3 аминокислот. Раньше оспаривалось мнение о существовании лактотропина в гипофизе человека, поскольку предполагалось, что эту функцию якобы выполняет соматотропин. В настоящее время получены убедительные доказательства существования пролактина человека, хотя в гипофизе его содержится меньше, чем гормона роста. В крови женщин содержание пролактина резко повышается перед родами: до 0,2 против 0,01 нг/л в норме.

Тиреотропный гормон (ТТГ, тиреотропин)

В отличие от приведенных выше пептидных гормонов гипофиза, представленных в основном одной полипептидной цепью, тиреотропин является сложным гликопротеином и содержит, кроме того, две α - и β -субъединицы, которые в отдельности биологической активностью не обладают. Тиреотропин контролирует развитие и функцию щитовидной железы и регулирует биосинтез и секрецию в кровь тиреоидных гормонов. Полностью расшифрована первичная структура α - и β -субъединиц тиреотропина быка, овцы и человека; α -субъединица, содержащая 96 аминокислотных остатков,

имеет одинаковую аминокислотную последовательность во всех изученных ТТГ и во всех лютеинизирующих гормонах гипофиза; β -субъединица тиреотропина человека, содержащая 112 аминокислот, отличается от аналогичного полипептида в ТТГ крупного рогатого скота 11 аминокислотными остатками и отсутствием С-концевого метионина. Поэтому многие авторы специфические биологические и иммунологические свойства гормона связывают с β -субъединицей ТТГ, но находящейся в комплексе с α -субъединицей. Предполагается, что действие тиреотропина осуществляется посредством связывания со специфическими рецепторами, представленными комплексами липопротеинов.

Гонадотропные гормоны (гонадотропины)

К гонадотропинам относятся фолликулостимулирующий гормон (фоллитропин) и лютеинизирующий гормон (лютропин или гормон, стимулирующий интерстициальные клетки). Оба гормона синтезируются в передней доле гипофиза и являются, как и тиреотропин, сложными белками — гликопротеинами. Фоллитропин вызывает созревание фолликулов в яичниках у самок и сперматогенез у самцов. Лютропин у самок стимулирует секрецию эстрогенов и прогестерона, как и разрыв фолликулов с образованием желтого тела, а у самцов — секрецию тестостерона и развитие интерстициальной ткани.

Химическая структура молекулы лютропина расшифрована полностью. Лютропин состоит из двух α - и β -субъединиц. Структура α -субъединиц гормона у большинства животных совпадает; у овцы она содержит 96 аминокислотных остатков и 2 углеводных радикала. У человека α -субъединица гормона укорочена на 7 аминокислотных остатков с N-конца и отличается природой 22 аминокислот. Расшифрована также последовательность аминокислот в β -субъединицах лютропина свиньи и человека. Следует отметить, что α - и β -субъединицы в отдельности лишены биологической активности (как и большинство субъединиц ферментов), и только их комплекс, образование которого, вероятнее всего, предопределено первичной структурой, приводит к формированию биологически активной макромолекулярной структуры, в образовании которой, как предполагают, ведущую роль играют гидрофобные взаимодействия.

Липотропные гормоны (ЛТГ, липотропины)

Среди гормонов передней доли гипофиза, структура и функция которых выяснены в последнее десятилетие, следует отметить липотропины, в частности β - и γ -ЛТГ. Наиболее подробно изучена первичная структура β -липотропина овцы и свиньи, молекулы которого состоят из 91 аминокислотного остатка и, кроме того, имеют существенные видовые отличия в последовательности аминокислот. К биологическим свойствам β -липотропина относятся: жиромобилизующее действие, кортикотропная, меланцитстимулирующая и гипокальциемическая активности и, кроме того, инсулиноподобный эффект, выражающийся в повышении скорости утилизации глюкозы в тканях. Предполагается, что липотропный эффект осуществляется через систему аденилатциклаза — цАМФ — протеинкиназа, завершающей стадией действия которой является фосфорилирование неактивной триацилглицерол-липазы, которая после активирования расщепляет нейтральные жиры на диацилглицерол и высшую жирную кислоту (см. главу 10).

Перечисленные выше биологические свойства обусловлены не β -липотропином, оказавшимся лишенным гормональной активности, а продуктами его распада, образующимися при ограниченном протеолизе. Оказалось, что в ткани мозга и в промежуточной доле гипофиза синтезируются биологически активные пептиды, наделенные опиатоподобным действием.

Ниже приводится структура некоторых из них:

Н – Тир – Гли – Гли – Фен – Мет – ОН
Метинин-энкефалин

Н – Тир – Гли – Гли – Фен – Лей – ОН
Лейцин-энкефалин

Н – Тир – Гли – Гли – Фен – Мет – Тре – Сер – Глу – Лиз – Сер – Гли – Тре – Про – Лей – Вал –
– Тре – Лей – Фен – Лиз – Асп – Ала – Иле – Вал – Лиз – Асп – Ала – Гис – Лиз – Лиз – Гли –
– Гли – ОН

β-Эндорфин

Общим типом структуры для трех соединений является тетрапептидная последовательность на N-конце. Доказано, что β-эндорфин (31 АМК) образуется путем протеолиза из более крупного гипофизарного гормона β-липотропина (91 АМК); последний вместе с АКТГ образуется из общего предшественника, прогормона, названного проопиокортином (являющегося, таким образом, препрогормоном), имеющим молекулярную массу 29000 Да. В свою очередь из АКТГ и β-липотропина путем ограниченного протеолиза образуются соответственно α- и β-меланоцитстимулирующие гормоны. Используя технику клонирования ДНК, а также метод определения первичной структуры нуклеиновых кислот Сэнгера, в ряде лабораторий была установлена нуклеотидная последовательность мРНК, предшественника проопиокортина. Эти исследования могут служить основой для целенаправленного получения новых биологически активных гормональных лечебных препаратов. Ниже представлены пептидные гормоны, образующиеся из β-липотропина путем специфического протеолиза.

Участок β-липотропина	Пептидный гормон
1 – 58	γ-Липотропин
41 – 58	β-МСГ
61 – 65	Мет-энкефалин
61 – 76	α-Эндорфин
61 – 77	γ-Эндорфин
61 – 79	δ-Эндорфин
61 – 91	β-Эндорфин

Учитывая исключительную роль β-липотропина как предшественника перечисленных гормонов, ниже представлена первичная структура β-липотропина свиньи (91 АМК):

Н – Глу – Лей – Ала – Гли – Ала – Про – Про – Глу – Про – Ала – Арг – Асп – Про – Глу – Ала –
– Про – Ала – Глу – Гли – Ала – Ала – Ала – Арг – Ала – Глу – Лей – Глу – Тир – Гли – Лей –
– Вал – Ала – Глу – Ала – Глу – Ала – Ала – Глу – Лиз – Лиз – Асп – Глу – Гли – Про – Тир –
– Лиз – Мет – Глу – Гис – Фен – Арг – Трп – Гли – Сер – Про – Про – Лиз – Асп – Лиз – Арг –
– Тир – Гли – Гли – Фен – Мет – Тре – Сер – Глу – Лиз – Сер – Гли – Тре – Про – Лей – Вал –
– Тре – Лей – Фен – Лиз – Асп – Ала – Иле – Вал – Лиз – Асп – Ала – Гис – Лиз – Лиз – Гли –
Гли – ОН

Интерес к указанным пептидам, в частности энкефалинам и эндорфинам, диктуется их необычайной способностью, подобно морфину, снимать болевые ощущения. Эта область исследования является интересной и многообещающей для развития физиологии, нейробиологии, неврологии и клиники.

Гормоны паразитовидных желез (паратгормон)

К гормонам белковой природы относится также паратгормон (точнее группа паратгормонов, отличающихся последовательностью аминокислот), синтезируемый паразитовидными железами. Еще в 1909 г. было показано, что удаление паразитовидных желез вызывает у животных тетанические судороги на фоне резкого падения концентрации кальция в плазме крови; введение солей кальция предотвращало гибель животных. Однако только в 1925 г. из паразитовидных желез был выделен

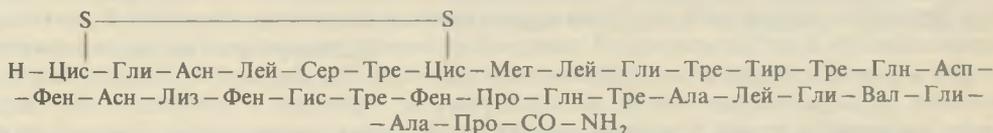
активный экстракт, вызывающий гормональный эффект — повышение содержания кальция в крови. Чистый гормон был получен только в 1970 г. из паразитовидных желез крупного рогатого скота и определена его первичная структура. Молекула паратгормона содержит 84 аминокислотных остатка и состоит из одной полипептидной цепи.

Относительно биологической роли паратгормона выяснено, что он участвует в регуляции концентрации катионов кальция и связанных с ними анионов фосфорной кислоты в крови. Как известно, концентрация кальция в сыворотке крови относится к химическим константам, и суточные колебания ее не превышают 3–5% (в норме она равна 2,2–2,6 ммоль/л). Ионы кальция оказались эссенциальными факторами, заменимыми другими катионами, для ряда жизненно важных физиологических процессов — мышечного сокращения, нервно-мышечного возбуждения, свертывания крови, проницаемости клеточных мембран, активности ряда ферментов и т. д. Вот почему любые нарушения, связанные с длительным недостатком кальция в пище или нарушением его всасывания в кишечнике, вызывают усиление синтеза паратгормона, который приводит к вымыванию солей кальция (в виде цитратов и фосфатов) из костной ткани и соответственно к деструкции минеральных и органических компонентов костей. Вторым органом-мишенью паратгормона является почка, где он уменьшает реабсорбцию фосфата в дистальных канальцах и повышает канальцевую реабсорбцию кальция. Считается доказанным, что физиологическое влияние паратгормона на клетки почек и костной ткани реализуется через систему аденилатциклаза — цАМФ.

Гормоны щитовидной железы

Щитовидная железа играет исключительно важную роль в обмене веществ. Об этом свидетельствуют резкое изменение основного обмена, наблюдаемое при нарушениях деятельности щитовидной железы, а также ряд косвенных данных, в частности обильное ее кровоснабжение, несмотря на небольшую массу (20–30 г). Щитовидная железа состоит из множества особых полостей — фолликулов, заполненных вязким секретом — коллоидом. В состав этого коллоида входит особый йодсодержащий гликопротеин с высокой молекулярной массой (порядка 650 000 Да), получивший название йодтиреоглобулина; он представляет собой запасную форму тироксина — основного гормона фолликулярной части щитовидной железы.

Помимо этого гормона (биосинтез и функции которого будут рассмотрены ниже), в особых клетках — так называемых парафолликулярных, или С-клетках щитовидной железы, — синтезируется гормон пептидной природы, обеспечивающий постоянную концентрацию кальция в крови и получивший соответственно название кальцитонина. Впервые на существование кальцитонина, обладающего способностью поддержания постоянства кальция в крови, указал в 1962 г. Д. Копп, который ошибочно считал, что этот гормон синтезируется паразитовидными железами. В настоящее время кальцитонин не только выделен в чистом виде из ткани щитовидной железы животных и человека, но и полностью раскрыта 32-членная аминокислотная последовательность, подтвержденная химическим синтезом. Ниже приведена первичная структура кальцитонина, полученного из щитовидной железы человека:



Кальцитонин человека содержит дисульфидный мостик (между 1-й и 7-й аминокислотами) и характеризуется N-концевым цистеином и C-концевым пролинамидом. Кальцитонины быка, овцы, свиньи и лососевых рыб мало отличаются друг от друга как по структуре и концевым аминокислотам, так и по гипокальциемической активности. Биологическое действие кальцитонина прямо противоположно эффекту паратгормона —

он вызывает подавление в костной ткани резорбтивных процессов и соответственно гипокальциемию и гипофосфатемию. Таким образом, постоянство уровня кальция в крови человека и животных обеспечивается главным образом паратгормоном и кальцитонином, т. е. деятельностью щитовидной и паращитовидных желез. Это следует учитывать во всех случаях, связанных с хирургическими лечебными манипуляциями на данных железах.

Химическая природа гормонов фолликулярной части щитовидной железы выяснена в деталях сравнительно давно; считается установленным, что все йодсодержащие гормоны, отличающиеся друг от друга содержанием йода, являются производными L-тиромина, который синтезируется в организме из аминокислоты L-тирозина.



Из L-тиромина легко синтезируется основной гормон щитовидной железы — тироксин, содержащий в 4-х положениях кольцевой структуры йод. Следует отметить, что гормональной активностью наделены 3,5,3'-трийодтиронин и 3,3'-дийодтиронин, также открытые в щитовидной железе.

В настоящее время еще полностью не выяснены вопросы о ферментных системах, катализирующих промежуточные стадии синтеза этих гормонов, и природе фермента, участвующего в превращении йодидов в свободный йод ($2 I^{-2} \rightarrow I_2$), необходимый для йодирования тирозина. Последовательность реакций, связанных с синтезом гормонов щитовидной железы, была расшифрована при помощи радиоактивного йода [^{131}I]; было показано, что введенный меченый йод прежде всего обнаруживается в молекуле моноидтирозина, затем — дийодтирозина и только потом — тироксина. Эти данные позволили утверждать, что моноид- и дийодтирозины являются предшественниками тироксина. Однако известно, что введение йода осуществляется на уровне не тироксина, а пептидной цепи тиреоглобулина в процессе его постсинтетической модификации; эта точка зрения кажется более правдоподобной, учитывая универсальность постсинтетической химической модификации при биосинтезе биологически активных веществ в организме. Катаболизм гормонов щитовидной железы протекает по двум направлениям: по пути распада гормонов с освобождением йода (в виде йодидов) и путем дезаминирования (отщепления аминогруппы) боковой цепи гормонов. Продукты обмена или неизмененные гормоны выделяются с мочой или калом. Возможно, что некоторая часть неизмененного тироксина, поступая через печень и желчь в кишечник, вновь всасывается, пополняя резервы гормонов в организме.

Биологическое действие гормонов щитовидной железы распространяется на множество физиологических функций организма. В частности, они регулируют скорость

основного обмена, рост и дифференцировку тканей, обмен белков, углеводов и липидов, водно-электролитный обмен, деятельность ЦНС, желудочно-кишечного тракта, гемопоэз, функцию сердечно-сосудистой системы, потребность в витаминах, сопротивляемость организма инфекциям и др. Точкой приложения действия тиреоидных гормонов считаются внутриклеточные рецепторы — белки, обеспечивающие транспорт тиреоидных гормонов в ядро и взаимодействие со специфическими генами; в результате увеличивается синтез ферментов, регулирующих скорость окислительно-восстановительных процессов. Естественно поэтому, что недостаточная функция щитовидной железы (гипофункция) или, наоборот, повышенная секреция гормонов (гиперфункция) вызывает глубокие расстройства физиологического статуса организма.

Гипофункция щитовидной железы в раннем детском возрасте приводит к развитию болезни, известной в литературе как **к р е т и н и з м**. Помимо остановки роста, специфических изменений со стороны кожи, волос, мышц, резкого снижения скорости процессов обмена, при кретинизме отмечаются глубокие нарушения психики; специфическое гормональное лечение в этом случае не дает положительных результатов.

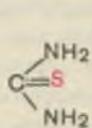
Недостаточная функция щитовидной железы в зрелом возрасте сопровождается развитием **г и п о т и р е о и д н о г о о т е к а**, или **м и к с е д е м ы** (от греч. туха — слизь, oedema — отек). Это заболевание чаще встречается у женщин и характеризуется нарушением водно-солевого, основного и жирового обменов. У больных отмечаются слизистый отек, патологическое ожирение, резкое снижение основного обмена, выпадение волос и зубов, общие мозговые нарушения и психические расстройства. Кожа становится сухой, температура тела падает; в крови повышено содержание глюкозы. Гипотиреозидизм сравнительно легко поддается лечению препаратами щитовидной железы.

Следует отметить еще одно поражение щитовидной железы, получившее название **э н д е м и ч е с к о г о з о б а**. Болезнь обычно развивается у лиц, проживающих в горных местностях, где содержится недостаточно йода в воде и растениях. Недостаток йода приводит к компенсаторному увеличению массы ткани щитовидной железы за счет преимущественного разрастания соединительной ткани, однако этот процесс не сопровождается увеличением секреции тиреоидных гормонов. Болезнь не приводит к серьезным нарушениям функции организма, хотя увеличенная в размерах щитовидная железа создает определенные неудобства. Лечение в данном случае сводится к обогащению продуктов питания, в частности поваренной соли, неорганическим йодом.

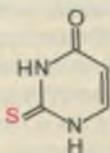
Повышенная функция щитовидной железы (гиперфункция) вызывает развитие **г и п е р т и р е о з а**, известного в литературе под названием **зоб диффузный токсический** (болезнь Грейвса или базедова болезнь). Резкое повышение обмена веществ сопровождается усиленным распадом тканевых белков, что приводит к развитию отрицательного азотистого баланса.

Наиболее характерным проявлением болезни считается триада симптомов: резкое увеличение числа сердечных сокращений (тахикардия), пучеглазие (экзофтальм) и зоб, т. е. увеличенная в размерах щитовидная железа; у больных развиваются общее истощение организма, а также психические расстройства.

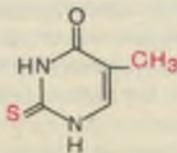
Лечение гиперфункции щитовидной железы и, в частности, токсического зоба сводится к оперативному удалению всей железы или введению ^{131}I (β - и γ -излучение частично разрушает ткань железы) и антагонистов тироксина, тормозящих синтез тиреоидных гормонов. К подобным веществам относятся, например, тиомочевина, тиоурацил (или метилтиоурацил).



Тиомочевина



Тиоурацил



Метилтиоурацил

Тормозящее действие на функцию щитовидной железы оказывают, кроме того, тиоцианат и вещества, содержащие аминокислотную группу, а также микродозы йода. Механизм действия антигипотиреоидных веществ, тормозящих образование гормонов щитовидной железы, окончательно не выяснен. Возможно, они оказывают ингибирующее действие на ферментные системы, участвующие в биосинтезе тиреоидных гормонов.

Гормоны поджелудочной железы

Поджелудочная железа относится к железам со смешанной секрецией. Внешне-секреторная функция ее заключается в синтезе ряда ключевых ферментов пищеварения, в частности амилазы, липазы, трипсина, химотрипсина, карбоксипептидазы и других, поступающих в кишечник с соком поджелудочной железы. Внутрисекреторную функцию выполняют, как было установлено еще в 1902 г. Л. В. Соболевым, *п а н к р е а т и ч е с к и е о с т р о в к и*, состоящие из клеток разного типа, вырабатывающие гормоны иногда даже противоположного действия. Так α - (или А-) клетки продуцируют глюкагон, β - (или В-) клетки синтезируют инсулин, D-клетки вырабатывают соматостатин и F-клетки — малоизученный панкреатический полипептид. Ниже будут рассмотрены инсулин и глюкагон как гормоны, имеющие исключительно важное значение для жизнедеятельности организма.

Инсулин

Инсулин, получивший свое название от наименования панкреатических островков (лат. *insula* — остров), был первым белком, первичная структура которого была раскрыта в 1954 г. Ф. Сэнгером (см. главу 1). В чистом виде инсулин был получен в 1922 г. после его обнаружения в экстрактах панкреатических островков Ф. Бантингом и Ч. Бестом. Молекула инсулина, содержащая 51 аминокислоту, состоит из двух полипептидных цепей, соединенных между собой в двух точках дисульфидными мостиками. Строение инсулина и его предшественника — *п р о и н с у л и н а* — приведены в главе 1 (см. рис. 1.14). В настоящее время принято обозначать цепью А инсулина 21-членный пептид и цепью В — пептид, содержащий 30 остатков аминокислот. Во многих лабораториях осуществлен, кроме того, химический синтез инсулина. Наиболее близким по своей структуре к инсулину человека является инсулин свиньи, у которого в цепи В вместо треонина в положении 30 содержится аланин; существенных различий в аминокислотной последовательности в инсулине разных животных не имеется; различия между ними связаны с аминокислотным составом цепи А в положениях — 8—10.

Согласно современным представлениям биосинтез инсулина осуществляется в β -клетках панкреатических островков из своего предшественника — проинсулина, впервые выделенного Д. Стайнером в 1966 г. В настоящее время не только выяснена первичная структура проинсулина, но и осуществлен его химический синтез (см. рис. 1.14). Проинсулин представлен одной полипептидной цепью, содержащей 84 аминокислотных остатка; он лишен биологической, т. е. гормональной активности. Местом синтеза проинсулина считается фракция микросом β -клеток панкреатических островков; превращение неактивного проинсулина в активный инсулин (наиболее существенная часть синтеза) происходит при перемещении проинсулина от рибосом к секреторным гранулам путем частичного протеолиза (отщепление с С-конца полипептидной цепи пептида, содержащего 33 аминокислотных остатка и получившего наименование соединяющего пептида, или С-пептида). Укажем также, что первичная структура С-пептида подвержена большим изменениям у разных видов животных, чем последовательность цепей А и В инсулина. Установлено, что исходным предшественником инсулина является *п р е п р о и н с у л и н*, содержащий, помимо проинсулина, его так называемую лидерную или сигнальную последовательность на N-конце, состоящую из 23 остатков аминокислот; при образовании молекулы проинсулина

этот сигнальный пептид отщепляется специальной пептидазой. Однако природа фермента и тонкие механизмы этого важного биологического процесса — образование активной молекулы инсулина — окончательно не выяснены.

Синтезированный из проинсулина инсулин может существовать в нескольких формах, отличающихся по биологическим, иммунологическим и физико-химическим свойствам. Различают две формы инсулина: 1) свободную, вступающую во взаимодействие с антителами, полученными к кристаллическому инсулину, и стимулирующую усвоение глюкозы мышечной и жировой тканями; 2) связанную, не реагирующую с антителами и активную только в отношении жировой ткани. В настоящее время доказано существование связанной формы инсулина и установлена локализация ее в белковых фракциях сыворотки крови, в частности в области трансферринов и α -глобулинов. Молекулярная масса связанного инсулина варьирует от 60 000 до 100 000 Да. Различают, кроме того, так называемую форму А инсулина, отличающуюся от двух предыдущих по ряду физико-химических и биологических свойств, занимающую промежуточное положение и появляющуюся в ответ на быструю, срочную потребность организма в инсулине.

В физиологической регуляции синтеза инсулина доминирующую роль играет концентрация глюкозы в крови. Так, повышение содержания глюкозы в крови вызывает увеличение секреции инсулина в панкреатических островках; снижение концентрации глюкозы в крови, наоборот, вызывает замедление секреции инсулина. Этот феномен контроля по типу обратной связи рассматривается как один из важнейших механизмов регуляции содержания глюкозы в крови. На секрецию инсулина оказывают влияние, кроме того, электролиты (особенно ионы кальция), аминокислоты, глюкагон и секретин. Приводятся доказательства роли циклазной системы в секреции инсулина; предполагается, что глюкоза действует в качестве сигнала для активирования аденилатциклазы, а образовавшийся в этой системе цАМФ — в качестве сигнала для секреции инсулина.

При недостаточной секреции (точнее недостаточном синтезе) инсулина развивается специфическое заболевание, известное под названием сахарный диабет (см. главу 9). Помимо клинически выявляемых симптомов (полиурия, полидипсия и полифагия), сахарный диабет характеризуется рядом специфических нарушений процессов обмена. Так, у больных развиваются гипергликемия (увеличение глюкозы в крови) и глюкозурия (выделение глюкозы с мочой, в которой в норме она отсутствует). К расстройствам обмена относят также усиленный распад гликогена в печени и мышцах, замедление биосинтеза белков и жиров, снижение скорости окисления глюкозы в тканях, развитие отрицательного азотистого баланса, увеличение содержания холестерина и других липидов в крови. При диабете усиливаются мобилизация жиров из депо, синтез углеводов из аминокислот (глюконеогенез) и избыточный синтез кетонных тел (кетонурия). После введения больным инсулина все перечисленные нарушения, как правило, исчезают, однако действие гормона ограничено во времени, поэтому необходимо вводить его постоянно. Клинические симптомы и метаболические нарушения при сахарном диабете могут быть объяснены не только отсутствием синтеза инсулина; получены доказательства, что при сахарном диабете могут иметь место и молекулярные дефекты. В частности, нарушение структуры инсулина или нарушение ферментативного превращения проинсулина в инсулин. В основе развития диабета часто лежит потеря рецепторами клеток-мишеней способности соединяться с молекулой инсулина, синтез которого не нарушен.

У экспериментальных животных введение инсулина вызывает гипогликемию (снижение уровня глюкозы в крови), увеличение запасов гликогена в мышцах, усиление анаболических процессов, повышение скорости утилизации глюкозы в тканях. Кроме того, инсулин оказывает опосредованное влияние на водный и минеральный обмен.

Механизм действия инсулина окончательно не расшифрован, несмотря на огромное количество фактических данных, свидетельствующих о зависимости между инсулином

и процессами обмена веществ в организме. В соответствии с «унитарной» теорией все эффекты инсулина вызваны его влиянием на обмен глюкозы через фермент гексокиназу, однако новые экспериментальные данные свидетельствуют, что усиление и стимуляция инсулином таких процессов, как транспорт ионов и аминокислот, синтез белка и других, являются независимыми. Это послужило основанием для предположения о множественных механизмах действия инсулина. Наиболее вероятной в настоящее время представляется мембранная локализация первичного действия почти всех белковых гормонов, включая инсулин. Получены доказательства существования специфического рецептора инсулина на внешней плазматической мембране жировых клеток, а также образование инсулин-рецепторного комплекса; в последнем процессе участвует сialовая кислота. Показано, что рецептор инсулина является гликопротеином с молекулярной массой порядка 135 000 Да. Дальнейшие пути передачи информации от инсулин-рецепторного комплекса на внутриклеточные процессы окончательно не установлены. Предполагается, что в жировых клетках и частично клетках печени в передаче инсулинового сигнала принимают участие аденилатциклаза и соответственно цАМФ, а в мышцах передача гормонального сигнала осуществляется без участия цАМФ, поскольку инсулин легко проникает внутрь клеток мышечной ткани. Нельзя исключить, кроме того, возможности существования внутриклеточного посредника действия инсулина, особого внутриклеточного рецептора и действия подобного инсулин-рецепторного комплекса на уровне генома. В появлении эффектов инсулина и соответственно передаче его гормональных сигналов важную роль играет, кроме того, Na-K-зависимая АТФаза, активность которой также регулируется инсулином; в результате возникает конкуренция между АТФазой и аденилатциклазой за общий субстрат — АТФ и дополнительный канал регуляции концентрации цАМФ в клетке. Количество цАМФ контролируется, кроме того, фосфодиэстеразой, активность которой также определяется инсулином.

Глюкагон

Глюкагон впервые был обнаружен в коммерческих препаратах инсулина еще в 1923 г., однако только в 1953 г. венгерский биохимик Ф. Штрауб получил этот гормон в гомогенном состоянии. Глюкагон синтезируется в α -клетках панкреатических островков поджелудочной железы. Он представлен одной линейно расположенной полипептидной цепью, в состав которой входит 29 аминокислот в следующей последовательности:

Н — Гис — Сер — Гли — Гли — Тре — Фен — Тре — Сер — Асп — Тир — Сер — Лиз — Тир — Лей — Асп — Сер — Арг — Арг — Ала — Гли — Асп — Фен — Вал — Гли — Три — Лей — Мет — Асп — Тре — ОН

Первичная структура глюкагонов человека и животных оказалась идентичной; исключение составляет только глюкагон индюка, у которого вместо аспарагина в положении 28 содержится серин. Глюкагон образуется из своего предшественника — проглюкагона, содержащего на С-конце полипептида дополнительный октапептид (8 остатков), отщепляемый в процессе постсинтетического протеолиза. Имеются данные, что у проглюкагона, так же как и у проинсулина, существует предшественник — препроглюкагон, структура которого пока не расшифрована.

По биологическому действию глюкагон, как и адреналин, относится к гипергликемическим факторам, вызывает увеличение концентрации глюкозы в крови главным образом за счет распада гликогена в печени. Органами-мишенями для глюкагона являются печень, миокард, жировая ткань, но не скелетные мышцы. Биосинтез и секреция глюкагона контролируются главным образом концентрацией глюкозы по принципу обратной связи; аналогичным свойством обладают аминокислоты и свободные жирные кислоты. На секрецию глюкагона оказывает влияние также инсулин.

В механизме действия глюкагона первичным является связывание со специфиче-

скими рецепторами мембраны клеток¹; образовавшийся глюкагон-рецепторный комплекс активирует аденилатциклазу и соответственно образование цАМФ. Последний, являясь универсальным эффектором внутриклеточных ферментов, активирует протеинкиназу, которая в свою очередь фосфорилирует киназу фосфорилазы и гликогенсинтазу. Фосфорилирование первого фермента способствует формированию активной гликогенфосфорилазы и соответственно распаду гликогена с образованием глюкозо-1-фосфата (см. главу 9), в то время как фосфорилирование гликогенсинтазы сопровождается переводом ее в неактивную форму и соответственно к блокированию синтеза гликогена. Общим итогом действия глюкагона является ускорение распада гликогена и торможение его синтеза в печени, результатом чего является увеличение концентрации глюкозы в крови.

Гипергликемический эффект глюкагона обусловлен, однако, не только распадом гликогена. Имеются бесспорные доказательства существования глюконеогенетического механизма гипергликемии, вызванной глюкагоном. Оказывается, что глюкагон способствует образованию глюкозы из промежуточных продуктов обмена белков и жиров. Глюкагон стимулирует образование глюкозы из аминокислот путем индукции синтеза ферментов глюконеогенеза при участии цАМФ. Глюкагон в отличие от адреналина тормозит гликолитический распад глюкозы до молочной кислоты, способствуя тем самым гипергликемии. Укажем также, на различия в физиологическом действии — в отличие от адреналина глюкагон не повышает кровяного давления и не увеличивает частоту сердечных сокращений. Следует отметить, что, помимо панкреатического глюкагона, в последнее время доказано существование кишечного глюкагона, синтезирующегося по всему пищеварительному тракту и поступающего в кровь. Первичная структура кишечного глюкагона пока точно не расшифрована, однако в его молекуле открыты идентичные N-концевому и среднему участкам панкреатического глюкагона аминокислотные последовательности, но разная C-концевая последовательность аминокислот.

Таким образом, панкреатические островки, синтезирующие два противоположного действия гормона — инсулин и глюкагон, выполняют ключевую роль в регуляции обмена веществ на молекулярном уровне.

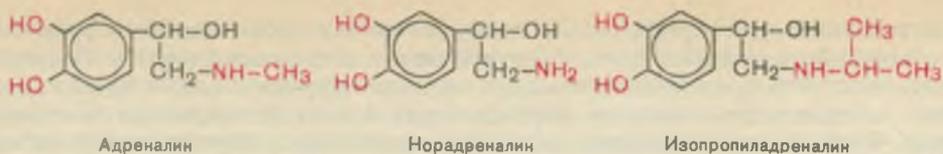
Гормоны надпочечников

Надпочечники состоят из двух индивидуальных в морфологическом и функциональном отношении частей — мозгового и коркового вещества. Мозговое вещество относится к хромоаффинной, или адреналовой, системе и вырабатывает гормоны, относящиеся по указанной выше классификации к производным аминокислот. Корковое вещество состоит из эпителиальной ткани и секретирует гормоны стероидной природы.

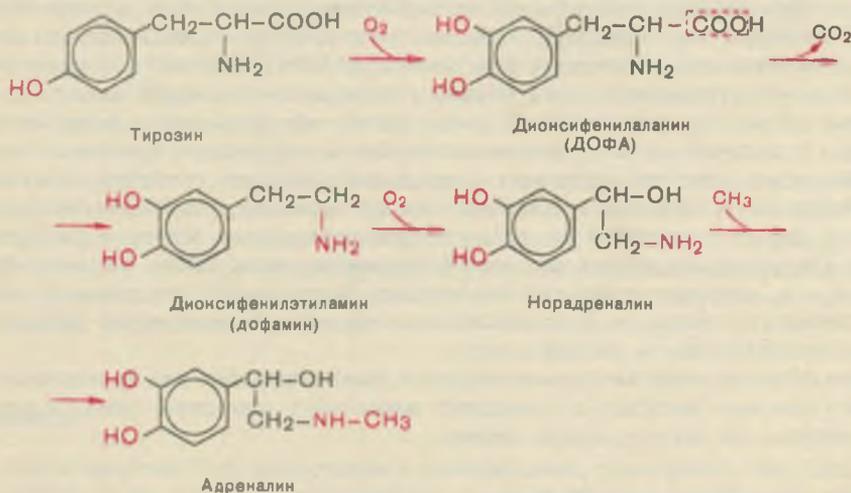
Гормоны мозгового вещества надпочечников

О способности экстрактов из надпочечников повышать кровяное давление было известно еще в XIX веке. Однако только в 1901 г. Дж. Такаmine и соавт. из мозгового слоя надпочечников выделили активное начало, идентифицированное с адреналином. Это был первый гормон, полученный в чистом кристаллическом виде. Спустя 40 с лишним лет, в 1946 г. из мозгового вещества был выделен еще один гормон — норадреналин, который до этого был синтезирован химическим путем. Помимо этих двух главных гормонов, в надпочечниках в следовых количествах синтезируется еще один гормон — изопропиладреналин; все они имеют сходное строение.

¹ Это так называемые глюкагонсвязывающие белки, которые избирательно взаимодействуют только с глюкагоном.



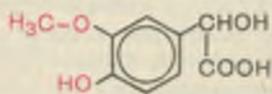
Все эти гормоны напоминают по строению аминокислоту тирозин, от которого они отличаются наличием дополнительных OH-групп в кольце и у β-углеродного атома боковой цепи и отсутствием карбоксильной группы. Действительно, получены экспериментальные доказательства, что предшественником гормонов мозгового вещества надпочечников является тирозин, подвергающийся в процессе обмена реакциям гидроксилирования, декарбоксилирования и метилирования с участием соответствующих ферментов (см. главу 11). Биосинтез катехоламинов (адrenalин и норadrenalин) может быть представлен в виде следующей упрощенной схемы:



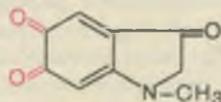
В мозговом веществе надпочечников человека массой 10 г содержится около 5 мг адrenalина и 0,5 мг норadrenalина. Содержание их в крови составляет соответственно 1,9 и 5,2 нмоль/л. В плазме крови оба гормона содержатся как в свободном, так и связанном состоянии, в частности с альбуминами. В небольших количествах оба гормона откладываются в виде соли с АТФ в нервных окончаниях, освобождаясь в ответ на их раздражение. Адrenalин и норadrenalин, как и дофамин, относятся к катехоламинам, т. е. к классу органических веществ, обладающих сильным биологическим действием. Все они оказывают мощное сосудосуживающее действие, вызывая повышение артериального давления, и в этом отношении действие их сходно с действием симпатической нервной системы. Кроме того, они оказывают сильное регулирующее влияние на обмен углеводов в организме, в частности адrenalин вызывает резкое повышение уровня глюкозы в крови, что обусловлено ускорением распада гликогена в печени под действием фермента фосфорилазы (см. главу 9).

Адrenalин, как и глюкагон, активирует фосфорилазу не прямо, а через систему аденилатциклаза — цАМФ — протейкиназа. Гипергликемический эффект норadrenalина значительно ниже. Он составляет примерно 5% от действия адrenalина. Параллельно отмечается накопление гексофосфатов в тканях, в частности в мышцах, уменьшение концентрации неорганического фосфата и повышение уровня ненасыщенных жирных кислот в плазме крови. Имеются данные, свидетельствующие о торможении окисления глюкозы в тканях под влиянием адrenalина. Это действие некоторые авторы связывают с уменьшением скорости проникновения (транспорта) глюкозы внутрь клетки.

Относительно судьбы катехоламинов в организме известно, что и адреналин, и норадреналин быстро разрушаются в организме, и с мочой выделяются неактивные продукты их обмена, главным образом в виде 3-метокси-4-оксиминдальной кислоты, оксоадренохрома, метоксинорадреналина и метоксиадреналина; эти метаболиты содержатся в моче преимущественно в связанной с глюкуроновой кислотой форме. Ферменты, катализирующие указанные превращения катехоламинов, выделены из многих тканей и достаточно хорошо охарактеризованы. В частности, моноаминоксидаза (МАО), определяющая в известной степени скорость биосинтеза и распада катехоламинов, и катехол-метилтрансфераза, катализирующая главный путь превращения адреналина, т. е. *o*-метилирование за счет S-аденозилметионина. Ниже представлена структура двух конечных продуктов распада катехоламинов:



3-Метокси-4-оксиминдальная кислота



Оксоадренохром

СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Гормоны коркового вещества надпочечников

Со второй половины XIX века известно заболевание, названное бронзовой болезнью или болезнью Аддисона, по имени автора, впервые описавшего его. Заболевание характеризуется усиленной пигментацией кожи, развитием мышечной слабости, расстройством функции желудочно-кишечного тракта, резким нарушением водно-солевого обмена и обмена белков и углеводов. Как теперь установлено, в основе заболевания лежит туберкулезное поражение надпочечников, которое приводит к резкой недостаточности синтеза гормонов в корковом веществе. При аддисоновой болезни расстройства обмена сводятся к резкому снижению концентрации ионов натрия и хлора и повышению уровня ионов калия в крови и мышцах, потере воды организмом и снижению уровня глюкозы в крови. Нарушения белкового обмена проявляются как в снижении синтеза белков из аминокислот, так и в увеличении остаточного азота в крови. Раньше это заболевание считалось неизлечимым и больные, как правило, погибали.

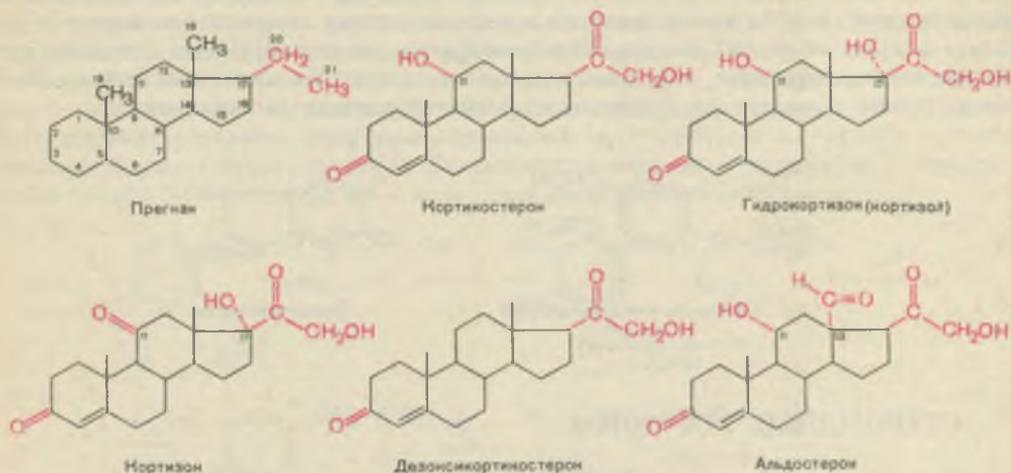
В настоящее время, после выяснения этиологии болезни и внедрения в медицинскую практику антибиотиков и специфических средств терапии туберкулеза, аддисонова болезнь поддается лечению.

Химическое строение, биосинтез и биологическое действие кортикостероидов

К настоящему времени из коркового вещества надпочечников человека, свиньи и быка выделено около 50 различных соединений, которым дано общее название кортикоиды или кортикостероиды. Общее число всех стероидов, которые синтезируются в надпочечниках многих животных, приближается к 100. Однако биологической активностью наделены не все кортикостероиды.

В зависимости от характера биологического эффекта гормоны коркового вещества надпочечников условно делят на глюкокортикоиды (кортикостероиды, оказывающие влияние на обмен углеводов, белков, жиров и нуклеиновых кислот) и минералокортикоиды (кортикостероиды, оказывающие влияние на обмен

солей и воды)¹. К первым относятся: кортикостерон, кортизон, гидрокортизон (кортизол), 11-дезоксикортизол и 11-дегидрокортикостерон, ко вторым — дезоксикортикостерон и альдостерон. В основе их структуры, так же как и в основе строения холестерина, эргостерина, желчных кислот, витаминов группы D, половых гормонов и ряда других веществ, лежит конденсированная кольцевая система циклопентанпергидрофенантрена.



Для гормонов коркового вещества надпочечников, наделенных биологической активностью, общим свойством строения оказалось наличие 21 углеродного атома; вследствие этого все они являются производными прегнана. Кроме того, для всех биоактивных гормонов коркового вещества надпочечников характерными оказались следующие структурные признаки: наличие двойной связи между 4-м и 5-м углеродными атомами, наличие кетонной группы (C=O) у 3-го углеродного атома, боковая цепь (—CO—CH₂—OH) у 17-го углеродного атома.

Ниже (см. с. 194) будут рассмотрены химическое строение, биосинтез и биологическое действие пяти гормонов коркового вещества надпочечников, наиболее распространенных в надпочечниках человека и большинства животных.

Установлено, что у человека и большинства животных предшественником кортикостероидов является холестерин и что процесс стероидогенеза, как и нормальное гистологическое строение и масса надпочечников, регулируются АКТГ гипофиза. В свою очередь синтез АКТГ в гипофизе, а значит, и кортикостероидов в корковом веществе надпочечников, регулируется гипоталамусом, который в ответ на стрессовые ситуации секретирует кортиколиберин. Имеются неоспоримые доказательства быстрого (кратковременного) и медленного (хронического) действия АКТГ на надпочечники, причем в остром случае железы отвечает кратковременным увеличением синтеза кортикостероидов, в то время как при хроническом воздействии АКТГ отмечается его трофический эффект, который сводится к стимулированию всех обменных процессов, обеспечивающих рост и размножение клеток железы, а также продолжительное увеличение секреции стероидных гормонов. Следует отметить, что действие АКТГ также опосредовано через специфический рецептор и систему аденилатциклаза — цАМФ — протеинкиназа.

Получены экспериментальные доказательства индуцирующего действия кортикостероидов на синтез специфических мРНК и соответственно синтез белка. Предпо-

¹ В надпочечниках открыты, кроме того, неспецифические половые гормоны: андро- и эстрокортикостероиды.

лагаются, что механизмы этого действия стероидов включают проникновение гормона вследствие легкой растворимости в жирах через липидный бислой клеточной мембраны, образование стероид-рецепторного комплекса в цитоплазме клетки, последующее преобразование этого комплекса в цитоплазме, быстрый транспорт в ядро и связывание его с хроматином. Считается, что в этом процессе участвуют как кислые белки хроматина, так и непосредственно ДНК. В настоящее время разработана концепция о существовании в организме определенной последовательности механизма кортикостероидной регуляции обмена веществ:

ГОРМОН→ГЕН→БЕЛОК(ФЕРМЕНТ)

Основной путь биосинтеза кортикостероидов включает последовательное ферментативное превращение холестерина в прегненолон, 17-оксипрегненолон, 21-оксипрегненолон и прогестерон. Ферменты осуществляют минимум три последовательные реакции гидроксилирования и реакцию отщепления боковой цепи холестерина (в виде изокапроновой кислоты). Гидроксилирующая система митохондрий и микросом клеток коркового вещества надпочечников отличается по составу и представляет собой сложную многокомпонентную систему. Имеющиеся данные о синтезе стероидных гормонов обобщены в схему¹ (по Н. А. Юдаеву и С. А. Афиногеновой).

Глюкокортикоиды оказывают разностороннее влияние на обмен веществ в разных тканях. В мышечной, лимфатической, соединительной и жировой тканях глюкокортикоиды проявляют катаболическое действие и вызывают снижение проницаемости клеточных мембран и соответственно торможение поглощения глюкозы и аминокислот; в то же время в печени они оказывают противоположное действие. Конечным итогом действия глюкокортикоидов является развитие гипергликемии, обусловленной главным образом глюкокогенолизом. Механизм развития гипергликемии после введения глюкокортикоидов включает, кроме того, снижение синтеза гликогена в мышцах, торможение окисления глюкозы в тканях и усиление распада жиров (соответственно сохранение запасов глюкозы, так как в качестве источника энергии используются свободные жирные кислоты).

В ткани печени доказано индуцирующее действие кортизона и гидрокортизона на синтез некоторых белков-ферментов: триптофанпирролазы, тирозинтрансминазы, серин- и треониндегидратаз и другие, свидетельствующее, что гормоны действуют на первую стадию передачи генетической информации — стадию транскрипции, способствуя синтезу мРНК.

Минералокортикоиды (дезоксикортикостерон и альдостерон) регулируют главным образом обмен натрия, калия, хлора и воды; они способствуют удержанию ионов натрия и хлора в организме и выведению с мочой ионов калия. По-видимому, происходит обратное всасывание ионов натрия и хлора в канальцах почек в обмен на выведение других продуктов обмена, в частности мочевины. Альдостерон получил свое название на основании наличия в его молекуле альдегидной группы у 13-го углеродного атома вместо метильной группы у всех остальных кортикостероидов. Альдостерон является наиболее активным минералокортикоидом среди других кортикостероидов, в частности он в 50—100 раз активнее дезоксикортикостерона по влиянию на минеральный обмен.

Относительно судьбы гормонов коркового вещества надпочечников известно, что период полураспада кортикостероидов составляет всего 70—90 мин. Кортикостероиды подвергаются или восстановлению за счет разрыва двойных связей (присоединения атомов водорода) или окислению, сопровождающемуся отщеплением боковой цепи у 17-го углеродного атома, теряя в обоих случаях биологическую активность.

¹ При изображении структуры стероидов связь α -ориентированных заместителей принято изображать штриховой линией, а β -ориентированных заместителей — сплошной, что отражено на схеме см. стр. 194.

Образовавшиеся продукты окисления гормонов коркового вещества надпочечников получили название 17-кетостероидов, которые выводятся с мочой в качестве конечных продуктов обмена. Определение 17-кетостероидов в моче имеет большое клиническое значение; у мужчин они являются также конечными продуктами обмена мужских половых гормонов. В норме в суточной моче 17-кетостероидов содержится от 10 до 25 мг у мужчин и от 5 до 15 мг у женщин. Повышенная экскреция их наблюдается, например, при опухоли интерстициальной ткани семенников, тогда как при других тестикулярных опухолях наблюдаются нормальные величины. При опухолях коркового вещества надпочечников резко увеличивается экскреция 17-кетостероидов с мочой; содержание их доходит до 600 мг в сутки. Простая гиперплазия коркового вещества сопровождается умеренным повышением уровня кетостероидов в моче. Для дифференциальной диагностики опухолей или простой гиперплазии обычно пользуются раздельным определением α - и β -17-кетостероидов. Пониженное выделение 17-кетостероидов с мочой наблюдается при евнухоидизме, гипофункции передней доли гипофиза. При аддисоновой болезни у мужчин экскреция 17-кетостероидов резко снижена (от 1 до 4 мг в сутки), а у женщин при этом заболевании она практически не наблюдается. Этот факт подтверждает указанное выше положение, что 17-кетостероиды образуются не только из гормонов коркового вещества надпочечников, но и из мужских половых гормонов. При микседеме (гипофункция щитовидной железы) суточное количество экскретируемых 17-кетостероидов близко к минимальному уровню (2—4 мг).

Следует указать, однако, что применение гормонов щитовидной железы, хотя и эффективно при лечении основного заболевания, оказывает небольшое влияние на количество экскретируемых с мочой 17-кетостероидов.

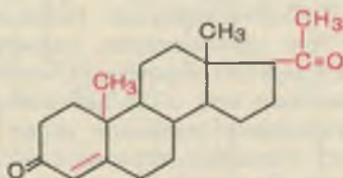
Гормоны коркового вещества надпочечников в настоящее время широко используются в клинической практике в качестве лекарственных препаратов. Применение кортизона с лечебной целью явилось следствием случайного наблюдения. Было замечено, что при беременности тяжесть симптомов ревматоидного артрита резко снижается, однако все эти симптомы вновь появляются после родов. Оказалось, что во время беременности происходит ускорение секреции гормонов коркового вещества надпочечников и поступление их в кровь. Параллельное гистологическое исследование надпочечников доказало резкое усиление роста и пролиферации клеток коркового вещества. Эти наблюдения навели на мысль об использовании гормонов коркового вещества надпочечников вообще и кортизона в частности при лечении ревматоидных артритов. Результаты лечения оказались настолько эффективными, что в первые годы применения кортизона некоторые авторы наблюдали почти 100% излечение артритов ревматического происхождения. Обладая противовоспалительной, антиаллергической и антииммунной активностью, глюкокортикоиды нашли широкое применение при лечении таких заболеваний, как бронхиальная астма, ревматоидный артрит, красная волчанка, пузырчатка, сенная лихорадка, различные аутоиммунные болезни, дерматозы и др. Однако длительное применение кортикостероидных препаратов может привести к серьезным нарушениям обменных процессов в организме.

Половые гормоны

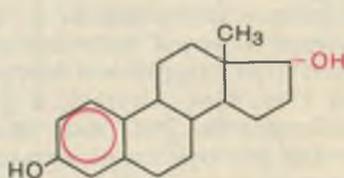
Половые гормоны синтезируются в основном в половых железах женщин (яичники) и мужчин (семенники); некоторое количество половых гормонов образуется, кроме того, в плаценте и корковом веществе надпочечников. Следует отметить, что в мужских половых железах образуется небольшое количество женских гормонов и, наоборот, в яичниках синтезируется незначительное количество мужских половых гормонов; это положение подтверждается исследованиями химической природы гормонов при некоторых патологических состояниях, когда отмечаются резкие сдвиги в соотношении синтеза мужских и женских половых гормонов.

Женские половые гормоны

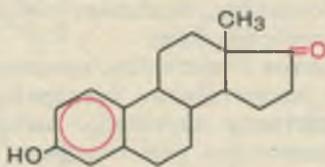
Основным местом синтеза женских половых гормонов — эстрогенов (от греч. oistros — страстное влечение) являются яичники и желтое тело; доказано также образование этих гормонов в надпочечниках, семенниках и плаценте. Впервые эстрогены обнаружены в 1927 г. в моче беременных женщин, а в 1929 г. А. Бутенандт и одновременно Э. Дойзи выделили из этого источника эстрон, который оказался первым стероидным гормоном, полученным в кристаллическом виде. В настоящее время открыты две группы женских половых гормонов, отличающихся по своей химической структуре и биологической функции: эстрогены (главный представитель — эстрадиол) и прогестины (главный представитель — прогестерон). Приводим химическое строение основных женских половых гормонов:



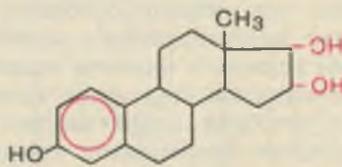
Прогестерон



Эстрадиол



Эстрон



Эстриол

Наиболее активный эстроген — эстрадиол, преимущественно синтезируемый в фолликулах; два остальных эстрогена являются производными эстрадиола и синтезируются также в надпочечниках и плаценте. Все эстрогены состоят из 18 атомов углерода. Секретция эстрогенов и прогестерона яичником носит циклический характер, зависящий от фазы полового цикла; так, в первой фазе цикла в основном синтезируются эстрогены, а во второй — преимущественно прогестерон. Предшественником этих гормонов в организме является, как и в случае кортикостероидов, холестерин, который подвергается последовательным реакциям гидроксирования, окисления и отщепления боковой цепи с образованием прегненолона. Завершается синтез эстрогенов уникальной реакцией ароматизации первого кольца, катализируемой ферментным комплексом микросом — ароматазой; предполагается, что процесс ароматизации включает минимум три оксидазные реакции и все они зависят от цитохрома P-450.

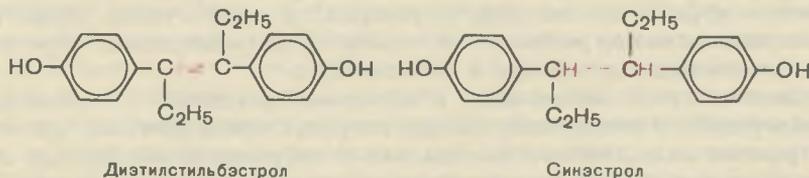
Следует указать, что во время беременности в женском организме функционирует еще один эндокринный орган, продуцирующий эстрогены и прогестерон, — плацента. Установлено, что одна плацента не может синтезировать стероидные гормоны и что функционально полноценным эндокринным органом, скорее всего, является комплекс плаценты и плода — фетоплацентарный комплекс (от лат. foetus — плод). Особенность синтеза эстрогенов заключается также в том, что исходный материал — холестерин — поставляется организмом матери; в плаценте осуществляются последовательные превращения холестерина в прегненолон и прогестерон. Дальнейший синтез имеет место только в тканях плода.

Ведущую роль в регуляции синтеза эстрогенов и прогестерона играют гонадо-

тропные гормоны гипофиза (фоллитропин и лютропин), которые опосредованно, через рецепторы клеток яичника и систему аденилатциклаза — цАМФ и, возможно, путем синтеза специфического белка контролируют синтез гормонов. Основная биологическая роль эстрогенов и прогестерона, синтез которых начинается после наступления половой зрелости, заключается в обеспечении репродуктивной функции организма женщины. В этот период они вызывают развитие вторичных половых признаков и создают оптимальные условия, обеспечивающие возможность оплодотворения яйцеклетки после овуляции. Прогестерон выполняет в организме ряд специфических функций: подготавливает слизистую оболочку матки к успешной имплантации яйцеклетки в случае ее оплодотворения; при наступлении беременности основная роль сводится к сохранению беременности; прогестерон оказывает тормозящее влияние на овуляцию и стимулирует развитие ткани молочной железы. Эстрогены оказывают анаболическое действие на организм, стимулируя синтез белка.

Распад эстрогенов, по-видимому, происходит в печени, хотя природа основной массы продуктов их обмена, выделяющихся с мочой, пока не выяснена. Они экскретируются с мочой в виде эфиров с серной или глюкуроновой кислотой, причем эстриол преимущественно выделяется в виде глюкуронида, а эстрон — эфира с серной кислотой. Прогестерон сначала превращается в печени в неактивный прегнандиол, который экскретируется с мочой в виде эфира с глюкуроновой кислотой.

В медицинской практике широкое применение получили природные гормоны и синтетические препараты, обладающие эстрогенной активностью, которые в отличие от первых не разрушаются в желудочно-кишечном тракте. К синтетическим эстрогенам относятся диэтилстильбэстрол, синэстрол, являющиеся производными углеводорода стильбена.

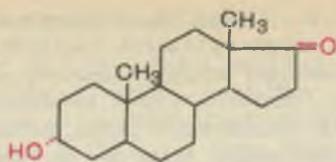


Оба этих препарата и ряд других производных стильбена нашли также применение в онкологической практике, оказывая тормозящее влияние на рост опухоли предстательной железы.

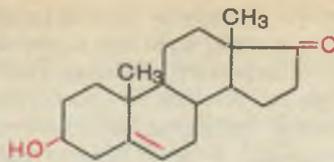
Мужские половые гормоны

В 1931 г. А. Бутенандт выделил из мочи мужчин кристаллический гормон, оказывающий стимулирующее действие на рост петушиного гребня каплунов. Этот гормон был назван андростероном (от греч. andros — мужчина), а предложенная химическая структура была подтверждена химическим синтезом, осуществленным в 1934 г. одновременно А. Бутенандтом и Л. Ружичкой. Позже из мочи мужчин был выделен еще один гормон — дегидроэпиандростерон, который обладал меньшей биологической активностью. В дальнейшем группа C_{19} -стероидов (состоит из 19 атомов углерода), обладающих способностью ускорять рост петушиного гребня, была названа андрогенами. В то же время гормон, выделенный из ткани семенников, оказался активнее андростерона почти в 10 раз и был идентифицирован в виде тестостерона (от лат. testis — семенник). Строение всех трех андрогенов может быть представлено в следующем виде (см. стр. 198):

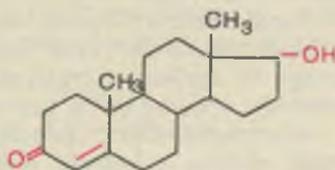
Андрогены в отличие от эстрогенов имеют две ангулярные метильные группы (у C_{10} и C_{13} -атомов), и в противоположность ароматическому характеру кольца А эстрогенов тестостерон, кроме того, содержит кетонную группу (как и кортикостероиды).



Андростерон



Дегидроэпиандростерон



Тестостерон

Биосинтез андрогенов осуществляется главным образом в семенниках и частично в яичниках и надпочечниках. Основными источниками и предшественниками андрогенов, в частности тестостерона, являются уксусная кислота и холестерин. Существуют экспериментальные доказательства, что путь биосинтеза тестостерона со стадии холестерина включает несколько последовательных ферментативных реакций через прегненолон и 17- α -оксипрегненолон. Регуляция биосинтеза андрогенов в семенниках осуществляется гонадотропными гормонами гипофиза (ЛГ и ФСГ), хотя механизм их первичного эффекта до сих пор не раскрыт; в свою очередь андрогены регулируют секрецию гонадотропинов по механизму отрицательной обратной связи, блокируя соответствующие центры в гипоталамусе.

Биологическая роль андрогенов в мужском организме в основном связана с дифференцировкой и функционированием репродуктивной системы, причем в отличие от эстрогенов андрогенные гормоны уже в эмбриональном периоде оказывают существенное влияние на дифференцировку мужских половых желез, а также на дифференцировку других тканей, определяя характер секреции гонадотропных гормонов во взрослом состоянии. Во взрослом организме андрогены регулируют развитие мужских вторичных половых признаков, сперматогенез в семенниках и т. д. Следует отметить, что андрогены обладают значительным анаболическим действием, выражающимся в стимуляции синтеза белка во всех тканях¹, но в большей степени в мышцах; для реализации анаболического эффекта андрогенов необходимым условием является присутствие соматотропина. Имеются данные, свидетельствующие об участии андрогенов, кроме того, в регуляции биосинтеза макромолекул в женских репродуктивных органах, в частности синтеза мРНК в матке.

Распад мужских половых гормонов в организме осуществляется в основном в печени по пути образования 17-кетостероидов (см. выше). Период полураспада тестостерона не превышает нескольких десятков минут. У взрослых мужчин с мочой экскретируется не более 1% неизмененного тестостерона, что свидетельствует о его расщеплении преимущественно в печени до конечных продуктов обмена. Дегидроэпиандростерон в основном экскретируется с мочой в неизмененном виде. При некоторых заболеваниях у больных увеличивается экскреция с мочой гидроксированных форм андрогенов при эквивалентном снижении выделения классических 17-кетостероидов. Следует указать также на возможность образования 17-кетостероидов из тестостерона у женщин. Отмечен высокий уровень частоты рака мо-

¹ Исключение составляет только вилочковая железа, на которую андрогены оказывают катаболическое действие.

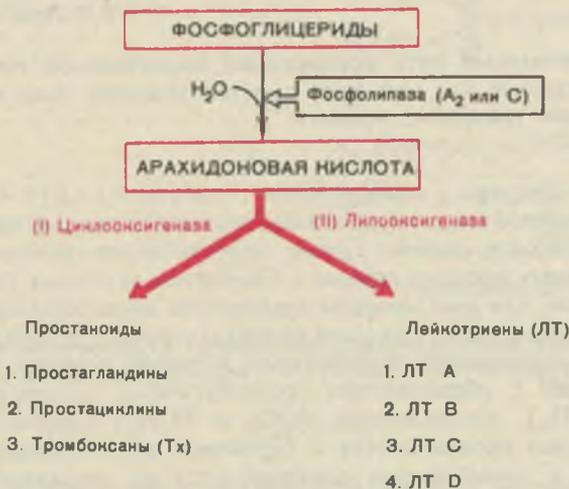
лочных желез у женщин с пониженной экскрецией 17-кетостероидов. Тестостерон и его синтетические аналоги (тестостерон-пропионат) нашли применение в медицинской практике в качестве лекарственных препаратов при лечении раковой опухоли молочной железы.

ПРОСТАГЛАНДИНЫ

Термин «простагландины» был введен У. Эйлером, впервые показавшим, что в сперме человека и экстрактах из семенных пузырьков барана содержатся вещества, оказывающие выраженное вазопрессорное действие и вызывающие сокращение гладкой мускулатуры матки. Хотя предположение У. Эйлера о том, что эти вещества являются специфическим секретом предстательной железы (prostata) в дальнейшем не подтвердилось, поскольку, как теперь установлено, они обнаружены во всех органах и тканях¹, тем не менее этот термин в литературе сохранился (синоним — простагландины).

В последнее десятилетие простагландины и родственные им биологически активные соединения (лейкотриены, простаглицлины, тромбоксаны) были предметом пристального внимания исследователей. Объясняется это тем, что, помимо широкого распространения в тканях, они оказывают сильное фармакологическое действие на множество физиологических функций организма, регулируя гемодинамику почек, сократительную функцию гладкой мускулатуры, секреторную функцию желудка, жировой, водно-солевой обмен и др. Имеются данные, свидетельствующие, что простагландины, вероятно, не являются «истинными» гормонами, но модулируют действие гормонов; биологические эффекты простагландинов, по-видимому, опосредованы через циклические нуклеотиды.

В последнее время были подтверждены представления С. Бергстрёма и сотр., что предшественником всех простагландинов являются полиненасыщенные жирные кислоты, в частности арахидоновая кислота (и ряд ее производных, дигомо-γ-линоленовая и пентановая кислоты, в свою очередь образующиеся в организме из линолевой и линоленовой кислот) (см. главу 10). Арахидоновая кислота после освобождения из фосфоглицеридов (фосфолипидов) биомембран, в зависимости от ферментативного пути превращения, дает начало простагландинам и лейкотриенам по схеме:



¹ Простагландины и ферментные системы, катализирующие их биосинтез, не обнаружены только в эритроцитах человека. Следует, однако, отметить, что наибольшее количество простагландинов содержат органы и ткани, относящиеся к репродуктивной системе.

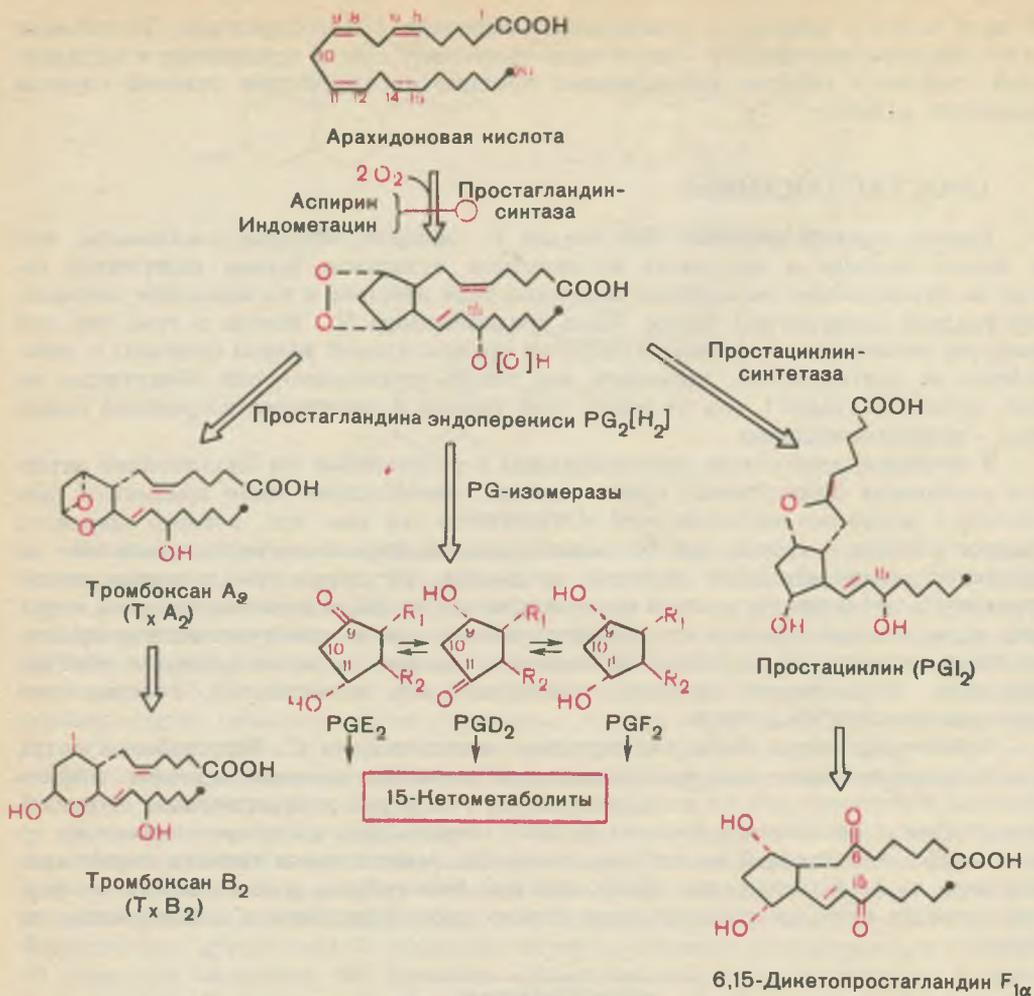


Рис. 6.1. Циклооксигеназный путь превращения арахидоновой кислоты. R_1 и R_2 – боковые цепи, идентичные для всех трех простагландинов. Знаком «—» обозначено блокирующее действие указанных веществ.

Первый путь получил наименование циклооксигеназного пути превращения арахидоновой кислоты, поскольку первые стадии синтеза простагландинов катализируются циклооксигеназой, точнее простагландин-синтазой (КФ 1.14.99.1). Известные к настоящему времени данные о биосинтезе основных простаноидов обобщены в рис. 6.1. Видно, что центральным химическим процессом биосинтеза является включение молекулярного кислорода (двух молекул) в структуру арахидоновой кислоты, осуществляемое специфическими оксигеназами, которые, помимо окисления, катализируют и циклизацию с образованием промежуточных продуктов простагландин-эндоперекисей $PG_2[H_2]$, обозначаемых PGG_2 и PGH_2 ; последние под действием простагландин-изомераз превращаются в первичные простагландины. Видно также, что простагланцины и тромбоксаны синтезируются из указанных промежуточных продуктов при участии отличных от изомераз ферментов. Детали механизма биосинтеза простаноидов пока до конца не выяснены, как и пути их окисления до конечных продуктов обмена.

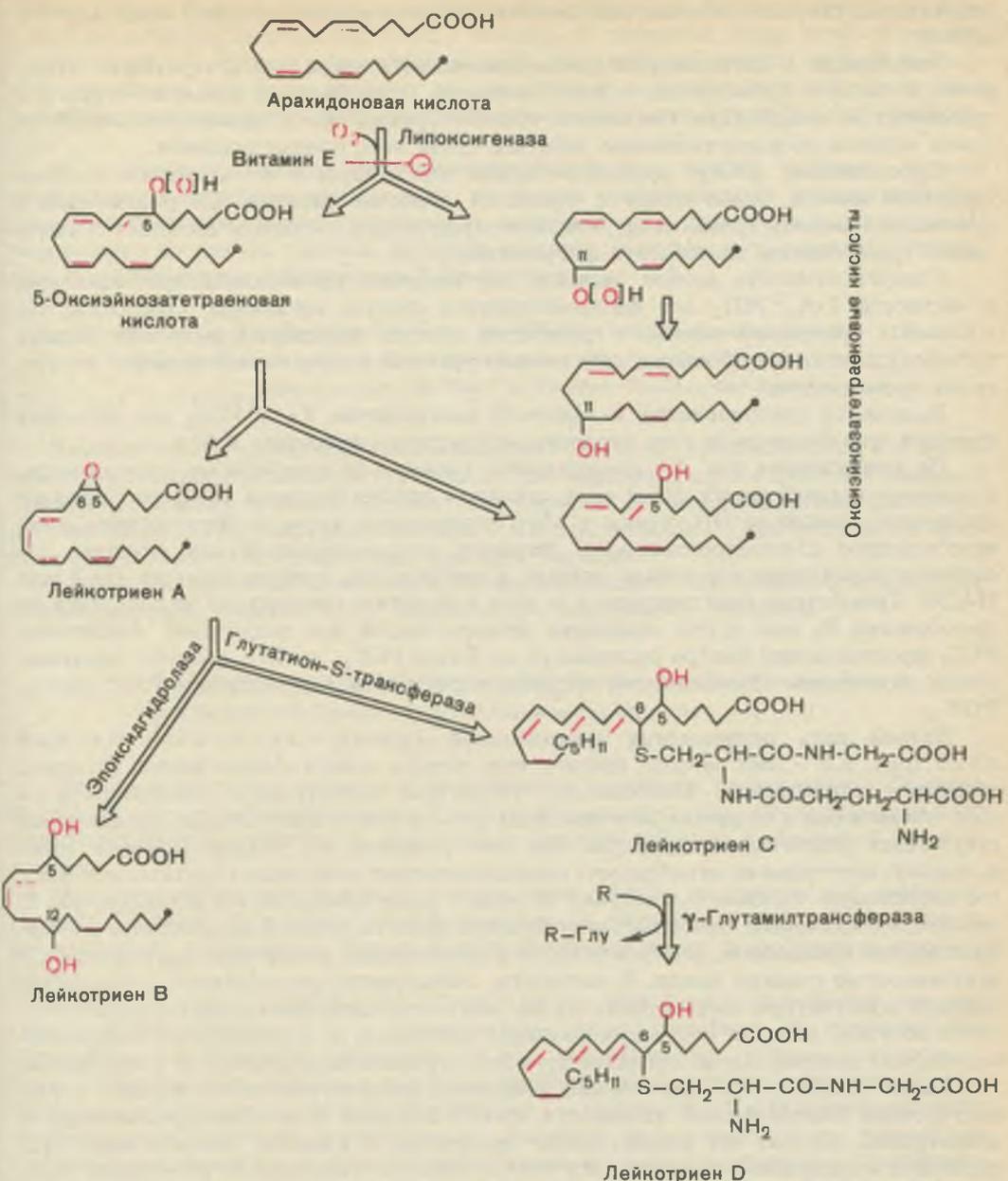


Рис. 6.2. Липоксигеназный путь превращения арахидоновой кислоты. R — акцептор остатка глутаминовой кислоты. Знаком «—» обозначено блокирующее действие витамина E.

Первичные простагландины синтезируются во всех клетках (за исключением эритроцитов), действуют на гладкую мускулатуру желудочно-кишечного тракта, репродуктивной и респираторной тканей, а также сосудов, модулируют активность других гормонов, автономно регулируют нервное возбуждение, процессы воспаления

(медиаторы), скорость почечного кровотока; действие их опосредовано через цАМФ и цГМФ.

Тромбоксан А синтезируется преимущественно в ткани мозга, селезенки, легких, почек, а также в тромбоцитах и воспалительной грануле; он вызывает агрегацию тромбоцитов, способствуя, тем самым, тромбообразованию и, кроме того, оказывает самое мощное сосудосуживающее действие среди всех простагландинов.

Простаглицин (PGI_2) преимущественно синтезируется в эндотелии сосудов, сердечной мышце, ткани матки и слизистой оболочке желудка. Он расслабляет, в противоположность тромбоксану, гладкую мускулатуру сосудов и вызывает дезагрегацию тромбоцитов, способствуя фибринолизу.

Следует отметить особое значение соотношения тромбоксаны:простаглицины, в частности $TxA_2:PGI_2$ для физиологического статуса организма. Оказалось, что у больных, предрасположенных к тромбозам, имеется тенденция к смещению баланса в сторону агрегации; у больных, страдающих уреимией, напротив, наблюдается дезагрегация тромбоцитов.

Выдвинуто предположение о важности соотношения $TxA_2:PGI_2$ для регуляции функции тромбоцитов *in vivo*, сердечно-сосудистого гомеостаза и т. д.

На приведенном рис. 6.1 представлены также пути катаболизма протаноидов. Начальной стадией катаболизма «классических» простагландинов является стереоспецифическое окисление ОН-группы у 15-го углеродного атома с образованием соответствующего 15-кетопроизводного. Фермент, катализирующий эту реакцию, 15-оксипростагландиндегидрогеназа открыт в цитоплазме, требует наличия НАД или НАДФ. Тромбоксан инактивируется *in vivo* или путем химического расщепления до тромбоксана B_2 или путем окисления дегидрогеназой или редуктазой. Аналогично PGI_2 (простаглицин) быстро распадается до 6-кето- $PGF_{1\alpha}$ *in vitro*, а *in vivo* инактивируется окислением 15-оксипростагландиндегидрогеназой с образованием 6,15-дикето- $PGF_{1\alpha}$.

Второй путь превращения арахидоновой кислоты — липооксигеназный путь (рис. 6.2) — дает начало синтезу еще одного класса биологически активных веществ — лейкотриенов. Особенности структуры лейкотриенов заключаются в том, что хотя они и содержат 20 углеродных атомов (как и протаноиды), однако у них отсутствует циклическая структура, все они содержат по четыре двойных связи и, наконец, некоторые из них образуют пептидолипидные комплексы с глутатионом или с его составными частями (лейкотриен D может далее превращаться в лейкотриен E, теряя остаток глицина). Основные биологические эффекты лейкотриенов связаны с воспалительными процессами, аллергическими и иммунными реакциями, анафилаксией и деятельностью гладких мышц. В частности, лейкотриены способствуют сокращению гладкой мускулатуры дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, регулируют тонус сосудов, обладая сосудосуживающим действием, и стимулируют сокращение коронарных артерий. Катаболические пути лейкотриенов окончательно не установлены.

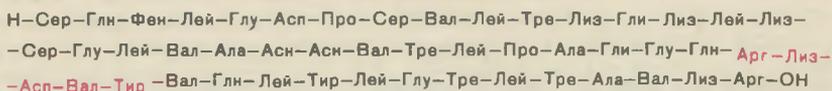
Таким образом, благодаря своему широкому распространению и высокой и разносторонней биологической активности простагландины (и вообще протаноиды) и лейкотриены находят все возрастающее применение в качестве лекарственных препаратов в медицинской практике. Эти обстоятельства стимулируют проведение дальнейших исследований как по пути поиска новых протаноидов, так и по пути химического синтеза их аналогов с защищенными функциональными группами, более стабильных при введении в организм.

ГОРМОНЫ ВИЛОЧКОВОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ТИМУСА)

Роль тимуса как эндокринной железы известна давно. Известно также, что тимус поставляет вскоре после рождения лимфоидные клетки в лимфатические узлы и селезенку и осуществляет образование и секрецию специфических гормонов, оказывающих влияние на развитие и созревание определенных клеток лимфоидной ткани.

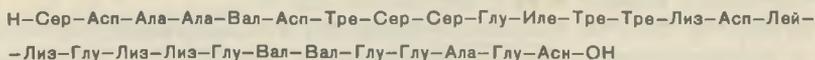
Неизвестными, однако, оставались вопросы, связанные с химической природой гормонально активных препаратов, хотя в опытах на животных было четко показано, что бесклеточный экстракт вилочковой железы оказывает влияние как на рост целостного организма, так и на развитие и поддержание иммунологической компетентности, обеспечивая нормальное функционирование клеточного и гуморального иммунитета.

К настоящему времени из экстрактов вилочковой железы выделено и охарактеризовано несколько гормонов, в основном представленных низкомолекулярными полипептидами. Ниже представлена первичная структура тимопоэтина II, выделенного из тимуса теленка, который является, по-видимому, основным гормоном, стимулирующим образование Т-лимфоцитов.



Тимопоэтин II состоит из 49 аминокислотных остатков¹, предполагается, что активным центром гормона является пентапептид (он выделен красным цветом и занимает 32–36-е положение с N-конца). Недавно этот короткий пятичленный пептид синтезирован химически, он получил наименование тимопентина-5; при введении в организм он усиливает неспецифические факторы защиты.

Еще одним гормоном, выделенным А. Гольдштейном и сотр. из вилочковой железы теленка, является тимозин α_1 (28 аминокислот) следующего строения:



Предполагается, что тимозин α_1 в организме выполняет регуляторную функцию на поздних стадиях дифференцировки Т-клеток. Показано, кроме того, что он оказывает выраженное фармакологическое действие при лечении лейкозов и иммунной недостаточности.

Недавно получен новый гормон тимуса (нонапептид), индуцирующий дифференцировку Т-клеток. Для проявления биологической активности он требует наличия двухвалентных ионов цинка. Цинксодержащий гормон имеет своеобразную конфигурацию.

Таким образом, в данной главе описаны не все известные к настоящему времени гормональные вещества. Так, в шишковидной железе (эпифизе) из аминокислоты триптофана синтезируется интересный, но малоизученный гормон — мелатонин. Более 20 биологически активных гормонов выделены из желудочно-кишечного тракта. Наиболее изученными из них являются гастрин I и гастрин II (17 и 14 аминокислотных остатков соответственно), регулирующие секрецию желудочного сока, прогастрин (34 АМК), считающийся циркулирующей в крови формой прогормона и превращающийся в активный гастрин I в клетках органа-мишени, а также глюкагон и секретин (27 АМК) (последний был первым, идентифицированным в качестве гормона, веществом). В слизистой оболочке кишечника синтезируется, кроме того, соматостатин. Выказано предположение, что интестинальные соматостатин и глюкагон регулируют секрецию гормонов, синтезируемых соответственно в гипоталамусе и поджелудочной железе. Сведения о других гормонах, включая растительные гормоны, частично можно найти в главах 11, 16 или в специальной литературе.

¹ Аналогичный 49-членный гормон недавно выделен из селезенки быка; он назван спленином (синоним тимопоэтин III), отличается тем, что в положении 34 вместо Асп содержит Глу.

ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ЭНЕРГИИ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

Обмен веществ и энергии — закономерный порядок превращения веществ и энергии в живых системах, направленный на их сохранение и самовоспроизведение. Обмен веществ и обмен энергии неразрывно связаны и представляют собой диалектическое единство.

Рассматривая обмен веществ в организмах, Ф. Энгельс подчеркивал диалектический характер этого процесса: «Растение, животное, каждая клетка в каждое мгновение своей жизни тождественны с собой и тем не менее отличаются от самих себя благодаря усвоению и выделению веществ, благодаря дыханию, образованию и отмиранию клеток, благодаря происходящему процессу циркуляции — словом, благодаря сумме непрерывных молекулярных изменений, которые составляют жизнь и общие итоги которых выступают воочию в виде жизненных фаз...»¹

Как указывал Ф. Энгельс, важнейшим свойством жизни является постоянный обмен веществ, с прекращением которого прекращается жизнь. Итак, обмен веществ — существенный и непрменный признак жизни.

Вся совокупность химических реакций, протекающих в живых организмах, включая усвоение веществ, поступающих извне (ассимиляция) и их расщепление (диссимиляция) вплоть до образования конечных продуктов, подлежащих выделению, составляет сущность и содержание обмена веществ. Отсюда понятно, что изучение обмена веществ — одна из основных задач биохимии.

Обмен веществ складывается из огромного количества химических реакций, каждая из которых может быть воспроизведена в отдельности в лабораторных условиях. Однако специфику обмена веществ определяют не сами по себе эти реакции, а особое сочетание, строгая согласованность и темп протекания реакций. Важнейшая характерная черта биологической формы движения — саморегуляция, которая возникает как результат совокупности химических реакций, из которых каждая в отдельности не обладает в полной мере способностью саморегулироваться, но, вместе взятые, они образуют систему, обнаруживающую свойства механизма с обратной связью.

С последовательно материалистических позиций рассматривал роль обмена веществ в жизни организмов основоположник отечественной физиологии И. М. Сеченов, а К. А. Тимирязев последовательно проводил идею о том, что основное свойство, которое характеризует живые организмы, заключается в постоянном деятельном обмене между веществом, составляющим организм, и веществом окружающей среды, которое организм постоянно воспринимает, ассимилирует, превращает его в себе подобное, вновь изменяет и выделяет в процессе диссимиляции. И. П. Павлов рассматривал обмен веществ как основу проявления жизнедеятельности, как основу физиологических функций организма. Существенный вклад в изучение химических основ жизненных процессов сделал А. И. Опарин, который изучал основные закономерности эволюции обмена веществ в ходе возникновения и развития жизни на Земле.

¹ Маркс К. и Энгельс Ф. Соч., 2-е изд., т. 20, с. 529.

О ПРЕВРАЩЕНИИ ХИМИЧЕСКОЙ ЭНЕРГИИ В ОРГАНИЗМЕ

В живых организмах химическая энергия превращается в другие виды энергии и используется для выполнения ряда функций прямо без промежуточной теплопродукции. Поскольку в основе жизнедеятельности не лежит принцип непосредственного использования тепловой энергии, простое окисление органических веществ в организме с выделением энергии исключительно в тепловой форме явилось бы бесполезной потерей энергии.

Первичным источником энергии для всей живой природы является солнечное излучение. Все многообразие организмов, обитающих на Земле, по использованию источников энергии можно разделить на две основные группы: автотрофные и гетеротрофные организмы. Первые (автотрофы) — прежде всего зеленые растения, способны непосредственно использовать лучистую энергию Солнца в процессе фотосинтеза, создавая органические соединения (углеводы, аминокислоты, жирные кислоты и др.) из неорганических веществ (рис. 7.1). Остальные живые организмы (гетеротрофы) ассимилируют уже готовые органические вещества, используя их как источник энергии или пластического материала для построения своего тела. Следует отметить, что большинство микроорганизмов тоже являются гетеротрофами. Однако они не способны поглощать целые пищевые частицы и выделяют в окружающую среду специальные переваривающие ферменты, которые расщепляют пищевые вещества, превращая их в малые, растворимые молекулы, которые могут проникнуть в клетки.

Как уже отмечалось, углеводы, жиры или белки и продукты их расщепления не могут непосредственно служить «топливом» для клеточных процессов. В результате таких

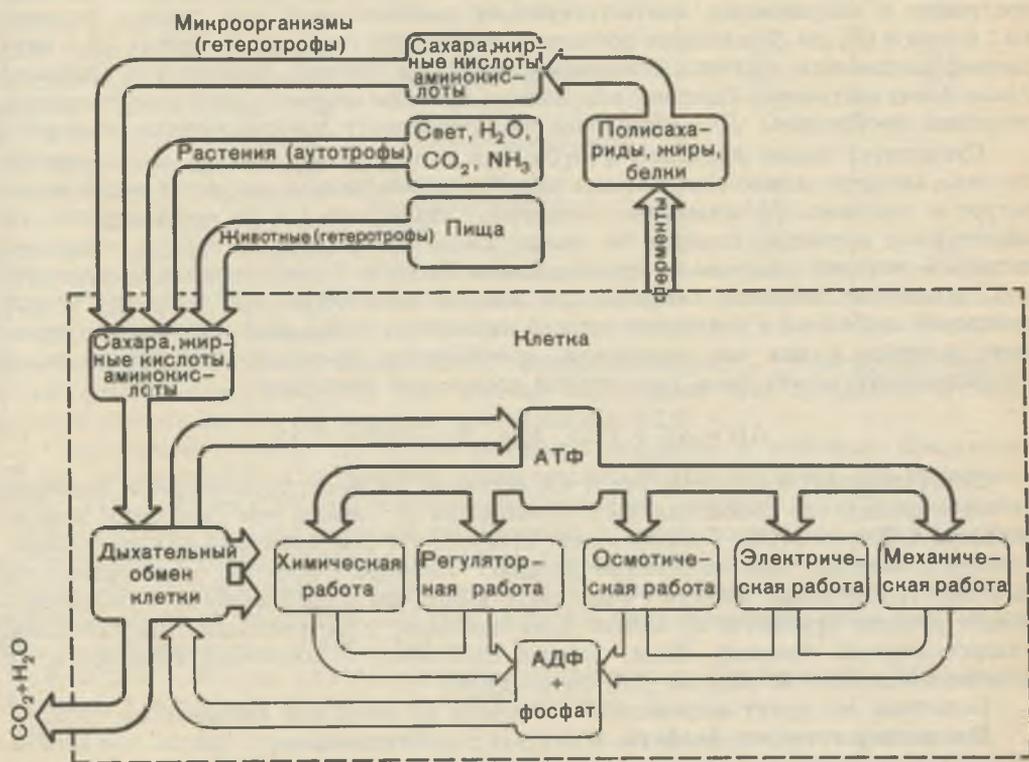


Рис. 7.1. Схематическое изображение превращений энергии, протекающих в клетке.

процессов, как тканевое дыхание, брожение и гликолиз, которые занимают центральное место в обмене веществ, происходит постепенное освобождение и аккумуляция энергии, заключенной в молекулах сложных органических соединений.

Некоторые аспекты биоэнергетики

Чтобы понять сущность процессов обмена энергии, необходимо познакомиться с рядом общих положений термодинамики. Первый закон термодинамики — это закон о сохранении энергии. Этот закон утверждает, что энергию нельзя ни создать, ни уничтожить. Математически первый закон термодинамики можно выразить следующей формулой:

$$Q = \Delta H + W',$$

где Q — энергия в виде теплоты; ΔH — изменение энтальпии (или теплосодержания системы) при постоянном давлении; W' — полезная работа, выполненная благодаря введению определенного количества теплоты Q .

Данное уравнение справедливо для идеальной обратимой системы, т. е. такой системы, которая, будучи переведенной в новое состояние путем поглощения энергии, может вновь возвратиться в исходное состояние и освободить то же самое количество ранее поглощенной энергии. Последняя может быть использована для совершения новой работы.

Однако в природе полностью обратимых систем не существует. Самопроизвольно химические процессы могут протекать лишь в одном направлении — в направлении состояния равновесия. Предсказать направление биохимических реакций позволяет второй закон термодинамики, согласно которому все самопроизвольные процессы протекают в направлении, соответствующем максимальной при данных условиях энтропии (S), до достижения состояния равновесия системы. Энтропия (S) — мера разупорядоченности системы. Увеличение энтропии системы препятствует возврату к исходному состоянию. Поэтому все реакции, которые сопровождаются возрастанием энтропии, необратимы. Для обращения их затрачивают дополнительную энергию.

Существует также понятие — свободная энергия. Это та часть энергии системы, которую можно использовать для совершения работы при постоянных температуре и давлении. Ее изменение обозначают символом ΔG . Ту же часть энергии химического процесса, которая не может быть превращена в работу, называют связанной энергией и выражают произведением $T\Delta S$ (где T — абсолютная температура, а ΔS — изменение энтропии системы при данном химическом превращении). Сумма изменений свободной и связанной энергий называется энтальпией (или теплосодержанием системы) и, как уже отмечалось, обозначается символом ΔH . Второй закон термодинамики может быть представлен следующей формулой:

$$\Delta H = \Delta G + T\Delta S \quad \text{или} \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S.$$

Если (например, в ходе реакции $A \rightarrow B$) величина ΔG имеет отрицательное значение, то это означает, что свободная энергия вещества B меньше, чем свободная энергия вещества A . В этом случае реакция может происходить самопроизвольно с выделением свободной энергии (экзергонический процесс). Наоборот, если ΔG — положительная величина, то свободная энергия у вещества B выше, чем у соединения A , и самопроизвольно реакция протекать не может. Она протекает с потреблением энергии извне (эндергонический процесс). Если система находится в состоянии равновесия, то количество свободной энергии (ΔG) равно нулю.

Величины ΔG могут выражаться в джоулях на моль или калориях на моль.

Высокоэнергетические фосфаты. В клетках освобождающаяся в результате катаболических процессов распада питательных веществ свободная энергия в дальнейшем может быть использована для осуществления многих химических реакций, протекающих с затратой энергии (см. рис. 7.1).

Запасание энергии происходит в виде богатых энергией химических связей особого класса соединений, большинство из которых является ангидридами фосфорной кислоты (нуклеозидтрифосфаты).

Существуют высокоэнергетические и низкоэнергетические фосфаты. Условной границей для этих двух групп соединений является величина свободной энергии гидролиза фосфатной связи. Следовательно, высокоэнергетические фосфаты имеют богатую энергией высокоэнергетическую (макроэнергетическую) фосфатную связь.

Когда говорят о богатых энергией связях¹, то в этом случае энергию связи определяют как разницу свободных энергий соединений, содержащего эту связь, и соединений, получающихся после ее разрыва. Макроэнергетическими (богатыми энергией) принято считать те связи, при гидролизе которых изменения свободной энергии системы ($-\Delta G$) составляют более 21 кДж/моль (или более 5 ккал/моль).

Центральную роль в энергообмене клеток всех типов осуществляет система адениновых нуклеотидов, которая включает в себя АТФ, АДФ и АМФ, а также неорганический фосфат (Φ_n) и ионы магния. АТФ является термодинамически неустойчивой молекулой и гидролизуется с образованием АДФ или АМФ. Именно эта неустойчивость позволяет АТФ выполнять функцию переносчика химической энергии, необходимой для удовлетворения большей части энергетических потребностей клеток. К соединениям, обладающим богатой энергией связью, помимо АТФ, относятся также УТФ, ЦТФ, ГТФ, ТТФ, креатинфосфат, пирозинфосфат, некото-

Таблица 7.1. Стандартная свободная энергия гидролиза (ΔG°) некоторых высокоэнергетических и низкоэнергетических соединений, а также свободная энергия гидролиза ряда соединений при физиологических условиях (ΔG_ϕ)

Соединения	$-\Delta G^\circ$, кДж/моль	$-\Delta G_\phi$, кДж/моль
<i>Высокоэнергетические</i>		
Фосфоенолпируват	61,7	66,7
1,3-Бисфосфоглицерат	49,2	41,7
Креатинфосфат	42,5	41,7
АТФ \rightarrow АДФ + Φ_n	30,4	50,0
Ацетил-КоА	30,4	
АДФ \rightarrow АМФ + Φ_n	28,3	50,0
Пирозинфосфат ($H_4P_2O_7$)	28,3	50,0
УДФ-глюкоза	24,2	
<i>Низкоэнергетические</i>		
Глюкозо-1-фосфат	21,0	
Фруктозо-6-фосфат	13,8	
АМФ	14,1	
Глюкозо-6-фосфат	13,8	23,8
Глицерол-3-фосфат	9,2	

рые тиозифиры (например, ацетил-КоА), фосфоенолпируват, 1,3-бисфосфоглицерат и ряд других соединений (табл. 7.1). Однако образование этих соединений в большинстве случаев зависит от энергии, поставляемой АТФ.

Стандартные условия: 1,0 М концентрации исходных и конечных продуктов, рН 7,0, температура 37°C и избыток ионов магния. В этих условиях при гидролизе АТФ ($ATP + H_2O \rightarrow ADP + \Phi_n$) изменение свободной энергии ($-\Delta G^\circ$) составляет -30,4 кДж/моль. При физиологических условиях в клетке не имеется таких высоких концентраций исходных веществ и их продуктов, а также ионов магния. Кроме того, возможны отклонения и в значениях рН. Поэтому в физиологических условиях реальная свободная энергия ($-\Delta G_\phi$) гидролиза концевой фосфатной связи АТФ будет иная и приближается к -50,0 кДж/моль.

Величина $-\Delta G_\phi$ для других соединений отличается от стандартной ($-\Delta G^\circ$), но не обязательно в сторону больших значений (см. табл. 7.1).

¹ Понятие «богатая энергией связь», которым пользуются биохимики, отличается от понятия «энергия связи», под которым в физической химии понимают энергию, необходимую для разрыва в молекуле связи между двумя атомами.

Заметим, что АТФ, хотя и служит ключевым энергетическим посредником в обмене веществ, не является веществом, наиболее «богатым» энергией. АТФ находится в середине энергетической шкалы.

Возможно несколько вариантов освобождения энергии фосфатных связей АТФ. Основной вариант — это отщепление концевой фосфата АТФ ($\text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{АДФ} + \text{H}_3\text{PO}_4$). Другой вариант — пиродифосфатное расщепление АТФ ($\text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{АМФ} + \text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$). Этот тип реакций значительно реже используется в биохимических процессах. Образующийся пиродифосфат относится к «богатым энергией» веществам. Однако богатые энергией связи пиродифосфата редко используются для синтеза других веществ, так как при его гидролизе энергия освобождается в виде теплоты.

При гидролизе концевой фосфатной связи АДФ высвобождается такое же количество энергии, как и при отщеплении концевой фосфатной связи АТФ. Казалось бы, что АДФ может во многих реакциях заменить АТФ, в частности в реакциях фосфорилирования. Однако эта возможность не реализуется в биохимических процессах. До сих пор реакции фосфорилирования при участии АДФ неизвестны. В действительности происходит гидролиз АДФ ($\text{АДФ} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{АМФ} + \text{H}_3\text{PO}_4$) до низкоэнергетических АМФ и фосфата с выделением теплоты.

Итак, накопление энергии в специфических фосфатных связях АТФ лежит в основе механизма переноса энергии в живой клетке. Есть основания считать, что в клетке существуют три основных типа перехода энергии АТФ: в энергию химических связей, в тепловую энергию и энергию, затрачиваемую на совершение работы (осмотической, электрической, механической и др.).

ПИТАНИЕ — СОСТАВНАЯ ЧАСТЬ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Поскольку основным энергетическим источником для человека является энергия, запасенная в химических связях компонентов пищевых продуктов, питание человека следует рассматривать как один из факторов окружающей среды, существенно влияющий на его здоровье и продолжительность жизни. Разработкой основ рационального питания здоровых людей занимается гигиена питания, питанием больных — диетология. Для взрослого человека при средней по утомляемости работе требуется суточный рацион в 3000 ккал (1 ккал = 4,19 кДж). С увеличением энергозатрат возрастает и потребность в пищевых продуктах.

Существует понятие о сбалансированном рациональном питании, т. е. соотношении белков, жиров, углеводов — 1 : 1 : 4, за счет чего обеспечивается суточная энергетическая потребность организма. Белки обеспечивают 15% суточной энергетической потребности, жиры — 30% и углеводы — 55%, причем белки животного происхождения должны составлять не менее половины общего количества белка, 75–80% общего количества жира должно приходиться на животные жиры и 20–25% — на растительные масла. Чтобы питание было полноценным, в пищевой рацион обязательно должны быть включены мясо, рыба, молочные продукты (основные источники белка и липидов), а также овощи, фрукты (источники углеводов), минеральные вещества, витамины.

АНАБОЛИЗМ И КАТАБОЛИЗМ — ОСНОВНЫЕ ПРОЦЕССЫ МЕТАБОЛИЗМА

Метаболизм¹ — превращение веществ в организме с момента поступления их в клетки до образования конечных продуктов обмена, т. е. совокупность химических реакций, протекающих в живых клетках и обеспечивающих организм веществами и энергией для его жизнедеятельности, роста, размножения.

¹ Синоним понятия «обмен веществ и энергии», ранее метаболизм нередко именовали промежуточным обменом.

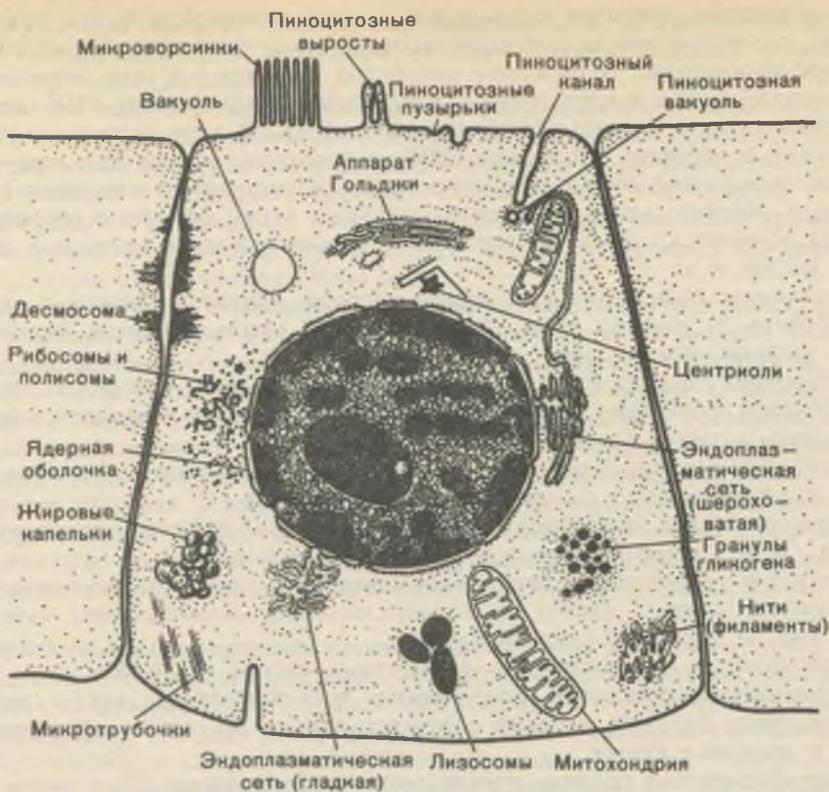


Рис. 7.2. Схематическое изображение «обобщенной» клетки (по Леви и Сикевичу).

Попав внутрь клетки, питательное вещество претерпевает ряд химических изменений, катализируемых ферментами. Определенная последовательность таких химических изменений называется метаболическим путем, а образующиеся промежуточные продукты — метаболитами.

Различают две стороны обмена веществ — анаболизм и катаболизм. Анаболические процессы направлены на образование и обновление структурных элементов клеток и тканей и заключаются в синтезе сложных молекул из более простых. Эти процессы восстановительные и сопровождаются затратой свободной химической энергии (эндергонические процессы). Катаболические превращения — это расщепление сложных молекул, как поступивших с пищей, так и входящих в состав клетки, до простых компонентов; эти процессы окислительные и сопровождаются выделением свободной энергии (экзергонические процессы). Обе стороны метаболизма тесно взаимосвязаны во времени и пространстве. Выяснение отдельных звеньев процесса обмена веществ и энергии у разных классов растений, животных и микроорганизмов обнаружило принципиальную общность путей биохимических превращений в живой природе.

Катаболические и анаболические пути, в особенности у эукариотических особей, отличаются по своей локализации в клетке. В настоящее время благодаря электронно-микроскопическим и гистохимическим исследованиям, а также методу дифференциального центрифугирования достигнуты значительные успехи в определении внутриклеточной локализации ферментов. На рис. 7.2 видно, что в клетке можно обнаружить клеточную, плазматическую, мембрану, ядро, митохондрии, лизосомы,

рибосомы, систему канальцев и пузырьков — эндоплазматическую сеть, пластинчатый комплекс, различные вакуоли, внутриклеточные включения и др. Главную по массе недифференцированную часть клетки составляет гиалоплазма (или цитозоль).

Установлено, что в ядре (точнее, в ядрышке) локализованы РНК-полимеразы, т. е. ферменты, катализирующие образование мРНК. В ядре содержатся ферменты, участвующие в процессе репликации ДНК, и некоторые другие (см. главу 12).

С митохондриями связаны ферменты цепи биологического окисления (тканевого дыхания) и окислительного фосфорилирования, а также ферменты пируватдегидрогеназного комплекса, цикла трикарбоновых кислот, синтеза мочевины, окисления жирных кислот и др.

В лизосомах содержатся в основном гидролитические ферменты с оптимумом рН в области 5. Именно из-за гидролитической принадлежности ферментов эти частицы названы лизосомами.

В рибосомах локализованы ферменты белкового синтеза, в этих частицах происходят процессы трансляции мРНК и связывание аминокислот в полипептидные цепи с образованием молекул белка.

В эндоплазматической сети сосредоточены ферменты синтеза липидов, а также ферменты, участвующие в реакциях гидроксिलирования.

С плазматической мембраной прежде всего связаны АТФаза, транспортирующая ионы Na^+ и K^+ , аденилатциклаза и ряд других ферментов.

В цитозоле (гиалоплазме) локализованы ферменты гликолиза, пентозофосфатного цикла, синтеза жирных кислот и мононуклеотидов, активирования аминокислот, а также многие ферменты глюконеогенеза.

Существующая приуроченность ферментных систем к определенным участкам клетки (компартаментализация) обеспечивает как разделение, так и интеграцию внутриклеточных функций, а также соответствующую регуляцию процессов обмена веществ и энергии в клетке.

Мультиферментные системы локализованы в структуре органелл таким образом, что каждый фермент располагается в непосредственной близости от следующего фермента данной последовательности реакций. Благодаря этому сокращается время, необходимое для диффузии промежуточных продуктов реакций, и вся последовательность реакций оказывается строго координированной во времени и пространстве. Это справедливо, например, для ферментов, участвующих в окислении пировиноградной кислоты и жирных кислот, синтезе белка, а также для ферментов переноса электронов в дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования. Кроме того, компартаментализация обеспечивает возможность протекания в одно и то же время как анаболических, так и катаболических процессов. Так, в клетке одновременно может происходить окисление жирных кислот с длинной цепью до стадии ацетил-КоА и противоположно направленный процесс — синтез жирных кислот из ацетил-КоА. Эти химически несовместимые процессы протекают в разных частях клетки: окисление жирных кислот — в митохондриях, а синтез — в гиалоплазме.

Методы изучения обмена веществ

Методы изучения процессов метаболизма можно подразделить на две основные группы: методы изучения метаболизма на целых организмах и аналитически-дезинтегрирующие методы.

Изучение процессов метаболизма на целом организме. В опытах на животных с экспериментальным диабетом, у которых с мочой выводятся большие количества глюкозы, было установлено, что введение таких аминокислот, как аланин, серин, глутаминовая кислота, вызывает еще более усиленное выведение глюкозы с мочой. На этом основании было сделано заключение, что эти аминокислоты могут служить метаболическими предшественниками глюкозы. На целых организмах также установлено, что мочевина, содержащаяся в моче многих млекопитающих, представ-

ляет собой главный продукт катаболизма белковых тел. Исследования на целом организме — наиболее старый метод, но он значительно обновился в результате применения изотопов (меченых атомов).

Обычно используются либо стабильные изотопы элементов, отличающихся по массе от широко распространенных в организме элементов (тяжелые изотопы), либо радиоактивные изотопы. Из стабильных изотопов чаще используют изотопы водорода с массой 2 (дейтерий, ^2H), азот с массой 15 (^{15}N), углерод с массой 13 (^{13}C) и кислород с массой 18 (^{18}O). Из радиоактивных изотопов применяются изотопы водорода (тритий, ^3H), фосфора (^{32}P и ^{33}P), углерода (^{14}C), серы (^{35}S), йода (^{131}I), железа (^{59}Fe), натрия (^{24}Na) и др.

Пометив при помощи стабильного или радиоактивного изотопа молекулу исследуемого соединения и введя его в организм, определяют затем меченые атомы или содержащие их химические группы в определенных соединениях, и, открыв их, делают заключение о путях превращения меченого вещества в организме. С помощью изотопного метода можно установить время пребывания вещества в организме, которое с известным приближением характеризует период его полураспада, т. е. время, за которое количество изотопа или меченого соединения уменьшается вдвое, или получить точные сведения относительно проницаемости мембран отдельных клеток. Изотопы применяются также, чтобы установить, является ли данное вещество предшественником или продуктом распада другого соединения. Наконец, при существовании нескольких путей обмена веществ можно определить, какой из них преобладает.

Аналитически-дизинтегрирующие методы. Принцип этих методов состоит в поэтапном упрощении, а точнее дезинтеграции, сложной биологической системы с целью изолирования отдельных ее частей. Если рассматривать эти методы в нисходящей последовательности, т. е. от более сложных к более простым системам, то их можно расположить в следующем порядке: удаление отдельных органов, метод тканевых срезов и клеточных культур, получение гомогенатов и субклеточных фракций, частичная или полная реконструкция ферментной системы *in vitro* с использованием ферментов, коферментов и других компонентов реакции.

Удаление органов. При удалении органов имеются два объекта исследования: организм без удаленного органа и изолированный орган. В частности, путем изучения перфузата в опытах с изолированными органами было установлено, что печень служит главным местом образования кетоновых тел и мочевины.

Метод тканевых срезов и клеточных культур. Получив тонкие срезы органа (ткани) при помощи микротомы, их помещают в специальную среду, содержащую те или иные соединения, и при определенных температуре и составе газовой среды (опыты обычно проводят в сосудах аппарата Варбурга) исследуют получающиеся при этом продукты. Например, с помощью такой методики можно изучать тканевое дыхание (потребление кислорода и выделение углекислого газа тканями).

Одним из подходов к изучению метаболизма является применение культуры клеток. При этом появляется возможность использовать «чистую» однородную клеточную популяцию, практически свободную от примеси других клеток. Особенно важен данный подход в тех случаях, когда необходимо исключить нейрогормональное влияние на изучаемые процессы метаболизма.

Гомогенаты и отдельные субклеточные фракции. Разрушение клеточных мембран делает возможным непосредственный контакт между содержимым клетки и добавленными соединениями. Это дает возможность установить, какие ферменты, коферменты и субстраты имеют значение для исследуемого процесса.

Применение метода дифференциального центрифугирования гомогенатов позволяет изучать процессы обмена веществ, связанные с различными органеллами клетки — митохондриями, лизосомами, рибосомами, ядром и др. Например, для изучения путей и механизмов синтеза белка используют изолированные рибосомы, а для исследу-

дования окислительных реакций цикла Кребса или цепи дыхательных ферментов служат митохондрии.

Использование с целью интеграции высокоочищенных ферментов и коферментов. С помощью данного метода, например, стало возможным полностью воспроизвести систему брожения, которая имеет все существенные признаки брожения дрожжей (см. главу 9).

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Регуляция метаболизма на клеточном и субклеточном уровнях осуществляется прежде всего путем регуляции синтеза и каталитической активности ферментов. К таким регуляторным механизмам относятся: подавление синтеза ферментов конечным продуктом метаболического пути, индукция синтеза одного или более ферментов субстратами, модуляция активности уже присутствующих молекул ферментов, в том числе аллостерическая регуляция (см. главу 4). Большое значение имеет также регуляция скорости поступления метаболитов в клетку, где ведущую роль играют биологические мембраны, окружающие цитоплазму и находящиеся в ней ядро, митохондрии, лизосомы и другие субклеточные органеллы. В последующих главах приведено много примеров участия таких контрольных механизмов в регуляции метаболизма. Важнейшим средством, с помощью которого осуществляется регуляция обмена веществ в живых организмах, являются гормоны (см. главу 6). Особая роль в механизме действия гормонов принадлежит циклическим нуклеотидам (цАМФ и цГМФ).

У животных и человека гормональная регуляция обмена веществ тесно связана с координирующей деятельностью нервной системы. Примером влияния нервной системы на углеводный обмен является так называемый сахарный укол Клода Бернара (механическое раздражение дна IV желудочка), который приводит к гипергликемии и глюкозурии в результате рефлекторного выброса надпочечниками адреналина в кровь и опосредованного аденилатциклазной системой расщепления гликогена в печени.

Важнейшая роль в процессах интеграции обмена веществ принадлежит коре большого мозга. Как указывал И. П. Павлов: «Чем совершеннее нервная система животного организма, тем она централизованнее, тем высший ее отдел является все в большей и большей степени распорядителем и распределителем всей деятельности организма... Этот высший отдел содержит в своем ведении все явления, происходящие в теле».

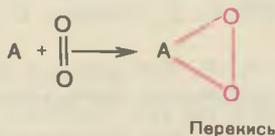
Биологическое окисление представляет собой совокупность реакций окисления, протекающих во всех живых клетках. Основной функцией этого процесса является обеспечение организма энергией в доступной для использования форме (прежде всего в форме АТФ).

Принципиальной особенностью биологического окисления, или тканевого дыхания¹, является то, что оно протекает постепенно, через многочисленные промежуточные ферментативные стадии, т. е. происходит многократная передача протонов и электронов или только электронов от одного соединения — донора к другому — акцептору; при этом протоны транспортируются лишь частью промежуточных переносчиков. У аэробов конечным акцептором электронов и протонов служит кислород.

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ УЧЕНИЯ О БИОЛОГИЧЕСКОМ ОКИСЛЕНИИ

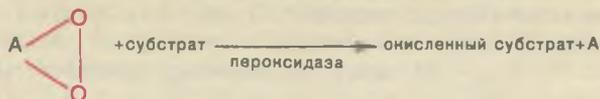
Изучение процессов окисления в организме было начато в XVIII веке А. Лавуазье. Он обратил внимание на наличие известного сходства между процессами горения органических веществ вне организма и дыханием животных. Лавуазье считал, что сущность процесса дыхания состоит в соединении кислорода вдыхаемого воздуха с углеродом и водородом органических веществ внутри тела. После работ Лавуазье в науке в течение долгого времени господствовало мнение о тождестве явлений горения и медленного окисления питательных веществ в организме. Вместе с тем было ясно, что биологическое окисление протекает при весьма необычных условиях: при низкой температуре (температура тела), без появления пламени (как это бывает при горении) и, наконец, в присутствии воды, содержание которой обычно достигает в тканях 75–80% от общей массы.

Причину столь своеобразного течения окислительных процессов в живых организмах ученые вначале пытались объяснить «активацией» кислорода в клетках организма. Одна из первых теорий биологического окисления, связанных с «активацией» кислорода, была развита А. Н. Бахом, который считал, что «активация» молекулярного кислорода происходит в результате разрыва одной его связи (—O—O—) и присоединения к органическим веществам — оксигеназам (обозначим их буквой А), способным к аутоокислации:



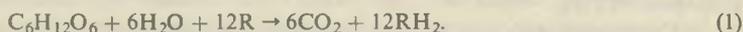
¹ Тканевое дыхание — биологическое окисление в клетках или тканях организма.

Образующиеся высокомолекулярные перекиси отдают активированный кислород при участии ферментов (пероксидаз) субстрату.



Таким образом, по мнению А. Н. Баха, путь использования кислорода в клетках лежит через образование перекисей, поэтому данная теория получила название перекисной теории окисления. Однако истинный механизм главного пути окисления различных субстратов дыхания оказался иным.

Важнейшая заслуга в развитии учения о биологическом окислении принадлежит другому русскому ученому — ботанику и биохимику В. И. Палладиному. Основные положения о механизме биологического окисления В. И. Палладин пояснил на примере окисления глюкозы:



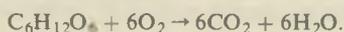
Глюкоза

Анаэробная фаза



Аэробная фаза

Суммируя уравнения, получим:



Здесь R — промежуточные переносчики водорода (пигменты, или хромогены, по В. И. Палладиному). Исходя из приведенных выше уравнений, следует: а) первая фаза тканевого дыхания, сопровождающаяся образованием углекислого газа (CO_2), не требует участия кислорода воздуха и осуществляется анаэробно. Кислород, входящий в состав CO_2 , — это кислород воды¹ или субстрата; б) важнейшую роль в осуществлении начальной анаэробной фазы дыхания играют не соединения, активирующие кислород, а специфические дегидрогеназы, катализирующие отщепление водорода от окисляемых субстратов; в) первичным акцептором атомов водорода, отщепляемых от окисляемых субстратов дегидрогеназами, являются особые термостабильные вещества, названные В. И. Палладиным хромогенами². Они могут существовать как в восстановленной, так и окисленной (дегидрированной) форме, т. е. играют роль промежуточных переносчиков водорода; г) поглощаемый при тканевом дыхании кислород воздуха играет лишь роль конечного акцептора водорода. Следовательно, если восстановленная форма промежуточного акцептора вступает во взаимодействие с кислородом воздуха, то образуется вода, и в этом случае (т. е. в аэробных условиях) речь идет о биологическом окислении. Если же в качестве конечного акцептора водорода фигурирует тот или иной метаболит, то это — анаэробный процесс (гликолиз или брожение).

В дальнейшем значительный вклад в изучение биологического окисления (его локализация в клетке, связь с другими процессами обмена веществ, механизмы ферментативных окислительно-восстановительных реакций, аккумуляция и превращение энергии и др.) внесли О. Варбург, Г. Виланд, Г. Калькар, Д. Кейлин, Г. Кребс, П. Митчелл, Д. Грин, А. Ленинджер, Б. Чанс, Э. Рэкер, а в СССР — В. А. Энгельгардт, В. А. Белицер, С. Е. Северин, В. П. Скулачев и др.

¹ Следует отметить, что уже А. Н. Бах допускал возможность окисления различных субстратов при тканевом дыхании гидроксилем воды. Однако все же основное значение при биологическом окислении он придавал, как уже отмечалось, «активации» кислорода.

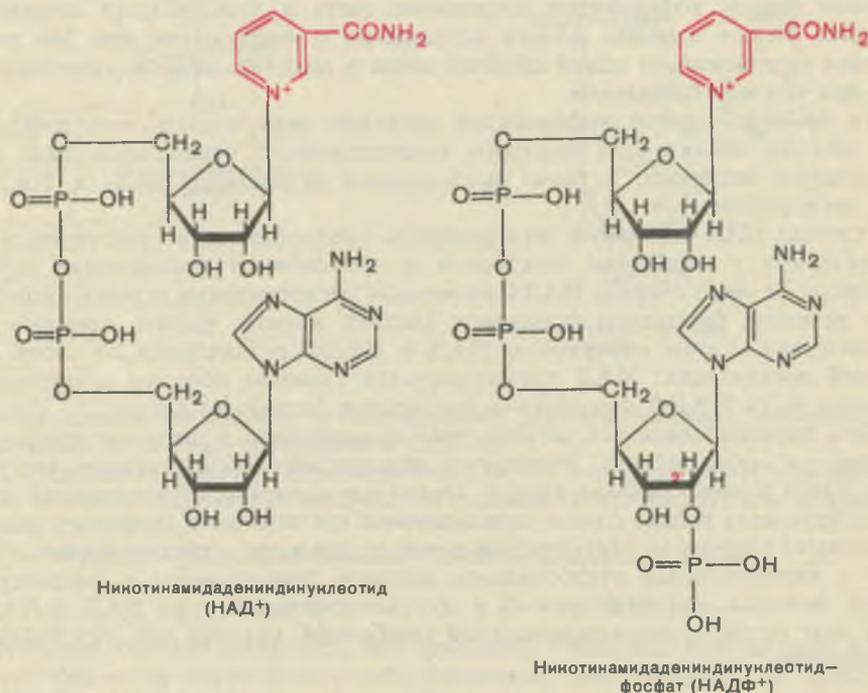
² В настоящее время известно, что в цепи биологического окисления первичными акцепторами атомов водорода (электронов) являются не хромогены, а коферменты НАД⁺ или НАДФ⁺ и в некоторых случаях ФМН или ФАД.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИОЛОГИЧЕСКОМ ОКИСЛЕНИИ

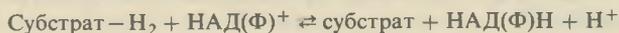
В переносе электронов от субстратов к молекулярному кислороду принимают участие: 1) пиридинзависимые дегидрогеназы, для которых коферментами служат либо НАД, либо НАДФ; 2) флавинозависимые дегидрогеназы (флавиновые ферменты), у которых роль протестической группы играют ФАД или ФМН; 3) цитохромы, содержащие в качестве протестической группы железопорфириновую кольцевую систему. Среди компонентов дыхательной цепи обнаружены также убихинон (коэнзим Q) и белки, содержащие негемовое железо.

Пиридинзависимые дегидрогеназы

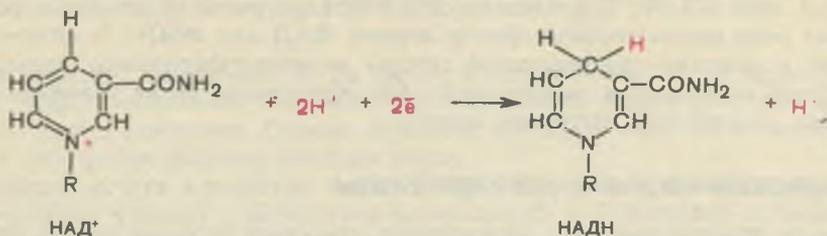
К числу пиридинзависимых дегидрогеназ относится большая группа ферментов, которые катализируют восстановление НАД⁺ и НАДФ⁺ различными органическими субстратами. Структура НАД была выяснена Г. Эйлер-Хельпиным и соавт. О. Варбургу принадлежит заслуга открытия НАДФ. Коферменты НАД и НАДФ являются динуклеотидами, в которых мононуклеотиды связаны между собой через остатки фосфорной кислоты. В состав одного из нуклеотидов входит амид никотиновой кислоты (витамин РР), другой представляет собой АМФ. В молекуле НАДФ имеется еще один остаток фосфорной кислоты, присоединенный к рибозе АМФ в положении 2'.



Катализируемые пиридинзависимыми дегидрогеназами реакции можно изобразить так:



Способность НАД⁺ и НАДФ⁺ играть роль промежуточного переносчика водорода связана с наличием в их структуре амида никотиновой кислоты. В электронно-протонной форме обратимое гидрирование – дегидрирование (присоединение и отщипывание протонов и электронов) этих коферментов может быть представлено с помощью следующего уравнения:



При переносе двух восстановительных эквивалентов от субстрата на НАД⁺ один из них включается в восстановленный кофермент в виде водорода, а другой – в виде электрона. Свободный ион Н⁺ остается в среде. Для простоты обозначения обычно восстановленные формы НАД и НАДФ изображают символами НАДН₂ и НАДФН₂.

Окисленные и восстановленные формы пиридиннуклеотидных коферментов обладают различными спектрами поглощения в УФ-области.

В окисленной форме НАД⁺ и НАДФ⁺ имеют одну узкую полосу поглощения с максимумом при 260 нм, зависящую от наличия аденина в его структуре. У восстановленной формы коферментов поглощение света в этой области понижается, и появляется вторая широкая полоса поглощения с максимумом при 340 нм, обусловленная исчезновением одной двойной связи в никотинамидном комплексе кофермента при его восстановлении.

Это свойство данных коферментов позволяет использовать спектрофотометрические методы анализа для быстрого количественного определения ряда субстратов – доноров водорода, а также исследования активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ.

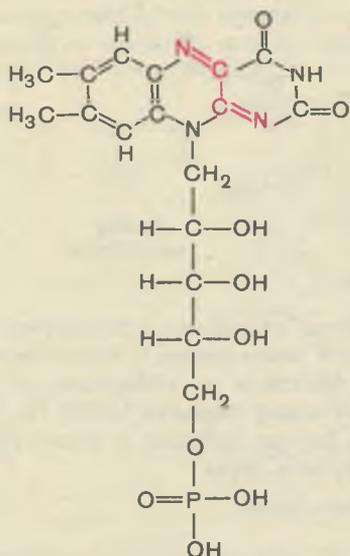
В клетках НАД-зависимые дегидрогеназы преимущественно участвуют в процессах, связанных с переносом электронов и протонов от органических субстратов к кислороду. В свою очередь НАДФ-зависимые дегидрогеназы играют существенную роль в реакциях биосинтеза (например, высших жирных кислот, стероидов и др.). В соответствии с этим коферменты НАД и НАДФ различаются по своей внутриклеточной локализации: НАД концентрируется главным образом в митохондриях, а большая часть НАДФ находится в цитоплазме (цитозоле) клеток.

Часть пиридинзависимых дегидрогеназ локализована в цитозоле клетки, а другая часть – в митохондриях. Некоторые дегидрогеназы присутствуют как в цитоплазме, так и в митохондриях клетки. Цитоплазматические дегидрогеназы способны взаимодействовать только с теми пиридиновыми нуклеотидами (коферментами), которые находятся в цитозоле. Митохондриальные дегидрогеназы обычно взаимодействуют только с пиридиновыми нуклеотидами, которые локализованы в матриксе митохондрий. Заметим, что цитозольный и митохондриальный пулы НАД и НАДФ отделены друг от друга митохондриальной мембраной, которая для этих коферментов непроницаема.

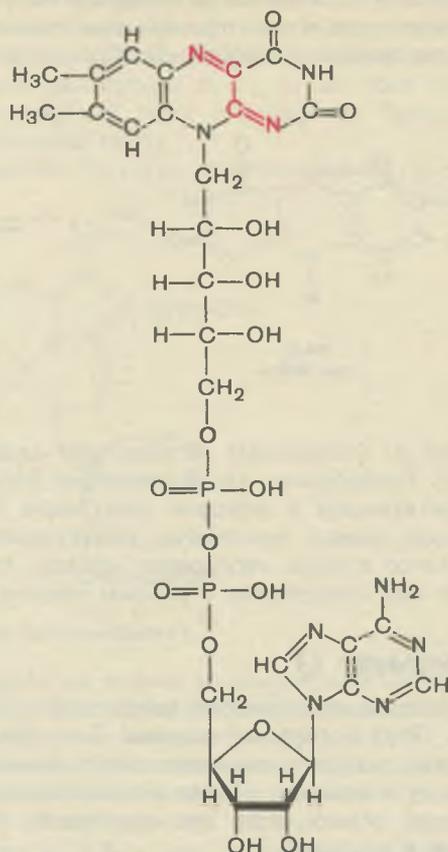
Флавиновые ферменты

Следующим акцептором атомов водорода является группа флавиновых ферментов, которые содержат в качестве кофермента (простетической группы) одно из двух производных витамина В₂ (рибофлавина): флавиномононуклеотид (ФМН) или флавиноаденидинуклеотид (ФАД).

ФМН и ФАД очень прочно, в отличие от коферментов НАД и НАДФ, присоединены к ферменту (точнее, к апоферменту) и не отщепляются от него ни на одной из стадий каталитического цикла.



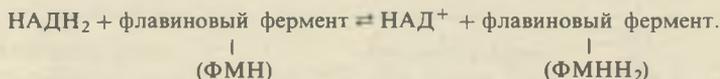
Флавимононуклеотид
(ФМН)



Флавиаденидинуклеотид
(ФАД)

С точки зрения значимости катализируемых реакций особенно интересны два флавопротеина: НАДН₂-дегидрогеназа и СДГ.

НАДН₂-дегидрогеназа, или флавопротеин-1 (ФП₁), содержит ФМН в качестве кофермента, который акцептирует водород, отщепляемый от НАДН₂ или НАДФН₂:

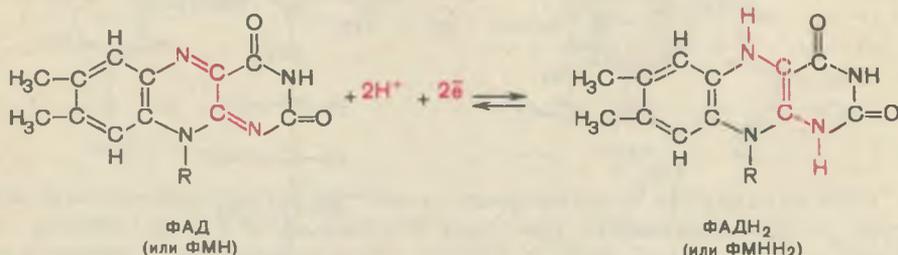


В некоторых случаях (например, при окислении сукцината или жирных кислот) флавиновые ферменты могут играть роль первичных дегидрогеназ, т. е. прямо, без участия НАД и НАДФ-зависимых дегидрогеназ, принимать электроны и протоны при окислении субстратов. Таким ферментом, в частности, является СДГ. Коферментом СДГ служит ФАД.

Впервые ФМН и ФАД были выделены Варбургом. Окисленные формы ФМН и ФАД обладают характерным спектром поглощения с максимумом при 450 нм; в окисленном состоянии флавиновые ферменты окрашены в красный, коричневый или

зеленый цвет. При восстановлении ФАД и ФМН полоса 450 нм в спектре поглощения исчезает.

Активной частью молекулы ФАД или ФМН является изоаллоксазиновое кольцо рибофлавина, к атомам азота которого могут присоединяться два атома водорода, т. е. два электрона и два протона при соответствующей внутримолекулярной перегруппировке двойных связей (R — остальная часть молекулы соответствующего кофермента).



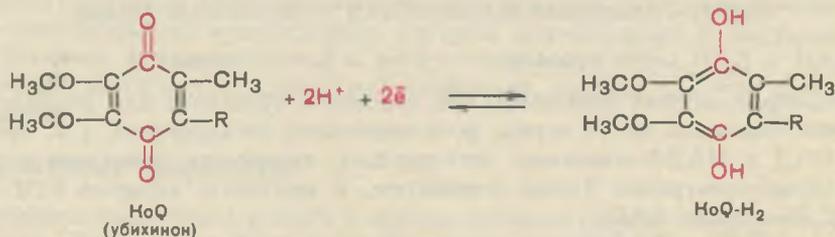
Многие из флавиновых дегидрогеназ являются сложными олигомерными образованиями. Установлено, что флавиновый фермент тесно связан с железосерным белком¹, участвующим в передаче электронов и протонов на кофермент Q. Железосерные белки имеют небольшую молекулярную массу порядка 10 000 Да и содержат несколько атомов негемового железа. Эти атомы собраны в несколько групп, в которых они объединены с равным числом атомов серы.

Кофермент Q

Следующим компонентом дыхательной цепи является кофермент Q (КоQ), или убихинон. Этот кофермент впервые был описан Р. Муртоном в 1953 г., который показал, что данное соединение имеет повсеместное распространение в клетках, и назвал его убихиноном. Позже было установлено, что убихинон, подобно НАД и ФАД, может играть роль промежуточного переносчика водородных атомов, т. е. электронов и протонов.

КоQ является производным бензохинона с длинной боковой цепью, которая в большинстве тканей млекопитающих состоит из 10 изопреноидных единиц (см. главу 5).

Восстановленная форма флавиновых ферментов в цепи дыхательных катализаторов передает атомы водорода (протоны и электроны) КоQ. Как всякий хинон, КоQ может существовать как в окисленной, так и восстановленной форме (R — изопреноидная боковая цепь).

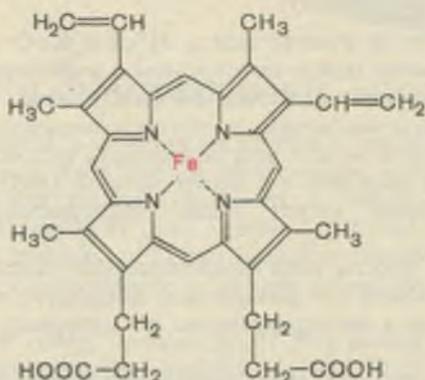


¹ Железосерные белки участвуют также в переносе электронов на участке дыхательной цепи между цитохромами b и c₁.

Цитохромы

Дальнейший перенос электронов от KoQH_2 на кислород осуществляет система цитохромов. Данная система состоит из ряда гемсодержащих белков (гемопротеинов), открытых в 1886 г. К. Мак-Мунном. Однако роль этих гемопротеинов в дыхании клеток была выяснена лишь в 1925 г. Д. Кейлином. В процессе тканевого дыхания наиболее важную роль играют цитохромы *b*, *c*₁, *c*, *aa*₃. Все они имеют простетическую геминую группу, близкую к гему гемоглобина (простетическая группа цитохрома *b*, как считают, идентична гему).

В качестве примера можно привести структуру простетической группы цитохрома *b*.



Простетическая группа цитохрома *b*

Цитохромы отличаются друг от друга не только своими простетическими группами, но и белковыми компонентами. В ходе каталитического процесса валентность содержащегося в цитохромах железа обратимо изменяется ($\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+}$).

Все цитохромы, особенно в восстановленной форме, имеют характерные спектры поглощения. Величины окислительно-восстановительного потенциала у разных цитохромов также неодинаковы (табл. 8.1). Например, для цитохрома *c* окислительно-восстановительный потенциал составляет 0,25 В, а для цитохрома *a* — 0,29 В. Система $1/2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ имеет потенциал +0,82 В. Таким образом, было выяснено, что звено цитохромов располагается в цепи окисления между убихиноном и кислородом; при этом цитохромы в цепь дыхательных катализаторов включаются в определенной последовательности:

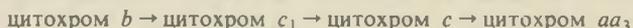


Таблица 8.1. Окислительно-восстановительные потенциалы (E_0) некоторых систем дыхательной цепи (концентрация всех компонентов 1 М, рН 7 и температура 25°C)

Восстановленная форма	Окисленная форма	E_0 , В
НАДН ₂	НАД ⁺	-0,32
ФАДН ₂ -белок	ФАД-белок	-0,05
KoQ — H ₂	KoQ	+0,04
Цитохром <i>b</i> (Fe^{2+})	Цитохром <i>b</i> (Fe^{3+})	+0,07
» <i>c</i> ₁ (Fe^{2+})	» <i>c</i> ₁ (Fe^{3+})	+0,23
» <i>c</i> (Fe^{2+})	» <i>c</i> (Fe^{3+})	+0,25
» <i>a</i> (Fe^{2+})	» <i>a</i> (Fe^{3+})	+0,29
» <i>a</i> ₃ (Fe^{2+})	» <i>a</i> ₃ (Fe^{3+})	+0,55
H ₂ O	$1/2\text{O}_2$	+0,82

Цитохромы b , c_1 и c выполняют функцию промежуточных переносчиков электронов, а цитохром aa_3 (цитохромоксидаза) является терминальным дыхательным ферментом, непосредственно взаимодействующим с кислородом. Окисленная форма цитохромоксидазы (Fe^{3+}) принимает электроны от восстановленного цитохрома c , переходя в восстановленную форму (Fe^{2+}), которая затем вновь окисляется в Fe^{3+} -форму молекулярным кислородом. Образовавшийся «активный» кислород присоединяет два протона из окружающей среды, в результате чего и образуется молекула воды.

В последнее время установлено, что цитохромоксидаза состоит из 6 субъединиц; каждая из них содержит геминую группу и атом меди. По-видимому, две субъединицы из шести составляют цитохром a , а остальные четыре относятся к цитохрому a_3 .

Обычно считается, что на участке между НАД и КоQ осуществляется двухэлектронный перенос, а на участке между цитохромом b и кислородом — одноэлектронный (следовательно, на каждом этапе дыхательной цепи должны участвовать по два цитохрома); тем не менее нельзя исключить и другие возможности. Учитывая, что любой компонент дыхательной цепи может восстанавливать редокс-системы только с более высоким потенциалом, а окислять — с более низким (табл. 8.1), то в целом цепь дыхательных катализаторов может быть представлена следующим образом (рис. 8.1).

Как уже отмечалось, иногда цепь биологического окисления (дыхательная цепь) может быть укорочена. Имеются флавиновые ферменты, например СДГ, которые способны отнимать водород непосредственно от субстрата и передавать его сразу на КоQ.

В ряде случаев дыхательная цепь может иметь еще более простое строение. Так, например, оксидазы L- и D-аминокислот (за исключением глутаматдегидрогеназы), ксантинооксидаза и некоторые другие ферменты катализируют окисление соответствующих субстратов за счет кислорода без участия как НАД или НАДФ, так и цитохромов. Эти оксидазы по своей химической природе являются флавопротеинами.

Все ферменты тканевого дыхания — компоненты цепи дыхательных катализаторов, — как установлено, связаны главным образом с митохондриями, точнее с их внутренними мембранами. Никотинамидадениндинуклеотидные коферменты и некоторые ферменты цикла трикарбоновых кислот находятся в матрице митохондрий, тогда как металлофлавопротеины, убихинон и цитохромы связаны с липидными структурами внутренней мембраны.

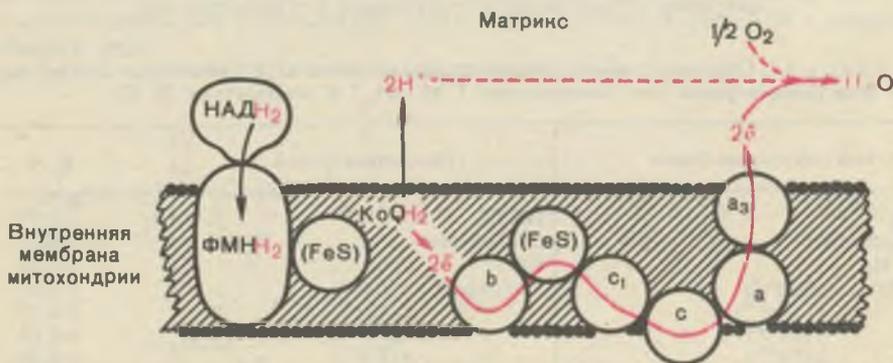
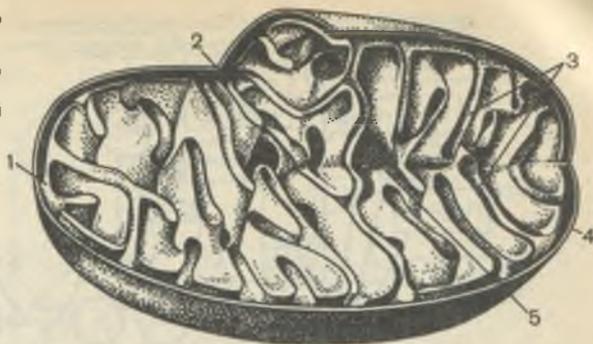


Рис 8.1. Организация компонентов дыхательной цепи митохондрий (схема).

Рис. 8.2. Строение митохондрии (по Богену).

1 — внутренняя мембрана; 2 — пространство между двумя мембранами; 3 — кристы; 4 — наружная мембрана; 5 — митохондриальный матрикс.



МИТОХОНДРИИ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

Митохондрии содержатся в цитоплазме клетки и представляют собой микроскопические палочковидные или иной формы образования, количество которых в одной клетке составляет сотни или тысячи (например, в одной клетке печени крысы содержится около 1000 митохондрий). Для одного и того же типа клеток число митохондрий более или менее постоянно. Однако следует помнить, что количество митохондрий может меняться в зависимости от стадии развития клетки и ее функциональной активности.

Что же представляют собой митохондрии? Внутреннее пространство митохондрий окружено двумя непрерывными мембранами (рис. 8.2), причем наружная мембрана гладкая, а внутренняя образует многочисленные складки, или кристы. Внутримитохондриальное пространство, ограниченное внутренней мембраной, заполнено так называемым матриксом, который примерно на 50% состоит из белка и имеет очень тонкую структуру. Размер митохондрий чаще равен 2—3 мкм в длину и около 1 мкм в ширину, однако удлиненную форму митохондрий не следует считать универсальной. В некоторых тканях, например в поперечнополосатых мышцах, митохондрии иногда принимают самые причудливые очертания.

В митохондриях сосредоточено большое количество ферментов. Наружная мембрана не содержит ни одного из компонентов цепи дыхательных катализаторов. С наружной мембраной связаны ферменты, участвующие в удлинении молекул насыщенных жирных кислот, имеющих от 12 до 16 атомов углерода. Кроме того, в наружной мембране имеются кинуренин-гидроксилаза, моноаминоксидаза и некоторые другие ферменты. Моноаминоксидаза может служить маркерным ферментом для обнаружения наружной мембраны митохондрий. Следует заметить, что некоторые ферменты наружной мембраны митохондрий напоминают ферменты мембран эндоплазматической сети. Исходя из ферментного набора наружной мембраны, пока трудно ответить на вопрос, в чем состоит ее назначение. Возможно, что наружная мембрана играет роль перегородки, отделяющей внутреннюю, рабочую часть митохондрии от всего остального пространства клетки.

В межмембранном пространстве митохондрий обнаруживается активность аденилаткиназы (миокиназы) и нуклеозиддифосфаткиназы. Как уже отмечалось, во внутренней мембране митохондрий находятся ферменты дыхательной цепи. Там же находятся СДГ, β -оксибутиратдегидрогеназа, карнитинацилтрансфераза и ряд других ферментов. Важно отметить, что расположение СДГ в непосредственной близости от других компонентов дыхательной цепи объясняет тот факт, что сукцинат окисляется в митохондриях намного быстрее, чем другие субстраты цикла трикарбоновых кислот. Маркерным ферментом для идентификации внутренней мембраны митохондрий служит цитохромоксидаза.

В матриксе митохондрий содержатся некоторые ферменты цикла Кребса (цитрат-синтаза, изоцитратдегидрогеназа, фумараза, малатдегидрогеназа, аконитаза), ферменты, участвующие в β -окислении жирных кислот и системе мочевины, АсАТ, глутаматдегидрогеназа, фосфоенолпируваткарбоксикиназа и др. Определение глутаматдегидрогеназы и малатдегидрогеназы часто используют для идентификации матрикса митохондрий.

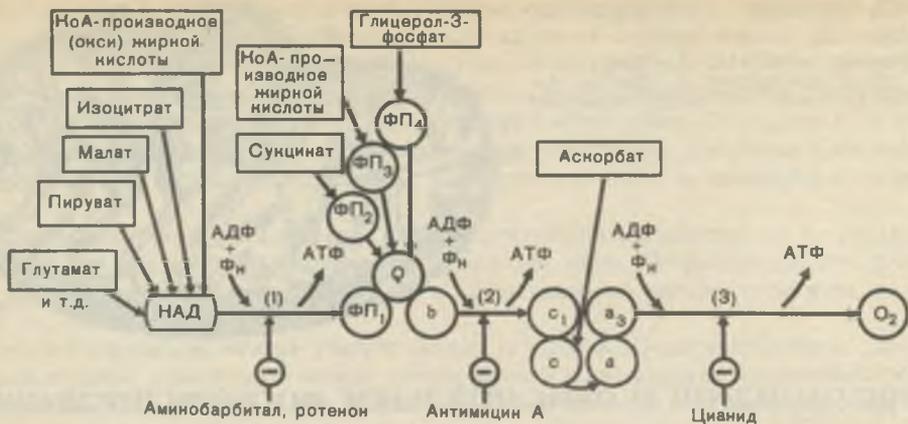


Рис. 8.3. Локализация трех пунктов фосфорилирования в дыхательной цепи. Стрелками показаны субстраты — доноры водорода и участки (1, 2, 3), в которых перенос электронов блокируется специфическими ингибиторами, а также места, в которых предположительно происходит синтез АТФ.

Чрезвычайно важной функцией цепи дыхательных катализаторов, связанных с внутренней мембраной митохондрий, наряду с переносом электронов от субстратов дыхания на кислород, является аккумуляция части освобождающейся энергии (около 50%) в фосфатных связях высокоэнергетических (или макроэнергетических) соединений (главным образом АТФ).

Процесс сопряжения тканевого дыхания и фосфорилирования получил название окислительного фосфорилирования. Впервые в начале 30-х годов В. А. Энгельгардт высказал предположение о наличии сопряжения между фосфорилированием АДФ и аэробным дыханием. Позже, в 1940 г., В. А. Белицер и Е. Т. Цыбакова показали, что синтез АТФ из АДФ и H_3PO_4 осуществляется в митохондриях при миграции электронов от субстрата к кислороду через цепь дыхательных катализаторов. При этом было обнаружено, что отношение Р/О, т. е. число молекул неорганического фосфата, перешедших в органическую форму (АТФ), в расчете на каждый поглощенный атом кислорода близко к 3.

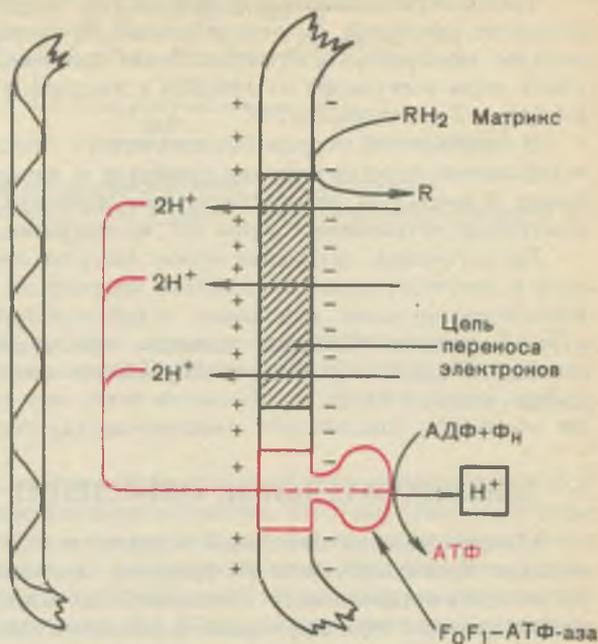
Установлено, что уменьшение свободной энергии системы при переносе пары электронных эквивалентов от $НАДН_2$ к молекулярному кислороду составляет 220 кДж (52,7 ккал). В свою очередь величина стандартной свободной энергии образования АТФ из АДФ и H_3PO_4 ($АДФ + H_3PO_4 \rightarrow АТФ + H_2O$) находится в пределах 30,2 кДж, или 7,3 ккал (по-видимому, в условиях *in vivo* эта величина порядка 34,5 кДж). Следовательно, уменьшение свободной энергии при переносе одной пары электронов от $НАДН_2$ к кислороду способно обеспечить синтез нескольких молекул АТФ из АДФ и фосфата.

На основании данных термодинамики была предсказана локализация трех пунктов фосфорилирования (образование 3 молекул АТФ) в дыхательной цепи (рис. 8.3). Опыты с применением ингибиторов (ротенон, амитал, антимицин А, цианид) ферментов дыхательной цепи подтвердили это предположение. При переносе электронов от $ФАДН_2$ по укороченному пути образуются только 2 молекулы АТФ. Известно, что интенсивность дыхания управляется отношением АТФ/АДФ. Чем меньше это отношение, тем интенсивнее идет дыхание, обеспечивая выработку АТФ. Изменение скорости дыхания с изменением концентрации АДФ носит название дыхательного контроля.

Рис. 8.4. Механизм образования АТФ согласно хемиосмотической гипотезе.

R — субстраты — доноры водорода.

Наружная мембрана Межмембранное пространство Внутренняя мембрана



Механизм окислительного фосфорилирования

Окончательно детали механизма сопряжения важнейших биологических процессов в митохондриях — дыхания и фосфорилирования — до сих пор не выяснены. Однако за последние два десятилетия достигнут большой прогресс в понимании основных принципов биоэнергетики клетки, связанной с хемиосмотическим синтезом АТФ в биомембранах.

Хемиосмотическая теория разработана в 1961—1966 гг. Митчеллом¹. Следует отметить, что экспериментальное обоснование и дальнейшее развитие этой теории во многом обязаны исследованиям В. П. Скулачева и др. Суть этой теории состоит в предположении, что дыхание и фосфорилирование связаны между собой через электрохимический потенциал ионов водорода на митохондриальной мембране ($\Delta\bar{\mu}_{H^+}$).

Принято считать, что компоненты дыхательной цепи, соответствующим образом расположенные в плоскости мембраны, присоединяя электрон, могут «захватывать» также ион H^+ из матрикса и соответственно, отдавая (передавая) электрон, способны освобождать ион H^+ в водное пространство, окружающее мембрану (в межмембранное пространство). На каждую пару электронов, переносимую вдоль дыхательной цепи от НАДН₂ к кислороду, приходится три пары ионов H^+ , извлекаемых из матрикса и передаваемых в наружную среду (рис. 8.4). При этом наружная поверхность внутренней мембраны митохондрий приобретает положительный заряд, а внутренняя — отрицательный. Иными словами, между водными фазами, которые разделены внутренней мембраной, создается градиент концентрации ионов H^+ с более кислым значением рН снаружи.

Согласно хемиосмотической теории ионы H^+ , выведенные наружу за счет энергии переноса электронов, снова устремляются внутрь, т. е. в митохондриальный матрикс, через каналы, или «поры», специального мембранного белка (F_0), который соединен с F_1 -АТФ-синтетазой (или обратимой АТФазой). Этот переход ионов H^+ из зоны с более высокой в зону с более низкой их концентрацией сопровождается

¹ За исследование биоэнергетических процессов в клетке П. Митчелл получил Нобелевскую премию в области химии в 1978 г.

выделением свободной энергии, за счет которой образуется $\Delta\bar{p}_{H^+}$ и синтезируется АТФ (см. рис. 8.4).

Таким образом, можно предполагать, что тканевое дыхание заряжает митохондриальную мембрану, а окислительное фосфорилирование разряжает ее, используя энергию мембранного потенциала для синтеза АТФ¹. Таким образом, при переносе одной пары электронов от НАДН₂ к кислороду образуются 3 молекулы АТФ, а от ФАДН₂ — 2 молекулы АТФ.

В современной теории биологического окисления и сопряженного с ним фосфорилирования имеется еще ряд пробелов и вопросов, требующих дальнейшего разрешения. В частности, недостаточно ясен механизм, с помощью которого цепь переноса электронов «откачивает» ионы Н⁺ из матрикса митохондрий наружу.

Биологическое окисление может быть не связано (разобщено) с фосфорилированием и соответственно накоплением макроэргов. Это так называемое свободное, или нефосфорилирующее, окисление; освобождающаяся при этом энергия рассеивается в виде теплоты. Следует помнить, что существует ряд соединений, способных разобщать дыхание и фосфорилирование, например динитрофенол, дикумарин, тироксин и др.

МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ

Микросомальное окисление осуществляется ферментными системами, локализованными преимущественно во фракциях микросом печени и надпочечников². В отличие от митохондриального окисления, где ведущую роль, как было показано выше, играют реакции дегидрирования, а кислород является конечным акцептором электронов и используется лишь для образования воды, в процессах микросомального окисления активированный кислород непосредственно внедряется в окисляемое вещество. При этом функциональная роль митохондриального и микросомального окисления в клетке различна. Митохондриальное окисление — механизм использования кислорода в биоэнергетических процессах. Микросомальное окисление — механизм использования кислорода с «пластическими» целями.

Ферментные системы, локализованные в микросомной фракции и способные использовать молекулярный кислород для окисления специфических органических соединений, делятся на две группы: диоксигеназы и монооксигеназы. Диоксигеназы катализируют реакции, в которых в молекулу органического субстрата включаются оба атома молекулы кислорода. $A + O_2 \longrightarrow AO_2$ Монооксигеназы (эту группу ферментов называют также гидроксилазами, их содержание в тканях относительно велико) присоединяют к субстрату только один из двух атомов кислорода. Обычно поставщиком атомов водорода для восстановления второго атома кислорода до воды служит НАДФН₂ (реже НАДН₂).

Например:



¹ Трансмембранные электрохимические потенциалы ионов могут служить источником энергии не только для синтеза АТФ, но и транспорта веществ, движения бактериальных клеток и других энергозависимых процессов.

² Микросомы — морфологически замкнутые везикулы, в которые превращается эндоплазматическая сеть при гомогенизации тканей. Следовательно, микросомную фракцию, выделяемую при дифференциальном центрифугировании гомогенатов, образуют преимущественно мембраны эндоплазматической сети и некоторые другие субклеточные структуры (например, рибосомы).

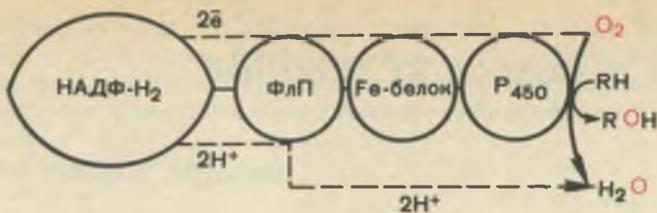


Рис. 8.5. Схематическое изображение монооксигеназной цепи микросом.

ФлП — флавопротеин, кофактором которого служит ФАД; Fe-белок — белок, содержащий негемовое железо; RH — субстрат окисления; P₄₅₀ — цитохром P₄₅₀.

Микросомальная цепь ферментов, осуществляющая гидроксилирование, в значительной мере изучена. Она содержит: цитохром P-450, восстановленный СО-комплекс которого имеет максимум поглощения при длине волны 450 нм; флавопротеин, коферментом которого служит ФАД; белок (аденодоксин), содержащий негемовое железо.

Необходимо еще раз подчеркнуть, что основная роль этой цепи заключается в гидроксилировании, а не в окислительном фосфорилировании. Поэтому флавопротеины и цитохромы, которые функционируют в микросомальной цепи окисления, резко отличаются от ферментов митохондриальной дыхательной цепи. В общей форме цепь переноса электронов в микросомах, при участии которой осуществляется гидроксилирование, представлена на рис. 8.5. Электроны НАДФН₂, обладающие высоким энергетическим потенциалом, переносятся на флавопротеин этой цепи; затем они передаются на аденодоксин (белок, содержащий негемовое железо); последний переносит электроны на окисленную форму цитохрома P-450; после чего восстановленная форма P-450 активирует кислород. Считается, что цитохром P-450 выполняет двоякую функцию. Во-первых, он связывает субстрат гидроксилирования, во-вторых, на нем происходит активация молекулярного кислорода.

К числу эндогенных субстратов микросомального окисления следует отнести стероидные гормоны и холестерин, а также, по-видимому, ненасыщенные жирные кислоты. В последнее время появились указания на возможную роль реакций микросомального окисления в биосинтезе простагландинов (см. главу 6). Велико значение микросомального окисления в метаболизме лекарственных средств и ряда токсичных соединений.

Иногда ошибочно считают, что монооксигеназная цепь микросом печени предназначена для окисления только ксенобиотиков. На самом же деле она служит универсальной биологической системой окисления неполярных соединений любого происхождения. Субстрат, окисляемый цитохромом P-450, должен отвечать одному требованию — быть неполярным, т. е. в данном случае проявляется специфичность не к структуре, а к физико-химическим свойствам субстрата.

В настоящее время известно свыше 7000 соединений, способных окисляться при участии монооксигеназной цепи. При этом гидроксилирование делает вещество более полярным. В результате то или иное потенциально токсичное соединение легче растворяется в водной среде, подвергается дальнейшим превращениям и выводится из организма. К сожалению, иногда бывает наоборот, например, монооксигеназная цепь, окисляя нетоксичный бензпирен (содержащийся в табачном дыму, копченостях), приводит к образованию токсичного оксибензпирена, являющегося сильным канцерогеном.

Углеводы наряду с белками и липидами являются важнейшими химическими соединениями живых организмов. В организме животных и человека углеводы выполняют весьма важные функции: прежде всего энергетическую (главный вид клеточного топлива), структурную (обязательный компонент большинства внутриклеточных структур), защитную (участие углеводных компонентов иммуноглобулинов в поддержании иммунитета).

Углеводы также используются для синтеза нуклеиновых кислот (рибоза, дезоксирибоза), они являются составными компонентами нуклеотидных коферментов, играющих исключительно важную роль в метаболизме живых существ. В последнее время все большее внимание стали привлекать смешанные биополимеры, содержащие углеводы. К таким смешанным биополимерам относятся, помимо нуклеиновых кислот, гликопептиды и гликопротеины, гликолипиды и липополисахариды, гликолипопротеины и т. д. Эти вещества выполняют сложные и важные функции в организме.

В составе тела человека и животных углеводы присутствуют в меньшем количестве (не более 2% от сухой массы тела), чем белки и липиды. В растительных организмах за счет целлюлозы на долю углеводов приходится до 80% сухой массы, поэтому в целом в биосфере углеводов больше, чем всех других органических соединений вместе взятых.

ХИМИЯ УГЛЕВОДОВ

Впервые термин «углеводы» был предложен профессором Дерптского (ныне Тартуского) университета К. Г. Шмидтом в 1844 г. В то время предполагали, что все углеводы имеют общую формулу $C_m(H_2O)_n$, т. е. углерод + вода. Отсюда и название «углеводы». Например, глюкоза и фруктоза имеют форму $C_6(H_2O)_6$, тростниковый сахар (сахароза) — $C_{12}(H_2O)_{11}$, крахмал — $[C_6(H_2O)_5]_n$ и т. д. В дальнейшем оказалось, что ряд соединений, принадлежащих по своим свойствам к классу углеводов, содержат водород и кислород в несколько иной пропорции, чем указано в общей формуле (например, дезоксирибоза — $C_5H_{10}O_4$). В 1927 г. Международная комиссия по реформе химической номенклатуры предложила термин «углеводы» заменить термином «глициды», однако он не получил широкого распространения. Старое название углеводы укоренилось и продолжает использоваться, являясь общепризнанным.

Необходимо отметить, что химия углеводов занимает одно из ведущих мест в истории развития органической химии. Тростниковый сахар можно считать первым органическим соединением, выделенным в химически чистом виде. Произведенный в 1861 г. А. М. Бутлеровым синтез (вне организма) углеводов из формальдегида явился первым синтезом представителей одного из трех основных классов веществ (белки, липиды, углеводы), входящих в состав живых организмов. Химическая структура простейших углеводов была выяснена в конце XIX века в результате фундаментальных исследований Э. Фишера. Следует отметить также, что значительный вклад в изучение углеводов внесли отечественные ученые А. А. Колли, П. П. Шо-

рыгин, Н. К. Кочетков и др. В 20-е годы нынешнего столетия работами английского исследователя У. Хеурса были заложены основы структурной химии полисахаридов. Со второй половины XX века происходит стремительное развитие химии и биохимии углеводов, обусловленное их важным биологическим значением.

Классификация углеводов

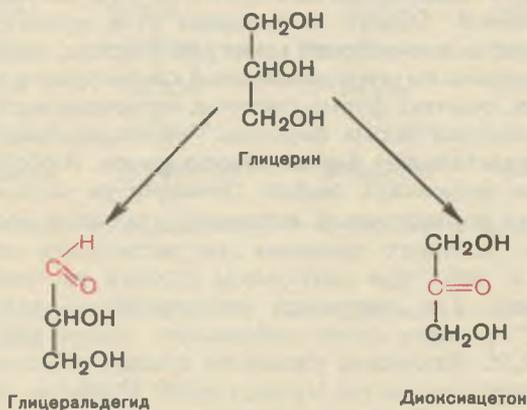
Согласно принятой в настоящее время классификации, углеводы подразделяются на три основные группы: моносахариды, олигосахариды и полисахариды.



Моносахариды

Моносахариды можно рассматривать как производные многоатомных спиртов, содержащие карбонильную (альдегидную или кетонную) группу. Если карбонильная группа находится в конце цепи, то моносахарид представляет собой альдегид и называется альдозой; при любом другом положении этой группы моносахарид является кетоном и называется кетозой.

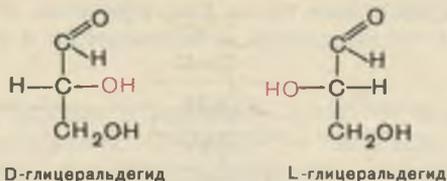
Простейшими представителями моносахаридов являются триозы: глицеральдегид и диоксиацетон. При окислении первичной спиртовой группы трехатомного спирта — глицерола — образуется глицеральдегид (альдоза), а окисление вторичной спиртовой группы приводит к образованию диоксиацетона (кетоза).



Стереоизомерия моносахаридов. Все моносахариды содержат один или более асимметричных атомов углерода: альдотриозы — один центр асимметрии, альдотетрозы — два, альдопентозы — три, альдогексозы — четыре и т. д. Кетозы содержат на один асимметричный атом меньше, чем альдозы с тем же числом углеродных атомов. Следовательно, кетотриоза — диоксиацетон — не содержит асимметричных атомов углерода. Все же остальные моносахариды могут существовать в виде различных стереоизомеров.

Общее число стереоизомеров для любого моносахарида выражается формулой: $N = 2^n$, где N — число стереоизомеров, а n — число асимметричных атомов углерода. Как уже отмечалось, глицеральдегид содержит только один асимметричный атом углерода и поэтому может существовать в виде двух различных стереоизомеров.

Изомер глицеральдегида, у которого при проекции модели на плоскость ОН-группа у асимметричного атома углерода расположена с правой стороны, принято считать D-глицеральдегидом, а зеркальное отражение — L-глицеральдегидом.



Альдогексозы содержат четыре асимметричных атома углерода и могут существовать в виде $2^4 = 16$ стереоизомеров, представителем которых, например, является глюкоза. Для альдопентоз и альдотетроз число стереоизомеров равно $2^3 = 8$ и $2^2 = 4$ соответственно.

Все изомеры моносахаридов подразделяются на D- и L-формы (D- и L-конфигурация) по сходству расположения групп атомов у последнего центра асимметрии с расположением групп у D- и L-глицеральдегида. Природные гексозы — глюкоза, фруктоза, манноза и галактоза — принадлежат, как правило, по стереохимической конфигурации к соединениям D-ряда.

На рис. 9.1 представлено семейство D-кетоз, содержащих от трех до шести атомов углерода.

Известно, что природные моносахариды обладают оптической активностью. Способность вращать плоскость поляризованного луча света — одна из важнейших особенностей веществ (в том числе моносахаридов), молекулы которых имеют асимметричный атом углерода или же асимметричны в целом. Свойство вращать плоскость поляризованного луча вправо обозначают знаком плюс (+), а в противоположную сторону — знаком минус (−). Так, D-глицеральдегид вращает плоскость поляризованного луча вправо, т. е. D-глицеральдегид является D(+)-альдотриозой, а L-глицеральдегид — L(−)-альдотриозой. Однако направление угла вращения поляризованного луча, которое определяется асимметрией молекулы в целом, заранее не предсказуемо. Моносахариды, относящиеся по стереохимической конфигурации к D-ряду, могут быть левовращающими. Так, обычная форма глюкозы, встречающаяся в природе, является правовращающей, а обычная форма фруктозы — левовращающей.

Циклические (полуацетальные) формы моносахаридов. Любой моносахарид, обладая рядом конкретных физических свойств (температура плавления, растворимость и т. д.), характеризуется специфической величиной удельного вращения $[\alpha]_D^{20}$ ¹. Установлено, что величина удельного вращения при растворении любого моносахарида постепенно меняется и лишь при длительном стоянии раствора достигает вполне определенного значения. Так, например, свежеприготовленный раствор глюкозы имеет $[\alpha]_D^{20} = +112,2^\circ$, которое после длительного стояния достигает равновесного значения $[\alpha]_D^{20} = +52,5^\circ$. Изменение удельного вращения растворов моносахаридов при стоянии (во времени) называется мутаротацией. Очевидно, мутаротация должна вызываться изменением асимметрии молекулы, а следовательно, трансформацией ее структуры в растворе.

Явление мутаротации имеет следующее объяснение. Известно, что альдегиды

¹ Удельное вращение $[\alpha]_D$ — угол поворота плоскости поляризованного луча света при прохождении через кювету толщиной 1 см с раствором вещества, имеющего концентрацию 1 моль/л. При определенной температуре, в данном растворителе и при определенной длине волны проходящего света величина удельного вращения определяется только природой растворенного вещества.

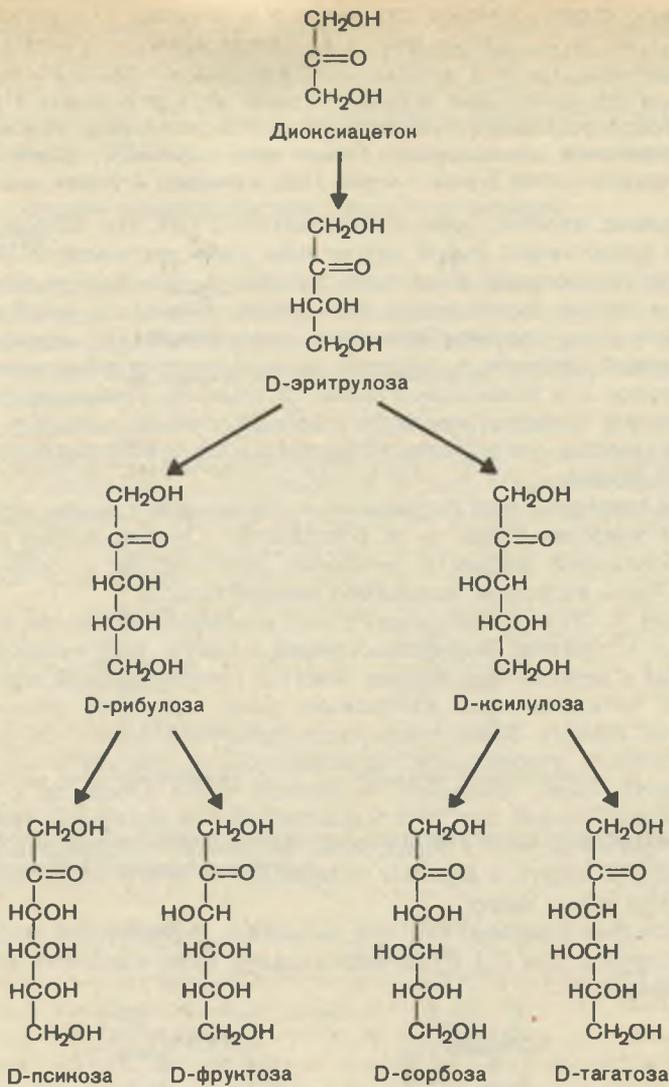


Рис. 9.1. Семейство D-кетоз, содержащих 3–6 атомов углерода.

и кетоны легко и обратимо реагируют с эквимолярным количеством спирта с образованием полуацеталей:



Реакция образования полуацетала может осуществляться и в пределах одной молекулы, если это не связано с пространственными ограничениями. По теории А. Байера, внутримолекулярное взаимодействие спиртовой и карбонильной групп наиболее благоприятно, если оно

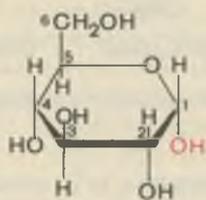
приводит к образованию пяти- или шестичленных циклов. При образовании полуацеталей возникает новый асимметричный центр (в случае D-глюкозы — это C-1). Шестичленные кольца сахаров называют пиранозами, а пятичленные — фуранозами. α -Форма — это форма, у которой расположение полуацетального гидроксила такое же, как гидроксила у асимметричного углеродного атома, определяющего принадлежность к D- или L-ряду. Иными словами, в формулах с α -модификацией моносахаридов D-ряда полуацетальный гидроксил пишут справа, а в формулах представителей L-ряда — слева. При написании β -формы поступают наоборот.

Таким образом, явление мутаротации связано с тем, что каждый твердый препарат углеводов представляет собой какую-либо одну циклическую (полуацетальную) форму, но при растворении и стоянии растворов эта форма через альдегидную превращается в другие таутомерные циклические формы до достижения состояния равновесия. При этом удельное вращение, характерное для исходной циклической формы, постепенно меняется, и, наконец, устанавливается постоянное удельное вращение, характерное для равновесной смеси таутомеров. Например, установлено, что в водных растворах глюкоза находится главным образом в виде α - и β -глюкопираноз, в меньшей степени — α - и β -глюкофураноз и совсем небольшое количество — в виде альдегидной формы.

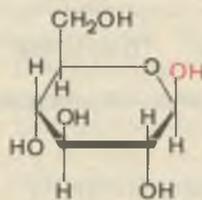
Следует подчеркнуть, что из различных таутомерных форм глюкозы в свободном состоянии известны лишь α - и β -пиранозы. Существование малых количеств фураноз и альдегидной формы в растворах доказано, но в свободном состоянии они не могли быть выделены вследствие неустойчивости.

В 20-х годах У. Хеурс предложил более совершенный способ написания структурных формул углеводов. Формулы Хеурса — шести- или пятиугольники, причем они изображены в перспективе: кольцо лежит в горизонтальной плоскости. Находящиеся ближе к читателю связи изображают более жирными линиями (углеродные атомы цикла не пишут). Заместители, расположенные справа от остова молекулы при ее вертикальном изображении, помещают ниже плоскости кольца, а заместители, находящиеся слева, занимают положение выше плоскости кольца. Обратное правило применяют только для того единственного углеродного атома, гидроксильная группа которого участвует в образовании циклического полуацетала. Так, у D-сахаров группу CH_2OH пишут в верхнем положении от этого атома углерода, а водородный атом при нем — внизу.

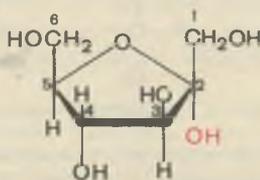
Наконец, следует помнить, что при написании структурных формул по Хеурсу гидроксильная группа при C-1 будет расположена ниже плоскости кольца в α -форме и выше — в β -форме:



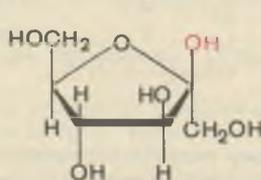
α -D-глюкопираноза



β -D-глюкопираноза



α -D-фруктофураноза



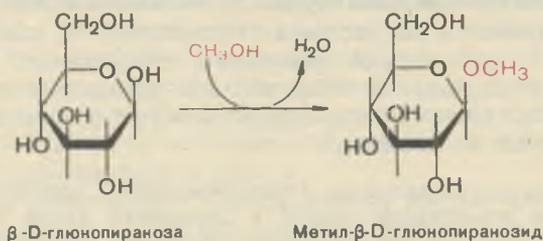
β -D-фруктофураноза

Проекционные формулы Хеурса не отражают подлинной конформации моносахаридов. Подобно циклогексану, пиранозное кольцо может принимать две конфигурации — форму кресла и форму лодки (конформационные формулы). Конфигурация формы кресла обычно более устойчива, и, по-видимому, именно она преобладает в большей части природных сахаров.

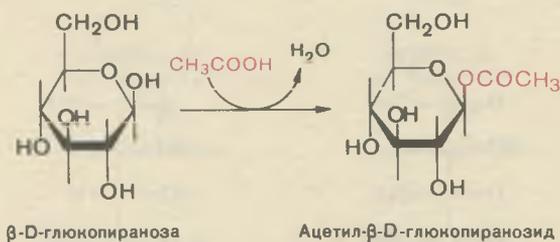
Основные реакции моносахаридов, продукты реакций и их свойства

Реакции полуацетального гидроксила. Как уже отмечалось, моносахариды как в кристаллическом состоянии, так и в растворе в основном существуют в полуацетальных формах. Полуацетальный гидроксил отличается большей реакционной способностью и может замещаться другими группировками в реакциях со спиртами, карбоновыми кислотами, фенолами и т. д.

Продукт реакции называют гликозидом. Соответственно α - и β -изомерам моносахаридов существуют α - и β -гликозиды. Например, при реакции метилового спирта с глюкозой (допустим, в β -пиранозной форме) в присутствии неорганических кислот образуется продукт алкилирования — метил- β -D-гликопиранозид:



При действии на β -D-гликопиранозу уксусной кислотой образуется продукт ацилирования — ацетил- β -D-гликопиранозид:

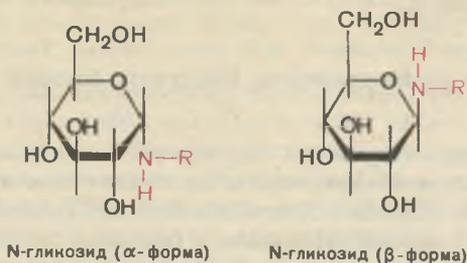


Ацилированию и метилированию способны подвергаться и остальные группы моносахаридов, хотя это требует намного более жестких условий. В тех случаях, когда в реакцию вступают спирты, фенолы или карбоновые кислоты, продукты реакции называют O-гликозидами. Следовательно, метил- β -D-гликопиранозид и ацетил- β -D-гликопиранозид являются O-гликозидами (связь осуществляется через кислород). Природные O-гликозиды, большинство из которых образуется в результате жизнедеятельности растений, существуют преимущественно в β -форме.

Важным классом гликозидов являются N-гликозиды, в которых гликозидная связь осуществляется через азот, а не через кислород¹. N-гликозиды рассматривают как

¹ Существуют еще S-гликозиды, которые представляют собой производные циклических форм тиосахаридов, в меркаптогруппе (-SH) при C-1 которых атом водорода замещен радикалом. S-гликозиды содержатся в ряде растений (горчица, черногорка, боярышник и др.)

производные моносахаридов, у которых гликозильная часть молекулы связана через атом азота с радикалом органического соединения (R), не являющегося углеводом. Как и O-гликозиды, N-гликозиды могут быть построены как пиранозиды или как фуранозиды и иметь α - и β -форму:



К N-гликозидам принадлежат исключительно важные в обмене веществ продукты расщепления нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов (нуклеотиды и нуклеозиды), АТФ, НАД, НАДФ, некоторые антибиотики и т. п. (см. главу 3).

Реакции с участием карбонильной группы. Хотя линейная форма в кристаллических препаратах моносахаридов и их растворах присутствует в незначительных количествах, ее участие в таутомерном равновесии обеспечивает моносахаридам все свойства, присущие альдегидам (в альдозах) или кетонам (в кетозах). Со способностью альдоз и кетоз присоединять спирты мы уже познакомились; рассмотрим теперь некоторые другие их свойства.

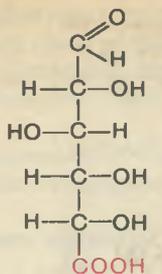
Окисление моносахаридов. Обработка альдоз слабыми окислителями приводит к превращению альдегидной группы в положении атома С-1 в карбоксильную группу с образованием при этом так называемых альдоновых кислот. Примером альдоновых кислот может быть D-глюконовая кислота, которая образуется при окислении альдегидной группы D-глюкозы. Фосфорилированная форма D-глюконовой кислоты играет важную роль в качестве промежуточного продукта углеводного обмена. Другим примером может быть D-галактоновая кислота — продукт окисления альдегидной группы D-галактозы.



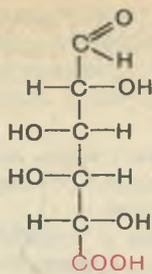
Другой класс называется альдуруновыми, или уруновыми, кислотами. В уруновых кислотах окислена (с образованием карбоксильной группы) первичная спиртовая группа, а альдегидная группа остается неокисленной. Уруновая кислота, образующаяся из D-глюкозы, носит название D-глюкуроновой кислоты, а из D-галактозы — D-галактуруновой кислоты (см. стр. 233).

Уруновые кислоты весьма важны в биологическом отношении, многие из них являются компонентами полисахаридов.

Восстановление моносахаридов. Моносахариды легко гидрируются по связи С—О и при этом превращаются в многоатомные спирты (сахароспирты). D-глюкоза, например, образует спирт — сорбит, а D-манноза — маннит. Восстановление D-фруктозы приводит



D-глюкуроновая кислота



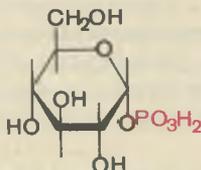
D-галактуроновая кислота

к эквимолекулярной смеси эпимеров – D-маннита и D-сорбита, так как в результате гидрирования второй атом углерода становится асимметричным. Такого рода восстановление может осуществляться и ферментативным путем.

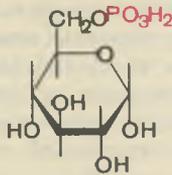
Фосфорнокислые эфиры углеводов. Моносахариды, этерифицированные фосфорной кислотой, играют исключительно большую роль в обмене веществ. Первым обнаруженным в природе фосфорнокислым эфиром углевода был фруктозо-1,6-бисфосфат, который выявили при брожении Л. А. Иванов, а также А. Гарден и В. Юнг в 1905 г. В последующие годы из природных источников выделено много новых моно- и бисфосфатов моносахаридов, в частности большое количество фосфатов кетоз, например, рибулозо- и ксилулозофосфаты. В настоящее время установлена важная роль во многих биохимических процессах наряду с фосфатами гексоз и пентоз также фосфатов гептоз (в первую очередь седогептулозо-7-фосфата) и фосфатов тетроз (эритрозо-4-фосфата и др.).

Большой интерес представляют пиррофосфорные эфиры моносахаридов, например 5-фосфорибозил-1-пиррофосфат (ФРПФ), который участвует в синтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

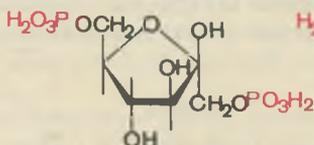
Ниже приводятся формулы некоторых фосфатов сахаров, играющих важную роль в обмене веществ.



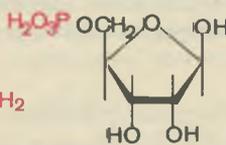
Глюкозо-1-фосфат



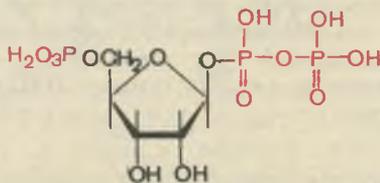
Глюкозо-6-фосфат



Фруктозо-1,6-бисфосфат



Рибозо-5-фосфат

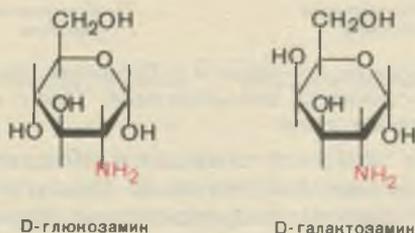


5-Фосфорибозил-1-пиррофосфат

Аминосакхара — производные моносахаридов, гидроксильная группа которых ($—OH$) замещена аминогруппой ($—NH_2$). В зависимости от положения аминогруппы (при атомах углерода) в молекуле аminosакхара различают 2-амино-, 3-амино-, 4-аминосакхара и т. д. По числу аминогрупп выделяют моноаминосакхара и диаминосакхара.

Аминосакхара обладают всеми свойствами аминов, обычных моносахаров, а также специфическими свойствами, обусловленными пространственной близостью гидроксильных и аминных групп.

В организме человека и животных наиболее важными аminosакхарами являются D-глюкозамин и D-галактозамин:



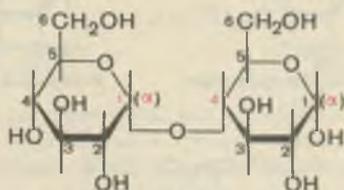
Аминосакхара входят в состав мукополисахаридов животного, растительного и бактериального происхождения, являются углеводными компонентами различных гликопротеинов и гликолипидов. В составе этих высокомолекулярных соединений аминогруппа аminosакхара чаще всего ацилирована, а иногда сульфирована (см. главу 20).

Олигосакхариды

Олигосакхариды — углеводы, молекулы которых содержат от 2 до 10 остатков моносахаридов, соединенных гликозидными связями. В соответствии с этим различают дисакхариды, трисакхариды и т. д.

Дисакхариды — сложные сахара, каждая молекула которых при гидролизе распадается на две молекулы моносахаридов. Дисакхариды наряду с полисахаридами являются одним из основных источников углеводов в пище человека и животных. По строению дисакхариды являются гликозидами, в которых две молекулы моносахаридов соединены гликозидной связью.

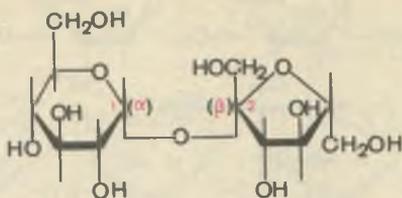
Среди дисакхаридов особенно широко известны мальтоза, лактоза и сахароза. Мальтоза, являющаяся α -глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)- α -глюкопиранозой, образуется в качестве промежуточного продукта при действии амилаз на крахмал (или гликоген), содержит два остатка α -D-глюкозы (название сахара, полуацетальный гидроксил которого участвует в образовании гликозидной связи, оканчивается на «ил»).



Мальтоза

В молекуле мальтозы у второго остатка глюкозы имеется свободный полуацетальный гидроксил. Такие дисакхариды обладают восстанавливающими свойствами.

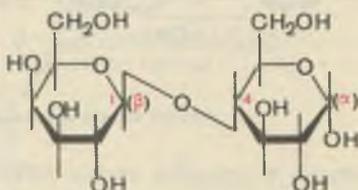
Одним из наиболее распространенных дисахаридов является сахароза — обычный пищевой сахар. Молекула сахарозы состоит из одного остатка D-глюкозы и одного остатка D-фруктозы. Следовательно, это — α -глюкопиранозил-(1 → 2)- β -фруктофуранозид:



Сахароза

В отличие от большинства дисахаридов сахароза не имеет свободного полуацетального гидроксила и не обладает восстанавливающими свойствами.

Дисахарид лактоза содержится только в молоке и состоит из D-галактозы и D-глюкозы. Это — β -галактопиранозил-(1 → 4)-глюкопиранозид:



Лактоза

Поскольку в молекуле лактозы имеется свободный полуацетальный гидроксил (в остатке глюкозы), она принадлежит к числу редуцирующих дисахаридов.

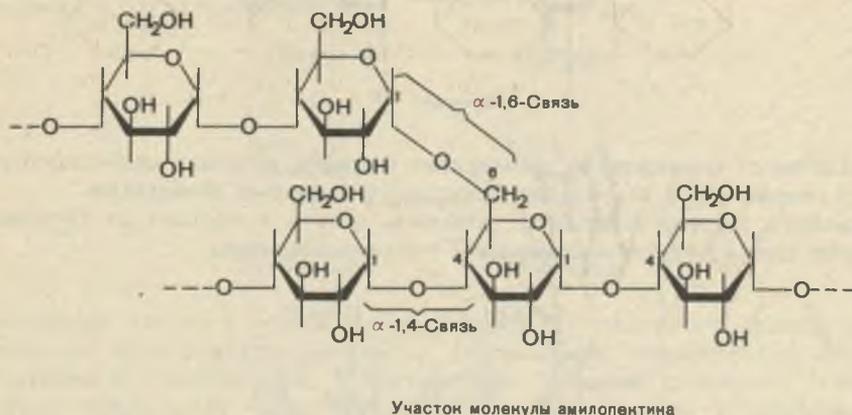
Среди природных трисахаридов наиболее известна рафиноза, содержащая остаток фруктозы, глюкозы и галактозы, которая находится в больших количествах в сахарной свекле и во многих других растениях. В целом олигосахариды, присутствующие в растительных тканях, разнообразнее по своему составу, чем олигосахариды животных тканей.

Полисахариды

С точки зрения общих принципов строения полисахариды можно разделить на две группы: гомополисахариды, состоящие из моносахаридных единиц только одного типа, и гетерополисахариды, для которых характерно наличие двух или более типов мономерных звеньев.

С точки зрения функционального назначения полисахариды также могут быть разделены на две группы: структурные и резервные полисахариды. Важным структурным полисахаридом является целлюлоза, а главными резервными полисахаридами — гликоген и крахмал (у животных и растений соответственно). В данной главе будут рассмотрены только гомополисахариды. Гетерополисахариды представлены в главе 20.

Крахмал представляет собой смесь двух гомополисахаридов: линейного — амилозы и разветвленного — амилопектина, общая формула которых $(C_6H_{10}O_5)_n$. Как правило, содержание амилозы в крахмале составляет 10–30%, амилопектина — 70–90%. Полисахариды крахмала построены из остатков глюкозы, соединенных в амилозе и в линейных цепях амилопектина α -1,4-связями, а в точках ветвления амилопектина — межпечечными α -1,6-связями.



В молекуле амилозы связано в среднем около 1000 остатков глюкозы, отдельные участки молекулы амилопектина состоят из 20–30 таких единиц.

В воде амилоза не дает истинного раствора. Цепочка амилозы в воде образует гидратированные мицеллы. В растворе при добавлении йода амилоза окрашивается в синий цвет. Амилопектин также дает мицеллярные растворы, но форма мицелл несколько иная. Полисахарид амилопектин окрашивается йодом в красно-фиолетовый цвет.

Крахмал имеет молекулярную массу $10^5 - 10^7$ Да. При частичном кислотном гидролизе крахмала образуются полисахариды меньшей степени полимеризации — декстрины¹, при полном гидролизе — глюкоза. Крахмал является наиболее важным для человека пищевым углеводом; содержание его в муке составляет 75–80%, в картофеле — 25%.

Гликоген — главный резервный полисахарид высших животных и человека, построенный из остатков α -D-глюкозы. Эмпирическая формула гликогена, как и крахмала $(C_6H_{10}O_5)_n$. Гликоген содержится практически во всех органах и тканях животных и человека; наибольшее количество его обнаружено в печени и мышцах. Молекулярная масса гликогена $10^5 - 10^8$ Да и выше. Его молекула построена из ветвящихся полиглюкозидных цепей, в которых остатки глюкозы соединены α -1,4-связями. В точках ветвления имеются α -1,6-связи. Гликоген по строению близок к амилопектину.

В молекуле гликогена различают внутренние ветви — участки полиглюкозидных цепей между точками ветвления, и наружные ветви — участки от периферической точки ветвления до нередуцирующего конца цепи (рис. 9.2).

При гидролизе гликоген, подобно крахмалу, расщепляется с образованием сначала декстринов, затем мальтозы и, наконец, глюкозы.

¹ Декстрины $(C_6H_{10}O_5)_p$ — продукты частичного расщепления полисахаридов: крахмала и гликогена. Все декстрины легко растворимы в воде. Они найдены в кишечнике как продукт ферментативного гидролиза, а также обнаружены в крови воротной вены животных и человека после принятия пищи, богатой углеводами.

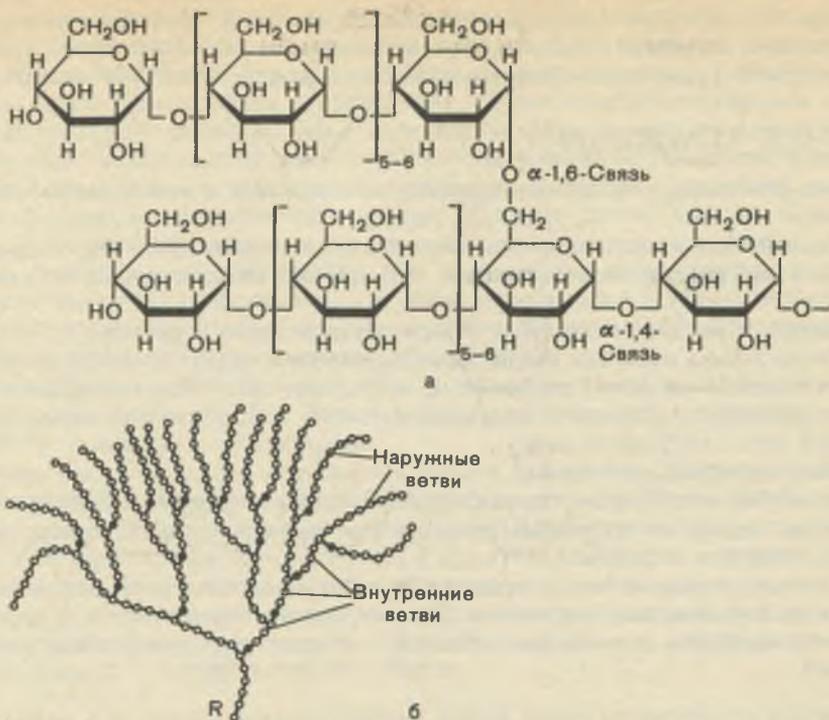
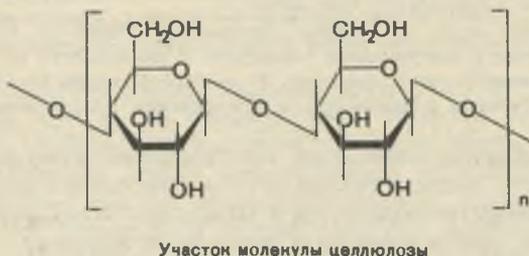


Рис. 9.2. Структура отдельного участка (а) и всей молекулы (б) гликогена (по Майеру).

Белые кружки — остатки глюкозы, соединенные α -1,4-связью; черные кружки — остатки глюкозы, соединенные α -1,6-связью; R — редуцирующая концевая группа. Внутренние цепи, или ветви, — участки между точками ветвления. Наружные цепи, или ветви, начинаются от точки ветвления и кончаются нередуцирующим остатком глюкозы.

Целлюлоза (клетчатка) — наиболее широко распространенный структурный полисахарид растительного мира. Она состоит из α -глюкозных остатков в их β -пиранозной форме, т. е. в молекуле целлюлозы β -глюкопиранозные мономерные единицы линейно соединены между собой β -1,4-связями:



При частичном гидролизе целлюлозы образуется дисахарид целлобиоза, а при полном гидролизе — D-глюкоза. Молекулярная масса целлюлозы 1 000 000 — 2 000 000 Да. Клетчатка не переваривается ферментами желудочно-кишечного тракта, так как набор этих ферментов у человека не содержит β -глюкозидазу. Вместе с тем известно, что присутствие оптимальных количеств клетчатки в пище способствует формированию кала. При полном исключении клетчатки из пищи нарушается формирование каловых масс.

Хитин — структурный полисахарид низших растений, особенно грибов, а также беспозвоночных животных (главным образом членистоногих). Хитин состоит из остатков 2-ацетиламино-2-дезоксид-Д-глюкозы, связанных между собой β -1,4-связями.

ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Обмен углеводов в организме человека складывается в основном из следующих процессов.

1. Расщепление в желудочно-кишечном тракте поступающих с пищей полисахаридов и дисахаридов до моносахаридов. Всасывание моносахаридов из кишечника в кровь.

2. Синтез и распад гликогена в тканях, прежде всего в печени.

3. Анаэробное и аэробное расщепление глюкозы. В тканях существуют два основных пути распада глюкозы: анаэробный путь гликолиза¹ (без потребления кислорода) и аэробный путь прямого окисления глюкозы или, как его называют, пентозофосфатный путь (пентозный цикл).

4. Взаимопревращение гексоз.

5. Аэробный метаболизм пирувата. Этот процесс выходит за рамки углеводного обмена, однако может рассматриваться как завершающая его стадия: окисление продукта гликолиза — пирувата.

6. Наконец, весьма важным является процесс глюконеогенеза, или образование углеводов из неуглеводных продуктов. Такими продуктами являются в первую очередь пировиноградная и молочная кислоты, глицерин, аминокислоты и ряд других соединений.

Переваривание и всасывание углеводов

Расщепление крахмала (и гликогена) начинается в ротовой полости под действием амилазы слюны.

Известны три вида амилаз, отличающихся главным образом по конечным продуктам их ферментативного действия, которые называют α -амилазой, β -амилазой и γ -амилазой. α -Амилаза расщепляет в полисахаридах внутренние α -1,4-связи, поэтому ее иногда называют эндоамилазой. Молекула α -амилазы содержит в своих активных центрах ионы кальция, необходимые для осуществления ферментативной активности. Кроме того, характерной особенностью α -амилазы животного происхождения является способность активироваться одновалентными анионами, прежде всего ионами хлора.

Под действием β -амилазы от крахмала отщепляется дисахарид мальтоза, т. е. она является экзоамилазой. β -Амилаза найдена у высших растений, где она выполняет важную роль в мобилизации резервного (запасного) крахмала.

γ -Амилаза отщепляет один за другим глюкозные остатки от конца полиглюкозидной цепочки. Различают кислые и нейтральные γ -амилазы в зависимости от того, в какой области рН они проявляют максимальную активность. В органах и тканях человека и млекопитающих кислая γ -амилаза локализована в лизосомах, а нейтральная — в микросомах и гиалоплазме.

Амилаза слюны является α -амилазой. Под влиянием этого фермента в основном происходят первые фазы распада крахмала (или гликогена) с образованием декстринов (в небольшом количестве образуется и мальтоза). Затем пища, более или менее смешанная со слюной, проглатывается и попадает в желудок.

Желудочный сок сам по себе не содержит ферментов, расщепляющих сложные

¹ Понятие «гликолиз» означает расщепление глюкозы. Первоначально оно относилось только к анаэробному брожению, завершающемуся образованием молочной кислоты (лактата) или этанола и CO_2 , однако теперь имеет более широкое значение и используется для описания распада глюкозы, проходящего через образование глюкозо-6-фосфата, фруктозобисфосфата и пирувата как в отсутствие, так и в присутствии кислорода. В последнем случае употребляют понятие «аэробный гликолиз» в отличие от «анаэробного гликолиза», завершающегося образованием молочной кислоты (лактата).

углеводы. В желудке действие α -амилазы слюны прекращается, так как желудочное содержимое имеет резко кислую реакцию (рН 1,5–2,5). Однако в более глубоких слоях пищевого комка, куда не сразу проникает желудочный сок, действие амилазы некоторое время продолжается и происходит расщепление полисахаридов с образованием декстринов и мальтозы. Наиболее важная фаза распада крахмала (и гликогена) протекает в двенадцатиперстной кишке под действием α -амилазы поджелудочного сока. Здесь рН возрастает приблизительно до нейтральных значений, и при этих условиях α -амилаза панкреатического сока обладает почти максимальной активностью. Этот фермент завершает превращение крахмала и гликогена в мальтозу, начатое амилазой слюны. Напомним, что в молекулах амилопектина и гликогена существуют также $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -гликозидные связи, находящиеся в точках ветвления. Эти связи в кишечнике гидролизуются особыми ферментами — амило-1,6-глюкозидазой и олиго-1,6-глюкозидазой (терминальной декстриназой).

Таким образом, расщепление крахмала и гликогена до мальтозы происходит в кишечнике под действием трех ферментов — панкреатической α -амилазы, амило-1,6-глюкозидазы и олиго-1,6-глюкозидазы.

Образующаяся мальтоза оказывается только временным продуктом, так как она быстро гидролизует под влиянием фермента мальтазы (α -глюкозидазы) на две молекулы глюкозы. Кишечный сок содержит также активную сахаразу, под влиянием которой из сахарозы образуются глюкоза и фруктоза¹. Лактоза, которая содержится только в молоке, под действием лактазы кишечного сока расщепляется на глюкозу и галактозу. В конце концов углеводы пищи распадаются на составляющие их моносахариды (преимущественно глюкоза, фруктоза и галактоза), которые всасываются кишечной стенкой и затем попадают в кровь.

Напомним, что на внутренней поверхности тонкой кишки располагаются ворсинки. В тонкой кишке человека на 1 мм² поверхности приходится 22–40, в подвздошной — 18–30 ворсинок. Снаружи ворсинки покрыты кишечным эпителием, клетки которого имеют множественные выросты — микроворсинки (до 4000 на каждой клетке). На 1 мм² поверхности тонкого кишечника у человека находится 80–140 млн микроворсинок.

При соответствующей обработке препаратов над микроворсинками обнаруживается волокнистая сеть, представляющая собой гликопротеиновый комплекс — гликокаликс. В поверхностных слоях гликокаликса задерживаются крупные молекулы и бактерии. Полисахариды не проникают через гликокаликс и, оставшись нерасщепленными при полостном пищеварении, гидролизуются на поверхности энтероцитов. Мальтоза, сахароза и лактоза могут гидролизываться в гликокаликсе. Такое переваривание получило название пристеночного, или внеклеточного, пищеварения.

Маловероятным представляется всасывание значительных количеств дисахаридов, так как из экспериментов с парентеральным их введением известно, что большая часть дисахаридов, поступивших в кровяное русло, выделяется с мочой неизменной; это является тем единственным и притом нефизиологическим случаем, когда дисахариды появляются в моче.

Скорость всасывания отдельных моносахаридов различна. Глюкоза и галактоза всасываются быстрее, чем другие моносахариды. Принято считать, что всасывание маннозы, ксилозы и арабинозы осуществляется преимущественно путем диффузии, всасывание же большинства других моносахаридов происходит за счет активного транспорта. Установлено, что для всасывания простых углеводов необходимо присутствие ионов натрия. Углеводы и натрий образуют комплексное соединение, которое транспортируется внутрь клетки. Затем комплекс распадается, а освобожденный ион натрия транспортируется обратно. Ион натрия активирует АТФазу, благодаря чему ускоряется распад АТФ и освобождается необходимая для всасывания энергия.

¹ Гидролиз сахарозы сопровождается изменением знака оптического вращения: правовращающая сахароза превращается в левовращающую смесь глюкозы и фруктозы. Эту смесь называли раньше инвертированным сахаром.

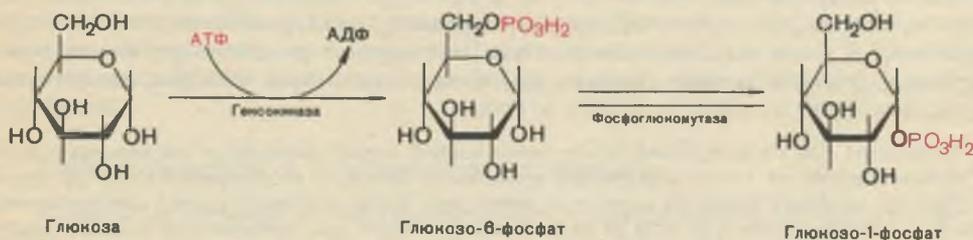
Динамика происходящих при этом процессов пока остается недостаточно ясной и в настоящее время обстоятельно изучается в различных лабораториях.

Судьба всосавшихся моносахаридов. Свыше 90% всосавшихся моносахаридов (главным образом глюкозы) через капилляры кишечных ворсинок попадает в кровеносную систему и с током крови через воротную вену доставляется прежде всего в печень. Остальное количество моносахаридов поступает по лимфатическим путям в венозную систему. В печени значительная часть всосавшейся глюкозы превращается в гликоген, который откладывается в печеночных клетках в форме своеобразных, видимых под микроскопом блестящих гранул.

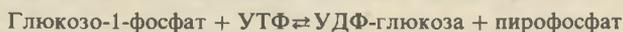
Синтез гликогена

Считалось, что гликоген-фосфорилаза (фосфорилаза *a*) катализирует как распад гликогена, так и его синтез, потому что в опытах *in vitro* было показано, что гликоген-фосфорилазная реакция обратима. Однако в дальнейшем было установлено, что в клетке фосфорилаза *a* катализирует только распад гликогена, синтез же гликогена осуществляется совершенно другим путем.

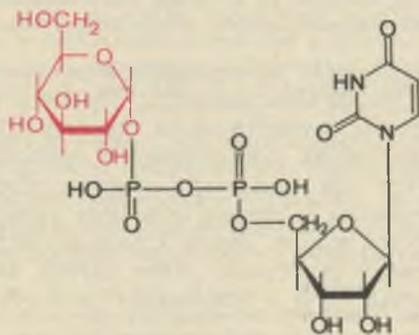
Прежде всего глюкоза подвергается фосфорилированию при участии фермента гексокиназы, а в печени — и глюкокиназы (см. главу 15). Далее глюкозо-6-фосфат под влиянием фермента фосфоглюкомутазы переходит в глюкозо-1-фосфат¹:



Образовавшийся глюкозо-1-фосфат уже непосредственно вовлекается в синтез гликогена. На первой стадии синтеза глюкозо-1-фосфат вступает во взаимодействие с УТФ, образуя уридиндифосфатглюкозу (УДФ-глюкозу) и пиррофосфат. Данная реакция катализируется ферментом глюкозо-1-фосфат-уридилтрансферазой (УДФ-пирофосфорилазой):



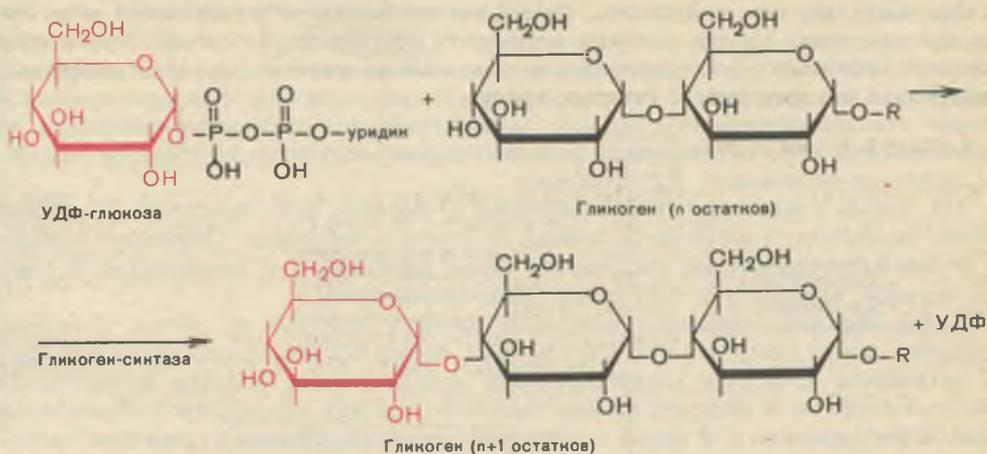
Ниже приведена структурная формула УДФ-глюкозы.



Уридиндифосфатглюкоза
(УДФ-глюкоза)

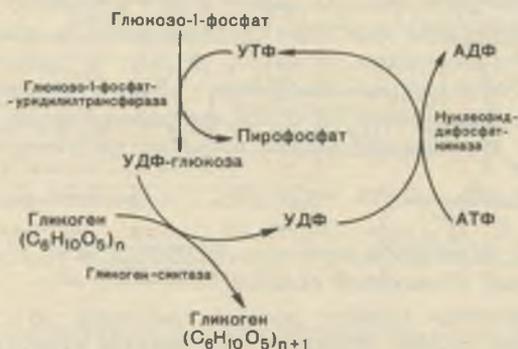
¹ Роль кофактора в данной реакции выполняет глюкозо-1,6-бисфосфат, образующийся в следующей реакции, катализируемой фосфоглюкокиназой: глюкозо-1-фосфат + АТФ \rightleftharpoons глюкозо-1,6-бисфосфат + АДФ.

На второй стадии, приводящей к образованию гликогена, происходит перенос глюкозного остатка, входящего в состав УДФ-глюкозы, на глюкозидную цепь гликогена («затравочное» количество). При этом образуется α -(1 \rightarrow 4)-связь между первым атомом углерода добавляемого остатка глюкозы и 4-гидроксильной группой остатка глюкозы цепи. Эта реакция катализируется ферментом гликогенсинтазой.



Образующийся УДФ затем вновь фосфорилируется в УТФ за счет АТФ, и таким образом весь цикл превращений глюкозо-1-фосфата начинается сначала.

В целом образование α -1,4-глюкозидной ветви («амилозной» ветви) гликогена можно представить в виде следующей схемы:



Установлено, что гликогенсинтаза неспособна катализировать образование α -(1 \rightarrow 6)-связи, имеющейся в точках ветвления гликогена. Этот процесс катализирует специальный фермент, получивший название гликогенветвящего фермента, или гликозил-(4 \rightarrow 6)-трансферазы¹.

Благодаря способности к отложению гликогена (главным образом в печени и мышцах и в меньшей степени в других органах и тканях) создаются условия для накопления в норме некоторого резерва углеводов. При повышении энерготрат в организме в результате возбуждения ЦНС обычно происходит усиление распада гликогена и образование глюкозы (гликогенез).

¹ Гликозил-(4 \rightarrow 6)-трансфераза катализирует перенос концевой олигосахаридного фрагмента, состоящего из 6 или 7 остатков глюкозы, с нередуцирующего конца одной из боковых цепей, насчитывающей не менее 11 остатков, на 6-гидроксильную группу остатка глюкозы той же или другой цепи гликогена. В результате образуется новая боковая цепь.

Помимо непосредственной передачи нервных импульсов к эффекторным органам и тканям, при возбуждении ЦНС повышаются функции ряда желез внутренней секреции (мозговое вещество надпочечников, щитовидная железа, гипофиз и др.), гормоны которых активируют распад гликогена, прежде всего в печени и мышцах (см. главу 6).

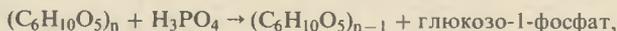
Например, как уже отмечалось, эффект катехоламинов в значительной мере опосредован действием цАМФ, который активирует протеинкиназы тканей. При участии последних происходит фосфорилирование ряда белков, в том числе гликогенсинтазы и фосфорилазы *b* — ферментов, участвующих в обмене углеводов. Фосфорилированный фермент гликогенсинтаза сам по себе малоактивен или полностью неактивен, но в значительной мере активируется положительным модулятором, глюкозо-6-фосфатом, который увеличивает V_{\max} фермента.

Эта форма гликогенсинтазы называется D-формой, или зависимой (dependent) формой, поскольку ее активность зависит от глюкозо-6-фосфата. Дефосфорилированная форма гликогенсинтазы, называемая также I-формой, или независимой (independent) формой, активна и в отсутствие глюкозо-6-фосфата.

Таким образом, адреналин оказывает двойное действие на обмен углеводов: ингибирует синтез гликогена из УДФ-глюкозы, поскольку для проявления максимальной активности D-формы гликогенсинтазы нужны весьма высокие концентрации глюкозо-6-фосфата, и ускоряет распад гликогена, так как способствует образованию активной фосфорилазы *a*. В целом суммарный результат действия адреналина состоит в ускорении превращения гликогена в глюкозу.

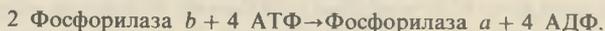
Распад гликогена и освобождение глюкозы (гликогенез)

Известно, что фосфоролитический распад играет ключевую роль в мобилизации полисахаридов¹. Фосфорилазы переводят полисахариды (в частности, гликоген) из запасной формы в метаболически активную форму; в присутствии фосфорилазы гликоген распадается с образованием фосфорного эфира глюкозы (глюкозо-1-фосфата) без предварительного расщепления на более крупные обломки молекулы полисахарида. В общей форме эту реакцию можно представить в следующем виде:



где $(C_6H_{10}O_5)_n$ означает полисахаридную цепь гликогена, а $(C_6H_{10}O_5)_{n-1}$ — ту же цепь, но укороченную на один глюкозный остаток.

На рис. 9.3 изображены процесс распада гликогена до глюкозо-1-фосфата и участие в этом процессе цАМФ. Фермент фосфорилаза существует в двух формах, одна из которых (фосфорилаза *a*) активна, в то время как другая (фосфорилаза *b*) обычно неактивна. Обе формы могут диссоциировать на субъединицы. Фосфорилаза *b* состоит из двух субъединиц, а фосфорилаза *a* — из четырех. Превращение фосфорилазы *b* в фосфорилазу *a* осуществляется фосфорилированием белка:



Катализируется эта реакция ферментом, который называется киназой фосфорилазы *b*. Было найдено, что эта киназа может существовать как в активной, так и в неактивной форме, причем неактивная киназа фосфорилазы превращается в актив-

¹ В тканях человека и животных советскими биохимиками Е. Л. Розенфельд и И. А. Поповой обнаружен также фермент α -амилаза, катализирующий отщепление остатков глюкозы от молекулы гликогена по α -1,4-связи. Однако ведущая роль в расщеплении гликогена в клетках принадлежит фосфорилазам.

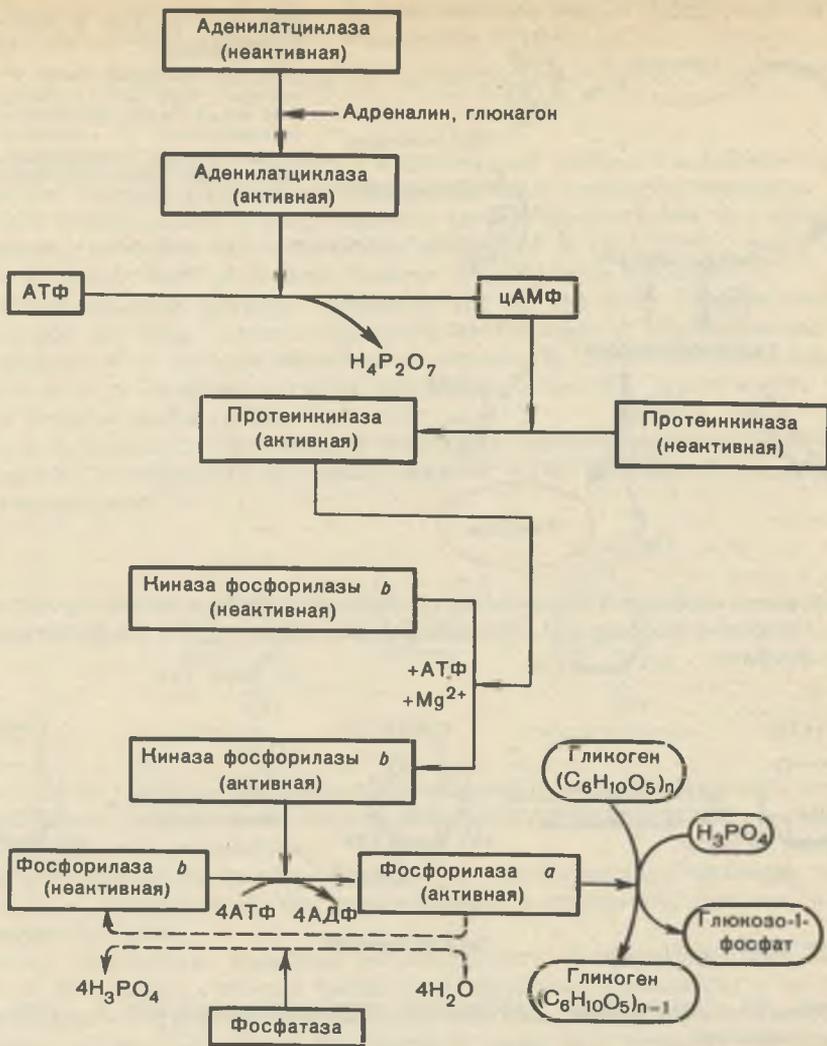


Рис. 9.3. Гормональная регуляция фосфоролитического отщепления остатка глюкозы от гликогена.

ную под влиянием фермента протеинкиназы (киназа киназы фосфорилазы). Активная форма последней образуется при участии цАМФ, которая в свою очередь образуется из АТФ под действием фермента аденилатциклазы, стимулируемой, в частности, адреналином и глюкагоном. Увеличение содержания адреналина в крови ведет по этой сложной цепи реакций к превращению фосфорилазы *b* в фосфорилазу *a* и, следовательно, к освобождению глюкозы в виде глюкозо-1-фосфата из запасного полисахарида гликогена. Обратное превращение фосфорилазы *a* в фосфорилазу *b* катализируется ферментом фосфатазой (эта реакция практически необратима).

Образовавшийся в результате фосфоролитического распада гликогена глюкозо-1-фосфат превращается под действием фосфоглюкомутазы в глюкозо-6-фосфат. Для осуществления данной реакции необходима фосфорилированная форма фосфоглюкомутазы, т. е. ее активная форма, которая образуется, как уже указывалось, в присутствии глюкозо-1,6-бисфосфата.

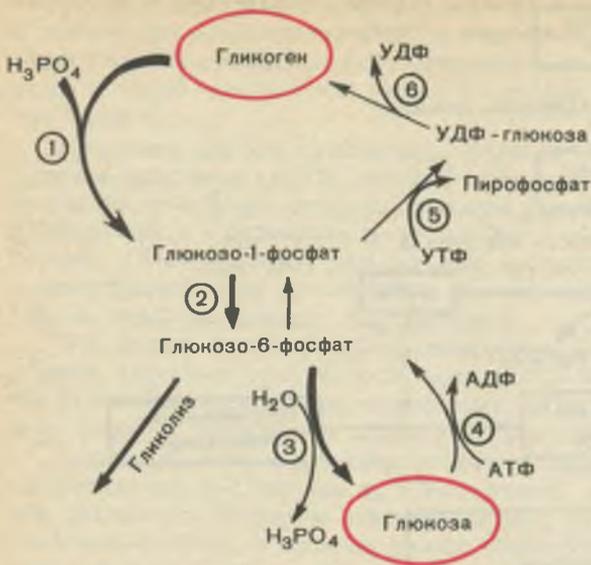
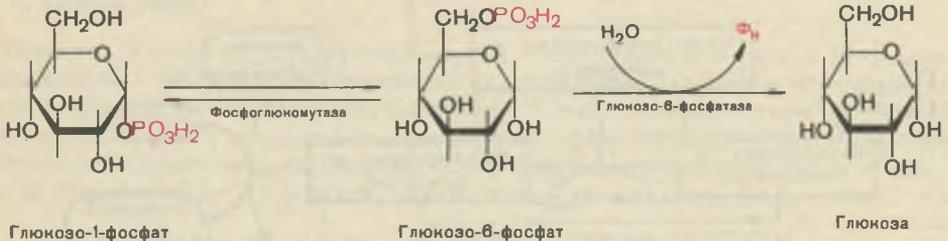


Рис. 9.4. Распад и синтез гликогена (схема).

Жирными стрелками указан путь распада, тонкими — путь синтеза. Цифрами обозначены ферменты: 1 — фосфорилаза; 2 — фосфоглюкомутаза; 3 — глюкозо-6-фосфатаза; 4 — гексокиназа (глюкокиназа); 5 — глюкозо-1-фосфат-уридилтрансфераза; 6 — гликогенсинтаза.

Образование свободной глюкозы из глюкозо-6-фосфата в печени происходит под влиянием глюкозо-6-фосфатазы¹. Данный фермент катализирует гидролитическое отщепление фосфата:



На рис. 9.4 суммированы изложенные выше представления о путях распада и синтеза гликогена.

Можно считать, что сохранение постоянства концентрации глюкозы в крови является результатом одновременного протекания двух процессов: поступления глюкозы в кровь из печени и потребления ее из крови тканями, где она используется в первую очередь как энергетический материал.

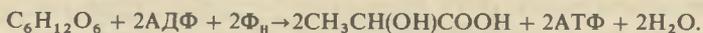
В тканях (в том числе и в печени) существуют два основных пути распада глюкозы: анаэробный (при отсутствии кислорода) и аэробный (для осуществления которого необходим кислород).

Гликолиз

Гликолиз (от греч. *glycys* — сладкий и *lysis* — растворение, распад) — сложный ферментативный процесс последовательных превращений глюкозы, протекающий в тканях человека и животных без потребления кислорода. Конечным продуктом гликолиза

¹ В отличие от печени в мышечной ткани глюкозо-6-фосфатаза отсутствует. Пути распада и синтеза гликогена в печени, в целом, подобны таковым в мышце, однако имеются существенные различия в структуре печеночных и мышечных ферментов метаболизма, а также в механизмах регуляции их активности.

является молочная кислота. В процессе гликолиза образуется АТФ. Суммарное уравнение гликолиза можно изобразить следующим образом:



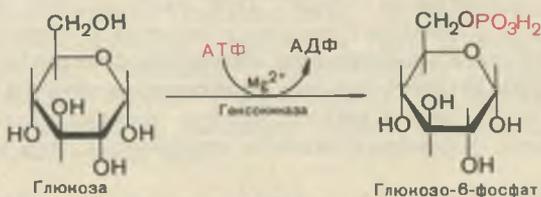
Глюкоза

Молочная кислота

В анаэробных условиях гликолиз — единственный процесс в животном организме, поставляющий энергию. Именно благодаря процессу гликолиза организм человека и животных определенный период времени может осуществлять ряд физиологических функций в условиях недостаточности кислорода. В тех случаях, когда гликолиз протекает в присутствии кислорода, говорят об аэробном гликолизе¹.

Последовательность реакций гликолиза, так же как и их промежуточные продукты, хорошо изучены. Процесс гликолиза катализируется одиннадцатью ферментами, большинство из которых выделено в гомогенном, кристаллическом или высокоочищенном виде, и свойства которых достаточно известны. Заметим, что гликолиз протекает в гиалоплазме (цитозоле) клетки.

Первой ферментативной реакцией гликолиза является фосфорилирование, т. е. перенос остатка ортофосфата на глюкозу за счет АТФ. Реакция катализируется ферментом гексокиназой:



Глюкоза

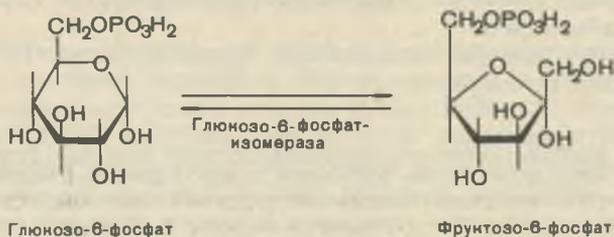
Глюкозо-6-фосфат

Образование глюкозо-6-фосфата в гексокиназной реакции связано с освобождением значительного количества свободной энергии системы и может считаться практически необратимым процессом.

Наиболее важным свойством гексокиназы является ее ингибирование глюкозо-6-фосфатом, т. е. последний служит одновременно и продуктом реакции, и аллостерическим ингибитором.

Фермент гексокиназа способен катализировать фосфорилирование не только D-глюкозы, но и других гексоз, в частности D-фруктозы, D-маннозы и др. В печени, кроме гексокиназы, существует фермент глюкокиназа, который катализирует фосфорилирование только D-глюкозы. В мышечной ткани этот фермент отсутствует (подробнее см. главу 15).

Второй реакцией гликолиза является превращение глюкозо-6-фосфата под действием фермента глюкозо-6-фосфат-изомеразы во фруктозо-6-фосфат:



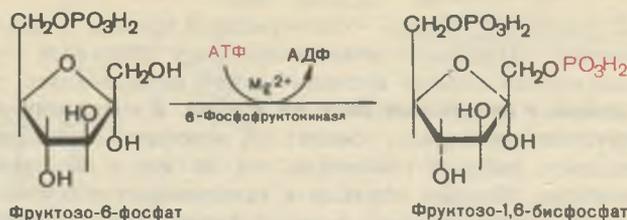
Глюкозо-6-фосфат

Фруктозо-6-фосфат

¹ В аэробных условиях гликолитический распад глюкозы до пировиноградной кислоты можно рассматривать как первую стадию окисления глюкозы до конечных продуктов этого процесса — углекислого газа и воды.

Эта реакция протекает легко в обоих направлениях и не нуждается в присутствии каких-либо кофакторов.

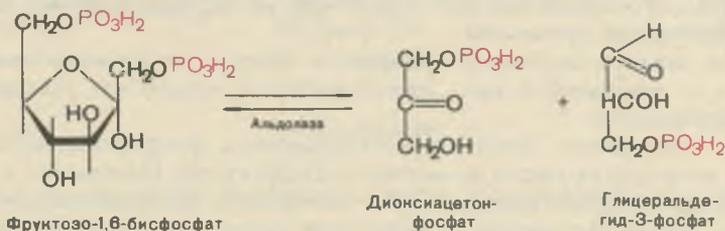
Третья реакция катализируется ферментом фосфофруктокиназой, образовавшийся фруктозо-6-фосфат вновь фосфорилируется за счет второй молекулы АТФ:



Данная реакция аналогично гексокиназной практически необратима, протекает в присутствии ионов магния и является наиболее медленно текущей реакцией гликолиза. Фактически эта реакция определяет скорость гликолиза в целом.

Фосфофруктокиназа относится к числу аллостерических ферментов. Она ингибируется АТФ и стимулируется АМФ¹. При значительных величинах отношения АТФ/АМФ активность фосфофруктокиназы угнетается и гликолиз замедляется. Напротив, при снижении этого коэффициента интенсивность гликолиза повышается. Так, в неработающей мышце активность фосфофруктокиназы низкая, а концентрация АТФ относительно высокая. Во время работы мышцы происходит интенсивное потребление АТФ и активность фосфофруктокиназы повышается, что приводит к усилению процесса гликолиза.

Четвертую реакцию гликолиза катализирует фермент альдолаза. Под влиянием этого фермента фруктозо-1,6-бисфосфат расщепляется на две фосфотриозы.

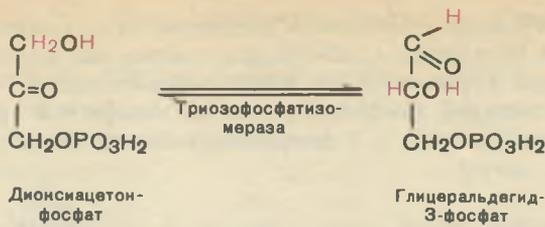


Эта реакция обратима. В зависимости от температуры равновесие устанавливается на различном уровне. В целом же при повышении температуры реакция сдвигается в сторону большего образования триозофосфатов (дигидроацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата)².

Пятая реакция – реакция изомеризации триозофосфатов. Катализируется ферментом триозофосфатизомеразой:

¹ Активность фосфофруктокиназы ингибируется также цитратом. Показано, что при диабете, голодании и некоторых других состояниях, когда интенсивно используются жиры как источник энергии, в клетках тканей содержание цитрата может возрастать в несколько раз. В этих условиях происходит резкое торможение активности фосфофруктокиназы цитратом.

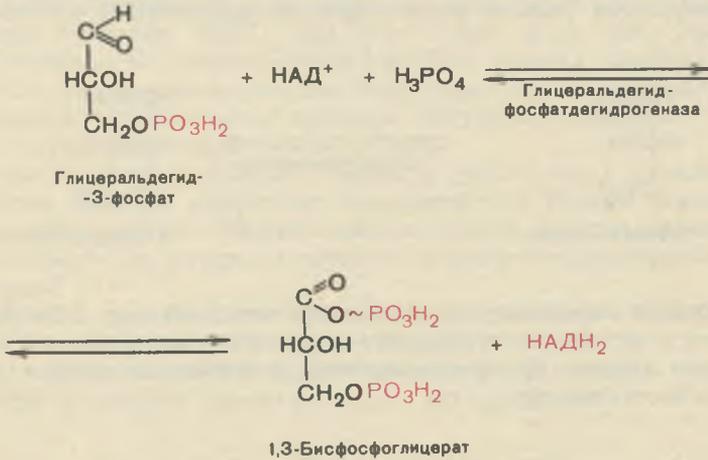
² Животные ткани содержат по меньшей мере три различные альдолазы, характерные для мышц, печени и мозга соответственно. Все альдолазы расщепляют фруктозо-1,6-бисфосфат до дигидроацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата и могут катализировать обратную конденсацию дигидроацетонфосфата с различными оксальдегидами, хотя и с неодинаковой скоростью.



Равновесие данной изомеразной реакции сдвинуто в сторону диоксиацетонфосфата: 95% диоксиацетонфосфата и около 5% глицеральдегид-3-фосфата. Однако в последующие реакции гликолиза может непосредственно включаться только один из двух образующихся триозофосфатов, а именно глицеральдегид-3-фосфат. Вследствие этого по мере потребления в ходе дальнейших превращений альдегидной формы фосфотриозы диоксиацетонфосфат превращается в глицеральдегид-3-фосфат.

Образованием глицеральдегид-3-фосфата как бы завершается первая стадия гликолиза. Вторая стадия — наиболее сложная и важная. Она включает окислительно-восстановительную реакцию (реакцию гликолитической оксидоредукции), сопряженную с субстратным фосфорилированием, в процессе которого образуется АТФ.

В результате шестой реакции глицеральдегид-3-фосфат в присутствии фермента глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, кофермента НАД и неорганического фосфата подвергается своеобразному окислению с образованием 1,3-бисфосфоглицериновой кислоты¹ и восстановленной формы НАД (НАДН₂). Эта реакция блокируется йодили бромацетатом, протекает в несколько этапов. Суммарно данную реакцию можно изобразить в следующем виде:

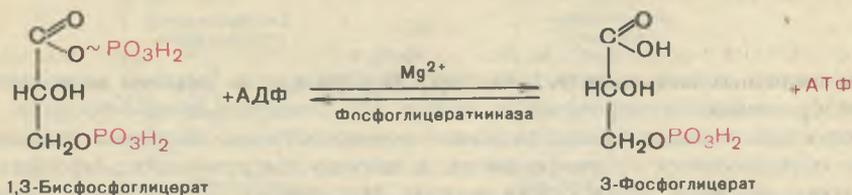


1,3-Бисфосфоглицерат представляет собой высокоэнергетическое соединение (макроэргическая связь условно обозначена знаком «тильда» ~). Механизм действия глицеральдегидфосфатдегидрогеназы сводится к следующему: в присутствии неорганического фосфата НАД⁺ выступает как акцептор водорода, отщепляющегося от глицеральдегид-3-фосфата. В процессе образования НАДН₂ глицеральдегид-3-фосфат связывается с молекулой фермента за счет SH-групп последнего. Образовавшаяся

¹ Глицеральдегид-3-фосфат последний углевод в цепи превращений глюкозы, дальнейшим превращениям подвергаются органические кислоты, которые находятся в диссоциированной форме, поэтому наряду с названием свободных кислот используют также название их анионов, например 3-фосфоглицерат, пируват и др.

связь богата энергией, но она непрочна и расщепляется под влиянием неорганического фосфата. При этом образуется 1,3-бисфосфоглицериновая кислота.

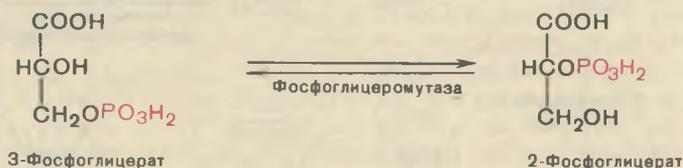
Седьмая реакция катализируется фосфоглицераткиназой, при этом происходит передача богатой энергией фосфатного остатка (фосфатной группы в положении 1) на АДФ с образованием АТФ и 3-фосфоглицериновой кислоты (3-фосфоглицерата):



Таким образом, благодаря действию двух ферментов (глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы и фосфоглицераткиназы) энергия, высвобождающаяся при окислении альдегидной группы глицеральдегид-3-фосфата до карбоксильной группы, запасается в форме энергии АТФ. В отличие от окислительного фосфорилирования образование АТФ из высокоэнергетических соединений называется субстратным фосфорилированием.

Восьмая реакция сопровождается внутримолекулярным переносом оставшейся фосфатной группы, и 3-фосфоглицериновая кислота превращается в 2-фосфоглицериновую кислоту (2-фосфоглицерат).

Реакция легко обратима, протекает в присутствии ионов Mg^{2+} . Кофактором фермента является также 2,3-бисфосфоглицериновая кислота, аналогично тому, как в фосфоглюкомутазной реакции роль кофактора выполнялась глюкозо-1,6-бисфосфатом:

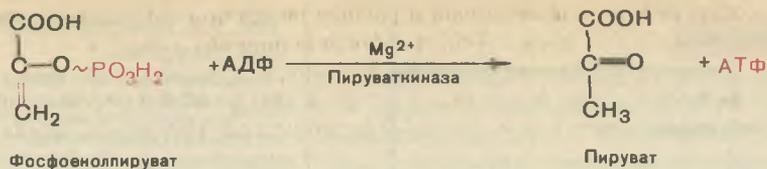


Девятая реакция катализируется ферментом енолазой, при этом 2-фосфоглицериновая кислота в результате отщепления молекулы воды переходит в фосфоенолпировиноградную кислоту (фосфоенолпируват), а фосфатная связь в положении 2 становится высокоэнергетической:



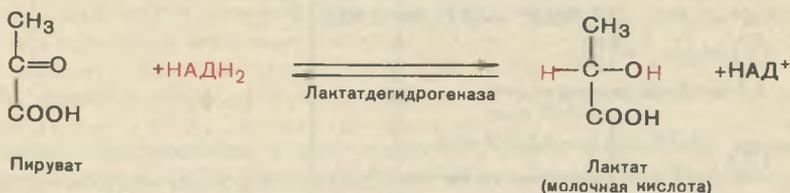
Енолаза активируется двухвалентными катионами Mg^{2+} или Mn^{2+} и ингибируется фторидом.

Десятая реакция характеризуется разрывом высокоэнергетической связи и переносом фосфатного остатка от фосфоенолпирувата на АДФ (субстратное фосфорилирование). Катализируется ферментом пируваткиназой:



Для действия пируваткиназы необходимы ионы Mg^{2+} , а также одновалентные катионы щелочных металлов (K^+ или др.). Внутри клетки реакция является практически необратимой.

В результате одиннадцатой реакции происходит восстановление пировиноградной кислоты и образуется молочная кислота. Реакция протекает при участии фермента лактатдегидрогеназы и кофермента НАДН_2 , образовавшегося в шестой реакции:



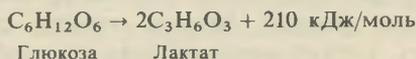
В целом последовательность протекающих при гликолизе реакций может быть представлена в следующем виде (рис. 9.5).

Реакция восстановления пирувата завершает внутренний окислительно-восстановительный цикл гликолиза. НАД^+ при этом играет роль лишь промежуточного переносчика водорода от глицеральдегид-3-фосфата (шестая реакция) на пировиноградную кислоту (одиннадцатая реакция), при этом сам он регенерируется и вновь может участвовать в циклическом процессе, получившем название гликолитической оксидоредукции.

Биологическое значение процесса гликолиза прежде всего заключается в образовании богатых энергией фосфорных соединений. На первых стадиях гликолиза затрачиваются две молекулы АТФ (гексокиназная и фосфофруктокиназная реакции). На последующих образуются четыре молекулы АТФ (фосфоглицераткиназная и пируваткиназная реакции).

Таким образом, энергетическая эффективность гликолиза в анаэробных условиях составляет две молекулы АТФ на одну молекулу глюкозы.

Известно, что изменение свободной энергии при расщеплении глюкозы до двух молекул молочной кислоты составляет около 210 кДж/моль:



Из этого количества энергии около 126 кДж рассеивается в виде тепла, а 84 кДж (максимально) накапливается в форме богатых энергией фосфатных связей АТФ, так как макроэнергетическая связь в молекуле АТФ соответствует примерно 33,6–42,0 кДж/моль. Таким образом, коэффициент полезного действия анаэробного гликолиза близок к 0,4 (84/210).

Величины изменения свободной энергии точно определены для отдельных реакций гликолиза в интактных эритроцитах человека. Установлено, что восемь реакций гликолиза близки к равновесию, а три реакции (гексокиназная, фосфофруктокиназная, пируваткиназная) сопровождаются значительным уменьшением свободной энергии, т. е. практически являются необратимыми.

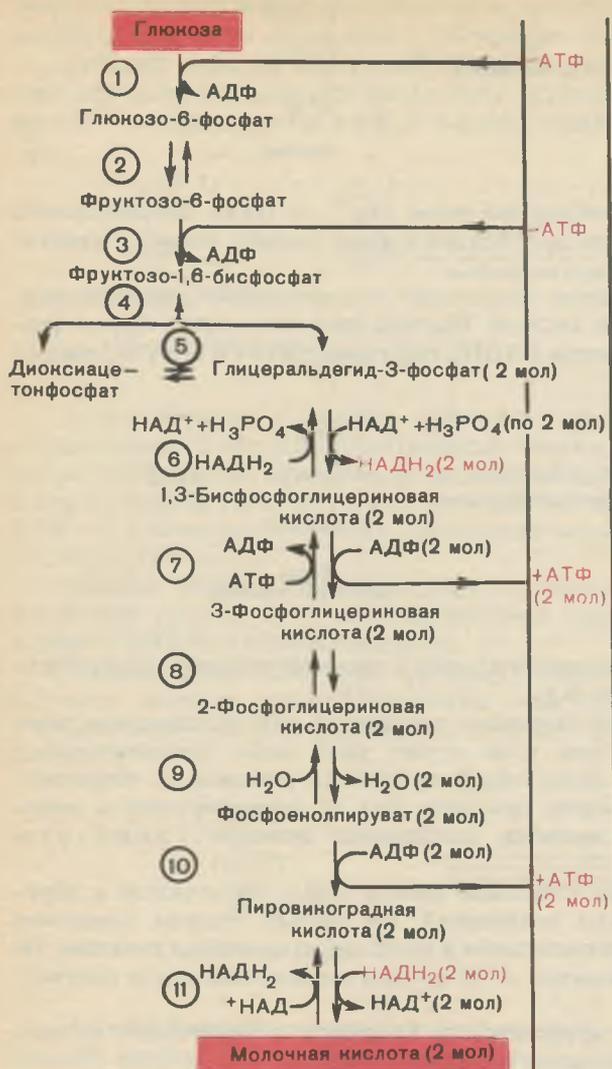


Рис. 9.5. Последовательность реакций гликолиза.

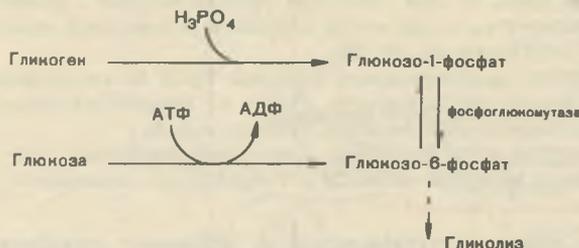
1 — гексокиназа; 2 — фосфоглюкоизомераза; 3 — фосфоглицераткиназа; 4 — альдолаза; 5 — триозофосфатизомераза; 6 — глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; 7 — фосфоглицераткиназа; 8 — фосфоглицеромутаза; 9 — енолаза; 10 — пируваткиназа; 11 — лактатдегидрогеназа.

Как уже отмечалось, основной лимитирующей скоростью гликолиза реакцией является фосфоглицераткиназная реакция. Вторым этапом, лимитирующим скорость и регулирующим гликолиз, служит гексокиназная реакция. Кроме того, контроль гликолиза осуществляется также ЛДГ и ее изоферментами. В тканях с аэробным метаболизмом (ткани сердца, почек и др.) преобладают изоферменты ЛДГ₁ и ЛДГ₂ (см. главу 4). Эти изоферменты ингибируются даже небольшими концентрациями пирувата, что препятствует образованию молочной кислоты и способствует более полному окислению пирувата (точнее, ацетил-КоА) в цикле трикарбоновых кислот.

В тканях человека, в значительной степени использующих энергию гликолиза (например, скелетные мышцы), главными изоферментами являются ЛДГ₃ и ЛДГ₄. Активность ЛДГ₅ максимальна при тех концентрациях пирувата, которые ингибируют ЛДГ₁. Преобладание изоферментов ЛДГ₄ и ЛДГ₅ обуславливает интенсивный анаэробный гликолиз с быстрым превращением пирувата в молочную кислоту.

Гликогенолиз

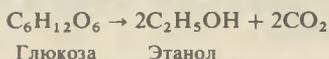
Процесс анаэробного распада гликогена получил название гликогенолиза. Вовлечение D-глюкозных единиц гликогена в процесс гликолиза происходит при участии двух ферментов — фосфорилазы *a* и фосфоглюкомутазы. Образовавшийся в результате фосфоглюкомутазной реакции глюкозо-6-фосфат может включаться в процесс гликолиза. После образования глюкозо-6-фосфата дальнейшие пути гликолиза и гликогенолиза полностью совпадают:



В процессе гликогенолиза в виде макроэргических соединений накапливаются не две, а три молекулы АТФ (не тратится АТФ на образование глюкозо-6-фосфата). На первый взгляд, энергетическая эффективность гликогенолиза выглядит несколько более высокой по сравнению с процессом гликолиза, но эта эффективность реализуется только при наличии активной фосфорилазы *a*; следует иметь в виду, что в процессе активации фосфорилазы *b* расходуется АТФ (см. рис. 9.4).

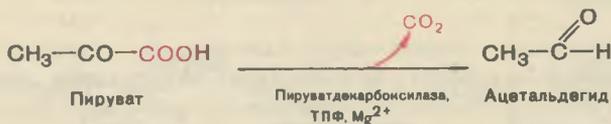
Спиртовое брожение

Спиртовое брожение осуществляется так называемыми дрожжеподобными организмами, а также некоторыми плесневыми грибами. Суммарную реакцию спиртового брожения можно изобразить следующим образом:

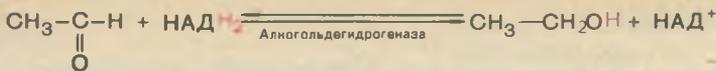


Механизм реакции спиртового брожения чрезвычайно близок к гликолизу. Расхождение начинается лишь после этапа образования пирувата. При гликолизе пируват при участии фермента ЛДГ и кофермента НАДН₂ восстанавливается в лактат. При спиртовом брожении этот конечный этап заменен двумя другими ферментативными реакциями — пируватдекарбоксилазной и алкогольдегидрогеназной.

В дрожжевых клетках (спиртовое брожение) пируват вначале подвергается декарбоксилированию, в результате чего образуется ацетальдегид. Данная реакция катализируется ферментом пируватдекарбоксилазой, который требует наличия ионов Mg²⁺ и кофермента тиаминпирофосфата (ТПФ):



Затем образовавшийся ацетальдегид присоединяет к себе водород, отщепляемый от НАДН₂, восстанавливаясь при этом в этанол, реакция катализируется ферментом алкогольдегидрогеназой:



Ацетальдегид

Этанол

Таким образом, конечными продуктами спиртового брожения являются этанол и CO_2 , а не молочная кислота, как при гликолизе.

Процесс молочнокислого брожения имеет большое сходство со спиртовым брожением. Отличие заключается лишь в том, что при молочнокислом брожении пировиноградная кислота не декарбосилируется, а, как и при гликолизе в животных тканях, восстанавливается при участии ЛДГ за счет водорода НАДН_2 .

Известны две группы молочнокислых бактерий. Одни из них в процессе брожения углеводов образуют только молочную кислоту, другие из каждой молекулы глюкозы «производят» по одной молекуле молочной кислоты, этанола и CO_2 .

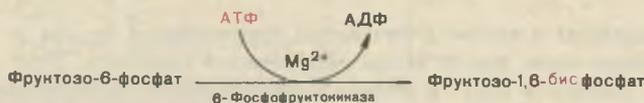
Существуют и другие виды брожения; конечными продуктами при этом могут являться пропионовая, масляная и янтарная кислоты, а также другие соединения.

Включение других углеводов в процесс гликолиза

Фруктоза. Установлено, что фруктоза, присутствующая в свободном виде во многих фруктах и образующаяся в тонком кишечнике из сахарозы, всасываясь в тканях, может подвергаться фосфорилированию во фруктозо-6-фосфат при участии фермента гексокиназы и АТФ:



Эта реакция ингибируется глюкозой. Образовавшийся фруктозо-6-фосфат либо превращается в глюкозу через стадии образования глюкозо-6-фосфата и последующего отщепления фосфорной кислоты (рис. 9.6), либо подвергается дальнейшим превращениям. Из фруктозо-6-фосфата под влиянием 6-фосфофруктокиназы и АТФ образуется фруктозо-1,6-бисфосфат:



Далее фруктозо-1,6-бисфосфат может подвергаться дальнейшим превращениям по пути гликолиза.

Таков главный путь включения фруктозы в мышечной ткани, почках, жировой ткани.

В печени, однако, для этого существует другой путь. В печени имеется фермент фруктокиназа, который катализирует фосфорилирование фруктозы не по 6-му, а по 1-му атому углерода:

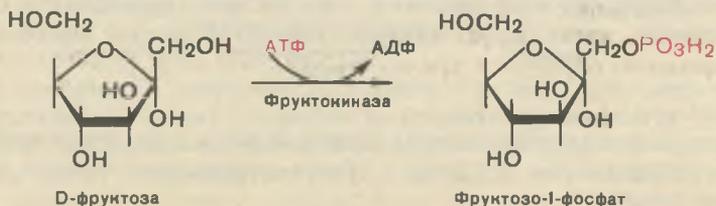
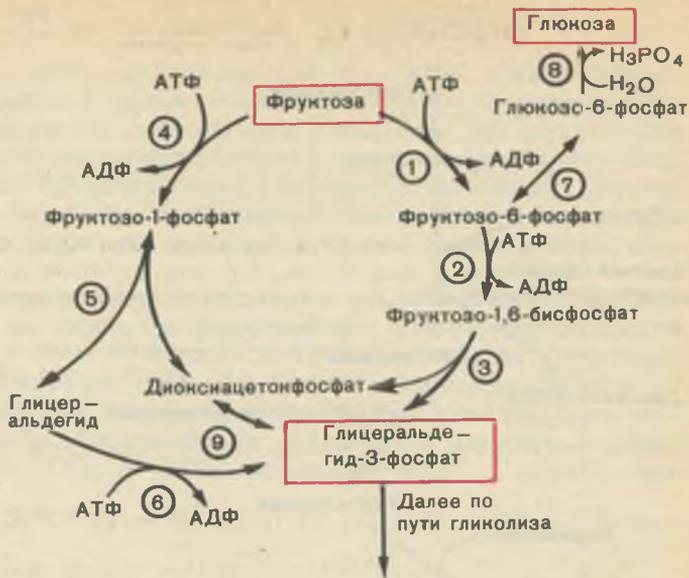


Рис. 9.6. Метаболизм фруктозы.

1 – гексокиназа; 2 – 6-фосфо-фруктокиназа; 3 – фруктозо-бисфосфатальдолоза; 4 – фруктокиназа; 5 – кетозо-1-фосфатальдолоза; 6 – триокиназа; 7 – глюкозофосфатизомераса; 8 – глюкозо-6-фосфатаза; 9 – триозофосфатизомераса.



Эта реакция не блокируется глюкозой. Образовавшийся фруктозо-1-фосфат расщепляется затем под действием кетозо-1-фосфатальдолозы на диоксиацетонфосфат и D-глицеральдегид:

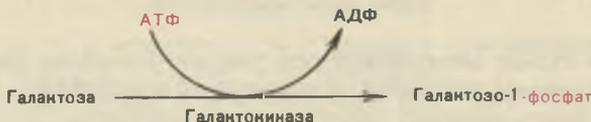


Образовавшийся D-глицеральдегид под влиянием соответствующей киназы (триокиназы) подвергается фосфорилированию до глицеральдегид-3-фосфата. В этот же промежуточный продукт гликолиза переходит и диоксиацетонфосфат.

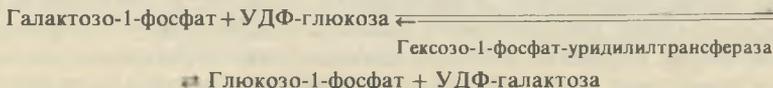
Существует врожденная аномалия обмена фруктозы, или эссенциальная фруктозурия, которая связана с врожденным недостатком фермента фруктокиназы, т. е. в организме не образуется фруктозо-1-фосфат. В результате обмен фруктозы возможен только путем фосфорилирования до фруктозо-6-фосфата, но эта реакция тормозится глюкозой, вследствие чего фруктоза накапливается в крови. Почечный порог для фруктозы очень низок, поэтому фруктозурия обнаруживается уже при концентрации фруктозы в крови, равной 0,73 ммоль/л.

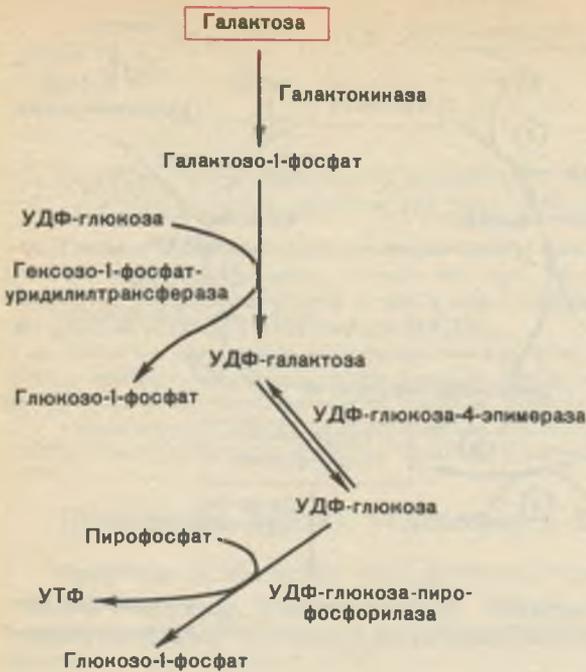
Галактоза. Основным источником галактозы является лактоза пищи, которая в пищеварительном тракте расщепляется до галактозы и глюкозы. На рис. 9.7 представлен метаболизм галактозы в тканях организма, прежде всего в печени.

Обмен галактозы начинается с превращения ее в галактозо-1-фосфат. Эта реакция катализируется галактокиназой с участием АТФ:

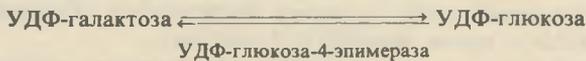


В следующей реакции в присутствии УДФ-глюкозы фермент гексозо-1-фосфатуридилтрансфераза катализирует превращение галактозо-1-фосфата в глюкозо-1-фосфат, одновременно образуется уридиндифосфатгалактоза (УДФ-галактоза):

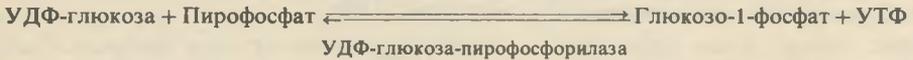




Образовавшийся глюкозо-1-фосфат в дальнейшем либо переходит в глюкозо-6-фосфат и далее подвергается уже известным превращениям, либо под влиянием фосфатазы образует свободную глюкозу, а УДФ-галактоза подвергается весьма своеобразной эпимеризации:



Затем УДФ-глюкоза-пирофосфорилаза катализирует расщепление УДФ-глюкозы с образованием глюкозо-1-фосфата:



О дальнейшей судьбе образовавшегося глюкозо-1-фосфата было сказано выше.

Среди патологических состояний, возникающих в результате нарушения обмена углеводов, важное место занимает галактоземия — рецессивно наследуемое заболевание.

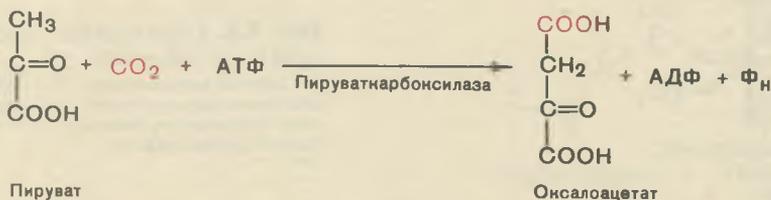
При этом заболевании общее содержание моносахаридов в крови повышается главным образом за счет галактозы, достигает 11,1–16,6 ммоль/л. Концентрация глюкозы в крови существенно не изменяется. Кроме галактозы, в крови накапливается также галактозо-1-фосфат. Галактоземия приводит к умственной отсталости и катаракте хрусталика. Возникновение данного заболевания у новорожденных связано с недостатком фермента генсозо-1-фосфат-уридиллитрансферазы. С возрастом наблюдается ослабление этого специфического нарушения обмена углеводов.

Глюконеогенез

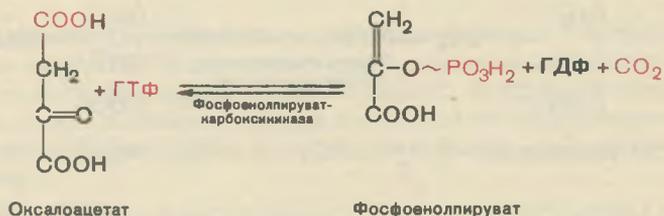
Глюконеогенез — синтез глюкозы из неуглеводных продуктов. Такими продуктами или метаболитами являются в первую очередь молочная и пировиноградная кислоты, так называемые гликогенные аминокислоты, глицерол и ряд других соединений. Иными словами, предшественниками глюкозы в глюконеогенезе могут быть пируват или любое соединение, превращающееся в процессе катаболизма в пируват или один из промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот¹. У позвоночных наиболее интенсивно глюконеогенез протекает в клетках печени и почек (корковое вещество).

Большинство стадий глюконеогенеза представляет собой обращение реакций гликолиза. Только три реакции гликолиза (гексокиназная, фосфофруктокиназная и пируваткиназная) необратимы, поэтому в процессе глюконеогенеза на трех этапах используются другие ферменты. Рассмотрим путь синтеза глюкозы из пирувата.

Образование фосфоенолпирувата из пирувата. Синтез фосфоенолпирувата осуществляется в несколько этапов. Первоначально пируват под влиянием пируваткарбоксилазы и при участии CO_2 и АТФ карбоксилируется² с образованием оксалоацетата:



Затем оксалоацетат в результате декарбоксилирования и фосфорилирования под влиянием фермента фосфоенолпируват-карбоксикиназы превращается в фосфоенолпируват. Донором фосфатного остатка в реакции служит гуанозинтрифосфат (ГТФ):



В дальнейшем было установлено, что в процессе образования фосфоенолпирувата участвуют ферменты цитоплазмы и митохондрий.

Первый этап локализуется в митохондриях (рис. 9.8). Пируваткарбоксилаза, которая катализирует эту реакцию, является аллостерическим митохондриальным

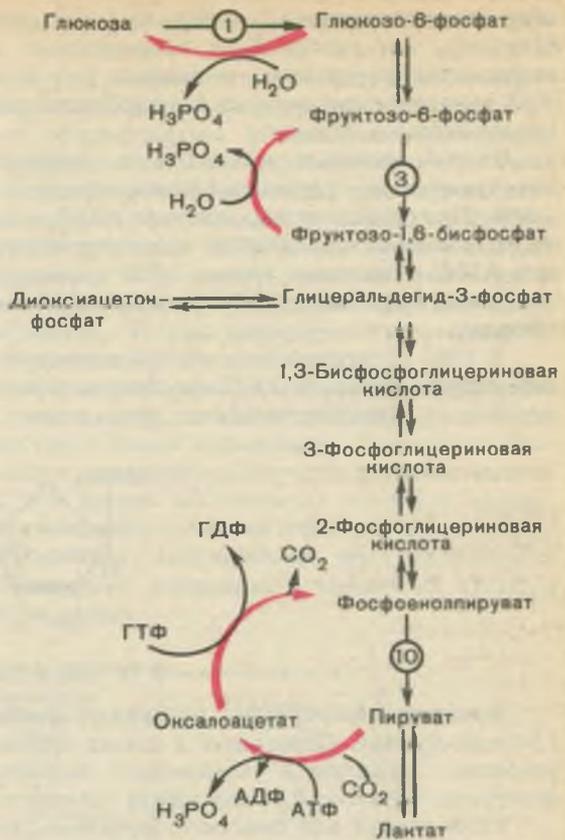
¹ У высших растений и микроорганизмов в процессе глюконеогенеза важную роль играет глиоксилатный цикл. Благодаря данному циклу высшие растения и микроорганизмы способны превращать двууглеродные метаболиты, а следовательно и ацетил-КоА, в углеводы.

В клетках животных отсутствуют два ключевых фермента глиоксилатного цикла: изоцитрат-лиаза и малат-синтаза, а потому у них этот цикл осуществляться не может.

² В реакцию вступает так называемая активная форма CO_2 , в образовании которой, помимо АТФ, участвует биотин (см. главу 5).

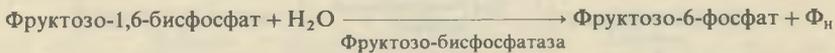
Рис. 9.9. Гликолиз и глюконеогенез.

Красными стрелками указаны «обходные» пути глюконеогенеза при биосинтезе глюкозы из пирувата и лактата; цифры в кружках обозначают соответствующую стадию гликолиза.

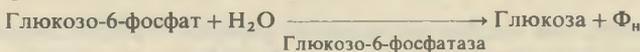


Дальнейшее превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват происходит в цитоплазме клетки.

Превращение фруктозо-1,6-бисфосфата во фруктозо-6-фосфат. Фосфоенолпируват, образовавшийся из пирувата, в результате ряда обратимых реакций гликолиза превращается во фруктозо-1,6-бисфосфат. Далее следует фосфофруктокиназная реакция, которая необратима. Глюконеогенез идет в обход этой эндергонической реакции. Превращение фруктозо-1,6-бисфосфата во фруктозо-6-фосфат катализируется специфической фосфатазой:



Образование глюкозы из глюкозо-6-фосфата. В последующей обратимой стадии биосинтеза глюкозы фруктозо-6-фосфат превращается в глюкозо-6-фосфат. Последний может дефосфорилироваться (т. е. реакция идет в обход гексокиназной реакции) под влиянием фермента глюкозо-6-фосфатазы:



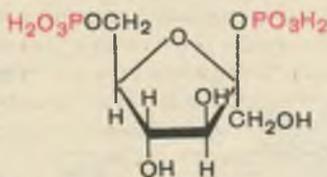
На рис. 9.9 представлены «обходные» реакции глюконеогенеза при биосинтезе глюкозы из пирувата и лактата.

Регуляция глюконеогенеза. Важным моментом в регуляции глюконеогенеза является реакция, катализируемая пируваткарбоксилазой. Роль положительного аллостерического модулятора этого фермента выполняет ацетил-КоА. В отсутствие ацетил-КоА фермент почти полностью лишен активности. Когда же в клетке накаплива-

ется митохондриальный ацетил-КоА, биосинтез глюкозы из пирувата усиливается. Известно, что ацетил КоА одновременно является отрицательным модулятором пируватдегидрогеназного комплекса (см. ниже). Следовательно, накопление ацетил-КоА замедляет окислительное декарбоксилирование пирувата, что также способствует превращению в глюкозу.

Вторым важным моментом в регуляции глюконеогенеза является реакция, катализируемая фруктозо-1,6-бисфосфатазой — ферментом, который ингибируется АМФ. Противоположное действие АМФ оказывает на фосфофруктокиназу, т. е. для этого фермента он является аллостерическим активатором. При низкой концентрации АМФ и высоком уровне АТФ происходит стимуляция глюконеогенеза. Напротив, когда величина отношения АТФ/АМФ низка, в клетке наблюдается расщепление глюкозы.

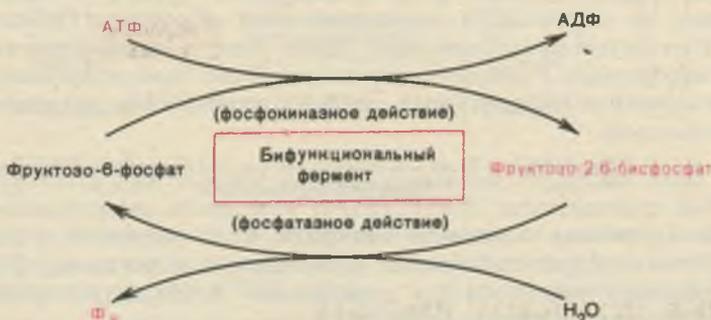
В 1980 г. группой бельгийских исследователей (Г. Херс и соавт.) в ткани печени был открыт фруктозо-2,6-бисфосфат, который является мощным регулятором активности двух вышеперечисленных ферментов:



β-Фруктозо-2,6-бисфосфат

Фруктозо-2,6-бисфосфат активирует фосфофруктокиназу и ингибирует фруктозо-1,6-бисфосфатазу. Повышение в клетке уровня фруктозо-2,6-бисфосфата способствует усилению гликолиза и уменьшению скорости глюконеогенеза. При снижении концентрации фруктозо-2,6-бисфосфата отмечается обратная картина.

Установлено, что биосинтез фруктозо-2,6-бисфосфата происходит из фруктозо-6-фосфата при участии АТФ, а распадается он на фруктозо-6-фосфат и неорганический фосфат. Биосинтез и распад фруктозо-2,6-бисфосфата катализируется одним и тем же ферментом, т. е. данный фермент бифункционален, он обладает и фосфокиназной и фосфатазной активностями:



Показано также, что бифункциональный фермент в свою очередь регулируется путем цАМФ-зависимого фосфорилирования. Фосфорилирование приводит к увеличению фосфатазной активности и снижению фосфокиназной активности бифункционального фермента. Этот механизм объясняет быстрое действие гормонов, в частности глюкагона, на уровень фруктозо-2,6-бисфосфата в клетке.

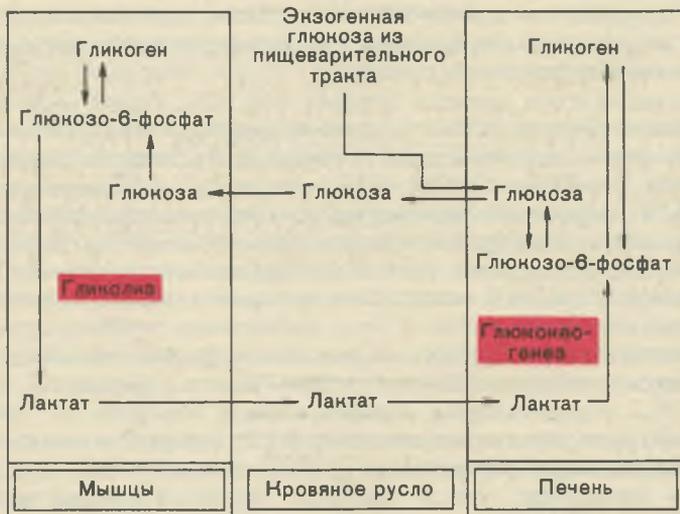
Активность бифункционального фермента регулируется также и некоторыми метаболитами, среди которых наибольшее значение имеет глицерол-3-фосфат. Действие глицерол-3-фосфата на фермент по своей направленности аналогично

эффекту, который наблюдается при его фосфорилировании с помощью цАМФ-зависимых протеинкиназ.

В настоящее время фруктозо-2,6-бисфосфат, помимо печени, обнаружен и в других органах и тканях животных, а также у растений и микроорганизмов.

Показано, что глюконеогенез может регулироваться и непрямым путем, т. е. через изменение активности фермента, непосредственно не участвующего в синтезе глюкозы. Так, установлено, что фермент гликолиза пируваткиназа существует в двух формах: L и M. Форма L (от англ. liver — печень) преобладает в тканях, способных к глюконеогенезу. Эта форма ингибируется избытком АТФ и некоторыми аминокислотами, в частности аланином. M-форма (от англ. muscle — мышцы) такой регуляции не подвержена. В условиях достаточного обеспечения клетки энергией имеет место ингибирование L-формы пируваткиназы. И как следствие этого, гликолиз замедляется и создаются условия, благоприятствующие глюконеогенезу.

Наконец, интересно отметить, что между гликолизом, интенсивно протекающим в мышечной ткани при ее активной деятельности, и глюконеогенезом, особенно характерным для печеночной ткани, существует тесная взаимосвязь. При максимальной активности мышц в результате усиления гликолиза образуется избыток молочной кислоты, диффундирующей в кровь, и в печени значительная его часть превращается в глюкозу (глюконеогенез). Образовавшаяся в печени глюкоза затем может быть использована как энергетический субстрат, необходимый для деятельности мышечной ткани. Взаимосвязь между процессами гликолиза в мышечной ткани и глюконеогенезом в печени представлена на схеме:



Аэробный метаболизм пирувата

Клетки, недостаточно снабжаемые кислородом, могут частично или полностью существовать за счет энергии гликолиза. Однако подавляющее большинство животных и растительных клеток в норме находятся в аэробных условиях и свое органическое «топливо» окисляют полностью до CO_2 и H_2O . В этих условиях пируват, образовавшийся при расщеплении глюкозы, не восстанавливается до лактата, а постепенно окисляется до CO_2 и H_2O в аэробной стадии катаболизма. При этом первоначально происходит окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием ацетил-КоА.

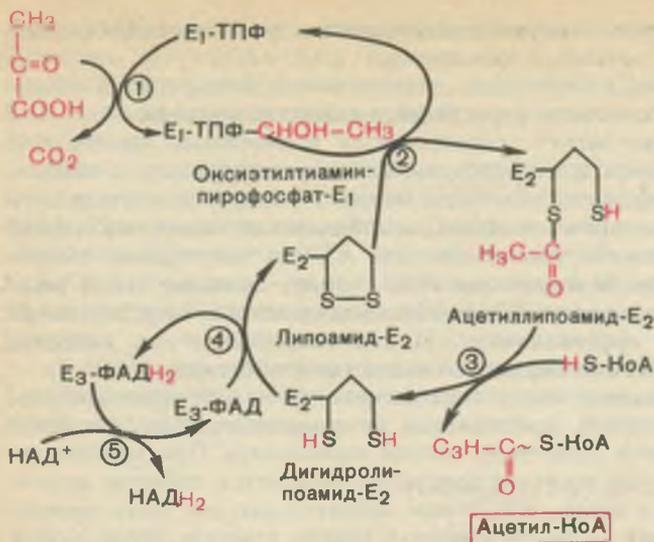


Рис. 9.10. Механизм действия пируватдегидрогеназного комплекса.

E_1 — пируватдегидрогеназа; E_2 — дигидролипоилацетилтрансфераза; E_3 — дигидролипоилдегидрогеназа; цифры в кружках обозначают стадии процесса.

Окислительное декарбоксилирование пирувинуградной кислоты

Окисление пирувата до ацетил-КоА происходит при участии ряда ферментов и коферментов, объединенных структурно в мультиферментную систему, получившую название пируватдегидрогеназный комплекс.

На первой стадии этого процесса пируват (рис. 9.10) теряет свою карбоксильную группу в результате взаимодействия с тиаминпирофосфатом (ТПФ) в составе активного центра фермента пируватдегидрогеназы (E_1). На второй стадии окислительная группа, которая одновременно переносится на амид липоевой кислоты (кофермент), связанной с ферментом дигидролипоилацетилтрансферазой (E_2). Этот фермент катализирует третью стадию: перенос ацетильной группы на коэнзим А (HS-КоА) с образованием конечного продукта ацетил-КоА, который является высокоэнергетическим (макроэргическим) соединением.

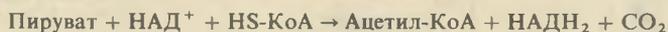
На четвертой стадии регенерируется окисленная форма липоамида из восстановленного комплекса дигидролипоамид- E_2 . При участии фермента дигидролипоилдегидрогеназы (E_3) осуществляется перенос атомов водорода от восстановленных сульфгидрильных групп дигидролипоамида на ФАД, который выполняет роль простетической группы данного фермента и прочно с ним связан. На пятой стадии (фактически это происходит уже в процессе четвертой стадии) восстановленный ФАДН₂ дигидролипоилдегидрогеназы передает водород на кофермент НАД с образованием НАДН₂.

Процесс окислительного декарбоксилирования пирувата происходит в матриксе митохондрий: в нем принимают участие (в составе сложного мультиферментного комплекса) три фермента (пируватдегидрогеназа, дигидролипоилацетилтрансфераза, дигидролипоилдегидрогеназа) и пять коферментов (ТПФ, амид липоевой кислоты, коэнзим А, ФАД и НАД), из которых три — относительно прочно связаны с ферментами (ТПФ- E_1 , липоамид- E_2 и ФАД- E_3), а два — легко диссоциируют (HS-КоА и НАД).

Все эти ферменты, имеющие субъединичное строение, и коферменты организованы в единый комплекс. Поэтому промежуточные продукты способны быстро взаимодействовать друг с другом. Показано, что составляющие комплекс полипептидные цепи субъединиц дигидролипоилацетилтрансферазы составляют как бы ядро комп-

лекса, вокруг которого расположены пируватдегидрогеназа и дигидролипиддегидрогеназа. Принято считать, что нативный ферментный комплекс образуется путем самосборки.

Суммарно реакцию, катализируемую пируватдегидрогеназным комплексом, можно представить следующим образом:



Реакция сопровождается значительным уменьшением стандартной свободной энергии и практически необратима.

Образовавшийся в процессе окислительного декарбоксилирования ацетил-KoA подвергается дальнейшему окислению с образованием в конечном счете CO_2 и H_2O ; полное окисление ацетил-KoA происходит в цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса). Этот процесс, так же как и окислительное декарбоксилирование пирувата, происходит в митохондриях клеток.

Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса)

Цикл трикарбоновых кислот впервые был открыт английским биохимиком Г. Кребсом¹. Он первым постулировал значение данного цикла для полного сгорания пирувата, главным источником которого является гликолитическое превращение углеводов. В дальнейшем было показано, что цикл трикарбоновых кислот является тем центром, в котором сходятся практически все метаболические пути. Таким образом, цикл Кребса — общий конечный путь окисления ацетильных групп (в виде ацетил-KoA), в которые превращается в процессе катаболизма большая часть органических молекул, играющих роль «клеточного топлива» — углеводов, жирных кислот и аминокислот.

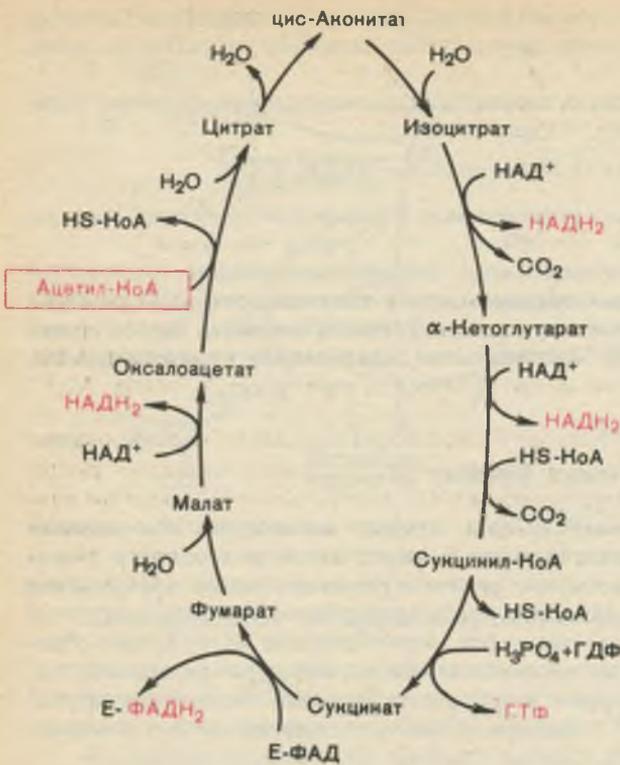
Итак, образовавшийся в результате окислительного декарбоксилирования пирувата в митохондриях ацетил-KoA вступает в цикл Кребса. Данный цикл происходит в матриксе митохондрий и состоит из восьми последовательных реакций (рис. 9.11). Начинается цикл с конденсации ацетил-KoA с оксалоацетатом и образования лимонной кислоты (цитрата). Затем лимонная кислота (шестиуглеродное соединение) путем ряда дегидрирований (отнятие водорода) и двух декарбоксилирований (отщепление CO_2) теряет два углеродных атома и снова в цикле Кребса превращается в оксалоацетат (четыреуглеродное соединение), т. е. в результате полного оборота цикла одна молекула ацетил-KoA сгорает до CO_2 и H_2O , а молекула оксалоацетата регенерируется. Ниже приводятся все восемь последовательных реакций (этапов) цикла Кребса.

Первая реакция, катализируется ферментом цитрат-синтазой, при этом ацетильная группа ацетил-KoA конденсируется с оксалоацетатом, в результате чего образуется лимонная кислота:



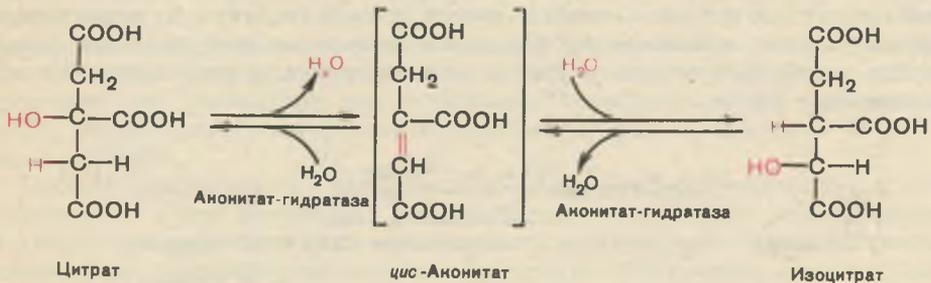
¹ За это выдающееся открытие Г. Кребс получил Нобелевскую премию в 1953 г. (совместно с Ф. Липманом). Цикл трикарбоновых кислот часто называют его именем — цикл Кребса (или цикл лимонной кислоты Кребса).

Рис. 9.11. Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса).



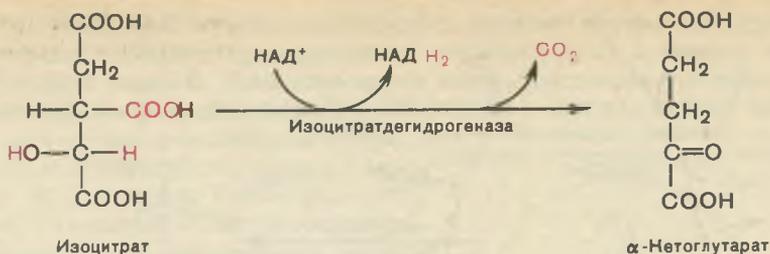
По-видимому, в данной реакции в качестве промежуточного продукта образуется связанный с ферментом цитрил-КоА. Затем последний самопроизвольно и необратимо гидролизуется с образованием цитрата и HS-КоА.

В результате второй реакции образовавшаяся лимонная кислота подвергается дегидратированию с образованием *цис*-аконитовой кислоты, которая, присоединяя молекулу воды, переходит в изолимонную кислоту (изоцитрат). Катализируют эти обратимые реакции гидратации – дегидратации фермент аконитатгидратаза (аконитаза). В результате происходит взаимоперемещение H и OH в молекуле цитрата:



Третья реакция, по-видимому, лимитирует скорость цикла Кребса; изолимонная кислота дегидрируется в присутствии НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы¹.

¹ В митохондриях существует два типа изоцитратдегидрогеназ: НАД- и НАДФ-зависимые; первый тип встречается только в митохондриях, второй – обнаруживается как в митохондриях, так и в цитозоле.

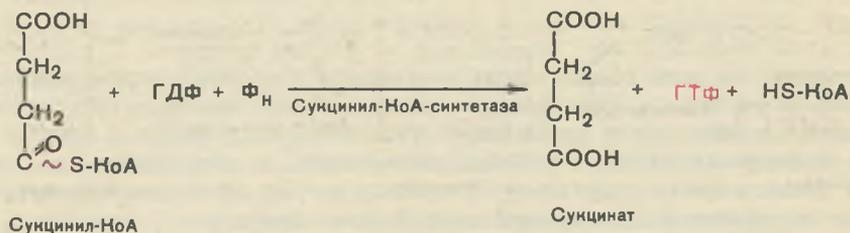


В ходе изоцитратдегидрогеназной реакции изолимонная кислота одновременно декарбоксилируется. НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа является аллостерическим ферментом, которому в качестве специфического активатора необходим АДФ. Кроме того, фермент для проявления своей активности нуждается в ионах Mg^{2+} или Mn^{2+} .

Во время четвертой реакции происходит окислительное декарбоксилирование α -кетоглутаровой кислоты с образованием высокоэнергетического соединения сукцинил-КоА. Механизм этой реакции сходен с реакцией окислительного декарбоксилирования пирувата до ацетил-КоА, α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс напоминает по своей структуре пируватдегидрогеназный комплекс. Как в одном, так и в другом случае в ходе реакции принимают участие пять коферментов: ТДФ, амид липоевой кислоты, HS-КоА, ФАД и НАД⁺.

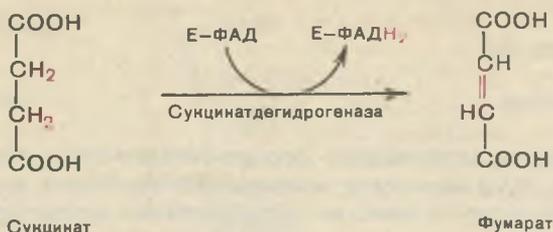


Пятая реакция катализируется ферментом сукцинил-КоА-синтетазой. В ходе этой реакции сукцинил-КоА при участии ГДФ и неорганического фосфата превращается в янтарную кислоту (сукцинат). Одновременно происходит образование высокоэнергетической фосфатной связи ГТФ¹ за счет высокоэнергетической тиоэфирной связи сукцинил-КоА:

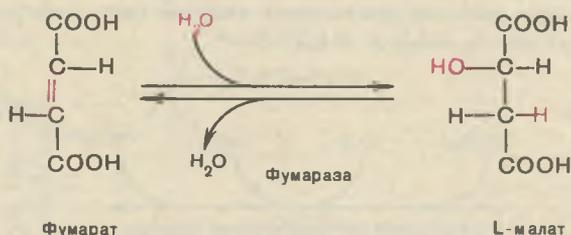


¹ Образовавшийся ГТФ отдает затем свою концевую фосфатную группу на АДФ, вследствие чего образуется АТФ. Образование высокоэнергетического нуклеозидтрифосфата в ходе сукцинил-КоА-синтетазной реакции — еще один пример фосфорилирования на уровне субстрата (субстратное фосфорилирование).

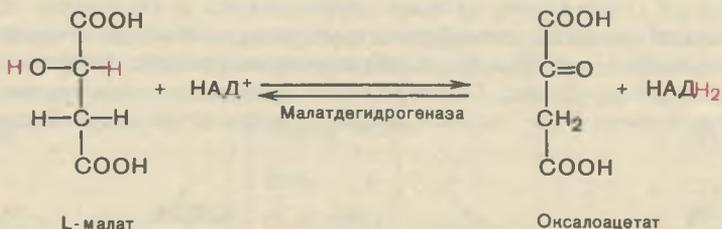
В результате шестой реакции сукцинат дегидрируется в fumarовую кислоту. Окисление сукцината катализируется сукцинатдегидрогеназой, в молекуле которой с белком прочно (ковалентно) связан кофермент ФАД. В свою очередь сукцинатдегидрогеназа прочно связана с внутренней митохондриальной мембраной:



Седьмая реакция осуществляется под влиянием фермента фумаратгидратазы (фумаразы). При этом образовавшаяся fumarовая кислота гидратируется, продуктом реакции является яблочная кислота (малат). Следует отметить, что фумаратгидратаза обладает стереоспецифичностью (см. главу 4) — в ходе реакции образуется L-яблочная кислота:



Наконец, в ходе восьмой реакции цикла трикарбоновых кислот под влиянием митохондриальной НАД-зависимой малатдегидрогеназы происходит окисление L-малата в оксалоацетат:



Как видно, за один оборот цикла, состоящего из восьми ферментативных реакций, происходит полное окисление («сгорание») одной молекулы ацетил-КоА. Для непрерывной работы цикла необходимо постоянное поступление в систему ацетил-КоА, а коферменты (НАД⁺ и ФАД), перешедшие в восстановленное состояние, должны снова и снова окисляться. Это окисление осуществляется в системе переносчиков электронов в дыхательной цепи (в цепи дыхательных ферментов), локализованной в мембране митохондрий. Поскольку образующийся ФАДН₂ прочно связан с СДГ, он передает атомы водорода через КоQ. Освобождающаяся в результате окисления ацетил-КоА энергия в значительной мере сосредоточивается в макроэргических фосфатных связях АТФ. Из четырех пар атомов водорода три пары переносятся через НАДН₂ на систему транспорта электронов; при этом в расчете на каждую пару в системе биологического окисления образуются 3 молекулы АТФ

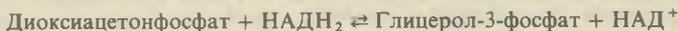
(в процессе сопряженного окислительного фосфорилирования), а всего, следовательно, 9 молекул АТФ (см. главу 8). Одна пара атомов от сукцинатдегидрогеназы-ФАДН₂ попадает в систему транспорта электронов через КоQ – в результате образуются только 2 молекулы АТФ. В ходе цикла Кребса синтезируется также 1 молекула ГТФ (субстратное фосфорилирование), что равносильно 1 молекуле АТФ. Итак, при окислении одной молекулы ацетил-КоА в цикле Кребса и системе окислительного фосфорилирования может образоваться 12 молекул АТФ.

Если же подсчитать полный энергетический эффект гликолитического расщепления глюкозы и последующего окисления двух образовавшихся молекул пирувата до СО₂ и Н₂О, то он окажется значительно большим.

Как уже отмечалось, 1 молекула НАДН₂ (3 молекулы АТФ) образуется при окислительном декарбоксилировании пирувата в ацетил-КоА. Так как при расщеплении 1 молекулы глюкозы образуются 2 молекулы пирувата, то при окислении их до 2 молекул ацетил-КоА и последующих двух оборотов цикла трикарбоновых кислот синтезируется 30 молекул АТФ (следовательно, окисление 1 молекулы пирувата до СО₂ и Н₂О дает 15 молекул АТФ).

К этому надо добавить 2 молекулы АТФ, образующиеся при аэробном гликолизе, и 6 молекул АТФ, синтезирующихся за счет окисления 2 молекул внемитохондриального НАДН₂, которые образуются при окислении 2 молекул глицеральдегид-3-фосфата в дегидрогеназной реакции гликолиза. Итого получим, что при расщеплении в тканях 1 молекулы глюкозы по уравнению: $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ синтезируются 38 молекул АТФ. Несомненно, что в энергетическом отношении полное расщепление глюкозы является более эффективным процессом, чем анаэробный гликолиз.

Необходимо отметить, что образовавшиеся в процессе превращения глицеральдегид-3-фосфата 2 молекулы НАДН₂ в дальнейшем при окислении могут давать не 6 молекул АТФ, а только 4. Дело в том, что сами молекулы внемитохондриального НАДН₂ не способны проникать через мембрану внутрь митохондрий. Однако отдаваемые ими электроны могут включаться в митохондриальную цепь биологического окисления с помощью так называемого глицеролфосфатного челночного механизма (рис. 9.12). Как видно на рисунке, цитоплазматический НАДН₂ сначала реагирует с цитоплазматическим диоксиацетонфосфатом, образуя глицерол-3-фосфат. Реакция катализируется НАД-зависимой цитоплазматической глицерол-3-фосфат-дегидрогеназой:



Образовавшийся глицерол-3-фосфат легко проникает через митохондриальную мембрану. Внутри митохондрии другая (митохондриальная) глицерол-3-фосфат-де-

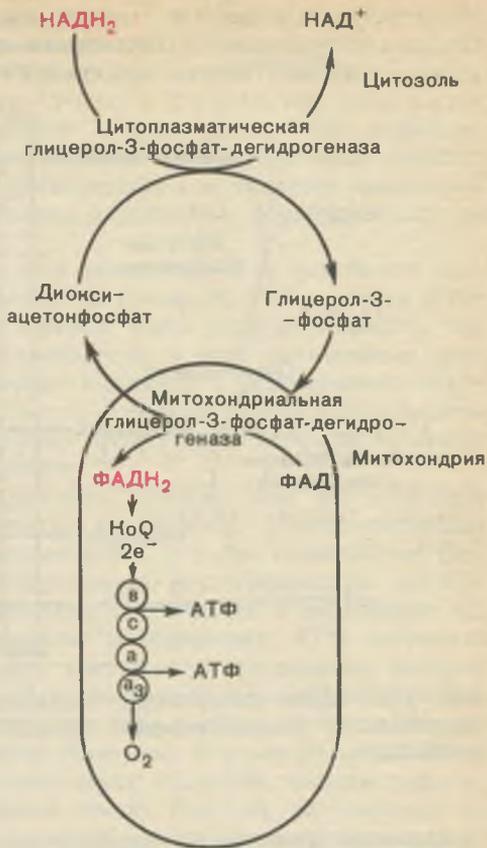


Рис. 9.12. Глицеролфосфатный челночный механизм. Объяснения в тексте.

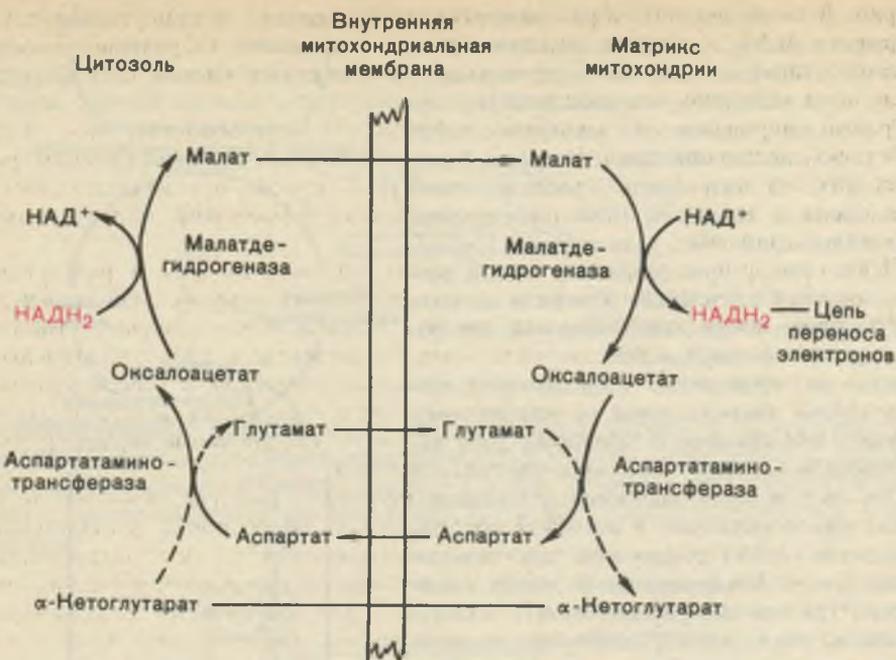
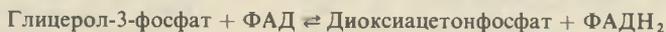


Рис. 9.13. Малат-аспартатная челночная система для переноса восстанавливающих эквивалентов от цитозольного НАДН_2 в митохондриальный матрикс. Объяснения в тексте.

гидрогеназа (флавиновый фермент) снова окисляет глицерол-3-фосфат до диоксиацетонфосфата:



Восстановленный флавопротеин (фермент — ФАДН_2) вводит на уровне КоQ приобретенные им электроны в цепь биологического окисления и сопряженного с ним окислительного фосфорилирования, а диоксиацетонфосфат выходит из митохондрий в цитоплазму и может вновь взаимодействовать с цитоплазматическим НАДН_2 . Таким образом, пара электронов (из 1 молекулы цитоплазматического НАДН_2), вводимая в дыхательную цепь с помощью глицеролфосфатного челночного механизма, дает не 3 АТФ, а 2 АТФ.

В дальнейшем было показано, что с помощью данного челночного механизма лишь в скелетных мышцах и мозге осуществляется перенос восстановительных эквивалентов от цитозольного НАДН_2 в митохондрии.

В клетках же печени, почек и сердца действует более сложная малат-аспартатная челночная система. Действие такого челночного механизма становится возможным благодаря присутствию малатдегидрогеназы и аспартатаминотрансферазы как в цитозоле, так и в митохондриях.

Установлено, что от цитозольного НАДН_2 восстановительные эквиваленты сначала при участии фермента малатдегидрогеназы (рис. 9.13) переносятся на цитозольный оксалоацетат. В результате образуется малат; последний с помощью системы, транспортирующей дикарбоновые кислоты, проходит через внутреннюю мембрану митохондрии в матрикс. Здесь малат окисляется в оксалоацетат, а матриксный НАД^+ восстанавливается в НАДН_2 , который может теперь передавать свои электроны в цепь дыхательных ферментов, локализованную на внутренней мембране мито-

хондрии. В свою очередь образовавшийся оксалоацетат¹ в присутствии глутамата и фермента АсАТ вступает в реакцию трансаминирования. Образующиеся аспаргат и α -кетоглутарат с помощью специальных транспортных систем способны переноситься через мембрану митохондрий.

Трансаминирование в цитозоле регенерирует оксалоацетат, что вызывает к действию следующий цикл. В целом процесс включает легко обратимые реакции, происходит без потребления энергии, «движущей силой» его является постоянное восстановление НАД⁺ в цитозоле глицеральдегид-3-фосфатом, образующимся при катаболизме глюкозы.

Итак, если функционирует малат-аспартатный механизм, то в результате полного окисления 1 молекулы глюкозы может образоваться не 36, а 38 молекул АТФ.

Регуляция цикла трикарбоновых кислот. Прежде всего следует помнить, что цикл Кребса поставляет восстановительные эквиваленты в цепь дыхательных ферментов, в которой поток электронов и протонов сопряжен с образованием АТФ, и в меньшей степени цикл трикарбоновых кислот снабжает восстановительными эквивалентами системы биосинтеза промежуточных продуктов, которые затем могут использоваться в других метаболических процессах.

Поэтому в принципе цикл не может протекать быстрее, чем это позволяет использованию образуемой АТФ. Непосредственно же скорость функционирования цикла Кребса регулируется концентрацией оксалоацетата, а также активностью цитрат-синтазы и НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы. Аллостерическим ингибитором цитрат-синтазы является АТФ. Его действие заключается в повышении K_m для ацетил-КоА. Иными словами, с увеличением концентрации АТФ снижается насыщение фермента ацетил-КоА и в результате уменьшается образование цитрата.

Как уже отмечалось, НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа — аллостерический фермент, которому в качестве специфического активатора необходим АДФ. Последний повышает сродство фермента к субстратам. Показано, что между связыванием изоцитрата, ионов магния, НАД⁺ и АДФ существует взаимная кооперативность. Другими словами, цикл Кребса, обеспечивающий клетку энергией, регулируется по типу обратной связи: ингибируется АТФ и активируется АДФ, накапливающимся по мере использования АТФ.

Эффект Пастера

Снижение скорости потребления глюкозы и прекращение накопления лактата в присутствии кислорода носит название эффекта Пастера. Впервые это явление наблюдал Л. Пастер во время своих широко известных исследований, касающихся роли брожения в производстве вина. В дальнейшем было показано, что эффект Пастера наблюдается также в животных и растительных тканях, где кислород тормозит анаэробный гликолиз. Значение эффекта Пастера, т. е. перехода в присутствии кислорода от анаэробного гликолиза или брожения к дыханию, состоит в переключении клетки на более эффективный и экономный путь получения энергии. В результате скорость потребления субстрата, например глюкозы, в присутствии кислорода снижается. Молекулярный механизм эффекта Пастера заключается, по-видимому, в конкуренции между системами дыхания и гликолиза (брожения) за АДФ, используемый для образования АТФ. Как известно, в аэробных условиях значительно эффективнее, чем в анаэробных, происходит удаление Φ_n и АДФ, генерация АТФ, а также регенерирование НАД⁺, окисленного из восстановленного НАДН₂. Иными словами, уменьшение в присутствии кислорода количества Φ_n и АДФ и соответствующее увеличение количества АТФ ведут к подавлению анаэробного гликолиза.

¹ Образовавшийся оксалоацетат непосредственно не может возвратиться в цитозоль через мембрану.

Пентозофосфатный путь окисления углеводов

Открытие пути прямого окисления углеводов, или, как его называют, пентозофосфатного цикла, связано главным образом с работами О. Варбурга, Ф. Липмана, Ф. Дикенса и В. А. Энгельгарда. Расхождение путей окисления углеводов — классического (цикл трикарбоновых кислот Кребса) и пентозофосфатного — начинается со стадии образования гексозомонофосфата. Если глюкозо-6-фосфат изомеризуется во фруктозо-6-фосфат, который фосфорилируется второй раз и превращается во фруктозо-1,6-бисфосфат, то в этом случае дальнейший распад углеводов происходит по

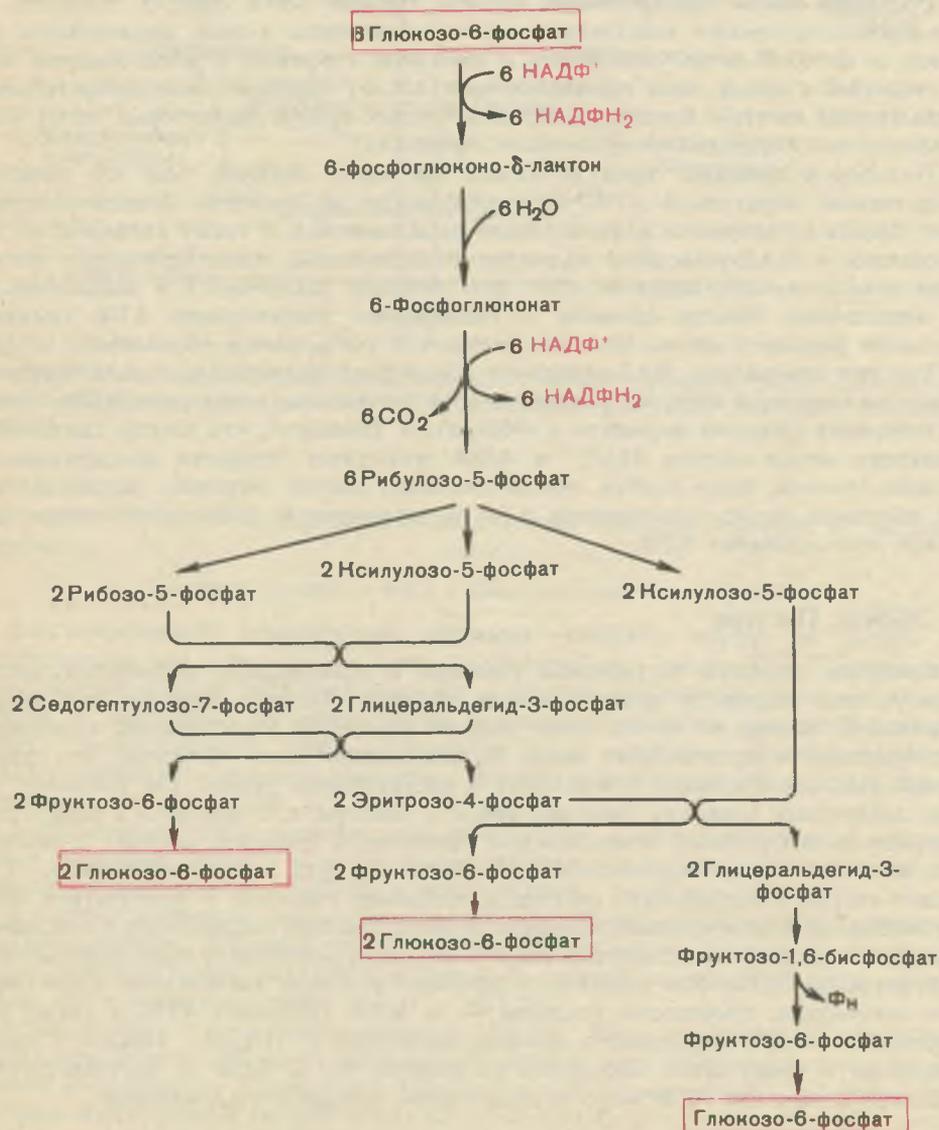


Рис. 9.14. Пентозофосфатный путь окисления углеводов.

обычному гликолитическому пути с образованием пировиноградной кислоты, которая, окисляясь до ацетил-КоА, затем «сгорает» в цикле Кребса.

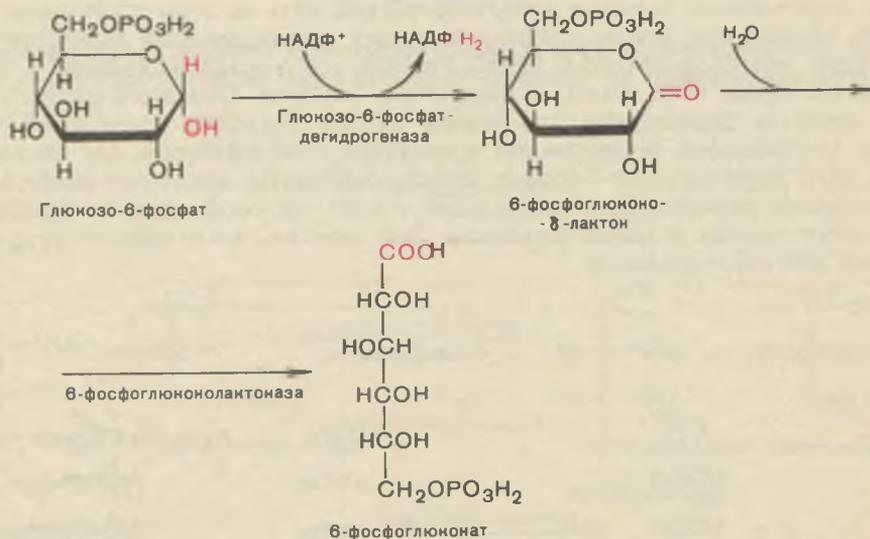
Если же второго фосфорилирования гексозо-6-монофосфата не происходит, то фосфорилированная глюкоза может подвергаться прямому окислению до фосфопентоз. В норме доля пентозофосфатного пути в количественном превращении глюкозы обычно невелика, варьирует у разных организмов и зависит от типа ткани и ее функционального состояния.

У млекопитающих активность пентозофосфатного цикла относительно высока в печени, надпочечниках, эмбриональной ткани и молочной железе в период лактации. Значение этого пути в обмене веществ велико. Он поставляет восстановленный НАДФН₂, необходимый для биосинтеза жирных кислот, холестерина и т. д. За счет пентозофосфатного цикла примерно на 50 % покрывается потребность организма в НАДФН₂.

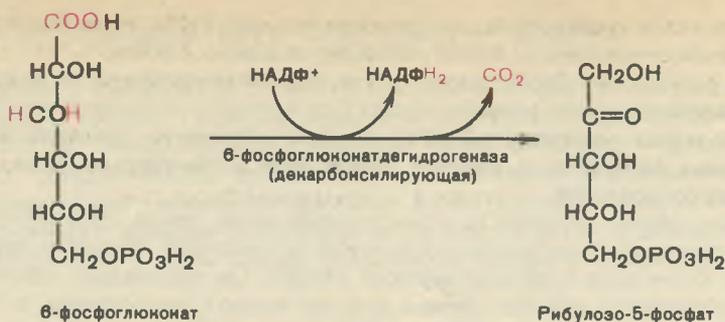
Вторая функция пентозофосфатного цикла заключается в том, что он поставляет пентозофосфаты для синтеза нуклеиновых кислот и многих коферментов. При ряде патологических состояний удельный вес пентозофосфатного пути окисления глюкозы возрастает. Механизм реакций пентозофосфатного цикла достаточно расшифрован.

Пентозофосфатный цикл начинается с окисления глюкозо-6-фосфата и последующего окислительного декарбоксилирования продукта (в результате от гексозофосфата отщепляется первый атом углерода). Это так называемая окислительная стадия пентозофосфатного цикла. Вторая стадия включает неокислительные превращения пентозофосфатов с образованием исходного глюкозо-6-фосфата (рис. 9.14). Реакции пентозофосфатного цикла протекают в цитоплазме клетки.

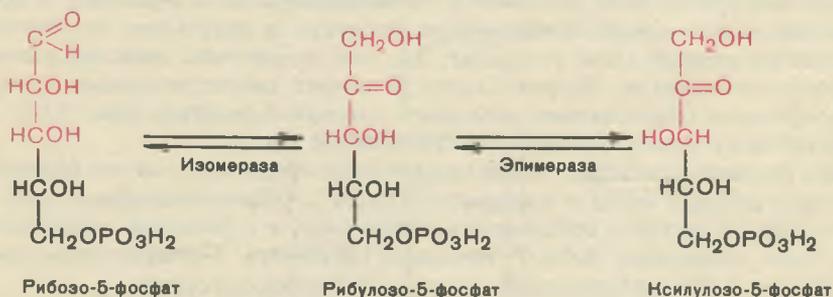
Первая реакция – дегидрирование глюкозо-6-фосфата при участии фермента глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы и кофермента НАДФ⁺. Образовавшийся в ходе реакции 6-фосфоглюконо-δ-лактон – соединение нестабильное, и с большой скоростью гидролизуются либо спонтанно, либо с помощью фермента 6-фосфоглюконолактоназы с образованием 6-фосфоглюконовой кислоты (6-фосфоглюконата):



В следующей окислительной реакции, катализируемой 6-фосфоглюконатдегидрогеназой (декарбоксилирующей), 6-фосфоглюконат дегидрируется и декарбоксилируется. В результате образуется фосфорилированная кетопентоза – D-рибулозо-5-фосфат и еще 1 молекула НАДФН₂:

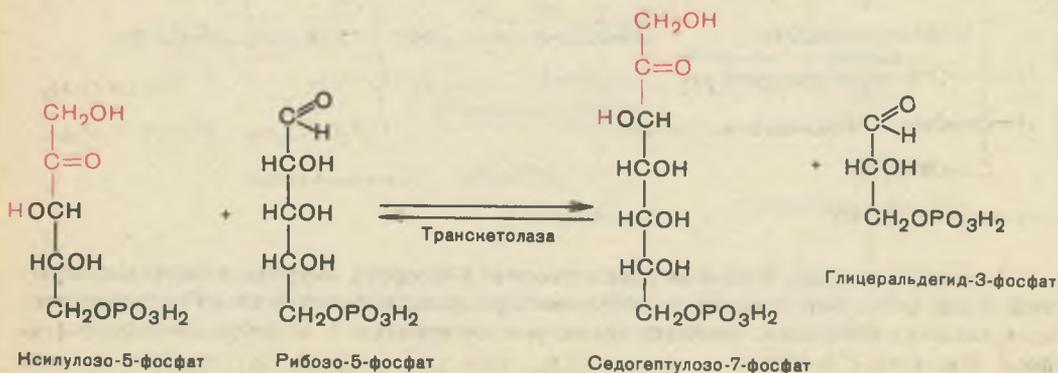


Под действием соответствующей эписимеразы из рибулозо-5-фосфата может образоваться другая фосфопентоза — ксилулозо-5-фосфат. Кроме того, рибулозо-5-фосфат под влиянием особой изомеразы легко превращается в рибозо-5-фосфат. Между этими формами пентозофосфатов устанавливается состояние подвижного равновесия:



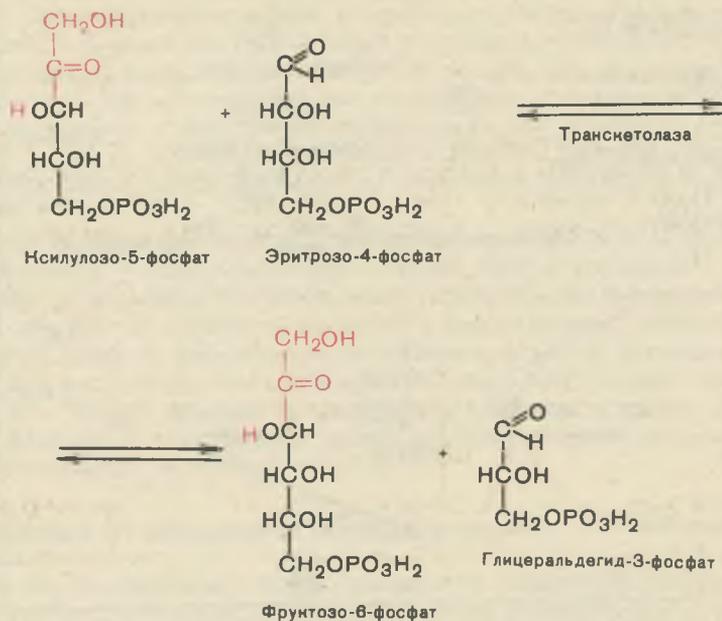
При определенных условиях пентозофосфатный путь на этом этапе может быть завершен. Однако при других условиях наступает так называемый неокислительный этап (стадия) пентозофосфатного цикла. Реакции этого этапа не связаны с использованием кислорода и протекают в анаэробных условиях. При этом частично образуются вещества, характерные для первой стадии гликолиза (фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-бисфосфат, фосфотриозы), а частично — специфические для пентозофосфатного пути (седогеулозо-7-фосфат, пентозо-5-фосфаты, эритрозо-4-фосфат).

Основными реакциями неокислительной стадии пентозофосфатного цикла являются транскетолазная и трансальдолазная. Эти реакции катализируют превращение изомерных пентозо-5-фосфатов:

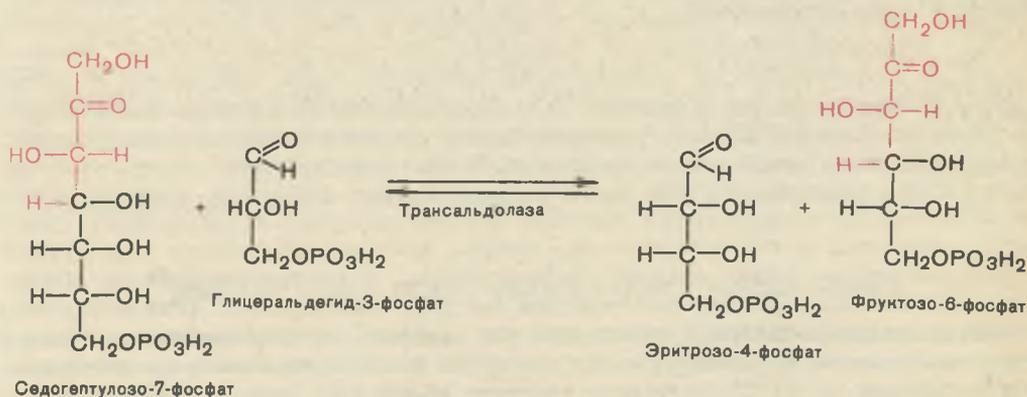


Коферментом в транскетолазной реакции служит ТПФ, играющий роль промежуточного переносчика гликольальдегидной группы от ксилулозо-5-фосфата к рибозо-5-фосфату. В результате образуется семиуглеродный моносахарид – седогептулозо-7-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат.

Транскетолазная реакция в пентозном цикле встречается дважды, второй раз – при образовании фруктозо-6-фосфата и триозофосфата в результате взаимодействия второй молекулы ксилулозо-5-фосфата с эритрозо-4-фосфатом:



Фермент трансальдолаза катализирует перенос остатка диоксиацетона (но не свободного диоксиацетона) от седогептулозо-7-фосфата на глицеральдегид-3-фосфат:



Как видно из рис. 9.14, 6-молекул глюкозо-6-фосфата, вступая в пентозофосфатный цикл, образуют 6 молекул рибулозо-5-фосфата и 6 молекул CO₂, после чего из 6 молекул рибулозо-5-фосфата снова регенерируются 5 молекул глюкозо-6-фосфата. Но это не означает, что молекула глюкозо-6-фосфата, вступающая в цикл,

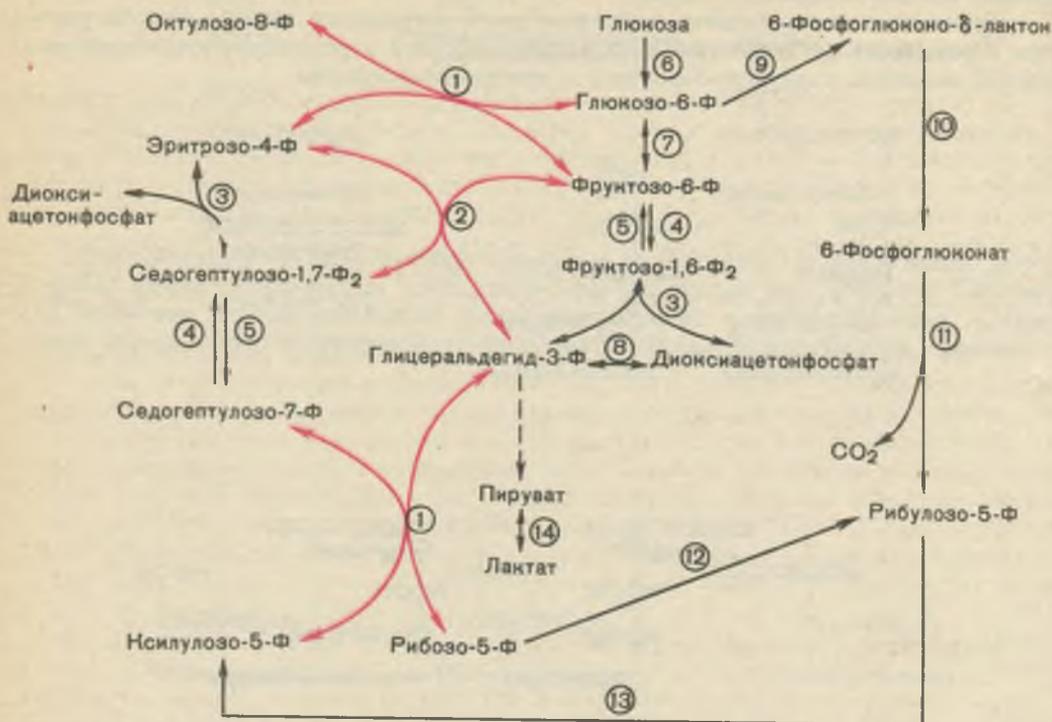
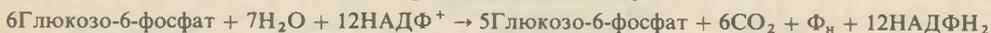


Рис. 9.15. Современная схема пентозофосфатного пути окисления углеводов, отражающая его связь с гликолизом (по Херсу).

1 — транскетолаза; 2 — трансальдолаза; 3 — альдолаза; 4 — фосфофруктокиназа; 5 — фруктозо-1,6-бисфосфатаза; 6 — гексокиназа; 7 — глюкозофосфатизомераза; 8 — триозофосфатизомераза; 9 — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; 10 — 6-фосфоглюконолактоназа; 11 — 6-фосфоглюконатдегидрогеназа; 12 — изомераза; 13 — эпимераза; 14 — лактатдегидрогеназа.

полностью окисляется. Все 6 молекул CO_2 образуются из С-1 атомов шести молекул глюкозо-6-фосфата. Валовое уравнение окислительной и неокислительной стадий пентозофосфатного цикла можно представить в следующем виде:



или



Образовавшийся НАДФН_2 используется в цитозоле на восстановительные синтезы и, как правило, не участвует в окислительном фосфорилировании, протекающем в митохондриях.

В последние годы появились работы, которые дают основание предполагать, что в некоторых тканях схема пентозофосфатного превращения углеводов сложнее, чем это представлено на рис. 9.14. Согласно этой более полной схеме пентозофосфатного пути первые этапы превращения совпадают с прежней схемой, однако после первой транскетолазной реакции начинаются некоторые отклонения (рис. 9.15).

С. Е. Северин и др. считают, что пентозофосфатный путь и гликолиз, протекающие в цитозоле, взаимосвязаны и способны переключаться друг на друга в зависимости от соотношения концентраций промежуточных продуктов, образовавшихся в клетке (см. рис. 9.15).

Регуляция углеводного обмена

Пути регуляции обмена углеводов крайне разнообразны. На любых уровнях организации живого организма обмен углеводов регулируется факторами, влияющими на активность ферментов, участвующих в реакциях углеводного обмена. К этим факторам относятся: концентрация субстратов, содержание продуктов (метаболитов) отдельных реакций, кислородный режим, температура, проницаемость биологических мембран, концентрация коферментов, необходимых для отдельных реакций, и т. д. (см. главу 4). По ходу изложения материала в данной главе мы старались показать влияние перечисленных выше факторов на активность ферментных систем углеводного обмена.

У человека и животных на всех стадиях синтеза и распада углеводов регуляция углеводного обмена осуществляется при участии ЦНС и гормонов.

Например, установлено, что уменьшение концентрации глюкозы в крови ниже 3,3–3,4 ммоль/л (60–70 мг/100 мл) приводит к рефлекторному возбуждению высших метаболических центров, расположенных в гипоталамусе. В регуляции углеводного обмена особая роль принадлежит высшему отделу ЦНС – коре большого мозга. Наряду с ЦНС важное влияние на содержание глюкозы в крови оказывают гормональные факторы, т. е. регуляция уровня глюкозы в крови осуществляется ЦНС через ряд эндокринных желез (см. главу 6).

Нарушения углеводного обмена

При некоторых состояниях можно наблюдать повышение содержания глюкозы в крови – гипергликемию, а также понижение концентрации глюкозы – гипогликемию. Гипергликемия является довольно частым симптомом при различных заболеваниях, прежде всего связанных с поражением эндокринной системы.

Сахарный диабет. В регуляции гликолиза и глюконеогенеза большую роль играет инсулин. При недостаточности инсулина возникает заболевание, которое носит название сахарного диабета. Повышается концентрация глюкозы в крови (гипергликемия), появляется глюкоза в моче (глюкозурия) и уменьшается содержание гликогена в печени. При этом мышечная ткань утрачивает способность утилизировать глюкозу крови. В печени при общем снижении интенсивности биосинтетических процессов (биосинтеза белков, синтеза жирных кислот из продуктов распада глюкозы) наблюдается усиленный синтез ферментов глюконеогенеза. При введении инсулина больным диабетом происходит коррекция метаболических сдвигов: нормализуется проницаемость мембран мышечных клеток для глюкозы, восстанавливается соотношение между гликолизом и глюконеогенезом. Инсулин контролирует эти процессы на генетическом уровне как индуктор синтеза ключевых ферментов гликолиза: гексокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы. Инсулин также индуцирует синтез гликогенсинтазы. Одновременно инсулин действует как репрессор синтеза ключевых ферментов глюконеогенеза. Заметим, что индукторами синтеза ферментов глюконеогенеза служат глюкокортикоиды. В связи с этим при инсулярной недостаточности и сохранении или даже повышении секреции кортикостероидов (в частности, при диабете) устранение влияния инсулина приводит к резкому повышению синтеза и концентрации ферментов глюконеогенеза, особенно фосфоенолпируват-карбоксикиназы, определяющей возможность и скорость глюконеогенеза в печени и почках.

Развитие гипергликемии при диабете можно рассматривать также как результат возбуждения метаболических центров в ЦНС импульсами с хеморецепторов клеток,

испытывающих энергетический голод в связи с недостаточным поступлением глюкозы в клетки ряда тканей.

Гипергликемия может возникнуть не только при заболевании поджелудочной железы, но и в результате расстройств функции других эндокринных желез, участвующих в регуляции углеводного обмена. Так, например, гипергликемия может наблюдаться при гипофизарных заболеваниях, опухолях коркового вещества надпочечников, гиперфункции щитовидной железы. Гипергликемия иногда появляется во время беременности. Наконец, гипергликемия может встречаться также при органических поражениях ЦНС, расстройствах мозгового кровообращения или сопровождать заболевания печени воспалительного или дегенеративного характера. Поддержание постоянного уровня глюкозы в крови, как уже отмечалось, является важнейшей функцией печени, резервные возможности которой в этом направлении весьма велики, поэтому гипергликемия, связанная с нарушением функции печени, выявляется обычно при тяжелых ее поражениях.

Большой клинический интерес представляет изучение реактивности организма на сахарную нагрузку у здорового и больного человека. В связи с этим в клинике довольно часто применяют исследование изменений во времени уровня глюкозы в крови обычно после приема per os 50 или 100 г глюкозы, растворенной в теплой воде, — так называемая сахарная нагрузка. При оценке построенных гликемических кривых обращают внимание на время максимального подъема, высоту этого подъема и время возврата концентрации глюкозы к исходному уровню. Для оценки гликемических кривых введено несколько показателей, из которых наиболее важное значение имеет коэффициент Бодуэна:

$$\frac{B - A}{A} \cdot 100\%$$

где А — уровень глюкозы в крови натощак; В — максимальное содержание глюкозы в крови после нагрузки глюкозой. В норме этот коэффициент составляет около 50%. Цифры, превышающие 80%, говорят о серьезном нарушении обмена углеводов.

Гипогликемия. Нередко связана с понижением функций тех эндокринных желез, повышение функций которых приводит, как это было отмечено выше, к гипергликемии. В частности, гипогликемию можно наблюдать при гипофизарной кахексии, аддисоновой болезни, гипотиреозе. Резкое снижение глюкозы в крови отмечается при аденомах островковой ткани поджелудочной железы вследствие повышенной продукции инсулина β -клетками панкреатических островков. Кроме того, гипогликемия может быть вызвана голоданием, продолжительной физической работой, приемом β -ганглиоблокаторов. Низкий уровень глюкозы в крови иногда отмечается при беременности, лактации.

Гипогликемия может возникнуть также при введении больным сахарным диабетом больших доз инсулина. Гипогликемия, как правило, сопровождается почечную глюкозурию, возникающую вследствие снижения почечного порога для глюкозы.

Глюкозурия. Обычно присутствие глюкозы в моче (глюкозурия) является результатом нарушения углеводного обмена на почве патологических изменений в поджелудочной железе (сахарный диабет, острый панкреатит и т. д.). Реже встречается глюкозурия почечного происхождения, связанная с недостаточностью резорбции глюкозы в почечных канальцах. Как временное явление глюкозурия может возникнуть при некоторых острых инфекционных и нервных заболеваниях, после приступов эпилепсии, сотрясения мозга.

Отравления морфином, стрихнином, хлороформом, фосфором также обычно сопровождаются глюкозурией. Наконец, необходимо помнить о глюкозурии алиментарного происхождения, глюкозурии беременных и глюкозурии на почве нервных стрессовых состояний (эмоциональная глюкозурия).

Изменение углеводного обмена при гипоксических состояниях. Отставание скорости окисления пирувата от интенсивности гликолиза наблюдается чаще всего при гипокси-

ческих состояниях, обусловленных различными нарушениями кровообращения или дыхания, высотной болезнью, анемией, понижением активности системы тканевых окислительных ферментов при некоторых инфекциях и интоксикациях, гипо- и авитаминозах, а также развивается в результате относительной гипоксии при чрезмерной мышечной работе.

При усилении гликолиза происходит накопление пирувата и лактата в крови, что сопровождается обычно изменением кислотно-основного равновесия, уменьшением щелочных резервов крови. Увеличение содержания лактата и пирувата в крови может наблюдаться также при поражениях паренхимы печени (поздние стадии гепатита, цирроз печени и т. п.) в результате торможения процессов глюконеогенеза в печени.

Гликогенозы. Ряд наследственных болезней связан с нарушением обмена гликогена. Эти болезни получили название гликогенозов. Они возникают в связи с дефицитом или полным отсутствием ферментов, катализирующих процессы распада или синтеза гликогена, и характеризуются избыточным его накоплением в различных органах и тканях. В табл. 9.1 приведены типы гликогенозов и их характеристика.

Гликогеноз I типа (болезнь Гирке) — чаще всего встречающийся гликогеноз, связанный с наследственным дефектом синтеза фермента глюкозо-6-фосфатазы в печени и почках. Болезнь наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Патологические симптомы появляются уже на первом году жизни ребенка: увеличена печень, нерезко увеличены в размерах почки. В результате гипогликемии появляются судороги, задержка роста, возможен ацидоз. В крови обнаруживается повышенное количество лактата и пирувата. Введение адреналина или глюкагона вызывает значительную гиперлактатацидемию, но не гипергликемию, так как глюкозо-6-фосфатаза в печени отсутствует и образования свободной глюкозы не происходит.

Таблица 9.1. Типы гликогенозов и их характеристика

Тип гликогеноза и название болезни	Молекулярная причина болезни	Структура гликогена	Основные органы, ткани и клетки, депонирующие гликоген
I тип Болезнь Гирке	Дефицит глюкозо-6-фосфатазы	Нормальная	Печень, почки
II тип Болезнь Помпе	Дефицит кислой α -1,4-глюкозидазы	»	Печень, селезенка, почки, мышцы, нервная ткань, эритроциты
III тип Болезнь Форбса, или болезнь Кори	Полное или частичное отсутствие активности амило-(1→6)-глюкозидазы и (или) гликогенветвящего фермента	Короткие многочисленные внешние ветви (лимитдекстрин)	Печень, мышцы, лейкоциты, эритроциты
IV тип Болезнь Андерсена	Отсутствие 1,4-глюкан-6- α -глюкозилтрансферазы	Длинные внешние и внутренние ветви с малым числом точек ветвления (амилопектин)	Печень, мышцы, лейкоциты
V тип Болезнь Мак-Ардла	Недостаточность фосфорилазы мышц	Нормальная	Скелетная мускулатура
VI тип Болезнь Герса	Недостаточность фосфорилазы печени	»	Печень, лейкоциты
VII тип Болезнь Томсона	Недостаточность фосфоглюкомутазы	»	Печень и (или) мышцы
VIII тип Болезнь Таруи	Недостаточность или полное отсутствие фосфофруктокиназы мышц	»	Мышцы, эритроциты
IX тип Болезнь Хага	Недостаточность киназы фосфорилазы <i>b</i>	»	Печень

Липиды – весьма разнородные по своему химическому строению вещества, характеризующиеся различной растворимостью в органических растворителях и, как правило, нерастворимые в воде. Они играют важную роль в процессах жизнедеятельности. Будучи одним из основных компонентов биологических мембран, липиды влияют на их проницаемость, участвуют в передаче нервного импульса, создании межклеточных контактов.

Другие функции липидов – образование энергетического резерва, создание защитных водоотталкивающих и термоизоляционных покровов у животных и растений, защита органов и тканей от механических воздействий.

КЛАССИФИКАЦИЯ, ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ЛИПИДОВ

При обработке животных или растительных тканей одним или несколькими (чаще последовательно) органическими растворителями, например хлороформом, бензолом или петролевым эфиром, некоторая часть материала переходит в раствор. Компоненты такой водонерастворимой фракции (вытяжки) называются липидами.

Таблица 10.1. Основные классы липидов

Нейтральные жиры (или ацилглицеролы)	Фосфоглицериды ¹
Воска	Фосфатидилэтанол-амины
Сфинголипиды	Фосфатидилхолины
Сфингомиелины	Фосфатидилсерины
Цереброзиды	Фосфатидилинозитолы
Ганглиозиды	Плазмалогены
Стероиды	Кардиолипиды

¹ Фосфоглицериды, а также сфингомиелины, содержащие фосфор, относятся к группе фосфолипидов.

обуславливающие их важные биологические свойства и сходную растворимость. Наиболее распространенные липиды – это нейтральные жиры, структурным компонентом которых, как и большинства липидов, являются жирные кислоты¹.

Жирные кислоты

Жирные кислоты – алифатические карбоновые кислоты – в организме могут находиться в свободном состоянии (следовые количества в клетках и тканях) либо выполнять роль строительных блоков для большинства классов липидов².

¹ В литературе можно встретить различные синонимы названия «нейтральные жиры»: жиры, ацилглицеролы, глицериды, ацилглицерины и др. – все они представляют собой эфиры спирта глицерина (глицерола) и жирных монокарбоновых кислот.

² В природе значительно чаще встречаются длинноцепочечные жирные кислоты с числом углеродных атомов больше двенадцати, часто их называют «высшие жирные кислоты».

Природные жирные кислоты, правда несколько условно, можно разделить на три группы: насыщенные, мононенасыщенные и полиненасыщенные жирные кислоты. Жирные кислоты, встречающиеся в природных липидах, содержат, как правило, четное число углеродных атомов и имеют по преимуществу неразветвленную цепь. Ниже приводятся формулы наиболее часто встречающихся природных жирных кислот¹.

Насыщенные жирные кислоты

Масляная (C ₄)	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COOH
Капроновая (C ₆)	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -COOH
Каприловая (C ₈)	CH ₃ -(CH ₂) ₆ -COOH
Каприновая (C ₁₀)	CH ₃ -(CH ₂) ₈ -COOH
Лауриновая (C ₁₂)	CH ₃ -(CH ₂) ₁₀ -COOH
Миристиновая (C ₁₄)	CH ₃ -(CH ₂) ₁₂ -COOH
Пальмитиновая (C ₁₆)	CH ₃ -(CH ₂) ₁₄ -COOH
Стеариновая (C ₁₈)	CH ₃ -(CH ₂) ₁₆ -COOH
Арахидиновая (C ₂₀)	CH ₃ -(CH ₂) ₁₈ -COOH
Бегеновая (C ₂₂)	CH ₃ -(CH ₂) ₂₀ -COOH
Лигноцериновая (C ₂₄)	CH ₃ -(CH ₂) ₂₂ -COOH

Мононенасыщенные (с одной двойной связью) жирные кислоты

Кроотоновая (C ₄)	CH ₃ -CH=CH-COOH
Пальмитоолеиновая (C ₁₆)	CH ₃ -(CH ₂) ₅ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH
Олеиновая (C ₁₈)	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH
Эруковая (C ₂₂)	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₁₁ -COOH
Нервоновая (C ₂₄)	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₁₃ -COOH

Полиненасыщенные (с двумя или более двойными связями) жирные кислоты.

Линолевая (C ₁₈)	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH (с двумя двойными связями)
Линоленовая (C ₁₈)	CH ₃ -CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH (с тремя двойными связями)
Арахидоновая (C ₂₀)	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -COOH (с четырьмя двойными связями)

Помимо этих основных трех групп, существует еще группа так называемых необычных природных жирных кислот. В качестве примера приводим некоторые из них, входящие в состав липидов:

Туберкулостеариновая (C ₁₉)	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH-(CH ₂) ₈ -COOH CH ₃
Цереброновая (C ₂₄)	CH ₃ -(CH ₂) ₂₁ -CH-COOH OH

Жирные кислоты, входящие в состав липидов животных и высших растений, имеют много общих свойств. Как уже отмечалось, почти все природные жирные кислоты содержат четное число углеродных атомов, чаще всего 16 или 18. Ненасыщенные жирные кислоты животных и человека, участвующие в построении липидов, обычно содержат двойную связь между 9-м и 10-м атомами углерода; дополнительные двойные связи,

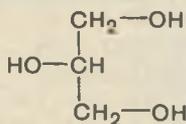
¹ По женеvской номенклатуре систематическое название жирных кислот производят от соответствующего названия углеводорода, например *n*-бутановая, *n*-гексановая и т. д. При нумерации углеродных атомов жирных кислот первым считается углерод карбоксильной группы (C—1), остальные атомы нумеруются по порядку, так что последним является углерод концевой метильной группы. Углеродные атомы (C—2 и C—3) часто обозначаются соответственно как α и β.

как правило, бывают на участке между 10-м атомом углерода и метильным концом цепи. Своеобразие двойных связей природных ненасыщенных жирных кислот заключается в том, что они всегда отделены двумя простыми связями, т. е. между ними всегда имеется хотя бы одна метиленовая группа ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$). Подобные двойные связи обозначают как «изолированные». Природные ненасыщенные жирные кислоты имеют *цис*-конфигурацию и крайне редко встречаются *транс*-конфигурации. Считают, что в ненасыщенных жирных кислотах с несколькими двойными связями *цис*-конфигурация придает углеводородной цепи изогнутый и укороченный вид, что имеет биологический смысл (особенно если учесть, что многие липиды входят в состав мембран).

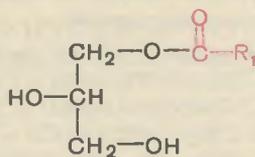
Жирные кислоты с длинной углеводородной цепью практически нерастворимы в воде. Их натриевые и калиевые соли (мыла) образуют в воде мицеллы. В последних отрицательно заряженные карбоксильные группы жирных кислот обращены к водной фазе, а неполярные углеводородные цепи спрятаны внутри мицеллярной структуры. Такие мицеллы имеют суммарный отрицательный заряд и в растворе остаются суспендированными благодаря взаимному отталкиванию.

Нейтральные жиры

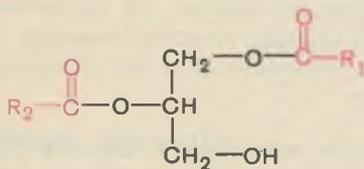
Нейтральные жиры¹ — это эфиры глицерина и жирных кислот. Если жирными кислотами этерифицированы все три гидроксильные группы глицерина (ацильные радикалы R_1 , R_2 и R_3 могут быть одинаковы или различны), то такое соединение называют триглицеридом (триацилглицеролом), если две — диглицеридом (диацилглицеролом) и, наконец, если этерифицирована одна группа — моноглицеридом (моноацилглицеролом).



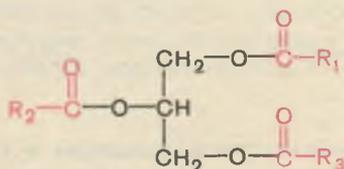
Глицерин (глицерол)



Моноглицерид (моноацилглицерол)



Диглицерид (диацилглицерол)



Триглицерид (триацилглицерол)

Нейтральные жиры находятся в организме либо в форме протоплазматического жира, являющегося структурным компонентом клеток, либо в форме запасного, резерв-

¹ Согласно рекомендациям Международной номенклатурной комиссии нейтральные жиры следует называть ацилглицеролами. Следовательно, могут быть триацилглицеролы, диацилглицеролы и моноацилглицеролы. Однако в настоящем учебнике сохранены более традиционные названия: три-, ди- и моноглицериды.

ного жира. Роль этих двух форм жира в организме неодинакова. Протоплазматический жир имеет постоянный химический состав и содержится в тканях в определенном количестве, не изменяющемся даже при патологическом ожирении, в то время как количество резервного жира подвергается большим колебаниям.

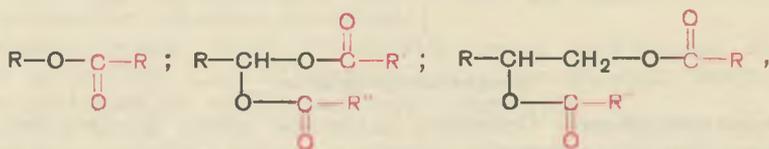
Основную массу природных нейтральных жиров составляют триглицериды. Жирные кислоты в триглицеридах могут быть насыщенными и ненасыщенными. Чаще среди жирных кислот встречаются пальмитиновая, стеариновая и олеиновая кислоты. Если все три кислотных радикала принадлежат одной и той же жирной кислоте, то такие триглицериды называют простыми (например, трипальмитин, тристеарин, триолеин и т. д.), если же разным жирным кислотам, — то смешанными. Названия смешанных триглицеридов образуются от входящих в их состав жирных кислот; при этом цифры 1, 2 и 3 указывают на связь остатка жирной кислоты с соответствующей спиртовой группой в молекуле глицерина (например, 1-олео-2-пальмитостеарин).

Жирные кислоты, входящие в состав триглицеридов, практически определяют их физико-химические свойства. Так, температура плавления триглицеридов повышается с увеличением числа и длины остатков насыщенных жирных кислот. Напротив, чем выше содержание ненасыщенных жирных кислот или кислот с короткой цепью, тем ниже точка плавления. Животные жиры (сало) обычно содержат значительное количество насыщенных жирных кислот (пальмитиновой, стеариновой и др.), благодаря чему они при комнатной температуре твердые. Жиры, в состав которых входит много моно- и полиненасыщенных кислот, при обычной температуре жидкие и называются маслами. Так, в конопляном масле 95% всех жирных кислот приходится на долю олеиновой, линолевой и линоленовой кислот и только 5% — на долю стеариновой и пальмитиновой кислот. Заметим, что в жире человека, плавящемся при 15°C (при температуре тела он жидкий), содержится 70% олеиновой кислоты.

Глицериды способны вступать во все химические реакции, свойственные сложным эфирам. Наибольшее значение имеет реакция омыления, в результате которой из триглицеридов образуются глицерин и жирные кислоты. Омыление жира¹ может происходить как при ферментативном гидролизе, так и при действии кислот или щелочей.

Воска

Воска — сложные эфиры высших жирных кислот и высших одноатомных или двухатомных спиртов с числом углеродных атомов от 16 до 22. Общие их формулы можно представить так:



где R, R' и R'' — возможные радикалы.

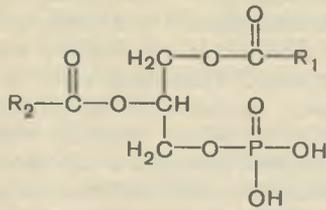
Воска могут входить в состав жира, покрывающего кожу, шерсть, перья. У растений 80% от всех липидов, образующих пленку на поверхности листьев и плодов, составляют воска. Известно также, что воска являются нормальными метаболитами некоторых микроорганизмов.

Природные воска (например, пчелиный воск, спермацет, ланолин) обычно содержат, кроме упомянутых сложных эфиров, некоторое количество свободных высших жирных кислот, спиртов и углеводов с числом углеродных атомов 21—35.

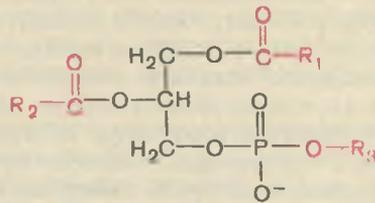
¹ Жиры в качестве примесей содержат некоторое количество свободных жирных кислот и незначительное количество неомыляемых веществ.

Фосфоглицериды

Фосфоглицериды являются производными фосфатидной кислоты: в их состав входят глицерин, жирные кислоты, фосфорная кислота и обычно азотсодержащие соединения. Общая формула фосфоглицеридов выглядит так:



Фосфатидная кислота

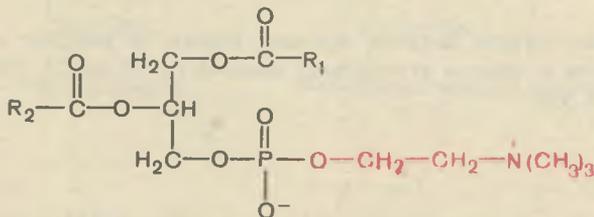


Фосфоглицерид

где R_1 и R_2 — радикалы высших жирных кислот, а R_3 — чаще радикал азотистого соединения. Для всех фосфоглицеридов характерно, что одна часть их молекулы (радикалы R_1 и R_2) обнаруживает резко выраженную гидрофобность, тогда как другая часть гидрофильна благодаря отрицательному заряду остатка фосфорной кислоты и положительному заряду радикала R_3 .

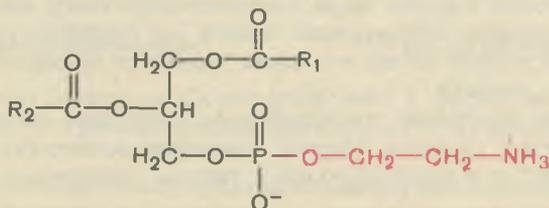
Из всех липидов фосфоглицериды обладают наиболее выраженными полярными свойствами. При помещении фосфоглицеридов в воду в истинный раствор переходит лишь небольшая их часть, основная же масса липида находится в водных системах в форме мицелл. Существует несколько групп (подклассов) фосфоглицеридов.

Фосфатидилхолины (лецитины). В отличие от триглицеридов в молекуле фосфатидилхолина одна из трех гидроксильных групп глицерина связана не с жирной, а с фосфорной кислотой. Кроме того, фосфорная кислота в свою очередь соединена эфирной связью с азотистым основанием холином $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$. Таким образом, в молекуле фосфатидилхолина соединены глицерин, высшие жирные кислоты, фосфорная кислота и холин:



Фосфатидилхолин (лецитин)

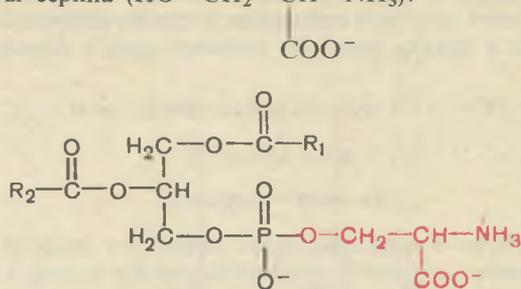
Фосфатидилэтанолламины. Основным различием между фосфатидилхолинами и фосфатидилэтанолламинами является наличие в составе последних азотистого основания этаноламина ($\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$):



Фосфатидилэтанолламин

Из фосфоглицеридов в организме животных и высших растений в наибольшем количестве встречаются фосфатидилхолины и фосфатидилэтаноламины. Эти две группы фосфоглицеридов метаболически связаны друг с другом и являются главными липидными компонентами мембран клеток.

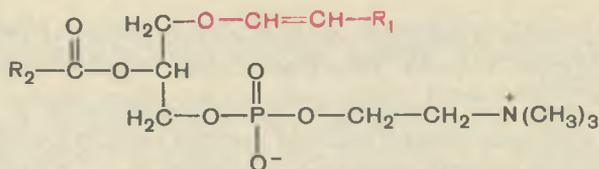
Фосфатидилсерины. В молекуле фосфатидилсерина азотистым соединением служит остаток аминокислоты серина ($\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_3$):



Фосфатидилсерин

Фосфатидилсерины распространены гораздо менее широко, чем фосфатидилхолины и фосфатидилэтаноламины, и их значение определяется в основном тем, что они участвуют в синтезе фосфатидилэтаноламинов.

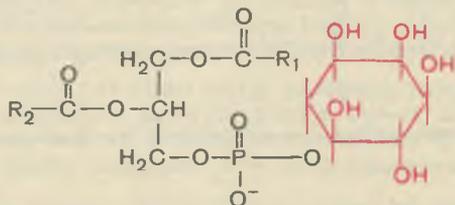
Плазмалогены. Отличаются от рассмотренных выше фосфоглицеридов тем, что вместо одного остатка высшей жирной кислоты содержат остаток α , β -ненасыщенного спирта, который образует простую эфирную связь (в отличие от сложноэфирной связи, образуемой остатком жирной кислоты) с гидроксильной группой глицерина в положении С-1:



Фосфатидальхолин (плазмалоген)

Основными подклассами плазмалогенов являются фосфатидальхолины¹, фосфатидальэтаноламины и фосфатидальсерины.

Фосфатидилинозитолы. Также относятся к группе производных фосфатидной кислоты, но не содержат азот. Радикалом (R_3) в этом подклассе фосфоглицеридов является шестиуглеродный циклический спирт — инозитол:

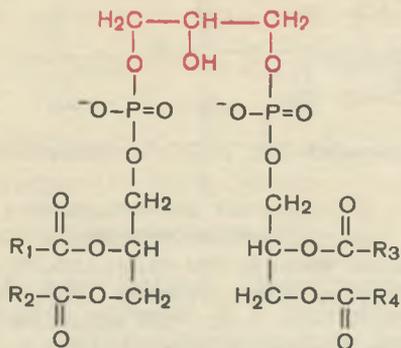


Фосфатидилинозитол

¹ В разбавленных кислотах плазмалогены гидролизуются с образованием альдегида соответствующего α , β -ненасыщенного спирта.

Фосфатидилинозитолы довольно широко распространены в природе. Обнаружены у животных, растений и микроорганизмов. В животном организме они найдены в мозге, печени и легких.

Кардиолипины. К фосфоглицеридам, точнее к полифосфоглицеридам, относятся кардиолипины. Остов молекулы кардиолипина включает три остатка глицерина, соединенных друг с другом двумя фосфодиефирными мостиками через С-1 и С-3; гидроксильные группы внешних остатков глицерина этерифицированы жирными кислотами. Кардиолипины входят в состав мембран митохондрий и бактерий.



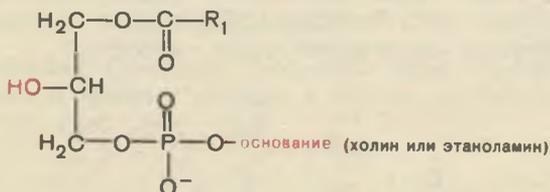
Кардиолипин

где R_1 ; R_2 ; R_3 ; R_4 — радикалы высших жирных кислот.

Необходимо отметить, что в природе встречается и свободная фосфатидная кислота, хотя по сравнению с другими фосфоглицеридами в относительно небольших количествах.

Среди жирных кислот, входящих в состав фосфоглицеридов, обнаружены как насыщенные, так и ненасыщенные жирные кислоты (чаще стеариновая, пальмитиновая, олеиновая и линолевая).

Установлено также, что большинство фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов содержат одну насыщенную высшую жирную кислоту в положении С-1 и одну ненасыщенную высшую жирную кислоту в положении С-2. Гидролиз фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов при участии особых ферментов¹, содержащихся, например, в яде кобры, приводит к отщеплению ненасыщенной жирной кислоты и образованию лизофосфолипидов — лизофосфатидилхолинов или лизофосфатидилэтаноламинов, обладающих сильным гемолитическим действием:



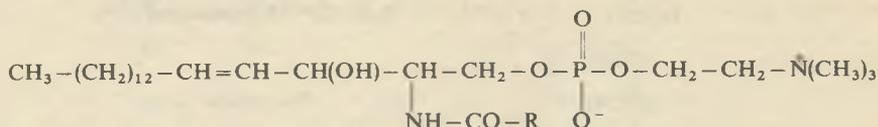
Лизофосфатидилхолин или лизофосфатидилэтаноламин

Сфинголипиды

Существуют три подкласса сфинголипидов: сфингомиелины, цереброзиды и ганглиозиды. Все сфинголипиды в своей структуре не содержат глицерин.

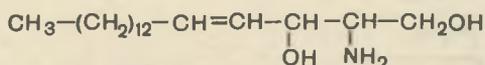
¹ Эти ферменты относятся к фосфолипазам A_2 .

Сфингомиелины. Наиболее распространенные сфинголипиды. Они в основном находятся в мембранах животных и растительных клеток. Особенно богата ими нервная ткань; сфингомиелины обнаружены также в ткани почек, печени и других органов. При гидролизе сфингомиелины образуют одну молекулу жирной кислоты, одну молекулу двухатомного ненасыщенного аминоспирта сфингозина, одну молекулу азотистого основания (чаще это холин) и одну молекулу фосфорной кислоты. Общую формулу сфингомиелинов можно представить так:

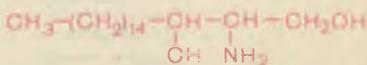


Сфингомиелин

Общий план построения молекулы сфингомиелина в определенном отношении напоминает строение молекул фосфоглицеридов. Молекула сфингомиелина содержит как бы полярную «головку», которая несет одновременно и положительный (остаток холина), и отрицательный (остаток фосфорной кислоты) заряд, и два неполярных «хвоста» (длинная алифатическая цепь сфингозина и ацильный радикал жирной кислоты). Следует заметить, что в некоторых сфингомиелинах, например выделенных из мозга и селезенки, вместо сфингозина найден спирт дигидросфингозин (восстановленный сфингозин):

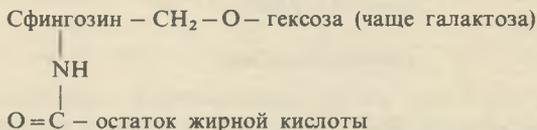


Сфингозин



Дигидросфингозин

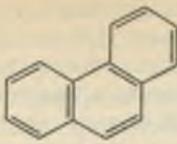
Цереброзиды. Цереброзиды не содержат ни фосфорной кислоты, ни холина. В их состав входит гексоза (обычно это D-галактоза), которая связана эфирной связью с гидроксильной группой аминоспирта сфингозина. Кроме того, в состав цереброзида входит жирная кислота. Среди этих жирных кислот чаще всего встречается лигноцириновая, нервоновая и цереброновая кислоты, т. е. жирные кислоты, имеющие 24 углеродных атома. Структура цереброзидов может быть представлена следующей схемой:



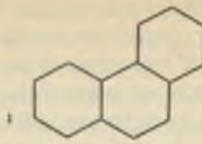
Наиболее изученными представителями цереброзидов являются нервон, содержащий нервоновую кислоту, цереброн, в состав которого входит цереброновая кислота, и керазин, содержащий лигноцириновую кислоту. Особенно велико содержание цереброзидов в мембранах нервных клеток (в миелиновой оболочке).

Существуют цереброзидсульфатиды (сульфаты цереброзидов), которые отличаются от цереброзидов наличием в молекуле остатка серной кислоты, присоединенного к третьему углеродному атому гексозы. В мозге млекопитающих цереброзидсульфатиды находятся в белом веществе. Однако содержание их в мозге намного ниже, чем цереброзидов.

Ганглиозиды. При гидролизе ганглиозидов можно обнаружить высшую жирную кислоту, спирт сфингозин, D-глюкозу и D-галактозу, а также производные аминосахаров: N-ацетилглюкозамин и N-ацетилнейраминную кислоту. Последняя синтезируется в организме из фосфоенолпирувата и N-ацетилманнозамин-6-фосфата и имеет следующую формулу, которую можно изобразить двумя различными способами:



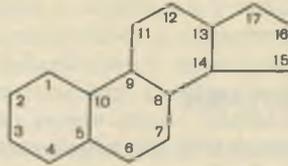
Фенантрен



Пергидрофенантрен

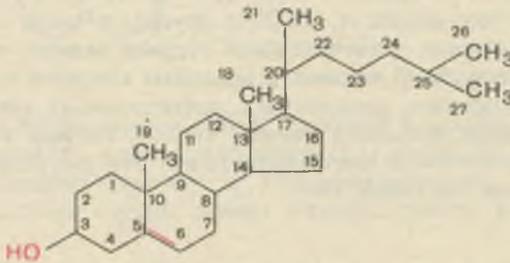


Циклопентан



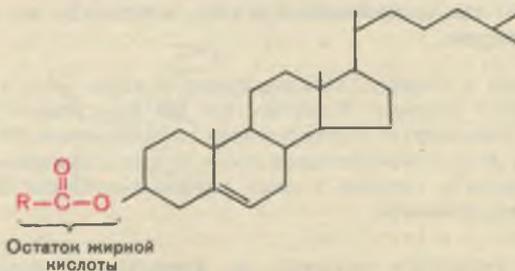
Циклопентанпергидрофенантрен
(общая структурная основа стероидов)

К стероидам относятся, например, гормоны коркового вещества надпочечников, половые гормоны, желчные кислоты, сердечные гликозиды. В организме человека важное место среди стероидов занимают стерины (стеролы), т. е. стероидные спирты. Главным представителем стеринов является холестерин (холестерол):



Холестерин (холестерол)

Он содержит спиртовую гидроксильную группу при С-3 и разветвленную алифатическую цепь из восьми атомов углерода при С-17. Гидроксильная группа при С-3 может быть этерифицирована высшей жирной кислотой; при этом образуются эфиры холестерина (холестериды):



Остаток жирной кислоты

Эфир холестерина (холестерид)

Холестерин является важным компонентом липопротеинов плазмы крови, а в печени и других тканях играет роль ключевого промежуточного продукта в синтезе многих соединений стероидной природы. Холестерином богаты плазматические мембраны многих животных клеток; в значительно меньшем количестве он содержится в мембранах митохондрий и в эндоплазматической сети.

Заметим, что в растениях холестерин отсутствует, зато имеются другие стерины, известные под общим названием фитостеринов.

ОБМЕН ЛИПИДОВ

Роль липидов в питании

Липиды являются обязательной составной частью сбалансированного пищевого рациона человека (см. главу 7). В среднем в организм взрослого человека с пищей ежедневно поступает около 90 г жиров животного и растительного происхождения. В пожилом возрасте, а также при малой физической нагрузке потребность в жирах снижается, в условиях холодного климата и при тяжелой физической работе — увеличивается.

Значение жиров как пищевого продукта весьма многообразно. Прежде всего жиры в питании человека имеют важное энергетическое значение. Высокая калорийность жиров по сравнению с белками и углеводами придает им особую энергетическую ценность при расходовании организмом больших количеств энергии. Известно, что при окислении 1 г жиров организм получает 38,9 кДж (9,3 ккал), тогда как при окислении 1 г белка или углеводов — 17,2 кДж (4,1 ккал). Кроме того, жиры являются растворителями витаминов А, D, E и других, в связи с чем обеспеченность организма этими витаминами в значительной степени зависит от поступления жиров в составе пищи (см. главу 5). С жирами в организм вводятся и некоторые полиненасыщенные кислоты (линолевая, линоленовая, арахидоновая), которые относят к категории незаменимых (эссенциальных) жирных кислот, так как ткани человека и ряда животных потеряли способность синтезировать их. Эти кислоты условно объединены в группу под названием «витамин F».

Переваривание и всасывание липидов

Расщепление жиров в желудочно-кишечном тракте. Слюна не содержит расщепляющих жиры ферментов. Следовательно, в полости рта жиры не подвергаются никаким изменениям. У взрослых людей жиры проходят через желудок также без особых изменений, поскольку содержащаяся в небольшом количестве в желудочном соке взрослого человека и млекопитающих липаза малоактивна. Величина рН желудочного сока около 1,5, а оптимальное значение рН для действия желудочной липазы находится в пределах 5,5—7,5. Кроме того, липаза может активно гидролизовать только предварительно эмульгированные жиры, в желудке же отсутствуют условия для эмульгирования жиров.

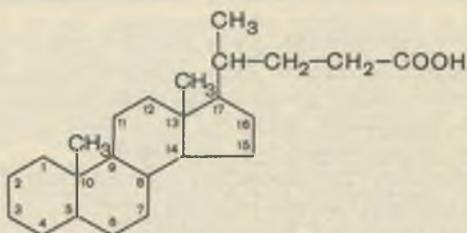
Переваривание жиров в полости желудка играет важную роль в процессе пищеварения у детей, особенно грудного возраста. Известно, что рН желудочного сока у детей грудного возраста около 5,0, что способствует перевариванию эмульгированного жира молока желудочной липазой. К тому же есть основания полагать, что при длительном употреблении молока в качестве основного продукта питания у детей грудного возраста наблюдается адаптивное усиление синтеза желудочной липазы.

Хотя в желудке взрослого человека не происходит заметного переваривания жиров пищи, все же в желудке отмечается частичное разрушение липопротеиновых

комплексов мембран клеток пищи, что делает жиры более доступными для последующего воздействия на них липазы панкреатического сока. Кроме того, незначительное расщепление жиров в желудке приводит к появлению свободных жирных кислот, которые, поступая в кишечник, способствуют эмульгированию там жиров.

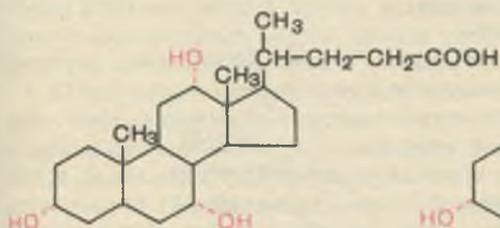
Расщепление жиров, входящих в состав пищи, происходит у человека и млекопитающих преимущественно в верхних отделах тонкого кишечника, где имеются весьма благоприятные условия для эмульгирования жиров.

После того как химус попадает в двенадцатиперстную кишку, прежде всего происходит нейтрализация попавшей в кишечник с пищей соляной кислоты желудочного сока бикарбонатами, содержащимися в панкреатическом и кишечном соках. Выделяющиеся при разложении бикарбонатов пузырьки углекислого газа способствуют хорошему перемешиванию пищевой кашицы с пищеварительными соками. Одновременно начинается эмульгирование жира. Наиболее мощное эмульгирующее действие на жиры оказывают соли желчных кислот, попадающие в двенадцатиперстную кишку с желчью в виде натриевых солей. Большая часть желчных кислот конъюгирована с глицином или таурином. По химической природе желчные кислоты являются производными холановой кислоты:

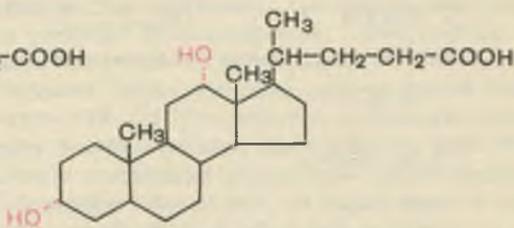


Холановая кислота

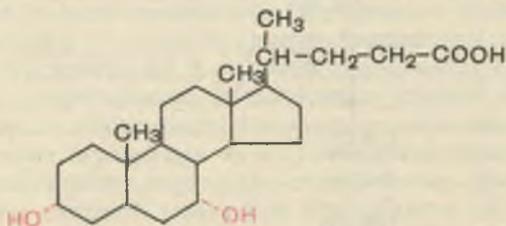
Желчные кислоты представляют собой основной конечный продукт обмена холестерина. В желчи человека в основном содержатся холевая (3,7,12-триоксихолановая), дезоксихолевая (3,12-диоксихолановая) и хенодезоксихолевая (3,7-диоксихолановая) кислоты (все гидроксильные группы имеют α -конфигурацию и поэтому обозначены пунктирной линией):



Холевая кислота



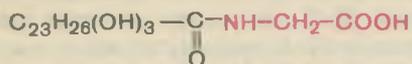
Дезоксихолевая кислота



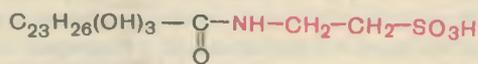
Хенодезоксихолевая кислота

Кроме того, в желчи человека в малых количествах содержатся литохолевая (3 α -оксихолановая) кислота, а также аллохолевая и уреодезоксихолевая кислоты – стереоизомеры холевой и хенодезоксихолевой кислот.

Как уже отмечалось, желчные кислоты присутствуют в желчи в конъюгированной форме, т. е. в виде гликохолевой, гликодезоксихолевой, гликохенодезоксихолевой (около $\frac{2}{3}$ – $\frac{4}{5}$ всех желчных кислот) или таурохолевой, тауродезоксихолевой и тауро-хенодезоксихолевой (около $\frac{1}{5}$ – $\frac{1}{3}$ всех желчных кислот) кислот. Эти соединения иногда называют парными желчными кислотами, так как они состоят из двух компонентов – из желчной кислоты и глицина или таурина. Заметим, что соотношения между конъюгатами обоих видов могут меняться в зависимости от характера пищи: в случае преобладания в ней углеводов увеличивается относительное содержание глициновых конъюгатов, а при высокобелковой диете – тауриновых конъюгатов. Строение парных желчных кислот может быть представлено в следующем виде:



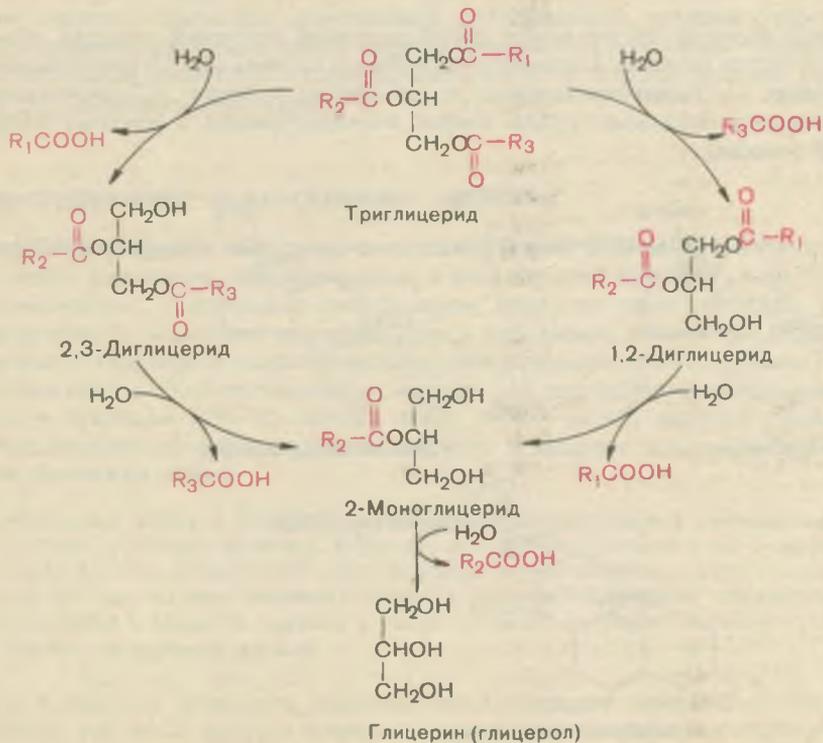
Глиохолевая кислота



Таурохолевая кислота

Считается, что только комбинация: соль желчной кислоты + ненасыщенная жирная кислота + моноглицерид способна дать необходимую степень эмульгирования жира. Соли желчных кислот резко уменьшают поверхностное натяжение на поверхности раздела жир/вода, благодаря чему они не только облегчают эмульгирование, но и стабилизируют уже образовавшуюся эмульсию.

Гидролиз эмульгированных триглицеридов под действием панкреатической липазы происходит поэтапно: сначала быстро гидролизуются сложноэфирные связи 1 и 3, а потом уже медленно идет гидролиз 2-моноглицерида:



Необходимо отметить, что в расщеплении жиров участвует также кишечная липаза, однако активность ее невысока. К тому же эта липаза катализирует гидролитическое расщепление моноглицеридов и не действует на ди- и триглицериды. Таким образом, практически основными продуктами, образующимися в кишечнике при расщеплении пищевых жиров, являются жирные кислоты, моноглицериды и глицерин.

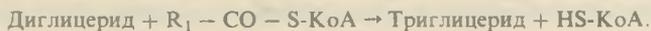
Всасывание жиров в кишечнике. Всасывание происходит в проксимальной части тонкого кишечника. Тонко эмульгированные жиры (величина жировых капелек эмульсии не должна превышать 0,5 мкм) частично могут всасываться через стенку кишечника без предварительного гидролиза. Однако основная часть жира всасывается лишь после расщепления его панкреатической липазой на жирные кислоты, моноглицериды и глицерин. Жирные кислоты с короткой углеродной цепью (менее 10 атомов углерода) и глицерин, будучи хорошо растворимыми в воде, свободно всасываются в кишечнике и поступают в кровь воротной вены, оттуда — в печень, минуя какие-либо превращения в кишечной стенке. Более сложно происходит всасывание жирных кислот с длинной углеродной цепью и моноглицеридов. Этот процесс осуществляется при участии желчи и главным образом желчных кислот, входящих в ее состав. В желчи соли желчных кислот, фосфолипиды и холестерин содержатся в соотношении 12,5 : 2,5 : 1,0. Жирные кислоты с длинной цепью и моноглицериды в просвете кишечника образуют с этими соединениями устойчивые в водной среде мицеллы. Структура этих мицелл такова, что их гидрофобное ядро (жирные кислоты, моноглицериды и др.) оказывается окруженным снаружи гидрофильной оболочкой их желчных кислот и фосфолипидов. Мицеллы примерно в 100 раз меньше самых мелких эмульгированных жировых капелек. В составе мицелл высшие жирные кислоты и моноглицериды переносятся от места гидролиза жиров к всасывающей поверхности кишечного эпителия. Относительно механизма всасывания жировых мицелл единого мнения нет. Одни исследователи считают, что в результате так называемой мицеллярной диффузии, а возможно и пиноцитоза, мицеллы целиком проникают в эпителиальные клетки ворсинок, где происходит распад жировых мицелл; при этом желчные кислоты сразу же поступают в ток крови и через систему воротной вены попадают в печень, откуда они вновь попадают в желчь. Другие исследователи допускают возможность перехода в клетки ворсинок только липидного компонента жировых мицелл, при этом соли желчных кислот, выполнив свою физиологическую роль, остаются в просвете кишечника и лишь потом в основной массе всасываются в кровь (в подвздошной кишке), попадают в печень и затем выделяются с желчью. Таким образом, и те и другие исследователи признают, что происходит постоянная циркуляция желчных кислот между печенью и кишечником. Этот процесс получил название печеночно-кишечной (энтерогапатической) циркуляции.

С помощью метода меченых атомов было показано, что в желчи содержится лишь небольшая часть желчных кислот (10—15% от общего количества), вновь синтезированных печенью, т. е. основная масса желчных кислот желчи (85—90%) — это желчные кислоты, реабсорбированные в кишечнике и повторно секретиремые в составе желчи. Установлено, что у человека общий пул желчных кислот составляет примерно 2,8—3,5 г; при этом они совершают 5—6 оборотов в сутки.

Ресинтез жиров в стенке кишечника. В стенке кишечника синтезируются жиры, в значительной степени специфичные для данного вида животного и отличающиеся по своему строению от пищевого жира. В известной мере это обеспечивается тем, что в синтезе триглицеридов (а также фосфолипидов) в кишечной стенке принимают участие наряду с экзогенными и эндогенные жирные кислоты. Однако способность к осуществлению в стенке кишечника синтеза жира, специфичного для данного вида животного, все же ограничена. А. Н. Лебедевым показано, что при скармливании животному, особенно предварительно голодавшему, больших количеств чужеродного жира (например, льняного масла или верблюжьего жира) часть его обнаруживается в жировых тканях животного в неизменном виде. Жировые депо скорее всего являются единственной тканью, где могут откладываться чужеродные жиры. Липиды,

входящие в состав протоплазмы клеток других органов и тканей, отличаются высокой специфичностью, их состав и свойства мало зависят от пищевых жиров.

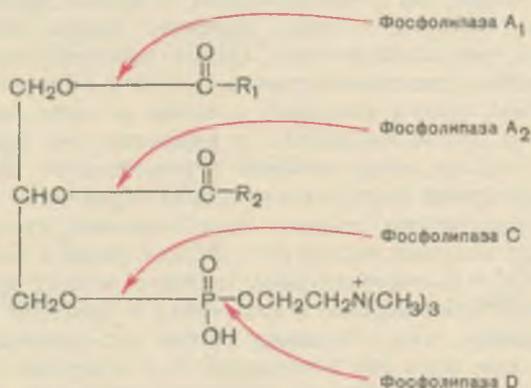
Механизм ресинтеза триглицеридов в клетках стенки кишечника в общих чертах сводится к следующему: первоначально из жирных кислот образуется их активная форма — ацил-КоА, после чего происходит последовательное ацилирование моноглицеридов с образованием сначала ди-, а затем триглицеридов:



Таким образом, в клетках кишечного эпителия высших животных моноглицериды, образующиеся в кишечнике при переваривании пищи, могут ацилироваться непосредственно, без промежуточных стадий.

Однако в эпителиальных клетках тонкого кишечника содержатся ферменты — моноглицеридлипаза, расщепляющая моноглицериды на глицерин и жирную кислоту, и глицеролкиназа, способная превращать глицерин (образовавшийся из моноглицерида или всосавшийся из кишечника) в глицерол-3-фосфат. Последний, взаимодействуя с активной формой жирной кислоты — ацил-КоА, образует фосфатидную кислоту, которая затем используется для ресинтеза триглицеридов и особенно фосфоглицеридов.

Переваривание и всасывание фосфоглицеридов и холестерина. Вводимые с пищей фосфоглицериды подвергаются в кишечнике воздействию специфических гидролитических ферментов (фосфолипаз), разрывающих эфирные связи между компонентами, входящими в состав фосфолипидов. Принято считать, что в пищеварительном тракте распад фосфоглицеридов происходит при участии различных типов фосфолипаз, выделяемых с панкреатическим соком. Ниже приведена схема гидролитического расщепления фосфатидилхолина:



Фосфолипаза A₂ поджелудочной железы поступает в полость тонкого кишечника в неактивной форме и только после воздействия трипсина, приводящего к отщеплению от нее гептапептида, приобретает активность. Накопление образовавшихся под действием фосфолипазы A₂ лизофосфолипидов в кишечнике может быть устранено, если одновременно на фосфоглицериды действуют обе фосфолипазы: A₁ и A₂¹.

В результате действия фосфолипаз фосфоглицериды расщепляются в кишечнике

¹ Существуют также фосфолипаза B, которая способна гидролизовать сложноэфирные связи фосфоглицеридов как в 1-м, так и во 2-м положениях.

с образованием глицерина, высших жирных кислот, азотистого основания (холин и этаноламин) и фосфорной кислоты. Необходимо отметить, что подобный механизм расщепления фосфоглицеридов существует и в тканях организма; катализируется этот процесс тканевыми фосфолипазами. Заметим, что последовательность реакций расщепления фосфоглицеридов на отдельные компоненты еще не выяснена.

Механизм всасывания высших жирных кислот и глицерина был уже рассмотрен. Фосфорная кислота всасывается кишечной стенкой главным образом в виде натриевых или калиевых солей. Холин и этаноламин всасываются в виде ЦДФ-производных. В кишечной стенке происходит ресинтез фосфоглицеридов. Необходимые компоненты для синтеза: высшие жирные кислоты, глицерин, фосфорная кислота, органические азотистые основания (холин или этаноламин) поступают в эпителиальную клетку при всасывании из полости кишечника, поскольку они образуются при гидролизе пищевых жиров и липидов; частично эти компоненты доставляются в эпителиальные клетки кишечника с током крови из других тканей. Ресинтез фосфоглицеридов проходит через стадию образования фосфатидной кислоты.

Холестерин попадает в пищеварительные органы человека преимущественно с яичным желтком, мясом, печенью, мозгом. В организм взрослого человека ежедневно поступает 0,1–0,3 г холестерина, содержащегося в пищевых продуктах либо в виде свободного холестерина, либо в виде его эфиров (холестеридов). Эфиры холестерина расщепляются на холестерин и жирные кислоты при участии особого фермента панкреатического и кишечного соков — холестеролэстеразы. Нерастворимый в воде холестерин, подобно жирным кислотам, всасывается в кишечнике лишь в присутствии желчных кислот.

Образование хиломикрон и транспорт липидов. Ресинтезированные в эпителиальных клетках кишечника триглицериды и фосфолипиды, а также поступивший в эти клетки из полости кишечника холестерин (здесь он может частично этерифицироваться) соединяются с небольшим количеством белка и образуют относительно стабильные комплексные частицы — хиломикроны (ХМ). Последние содержат около 2% белка, 7% фосфолипидов, 8% холестерина и его эфиров и свыше 80% триглицеридов. Диаметр ХМ колеблется от 0,1 до 5 мкм. Благодаря большим размерам частиц ХМ не способны проникать из эндотелиальных клеток кишечника в кровеносные капилляры и диффундируют в лимфатическую систему кишечника, а из нее — в грудной лимфатической проток. Затем из грудного лимфатического протока ХМ попадают в кровяное русло, т. е. с их помощью осуществляется транспорт экзогенных триглицеридов, холестерина и частично фосфолипидов из кишечника через лимфатическую систему в кровь. Уже через 1–2 ч после приема пищи, содержащей липиды, наблюдается алиментарная гиперлипемия. Это физиологическое явление, характеризующееся в первую очередь повышением концентрации триглицеридов в крови и появлением в ней ХМ. Пик алиментарной гиперлипемии приходится на 4–6 ч после приема жирной пищи. Обычно через 10–12 ч после приема пищи содержание триглицеридов возвращается к нормальным величинам, а ХМ полностью исчезают из кровяного русла.

Известно, что печень и жировая ткань играют наиболее существенную роль в дальнейшей судьбе ХМ. Последние свободно диффундируют из плазмы крови в межклеточные пространства печени (синусоиды). Допускается, что гидролиз триглицеридов ХМ происходит как внутри печеночных клеток, так и на их поверхности. Что касается жировой ткани, то ХМ не способны (из-за своих размеров) проникать в ее клетки. В связи с этим триглицериды ХМ подвергаются гидролизу на поверхности эндотелия капилляров жировой ткани при участии фермента липопроотеидлипазы. В результате образуются жирные кислоты и глицерин. Часть жирных кислот проходит внутрь жировых клеток, а часть связывается с альбуминами сыворотки крови и уносится с ее током. С током крови может покидать жировую ткань и глицерин. Расщепление триглицеридов ХМ в печени и в кровеносных капиллярах жировой ткани фактически приводит к прекращению существования ХМ.

ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ ОБМЕН ЛИПИДОВ

Метаболизм липидов включает следующие основные процессы: расщепление триглицеридов в тканях с образованием высших жирных кислот и глицерина, мобилизацию жирных кислот из жировых депо и их окисление, образование ацетоновых тел (кетоновых тел), биосинтез высших жирных кислот, триглицеридов, фосфолипидов, сфинголипидов, холестерина и т. д.

Внутриклеточный липолиз

Главным эндогенным источником жирных кислот, используемых в качестве «топлива», служит резервный жир, содержащийся в жировой ткани. Принято считать, что триглицериды жировых депо выполняют в обмене липидов такую же роль, как гликоген печени в обмене углеводов, а высшие жирные кислоты по своей энергетической роли напоминают глюкозу, которая образуется в процессе фосфоролиза гликогена. При физической работе и других состояниях организма, требующих повышенных энергозатрат, потребление триглицеридов жировой ткани как энергетического резерва увеличивается.

Поскольку в качестве источников энергии могут использоваться только свободные, т. е. незатерифицированные жирные кислоты, то триглицериды сначала гидролизуются при помощи специфических тканевых ферментов — липаз — до глицерина и свободных жирных кислот. Последние из жировых депо могут переходить в плазму крови (мобилизация высших жирных кислот), после чего они используются тканями и органами тела в качестве энергетического материала.

В жировой ткани содержится несколько липаз, из которых наибольшее значение имеют триглицеридлипаза (так называемая гормоночувствительная липаза), диглицеридлипаза и моноглицеридлипаза. Активность двух последних ферментов в 10–100 раз превышает активность первого. Триглицеридлипаза активируется рядом гормонов (например, адреналином, норадреналином, глюкагоном и др.), тогда как диглицеридлипаза и моноглицеридлипаза нечувствительны к их действию. Триглицеридлипаза является регуляторным ферментом.

Установлено, что гормоночувствительная липаза (триглицеридлипаза) находится в жировой ткани в неактивной форме и активируется цАМФ. В результате воздей-

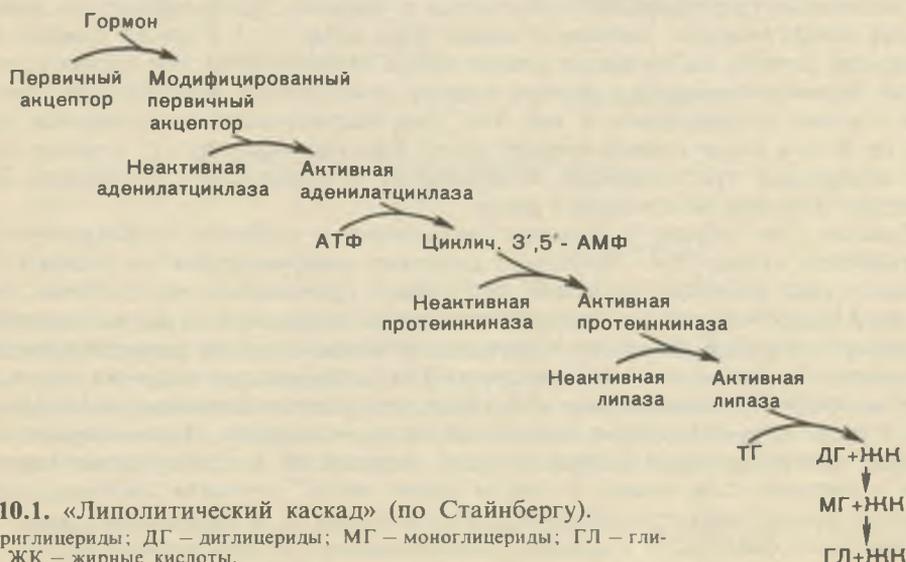


Рис. 10.1. «Липолитический каскад» (по Стайнбергу).

ТГ — триглицериды; ДГ — диглицериды; МГ — моноглицериды; ГЛ — глицерин; ЖК — жирные кислоты.

ствия гормонов первичный клеточный рецептор модифицирует свою структуру, и в такой форме он способен активировать фермент аденилатциклазу, что в свою очередь стимулирует образование цАМФ из АТФ. Образовавшийся цАМФ активирует фермент протеинкиназу, который путем фосфорилирования неактивной триглицеридлипазы превращает ее в активную форму (рис. 10.1). Активная триглицеридлипаза расщепляет триглицерид на диглицерид и жирную кислоту. Затем при действии ди- и моноглицеридлипаз образуются конечные продукты липолиза — глицерин и свободные жирные кислоты, которые поступают в кровяное русло. Связанные с альбуминами плазмы в виде комплекса свободные жирные кислоты с током крови попадают в органы и ткани, где комплекс распадается, а жирные кислоты подвергаются либо β -окислению, либо частично используются для синтеза триглицеридов (из которых затем образуются липопротеины), фосфоглицеридов, сфинголипидов и других соединений, а также на этерификацию холестерина.

Другой источник жирных кислот — фосфолипиды мембран. В клетках животных непрерывно происходит метаболическое обновление фосфолипидов, в процессе которого образуются свободные жирные кислоты (продукт действия тканевых фосфолипаз).

Окисление жирных кислот

Ф. Кнооп в 1904 г. выдвинул гипотезу β -окисления жирных кислот на основании опытов по скармливанию собакам различных жирных кислот, в которых один атом водорода в концевой метильной группе (у ω -углеродного атома) был замещен фенильным радикалом (C_6H_5 -).

Ф. Кнооп высказал предположение, что окисление молекулы жирной кислоты в тканях организма происходит в β -положении; в результате происходит последовательное отщепление от молекулы жирной кислоты двууглеродных фрагментов со стороны карбоксильной группы.

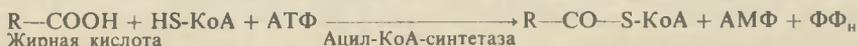
Жирные кислоты, входящие в состав естественных жиров животных и растений, имеют четное число углеродных атомов. Любая такая кислота, отщепляя по паре углеродных атомов, в конце концов проходит через стадию масляной кислоты, которая после очередного β -окисления должна дать ацетоуксусную кислоту. Последняя затем гидролизуется до двух молекул уксусной кислоты.

Теория β -окисления жирных кислот, предложенная Кноопом, в значительной мере послужила основой современных представлений о механизме окисления жирных кислот.

Современные представления об окислении жирных кислот

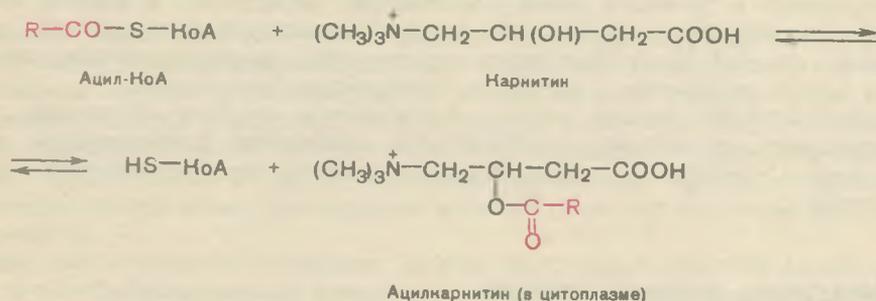
Установлено, что окисление жирных кислот в клетках происходит в митохондриях при участии мультиферментного комплекса. Известно также, что жирные кислоты первоначально активируются при участии АТФ и HS-CoA; субстратами на всех последующих стадиях ферментативного окисления жирных кислот служат CoA-эфиры этих кислот; выяснена также роль карнитина в транспорте жирных кислот из гиалоплазмы в митохондрии. Процесс окисления жирных кислот складывается из следующих основных этапов.

Активация жирных кислот и их проникновение из цитоплазмы в митохондрии. Образование «активной формы» жирной кислоты (ацил-CoA) из коэнзима А и жирной кислоты является эндергоническим процессом, протекающим за счет использования энергии АТФ:

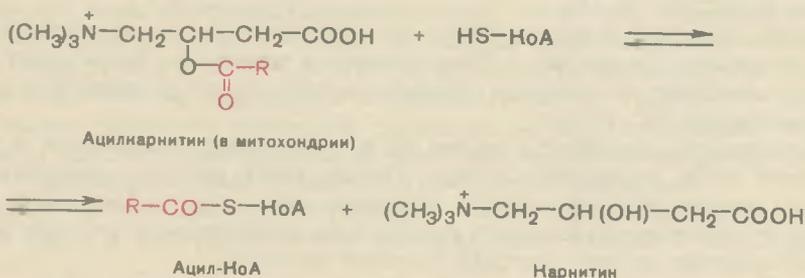


Реакция катализируется ацил-КоА-синтетазой. Существует несколько таких ферментов: один из них катализирует активацию жирных кислот, содержащих 2–3, другой – 4–12, третий – от 12 и более атомов углерода.

Как уже отмечалось, окисление жирных кислот (ацил-КоА) происходит в митохондриях. Переносчиком ацильных групп из цитоплазмы в матрикс митохондрии служит карнитин (γ -триметиламино- β -оксибутират). Ацил-КоА, соединяясь с карнитином, при участии специфического цитоплазматического фермента (карнитин-ацилтрансферазы)¹ образует ацилкарнитин (эфир карнитина и жирной кислоты), который обладает способностью проникать внутрь митохондрии:

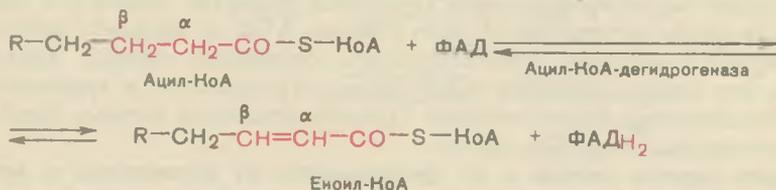


После прохождения ацилкарнитина через мембрану митохондрии происходит обратная реакция – расщепление ацилкарнитина при участии HS-КоА и митохондриальной карнитин-ацилтрансферазы:



При этом карнитин возвращается в цитоплазму клетки, а ацил-КоА подвергается в митохондриях окислению.

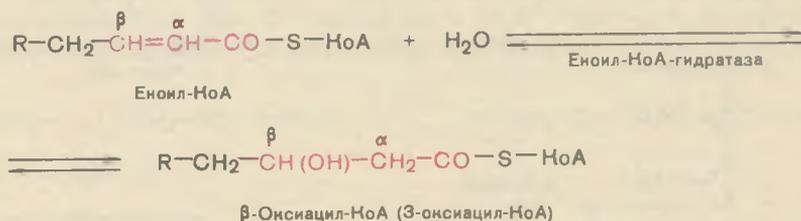
Первая стадия дегидрирования. Ацил-КоА в митохондриях прежде всего подвергается ферментативному дегидрированию; при этом ацил-КоА теряет два атома водорода в α - и β -положении, превращаясь в КоА-эфир ненасыщенной кислоты:



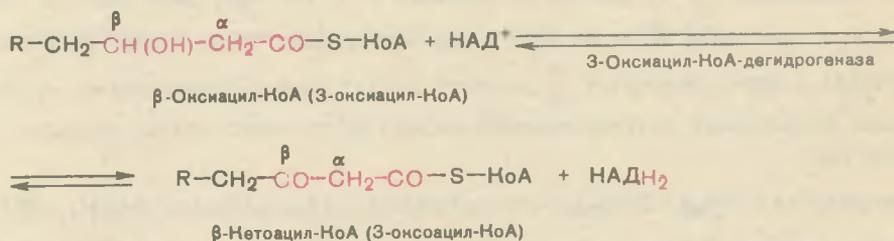
¹ В последние годы показано, что в этом процессе участвуют две ацилтрансферазы; одна из них катализирует ацилирование карнитина жирными кислотами с короткой цепью и называется карнитин-ацетилтрансфераза. Другой фермент катализирует ацилирование карнитина жирными кислотами с длинной цепью углеродных атомов, который получил название карнитин-пальмитоилтрансфераза.

Существует несколько ФАД-содержащих ацил-КоА-дегидрогеназ, каждая из которых обладает специфичностью по отношению к ацил-КоА с определенной длиной углеродной цепи.

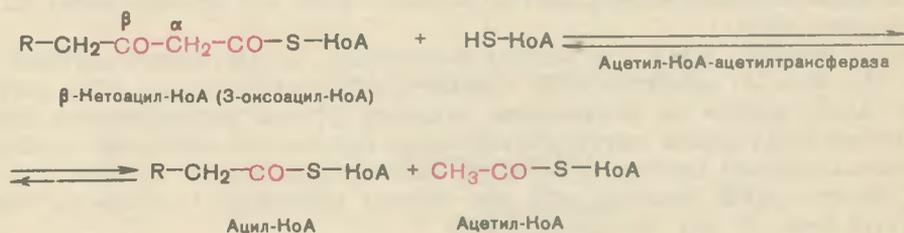
Стадия гидратации. Ненасыщенный ацил-КоА (еноил-КоА) при участии фермента еноил-КоА-гидратазы присоединяет молекулу воды. В результате образуется β-оксиацил-КоА (или 3-оксиацил-КоА):



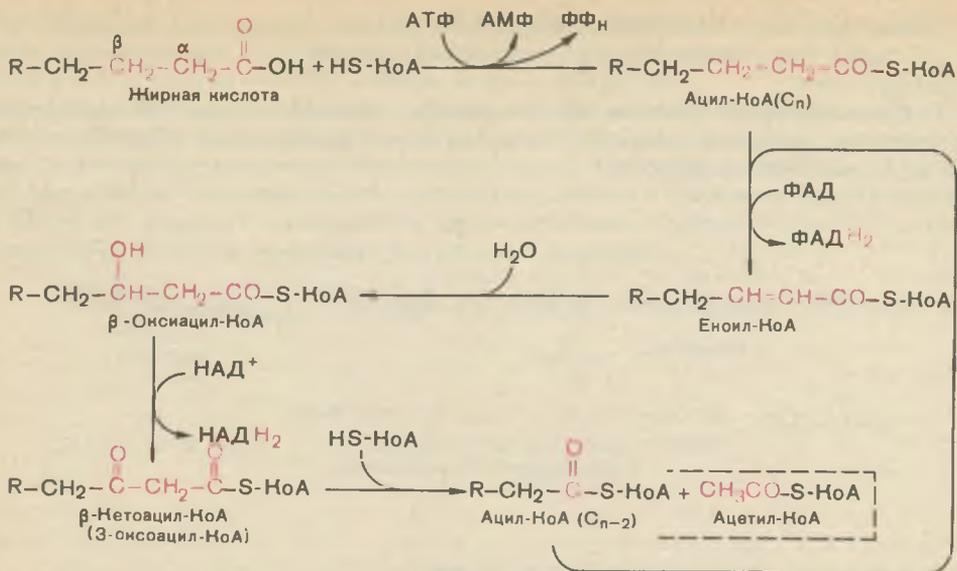
Вторая стадия дегидрирования. Образовавшийся β-оксиацил-КоА затем дегидрируется. Эту реакцию катализируют НАД-зависимые дегидрогеназы:



Тиолазная реакция. β-Кетоацил-КоА взаимодействует с коэнзимом А. В результате происходит расщепление β-кетоацил-КоА и образуется укороченный на два углеродных атома ацил-КоА и двууглеродный фрагмент в виде ацетил-КоА. Данная реакция катализируется ацетил-КоА-ацилтрансферазой (тиолазой):



Образовавшийся ацетил-КоА подвергается окислению в цикле трикарбоновых кислот, а ацил-КоА, укоротившийся на два углеродных атома, снова многократно проходит весь путь β-окисления вплоть до образования бутирил-КоА (4-углеродное соединение), который в свою очередь окисляется до двух молекул ацетил-КоА.



Например, в случае пальмитиновой кислоты (C_{16}) повторяются 7 циклов окисления. Запомним, что при окислении жирной кислоты, содержащей n углеродных атомов, происходит $\frac{n}{2} - 1$ циклов β -окисления (т. е. на один цикл меньше, чем $\frac{n}{2}$, так как при окислении бутирил-КоА сразу происходит образование двух молекул ацетил-КоА) и всего получится $\frac{n}{2}$ молекул ацетил-КоА. Следовательно, суммарное уравнение β -окисления активированной молекулы пальмитиновой кислоты можно написать так:



Баланс энергии. При каждом цикле β -окисления образуются 1 молекула ФАДH_2 и 1 молекула НАДH_2 . Последние в процессе окисления в дыхательной цепи и сопряженного с ним фосфорилирования дают: ФАДH_2 (через КоQ) – 2 молекулы АТФ и НАДH_2 – 3 молекулы АТФ , т. е. в сумме за один цикл образуются 5 молекул АТФ . В случае окисления пальмитиновой кислоты проходит 7 циклов β -окисления, что ведет к образованию $5 \times 7 = 35$ молекул АТФ . В процессе β -окисления пальмитиновой кислоты образуются 8 молекул ацетил-КоА, каждая из которых, сгорая в цикле трикарбонных кислот, дает 12 молекул АТФ , а 8 молекул дадут $12 \times 8 = 96$ молекул АТФ .

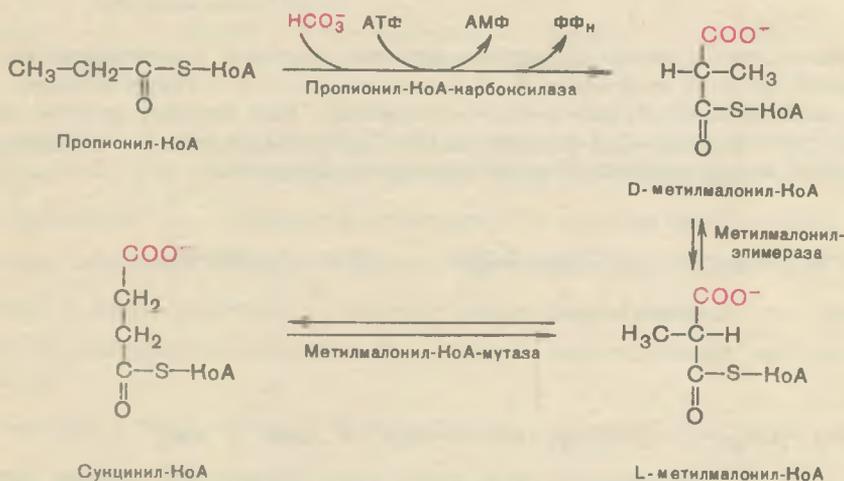
Таким образом, всего при полном β -окислении пальмитиновой кислоты образуется $35 + 96 = 131$ молекула АТФ . Однако с учетом 1 молекулы АТФ , потраченной в самом начале на образование активной формы пальмитиновой кислоты (пальмитоил-КоА), общий энергетический выход при полном окислении одной молекулы пальмитиновой кислоты в условиях животного организма составит $131 - 1 = 130$ молекул АТФ (заметим, что при полном окислении 1 молекулы глюкозы образуется лишь 38 или 36 молекул АТФ).

Подсчитано, что изменение свободной энергии системы (ΔG) при полном сгорании 1 молекулы пальмитиновой кислоты составляет 9797 кДж, а богатая энергией конечная фосфатная связь АТФ характеризуется величиной около 34,5 кДж, то примерно 45% всей потенциальной энергии пальмитиновой кислоты при ее окислении в организме может быть использовано для синтеза АТФ , а оставшаяся часть, по-видимому, рассеивается в виде теплоты.

Окисление жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов

Как уже отмечалось, основная масса природных липидов содержит жирные кислоты с четным числом углеродных атомов. Однако в липидах многих растений и некоторых морских организмов присутствуют жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода. Кроме того, у жвачных животных при переваривании углеводов в рубце образуется большое количество пропионовой кислоты, которая содержит три углеродных атома. Пропионат всасывается в кровь и окисляется в печени и других тканях.

Заметим, что жирные кислоты с длинной цепью, содержащей нечетное число углеродных атомов при β -окислении, в конечном итоге образуют ацетил-КоА и молекулу пропионил-КоА. Получившийся пропионил-КоА превращается в сукцинил-КоА — метаболит цикла Кребса:



Метаболизм кетоновых тел

Под термином «кетоновые (ацетоновые) тела» подразумевают ацетоуксусную кислоту (ацетоацетат) ($\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COOH}$), β -оксимасляную кислоту (β -оксибутират) ($\text{CH}_3\text{CH(OH)CH}_2\text{COOH}$) и ацетон (CH_3COCH_3).

Ацетон в крови в норме присутствует в крайне низких концентрациях, образуется в результате спонтанного декарбоксилирования ацетоуксусной кислоты и, по-видимому, не имеет определенного физиологического значения.

Кетоновые тела образуются в печени. Прежние представления о том, что кетоновые тела являются промежуточными продуктами β -окисления жирных кислот, оказались ошибочными. Во-первых, в обычных условиях промежуточными продуктами β -окисления жирных кислот являются КоА-эфиры этих кислот: β -оксипропионил-КоА или ацетоацетил-КоА. Во-вторых, β -оксипропионил-КоА, образующийся в печени при β -окислении жирных кислот, имеет L-конфигурацию, в то время как β -оксипропионат, обнаруживаемый в крови, представляет собой D-изомер. Именно β -оксипропионат D-конфигурации образуется в ходе метаболического пути синтеза β -окси- β -метилглутарил-КоА.

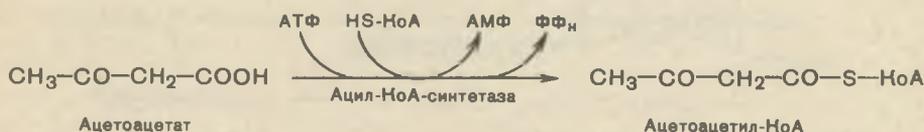
Таким образом, было установлено, что кетоновые тела синтезируются в печени из ацетил-КоА (см. схему).

голодании, а также у животных с экспериментальным острым аллоксановым диабетом) концентрация кетоновых тел в крови увеличивается и может достигать 20 ммоль/л. Такое состояние, которое получило название кетонемии, возникает в тех случаях, когда скорость образования кетоновых тел превышает способность периферических тканей их утилизировать.

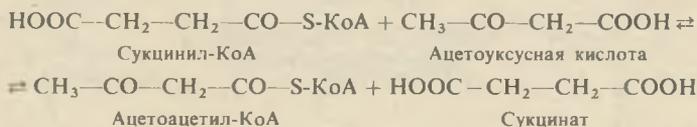
В последние годы начали накапливаться данные, указывающие на важную роль кетоновых тел в поддержании энергетического баланса. Кетоновые тела – своего рода поставщики топлива для мышц, почек и действуют, возможно, как часть регуляторного механизма с обратной связью, предотвращая чрезвычайную мобилизацию жирных кислот из жировых депо. Печень в этом смысле является исключением, она не использует кетоновые тела в качестве энергетического материала.

В периферических тканях β-оксималая кислота окисляется до ацетоуксусной кислоты, а последняя активируется с образованием соответствующего КоА-эфира (ацетоацетил-КоА).

Существуют два ферментативных механизма активации ацетоуксусной кислоты. Первый путь – это использование АТФ и HS-КоА аналогично тому, как при активации жирных кислот:

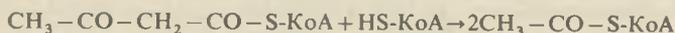


Второй путь активации – это перенос КоА от сукцинил-КоА на ацетоуксусную кислоту.



Данная реакция катализируется ферментом 3-кетоацил-КоА-трансферазой. Возможно, что биологически более важным является именно этот путь активации ацетоацетата.

Образовавшийся в ходе этих реакций ацетоацетил-КоА подвергается далее тиолитическому расщеплению в митохондриях с образованием двух молекул ацетил-КоА, который окисляется затем в цикле трикарбоновых кислот до CO₂ и H₂O.



Биосинтез липидов

Способность животных и человека запасать полисахариды довольно ограничена, поэтому глюкоза, получаемая в количествах, превышающих непосредственные энергетические потребности и «запасующую емкость» организма, может служить «строительным материалом» для синтеза жирных кислот и глицерина. Последние в свою очередь превращаются в триглицериды, которые откладываются в жировых тканях.

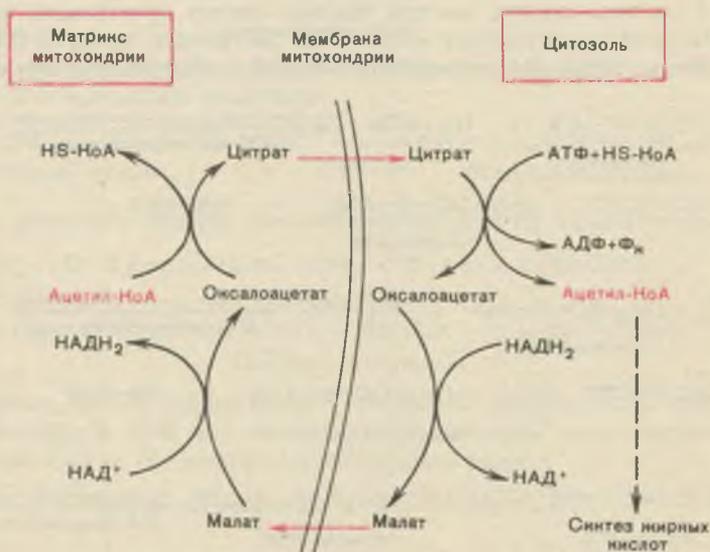
Важным процессом является также биосинтез холестерина и других стероидов. Хотя в количественном отношении путь синтеза холестерина не столь важен, однако он имеет большое значение в связи с тем, что из холестерина в организме образуются многочисленные биологически активные стероиды.

Синтез высших жирных кислот в организме

В настоящее время в достаточной степени изучен механизм биосинтеза жирных кислот в организме животных и человека, а также катализирующие этот процесс ферментные системы. Синтез жирных кислот в тканях протекает в цитоплазме клетки. В митохондриях же в основном происходит удлинение существующих цепей жирных кислот¹. Например, установлено, что в цитоплазме печеночных клеток синтезируется главным образом пальмитиновая кислота, а в митохондриях печеночных клеток из уже синтезированной в цитоплазме клетки пальмитиновой кислоты или из жирных кислот экзогенного происхождения, т. е. поступивших из кишечника, образуются жирные кислоты, содержащие 18, 20 и 22 углеродных атома. При этом реакции синтеза жирных кислот в митохондриях по существу являются обратными реакциями процесса β -окисления жирных кислот.

Внемитохондриальный же синтез (основной, главный) жирных кислот по своему механизму резко отличается от процесса их окисления. Строительным блоком для синтеза жирных кислот в цитоплазме клетки служит ацетил-КоА, который в основном поступает из митохондрий. Кроме того, было выявлено, что цитрат стимулирует синтез жирных кислот в цитоплазме клетки. Известно, что образующийся в митохондриях в процессе окислительного декарбоксилирования пирувата и окисления жирных кислот ацетил-КоА не может диффундировать в цитоплазму клетки, так как митохондриальная мембрана непроницаема для данного субстрата. Поэтому вначале внутримитохондриальный ацетил-КоА взаимодействует с оксалоацетатом, в результате образуется цитрат. Реакция катализируется ферментом цитрат-синтазой. Образовавшийся цитрат переносится через внутреннюю мембрану митохондрии в цитозоль при помощи специальной трикарбоксилат-транспортирующей системы.

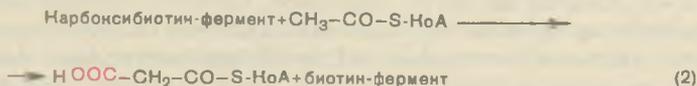
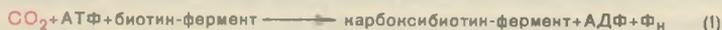
В цитозоле цитрат реагирует с HS-КоА и АТФ, вновь распадаясь на ацетил-КоА и оксалоацетат. Эта реакция катализируется АТФ-цитрат-лиазой. Уже в цитозоле оксалоацетат при участии цитозольной малатдегидрогеназы восстанавливается до малата. Последний при помощи дикарбоксилат-транспортирующей системы возвращается в митохондриальный матрикс, где окисляется до оксалоацетата, завершая тем самым так называемый челночный цикл:



¹ Опыты *in vitro* показали, что изолированные митохондрии обладают ничтожной способностью включать меченую уксусную кислоту в жирные кислоты с длинной цепью.

Существует еще один путь переноса внутримитохондриального ацетил-КоА в цитоплазму клетки — с участием карнитина. Выше указывалось, что карнитин играет роль переносчика ацильных групп из цитоплазмы в митохондрии при окислении жирных кислот. По-видимому, он может выполнять эту роль и в обратном процессе, т. е. в переносе ацильных радикалов, в том числе ацетильного радикала, из митохондрий в цитоплазму клетки. Однако, когда речь идет о синтезе жирных кислот, данный путь переноса ацетил-КоА не является главным.

Важнейшим шагом в понимании процесса синтеза жирных кислот было открытие фермента ацетил-КоА-карбоксилазы. Этот сложный фермент, содержащий в качестве простетической группы биотин, катализирует АТФ-зависимый синтез малонил-КоА ($\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{S-CoA}$) из ацетил-КоА и CO_2 . Реакция протекает в два этапа:



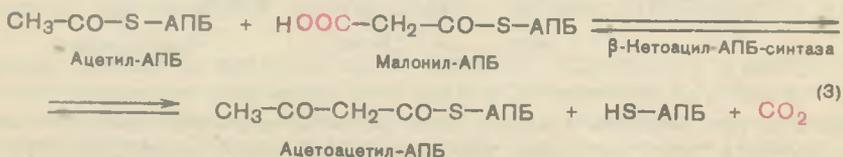
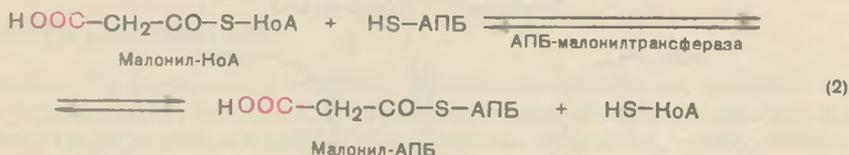
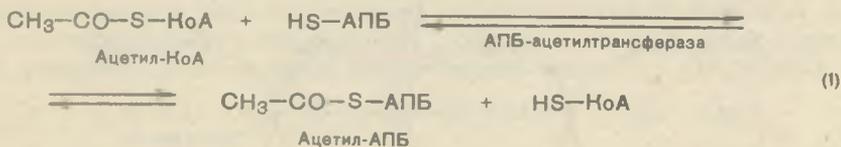
Малонил-КоА

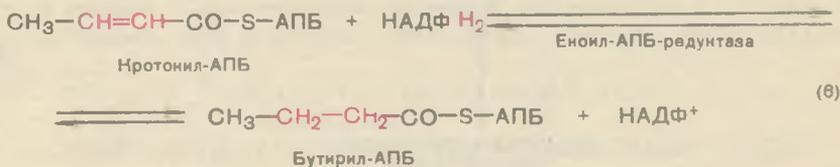
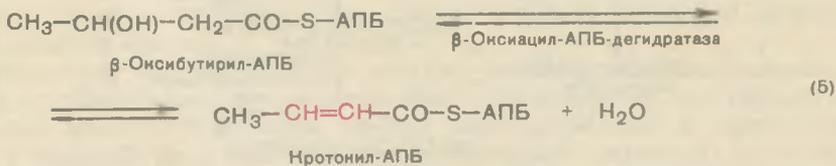
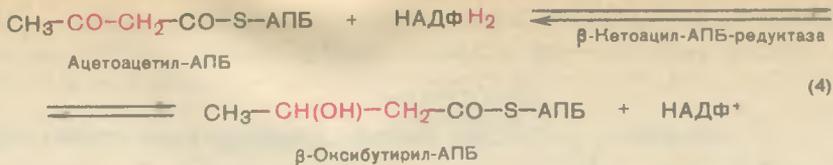
Установлено, что функцию аллостерического активатора ацетил-КоА-карбоксилазной реакции выполняет цитрат.

Малонил-КоА представляет собой первый специфический продукт биосинтеза жирных кислот. В присутствии соответствующей ферментной системы малонил-КоА быстро превращается в жирные кислоты.

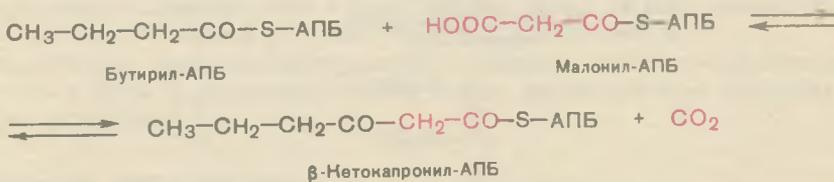
Ферментная система, синтезирующая высшие жирные кислоты, состоит из нескольких ферментов, определенным образом связанных между собой. Процесс синтеза жирных кислот вначале был детально изучен на *E. coli* и некоторых других микроорганизмах, в общих чертах он сходен с таковым у высших организмов. Мультиферментный комплекс, именуемый синтетазой (или синтазой) жирных кислот, состоит из шести ферментов, связанных с так называемым ацилпереносящим белком (АПБ). Этот белок относительно термостабилен, имеет 2 свободные HS-группы (цистеина и фосфопантетеинового остатка, присоединенного к OH-группе серина) и вовлекается в процесс синтеза высших жирных кислот практически на всех его этапах. Относительная молекулярная масса АПБ составляет около 10 000 Да.

Ниже приводится последовательность реакций, происходящих при синтезе жирных кислот:

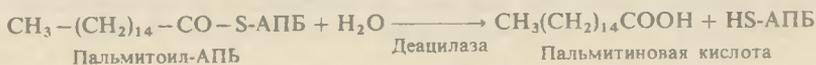




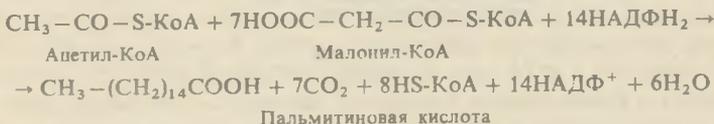
Далее цикл реакций повторяется. Допустим, что идет синтез пальмитиновой кислоты (C₁₆); в этом случае образованием бутирил-АПБ завершается лишь первый из семи циклов, в каждом из которых началом является присоединение молекулы малонил-АПБ к карбоксильному концу растущей цепи жирной кислоты. При этом отщепляется дистальная карбоксильная группа малонил-АПБ в виде CO₂. Например, образовавшийся в первом цикле бутирил-АПБ взаимодействует с малонил-АПБ:



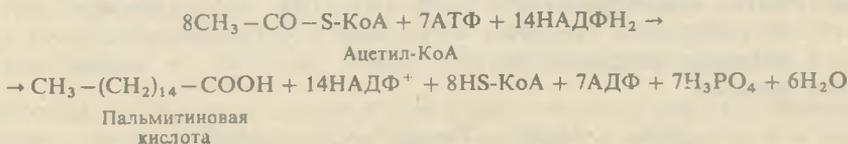
Завершается синтез жирной кислоты отщеплением HS-АПБ от ацил-АПБ под влиянием фермента деацилазы, например:



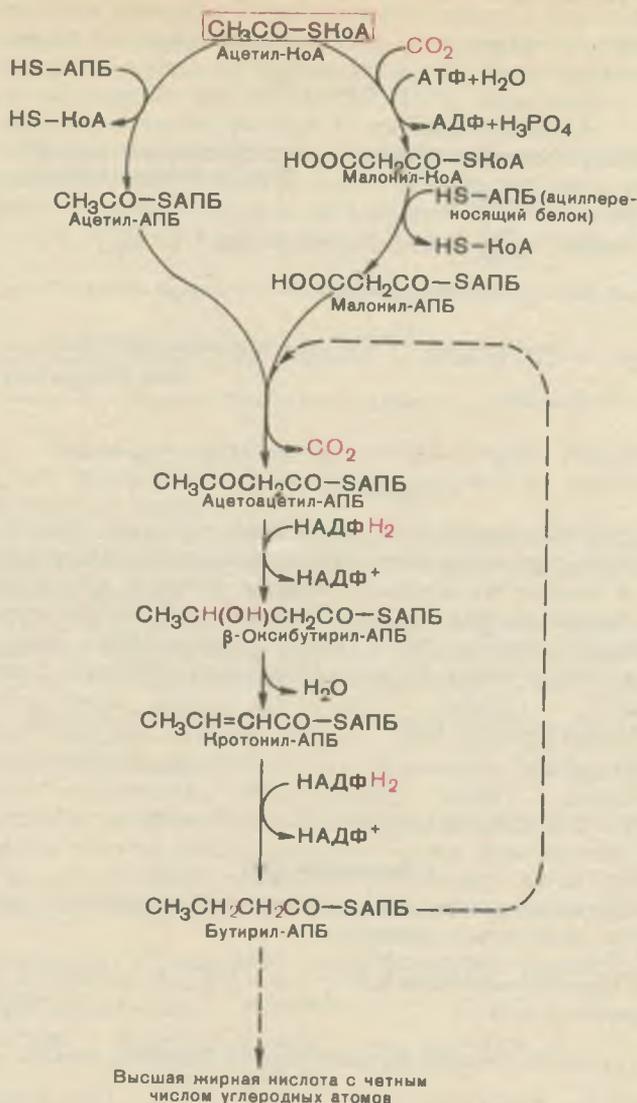
Суммарное уравнение синтеза пальмитиновой кислоты можно написать так:



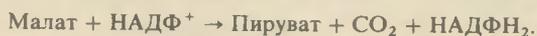
Или, учитывая, что на образование 1 молекулы малонил-КоА из ацетил-КоА расходуется 1 молекула АТФ и 1 молекула CO₂, которая затем отщепляется, суммарное уравнение можно представить в следующем виде:



Основные этапы биосинтеза жирных кислот можно представить в виде схемы:



По сравнению с β -окислением биосинтез жирных кислот имеет ряд характерных особенностей: синтез жирных кислот в основном осуществляется в цитоплазме клетки, а окисление — в митохондриях; участие в процессе биосинтеза жирных кислот малонил-КоА, который образуется путем связывания CO_2 (в присутствии биотин-фермента и АТФ) с ацетил-КоА; на всех этапах синтеза жирных кислот принимает участие ацилпереносящий белок (HS-АПБ); необходимость для синтеза жирных кислот кофермента НАДФН_2 . Последний в организме образуется частично (на 50%) в реакциях пентозофосфатного цикла, частично — в других реакциях, в частности в реакции:



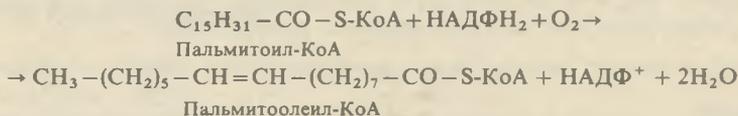
В процессе синтеза жирных кислот образуются оксипроизводные, относящиеся по своей конфигурации к D-ряду жирных кислот, а при окислении жирных кислот — оксипроизводные L-ряда.

Образование ненасыщенных жирных кислот

В тканях млекопитающих присутствуют ненасыщенные жирные кислоты, различающиеся длиной алифатической цепи между концевой метильной группой и ближайшей двойной связью.

Установлено, что две наиболее распространенные мононенасыщенные жирные кислоты — пальмитоолеиновая и олеиновая — синтезируются из пальмитиновой и стеариновой кислот. Образование двойной связи происходит в микросомах клеток печени и жировой ткани при участии специфической оксигеназы и молекулярного кислорода.

В этой реакции одна молекула кислорода используется в качестве акцептора двух пар электронов, одна из которых принадлежит субстрату (Ацил-КоА), а другая — НАДФН₂:



Вместе с тем ткани человека и ряда животных, как уже указывалось, неспособны синтезировать линолеовую и линоленовую кислоты, а должны получать их с пищей (синтез этих кислот осуществляется растениями).

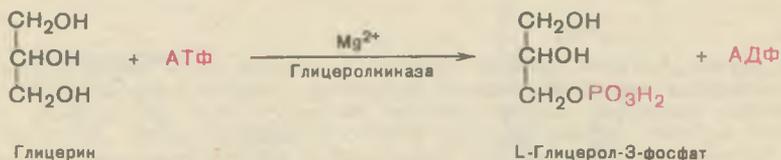
Все другие полиненасыщенные кислоты, обнаруженные у млекопитающих, образуются из четырех предшественников (пальмитоолеиновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот) путем дальнейшего удлинения цепи и (или) введения новых двойных связей. Этот процесс протекает при участии митохондриальных и микросомных ферментов.

Биологическая роль полиненасыщенных жирных кислот в значительной мере прояснилась в связи с открытием нового класса физиологически активных соединений — простагландинов (см. главу 6).

Биосинтез триглицеридов

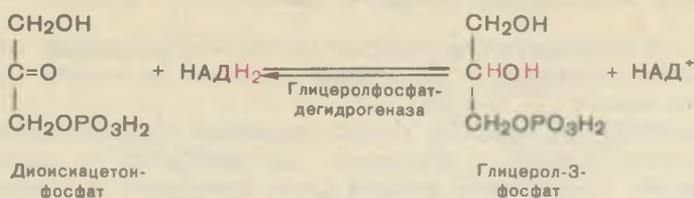
Скорость биосинтеза жирных кислот во многом определяется скоростью образования триглицеридов и фосфолипидов, так как свободные жирные кислоты присутствуют в тканях и плазме крови в небольших количествах и в норме не накапливаются.

Синтез триглицеридов происходит из глицерина и жирных кислот (главным образом стеариновой, пальмитиновой и олеиновой). Путь биосинтеза триглицеридов в тканях протекает через образование глицерол-3-фосфата как промежуточного соединения. В почках, а также в стенке кишечника, где активность фермента глицеролкиназы высока, глицерин фосфорилируется за счет АТФ с образованием глицерол-3-фосфата:

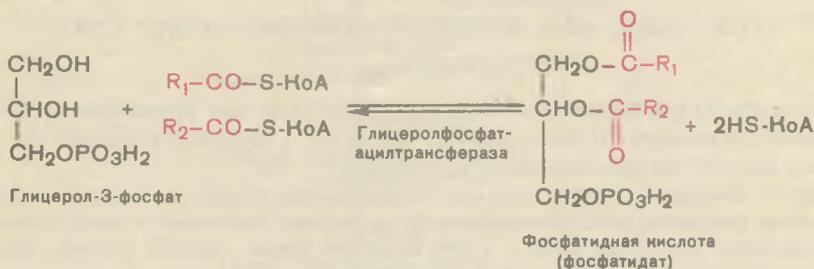


В жировой ткани и мышцах вследствие очень низкой активности глицеролкиназы образование глицерол-3-фосфата в основном связано с гликолизом или гликогено-

лизом¹. Известно, что в процессе гликолитического распада глюкозы образуется диоксиацетонфосфат (см. главу 9). Последний в присутствии цитоплазматической НАД-зависимой глицеролфосфатдегидрогеназы способен превращаться в глицерол-3-фосфат:

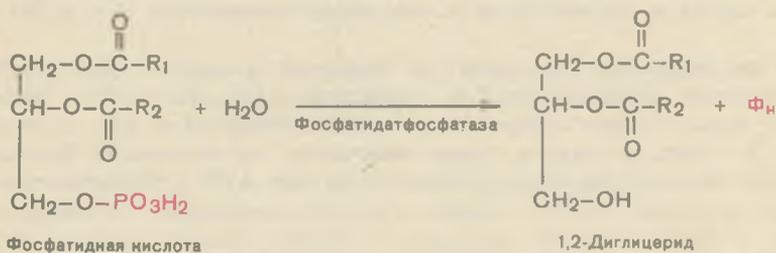


В печени наблюдаются оба пути образования глицерол-3-фосфата. Образовавшийся тем или иным путем глицерол-3-фосфат ацилируется двумя молекулами КоА-производного жирной кислоты (т. е. «активными» формами жирной кислоты)². В результате образуется фосфатидная кислота (фосфатидат):



Фосфатидная кислота присутствует в клетках в чрезвычайно малых количествах, однако она является весьма важным промежуточным продуктом, общим для биосинтеза триглицеридов и фосфоглицеридов.

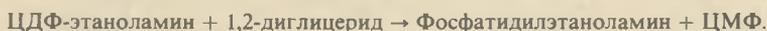
В ходе синтеза триглицеридов происходит дефосфорилирование фосфатидной кислоты с помощью специфической фосфатазы (фосфатидатфосфатазы) и образование 1,2-диглицерида:



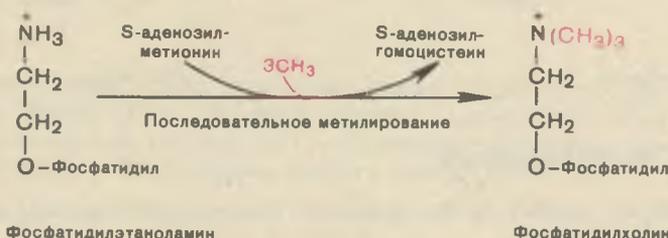
¹ В тех случаях, когда содержание глюкозы в жировой ткани понижено (например, при голодании), образуется лишь незначительное количество глицерол-3-фосфата и освободившиеся в ходе липолиза свободные жирные кислоты не могут быть использованы на ресинтез триглицеридов, поэтому жирные кислоты покидают жировую ткань. Напротив, активация гликолиза в жировой ткани способствует накоплению в ней триглицеридов, а также входящих в их состав жирных кислот.

² У некоторых микроорганизмов, например у *E. coli*, донором ацильной группы являются не КоА-производные, а АПБ-производные жирной кислоты.

В следующей реакции ЦДФ-этаноламин, взаимодействуя с 1,2-диглицеридом, образующимся при дефосфорилировании фосфатидной кислоты, превращается в фосфатидилэтаноламин, реакция катализируется ферментом этаноламинфосфотрансферазой:



Биосинтез фосфатидилхолина (лецитина). Фосфатидилэтаноламин является предшественником фосфатидилхолина. В результате последовательного переноса трех метильных групп от трех молекул S-аденозилметионина (донора метильных групп, см. главу 11) к аминогруппе остатка этаноламина образуется фосфатидилхолин:



Существует еще один путь синтеза фосфатидилхолина в клетках животных. В этом случае, как и при синтезе фосфатидилэтаноламина, используется ЦТФ в качестве переносчика, но уже не фосфозаноламина, а фосфохолина.

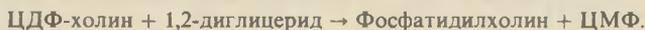
На первом этапе синтеза свободный холин активируется под действием холинкиназы с образованием фосфохолина:



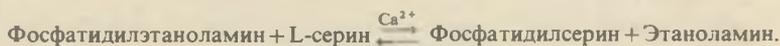
Затем фосфохолин реагирует с ЦТФ, образуя цитидиндифосфатхолин (ЦДФ-холин):



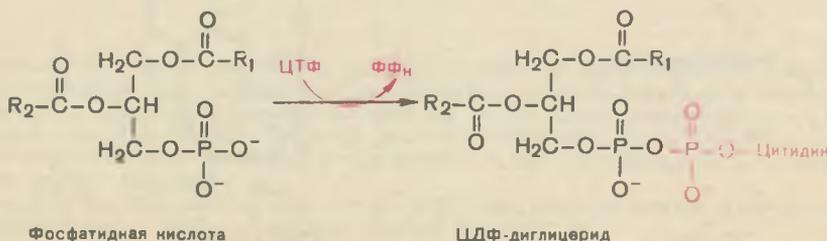
В дальнейшем ЦДФ-холин взаимодействует с 1,2-диглицеридом, в результате образуется фосфатидилхолин:



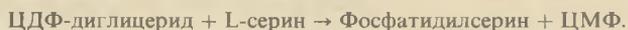
Биосинтез фосфатидилсерина. У млекопитающих фосфатидилсерин образуется в реакции обмена этаноламина на серин следующим путем:



Существует и второй путь образования фосфатидилсерина, который связан с предварительным вовлечением фосфатидной кислоты в синтез фосфоглицеридов:



Затем происходит перенос серина на фосфатидильный остаток с образованием фосфатидилсерина¹:



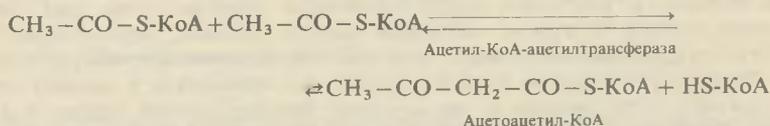
Заметим, что таким же путем происходит образование фосфатидилинозитола.

Биосинтез холестерина

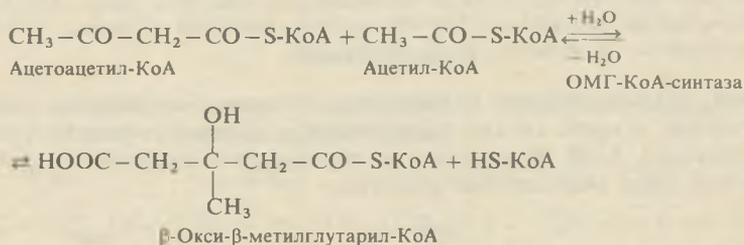
В 40–60-х годах нашего столетия К. Блох и сотр. в опытах с использованием ацетата, меченного ¹⁴C по метильной и карбоксильной группе, показали, что оба атома углерода уксусной кислоты включаются в холестерин печени приблизительно в одинаковых количествах. Кроме того, было доказано, что все атомы углерода холестерина происходят из ацетата.

В дальнейшем благодаря работам Ф. Линена, Г. Попьяка, Дж. Корнфорта, А. Н. Климова и других исследователей были выяснены основные детали ферментативного синтеза холестерина, насчитывающего более 35 энзиматических реакций. В синтезе холестерина можно выделить три основные стадии: первая – превращение активного ацетата в мевалоновую кислоту, вторая – образование сквалена из мевалоновой кислоты, третья – циклизация сквалена в холестерин.

Рассмотрим стадию превращения активного ацетата в мевалоновую кислоту. Начальным этапом синтеза мевалоновой кислоты из ацетил-КоА является образование ацетоацетил-КоА посредством обратимой тиолазной реакции:

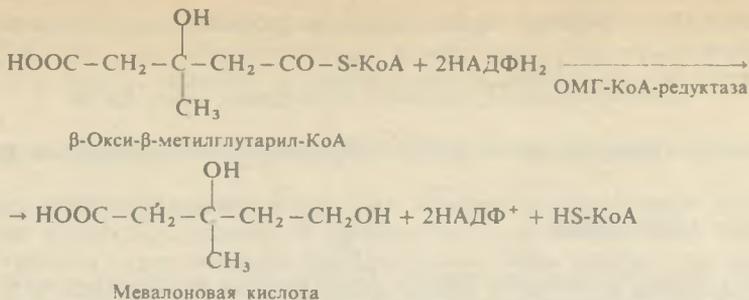


Затем при последующей конденсации ацетоацетил-КоА с третьей молекулой ацетил-КоА при участии оксиметилглутарил-КоА-синтазы (ОМГ-КоА-синтазы) образуется β-окси-β-метилглутарил-КоА:²



Далее β-окси-β-метилглутарил-КоА под действием регуляторного фермента НАДФ-зависимой оксиметилглутарил-КоА-редуктазы (ОМГ-КоА-редуктазы) в результате восстановления одной из карбоксильных групп и отщепления HS-CoA превращается в мевалоновую кислоту:

¹ Фосфатидилсерин может декарбоксилироваться с образованием фосфатидилэтаноламина.
² Первые этапы синтеза мевалоновой кислоты уже рассматривались, когда речь шла об образовании кетоновых тел.

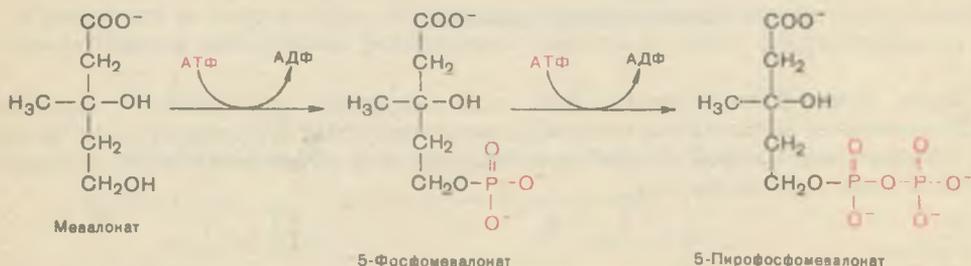


ОМГ-КоА-редуктазная реакция — первая практически необратимая реакция в цепи биосинтеза холестерина и протекает она со значительной потерей свободной энергии (около 33,6 кДж). Установлено, что данная реакция лимитирует скорость биосинтеза холестерина

Наряду с классическим путем биосинтеза мевалоновой кислоты имеется второй путь, в котором в качестве промежуточного субстрата, по-видимому, образуется не β -окси- β -метилглутарил-КоА, а β -окси- β -метилглутарил-S-АПБ. Реакции этого пути идентичны начальным стадиям биосинтеза жирных кислот вплоть до образования ацетоацетил-S-АПБ. В образовании мевалоновой кислоты по этому пути принимает участие ацетил-КоА-карбоксилаза — фермент, осуществляющий превращение ацетил-КоА в малонил-КоА. Оптимальное соотношение малонил-КоА и ацетил-КоА для синтеза мевалоновой кислоты: 2 молекулы ацетил-КоА на 1 молекулу малонил-КоА.

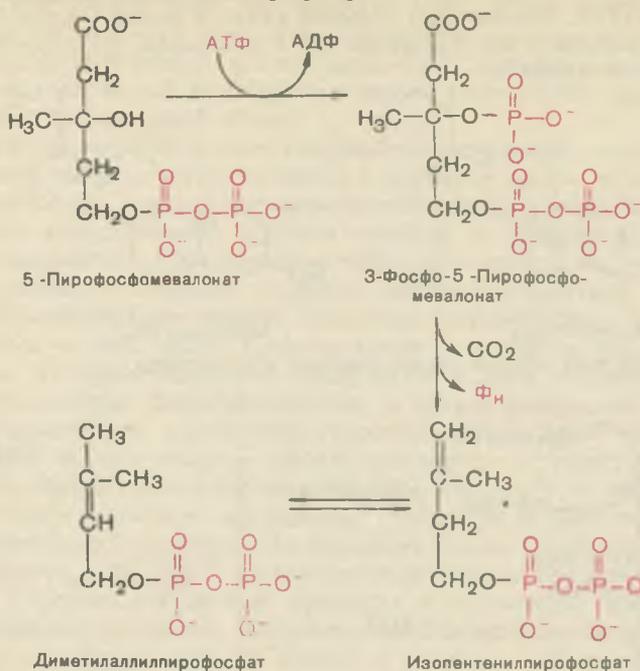
Участие малонил-КоА, основного субстрата биосинтеза жирных кислот, в образовании мевалоновой кислоты и различных полиизопреноидов показано для ряда биологических объектов: печени голубя и крысы, молочной железы кролика, бесклеточных дрожжевых экстрактов. Этот путь биосинтеза мевалоновой кислоты отмечается преимущественно в цитозоле клеток печени. Существенную роль в образовании мевалоната в данном случае играет ОМГ-КоА-редуктаза, обнаруженная в растворимой фракции печени крысы и неидентичная микросомному ферменту по ряду кинетических и регуляторных свойств. Регуляция второго пути биосинтеза мевалоновой кислоты при ряде воздействий (голодание, кормление холестерином, введение поверхностно-активного вещества — тритона WR-1339) отличается от регуляции первого пути, в котором принимает участие микросомная редуктаза. Эти данные свидетельствуют о существовании двух автономных систем биосинтеза мевалоновой кислоты. Физиологическая роль второго пути окончательно не изучена. Полагают, что он имеет определенное значение не только для синтеза веществ нестероидной природы, таких как боковая цепь убихинона и уникального основания N^6 -(Δ^2 -изопентил)-аденозина некоторых тРНК, но и для биосинтеза стероидов (А. Н. Климов, Э. Д. Полякова).

На второй стадии синтеза холестерина мевалоновая кислота превращается в сквален. Реакции второй стадии начинаются с фосфорилирования мевалоновой кислоты с помощью АТФ. В результате образуется 5-фосфорный эфир, а затем 5-пирофосфорный эфир мевалоновой кислоты:

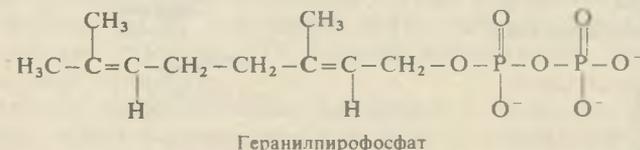


5-пирофосфомевалоновая кислота в результате последующего фосфорилирования третичной гидроксильной группы образует нестабильный промежуточный про-

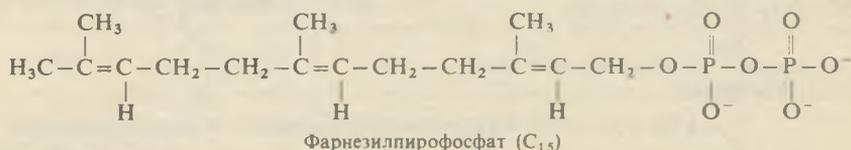
дукт — 3-фосфо-5-пирофосфомевалоновую кислоту, которая, декарбоксилируясь и теряя остаток фосфорной кислоты, превращается в изопентенилпирофосфат. Последний изомеризуется в диметилаллилпирофосфат:



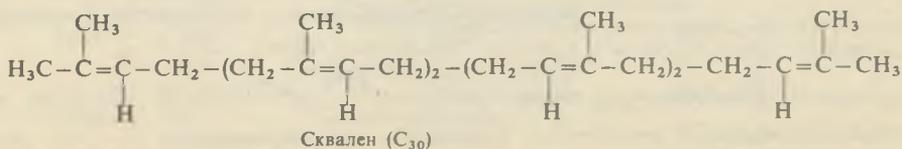
Затем оба изомерных изопентенилпирофосфата (диметилаллилпирофосфат и изопентенилпирофосфат) конденсируются с высвобождением пирофосфата и образованием геранилпирофосфата:



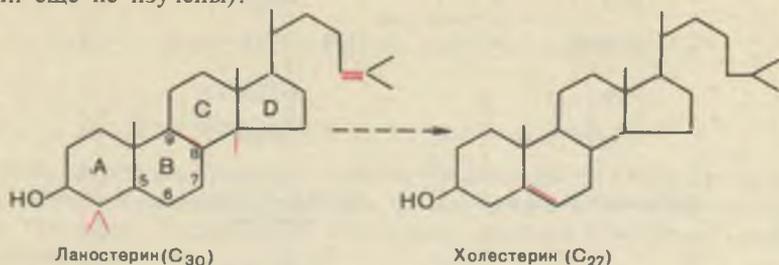
К геранилпирофосфату вновь присоединяется изопентенилпирофосфат, образуя в результате этой реакции фарнезилпирофосфат:



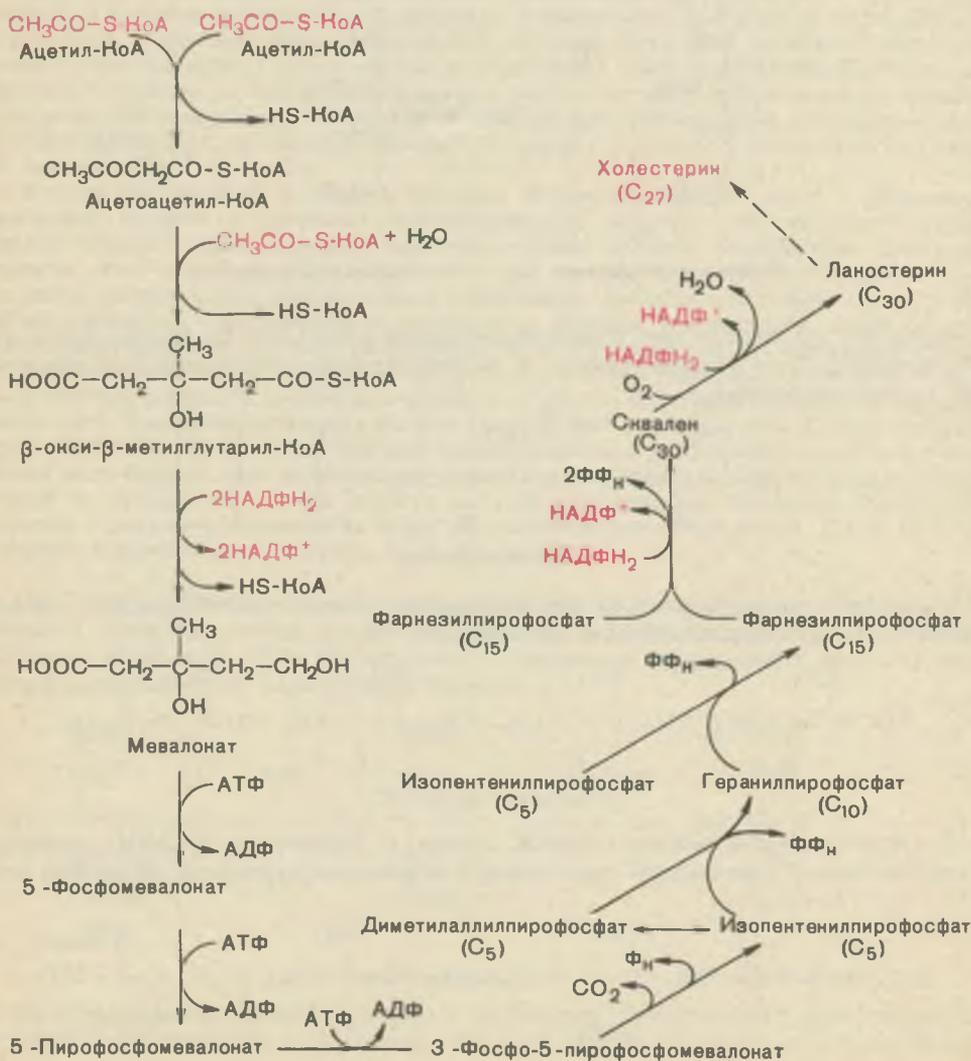
В заключительной реакции данной стадии в результате НАДФН₂-зависимой восстановительной конденсации двух молекул фарнезилпирофосфата образуется сквален:



На третьей стадии биосинтеза холестерина сквален под влиянием скваленоксида-циклазы циклизуется с образованием ланостерина. Дальнейший процесс превращения ланостерина в холестерин включает ряд реакций, сопровождающихся удалением трех метильных групп, насыщением двойной связи в боковой цепи и перемещением двойной связи в кольце В из положения 8,9 в положение 5,6 (детально эти последние реакции еще не изучены):



Ниже представлена общая схема синтеза холестерина:



Регуляция липидного обмена

Обмен липидов прежде всего регулируется ЦНС. Кора мозга оказывает трофическое влияние на жировую ткань либо через нижележащие отделы ЦНС — симпатическую и парасимпатическую системы, либо через эндокринные железы. В настоящее время установлен целый ряд биохимических механизмов, лежащих в основе действия гормонов на липидный обмен.

Известно, что длительный отрицательный эмоциональный стресс, сопровождающийся увеличением выброса катехоламинов в кровяное русло, может вызывать заметное похудание. Здесь уместно напомнить, что жировая ткань обильно иннервируется волокнами симпатической нервной системы и возбуждение этих волокон сопровождается выделением норадреналина непосредственно в жировую ткань. Адреналин и норадреналин увеличивают скорость липолиза в жировой ткани; в результате усиливается мобилизация жирных кислот из жировых депо и содержание неэтерифицированных жирных кислот в плазме крови повышается. Как уже отмечалось, тканевые липазы (триглицеридлипаза) существуют в двух взаимопревращающихся формах, одна из которых фосфорилирована и каталитически активна, тогда как другая — нефосфорилирована и неактивна. Адреналин стимулирует через аденилатциклазу синтез цАМФ. В свою очередь цАМФ активирует соответствующую протеинциклазу, которая способствует фосфорилированию липазы, т. е. образованию ее активной формы. Следует заметить, что действие глюкагона на липолитическую систему сходно с действием катехоламинов. Не подлежит также сомнению, что секрет передней доли гипофиза, в частности соматотропный гормон, оказывает влияние на липидный обмен. Гипофункция железы приводит к отложению жира в организме, наступает гипофизарное ожирение. Напротив, повышенная продукция СТГ стимулирует липолиз, и содержание жирных кислот в плазме крови увеличивается. Доказано, что стимуляция липолиза СТГ блокируется ингибиторами синтеза мРНК. Кроме того, известно, что действие СТГ на липолиз характеризуется наличием лаг-фазы продолжительностью около часа, тогда как адреналин стимулирует липолиз почти мгновенно. Иными словами, можно считать, что первичное действие этих двух типов гормонов на липолиз проявляется различными путями. Адреналин стимулирует активность аденилатциклазы, а СТГ индуцирует синтез данного фермента. Конкретный механизм, с помощью которого СТГ гормон избирательно увеличивает синтез аденилатциклазы, пока неизвестен.

Инсулин оказывает противоположное адреналину и глюкагону действие на липолиз и мобилизацию жирных кислот. Недавно было показано, что инсулин стимули-

Таблица 10.2. Влияние некоторых факторов на мобилизацию жирных кислот из жировой ткани [по А. Н. Климову и др., 1978]

Фактор	Характер влияния	Предполагаемый механизм действия
Катехоламины, глюкагон, тироксин, глюкокортикоиды СТГ, АКТГ	Усиление	Активация аденилатциклазы
Простагландины	Угнетение	Усиление синтеза аденилатциклазы и гормоночувствительной липазы Ослабление действия катехоламинов на аденилатциклазу, угнетение аденилатциклазы
Инсулин	Угнетение	Торможение освобождения жирных кислот в результате активации гликолиза в жировой ткани; активация фосфоэстеразы цАМФ
Стресс, физическая нагрузка, голодание, охлаждение	Усиление	Стимуляция секреции катехоламинов и угнетение секреции инсулина

рует фосфодиэстеразную активность в жировой ткани. Поскольку фосфодиэстераза играет важную роль в поддержании стационарного уровня цАМФ в тканях, увеличение содержания инсулина должно вызывать повышение активности фосфодиэстеразы, что в свою очередь приводит к уменьшению концентрации цАМФ в клетке, а следовательно, и образованию активной формы липазы.

Несомненно, что и другие гормоны, в частности тироксин, половые гормоны, также оказывают влияние на липидный обмен. Например, известно, что удаление половых желез (кастрация) вызывает у животных избыточное отложение жира. Однако сведения, которыми мы располагаем, не дают пока основания с уверенностью говорить о конкретном механизме их действия на обмен липидов. В табл. 10.2 приведены сводные данные о влиянии ряда факторов на мобилизацию жирных кислот из жировых депо.

Нарушения липидного обмена

Нарушение процессов всасывания жиров. Нарушения липидного обмена могут наступать уже в процессе переваривания и всасывания жиров. Одна группа расстройств связана с недостаточным поступлением панкреатической липазы в кишечник, вторая группа — обусловлена нарушением поступления в кишечник желчи. Кроме того, нарушения процессов переваривания и всасывания липидов могут быть связаны с заболеваниями желудочно-кишечного тракта (при энтеритах, гиповитаминозах и некоторых других патологических состояниях). Образовавшиеся в полости кишечника моноглицериды и жирные кислоты не могут нормально всасываться из-за повреждения эпителиального покрова кишечника. Во всех этих случаях кал содержит много нерасщепленного жира или невсосавшихся высших жирных кислот и имеет характерный серовато-белый цвет.

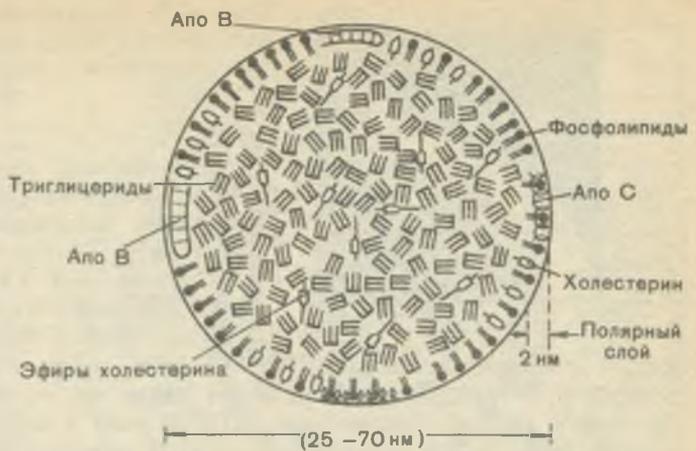
Нарушение процессов перехода жира из крови в ткани. При недостаточной активности липопротеинлипазы крови нарушается переход жирных кислот из хиломикрон (ХМ) плазмы крови в жировые депо (не расщепляются триглицериды). Чаще это наследственное заболевание, связанное с полным отсутствием активности липопротеинлипазы. Плазма крови при этом имеет молочный цвет из-за чрезвычайно высокого содержания ХМ. Наиболее эффективным лечением этого заболевания является замена природных жиров, содержащих жирные кислоты с 16—18 углеродными атомами, на синтетические, в состав которых входят короткоцепочечные жирные кислоты с 8—10 углеродными атомами. Эти жирные кислоты способны всасываться из кишечника непосредственно в кровь без предварительного образования ХМ.

Кетонемия и кетонурия. В крови здорового человека кетоновые (ацетоновые) тела содержатся лишь в очень небольших концентрациях. Однако при голодании, а также у лиц с тяжелой формой сахарного диабета, как уже указывалось, содержание кетоновых тел в крови может повышаться до 20 ммоль/л. Это состояние носит название кетонемии; оно обычно сопровождается резким увеличением содержания кетоновых тел в моче (кетонурия). Например, если в норме за сутки с мочой выводится около 40 мг кетоновых тел, то при сахарном диабете содержание их в суточной порции мочи может достигать до 50 г и более.

В настоящее время явления кетонемии и кетонурии при сахарном диабете или голодании можно объяснить следующим образом. И диабет, и голодание сопровождаются резким сокращением запасов гликогена в печени. Многие ткани и органы, в частности мышечная ткань, находятся в состоянии энергетического голода (при недостатке инсулина глюкоза не может с достаточной скоростью поступать в клетку). В этой ситуации благодаря возбуждению метаболических центров в ЦНС импульсами с хеморецепторов клеток, испытывающих энергетический голод, резко усиливаются липолиз и мобилизация большого количества жирных кислот из жировых депо в печень. В печени происходит интенсивное образование кетоновых тел. Образующиеся в необычно большом количестве кетоновые тела (ацетоуксусная и β -оксимасляная кис-

Рис. 10.2. Модель липопротеиновой частицы — ЛПОНП (схема по Морисету).

Апо В и С — различные аполипопротеины.



лоты) с током крови транспортируются из печени к периферическим тканям. Хотя периферические ткани при диабете и голодании сохраняют способность использовать кетоновые тела в качестве энергетического материала, однако ввиду необычно высокой концентрации кетоновых тел в притекающей крови мышцы и другие органы не справляются с их окислением, и как следствие возникает кетонемия.

Атеросклероз и липопротеины. В настоящее время доказана ведущая роль определенных классов липопротеинов в патогенезе атеросклероза. Известное положение акад. Н. Н. Аничкова «без холестерина нет атеросклероза» на современном уровне наших знаний можно выразить словами: «без атерогенных липопротеинов не может быть атеросклероза».

Напомним, что плазменные липопротеины¹ — сложные комплексные соединения, в состав которых, кроме белка, входит липидный компонент. Плазменные липопротеины имеют характерное строение: внутри липопротеиновой частицы находится жировая капля (ядро), содержащая неполярные липиды (триглицериды, этерифицированный холестерин). Жировая капля окружена оболочкой, в состав которой входят фосфолипиды, белок и свободный холестерин. Толщина этой оболочки составляет 2–2,5 нм, что соответствует половине толщины фосфолипидного бислоя клеточных мембран. Отсюда было сделано заключение, что в плазменных липопротеинах содержится фосфолипидный монослой. Предложено много различных гипотетических схем строения липопротеиновой частицы. Одна из них, представленная на рис. 10.2, изображает частицу липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). При оценке строения липопротеиновой частицы следует учитывать, что незтерифицированный холестерин может находиться во взаимодействии не только с фосфолипидным монослоем, но и с белковым компонентом. Белки, входящие в состав липопротеинов, получили название аполипопротеинов. В настоящее время из липопротеинов плазмы крови выделены в чистом виде по крайней мере девять аполипопротеинов и для пяти из них установлена первичная структура. Хотя содержание белка в различных классах липопротеинов сильно варьирует, он играет важную роль в сборке липопротеиновых частиц, их секреции и метаболизме.

Различают несколько классов липопротеинов: α -липопротеины, или липопротеины высокой плотности (ЛПВП), β -липопротеины, или липопротеины низкой плотности (ЛПНП), пре- β -липопротеины, или липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), и хиломикроны (ХМ). Химический состав различных классов плазменных липопротеинов представлен на рис. 10.3.

¹ Помимо плазменных липопротеинов, в организме существуют мембранные липопротеины, которые имеют несколько иное строение; функция их тесно связана с метаболизмом клетки.

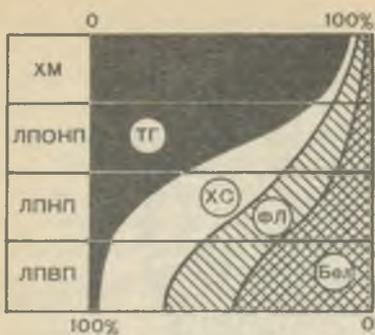


Рис. 10.3. Химический состав различных классов липопротеинов (по А. Н. Климову).

ТГ — триглицериды; ХС — холестерин; ФЛ — фосфолипиды; Бел — белки.

Установлено, что атеросклероз и связанные с ним заболевания протекают при значительном повышении содержания в плазме крови фракции ЛПНП, а во многих случаях и фракции ЛПОНП.

Показано, что ХМ не могут проникать внутрь сосудистой стенки из-за своих больших размеров, а ЛПВП, ЛПНП и частично ЛПОНП этой способностью обладают.

Однако ЛПВП имеют среди липопротеинов самые малые размеры и, по-видимому, легче могут удаляться из стенки сосуда через его лимфатическую систему. Кроме того, ЛПВП, имея в своем составе наиболее высокий процент белка и фосфолипидов, способны метаболизировать в сосудистой стенке быстрее, чем богатые холестерином и триглицеридами ЛПНП и ЛПОНП.

Таким образом, экспериментальные и клинические наблюдения свидетельствуют о том, что из всех липопротеинов плазмы крови атерогенностью обладают в первую очередь ЛПНП, а также, по-видимому, ЛПОНП. Именно эти атерогенные липопротеины способны проникнуть в сосудистую стенку из плазмы крови и служить в дальнейшем первичным субстратом, вызывающим атеросклеротическое поражение артерий. К сожалению, пока мало известен биохимический путь от липопротеиновой частицы до атеросклеротической бляшки.

Не следует забывать и то обстоятельство, что в проявлении атерогенности липопротеинов имеет важное значение состояние сосудистой стенки; последняя может оказывать существенное влияние и на скорость проникновения липопротеинов внутрь сосуда, и на их дальнейшую судьбу.

Советскими биохимиками (А. Н. Климов, Ю. Н. Зубжицкий, Т. Н. Ловягина, В. А. Нагорнев) разработана аутоиммунная теория патогенеза атеросклероза, согласно которой в крови человека и животных могут образовываться ЛПОНП (возможно, и ЛПНП), обладающие аутоиммунными свойствами. Как следствие происходит образование антител против аутоантигенных ЛПОНП с формированием соответствующего иммунного комплекса ЛПОНП-антитело в избытке антигена. Цитопатогенный эффект комплекса на сосудистую стенку проявляется в нарушении проницаемости эндотелиального барьера, что сопровождается отложением комплекса во внутренней оболочке сосудистой стенки. Увеличение проницаемости артериальной стенки под действием иммунного комплекса является благоприятным фактором для последующей инфильтрации атерогенными липопротеинами.

Формирование липидных пятен и бляшек сопровождается глубокими дистрофическими изменениями в пределах сосудистой стенки, что приводит к лизису и фрагментации волокнистых структур. Поступление в кровь продуктов распада эластина и коллагена стимулирует выработку антител против тканевых антигенов. Фиксация этих новых аутоиммунных комплексов («структурный антиген — антитело») сопровождается дальнейшими изменениями тканевых структур артерий, что может приводить к быстрому прогрессированию атеросклеротических поражений.

Липосомы

Липосомы — искусственно создаваемые липидные везикулы (пузырьки), состоящие из одного или нескольких фосфолипидных бислоев, разделенных водной фазой. Размер диаметра липосом может колебаться от 25 до 10 000 нм. Обычно липосомы получают путем встряхивания или обработки ультразвуком водных суспензий фосфолипидов. Липосомы могут быть сформированы из индивидуальных фосфолипидов,

Рис. 10.4. Модель многослойной липосомы с инкапсулированными водо- и жирорастворимыми препаратами (по Грегориадису).

1 — молекулы, растворимые в водном слое; 2 — молекулы, растворимые в липидном слое; 3 — молекулы, растворимые в водном слое с гидрофобными радикалами, проникающими в липидный слой.

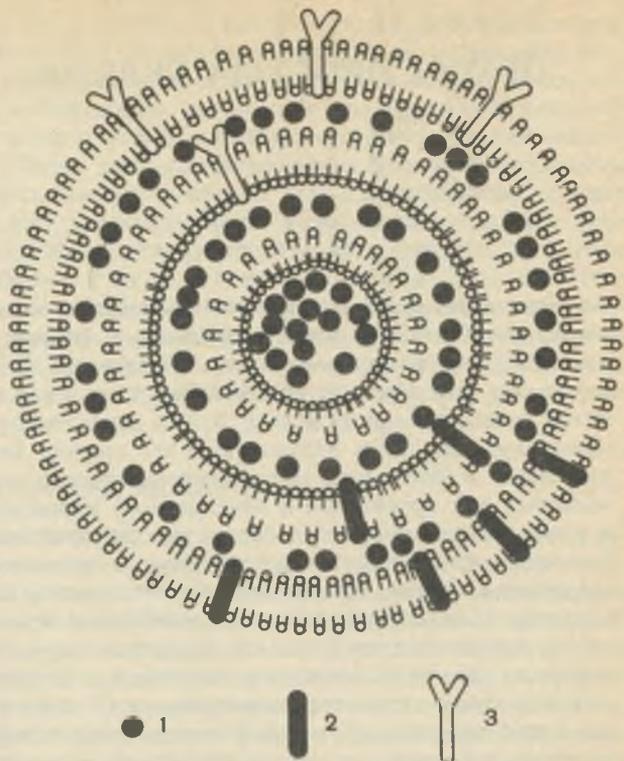
как природных, так и синтетических, а также из смеси фосфолипидов.

Вначале липосомы использовались только как модели биологических мембран. В дальнейшем было установлено, что их можно применять как микроконтейнеры, которые способны доставлять разнообразные лекарственные препараты в различные органы и ткани. В липосомы могут быть заключены ферменты, гормоны, витамины, антибиотики, цитостатики, циклические нуклеотиды и т. д.

На рис. 10.4 представлена модель многослойной липосомы, а также показано распределение водо- и жирорастворимых препаратов, инкапсулированных в липосоме.

Использование комплексов липосома — препарат имеет целый ряд преимуществ перед применением только препаратов: липосомы позволяют доставлять в клетки вещества, которые в отсутствие липосом в них не проникают; присоединение к липосомам соответствующих антител (векторов) может обеспечить доставку веществ в клетки-мишени; препарат, инкапсулированный в липосомы, обеспечивает больший терапевтический эффект (время действия увеличивается, при этом доза его может быть значительно снижена); липосомы могут эффективно использоваться как адьюванты, т. е. вещества, стимулирующие иммунологические реакции. Предполагается, что существуют по крайней мере два механизма проникновения липосом в клетку. Первый путь — вследствие эндоцитоза липосома захватывается клеткой, образуется вакуоль, которая сливается с лизосомами. Фосфолипазы лизосом гидролизуют фосфолипиды мембраны лизосом, что обеспечивает выход препарата в цитоплазму клетки. Если липосома состоит из нескольких липидных мембран, то постепенный гидролиз их обеспечивает медленное поступление препарата в клетку. Второй путь — липосомы сливаются с клеточной мембраной, при этом липидный компонент липосомы встраивается в мембрану клетки, а водорастворимый препарат проникает в цитоплазму. Таким образом, в обоих случаях вещество, инкапсулированное в липосоме, попадает в клетки, несмотря на мембранный барьер.

В экспериментах на животных показано, что при внутривенном, внутримышечном и внутрибрюшинном введении липосомы довольно быстро покидают кровяное русло, захватываясь клетками системы макрофагов, в первую очередь клетками печени и селезенки. Другие органы и ткани поглощают некоторое количество введенных липосом, однако их доля невелика. В настоящее время ведется поиск новых систем (подходов) направленного транспорта лекарственных веществ в организм с помощью липосом.



Белковый обмен занимает особое место в многообразных превращениях веществ, характерных для всех живых организмов. Выполняя ряд уникальных функций, свойственных живой материи, белки определяют не только микро- и макроструктуру отдельных субклеточных образований, специфику клеток, органов и целостного организма (пластическая функция), но и в значительной степени динамическое состояние между организмом и окружающей его средой. Белковый обмен строго специфичен, направлен и настроен, обеспечивая непрерывность воспроизводства и обновления белковых тел организма. В течение всей жизнедеятельности в организме постоянно и с высокой скоростью совершаются два противоположных процесса — распад, расщепление органических макромолекул и надмолекулярных структур и синтез этих соединений. Этими процессами обеспечиваются катаболические реакции и процессы создания сложной структурной организации живого из хаоса веществ окружающей среды, причем ведущую роль в последнем случае играют именно белки. Все остальные виды обмена подчинены этой глобальной задаче живого — самовоспроизведению себе подобных путем программированного синтеза специфических белков, используя для этого энергию углеводов и липидов, строительный материал в виде углеродных остатков аминокислот, продуктов обмена углеводов и др.

Белки способны также выполнять энергетическую функцию, в особенности при избыточном их поступлении с пищей или в экстремальных ситуациях, когда белки тела подвергаются усиленному распаду, восполняя недостаток питательных веществ, например, при голодании или патологии (при сахарном диабете). Как известно, при сгорании 1 г белков освобождается энергия, равная 16,8 кДж. Эта энергия обычно может быть полностью заменена энергией окисления углеводов и липидов, однако при длительном исключении их из пищи у животных не наблюдается существенных патологических отклонений, тогда как исключение белков из пищи даже на короткий срок приводит к серьезным нарушениям, а иногда и к необратимым патологическим явлениям. Если животные находятся на малобелковой диете, то у них очень быстро развивается белковая недостаточность — болезнь, характеризующаяся нарушением ряда важных физиологических функций организма. Аналогичные изменения наблюдаются и у людей при недостаточном потреблении белка. Следовательно, белки являются незаменимыми веществами для организма, выполняя прежде всего пластическую функцию. Однако этим не ограничивается специфическая роль белка. В опытах на крысах было показано, что белковая недостаточность у животных проявляется прежде всего не в уменьшении массы органов и тканей, а в снижении активности ферментов, обусловленном замедлением процессов биосинтеза белка.

Таким образом, помимо пластической роли, белки выполняют уникальную каталитическую функцию, которой не наделены ни углеводы, ни жиры, ни какие-либо другие вещества органической природы. Следует указать также, что белки (соответственно и продукты их гидролиза — аминокислоты) принимают непосредственное участие в биосинтезе ряда гормонов, регулирующих процессы обмена веществ в организме. Таким образом, именно белковый обмен координирует, регулирует и интегрирует многообразие химических превращений в целостном живом организме, подчиняя его задачам сохранения вида, обеспечивая тем самым непрерывность жизни.

Характерной особенностью белкового обмена является его чрезвычайная раз-

ветвленность. Достаточно указать, что в обмене 20 аминокислот, входящих в состав белковых молекул, в организме животных участвует несколько сотен промежуточных продуктов, тесно связанных с промежуточными метаболитами обмена углеводов и липидов. Число ферментов, катализирующих химические реакции азотистого обмена, также исчисляются сотнями. Если к этому добавить, что блокирование одного какого-либо специфического пути обмена даже одной аминокислоты может привести к появлению совершенно неизвестных продуктов обмена (так как возникают условия для неспецифических превращений всех предшествующих компонентов в данной цепи реакций), то становятся понятными трудности интерпретации данных о регуляции процессов азотистого обмена в норме и особенно при патологии. Тем не менее исключительно перспективно изучение обмена белков с целью выяснения особенностей их метаболизма и синтеза, овладение тонкими молекулярными механизмами которых несомненно даст в руки исследователя ключ к пониманию развития и течения патологических процессов, а также к целенаправленному воздействию на многие процессы жизни.

ДИНАМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВ ТЕЛА

Кажущаяся стабильность химического состава целостного организма является результатом существования определенного равновесия между скоростями синтеза и распада его составляющих. В связи с внедрением в биохимическую и клиническую практику метода меченых атомов однозначно доказано, что белки нужны не только растущему, но и сформировавшемуся организму, когда его рост прекращается, т. е. имеются доказательства существования в организме механизма постоянного обновления химических составных частей тела. При нормальных физиологических условиях, как и при патологических состояниях, скорости синтеза и распада специфических веществ определяются, помимо нервно-гормонального влияния, химической природой веществ и внутриклеточной их локализацией. В растущем организме при образовании новых органов и тканей скорость синтеза многих его компонентов преобладает над скоростью распада. Тяжелые изнуряющие болезни, а также голодание, напротив, характеризуются преобладанием скорости катаболизма над скоростью синтеза. Почти все белки тела, включая структурные белки, гемоглобин, белки плазмы и других биологических жидкостей организма, также подвергаются постоянному распаду и синтезу. Так, например, более половины белков печени, сыворотки крови и слизистой оболочки кишечника подвергается распаду и ресинтезу в течение 10 дней. Медленнее обновляются белки мышц, кожи и мозга.

Введенные в организм меченые аминокислоты быстро включаются в белки тканей. Активный ресинтез белков происходит даже в период длительного голодания, и в то же время отмечается интенсивный распад белков в состоянии азотистого равновесия, причем распад белков в какой-либо ткани часто сопровождается усиленным биосинтезом белка в других тканях. Индуцированные активной или пассивной иммунизацией белки антител — γ -глобулины — также подвергаются постоянному распаду и синтезу. Полупериод распада антител и ряда других белков крови человека составляет примерно 2 нед. Для белков слизистой оболочки кишечника этот период составляет несколько дней, для ряда гормонов исчисляется часами и даже минутами (инсулин).

Высокая скорость обновления белков тела, доказанная при помощи метода меченых атомов, свидетельствует о том, что в организме происходит постоянное смешивание эндогенных белковых молекул и продуктов их гидролиза — аминокислот — с молекулами белков и их производных, синтезированных из аминокислот белков пищи. Эта смесь эндогенного и экзогенного материала, которая может в принципе служить источником анаболических и катаболических реакций азотистого обмена, существует в качестве резервного материала, называемого метаболическим пулом. Изотопными методами показано, что примерно $2/3$ общего пула амино-

кислот приходится на эндогенные источники и только $\frac{1}{3}$ имеет своим источником белки пищи. Эти данные указывают прежде всего на исключительную важность эндогенного источника аминокислот и, кроме того, свидетельствуют о высокой скорости обновления белков тела.

Необходимо подчеркнуть, что белковый обмен интегрирован также с обменом углеводов, липидов и нуклеиновых кислот через аминокислоты или α -кетокислоты (α -кетоглутарат, оксалоацетат и пируват). Так, например, аспарагиновая кислота или аланин путем трансаминирования обратимо превращаются соответственно в оксалоацетат и пируват, которые непосредственно включаются в углеводный обмен. Эти данные, как и результаты опытов с введением животным меченых аминокислот и α -кетокислот, свидетельствуют о том, что в организме млекопитающих не существует, вопреки классической теории М. Рубнера и К. Фойта, обособленного и независимого эндогенного и экзогенного обмена вообще и белкового обмена в частности.

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

Направление и интенсивность обмена белков в первую очередь определяются физиологическим состоянием организма и, несомненно, регулируются, как и все другие виды обмена, деятельностью ЦНС. Более интенсивно обмен белков протекает в детском возрасте, при активной мышечной работе, беременности и лактации, т. е. в тех случаях, когда резко повышаются потребности в белках. Существенное влияние на белковый обмен оказывает характер питания и, в частности, количественный и качественный белковый состав пищи. При недостаточном поступлении белков с пищей происходит распад белков ряда тканей (печени, плазмы, крови, слизистой оболочки кишечника и др.) с образованием свободных аминокислот, обеспечивающих синтез абсолютно необходимых цитоплазматических белков, ферментов, гормонов и других биологически активных соединений. Таким образом, «в жертву» приносятся некоторые «строительные» белки тканей для обеспечения жизнедеятельности целостного организма. Введение с пищей повышенных количеств белка, напротив, не оказывает заметного влияния на состояние белкового обмена, поскольку избыток конечных продуктов азотистого обмена выводится с мочой. Более существенное значение имеет, однако, качественный белковый состав пищи, поскольку отсутствие или недостаток хотя бы одной какой-либо незаменимой аминокислоты может служить лимитирующим фактором биосинтеза всех белков в организме.

Синтез белка подчиняется закону «все или ничего» и осуществляется при условии наличия в клетке полного набора всех 20 аминокислот. Даже при поступлении всех аминокислот с пищей организм будет испытывать состояние белковой недостаточности, если всасывание какой-либо аминокислоты в кишечнике замедлено или если она разрушается в большей степени, чем в норме, под действием кишечной микрофлоры. В этих случаях будет происходить ограниченный синтез белка или организм будет компенсировать недостаток аминокислот для биосинтеза белка за счет распада собственных белков. Степень усвоения белков и аминокислот пищи зависит также от количественного и качественного состава углеводов и липидов, которые резко сокращают энергетические потребности организма за счет белков. Экспериментальный и клинический материал свидетельствует, что диета с недостаточным содержанием жиров и низкокалорийная пища способствуют повышению экскреции аминокислот и продуктов их распада с мочой.

Имеются экспериментальные доказательства прямой и опосредованной связи белкового обмена с обеспеченностью организма витаминами, в частности В₁, В₂, В₆, РР и др. Обмен белков регулируется, кроме того, деятельностью желез внутренней секреции. Гормоны определяют в известной мере направление (в сторону синтеза или распада) и интенсивность белкового обмена. Например, после введения АКГГ и гормонов щитовидной железы наблюдается интенсивный распад тканевых белков.

Ряд других гормонов, в частности СТГ, андрогены и эстрогены, напротив, стимулируют анаболические реакции и способствуют синтезу белка. Введение некоторых гормонов коркового вещества надпочечников вызывает диспротеинемию и приводит к развитию отрицательного азотистого баланса, что некоторые авторы связывают со стимулированием глюконеогенеза из углеродных скелетов аминокислот (после дезаминирования последних).

Таким образом, состояние белкового обмена определяется множеством факторов, как экзогенных (окружающая среда, характер питания и др.), так и эндогенных (физиологическое состояние организма, включающее нервно-гормональный статус, ферментная оснащенность и др.). Любые отклонения от нормального физиологического состояния организма отражаются на азотистом обмене. Знание закономерностей изменений обмена белков при данном конкретном патологическом процессе — необходимая предпосылка для правильного выбора тактики терапевтических мероприятий по устранению нарушенного процесса обмена.

АЗОТИСТЫЙ БАЛАНС

Поскольку основная масса азота пищи представлена белками (как и большинство выделяемых конечных азотистых соединений являются продуктами распада белка), принято считать, что для правильной оценки состояния обмена белков достаточно точным критерием может быть определение азотистого баланса. Этот термин означает количественную разницу между введением с пищей азота и выведением его в виде конечных продуктов азотистого обмена, выраженных в одинаковых единицах (г/сут). Определение азотистого баланса часто используют в клинической практике для оценки обеспеченности больного белковой пищей. Количество пищевого азота (соответственно белка) может быть сравнительно легко и точно определено, в то время как количество теряемого организмом азота не всегда может быть точно вычислено, поскольку на практике учитывают только азотистые продукты, выделяемые почками и кишечником; между тем следует учитывать потерю азота также со слюной, эпителием кожи, волосами и др.

Различают положительный и отрицательный азотистый баланс, а также азотистое равновесие. Если количество выводимого из организма азота меньше количества азота, вводимого с пищей, то говорят о положительном азотистом балансе. В этом случае часть азота остается в организме и расходуется в первую очередь на биосинтез высокомолекулярных белковых веществ органов и тканей. Такое состояние характерно для молодого, растущего организма, а также для женщин во время беременности. Оно свидетельствует о том, что синтетические процессы преобладают над процессами распада белков органов и тканей. При отрицательном азотистом балансе количество выделяемого азота превышает количество азота, поступающего в течение суток. Это состояние встречается при голодании (частичном или полном), белковой недостаточности, тяжелых заболеваниях, когда происходит интенсивный распад белков тела у больных, получающих даже полноценную в качественном и количественном отношении белковую пищу. У людей пожилого возраста даже без видимых патологических изменений часто отмечается отрицательный азотистый баланс, связанный с превышением скорости распада белков над скоростью синтеза, хотя организм может получать достаточное количество белка. В состоянии азотистого равновесия количество азота, теряемого организмом, равно количеству получаемого с пищей азота. Это состояние характерно для здорового взрослого человека, находящегося на полноценной диете с нормальным суточным содержанием белка.

Таким образом, организмы животных и человека постоянно нуждаются в белковой пище, поэтому недостаток белка или полное исключение его сопровождаются развитием патологии, в конечном счете приводящей к гибели организма. С понятием азотистого баланса тесно связана проблема о нормах белка в питании.

НОРМЫ БЕЛКА В ПИТАНИИ

Для достижения азотистого равновесия, сохранения здоровья человека и обеспечения высокой работоспособности необходимо точно знать нормы белка в питании. Изучение этого вопроса имеет, кроме чисто академического интереса, большое социальное значение.

Принятые в нашей стране нормы белка для взрослого человека и для детей разного возраста основаны на результатах многочисленных научных исследований советских ученых, учитывают разные климатические условия, условия труда, профессию, возраст и другие факторы. Эти нормы выводятся из оптимального содержания белка в пищевом рационе. Так, взрослый человек, занимающийся умственным трудом и подвергающийся средней физической нагрузке (полностью механизированный труд), должен получать 100—120 г белка в сутки при энерготратах 12 000 кДж. При изменении условий труда (недостаточно механизированный труд) и больших энерготратах эта норма белка увеличивается на 10 г на каждые 2100 кДж. Рабочие, выполняющие тяжелую физическую работу, должны получать 130—150 г белка в сутки.

Потребности белка в детском возрасте определяются в первую очередь возрастом и массой тела. Дети даже раннего возраста нуждаются в получении 55—72 г белка в сутки. С возрастом (от 12 до 15 лет) эта норма белка увеличивается до суточной нормы взрослого человека. Суточные потребности в белке резко возрастают при беременности и лактации, а также при некоторых патологических состояниях, когда организм теряет белок с мочой или асцитной жидкостью, экссудатами (например, при нефритах, тяжелых инфекционных заболеваниях, ожогах, травмах и т. д.).

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ БЕЛКОВ

Состояние белкового обмена целостного организма зависит не только от количества принимаемого с пищей белка, но и от качественного его состава. В опытах на животных было показано, что получение одинакового количества разных пищевых белков приводит в ряде случаев к развитию отрицательного азотистого баланса. Так, скармливание одних и тех же количеств казеина и желатина крысам приводило к положительному азотистому балансу в первом случае и к отрицательному — во втором. Все дело заключается в различном аминокислотном составе белков, что послужило основанием для предположения о существовании в природе якобы «неполноценных» белков. Оказывается, из 20 аминокислот в желатине почти отсутствуют (или содержатся в малых количествах) валин, тирозин, метионин и цистеин, кроме того, желатин характеризуется другим, отличным от казеина процентным содержанием отдельных аминокислот. Этим можно объяснить, что замена в питании крыс казеина на желатин приводит к развитию отрицательного азотистого баланса. Эти данные свидетельствуют о том, что различные белки обладают неодинаковой пищевой ценностью. Поэтому для удовлетворения пластических потребностей организма требуются достаточные количества разных белков пищи. По-видимому, справедливо положение, что чем ближе аминокислотный состав принимаемого пищевого белка к аминокислотному составу белков тела, тем выше его биологическая ценность. Следует, однако, отметить, что степень усвоения пищевого белка зависит также от эффективности его распада под влиянием ферментов желудочно-кишечного тракта. Ряд белковых веществ (например, шерсть, волосы, перья и др.), несмотря на их близкий аминокислотный состав к белкам тела человека, почти не используются в качестве пищевого белка, поскольку они не гидролизуются протеиназами кишечника человека и большинства животных.

С понятием биологической ценности белков тесно связан вопрос об эссенциальных, незаменимых аминокислотах. Живые организмы существенно различаются в зависимости от их способности синтезировать аминокислоты и азотсодержащие соединения, которые они могут использовать для биосинтеза аминокислот. Высшие расте-

ния, например, могут синтезировать все необходимое для белкового синтеза аминокислоты, причем могут использовать для этого аммиак или нитраты в качестве источника азота. Микроорганизмы обладают различной способностью синтезировать аминокислоты; в частности, если *E. coli* синтезирует все аминокислоты, используя нитриты и нитраты или аммиак, то молочнокислые бактерии не обладают этой способностью и получают аминокислоты в готовом виде из молока. Высшие позвоночные животные не синтезируют все необходимые аминокислоты. В организме человека и белых крыс синтезируются только 10 из 20 необходимых аминокислот; это так называемые заменимые аминокислоты. Они могут быть синтезированы из продуктов обмена углеводов и липидов. Остальные 10 аминокислот не синтезируются в организме, поэтому они были названы жизненно необходимыми, эссенциальными, или незаменимыми аминокислотами (табл. 11.1).

Таблица 11.1. Заменимые и незаменимые аминокислоты

Заменимые	Незаменимые	Заменимые	Незаменимые
Аланин Аспарагин Аспарагиновая кислота Глицин Глутамин	Аргинин ¹ Валин Гистидин ¹ Изолейцин Лейцин	Глутаминовая кислота Пролин Серин Тирозин Цистеин (цистин)	Лизин Метионин Треонин Триптофан Фенилаланин

¹ Частично заменимые.

Незаменимость указанных аминокислот для роста и развития организма животных и человека связана с отсутствием способности тканей синтезировать углеродные скелеты незаменимых аминокислот, поскольку процесс аминирования соответствующих кетопроизводных осуществляется сравнительно легко посредством реакций трансаминирования. Следовательно, для обеспечения нормальной жизнедеятельности человека и животных все эти 10 аминокислот должны поступать с пищей.

Следует указать, что для взрослого человека аргинин и гистидин оказались частично заменимыми. В наблюдениях Г. Роуза на людях, получавших искусственную пищу, в которой белок был полностью заменен смесью 20 аминокислот, установлено, что для сохранения нормальной массы тела и работоспособности имеет значение не только определенное количество каждой аминокислоты и соотношение незаменимых аминокислот в подобной диете, но и содержание в ней общего азота. В табл. 11.2 приведена минимальная суточная потребность организма человека в незаменимых аминокислотах, обеспечивающая азотистое равновесие.

Исключение какой-либо незаменимой аминокислоты из пищевой смеси сопровождалось развитием отрицательного азотистого баланса, истощением, остановкой роста.

Таблица 11.2. Минимальная суточная потребность организма человека в независимых аминокислотах (рекомендации ФАО и ВОЗ)

Аминокислота	Потребность индивидуума, г/сут	Потребность в расчете на массу тела, в мг/кг
Арг	1,8	Взрослый организм не нуждается 10 14 12 13 14 7 3,5 10
Гис	0,9	
Иле	0,7	
Лей	1,1	
Лиз	0,8	
Мет (Цис) ¹	1,1	
Фен (Тир) ²	1,1	
Тре	0,5	
Трп	0,25	
Вал	0,80	

¹ Цистеин снижает потребность в метионине на 80%.

² Тирозин снижает потребность в фенилаланине на 70%.

нарушениями со стороны нервной системы и др. В опытах на крысах были установлены следующие пропорциональные величины незаменимых аминокислот, необходимых для оптимального роста, относительно триптофана, принятого за единицу; лизина — 5; лейцина — 4; валина — 3,5; фенилаланина — 3,5; метионина — 3; изолейцина — 2,5; треонина — 2,5; гистидина — 2; аргинина — 1. Имеются доказательства, что такое же соотношение незаменимых аминокислот требуется для человека.

Последствия недостаточного содержания какой-либо незаменимой аминокислоты в пище более подробно изучены на животных. Отсутствие или недостаток валина и лизина, например, приводит к остановке роста и развитию тяжелой клинической картины, напоминающей авитаминоз у животных.

Следует особо подчеркнуть, что недостаток в пище одной незаменимой аминокислоты ведет к неполному усвоению других аминокислот. Вместе с тем в опытах на животных было показано, что потребности в незаменимом фенилаланине могут быть частично компенсированы заменимой аминокислотой — тирозином. Точно так же потребности в метионе могут быть частично замещены гомоцистеином с добавлением необходимого количества доноров метильных групп. Глутаминовая кислота снижает потребности в аргинине. Необходимо учитывать и видовые различия при определении незаменимости отдельных аминокислот. Для цыплят, например, глицин оказался незаменимым фактором роста.

Для оценки биологической ценности пищевого белка важное значение имеет знание его аминокислотного состава. Так, скормливание крысам казеина (белок молока) и белка зеина, выделенного из кукурузы, который не содержит в своем составе лизина и практически триптофана, показало, что при получении казеина рост животных не нарушался. Замена казеина зеином привела к постепенному отставанию в росте и снижению массы тела животных. Добавление к зеину только триптофана предотвращало снижение массы тела, но не увеличивало рост; при добавлении к рациону еще и лизина масса тела прогрессивно нарастала. Таким образом, скормливание выделенного из кукурузного зерна белка зеина, не содержащего двух незаменимых аминокислот, приводит к остановке роста, уменьшению массы тела животных и развитию отрицательного азотистого баланса.

Однако человек и животные питаются не искусственно выделенными, а натуральными белками, входящими в состав смешанной пищи, в которой обычно содержится весь набор незаменимых аминокислот. Так, например, цельное кукурузное зерно содержит 2,5% лизина, 0,7% триптофана, в то время как зеин не содержит лизина вообще, а триптофана всего 0,1%. Этот пример лишний раз свидетельствует о том, что в природе неполноценных белков почти не существует и что следует, очевидно, лишь различать биологически более ценные и менее ценные (в питательном отношении) белки (табл. 11.3).

Биологическая ценность пищевого белка целиком зависит от степени его усвоения организмом, что в свою очередь определяется соответствием между аминокислотным составом потребляемого белка и аминокислотным составом белков тела. Такой белок лучше используется организмом для синтеза белков тканей. Для человека, например, белки мяса, молока, яиц биологически более ценны, поскольку их аминокислотный состав ближе к аминокислотному составу органов и тканей человека. Сказанное вовсе не исключает приема растительных белков, в которых содержится необходимый набор аминокислот, но в другом соотношении. Поэтому для биосинтеза одного и того же количества собственных белков тела человеку потребуется значительно больше растительных белков, чем животных.

Таким образом, для нормального роста и гармоничного развития организма человека исключительно большое значение имеют составление и подбор пищевых продуктов, содержащих оптимальный аминокислотный состав и обеспечивающих физиологически полноценное питание для разных возрастных групп населения с учетом не только возраста и пола, но и различных климатических условий, характера труда, сезона года и т. д.

Таблица 11.3. Содержание незаменимых аминокислот в белках различного происхождения

Аминокислота	Содержание (в % на сухую массу)					
	пшеничная мука	соевая мука	рыбная мука	говядина	коровье молоко	кормовые дрожжи
Арг	4,2	4,7	5,0	7,7	4,1	8,0
Гис	2,2	2,4	2,3	3,3	2,6	1,7
Иле	4,2	5,4	4,6	6,0	7,8	5,5
Лей	7,0	7,7	7,8	8,0	11,0	7,6
Лиз	1,9	6,5	7,5	10,0	8,7	6,8
Мет	1,5	1,4	2,6	3,2	0,8	1,2
Фен	5,5	5,1	4,0	5,0	5,5	3,9
Тре	2,7	4,0	4,2	5,0	4,7	5,4
Трп	0,8	1,5	1,2	1,4	1,5	1,6
Вал	4,1	5,0	5,2	5,5	7,1	6,0

БЕЛКОВЫЕ РЕЗЕРВЫ

Под термином «резервные» белки понимают не особые отложения белков, а легко мобилизуемые при необходимости тканевые белки, которые после гидролиза под действием тканевых протеиназ служат поставщиками аминокислот, необходимых для синтеза ферментов, гормонов и др. Опыты на животных показали, что при голодании, например, наблюдается неравномерное изменение массы отдельных органов и тканей; в значительно большей степени снижается масса печени. Многочисленные наблюдения над больными в клинике также свидетельствуют, что при голодании и тяжелых инфекционных заболеваниях, когда наблюдается интенсивный распад органов, в первую очередь снижается масса печени и мышц. без существенного изменения массы мозга и сердца. Организм за счет распада белков печени и мышц обеспечивает нормальную деятельность жизненно важных органов. На основании этих данных принято считать, что белки плазмы крови, печени и мышц могут служить в качестве «резервных», хотя эти резервы по своему существу резко отличаются от резервов углеводов (отложение гликогена в печени и мышцах) и липидов (отложение триглицеридов в жировых депо). Следует, однако, подчеркнуть, что существование в организме механизма срочной мобилизации белковых ресурсов в экстремальных условиях (голодание, тяжелая интоксикация, потеря крови и др.), несомненно, имеет важное физиологическое значение.

ПАРЕНТЕРАЛЬНОЕ БЕЛКОВОЕ ПИТАНИЕ

Весьма важной для клинической практики является проблема парентерального белкового питания. Как известно, белки пищи могут быть использованы организмом человека только после предварительного переваривания и расщепления их в желудочно-кишечном тракте до свободных аминокислот. Введение белков парентерально, т. е. минуя кишечный тракт, приводит к развитию сенсibilизации (повышенной чувствительности организма к чужеродному белку), а повторное введение белков может привести к анафилаксии — шоковому состоянию организма. Между тем к такому методу введения белка иногда вынуждены прибегать клиницисты, в частности в хирургической практике при непроходимости пищевода на почве ожогов и отравлений, при тяжелых раковых поражениях пищевода и желудка, после операции на желудке и кишечнике и др. Для предотвращения тяжелых осложнений, возникающих после парентерального введения белковых растворов, в настоящее время для белкового питания используют гидролизаты белков (смесь аминокислот). Введение аминокислот-

ной смеси не вызывает аллергических реакций, поскольку свободные аминокислоты не обладают в отличие от белков ни видовой, ни тканевой специфичностью. Длительные наблюдения над больными в клинических условиях свидетельствуют, что потребности организма в белках могут быть полностью компенсированы введением смеси аминокислот. Нельзя не указать, однако, и на ряд побочных отрицательных реакций организма в ответ на введение гидролизатов белков, в частности на нарушение психической деятельности.

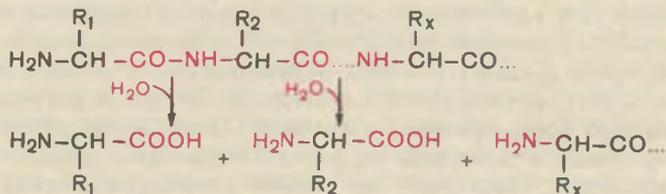
ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКОВ

Главными источниками белков для человека являются пищевые продукты животного и растительного происхождения. В табл. 11.4 представлены средние данные о содержании белка в основных пищевых продуктах. Видно, что главным образом животные (мясо, рыба, сыр) и только некоторые растительные (горох, соя) продукты богаты белками, в то время как наиболее распространенные растительные пищевые продукты содержат небольшие количества белка.

Таблица 11.4. Содержание белка в некоторых пищевых продуктах

Наименование продукта	Содержание белка, %	Наименование продукта	Содержание белка, %
Мясо	18–22	Гречневая крупа	11
Рыба	17–22	Пшено	10
Сыр	20–36	Орехи лесные	12
Яйца	13	» кедровые	4
Молоко	3,5	Картофель	1,5–2
Хлеб ржаной	7,8	Капуста	1,1–1,6
Рис	8	Морковь	0,8–1,6
Горох	26	Свекла	1,6
Соя	35	Яблоки	0,3–0,4
Макароны	9–13	Вишня	1–1,1

Весь сложный процесс переваривания пищевых белков в желудочно-кишечном тракте «настроен» таким образом, чтобы путем последовательного действия протеолитических ферментов лишить белки пищи видовой и тканевой специфичности и придать продуктам распада способность всасываться в кровь через стенку кишечника. Показано, что примерно 95–97% белков пищи всасывается в виде свободных аминокислот. Следовательно, ферментный аппарат желудочно-кишечного тракта осуществляет поэтапное, строго избирательное расщепление пептидных связей белковой молекулы вплоть до конечных продуктов гидролиза белков – свободных аминокислот. Гидролиз заключается в разрыве пептидных связей – CO–NH – белковой молекулы.



Протеолитические ферменты (протеиназы) обладают широкой специфичностью, хотя многие из них специфичны к размеру полипептида и к структуре радикала аминокислоты, участвующей в образовании пептидной связи. В табл. 11.5 приведен список основных ферментов, катализирующих гидролитический распад пищевых белков и пептидов.

Таблица 11.5. Протеолитические ферменты желудочно-кишечного тракта

Источник	Фермент	Примечание
Желудочный сок	Пепсин	Протеиназа (найден также в желудочном соке птиц, рептилий и рыб)
» »	Реннин	Вызывает свертывание молока
» »	Гастриксин	Пепсиноподобный фермент
Панкреатический сок	Трипсин	Протеиназа
» »	Химотрипсин	»
» »	Коллагеназа	»
» »	Карбоксипептидаза	Пептидаза
» »	Эластаза	»
Кишечный сок	Аминопептидаза	»
» »	Лейцинаминопептидаза	»
» »	Аланинаминопептидаза	»
» »	Энтеропептидаза	Гликопротеин
» »	Трипептидазы	Пептидазы
» »	Дипептидазы	»
» »	Пролил-дипептидаза	»
» »	Пролин-дипептидаза	»

Следует подчеркнуть, что, хотя с пищей человек получает огромное разнообразие белков, все они подвергаются воздействию ограниченного числа протеиназ. Эти ферменты относятся к классу гидролаз (см. главу 4) и часто называются также пептидазами. Известны две группы пептидаз: экзопептидазы, катализирующие разрыв концевой пептидной связи с освобождением одной какой-либо концевой аминокислоты, и эндопептидазы, преимущественно гидролизующие пептидные связи внутри полипептидной цепи. Поскольку эндопептидазы обладают разной субстратной специфичностью действия, всецело определяемой природой радикалов аминокислот по соседству с разрываемой пептидной связью, белковая молекула распадается под действием разных эндопептидаз на строго определенное число пептидов, сравнительно легко идентифицируемых методами хроматографии и электрофореза (метод отпечатков пальцев). Это свойство эндопептидаз нашло широкое применение в исследовательской работе при выяснении первичной структуры индивидуальных белков.

Эндопептидазы

Пепсин. Одним из хорошо изученных и основных протеолитических ферментов пищеварительного тракта является пепсин. Его наличие в желудке было показано в 1783 г. Л. Спалланцани, хотя в кристаллическом виде он был получен только в 1930 г. (см. главу 1). Пепсин вырабатывается в клетках слизистой оболочки желудка в неактивной форме — в виде пепсиногена; превращение последнего в активный пепсин осуществляется в желудочном содержимом. Однако молекулярный механизм превращения неактивного пепсиногена в активный пепсин в деталях еще не выяснен. Наиболее вероятным считается предположение, что этот процесс является последовательным и протекает в несколько этапов в присутствии соляной кислоты по механизму аутокаталитического действия самого пепсина. Поскольку молекулярная масса пепсиногена приблизительно равна 40 400 Да, а пепсина — 32 700 Да, то превращение первого во второй связано с отщеплением пептидных фрагментов. Оба фермента можно сравнительно легко получить в кристаллическом виде. Следует отметить, что в отличие от других протеиназ пепсин отличается высокой устойчивостью в сильноокислой среде и характеризуется низким значением изоэлектрической точки ($pI < 1$). Эти условия обычно создаются в желудочном содержимом, куда поступает

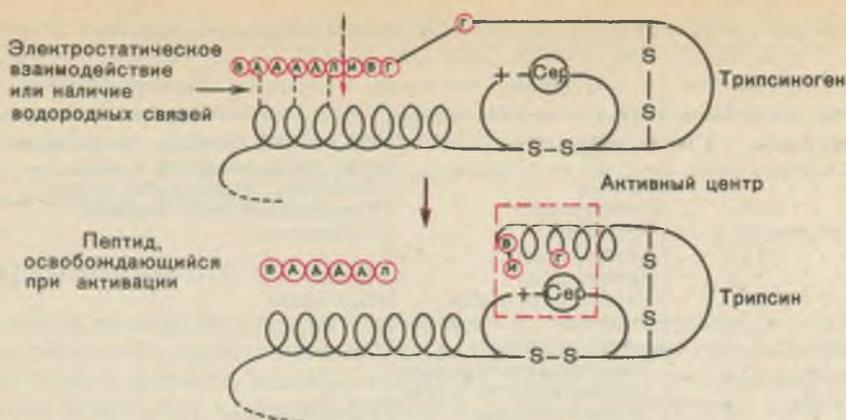


Рис. 11.1. Механизм активации трипсиногена быка (схема).

секретируемая клетками слизистой оболочки соляная кислота; рН чистого желудочного сока колеблется от 1,0 до 2,0. Эта среда является оптимальной для каталитического действия пепсина. Имеются доказательства, что в желудке человека из пепсиногена, вероятно, образуется не один активный пепсин, а несколько близких по строению пепсинов, включая пепсиноподобный фермент **гастрексин**, который имеет отличный от пепсина оптимум рН действия, равный 3,0.

Реннин. Реннин выделен из сока четвертого отдела желудка телят в кристаллическом виде. Он открыт также в желудочном соке детей грудного возраста. По механизму и специфичности действия реннин сильно отличается от пепсина, тогда как по структуре близок к нему: также состоит из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 40 000 Да. Изoeлектрическая точка реннина равна 4,5.

Три другие важные эндопептидазы — трипсин, химотрипсин и эластаза, участвующие в дальнейшем после действия пепсина переваривании белков, синтезируются в поджелудочной железе. Все они вырабатываются в неактивной форме, в виде проферментов и их превращение в активные ферменты осуществляется в тонком кишечнике, куда они поступают с панкреатическим соком.

Трипсин. Трипсиноген и трипсин получены в кристаллическом виде; полностью расшифрована первичная структура и известен молекулярный механизм превращения профермента в активный фермент. В опытах *in vitro* превращение трипсиногена в трипсин катализирует не только энтеропептидаза и сам трипсин, но и другие протеиназы и ионы Ca^{2+} . Активирование химически выражается в отщеплении с N-конца полипептидной цепи 6 аминокислотных остатков (гексапептида следующего состава: Вал—Асп—Асп—Асп—Асп—Лиз—) и соответственно укорочении полипептидной цепи (рис. 11.1).

Следует, однако, подчеркнуть, что в этом небольшом, казалось бы, химическом процессе — отщепление гексапептида от предшественника — заключено важное биологическое значение, поскольку при этом происходит формирование активного центра и образование трехмерной структуры трипсина, а известно (см. главу 1 и 4), что белки биологически активны только при сохранении своей нативной трехмерной конформации. В том, что трипсин, как и другие протеиназы, вырабатывается в поджелудочной железе в неактивной форме, также имеется определенный физиологический смысл, поскольку в противном случае трипсин мог бы оказывать разрушающее протеолитическое воздействие не только на клетки самой железы, но и на другие ферменты, синтезируемые в ней (амилазу, липазу и др.). При остром панкреатите, когда трипсин и другие ферменты из пораженной поджелудочной железы «вымываются» в кровь, уровень их в крови соответствует размерам некротического

участка; в этом случае определение активности трипсина в сыворотке крови является надежным ферментным тестом при диагностике острого панкреатита. Укажем также, что субстратная специфичность трипсина ограничена разрывом только тех пептидных связей, в образовании которых участвуют карбоксильные группы лизина и аргинина.

Химотрипсин. В поджелудочной железе синтезируется ряд химотрипсинов (α -, δ -, π -химотрипсины) из двух предшественников — химотрипсиногена А и химотрипсиногена В. Активируются проферменты в кишечнике под действием активного трипсина и химотрипсина. Полностью раскрыта последовательность аминокислот химотрипсиногена А, во многом сходная с последовательностью аминокислот трипсина. Молекулярная масса его составляет примерно 25 000 Да (см. рис. 1.10 и 1.11). Он состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 246 аминокислотных остатков. Активация профермента не сопряжена с отщеплением большого участка молекулы (см. рис. 4.3). Получены доказательства, что разрыв одной пептидной связи между аргинином и изолейцином в молекуле химотрипсиногена А под действием трипсина приводит к формированию π -химотрипсина, обладающего наибольшей ферментативной активностью. Последующее отщепление дипептида Сер—Арг приводит к образованию δ -химотрипсина. Аутокаталитический процесс активирования, вызванный химотрипсином, сначала приводит к формированию неактивного промежуточного неохимотрипсина, который под действием активного трипсина превращается в α -химотрипсин; этот же продукт образуется из δ -химотрипсина, но под действием активного химотрипсина. Таким образом, благодаря совместному перекрестному воздействию химотрипсина и трипсина из химотрипсиногена образуются разные химотрипсины, различающиеся как ферментативной активностью, так и некоторыми физико-химическими свойствами, в частности электрофоретической подвижностью.

Следует указать, что химотрипсин обладает более широкой субстратной специфичностью, чем трипсин. Он катализирует гидролиз не только пептидов, но и эфиров, гидроксаматов, амидов и других ацилпроизводных, хотя наибольшую активность химотрипсин проявляет по отношению к пептидным связям, в образовании которых принимают участие карбоксильные группы ароматических аминокислот — фенилаланина, тирозина и триптофана¹.

Эластаза. В поджелудочной железе синтезируется еще одна эндопептидаза — эластаза в виде проэластазы. Превращение профермента в эластин в тонком кишечнике катализируется трипсином. Название фермент получил от субстрата эластина, который он гидролизует. Эластин содержится в соединительной ткани и характеризуется наличием большого числа остатков глицина и серина. Эластаза обладает широкой субстратной специфичностью, но предпочитательнее гидролизует пептидные связи, образованные аминокислотами с небольшими гидрофобными радикалами, в частности глицином, аланином и серином. Интересно, что ни трипсин, ни химотрипсин не гидролизуют пептидные связи молекулы эластина, хотя все три фермента, включая эластазу, содержат сходные участки аминокислотных последовательностей и одинаковые места положения дисульфидных мостиков, а также имеют в активном центре один и тот же ключевой остаток серина (см. табл. 4.2), что подтверждают опыты с ингибированием всех трех ферментов диизопропилфторфосфатом, химически связывающим ОН-группу серина. Высказано предположение, что все три эндопептидазы поджелудочной железы — трипсин, химотрипсин и эластаза — возможно, имеют один и тот же общий предшественник и что специфичность активного фермента в основном определяется конформационными изменениями профермента в процессе активирования.

¹ Химотрипсин является одним из наиболее изученных ферментов, для которого в деталях расшифрован механизм ферментативного катализа, включающий образование промежуточного продукта ацилфермента. Доказана существенность для акта катализа гидроксильной группы серина и протонированного остатка гистидина в активном центре фермента.

Экзопептидазы. В переваривании белков в тонком кишечнике активное участие принимает семейство экзопептидаз. Одни из них (карбоксипептидазы) синтезируются в поджелудочной железе и активируются трипсином в кишечнике, другие (аминопептидазы) вырабатываются в клетках слизистой оболочки кишечника и также активируются трипсином.

Карбоксипептидазы. Подробно изучены две карбоксипептидазы — А и В, относящиеся к металлопротеинам и катализирующие отщепление от полипептида С-концевых аминокислот. Карбоксипептидаза А разрывает преимущественно пептидные связи, образованные концевыми ароматическими аминокислотами, а карбоксипептидаза В — связи, в образовании которых участвуют С-концевые лизин или аргинин. Очищенный препарат карбоксипептидазы А обладает бифункциональной активностью — пептидазной и эстеразной — и содержит ион цинка (один атом на 1 моль фермента). При замене ионов Zn^{2+} на ионы Ca^{2+} происходит полная потеря пептидазной активности, но усиливается исходная эстеразная активность, хотя при этом существенных изменений в третичной структуре фермента не отмечено.

Аминопептидазы. В кишечном соке открыты два фермента — аланинаминопептидаза, преимущественно катализирующая гидролиз пептидной связи, в образовании которой участвует N-концевой аланин, и лейцинаминопептидаза, не обладающая строгой субстратной специфичностью и гидролизующая пептидные связи, образованные любой N-концевой аминокислотой. Оба фермента осуществляют ступенчатое отщепление аминокислот от N-конца полипептидной цепи.

Дипептидазы. Процесс переваривания пептидов, их расщепление до свободных аминокислот в тонком кишечнике завершают дипептидазы. Среди дипептидаз кишечного сока хорошо изучена глицил-глицин-дипептидаза, гидролизующая соответствующий дипептид до двух молекул глицина. Известны также две другие дипептидазы: пролил-дипептидаза (пролиназа), катализирующая гидролиз пептидной связи, в образовании которой участвует $COOH$ -группа пролина, и пролин-дипептидаза (пролидаза), гидролизующая дипептиды, в которых азот пролина связан кислотнo-амидной связью.

Еще сравнительно недавно протеиназы традиционно связывали только с процессами переваривания. Однако в настоящее время накапливается все больше данных о более широкой биологической роли протеолитических ферментов тканей в регуляции ряда внеклеточных и внутриклеточных процессов. Некоторые из них выполняют защитную функцию (свертывание крови, система комплемента, или лизис клеток), другие генерируют гормоны, токсины, вазоактивные агенты (ангиотензин, кинины). Ряд протеиназ регулирует образование пищеварительных ферментов, взаимодействие между клетками и клеточными поверхностями или развитие фертилизации (хитинсинтетаза) и дифференциации. Регуляция в большинстве случаев предусматривает превращение неактивного предшественника в активный белок путем отщепления ограниченного числа пептидов. Этот процесс, впервые описанный К. Линдерстрем-Лангом еще в 50-е годы, в последнее время получил наименование *ограниченного протеолиза*. Значение этого процесса очень важно как для понимания сущности и биологического значения синтеза в клетках неактивных пре- и пробелков, так и для широкого его практического использования в лабораториях и промышленности. В регуляции действия протеолитических ферментов участвуют также ингибиторы протеиназ белковой природы, открытые не только в поджелудочной железе, но и в плазме крови, курином яйце и т. д.

Отделение панкреатического и кишечного сока регулируется нейрогормональными факторами, которые подробно излагаются в курсе физиологии. Имеются доказательства роли соляной кислоты в качестве пускового механизма выработки в кишечнике особых гормонов. В частности, соляная кислота, попадая в двенадцатиперстную кишку, действует на слизистую оболочку и стимулирует секрецию секретина (см. главу 6). С током крови секретин приносится в поджелудочную железу, стимулируя выработку и отделение щелочного панкреатического сока, а также способствует оттоку желчи. Показано, что секретин быстро исчезает из кровотока, а новые порции

его не вырабатываются, поскольку соляная кислота нейтрализуется щелочным желудочным соком. Таким образом, благодаря существованию такого механизма, действующего по типу обратной связи, осуществляется регуляция секреции и отделения желудочного сока. Желудочный сок, полученный при действии секретина, содержит незначительное количество ферментов, но богат бикарбонатами, создающими слабощелочную среду (рН 7,5–8,5), оптимальную для действия пищеварительных ферментов в кишечнике. Вторым гормоном, также синтезирующимся в двенадцатиперстной кишке и регулирующим секрецию желудочного сока, является холецистокинин (панкреозимин). Сок, полученный после его введения, напротив, богат ферментами и беден бикарбонатами.

Переваривание белков в желудке

В желудке имеются все условия для переваривания белков. Во-первых, в желудочном соке содержится активный фермент пепсин. Во-вторых, благодаря наличию в желудочном соке свободной соляной кислоты для действия пепсина создается оптимальная среда (рН 1,5–2,5). Следует особо указать на существенную роль соляной кислоты в переваривании белков; она переводит неактивный пепсиноген в активный пепсин, создает оптимальную среду для действия пепсина, в присутствии соляной кислоты происходят набухание белков (увеличение поверхности соприкосновения фермента с субстратом), частичная денатурация и, возможно, гидролиз сложных белков. Кроме того, соляная кислота стимулирует выработку секретина, ускоряет всасывание железа, и оказывает бактерицидное действие.

Ввиду исключительной роли соляной кислоты в переваривании белков были предприняты попытки объяснить механизм ее секреции в желудке. Хотя в деталях этот механизм до сих пор не выяснен, однако имеющиеся данные свидетельствуют, что образующиеся при диссоциации хлорида натрия в крови ионы хлора диффундируют через клеточную мембрану и соединяются с ионами водорода, которые в свою очередь освобождаются при диссоциации угольной кислоты, образующейся в обкладочных клетках из конечных продуктов обмена — H_2O и CO_2 . Образовавшаяся соляная кислота затем секретруется обкладочными клетками в полость желудка. Равновесие ионов между кровью и обкладочными клетками достигается поступлением отрицательно заряженных ионов HCO_3^- из клеток в кровь взамен ионов хлора, поступающих из крови в клетки. Предполагается участие АТФ, поскольку синтез соляной кислоты требует доставки энергии. Следует отметить, что при некоторых поражениях желудка (обычно при воспалительных процессах) могут нарушаться секреция соляной кислоты и соответственно переваривание белков.

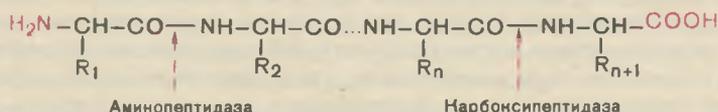
Пепсин, как было указано выше, гидролизует преимущественно пептидные связи, образованные аминокеттогруппами ароматических аминокислот. Он расщепляет практически все природные белки. Исключение составляют некоторые кератины, протамины, гистоны и мукопротеины. Наибольший гидролитический эффект пепсин оказывает на денатурированные белки. При этом образуются различного размера пептиды и, возможно, небольшое число свободных аминокислот. В желудочном соке грудных детей, а также в секрете четвертого желудочка телят и других молодых жвачных животных содержится весьма активный фермент реннин, отличающийся от пепсина. Реннин катализирует свертывание молока, т. е. превращение растворимого казеиногена в нерастворимый казеин. У взрослых людей эту функцию выполняет пепсин. Механизм этого процесса, несмотря на кажущуюся простоту, в деталях пока не выяснен. Предполагается, что реннин превращает растворимый казеиноген молока в параказеин, кальциевая соль которого нерастворима, и он выпадает в осадок в виде творога. Интересно отметить, что после удаления ионов кальция из молока образования осадка не происходит.

Наличие активного реннина в желудочном соке грудных детей имеет, по-видимому, важное физиологическое значение, поскольку при свертывании молока, являющегося

основным пищевым продуктом в этом возрасте, резко замедляется продвижение нерастворимого казеина через пищеварительный канал, в результате чего он дольше подвергается действию протеиназ.

Переваривание белков в кишечнике

Дальнейшее превращение белков пищи осуществляется в тонком кишечнике, где на белки действуют ферменты панкреатического и кишечного соков. Трипсин и химотрипсин действуют на белки аналогично пепсину, но разрывают другие внутренние пептидные связи; оба фермента наиболее активны в слабощелочной среде (рН 7,2–7,8). Благодаря гидролитическому действию на белки всех трех эндопептидаз (пепсина, трипсина, химотрипсина) образуются различной длины пептиды и некоторое количество свободных аминокислот. Дальнейший гидролиз пептидов до свободных аминокислот осуществляется под влиянием группы ферментов – пептидаз. Помимо панкреатической карбоксипептидазы, на пептиды действуют кишечная аминопептидаза и разнообразные дипептидазы. Эта группа ферментов относится к экзопептидазам и катализирует гидролиз пептидной связи по схеме:



Точкой приложения аминопептидазы является пептидная связь с N-конца пептида. Карбоксипептидаза разрывает пептидную связь с противоположного С-конца пептида. Эти ферменты отщепляют по одной аминокислоте от полипептида и в конечном итоге остаются дипептиды (состоящие из двух аминокислот), на которые действуют специфические дипептидазы. При этом образуются свободные аминокислоты, которые затем подвергаются всасыванию.

Из других ферментов протеолиза следует упомянуть об эластазе и коллагеназе поджелудочной железы, гидролизующих соответственно эластин и коллаген. Топографически основные процессы гидролиза белков, как и углеводов и жиров, протекают на поверхности слизистой оболочки кишечника (так называемое пристеночное пищеварение по А. М. Уголеву).

ВСАСЫВАНИЕ ПРОДУКТОВ РАСПАДА БЕЛКОВ

Продукты гидролиза белков всасываются в желудочно-кишечном тракте в основном в виде свободных аминокислот. Кинетика всасывания аминокислот в кишечнике в опытах *in vivo* и *in vitro* свидетельствует, что аминокислоты, подобно глюкозе, всасываются свободно с ионами натрия. Для лизина, цистеина и цистина, глицина и пролина, очевидно, существует более одной системы транспорта через стенку кишечника. Некоторые аминокислоты обладают способностью конкурентно тормозить всасывание других аминокислот, что говорит о вероятном существовании общей переносящей системы или одного общего механизма. Так, в присутствии лизина тормозится всасывание аргинина, но не изменяется всасывание аланина, лейцина и глутамата.

Современные представления о проблеме транспорта веществ через мембраны (включая мембраны эпителиальных клеток кишечника) не позволяют точно охарактеризовать молекулярный механизм транспорта аминокислот. Существуют два представления, по-видимому, дополняющих друг друга, о том, что требуемая для активного транспорта энергия поставляется за счет биохимических реакций (это так называемый направляемый метаболизмом транспорт) или за счет энергии переноса другого

транспортируемого вещества, в частности энергии движения ионов Na^+ (или других ионов) в клетку.

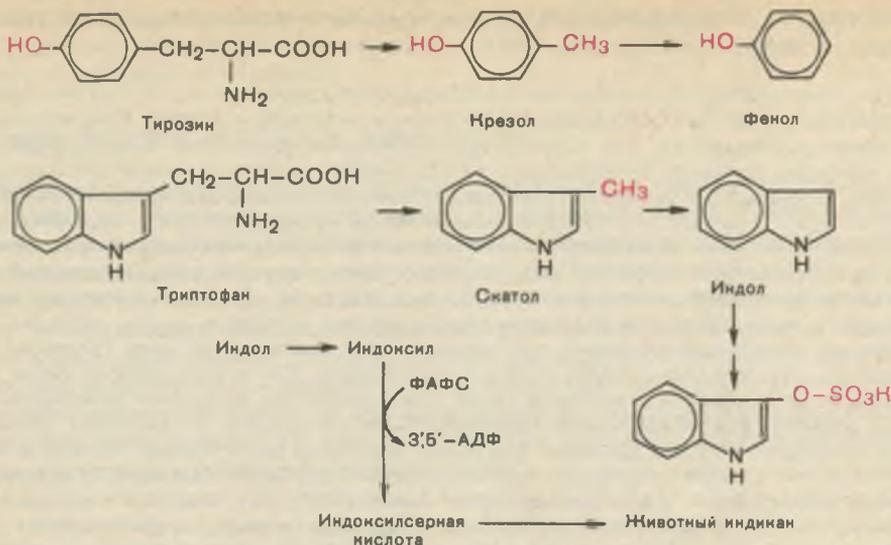
Большое количество информации о специфичности транспорта было получено при анализе наследственных дефектов всасывания аминокислот в кишечнике и почках. Классическим примером является цистинурия, при которой резко повышено содержание в моче цистина, аргинина, орнитина и лизина, обусловленное наследственным дефектом механизма почечной реабсорбции. Поскольку из указанных аминокислот цистин относительно нерастворим в воде, он легко выпадает в осадок в мочеточнике или мочевом пузыре, приводя к образованию цистинных камней со всеми вытекающими нежелательными последствиями (закупорка мочевыводящего тракта, развитие инфекции и др.). Аналогичное нарушение всасывания аминокислот, в частности триптофана, наблюдается при болезни Хартнупа. Доказано всасывание небольших пептидов, в особенности при патологии; так, в опытах *in vitro* и *in vivo* свободный глицин всасывался значительно медленнее, чем дипептид глицилглицин или даже трипептид, образованный из трех остатков глицина. Следует подчеркнуть, что в этих случаях после введения олигопептидов с пищей в порталной крови обнаруживаются свободные аминокислоты. Очевидно, олигопептиды подвергаются гидролизу после всасывания. В некоторых случаях отмечается всасывание больших пептидов. Например, некоторые растительные токсины, в частности абрин и ризин, а также токсины ботулизма, холеры и дифтерии всасываются непосредственно в кровь. Дифтерийный токсин (молекулярная масса 63000 Да), наиболее изученный из этих токсинов, состоит из двух функциональных полипептидов: первого, связывающегося со специфическим рецептором на поверхности чувствительной (восприимчивой) клетки, и второго, проникающего внутрь клетки и оказывающего эффект, который чаще всего сводится к торможению внутриклеточного синтеза белка всего организма. Транспорт этих двух полипептидов или целого токсина через двойной липидный слой биомембран до настоящего времени считается уникальным и загадочным процессом.

Ряд вопросов, однако, до сих пор остается нерешенным, в частности вопросы об относительном количестве всасывания небольших пептидов и месте их гидролиза (на клеточной поверхности или внутриклеточно), а также основная проблема: выяснение молекулярных механизмов работы транспортных систем.

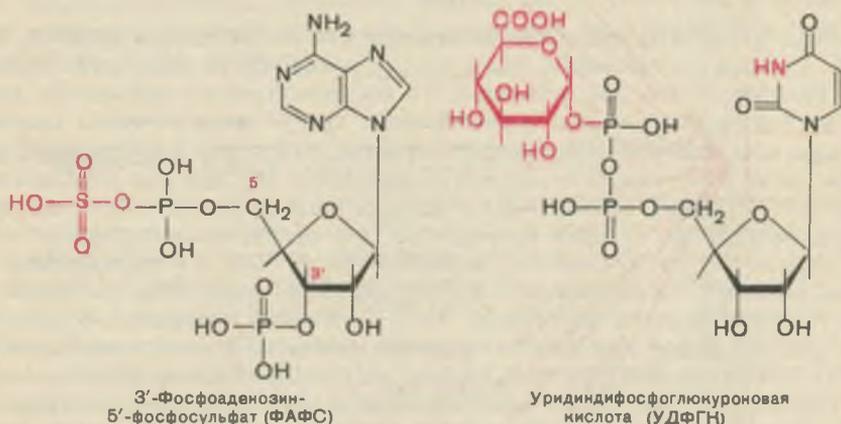
Превращения аминокислот под действием микрофлоры кишечника

Известно, что микроорганизмы кишечника для своего роста также нуждаются в доставке с пищей определенных аминокислот. Микрофлора кишечника располагает набором ферментных систем, отличных от соответствующих ферментов животных тканей и катализирующих самые разнообразные превращения пищевых аминокислот (в том числе несвойственные организму человека, в частности гнилостный распад). Благодаря этому в кишечнике создаются оптимальные условия для образования ядовитых продуктов распада аминокислот — фенола, индола, крезола, скатола, сероводорода, метилмеркаптана, а также нетоксичных для организма соединений — спиртов, аминов, жирных кислот, кетокислот, оксикислот и др. Все эти превращения аминокислот, вызванные деятельностью микроорганизмов кишечника, получили общее название гниения белков в кишечнике. Так, в процессе постепенного и глубокого распада серосодержащих аминокислот (цистина, цистеина и метионина) в кишечнике образуются сероводород (H_2S) и метилмеркаптан CH_3SH . Диаминокислоты — орнитин и лизин — подвергаются процессу декарбоксилирования с образованием аминов, соответственно путресцина и кадаверина.

Из ароматических аминокислот — фенилаланина, тирозина и триптофана — при аналогичном бактериальном декарбоксилировании образуются соответствующие амины: фенилэтиламин, параоксифенилэтиламин (или тирамин) и индолилэтиламин (триптамин). Помимо этого процесса, микробные ферменты кишечника вызывают постепенное разрушение боковых цепей циклических аминокислот, в частности тирозина и триптофана, с образованием ядовитых продуктов обмена, соответственно крезола и фенола, скатола и индола.

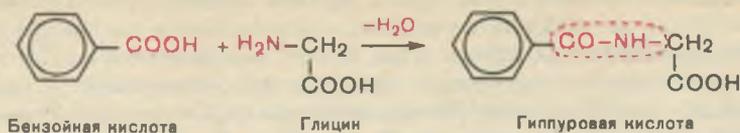


После всасывания эти продукты через воротную вену попадают в печень, где они подвергаются обезвреживанию путем химического связывания с серной или глюкуроновой кислотой с образованием нетоксичных, так называемых парных, кислот (например, фенолсерная кислота или скатоксилсерная кислота). Последние выделяются с мочой. Механизм обезвреживания этих продуктов изучен детально. В печени содержатся специфические ферменты — арилсульфотрансфераза и УДФ-глюкурозилтрансфераза, катализирующие соответственно перенос остатка серной кислоты из ее связанной формы — 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата (ФАФС) и остатка глюкуроновой кислоты также из ее связанной формы — уридилдифосфоглюкуроновой кислоты (УДФГК) на любой из указанных выше продуктов. Ниже представлены химическое строение ФАФС и УДФГК:



Индо́л (как и скато́л) предварительно подвергается окислению в индоксил (соответственно статоксил), который взаимодействует непосредственно в ферментативной реакции с ФАФС или с УДФГК. Так, например, индо́л связывается в виде эфирсерной кислоты, калиевая соль которой получила название животного индикана, выводимого с мочой (см. главу 17). По количеству индикана в моче человека можно сделать заключение о скорости процесса гниения белков в кишечнике и функциональном состоянии печени. О функции печени и ее роли в обезвреживании токсич-

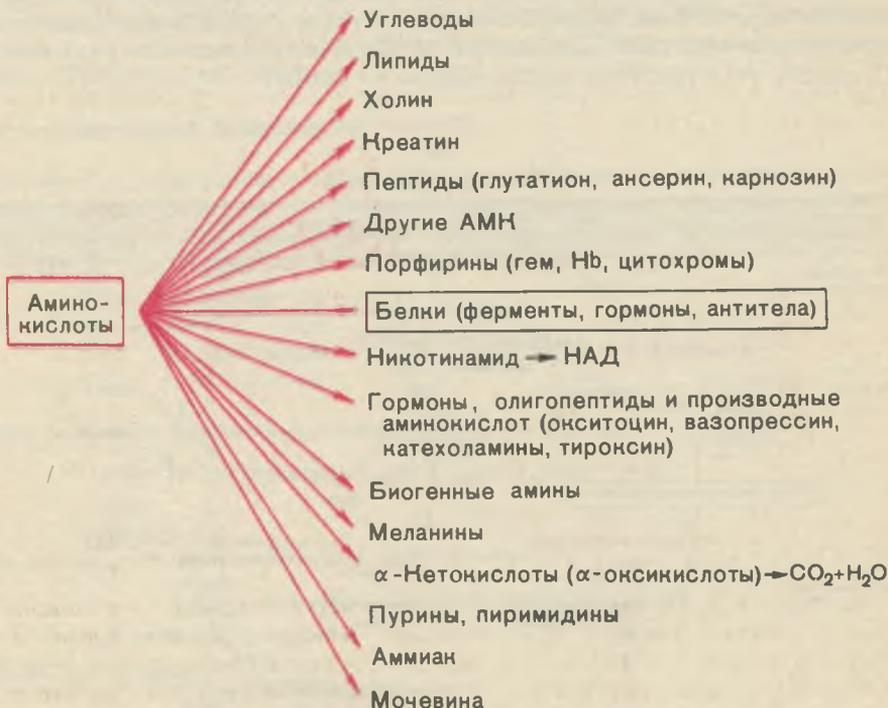
ных продуктов часто также судят по скорости образования и выделения гиппуровой кислоты с мочой после приема бензойной кислоты (см. главу 15).



Таким образом, организм человека и животных обладает рядом защитных механизмов синтеза, биологическая роль которых заключается в обезвреживании токсичных веществ, поступающих в организм извне или образующихся в кишечнике из пищевых продуктов благодаря жизнедеятельности микроорганизмов.

Судьба всосавшихся аминокислот

Приведенная ниже схема дает представление о многообразных путях использования аминокислот после всасывания в кишечнике. Поступив через воротную вену в печень, они прежде всего подвергаются ряду превращений в этом органе, хотя значительная часть аминокислот разносится кровью по всему организму и используется для физиологических целей. В печени аминокислоты используются не только для синтеза собственных белков и белков плазмы крови, но также для синтеза специфических азотсодержащих соединений — пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, креатина, мочевой кислоты, НАД и др.; печень обеспечивает, кроме того, сбалансированный пул свободных аминокислот организма путем синтеза заменимых аминокислот и перераспределения азота в результате трансаминирования.

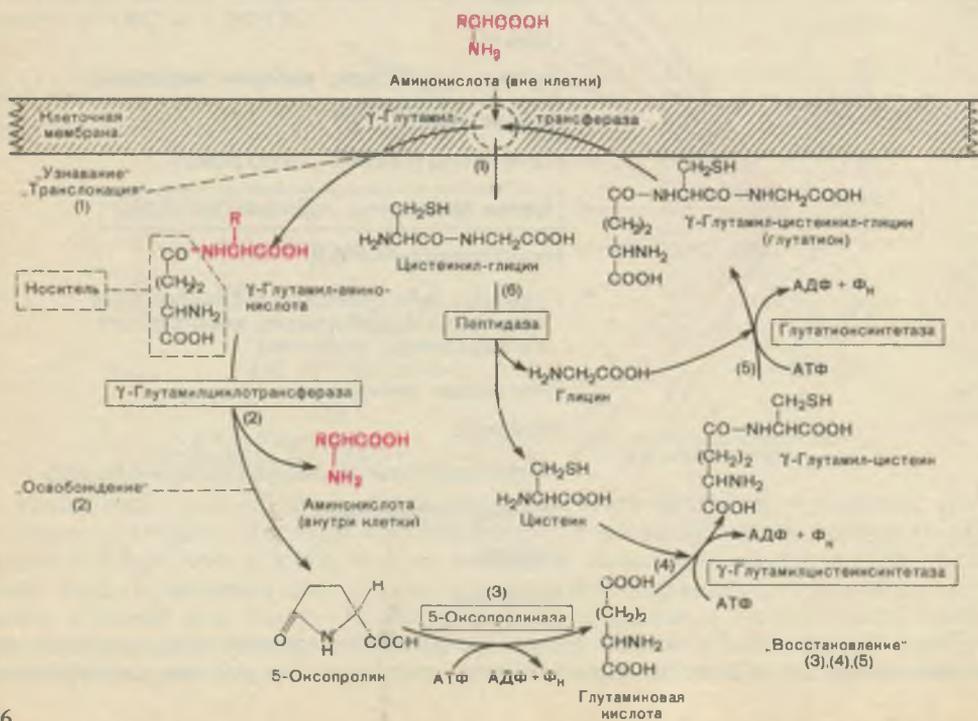


Как видно из представленной схемы, всосавшиеся аминокислоты в первую очередь используются в качестве строительного материала для синтеза специфических

тканевых белков, ферментов, гормонов и других биологически активных соединений. Некоторое количество аминокислот подвергается распаду с образованием конечных продуктов белкового обмена (CO_2 , H_2O и NH_3) и освобождением энергии. Подсчитано, что в организме взрослого человека, находящегося на полноценной диете, освобождается примерно 1200 кДж в сутки за счет окисления около 70 г аминокислот (помимо пищевых, также эндогенных аминокислот, образующихся при гидролизе тканевых белков). Это количество составляет около 10% суточной потребности организма человека в энергии. Количество аминокислот, подвергающихся распаду, зависит как от характера питания, так и от физиологического состояния организма. Например, даже при полном голодании или частичном белковом голодании с мочой постоянно выделяется небольшое количество азотистых веществ, что свидетельствует о непрерывности процессов распада белков тела. Аминокислоты, как и белки, не накапливаются и не откладываются в тканях (наподобие жиров и гликогена), и у взрослого человека при нормальной обеспеченности пищевым белком поддерживается довольно постоянная концентрация аминокислот в крови (см. главу 16). Использование аминокислот в синтезе белка будет подробно рассмотрено в главе 13.

Транспорт аминокислот через клеточные мембраны

Различная скорость проникновения аминокислот через мембраны клеток, установленная при помощи метода меченых атомов, свидетельствует о существовании в организме активной транспортной системы, обеспечивающей перенос аминокислот как через внешнюю клеточную мембрану, так и через систему внутриклеточных мембран. Несмотря на тщательные исследования, проведенные в разных лабораториях, тонкие механизмы функционирования активной системы транспорта аминокислот пока не расшифрованы. Очевидно, что таких систем существует несколько, в частности А. Майстером предложена оригинальная схема транспорта нейтральных аминокислот через плазматическую мембрану, которая, по-видимому, активно функционирует в почечных канальцах, слизистой оболочке кишечника и ряде других тканей. Сущность этой гипотезы можно понять из схемы:



Предполагается, что главную роль в этом процессе играет мембранно-связанный гликопротеин — фермент γ -глутамилтрансфераза, которая катализирует перенос γ -глутамильной группы от глутатиона или другого γ -глутамильного пептида на транспортируемую аминокислоту. Комплекс γ -глутамил-аминокислота после переноса через биомембрану распадается внутри клетки (или внутри субклеточного образования) под действием γ -глутамилциклотрансферазы на свободную аминокислоту и 5-оксопролин (пироглутаминовая кислота), образование которого почти целиком сдвигает реакцию расщепления комплекса вправо. Благодаря возможности ресинтеза глутатиона, требующего затраты энергии АТФ, цикл может повторяться многократно, транспортируя значительные количества аминокислот.

ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ В ТКАНЯХ

Промежуточный метаболизм аминокислот белковых молекул, как и других питательных веществ в живых организмах, включает катаболические (распад до конечных продуктов обмена), анаболические (биосинтез аминокислот) процессы, а также ряд других специфических превращений, сопровождающихся образованием биологически активных соединений. Условно промежуточный метаболизм аминокислот можно разделить на общие пути обмена и индивидуальные превращения отдельных аминокислот.

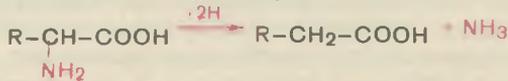
Общие пути обмена аминокислот

Общие пути превращения аминокислот включают реакции дезаминирования, трансаминирования, декарбоксилирования, биосинтеза и рацемизации. Рассмотрим подробно первые четыре реакции, имеющие значение для всех живых организмов. Реакции рацемизации характерны только для микроорганизмов; открыты ферменты, катализирующие рацемизацию ряда аминокислот (Ала, Глу, Про, Мет, Лиз, Сер) и эпимеризацию оксипролина и α, ϵ -диаминопимелиновой кислоты. Физиологическая роль рацемаз микроорганизмов сводится к синтезу D-изомеров аминокислот для построения клеточной оболочки.

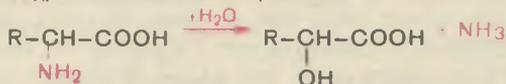
Дезаминирование аминокислот

Доказано существование четырех типов дезаминирования аминокислот (отщепление аминогруппы). Выделены соответствующие ферментные системы, катализирующие эти реакции, и идентифицированы продукты реакции. Во всех случаях NH_2 -группа аминокислоты освобождается в виде аммиака:

I. Восстановительное дезаминирование



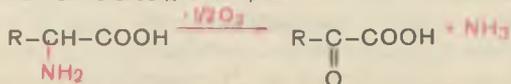
II. Гидролитическое дезаминирование



III. Внутримолекулярное дезаминирование

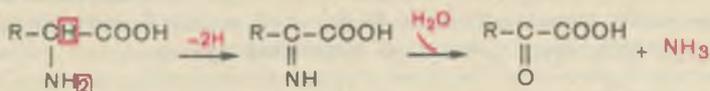


IV. Окислительное дезаминирование

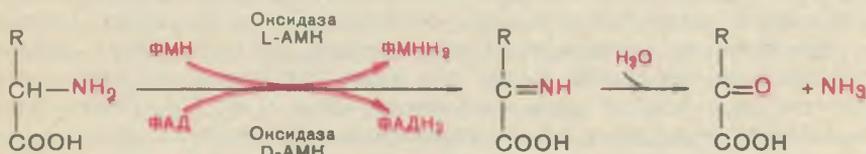


Помимо аммиака, продуктами дезаминирования являются жирные кислоты, оксикислоты и кетокислоты. Для животных тканей, растений и большинства аэробных микроорганизмов преобладающим типом реакций является окислительное дезаминирование аминокислот, за исключением гистидина, подвергающегося внутри-молекулярному дезаминированию.

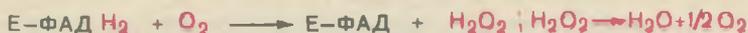
Рассмотрим более подробно механизм окислительного дезаминирования аминокислот, протекающего в две стадии:



Первая стадия является ферментативной и завершается образованием неустойчивого промежуточного продукта (иминокислота), который на второй стадии спонтанно без участия фермента, но в присутствии воды распадается на аммиак и α -кетокислоту. Следует указать, что оксидазы аминокислот (L- и D-изомеров) являются сложными флавопротеинами, содержащими в качестве кофермента ФМН или ФАД, которые выполняют в этой реакции роль акцепторов двух электронов и протонов, отщепляющихся от аминокислоты. Оксидазы L-аминокислот могут содержать как ФМН, так и ФАД, а оксидазы D-аминокислот только ФАД в качестве простетической группы. Схематически реакции окислительного дезаминирования аминокислот с участием коферментов могут быть представлены в следующем виде:



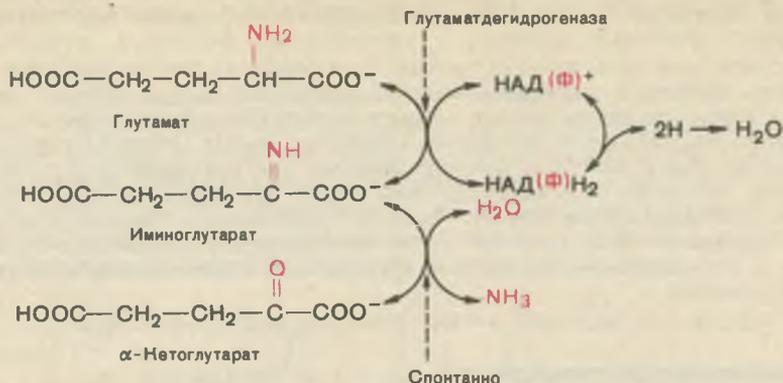
Восстановленные флавиннуклеотиды оксидаз L- и D-аминокислот могут непосредственно окисляться молекулярным кислородом, образуя перекись водорода, которая подвергается расщеплению под действием каталазы на воду и кислород:



Впервые в лаборатории Д. Грина из ткани печени и почек крыс была выделена оксидаза, катализирующая дезаминирование 12 природных (L-изомеров) аминокислот. Оказалось, однако, что этот фермент имеет оптимум pH действия в щелочной среде (pH 10.0) и что при физиологических значениях pH ее активность на порядок ниже, чем при pH 10.0. В тканях животных и человека отсутствует подобная среда, поэтому оксидазе L-аминокислот принадлежит ограниченная роль в процессе окислительного дезаминирования природных аминокислот. В животных тканях оксидазным путем со значительно большей скоростью дезаминируются D-изомеры аминокислот. Эти данные подтвердились после того, как из животных тканей был выделен специфический фермент оксидаза D-аминокислот, который в отличие от оксидазы L-аминокислот оказался высокоактивным при физиологических значениях pH среды. Не до конца ясным остается вопрос о том, каково назначение столь активной оксидазы D-аминокислот в тканях, если поступающие с пищей белки и белки тела животных и человека состоят исключительно из природных (L-изомеров) аминокислот.

В животных тканях Г. Эйлером открыт высокоактивный при физиологических значениях pH специфический фермент (глутаматдегидрогеназа), катализирующий окислительное дезаминирование L-глутаминовой кислоты. Он является анаэробным ферментом и чрезвычайно широко распространен во всех живых объектах. В качестве кофермента глутаматдегидрогеназа содержит НАД (или НАДФ). Реакция включает анаэробную фазу дегидрирования глутаминовой кислоты с образованием

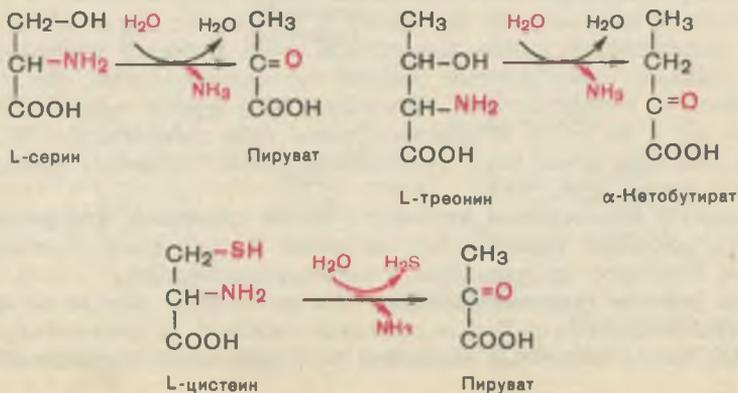
промежуточного продукта — иминоглутаровой кислоты — и спонтанный гидролиз последней на аммиак и α -кетоглутаровую кислоту в соответствии со следующей схемой:



Первая стадия окисления глутаминовой кислоты аналогична реакции окислительного дезаминирования; восстановленный НАД(Ф)H₂ далее окисляется при участии флавиновых ферментов и цитохромной системы (см. главу 8) с образованием конечного продукта — воды. Образовавшийся аммиак благодаря обратимости ферментативной реакции в присутствии НАДФH₂ может участвовать в восстановительном аминировании α -кетоглутаровой кислоты с образованием глутаминовой кислоты. Различают три разных типа глутаматдегидрогеназ: один из них используют в качестве кофермента как НАД, так и НАДФ (клетки животных); два других используют или НАД, или НАДФ (микроорганизмы, клетки растений и грибов), соответственно катализируя дезаминирование или биосинтез глутамата.

Глутаматдегидрогеназа животных тканей является одним из наиболее изученных ферментов азотистого обмена. Это олигомерный фермент (молекулярная масса 312 000 Да), состоящий из 6 субъединиц (молекулярная масса каждой около 52 000 Да), проявляющий свою основную активность только в мультимерной форме. При диссоциации этой молекулы на субъединицы, наступающей легко в присутствии НАДH₂, ГТФ и некоторых стероидных гормонов, фермент теряет свою главную глутаматдегидрогеназную функцию, но приобретает способность дезаминировать ряд других аминокислот. Это свидетельствует об аллостерической природе глутаматдегидрогеназы, действующей как регуляторный фермент в аминокислотном обмене.

Помимо перечисленных выше четырех типов дезаминирования аминокислот и ферментов, катализирующих эти превращения, в животных тканях и печени человека открыты также три специфических фермента (серин- и треониндегидратазы и цистатионин- γ -лиаза), катализирующих неокислительное дезаминирование серина, треонина и цистеина:

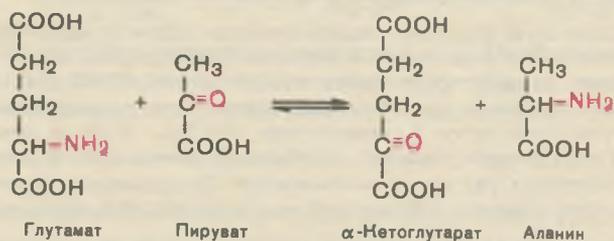


Конечными продуктами реакции являются пируват и α -кетобутират, аммиак и сероводород. Поскольку указанные ферменты требуют присутствия пиридоксальфосфата в качестве кофермента, реакция неокислительного дезаминирования, вероятнее всего, протекает с образованием шиффовых оснований как промежуточных метаболитов.

Наиболее изученным ферментом является треониндегидратаза, которая оказалась не только аллостерическим ферментом, но и наряду с триптофан-2,3-диоксигеназой, тирозинами-нотрансферазой, индуцибельным ферментом в животных тканях (индукция синтеза ферментов *de novo* является общим свойством микроорганизмов). Так, при скармливании крысам гидролизата казеина активность треониндегидратазы печени повышается почти в 300 раз. Этот синтез тормозится ингибитором белкового синтеза — пурамицином. Поскольку индукция почти полностью тормозится также глюкозой пищи, треонингидратаза, по-видимому, является ответственной за глюконеогенез, так как α -кетобутират легко превращается в пируват и соответственно в глюкозу.

Трансаминирование аминокислот

Под трансаминированием подразумевают реакции межмолекулярного переноса аминогруппы (NH_2) от аминокислоты на α -кетокислоту без промежуточного образования аммиака. Впервые реакции трансаминирования (прежнее название переаминирование) были открыты в 1937 г. советскими учеными А. Е. Браунштейном и М. Г. Крицман при изучении дезаминирования глутаминовой кислоты в мышечной ткани. Было замечено, что при добавлении к гомогенату мышц глутаминовой и пировиноградной кислот образуются α -кетоглутаровая кислота и аланин без промежуточного образования аммиака; добавление аланина и α -кетоглутаровой кислоты соответственно приводило к образованию пировиноградной и глутаминовой кислот.

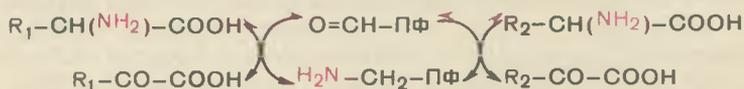


Реакции трансаминирования являются обратимыми и, как выяснилось позже, универсальными для всех живых организмов. Эти реакции протекают при участии специфических ферментов, названных А. Е. Браунштейном аминотрансферазами (по современной классификации аминотрансферазы или трансаминазы). Теоретически реакции трансаминирования возможны между любой аминокислотой, однако наиболее интенсивно они протекают в том случае, когда один из партнеров представлен дикарбоновой аминокислотой или кетокислотой. В тканях животных и у микроорганизмов доказано существование реакций трансаминирования между монокарбоновыми аминокислотами и кетокислотами. Донорами NH_2 -группы могут также служить не только α -, но и β -, γ -, δ - и ω -аминогруппы ряда аминокислот. В лаборатории А. Майстера доказано, кроме того, трансаминирование глутамина и аспарагина с кетокислотами в тканях животных.

В переносе аминогруппы активное участие принимает кофермент трансаминаз — пиридоксальфосфат (производное витамина B_6 ; см. главу 5), который в процессе реакции обратимо превращается в пиридоксаминфосфат.

Механизм реакции трансаминирования. Общую теорию механизма ферментативного трансаминирования разработали советские ученые А. Е. Браунштейн и М. М. Шемьякин. Одновременно подобный механизм был предложен американским биохими-

ком Э. Снеллом. Все трансминазы (как и декарбоксилазы аминокислот) содержат один и тот же кофермент — пиридоксальфосфат. Для реакций трансминирования характерен общий механизм. Специфичность трансминаз обеспечивается белковым компонентом. Ферменты трансминирования катализируют перенос NH_2 -группы не на α -кетокислоту, а сначала на кофермент — пиридоксальфосфат; образовавшееся промежуточное соединение (шиффово основание) подвергается внутримолекулярным превращениям (лабилизация α -водородного атома, перераспределение энергии связи), приводящим к освобождению α -кетокислоты и пиридоксаминфосфата; последний на второй стадии реакции реагирует с любой другой α -кетокислотой, что через те же стадии образования промежуточных соединений (идущих в обратном направлении) приводит к синтезу новой аминокислоты и освобождению пиридоксальфосфата. Опуская промежуточные стадии образования шиффовых оснований, обе стадии реакции трансминирования можно представить в виде общей схемы:



Детальный механизм действия трансминаз представлен на рис. 11.2.

В связи с тем, что во всех пиридоксальных ферментах (включая трансминазы) карбонильная группа кофермента ($-\text{CHO}$) оказалась связанной с ϵ -аминогруппой лизина белковой части, в классический механизм реакции трансминирования А. Е. Браунштейн и Э. Снелл внесли следующее дополнение. Оказалось, что взаимодействие между субстратом, т. е. L-аминокисло-

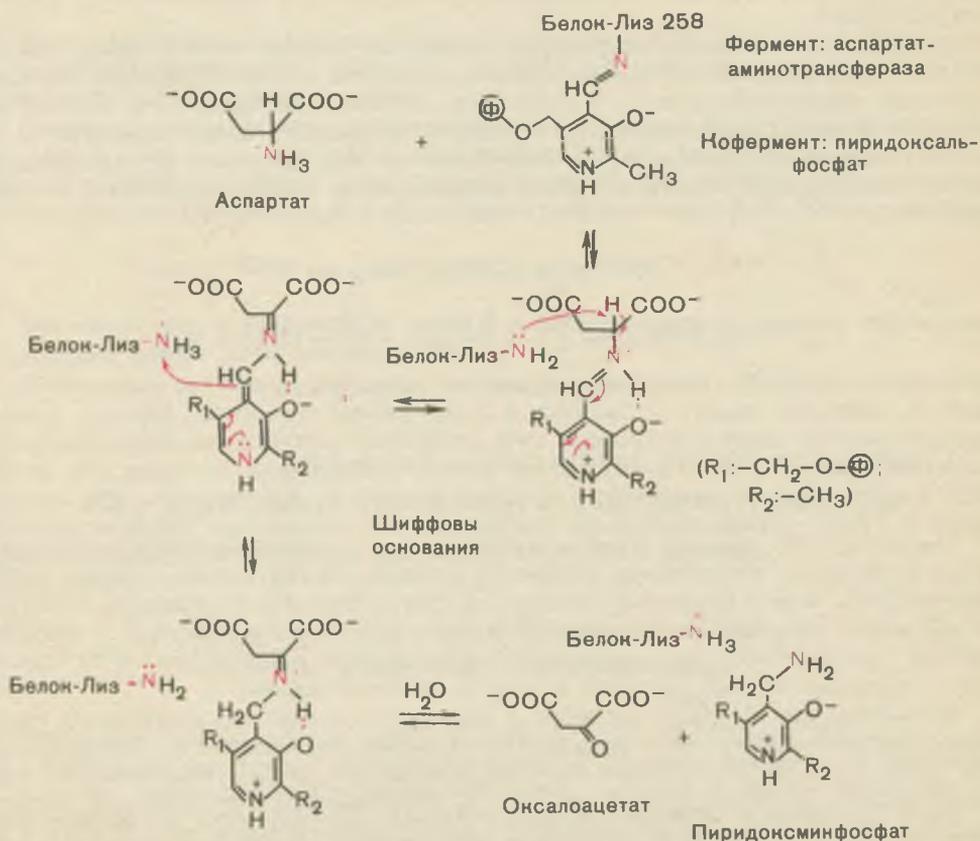


Рис. 11.2. Механизм действия пиридоксальфосфата в аспартатаминотрансферазе.

той (на схеме аспарат) и пиридоксальфосфатом, происходит не путем конденсации с выделением молекулы воды, а путем реакции замещения, при которой NH_2 -группа субстрата вытесняет $\epsilon\text{-NH}_2$ -группу лизина в молекуле ферментного белка, что приводит к формированию пиридоксальфосфатного комплекса.

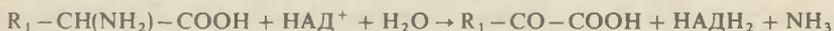
Существование представленного механизма реакции трансаминирования доказано разнообразными методами, включая методы спектрального анализа по идентификации промежуточных альдиминных и кетиминных производных пиридоксальфосфата.

Роль трансаминаз и реакций трансаминирования в обмене аминокислот. Чрезвычайно широкое распространение трансаминаз в животных тканях, у микроорганизмов и растений, их высокая резистентность к физическим, химическим и биологическим воздействиям, абсолютная стереохимическая специфичность по отношению к L-аминокислотам, а также высокая каталитическая активность в процессах трансаминирования послужили предметом детального исследования роли этих ферментов в обмене аминокислот. Выше было указано, что при физиологических значениях pH среды активность оксидазы L-аминокислот резко снижена. Учитывая это обстоятельство, а также высокую скорость протекания реакции трансаминирования, А. Е. Браунштейн выдвинул гипотезу о возможности существования в животных тканях непрямого пути дезаминирования аминокислот через реакции трансаминирования, названного им процессом трансдезаминирования. Основой для выдвижения этой гипотезы послужили также данные Г. Эйлера о том, что в животных тканях из всех природных аминокислот с высокой скоростью дезаминируется только L-глутаминовая кислота в реакции, катализируемой высокоактивной и специфической глутаматдегидрогеназой.

Согласно этой гипотезе, получившей экспериментальное подтверждение, все или почти все природные аминокислоты сначала реагируют с α -кетоглутаровой кислотой в реакции трансаминирования с образованием глутаминовой кислоты и соответствующей кетокислоты. Образовавшаяся глутаминовая кислота затем подвергается непосредственному окислительному дезаминированию под действием глутаматдегидрогеназы. Схематически механизм трансдезаминирования можно представить в следующем виде:



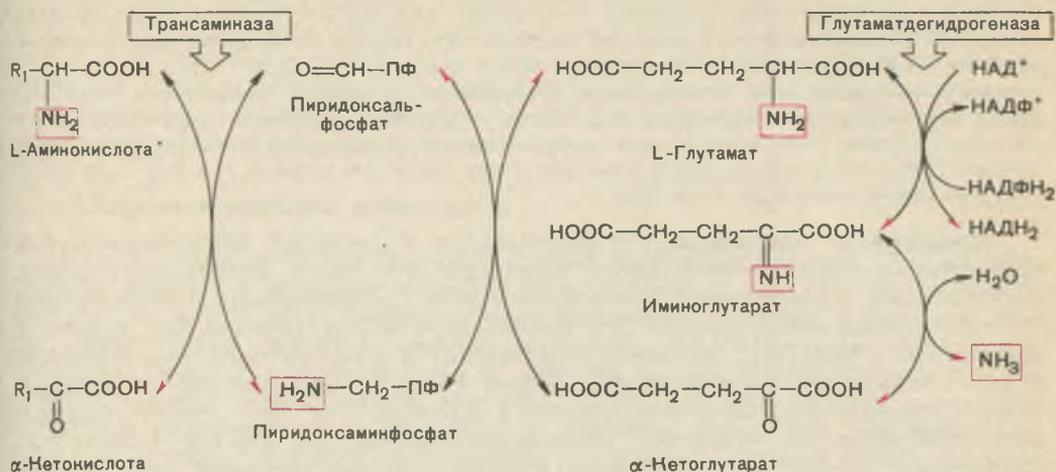
Суммарная реакция при этом сводится к следующей:



Поскольку обе реакции (трансаминирование и дезаминирование глутаминовой кислоты) являются обратимыми, создаются условия для синтеза по существу любой аминокислоты, если в организме имеются соответствующие α -кетокислоты. Известно, что организм животных и человека не наделен способностью синтеза углеродных скелетов (α -кетокислот), так называемых незаменимых аминокислот; этой способностью обладают только растения и многие микроорганизмы.

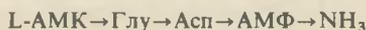
Механизм, при помощи которого в живых организмах осуществляется синтез природных аминокислот из α -кетокислот и аммиака, был назван А. Е. Браунштейном трансдезаминированием. Сущность его сводится к восстановительному аминированию α -кетоглутаровой кислоты с образованием глутаминовой кислоты (реакцию катализирует НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназа, работающая в режиме синтеза) и к последующему трансаминированию глутамата с любой α -кето-

кислотой. В результате образуется L-аминокислота, соответствующая исходной кетокислоте, и вновь освобождается α -кетоглутаровая кислота, которая может акцептировать новую молекулу аммиака. Роль реакций трансминирования как в дезаминировании, так и в биосинтезе аминокислот может быть представлена в виде следующей схемы:



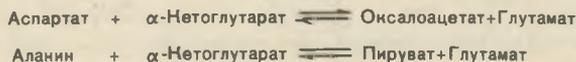
Видно, что трансминазы катализируют опосредованное через глутаматдегидрогеназу как дезаминирование природных аминокислот (красные стрелки), так и биосинтез аминокислот (черные стрелки).

Получены доказательства существования в организме теплокровных животных еще одного механизма непрямого дезаминирования L-аминокислот, при котором Глу, Асп и АМФ выполняют роль системы переноса NH_2 -группы; гидролитическое дезаминирование АМФ приводит к образованию инозинмонофосфата (ИМФ) и аммиака:



Возможно, что в аналогичной системе в качестве промежуточного переносчика NH_2 -группы вместо АМФ участвует НАД.

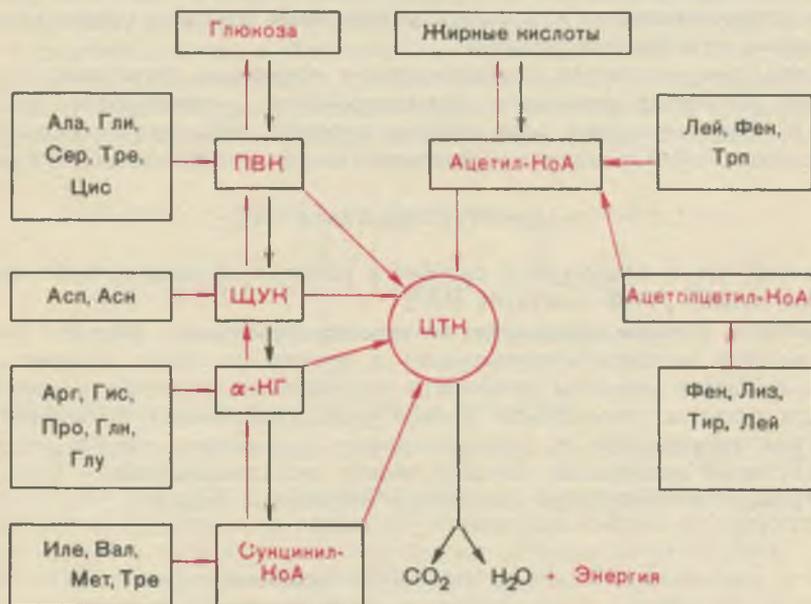
Клиническое значение определения активности трансминаз. Широкое распространение и высокая активность трансминаз в органах и тканях человека, а также сравнительно низкие величины активности этих ферментов в крови послужили основанием для попыток определения уровня ряда трансминаз в сыворотке крови человека при органических и функциональных поражениях разных органов. Для клинических целей наибольшее значение имеют две трансминазы – АсАТ и АлАТ, катализирующие соответственно следующие обратимые реакции:



В сыворотке крови здоровых людей активность этих трансминаз в тысячи раз ниже, чем в паренхиматозных органах. Поэтому органические поражения при острых и хронических заболеваниях, сопровождающиеся деструкцией клеток, приводят к выходу трансминаз из очага поражения в кровь. Так, при инфаркте миокарда уровень АсАТ сыворотки крови уже через 3–5 ч после наступления инфаркта резко повышается (в 20–30 раз). Максимум активности обеих трансминаз крови приходится на конец первых суток, а уже через 2–3 дня

при благоприятном исходе болезни уровень сывороточных трансаминаз возвращается к норме. Напротив, при затяжном процессе или наступлении повторного инфаркта миокарда наблюдается новый пик повышения активности этих ферментов в крови. Этим объясняется тот факт, что в клинике трансаминазный тест используется не только для постановки диагноза заболевания, но и для прогноза и проверки эффективности метода лечения¹. При гепатитах также наблюдается гипертрансаминаземия (за счет преимущественного повышения уровня АЛАТ), но она имеет более умеренный и затяжной характер, и повышение трансаминазной активности в сыворотке крови происходит медленно. При различного рода коронарной недостаточности (стенокардия, пороки сердца и др., кроме инфаркта миокарда) гипертрансаминаземия или не наблюдается, или незначительна. Определение активности трансаминаз сыворотки крови при заболеваниях сердца следует отнести к дифференциально-диагностическим лабораторным тестам. Повышение уровня трансаминаз сыворотки крови отмечено, кроме того, при некоторых заболеваниях мышц, в частности при обширных травмах, гангрене конечностей и прогрессивной мышечной дистрофии.

Превращения α -кетокислот. Образовавшиеся в процессе дезаминирования и трансдезаминирования α -кетокислоты подвергаются в тканях животных различным превращениям, прежде всего восстановительному аминированию с образованием соответствующей аминокислоты. Это так называемый синтетический путь превращения. Опыты с перфузией растворов α -кетокислот и аммиака через изолированную печень показали, что в оттекающей из печени жидкости действительно открываются соответствующие исходным кетокислотам L-аминокислоты. Этот синтез протекает преимущественно по механизму трансреаминирования при участии трансаминаз. Существуют, кроме того, гликогенные, кетогенные и окислительные пути, ведущие к образованию соответственно глюкозы, жирных кислот, кетоновых тел и компонентов цикла трикарбоновых кислот. Ниже эти процессы представлены в виде схемы:



Углеродные скелеты аминокислот могут включаться в ЦТК через следующие соединения: ацетил-КоА (некоторые опосредованно через ПВК, пируват), ЩУК (щавелевоуксусную кислоту, оксалоацетат), α -КГ (α -кетоглутарат) и сукцинил-КоА.

¹ В настоящее время с диагностической целью в клинике внутренних болезней широко используют наборы химических реактивов для быстрого (экспрессного) определения активности трансаминаз в сыворотке крови.

Пять аминокислот (Фен, Лиз, Лей, Трп и Тир) считаются «кетогенными», поскольку они являются предшественниками кетоновых тел, в частности ацетоуксусной кислоты, в то время как большинство других аминокислот, обозначаемых как «гликогенные», служат в организме источником углеводов, в частности глюкозы. Подобный синтез углеводов de novo наблюдается при некоторых патологических состояниях, например при сахарном диабете, а также при гиперфункции коркового вещества надпочечников и введении глюкокортикоидов (см. главу 6). Такое разделение аминокислот на кетогенные и гликогенные носит, однако, условный характер, поскольку некоторые углеродные атомы Лиз, Трп, Фен и Тир могут включаться в молекулы предшественников глюкозы, например Фен и Тир — в фумарат. Истинно кетогенной аминокислотой является только лейцин.

Декарбоксилирование аминокислот

Процесс отщепления карбоксильной группы аминокислот в виде CO_2 получил название декарбоксилирования. Несмотря на ограниченный круг субстратов (аминокислот и их производных), подвергающихся декарбоксилированию в животных тканях, образующиеся продукты реакции, названные биогенными аминами, оказывают сильное фармакологическое действие на множество физиологических функций человека и животных. В животных тканях показано декарбоксилирование следующих аминокислот и их производных: тирозина, триптофана, 5-окситриптофана, валина, серина, гистидина, глутаминовой и γ -оксиглутаминовой кислот, 3,4-диоксифенилаланина, цистеина, аргинина, орнитина, S-аденозилметионина и α -аминомалонической кислоты. Помимо этого, у микроорганизмов и растений открыто декарбоксилирование ряда других аминокислот.

В живых организмах открыты четыре типа декарбоксилирования аминокислот.

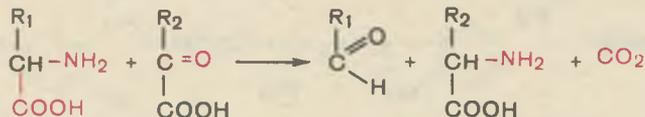
1. α -Декарбоксилирование, характерное для тканей животных, при котором от аминокислот отщепляется карбоксильная группа, стоящая по соседству с α -углеродным атомом. Продуктами реакции являются CO_2 и биогенные амины:



2. ω -Декарбоксилирование, свойственное микроорганизмам. Например, из аспарагиновой кислоты этим путем образуется α -аланин:

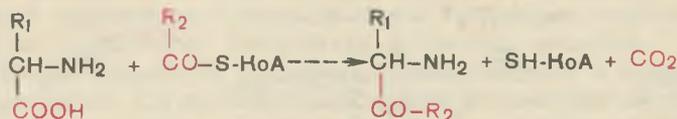


3. Декарбоксилирование, связанное с реакцией трансаминирования:



В этой реакции образуется альдегид и новая аминокислота, соответствующая исходной кетокислоте.

4. Декарбоксилирование, связанное с реакцией конденсации двух молекул:

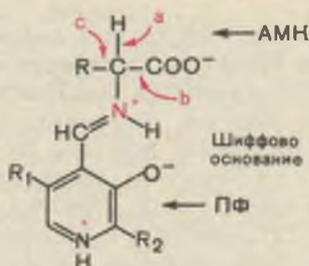


Эта реакция в тканях животных осуществляется при синтезе δ -аминолевулиновой кислоты из глицина и сукцинил-КоА (см. главу 12) и при синтезе сфинголипидов, а также у растений при синтезе биотина.

Реакции декарбоксилирования в отличие от других процессов промежуточного обмена аминокислот являются необратимыми. Они катализируются специфическими

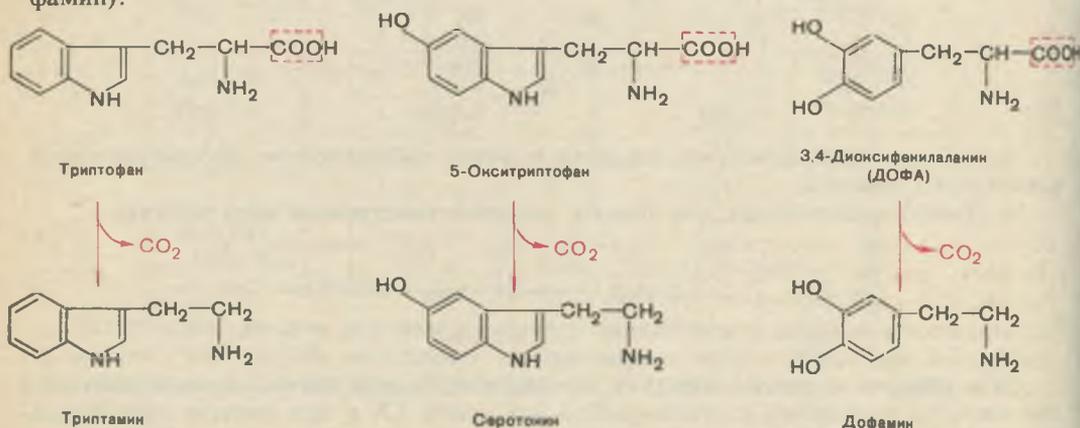
ферментами – декарбоксилазами аминокислот, отличающимися от декарбоксилаз α -кетокислот (см. главу 9) как белковым компонентом, так и природой кофермента. Декарбоксилазы аминокислот состоят из белковой части, обеспечивающей специфичность действия, и простетической группы, представленной пиридоксальфосфатом (ПФ), как и у трансаминаз. Таким образом, в двух совершенно различных процессах обмена аминокислот участвует один и тот же кофермент. Исключение составляют две декарбоксилазы – гистидиндекарбоксилаза *Micrococcus* и *Lactobacillus* и аденозилметиониндекарбоксилаза *E. coli*, содержащие (как показали С. Р. Мардашев и Э. Снелл) вместо ПФ остаток пировиноградной кислоты¹.

Механизм реакции декарбоксилирования аминокислот в соответствии с общей теорией пиридоксалевого катализа (см. рис. 11.2) сводится к образованию ПФ-субстратного комплекса, представленного как и в реакциях трансаминирования шиффовым основанием ПФ и аминокислоты.



Образование подобного комплекса в сочетании с некоторым оттягиванием электронов белковой частью молекулы фермента сопровождается лабильзацией одной из трех связей при α -углеродном атоме, благодаря чему аминокислота способна вступать в реакции: трансаминирования (а), декарбоксилирования (в) и альдольного расщепления (с).

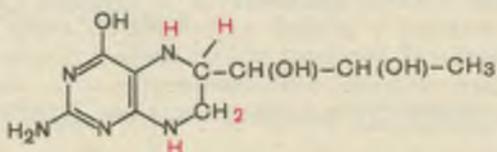
Ниже будут представлены отдельные примеры декарбоксилирования аминокислот, в частности тех, продукты реакции которых оказывают сильное фармакологическое действие. Одним из хорошо изученных ферментов является декарбоксилаза ароматических аминокислот; она не обладает строгой субстратной специфичностью и катализирует декарбоксилирование L-изомеров триптофана, 5-окситриптофана и 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА); продуктами реакций, помимо CO_2 , являются соответственно триптамин, серотонин и диоксифенилэтиламин (дофамин):



¹ Предполагается, что некоторые декарбоксилазы животных тканей, декарбоксилирующие, например, S-аденозилметионин, фосфатидилсерин и аспартат, также содержат пируват.

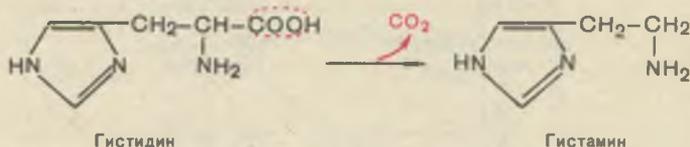
Декарбоксилаза ароматических аминокислот получена в чистом виде (молекулярная масса 112 000 Да); кофермент — ПФ. В больших количествах она содержится в надпочечниках и ЦНС; играет важную роль в регуляции содержания биогенных аминов. Образующийся из 5-окситриптофана серотонин оказался высокоактивным биогенным амином, наделенным сосудосуживающим действием. Он участвует также в регуляции артериального давления, температуры тела, дыхания, в почечной фильтрации, является медиатором нервных процессов в ЦНС. Некоторые авторы считают серотонин причастным к развитию аллергии, демпинг-синдрома, токсикоза беременности, карциноидного синдрома и геморрагических диатезов.

Относительно продукта декарбоксилазной реакции — дофамина — следует прежде всего указать, что он является предшественником катехоламинов (норадреналина и адреналина). Источником ДОФА в организме является тирозин, который под действием специфической гидроксилазы превращается в 3,4-диоксифенилаланин. Тирозин-3-монооксигеназа открыта в надпочечниках, ткани мозга и периферической нервной системы. Простетической группой тирозин-монооксигеназы, как и дофамин-монооксигеназы (последняя катализирует превращение дофамина в норадреналин) является тетрагидробиоптерин, имеющий следующее строение:



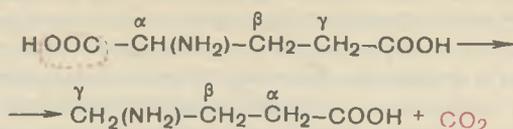
Физиологическая роль тирозин-3-монооксигеназы очень высока, поскольку катализируемая этим ферментом реакция определяет скорость биосинтеза катехоламинов, регулирующих деятельность сердечно-сосудистой системы. В медицинской практике широко используются ингибиторы декарбоксилазы ароматических аминокислот, в частности α -метилдофа (альдомет), вызывающий снижение кровяного давления.

В животных тканях с высокой скоростью протекает декарбоксилирование гистидина под действием специфической декарбоксилазы.



Гистамин обладает широким спектром биологического действия. По сосудорасширяющему действию на кровеносные сосуды он резко отличается от других биогенных аминов, оказывающих сосудосуживающее действие. Большое количество гистамина образуется в области воспаления, что имеет определенный биологический смысл. Вызывая расширение сосудов в очаге воспаления, гистамин тем самым ускоряет приток лейкоцитов, способствуя активации защитных сил организма. Гистамин, кроме того, участвует в секреции соляной кислоты в желудке, что широко используется в клинике при изучении секреторной деятельности желудка (гистаминовая проба). Он имеет прямое отношение к явлениям сенсibilизации и десенсибилизации. При повышенной чувствительности к гистамину в клинике используются антигистаминные препараты (санорин, димедрол и др.), оказывающие влияние на рецепторы сосудов. Гистамину приписывают, кроме того, роль медиатора боли. Болевой синдром — сложный процесс, детали которого пока не выяснены, но участие в нем гистамина не подлежит сомнению.

В клинической практике широко используется, кроме того, продукт α -декарбоксилирования глутаминовой кислоты — γ -аминоасляная кислота (ГАМК). Фермент, катализирующий эту реакцию (глутаматдекарбоксидаза), является высокоспецифичным:

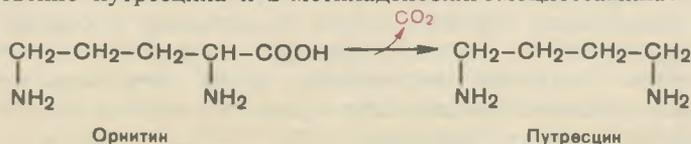


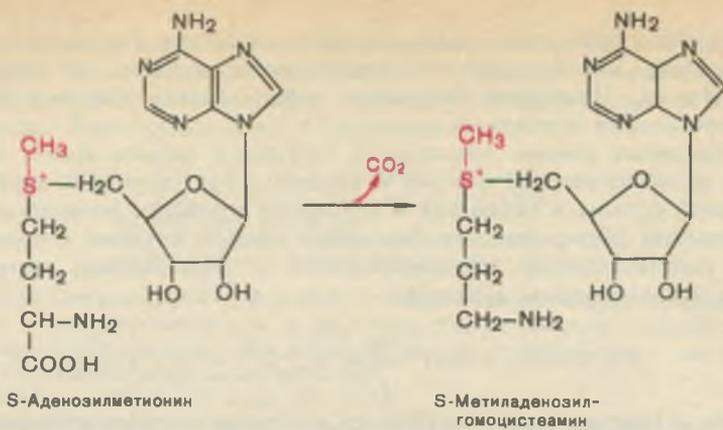
Интерес к ГАМК связан с тормозящим ее действием на деятельность ЦНС. Больше всего ГАМК и глутаматдекарбоксилазы обнаружено в сером веществе коры большого мозга, в то время как белое вещество мозга и периферическая нервная система их почти не содержат. Введение ГАМК в организм вызывает разлитой тормозной процесс в коре (центральное торможение) и у животных приводит к утрате условных рефлексов. ГАМК используется в клинике при лечении некоторых заболеваний ЦНС, связанных с резким возбуждением коры большого мозга. Так, в практике лечения эпилепсии хороший эффект (резкое сокращение частоты эпилептических припадков) дает введение глутаминовой кислоты. Как оказалось, лечебный эффект обусловлен не самой глутаминовой кислотой, а продуктом ее декарбоксилирования — ГАМК.

В животных тканях с высокой скоростью декарбоксилируются также два производных цистеина — цистеиновая и цистеинсульфиновая кислоты. В процессе этих специфических ферментативных реакций образуется таурин, который используется в организме для синтеза парных желчных кислот (см. главу 10):

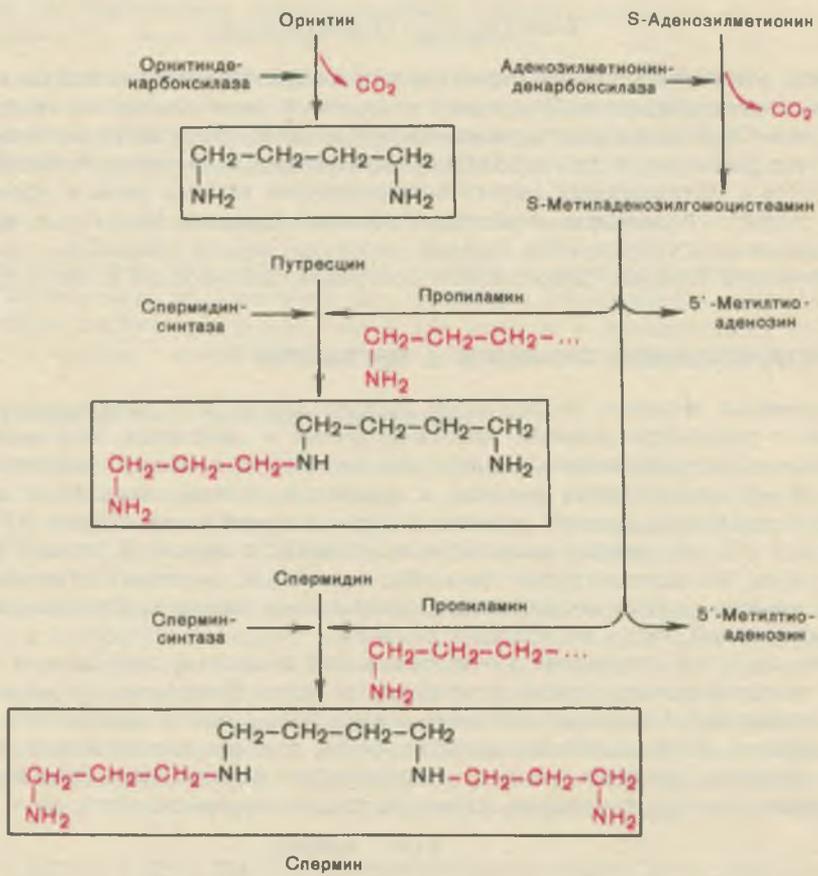


Следует отметить еще два недавно открытых в тканях животных фермента, катализирующих декарбоксилирование орнитина и S-аденозилметионина с образованием соответственно путресцина и S-метиладенозилгомоцистеина:





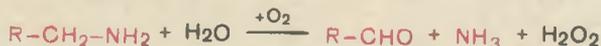
Значение этих реакций, катализируемых орнитиндекарбоксилазой и аденозилметиониндекарбоксилазой тканей животных, огромно, если учесть, что путресцин и аминокпропильная часть S-метиладенозилгомоцистеина используются для синтеза полиаминов – спермидина и спермина.



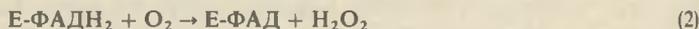
Полиамины, к которым относят также диамин – путресцин, играют важную роль в процессах пролиферации клеток, регуляции синтеза полимерных молекул (нуклеиновых кислот и белков), хотя конкретный механизм участия их в указанных процессах не всегда ясен.

Таким образом, биогенные амины являются сильными фармакологически активными веществами, оказывающими разностороннее влияние на физиологические функции организма. Некоторые биогенные амины нашли широкое применение в качестве лекарственных препаратов.

Распад биогенных аминов. Накопление биогенных аминов может отрицательно сказаться на физиологическом статусе и вызывать ряд серьезных нарушений в организме. Однако органы и ткани как и целостный организм располагают специальными механизмами обезвреживания биогенных аминов, которые в общем виде сводятся к их окислительному дезаминированию с образованием соответствующих альдегидов и освобождением аммиака:



Ферменты, катализирующие эти реакции, получили названия моноамин- и диаминооксидаз. Более подробно изучен механизм окислительного дезаминирования моноаминов. Этот ферментативный процесс является необратимым и протекает в две стадии:

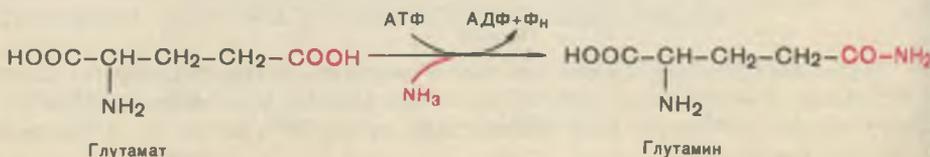


Первая, анаэробная, стадия характеризуется образованием альдегида, аммиака и восстановленного фермента. Последний в аэробной фазе окисляется молекулярным кислородом. Образовавшаяся перекись водорода далее распадается на воду и кислород. Моноаминоксидаза (МАО), ФАД-содержащий фермент, преимущественно локализуется в митохондриях, играет исключительно важную роль в организме, регулируя скорость биосинтеза и распада биогенных аминов. Некоторые ингибиторы моноаминоксидазы (ипраниазид, гармин, паргилин) нашли применение при лечении гипертонической болезни, депрессивных состояний, шизофрении и др.

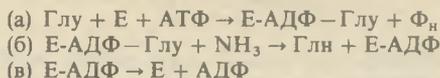
Обезвреживание аммиака в организме

В организме человека подвергается распаду около 70 г аминокислот в сутки; при этом в результате реакций дезаминирования и окисления биогенных аминов освобождается большое количество аммиака, являющегося высокотоксичным соединением. Поэтому концентрация аммиака в организме должна сохраняться на низком уровне. Действительно, уровень аммиака в норме в крови не превышает 60 мкмоль/л (это почти в 100 раз меньше концентрации глюкозы в крови). В опытах на кроликах показано, что концентрация аммиака 3 ммоль/л является летальной. Таким образом, аммиак должен подвергаться связыванию в тканях с образованием нетоксичных соединений, легко выделяемых с мочой.

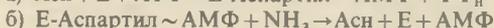
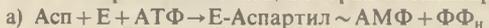
Одним из путей связывания и обезвреживания аммиака в организме, в частности в мозге, сетчатке, почках, печени и мышцах, является биосинтез глутамина (и, возможно, аспарагина). Поскольку глутамин и аспарагин с мочой выделяются в небольшом количестве, было высказано предположение, что они выполняют скорее транспортную функцию переноса аммиака в нетоксичной форме. Ниже приводится уравнение реакции синтеза глутамина, катализируемого глутаминсинтетазой:



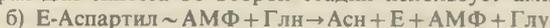
Механизм этой синтетазной реакции, подробно изученный А. Майстером, включает ряд стадий. Если фермент обозначить Е и принять сокращенные буквенные обозначения аминокислот, то механизм синтеза глутамина в присутствии глутаминсинтетазы может быть представлен в следующем виде:



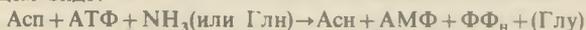
Биосинтез аспарагина протекает несколько отлично и зависит от природы ферментов и донора аммиака. Так, у микроорганизмов и в животных тканях открыта специфическая аммиакзависимая аспарагинсинтетаза, которая катализирует синтез аспарагина в две стадии:



В животных тканях содержится, кроме того, глутаминзависимая аспарагинсинтетаза, которая для синтеза во второй стадии использует амидную группу глутамина:



Суммарная ферментативная реакция синтеза аспарагина может быть представлена в следующем виде:



Видно, что энергетически синтез аспарагина обходится организму дороже, поскольку образовавшийся Ф_n далее распадается на ортофосфат.

Часть аммиака легко связывается с α -кетоглутаровой кислотой благодаря обратимости глутаматдегидрогеназной реакции; если еще учесть связывание одной молекулы аммиака при синтезе глутамина, то нетрудно видеть, что в организме имеется хорошо функционирующая система, связывающая две молекулы аммиака:

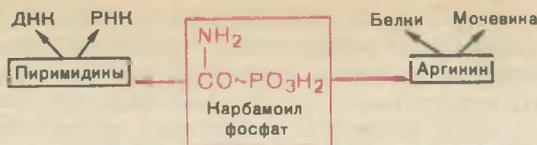


Глутамин, кроме того, используется почками в качестве резервного источника аммиака (образуемого из глутамина под действием глутаминазы), необходимо для нейтрализации кислых продуктов обмена при ацидозе и защищающего тем самым организм от потери с мочой используемых для этих же целей ионов Na^+ .

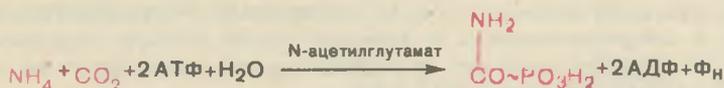
Орнитинный цикл мочевинообразования

Основным механизмом обезвреживания аммиака в организме является биосинтез мочевины. Последняя выводится с мочой в качестве главного конечного продукта белкового, соответственно аминокислотного, обмена. На долю мочевины приходится до 80—85% всего азота мочи. Основным и, возможно, единственным местом синтеза мочевины является печень. Впервые Г. Кребс и К. Гензеляйт в 1932 г. вывели уравнения реакций синтеза мочевины, которые представлены ниже в виде цикла, получившего в литературе название орнитинного цикла мочевинообразования Кребса. Следует указать, что в биохимии это была первая циклическая система метаболизма, обнаружение которой почти на 5 лет опередило открытие Г. Кребсом другого метаболического процесса — цикла трикарбоновых кислот. Дальнейшие исследования в основном подтвердили циклический характер биосинтеза мочевины в печени; благодаря исследованиям Г. Коена, С. Ратнер и ее сотрудников были уточнены промежуточные этапы и ферментные системы, катализирующие образование мочевины.

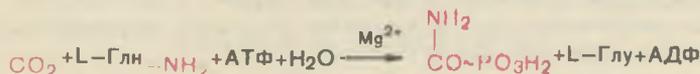
Таким образом, весь цикл мочевинообразования может быть представлен следующим образом. На первом этапе синтезируется макроэргическое соединение карбамоилфосфат, синтез которого представляет немалый интерес. Карбамоилфосфат — это метаболически активная форма аммиака, используемая в качестве исходного продукта для синтеза ряда других азотистых соединений.



К настоящему времени открыты три разных пути синтеза карбамоилфосфата de novo, катализируемые тремя разными ферментами:



Эту необратимую реакцию (требует затраты двух молекул АТФ) катализирует регуляторный фермент — аммиакзависимая карбамоилфосфат-синтетаза (КФ 6.3.4.16); реакция открыта в митохондриях печени и преимущественно используется для синтеза аргинина и мочевины. Роль активирующего модулятора — N-ацетилглутамата — представляется в стабилизации активной конформации фермента.

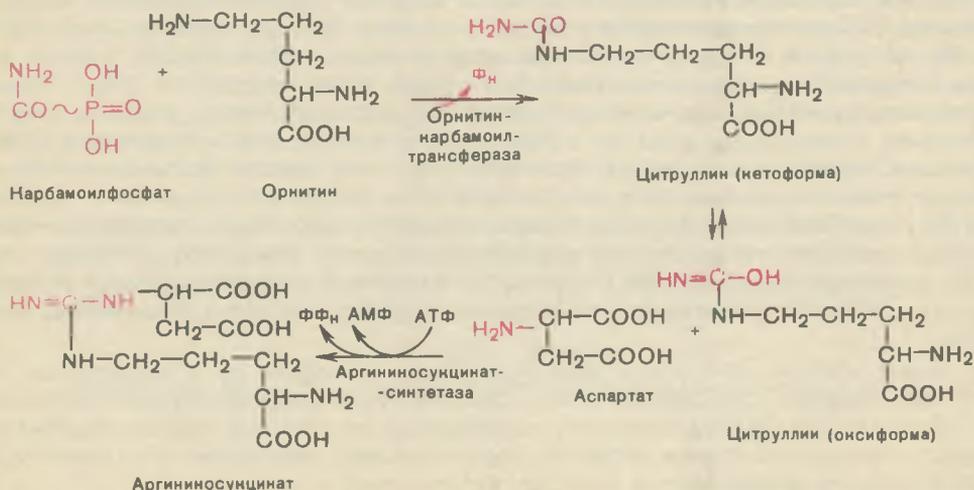


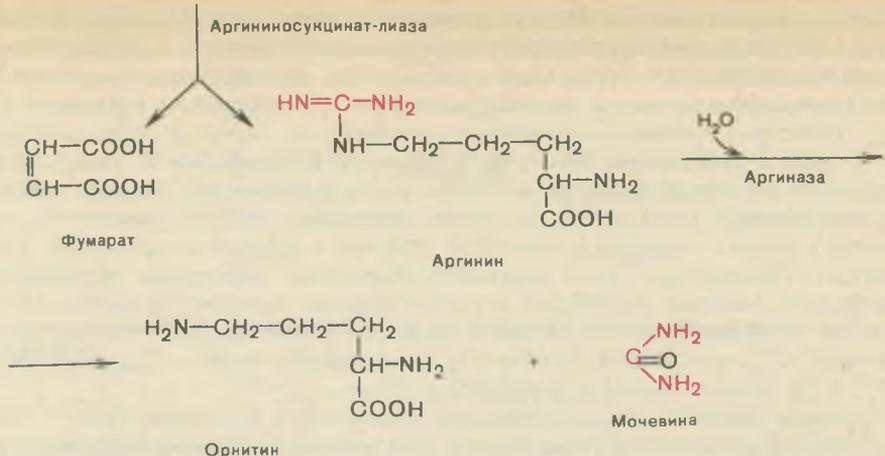
Этот путь синтеза катализирует глутаминзависимая карбамоилфосфат-синтетаза (КФ 6.3.5.5), открытая в цитоплазме клеток животных. Данная реакция, также являющаяся необратимой благодаря включению гидролитической стадии, используется для синтеза пиримидиновых нуклеотидов. Фермент широко распространен в клетках животных, требует затраты одной молекулы АТФ:



Данную обратимую реакцию катализирует карбаматкиназа (КФ 2.7.2.2); она открыта у разных микроорганизмов и, возможно, используется скорее для ресинтеза АТФ, чем для синтеза карбамоилфосфата.

На втором этапе цикла мочевинообразования происходит конденсация карбамоилфосфата и орнитина с образованием цитруллина; реакцию катализирует орнитин-карбамоилтрансфераза:

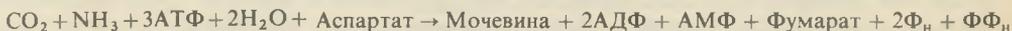




На следующей стадии цитруллин превращается в аргинин в результате двух последовательно протекающих реакций. Первая из них, энергозависимая, сводится к конденсации цитруллина и аспарагиновой кислоты с образованием аргининосукцината (эту реакцию катализирует аргининосукцинат-синтетаза). Аргининосукцинат распадается в следующей реакции на аргинин и фумарат при участии другого фермента – аргининосукцинат-лиазы. На последнем этапе аргинин расщепляется на мочевину и орнитин под действием аргиназы.

Необходимо подчеркнуть, что аргиназа содержится в печени тех животных, которые экскретируют с мочой мочевину как основной и конечный продукт азотистого обмена; в печени птиц, например, аргиназа отсутствует, поскольку птицы выделяют мочевую кислоту вместо мочевины. Орнитиновый цикл мочевинообразования с учетом новых данных представлен на рис. 11.3.

Ниже приведена суммарная реакция синтеза мочевины без учета промежуточных продуктов:



Данная реакция сопровождается снижением свободной энергии ($\Delta G^\circ = -40$ кДж), поэтому процесс всегда протекает в направлении синтеза мочевины. Из приведенной схемы процесса мочевинообразования нетрудно видеть, что один из атомов азота мочевины имеет своим источником свободный аммиак (через карбамоилфосфат); второй атом азота поступает из аспартата. Аммиак образуется главным образом в процессе глутаматдегидрогеназной реакции. Что же касается пополнения запасов аспартата, то в этом процессе участвуют три сопряженные реакции: сначала фумарат под действием фумаразы присоединяет воду и превращается в малат, который окисляется затем при участии малатдегидрогеназы с образованием оксалоацетата, последний в реакции трансаминирования с глутаматом вновь образует аспартат.



Рис. 11.3. Орнитиновый цикл мочевинообразования.

Суммируя известные фактические данные о механизмах обезвреживания аммиака в организме, можно прийти к следующему заключению. Часть аммиака используется на биосинтез аминокислот путем восстановительного аминирования α -кетокислот или реакции трансаминирования. Аммиак используется в биосинтезе глутамина и аспарагина. Некоторое количество аммиака выводится с мочой в виде аммонийных солей. В форме креатинина, который образуется из креатина и креатинфосфата, выделяется из организма значительная часть азота аминокислот. Однако наибольшее количество аммиака расходуется на синтез мочевины, которая выводится с мочой в качестве главного конечного продукта белкового обмена в организме человека и животных. Подсчитано, что в состоянии азотистого равновесия организм взрослого здорового человека потребляет и соответственно выделяет примерно 15 г азота в сутки; из экскретируемого с мочой количества азота на долю мочевины приходится около 85%, креатинина — около 5%, аммонийных солей — 3%, мочевой кислоты — 1% и на другие формы — около 6%.

В процессе эволюции живые организмы выработали различные типы азотистого обмена. Аммонийотелический тип, при котором главным конечным продуктом азотистого обмена является аммиак, свойствен преимущественно рыбам. Уретотелический тип обмена — основным конечным продуктом обмена белков является мочевина, характерен для человека и животных. Урикоотелический тип — главным конечным продуктом обмена является мочевая кислота, характерен для птиц и рептилий.

Специфические пути обмена некоторых аминокислот

Помимо общих путей обмена, характерных для всех аминокислот, в настоящее время в животных тканях выяснены довольно подробно индивидуальные пути превращения почти всех аминокислот, входящих в состав белковых молекул. Некоторые из этих превращений хотя и имеют в количественном отношении второстепенное значение, но образующиеся продукты реакции могут играть важную, а иногда и решающую роль в процессах обмена веществ. Ниже будет рассмотрен выборочно обмен тех аминокислот, специфические, так называемые частные пути превращения которых в организме человека и животных определяют во многих отношениях его физиологическое состояние.

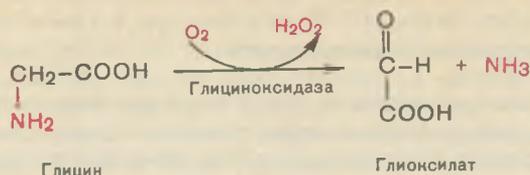
Обмен глицина и серина

Глицин является единственной из всех входящих в состав белков аминокислот, в молекуле которой отсутствует асимметрический атом углерода. Тем не менее метаболически он связан с химическими компонентами организма в большей степени, чем любая другая аминокислота.

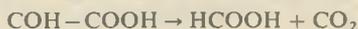


Из схемы видно, что глицин в некоторых синтезах играет незаменимую роль, в частности в образовании белков, пуриновых нуклеотидов, гема гемоглобина, парных желчных кислот, креатина, глутатиона и т. д.

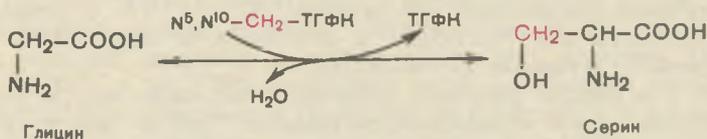
Оксидаза L-аминокислот глицин не дезаминирует; в тканях открыт специфический флавопротеин — глицинооксидаза, которая осуществляет эту реакцию:



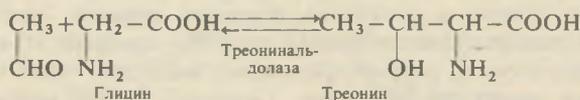
Глиоксالات далее в тканях окисляется до оксалата или муравьиной кислоты и CO_2 по уравнению:



Образовавшаяся муравьиная кислота подвергается далее восстановлению при участии НАДФН₂ и ТГФК в $\text{N}^5, \text{N}^{10}\text{—CH}_2\text{—ТГФК}$, которая служит донором оксиметильной группы в реакциях взаимопревращения глицина и серина; эту реакцию катализирует пиридоксальный фермент — серин-оксиметилтрансфераза:



Показано также взаимопревращение глицина и треонина благодаря треонинальдолазной реакции:



Основным путем катаболизма глицина в животных тканях, однако, считается распад его на CO_2 , NH_3 и $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -метилентетрагидрофолиевую кислоту по уравнению:
 $\text{H}_2\text{N—CH}_2\text{—COOH} + \text{ТГФК} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{N}^5, \text{N}^{10}\text{—CH}_2\text{—ТГФК}$

Механизм этой реакции, недавно раскрытый К. Тада, включает участие митохондриальной глицинрасщепляющей ферментной системы, отличной от глицинсинтазы и состоящей из 4 белков: Р-белка, содержащего пиридоксальфосфат (глициндекарбоксилаза), Н-белка, содержащего липоевую кислоту, Т-белка, требующего присутствия ТГФК и L-белка, названного липоамиддегидрогеназой.

Биологический смысл данного пути катаболизма глицина состоит, вероятнее всего, в образовании активного одноуглеродного фрагмента ($\text{N}^5, \text{N}^{10}\text{—CH}_2\text{—ТГФК}$), используемого в уникальных реакциях синтеза метионина, пуриновых нуклеотидов, тимидиловой кислоты и др. Получены доказательства, что наследственная некетогенная глицинемия (повышение уровня глицина в крови) обусловлена недостаточностью Р- или Т-белка глицинрасщепляющей ферментной системы печени или мозга и что каждый из этих белков контролируется отдельным геном.

Ряд других эссенциальных функций глицина в частности участие в образовании δ-аминолевулиновой кислоты при синтезе порфиринов (гема) и пуриновых нуклеотидов, будет освещен ниже (см. главу 12).

Поскольку серин легко превращается в пируват под действием сериндегидратазы, в тканях имеются условия для превращения глицина (через серин) в пируват, и этим путем осуществляется участие глицина в обмене углеводов. Важную роль

играет серин в биосинтезе сложных белков — фосфопротеинов, а также фосфолипидов. Помимо фосфатидилсерина, углеродный скелет и азот серина используются в биосинтезе фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина (см. главу 10).

Обмен серосодержащих аминокислот

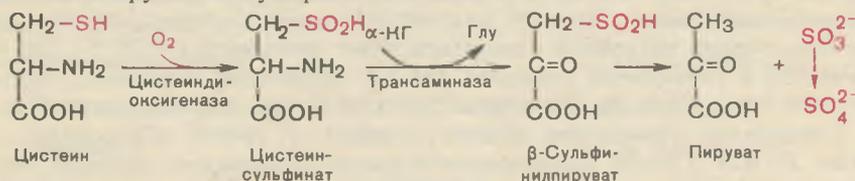
В молекулах белка обнаружены три серосодержащие аминокислоты (метионин, цистеин и цистин), метаболически тесно связанные друг с другом. Благодаря наличию высокореактивной SH-группы в составе цистеина в тканях легко осуществляется ферментативная окислительно-восстановительная реакция между цистеином и цистином¹.



Дисульфидная связь часто образуется между двумя остатками цистеина внутри одной полипептидной цепи или между двумя полипептидными цепями, способствуя тем самым стабилизации молекулы белка. Цистеин является составной частью трипептида глутатиона, сокращенно обозначаемого Г—SH, что подчеркивает функциональную значимость его тиогруппы и возможность образования дисульфидной связи окисленного глутатиона (Г—S—S—Г).

Известно, что многие ферменты содержат в активном центре SH-группы, абсолютно необходимые для каталитической реакции. При их окислении ферменты теряют свою активность. Предполагается, что одной из главных функций глутатиона является сохранение этих ферментов в активной восстановленной форме. Окисленный глутатион может вновь восстанавливаться под действием глутатионредуктазы, используя НАДФН₂. С другой стороны, глутатион может оказывать ингибирующее действие на некоторые белки: в частности, известна реакция инактивации инсулина под действием глутатионинсулинтрансгидрогеназы, в которой SH-глутатион является донором водородных атомов, разрывающих дисульфидные связи между двумя полипептидными цепями молекулы инсулина. Показана также коферментная функция глутатиона, в частности для глиоксилазы I. Выше обсуждалось участие глутатиона в транспорте аминокислот через клеточную мембрану.

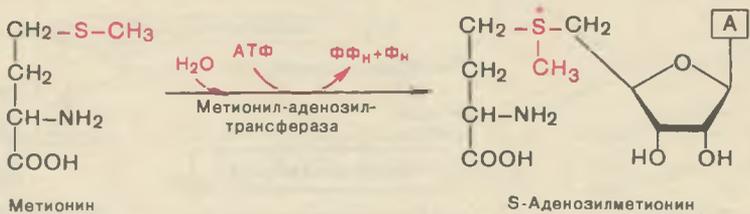
Поскольку в процессе катаболизма сера метионина в тканях в основном переходит в серу цистеина, а взаимопревращение цистина в цистеин легко осуществляется, проблема окисления серы всех аминокислот практически сводится к окислению цистеина. Главным путем оказался окислительный, включающий окисление цистеина в цистеинсульфиновую кислоту, трансаминирование последней с α-кетоглутаратом и образование пирувата и сульфита по схеме:



Сульфит затем быстро окисляется в тканях и выводится с мочой в виде нетоксичных сульфатов и эфирсерных кислот. Об использовании цистеина и продуктов его окисления — цистеинсульфиновой и цистеиновой кислот — в образовании таурина было сказано выше.

¹ Окисление цистеина в цистин может осуществляться и неферментативным путем.

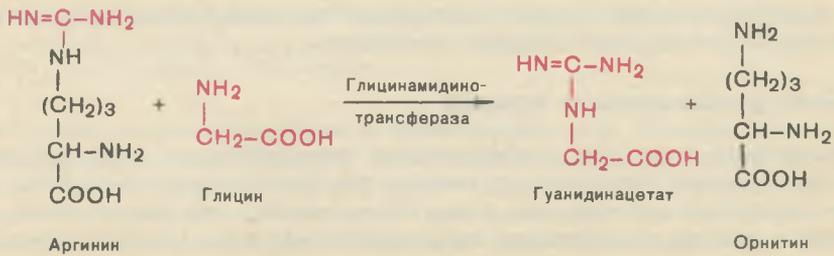
Метионин вступает в печени в реакцию трансаминирования с α -кетоглутаратом и превращается в α -кето- β -метилтиомасляную кислоту. Однако этот путь обмена не является главным; последний, как было указано выше, лежит через цистеин, в состав которого включается сера метионина. Превращение метионина в цистеин оказалось необратимым процессом. Выяснилось также, что углеродный скелет цистеина имеет своим источником другую аминокислоту, а именно серин. Фактическим донором метильных групп в реакциях трансаминирования является не свободный метионин, а так называемый активный метионин — S-аденозилметионин, который образуется в процессе АТФ-зависимой реакции, катализируемой метионин-аденозилтрансферазой:



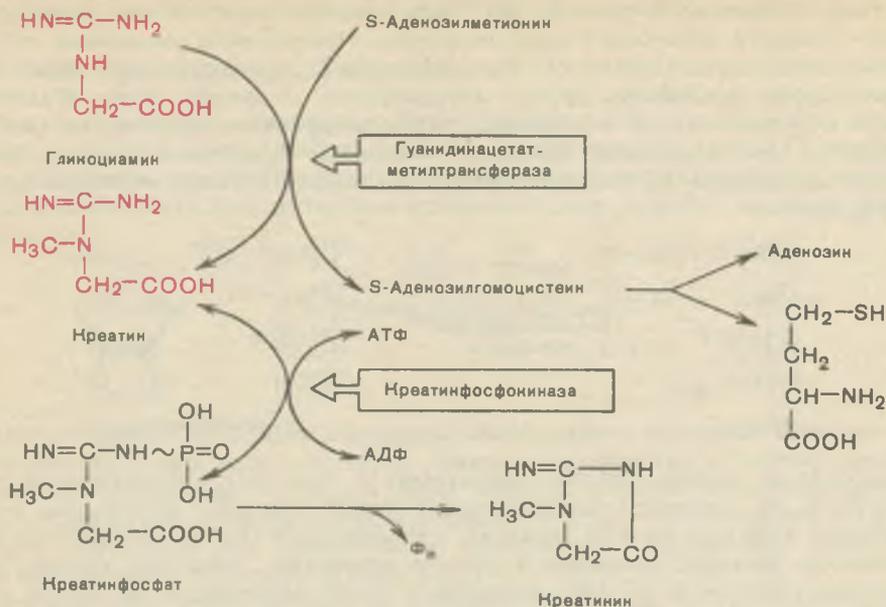
Своеобразие данной реакции заключается в том, что CH_3 -группа метионина активируется под действием положительного заряда соседнего атома серы. S-аденозилметионин участвует во всех реакциях, где метильная группа используется в биосинтетических реакциях, например в синтезе адреналина, креатина, тимина, фосфатидилхолина, бетаина и др. Образовавшийся после отщепления метильной группы S-аденозилгомоцистеин подвергается гидролизу на аденозин и гомоцистеин; последний или используется в синтезе серина (это основной путь превращения), или служит акцептором метильной группы от $\text{N}^5\text{-CH}_3\text{-ТГФК}$ в синтезе метионина (эту реакцию катализирует гомоцистеинметилтрансфераза), завершая, таким образом, своеобразный цикл активирования метильной группы:



В качестве примера ниже приводится схема биосинтеза креатина, в котором принимают участие три аминокислоты: аргинин, глицин и метионин. Реакция синтеза протекает в две стадии. Первая стадия — биосинтез гуанидинацетата осуществляется в почках при участии глицин-амидинотрансферазы:

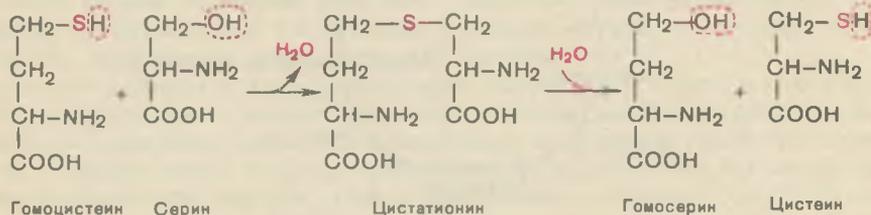


Вторая стадия синтеза креатина протекает в печени при участии гуанидинацетат-метилтрансферазы.



Креатин подвергается фосфорилированию с образованием креатинфосфата, который после дефосфорилирования (необратимая реакция) превращается в креатинин, выделяющийся с мочой.

Гомоцистеин может вновь превращаться в метионин путем метилирования. Однако основной путь дальнейшего превращения гомоцистеина связан с его использованием в синтезе цистеина, который может быть представлен в виде двух последовательных ферментативных реакций:



Ферменты, катализирующие синтез и распад цистатионина (цистатионин-β-синтаза и цистатионаза), содержат ПФ. Цистеин далее подвергается окислению по описанному выше пути, а гомосерин после трансаминирования с α-кетоглутаратом превращается в α-кетомасляную кислоту; последняя может также образоваться из цистатионина непосредственно, минуя стадию гомосерина.

Обмен фенилаланина и тирозина

Фенилаланин относится к незаменимым аминокислотам, поскольку ткани животных не обладают способностью синтеза его бензольного кольца. В то же время тирозин полностью заменим при достаточном поступлении фенилаланина с пищей. Объясняется это тем, что основной путь превращения фенилаланина начинается с его

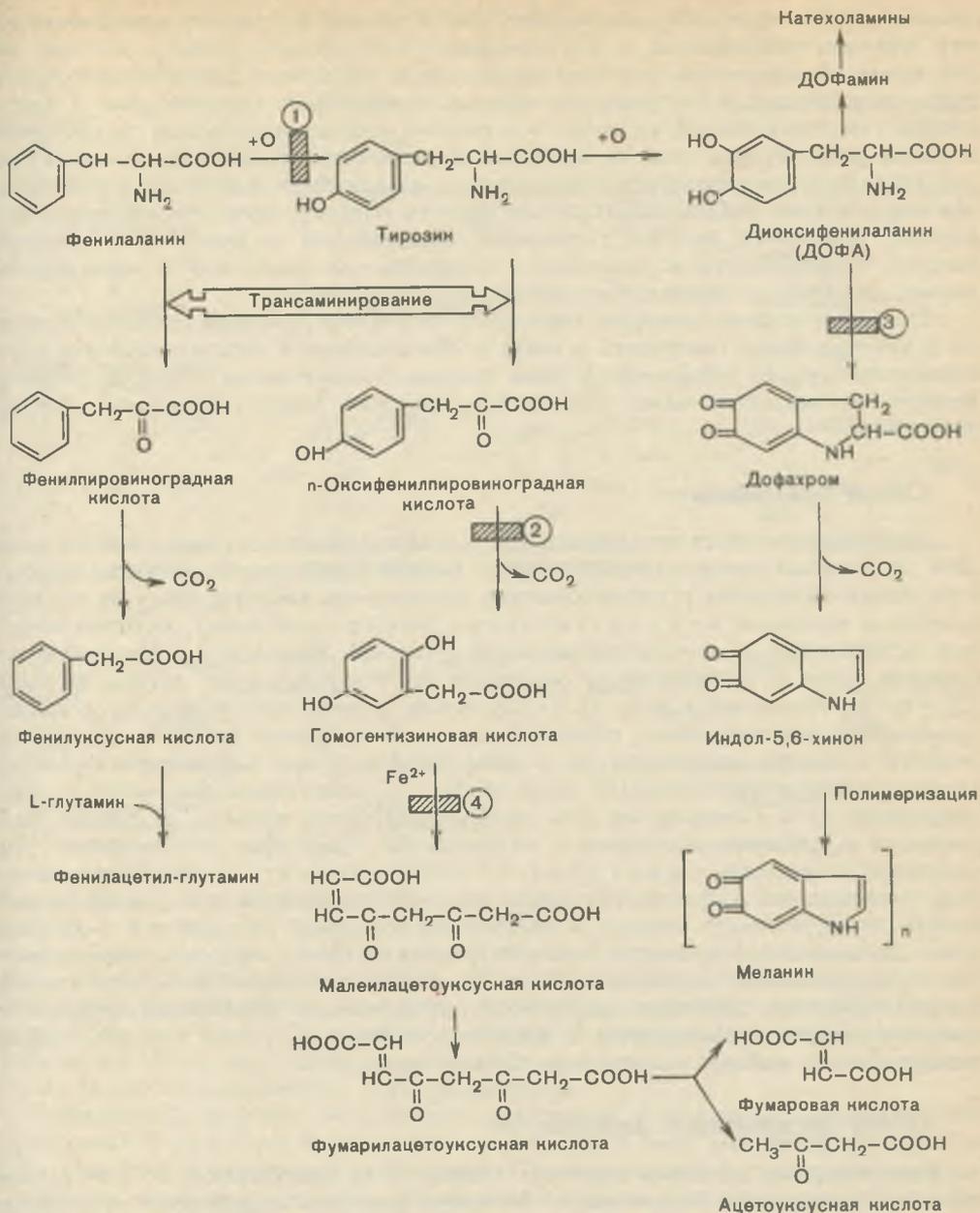


Рис. 11.4. Основные метаболические превращения фенилаланина и тирозина. Цифры в кружках обозначают блокирование реакций при следующих заболеваниях: 1 – фенилкетонурии; 2 – тирозинозе; 3 – альбинизме; 4 – алкаптонурии.

окисления (точнее, гидроксирования) в тирозин (рис. 11.4). Реакция гидроксирования катализируется специфической фенилаланин-4-монооксигеназой, которая в качестве кофермента содержит, как все другие гидроксилазы, тетрагидробиоптерин. Блокирование этой реакции, наблюдаемое при нарушении синтеза фенилаланин-4-монооксигеназы в печени, приводит к развитию тяжелой наследственной болезни –

фенилкетонурии (фенилпировиноградная олигофрения). В процессе трансаминирования тирозин превращается в *n*-оксифенилпировиноградную кислоту, которая под действием специфической оксидазы подвергается окислению, декарбоксилированию, гидроксильрованию и внутримолекулярному перемещению боковой цепи с образованием гомогентизиновой кислоты; эта реакция требует присутствия аскорбиновой кислоты, роль которой пока не выяснена. Дальнейшее превращение гомогентизиновой кислоты в малеилацетоуксусную кислоту катализируется оксидазой гомогентизиновой кислоты. Малеилацетоуксусная кислота под действием специфической изомеразы, требующей наличия глутатиона, превращается в фумарилацетоуксусную кислоту, подвергающуюся гидролизу с образованием фумаровой и ацетоуксусной кислот, дальнейшие превращения которых уже известны.

Об использовании молекулы тирозина в биосинтезе гормонов щитовидной железы и катехоламинов говорилось в главе 6. Фенилаланин и тирозин являются также предшественниками меланинов. В этом важном биологическом процессе, обеспечивающем пигментацию кожи, глаз, волос, активное участие принимает фермент тирозиназа.

Обмен триптофана

Триптофан считается незаменимой для человека и животных аминокислотой, кроме того, он является предшественником ряда важных биологически активных веществ, в частности серотонина и рибонуклеотида никотиновой кислоты. Один из его метаболитов, в частности индолилуксусная кислота, обладает ростстимулирующей активностью в отношении растений (ростовой фактор). В физиологических условиях более 95% триптофана окисляется по кинурениновому пути и не более 1% — по серотониновому (рис. 11.5). Серотонин в организме подвергается окислительному дезаминированию с образованием индолилуксусной кислоты, которая выделяется с мочой; содержание ее в моче повышено при поражениях кишечника злокачественными карциноидами, когда около 60% триптофана окисляется по серотониновому пути. Основной же путь обмена триптофана приводит к синтезу НАД, уменьшая потребность организма в витамине РР. Триптофан под действием гемосодержащего фермента, триптофан-2,3-диоксигеназы, в присутствии кислорода превращается в формилкинуренин, который распадается при участии формамидазы на муравьиную кислоту и кинуренин; последний окисляется в 3-оксикинуренин. Дальнейшие превращения 3-оксикинуренина связаны с пиридоксальвым ферментом — кинурениназой, гидролизующей его на аланин и 3-оксиантралиловую кислоту, которая через ряд промежуточных продуктов (механизм образования которых до конца не раскрыт) превращается в хинолиновую кислоту, т. е. в непосредственный предшественник рибонуклеотида никотиновой кислоты.

Обмен дикарбоновых аминокислот

Классическими работами советских ученых А. Е. Браунштейна и С. Р. Мардашева и американского биохимика А. Майстера доказана выдающаяся роль дикарбоновых аминокислот (глутаминовой и аспарагиновой кислоты и их амидов — глутамина и аспарагина) в интеграции азотистого обмена в организме. Система дикарбоновых аминокислот, к которой относят также соответствующие α -кетокислоты, теснейшим образом связана не только с азотистым метаболизмом в целом, но и с обменом липидов и углеводов. Выше отмечалась особая роль дикарбоновых аминокислот и ферментов, катализирующих их превращения, в перераспределении азота в организме, дезаминировании и синтезе природных аминокислот (реакции трансдезаминирования и трансреаминирования) и образовании конечных продуктов белкового обмена — синтезе мочевины.

Аспарагиновая кислота принимает непосредственное участие в орнитинном

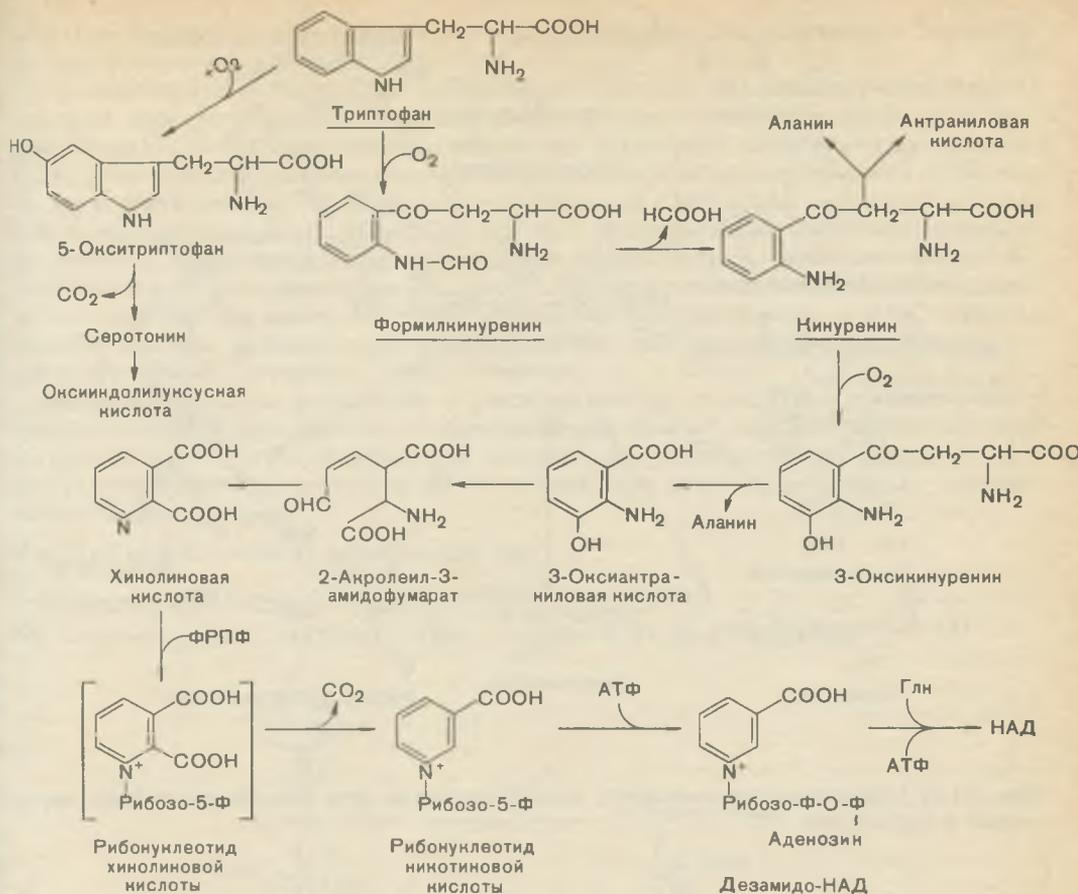


Рис. 11.5. Метаболические превращения триптофана.

цикле мочевинообразования, реакции трансаминирования, биосинтезе углеводов (гликогенная аминокислота), карнозина и ансерина, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов (см. главу 12), а также в синтезе N-ацетиласпарагиновой кислоты в ткани мозга. Роль последней, содержащейся в довольно высоких концентрациях в ткани мозга млекопитающих, пока не выяснена.

Глутаминовая кислота, являющаяся гликогенной и заменимой аминокислотой для человека и животных, также включается в синтез ряда специфических метаболитов, в частности глутатиона и глутамина. Помимо участия в транспорте аммиака и регуляции кислотно-щелочного равновесия, глутамин является незаменимым источником азота в ряде синтезов, в частности в биосинтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, аминоксахаров, обезвреживании фенилуксусной кислоты (синтез фенилацетилглутамина) у человека и человекообразных обезьян, а также в синтезе витамина фолиевой кислоты (птероилглутаминовая кислота). На рис. 11.6 суммированы реакции синтеза ряда веществ, в которых амидный азот глутамина выполняет специфическую роль, незаменимую азотом других аминокислот.

Глутамин и аспарагин оказались, кроме того, эссенциальными факторами для роста некоторых нормальных и опухолевых клеток в культуре ткани; глутамин и аспарагин не могли быть заменены ни друг другом, ни соответствующими дикарбоновыми аминокислотами. Это свидетельствует о том, что в условиях выращивания

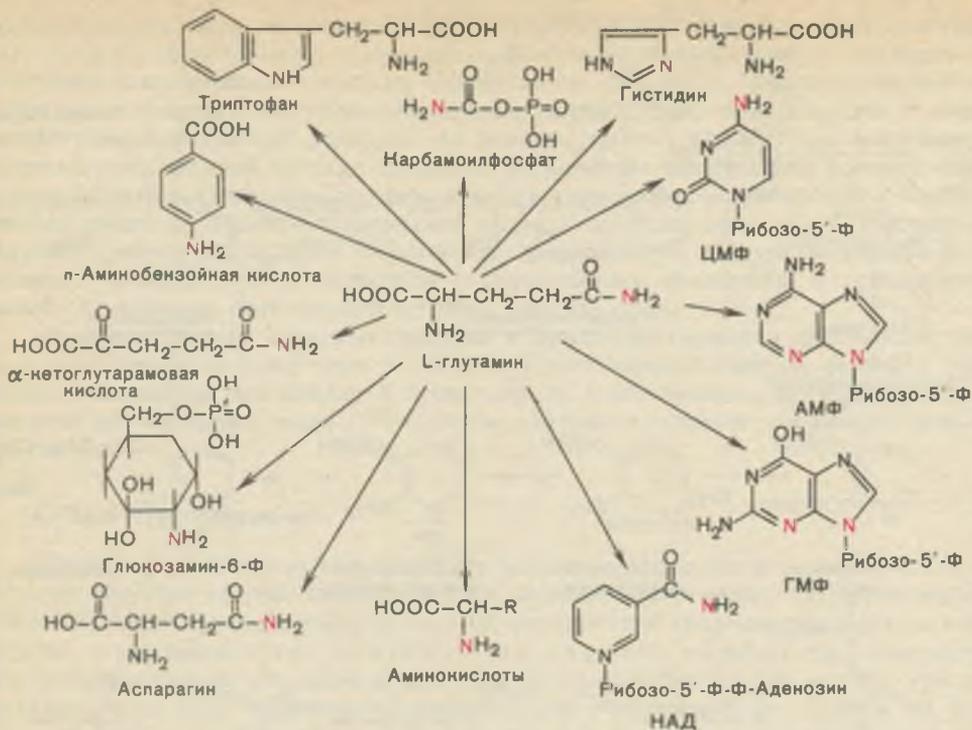
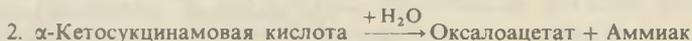


Рис. 11.6. Использование амидного азота глутамин для синтеза различных соединений в организме.

клеток в культуре ткани некоторые клетки теряют способность синтезировать эти амиды синтезным или трансминазным путем.

Получены доказательства, что глутамин и аспарагин в животных тканях подвергаются сочетанному трансминированию и дезаминированию под влиянием специфических трансминаз амидов (глутаминтрансминазы и аспарагинтрансминазы) и неспецифической ω-амидазы:



В реакции переноса участвует α-аминогруппа аспарагина (а не амидная группа, как предполагалось раньше), в то время как амидная группа промежуточного соединения α-кетосукцинамовой кислоты освобождается в процессе гидролиза в виде аммиака. Трансминирование – обратимый процесс, поэтому лимитирующими факторами в синтезе аспарагина (и глутамин) являются ω-амиды щавелевоуксусной и α-кетоглутаровой кислот, синтез которых в животных тканях не доказан.

Глутаминовая кислота является одним из немногих соединений в дополнение к глюкозе, которые служат энергетическим материалом для ткани мозга. Выше было указано на высокую активность в ткани мозга глутаматдекарбоксилазы, которая превращает глутамат в ГАМК. Дальнейшее окисление ее включает трансми-

нирование с образованием полуальдегида янтарной кислоты, окисление в янтарную кислоту и, наконец, окисление через ЦТК.

В обеих реакциях (декарбоксилировании глутамата и трансаминировании ГАМК) участвует пиридоксальфосфат, который оказался более прочно связанным с ГАМК-трансаминазой. ГАМК оказывает тормозящий эффект на синаптическую передачу в ЦНС, поэтому судорожные явления, наблюдаемые при недостаточности витамина В₆, могут быть связаны со снижением образования ГАМК в глутаматдекарбоксилазной реакции. У животных судороги могут быть вызваны также введением изониазида, который связывает альдегидную группу кофермента, или авитаминов В₆, в частности метоксипиридоксина. Так как ГАМК служит естественно встречающимся «транквилизатором», одним из путей повышения ее концентрации в ЦНС является введение веществ, оказывающих тормозящее действие на ГАМК-трансаминазу, которая эффективно удаляет ГАМК.

В последние годы у бактерий и растений (но не в животных тканях) открыт совершенно новый путь синтеза глутаминовой кислоты из α-кетоглутаровой кислоты и глутамина. Этот путь, получивший название глутаматсинтазного цикла, включает две сопряженные с распадом АТФ необратимые реакции, ведущие к усвоению (ассимиляции) аммиака:

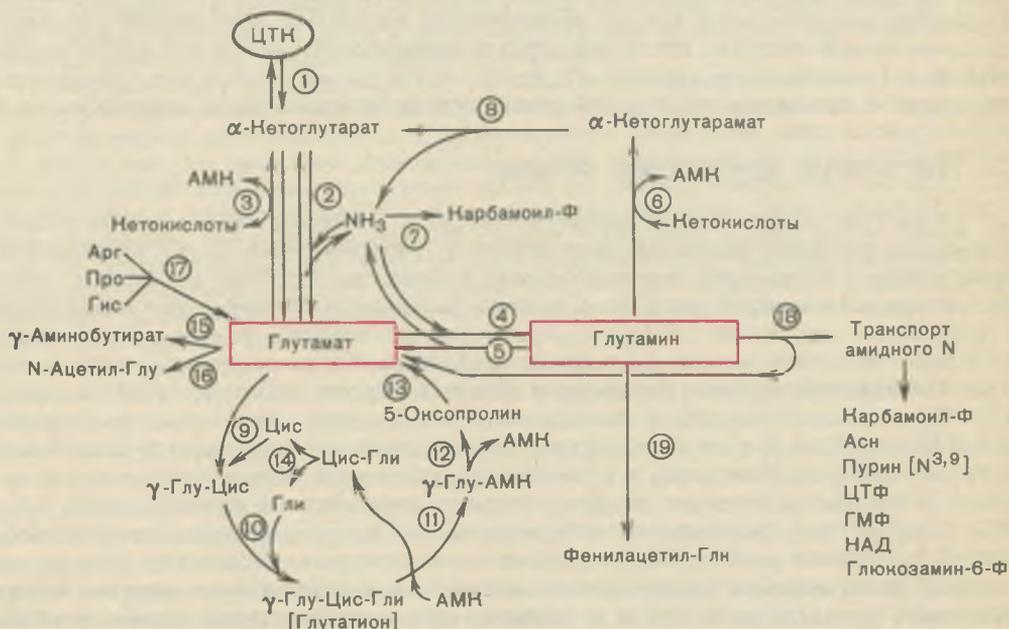
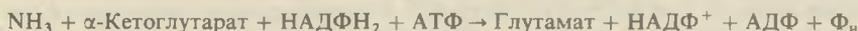
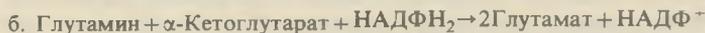
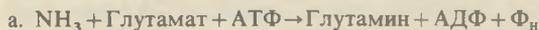


Рис. 11.7. Метаболические превращения глутамата и глутамина в тканях животных (схема по Майстеру).

1 — реакции цикла лимонной кислоты; 2 — глутаматдегидрогеназа; 3 — глутаматтрансаминаза; 4 — глутаминсинтаза; 5 — глутаминаза; 6 — глутаминтрансаминаза; 7 — карбамоилфосфатсинтаза (печень); 8 — ω-амидаза; 9 — γ-глутамилцистеинсинтаза; 10 — глутатионсинтаза; 11 — γ-глутамилтрансфераза; 12 — γ-глутамилциклотрансфераза; 13 — 5-оксопролиназа; 14 — цистенилглициназа; 15 — глутаматдекарбоксилаза; 16 — глутамат-N-ацетилаза; 17 — ферменты, катализирующие распад этих аминокислот; 18 — амидотрансферазы глутамина; 19 — глутамин-фенилацетилтрансфераза.

Первую стадию (а) катализирует глутаминсинтетаза, которая свойственна и для клеток животных, вторую (б) — глутаматсинтаза, открытая только у растений, грибов и микроорганизмов. Обе стадии могут быть представлены вместе с обратимой глутаматдегидрогеназной реакцией (в) в виде следующей схемы:



Оказалось, что при низких концентрациях аммиака, характерных для растений и микроорганизмов, реакции протекают преимущественно по глутаматсинтазному циклу, а при высоких его концентрациях, свойственных тканям животных, — по глутаматдегидрогеназному пути; в обоих случаях синтезируется глутамат.

С метаболизмом глутаминовой кислоты связаны также пути обмена пролина и аргинина (рис. 11.7), хотя следует напомнить, что аргинин относится к частично незаменимым аминокислотам, особенно в молодом возрасте, когда его синтез из глутамата не может обеспечить потребности быстрого роста организма. Кроме того, основным путем метаболизма аргинина является путь синтеза мочевины. Более специфичен и необратим путь превращения гистидина (также частично незаменимая для животных аминокислота) в глутаминовую кислоту. В этом превращении участвуют два хорошо изученных фермента — гистидинаммиаклиаза (гистидидаза), катализирующая внутримолекулярное дезаминирование гистидина, и уроканиназа, которая катализирует разрыв имидазольного кольца уроканиновой кислоты с образованием имидазолпропионовой кислоты; последняя через формиминоглутаминовую кислоту превращается в глутаминовую кислоту. О других путях обмена гистидина (образование гистамина и окисление его под действием диаминоксидазы) было сказано выше.

Патология азотистого обмена

Азотистый обмен связан преимущественно с обменом белков, структурными единицами которого являются аминокислоты, поэтому ниже будут представлены накопленные к настоящему времени данные о нарушениях обмена отдельных аминокислот при патологии. Повышенный интерес биохимиков, физиологов и клиницистов к проблемам патологии обмена аминокислот объясняется рядом обстоятельств. Во-первых, имеются экспериментальные доказательства и клинические наблюдения о развитии патологического синдрома, в основе которого лежат нарушения нормального пути обмена отдельных аминокислот в организме. Во-вторых, в последнее время аминокислоты и их производные нашли широкое применение в клинической практике, например: метионин — в лечении ряда болезней печени, глутаминовая кислота — в лечении некоторых поражений мозга, глутамин — в лечении кетонурии и т. д. Наконец, ряд аминокислот и продукты их декарбоксилирования (биогенные амины) оказывают регулирующее влияние на многие физиологические функции организма. Из сказанного можно сделать вывод, что знание закономерностей обмена отдельных аминокислот в норме и особенно при патологии представляет исключительный научно-теоретический и практический интерес.

О нарушении обмена аминокислот в целомном организме судят не только по количественному и качественному составу продуктов их обмена в крови и моче, но и по уровню самих свободных аминокислот в биологических жидкостях организма. Большинство тканей характеризуется своеобразным аминокислотным «спектром». В плазме крови он примерно соответствует аминокислотному составу свободных аминокислот в органах и тканях, за исключением более низкого содержания глутамата и аспартата и более высокого уровня глутамина, на долю которого при-

ходится до 25% от общего количества аминокислот. Спинномозговая жидкость отличается меньшим содержанием почти всех аминокислот, кроме глутамина. Аминокислотный состав мочи резко отличается от аминокислотного состава плазмы крови. Оказывается, у человека, получающего полноценное питание, аминокислотный состав мочи более или менее постоянен изо дня в день, но у разных людей с почти одинаковым аминокислотным составом плазмы состав аминокислот в моче может оказаться совершенно различным.

Природу нарушений процессов обмена при недостаточности какой-либо аминокислоты трудно установить экспериментально, поскольку при этом страдает весь процесс биосинтеза белка, подчиняющийся закону «все или ничего». Специфические проявления недостаточности аминокислот могут развиваться у человека только в условиях патологии при повышенном использовании данной аминокислоты. Выше было указано, что у больных с карциноидной опухолью более 60% триптофана окисляется по серотониновому пути (в норме он составляет 1%) — это, естественно, приводит к относительной недостаточности указанной аминокислоты. У больных со злокачественной меланомой тирозин и, возможно, фенилаланин расходуются преимущественно на биосинтез меланина. Этим, вероятно, можно объяснить специфическое истощение организма, наблюдаемое при меланомах. В связи с возможностью приготовления искусственных рационов (исключение из рациона человека и животных какой-либо аминокислоты) можно описать синдром, характерный для недостаточности данной аминокислоты. Так, недостаток триптофана у человека ведет к уменьшению массы тела, а у новорожденного даже 10-дневный дефицит триптофана приводит к анорексии и к гипопротейнемии. У крыс отмечено выпадение зубов, шерсти, помутнение роговицы и развитие катаракты, а у цыплят — увеличение потребности в витамине PP. Недостаток лизина у человека вызывает головокружение, тошноту, повышенную чувствительность к шуму; недостаток гистидина сопровождается снижением концентрации гемоглобина. При недостаточности аргинина у крыс наблюдается атрофия семенников, а у человека — гипоспермия. При исключении из пищи метионина отмечается жировое перерождение печени и почек, обусловленное недостатком лабильных метильных групп, необходимых для синтеза фосфатидилхолинов.

Некоторые заменимые аминокислоты становятся незаменимыми, если они не поступают с пищей, так как клетки организма не справляются с быстрым их синтезом. По данным Р. Фишера, недостаток цистеина ведет к почти полному торможению роста клеток *in vitro* даже при наличии всех остальных аминокислот в среде. Доказано, кроме того, что достаточное количество цистеина в пище значительно снижает потребности в метионине (см. табл. 11.2). Напротив, полное исключение цистеина из рациона может настолько резко повысить потребности в метионине, что обычно адекватное питание оказывается недостаточным. Таким образом, заменимые аминокислоты могут оказаться лимитирующими факторами анаболических процессов в организме, поскольку поступление одних только независимых аминокислот не обеспечивает нормальное протекание биосинтетических реакций, обычно наблюдаемое при полноценном белковом питании.

Одним из характерных нарушений азотистого обмена является белковая недостаточность, являющаяся следствием не только дефицита белка, но и ряда тяжелых заболеваний даже при достаточном поступлении белка с пищей. Белковая недостаточность у человека развивается как при полном и частичном голодании, так и при приеме однообразного белкового питания, когда в диете преобладают белки растительного происхождения, биологическая ценность которых значительно ниже ценности белков животного происхождения. Результатом этих состояний являются развитие отрицательного азотистого баланса, гипопротейнемии (снижение концентрации белков в сыворотке крови до 50—30 г/л; в норме 65—85 г/л) и нарушения коллоидно-осмотического и водно-солевого обмена (развитие отеков). При тяжелых формах пищевых дистрофий, например при *кв а ш и о р к о р е* — заболевании, довольно распространенном среди детей в развивающихся странах, наблюдаются тяжелые поражения печени, остановка роста, резкое снижение сопротивляемости организма инфекциям, отечность, атония мышц. Болезнь часто заканчивается летальным исходом.

Количественному учету при белковой недостаточности в основном поддаются нарушения, связанные с обменом аминокислот. Одним из наиболее ранних наруше-

ний азотистого обмена при белковой недостаточности является резкое снижение интенсивности процессов дезаминирования, трансаминирования и биосинтеза аминокислот, а также синтеза мочевины в печени. Оказалось, что эти нарушения обусловлены недостаточным синтезом и разрушением белковой части ферментов, катализирующих эти реакции; исключение составляет аргиназа, активность которой при этом почти не нарушена. Следствием указанных нарушений являются накопление значительных количеств аминокислот в крови, экскреция с мочой свободных аминокислот (до 10—20 г/сут, в норме около 1 г/сут) и резкое снижение образования и выделения мочевины с мочой.

При белковой недостаточности, помимо нарушений общих процессов аминокислотного обмена, отмечены специфические изменения обмена отдельных аминокислот. Так, нарушения обмена триптофана выражаются как в снижении синтеза никотинамида, так и в накоплении в организме 3-оксипантраниловой и ксантуреновой кислот. Последняя, по некоторым данным, оказывает токсическое действие на β -клетки панкреатических островков, являясь тем самым одним из патогенетических факторов диабета. Нарушения в обмене гистидина сводятся к снижению активности гистидин-аммиак-лиазы и гистаминазы и, напротив, к повышению активности гистидиндекарбоксилазы. Все это способствует накоплению гистамина в тканях со всеми вытекающими отсюда отрицательными последствиями. С другой стороны, при белковой недостаточности обмен метионина практически не нарушен. Все эти данные свидетельствуют о дискоординации ферментных систем обмена аминокислот, что в значительной степени затрудняет терапевтические подходы к устранению последствий белковой недостаточности.

Аминоацидурия. Качественный и количественный состав аминокислот мочи человека имеет прежде всего диагностическое значение, поскольку ряд болезней человека возникает на почве первичного нарушения обмена отдельной аминокислоты или группы аминокислот. Кроме того, для ряда органических поражений органов и тканей человека, а также аномалий обмена характерен свой аминокислотный спектр мочи. Ввиду этого, а также благодаря легкой доступности объекта исследования анализ мочи на аминокислоты приобретает большое клиническое значение. На экскрецию аминокислот большое влияние оказывают возраст, характер питания, пол, гормоны и другие факторы. Установлено, что у младенцев с мочой выделяется больше аминокислот, чем у взрослых людей. Обычно различают повышенную и пониженную экскрецию аминокислот. В свою очередь гипераминоацидурия делится на почечную, связанную с приобретенными или врожденными дефектами реабсорбции аминокислот в почках, и внепочечную, связанную с увеличением концентрации всех или отдельных аминокислот в крови (см. главу 17).

Как известно, обратное всасывание аминокислот (реабсорбция) в почках происходит против градиента концентрации; в своей основе этот процесс, вероятнее всего, является ферментативным, однако детально он пока не выяснен. При хронических нефритах часто с мочой выделяется больше лизина, аргинина, пролина и цитруллина, хотя их уровень в крови может оставаться в пределах нормы. При нефрозах почти всегда выделяется больше этаноламина, таурина и β -аминомасляной кислоты, и эта гипераминоацидурия считается неблагоприятным прогностическим признаком болезни.

Значительно чаще встречаются наследственные дефекты всасывания аминокислот в почках. Одним из хорошо известных заболеваний считается цистиноз, который рядом авторов отождествляется с синдромом Абдергальдена — Фанкони как по клиническим и биохимическим проявлениям, так и по характеру наследственной передачи болезни. Основной метаболический дефект в обоих случаях связан с врожденным нарушением реабсорбции почти всех аминокислот (за исключением циклических) в канальцах почек; следствием этого являются увеличение в 5—10 раз экскреции аминокислот, в 20—30 раз — цистина и цистеина, и избирательное отложение цистина в ретикулярных клетках костного мозга, селезенке, печени и клетках роговицы глаза. Интересно, что при цистинозе образования камней почти не происходит в от-

личие от другого врожденного нарушения обмена — цистинурии, при которой всегда образуются цистиновые камни. Сущность дефекта реабсорбции аминокислот при цистинозе не выяснена.

Цистинурия относится к довольно распространенным наследственным заболеваниям: метаболический дефект выражается в выделении с мочой в 50 раз больше нормы количества четырех аминокислот: цистина, лизина, аргинина и орнитина. Уровень цистина в крови обычно не выше нормальных величин. Люди, страдающие цистинурией, вполне здоровы, за исключением тенденции к образованию в организме камней. Эта врожденная аномалия обмена связана с полным блокированием реабсорбции цистина и частичным нарушением всасывания трех других аминокислот в почках; нарушений в промежуточном обмене этих аминокислот при этом не выявлено.

При другом наследственном «пороке» обмена — гепатоцеребральной дистрофии (болезни Вильсона), помимо генерализованной (общей) гипераминоацидурии, отмечается снижение концентрации медьсодержащего белка — церулоплазмينا — в сыворотке крови и отложение меди в мозге, печени, почках. Генетический дефект связан с нарушением синтеза церулоплазмينا. Возможно, что свободная медь образует комплексы с аминокислотами, которые не всасываются в каналах.

Аналогичная гипераминоацидурия наблюдается при галактоземии, синдроме Лоу и других наследственных заболеваниях. Пониженная экскреция аминокислот описана при квашиоркоре.

Врожденные нарушения обмена отдельных аминокислот. Пристальное внимание ученых привлекают некоторые наследственные заболевания человека, являющиеся следствием первичного дефекта обмена отдельных аминокислот. Возникновение и дальнейшее развитие специфического патологического синдрома при этих наблюдениях обусловлено полным или частичным отсутствием определенных ферментативных активностей: организм либо теряет способность синтезировать данный фермент, либо образуется недостаточное количество, либо синтезируется аномальный фермент, отличающийся по структуре от нативного фермента. Следствием такого врожденного дефекта обмена является накопление в тканях повышенного содержания нормальных промежуточных или побочных (неспецифических) продуктов обмена, оказывающих токсическое влияние на организм и в первую очередь на ЦНС. Этим, пожалуй, объясняется тот факт, что в основном заболевают дети в раннем возрасте, у которых затем развиваются специфические расстройства психической деятельности. Весьма вероятно также, что отдельные аминокислоты и продукты их обмена в оптимальных концентрациях являются эссенциальными для некоторых сторон деятельности мозга. Поэтому задача биохимиков, физиологов и клиницистов состоит в том, чтобы выяснить зависимость между развитием патологического синдрома при врожденных «пороках» обмена и специфическими нарушениями обмена аминокислот. Ниже приведены некоторые примеры подобных нарушений.

Фенилкетонурия (фенилпировиноградная олигофрения) развивается как результат потери способности организма синтезировать фенилаланин-4-монооксигеназу, катализирующую превращение фенилаланина в тирозин. Характерной особенностью болезни является резкое замедление умственного развития ребенка, а также экскреция с мочой больших количеств фенилпировиноградной кислоты (до 1–2 г/сут) и фенилацетилглутамина (до 2–3 г/сут). Решающим доказательством метаболического блока при фенилкетонурии являются данные о накоплении фенилаланина в тканях. Так, количество его в крови может достигать до 600 мг/л (в норме 15 мг/л), в спинномозговой жидкости — до 80 мг/л (в норме 1,5 мг/л). Развитие болезни можно предотвратить, если значительно снизить или исключить прием фенилаланина с пищей с самого рождения ребенка.

Алкаптонурия характеризуется экскрецией с мочой больших количеств (до 0,5 г/сут) гомогентизиновой кислоты, окисление которой кислородом воздуха придает моче темную окраску. В далеко зашедших случаях развиваются охроноз, отложение

пигмента в тканях и потемнение носа, ушей и склеры. Эта болезнь известна с древнейших времен, однако только в 1962 г. были получены доказательства, что метаболический дефект при алкаптонурии связан с врожденным отсутствием в печени и почках оксидазы гомогентизиновой кислоты.

Альбинизм характеризуется врожденным отсутствием пигментов в коже, волосах и сетчатке. Метаболический дефект связан с потерей меланоцитами способности синтезировать тирозиназу — фермент, катализирующий окисление тирозина в диоксифенилаланин и диоксифенилаланинхинон, являющихся предшественниками меланина. Предположение о блокировании процесса полимеризации меланина при альбинизме не подтвердилось.

Болезнь Хартнупа характеризуется специфическими нарушениями обмена триптофана. Основным проявлением болезни, помимо пеллагроподобных кожных поражений, психических расстройств и атаксии, служит гипераминоацидурия. Поскольку с мочой выделяются в повышенных количествах индолилацетат, индолилацетилглутамин и индикан, но нормальные количества индолилмолочной кислоты, очевидно, метаболический блок связан с первой реакцией нормального пути обмена триптофана, и обмен преимущественно идет по пути декарбоксилирования. При другом наследственном «пороке» обмена триптофана — болезни «моча с запахом кленового сиропа» и при фенилкетонурии также экскретируется индолилацетат, но в этих случаях он имеет своим источником индолилпируват, так как параллельно с мочой выделяется в больших количествах индолилмолочная кислота, которая может образоваться только из фенилпирувата. Согласно новым данным, при болезни Хартнупа метаболический дефект связан с врожденным нарушением всасывания триптофана в кишечнике и реабсорбции триптофана и продуктов его обмена в почках. Из этого следует, что по химическому составу индолилпроизводных в моче и крови можно судить как о природе болезни (карциноидная опухоль, фенилкетонурия, болезнь Хартнупа и др.), так и о механизме нарушения обмена триптофана, что важно для постановки правильного диагноза и проведения адекватного лечения.

Таким образом, первичные нарушения обмена отдельных аминокислот обычно наступают вследствие блокирования действия какого-либо фермента. В ряде случаев имеет место резкое отставание умственного развития. Однако вопрос о том, чем обусловлено это торможение психической деятельности — токсическим действием ненормально высоких концентраций аминокислот или их метаболитов на мозг, нарушением нормального соотношения аминокислот и, следовательно, биосинтеза белка или вторичными нарушениями энергетического и других видов обмена, окончательно не решен. Поэтому идентификация химической реакции или ферментативной системы, нарушение функции которой является первопричиной развития тяжелого наследственного заболевания, в наши дни не только представляет большой теоретический интерес, но и играет в ряде случаев решающую роль в диагностике и терапии этих болезней. Следует всегда учитывать, что при блокировании нормального пути обмена какой-либо аминокислоты промежуточные метаболиты, следующие за местом блокирования, становятся незаменимыми при данном заболевании.

ОБМЕН СЛОЖНЫХ БЕЛКОВ

В данной главе будут рассмотрены современные представления о биосинтезе и распаде простетических групп только двух классов сложных белков — нуклеопротеинов и хромопротеинов, белковые компоненты которых подвергаются превращениям, свойственным всем белкам.

ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нуклеиновые кислоты составляют существенную небелковую часть сложного класса органических веществ, получивших название нуклеопротеинов (см. главу 2); последние являются основой наследственного аппарата клетки хромосом. Белковые компоненты нуклеопротеинов подвергаются многообразным превращениям, аналогичным метаболизму белков и продуктов их распада — аминокислот, подробно рассмотренному в главе 11. В отношении самих нуклеиновых кислот, их структуры и функций в живых организмах в последнее время накоплен огромный фактический материал, подробно рассмотренный в ряде специальных руководств и монографий. Помимо важной роли нуклеиновых кислот в хранении и реализации наследственной информации, промежуточные продукты их обмена, в частности моно-, ди- и трифосфатнуклеозиды, выполняют важные регуляторные функции, контролируя биоэнергетику клетки и скорость метаболических процессов. В то же время нуклеиновые кислоты не являются незаменимыми пищевыми факторами и не играют существенной роли в качестве энергетического материала.

Переваривание нуклеопротеинов и всасывание продуктов их распада осуществляется в желудочно-кишечном тракте. Под влиянием ферментов желудка, частично соляной кислоты, нуклеопротеины пищи распадаются на полипептиды и нуклеиновые кислоты; первые в кишечнике подвергаются гидролитическому расщеплению до свободных аминокислот. Распад нуклеиновых кислот осуществляется в тонком кишечнике в основном гидролитическим путем под действием ДНКазы и РНКазы поджелудочного сока. Продуктами реакции при действии РНКазы являются пуриновые и пиримидиновые мононуклеотиды, смесь ди- и тринуклеотидов и резистентные к действию РНКазы олигонуклеотиды. Под действием ДНКазы образуются в основном динуклеотиды, олигонуклеотиды и небольшое количество мононуклеотидов. Полный гидролиз нуклеиновых кислот до стадии мононуклеотидов осуществляется, очевидно, другими, менее изученными ферментами (фосфодиэстеразами) слизистой оболочки кишечника.

В отношении дальнейшей судьбы мононуклеотидов существует два предположения. Мононуклеотиды в кишечнике расщепляются под действием неспецифических фосфатаз (кислой и щелочной), которые гидролизуют фосфозфирную связь мононуклеотида («нуклеотидазное» действие), с образованием нуклеозидов и фосфорной кислоты, и в таком виде всасываются. Согласно второму предположению, мононуклеотиды всасываются, и распад их осуществляется в клетках слизистой оболочки кишечника. Имеются также доказательства существования в стенке кишечника нуклеотидаз, катализирующих гидролитический распад мононуклеотидов. Дальнейший распад образовавшихся нуклеозидов осуществляется внутри клеток слизистой оболочки преимущественно фосфоролитическим, а не гидролитическим путем¹.

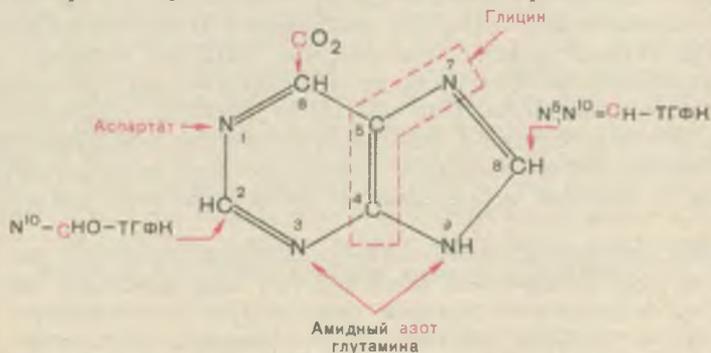
¹ В животных тканях открыты специфические нуклеозидфосфорилазы, действующие на нуклеозиды.

Всасываются преимущественно нуклеозиды, и в таком виде часть азотистых оснований может быть использована для синтеза нуклеиновых кислот организма. Если же происходит дальнейший распад нуклеозидов до свободных пуриновых и пиримидиновых оснований, то гуанин не используется для синтетических целей. Что касается других оснований, то, как показывают опыты с мечеными по азоту аденином и урацилом, в тканях они могут включаться в состав нуклеиновых кислот. Однако экспериментальные данные свидетельствуют, что биосинтез азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот органов и тканей, протекает преимущественно, если не целиком, *de novo* из низкомолекулярных азотистых и безазотистых предшественников.

Таким образом, синтез нуклеиновых кислот, мономерными единицами которых являются мононуклеотиды, будет определяться скоростью синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов: синтез последних в свою очередь зависит от наличия всех составляющих их трех компонентов. Источником рибозы и дезоксирибозы являются продукты превращения глюкозы в пентозофосфатном цикле. Пока не получены доказательства существенности пищевых пентоз в синтезе нуклеиновых кислот. Фосфорная кислота также не является лимитирующим фактором, поскольку она поступает в достаточном количестве с пищей. Следовательно, биосинтез нуклеиновых кислот начинается с синтеза азотистых оснований (точнее мономерных молекул — мононуклеотидов).

Биосинтез пуриновых нуклеотидов

Пуриновые основания, образующиеся в процессе переваривания нуклеиновых кислот в кишечнике, в дальнейшем практически не используются, поэтому их синтез осуществляется из низкомолекулярных предшественников, продуктов обмена углеводов и белков. Впервые работами Дж. Бьюкенена, Дж. Гринберга экспериментально доказано включение ряда меченых атомов, в частности ^{15}N - и ^{14}C -глицина, ^{15}N -аспартата, ^{15}N -глутамина и др., в пуриновое кольцо мочевиной кислоты. Скармливая птицам эти и другие меченые соединения, Бьюкенен анализировал места включения метки в пуриновое кольцо; полученные данные были в дальнейшем уточнены и подтверждены рядом других авторов. Результаты этих исследований представлены в виде схемы:

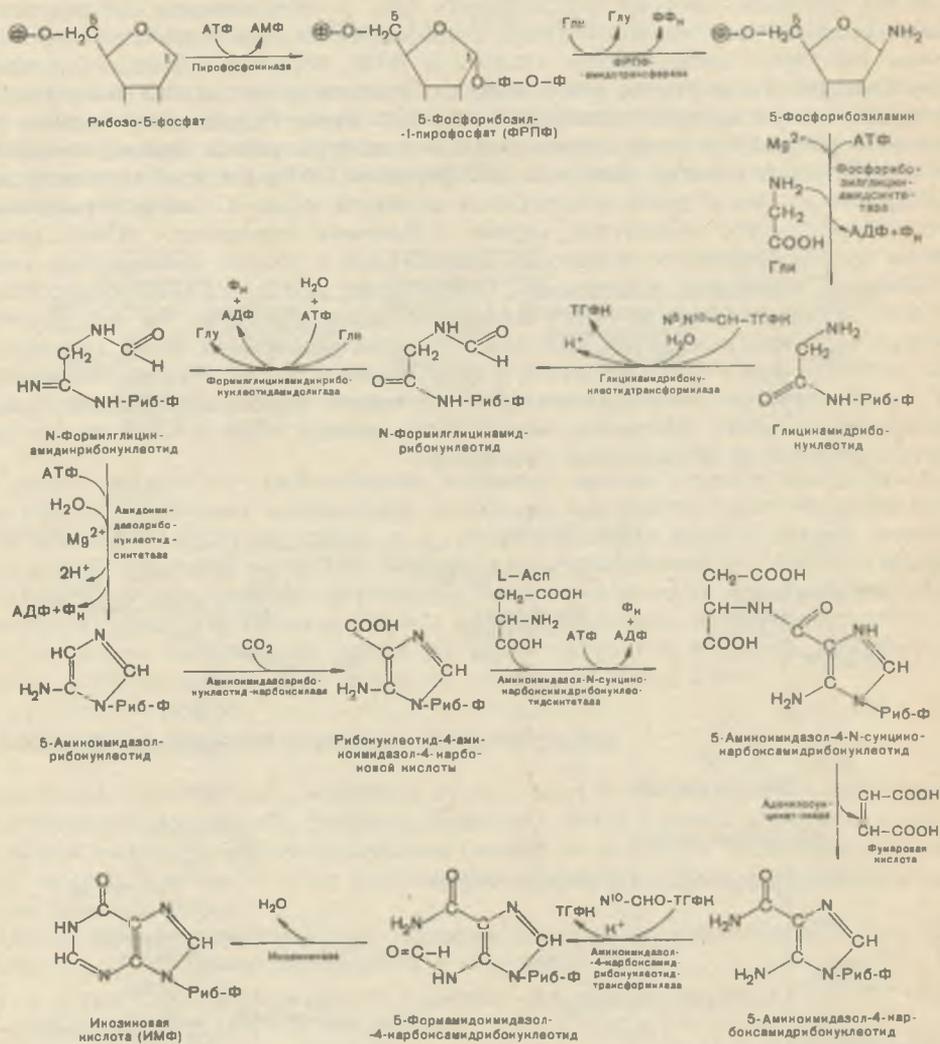


Из схемы видно, что 4-й и 5-й атомы углерода и 7-й атом азота в ядре имеют своим источником глицин. Два атома азота (N-3 и N-9) происходят из амидной группы глутамина, один атом азота (N-1) — из азота аспарагиновой кислоты; углеродный атом (C-2) происходит из углерода N^{10} -формил-ТГФК, атом углерода в 8-м положении — из $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -метенил-ТГФК и, наконец, углерод C-6 имеет своим источником CO_2 .

В настоящее время благодаря исследованиям Дж. Бьюкенена, Дж. Гринберга, А. Корнберга и их сотрудников полностью расшифрована последовательность включения перечисленных выше веществ в пуриновое кольцо, установлена природа всех

промежуточных соединений и ферментных систем, катализирующих химические реакции.

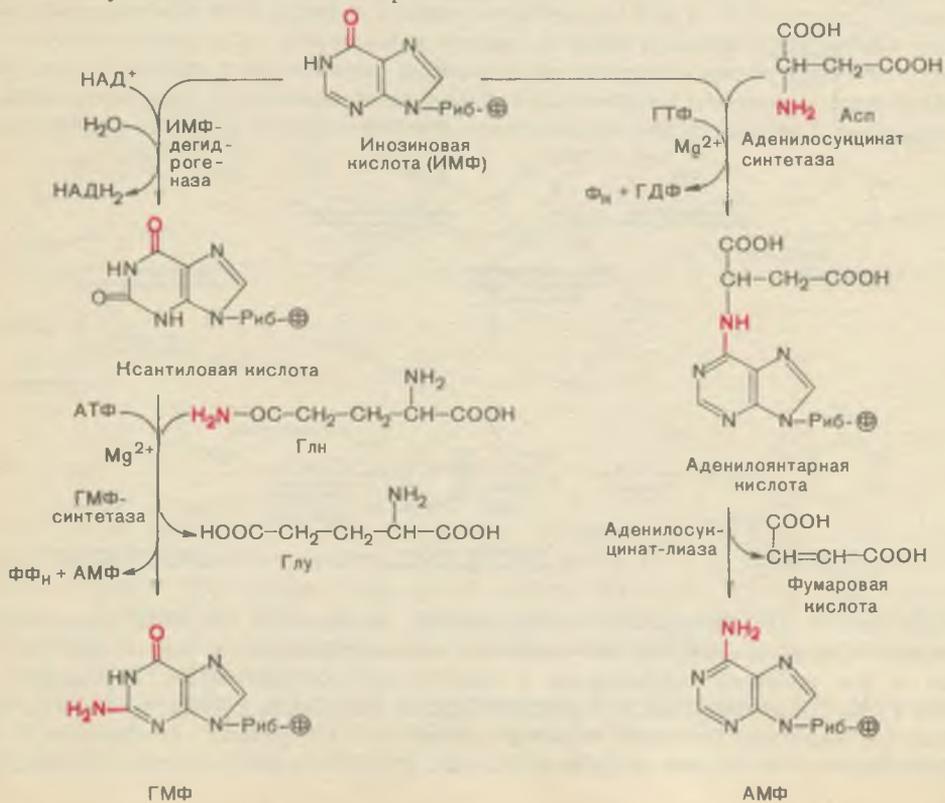
Интересным оказался факт почти полного совпадения путей синтеза пуриновых оснований в печени животных и у микроорганизмов, в частности у *E. coli* и *Neurospora crassa*. Следует, однако, отметить, что конечным результатом синтеза оказалось не свободное пуриновое основание, а рибонуклеотид — инозиновая кислота (ИМФ), из которой далее синтезируются АМФ и ГМФ. На схеме представлена последовательность всех 11 химических реакций этого синтеза с указанием ферментных систем, кофакторов, источников энергии и других известных к настоящему времени кофакторов.



Как видно из приведенной схемы, синтез инозиновой кислоты начинается с D-рибозо-5-фосфата, который, как известно, является продуктом пентозофосфатного цикла и на который переносится в необычной реакции сразу пирофосфатная группа АТФ. Образовавшийся 5-фосфорибозил-1-пирофосфат (ФРПФ) взаимодействует с глутамином, который является донором NH₂-группы, и образуется β-5-фосфорибозил-амин, причем в процессе реакции наряду с освобождением пирофосфата

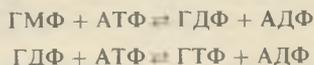
и свободной глутаминовой кислоты происходит изменение конфигурации (из α - в β -). Таким образом, данная стадия становится ключевой реакцией в синтезе пуринов. На следующей стадии присоединяется вся молекула глицина к свободной NH_2 -группе β -5-фосфорибозил-амин (реакция нуждается в доставке энергии АТФ) с образованием глицинамидрибонуклеотида. Цепь в следующей стадии удлиняется за счет присоединения формильной группы из $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -метенил-ТГФК с образованием формилглицинамидрибонуклеотида. На формильную группу последнего переносится далее амидная группа глутамин и синтезируется формилглицинамидинрибонуклеотид (реакция также идет с потреблением энергии АТФ). На следующей стадии замыкается пятичленное имидазольное кольцо и образуется 5-аминоимидазолрибонуклеотид, который способен акцептировать CO_2 с образованием рибонуклеотида 5-аминоимидазол-4-карбонной кислоты. В последующем двухступенчатом процессе, в котором участвуют аспарагиновая кислота и АТФ, образуется 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотид и освобождается фумаровая кислота. В этих реакциях азот аспарагиновой кислоты включается в 1-е положение будущего пуринового ядра. Последний углеродный атом пиримидинового остатка кольца пурина вводится в виде формильного остатка (источник N^{10} -формил-ТГФК), который присоединяется к 5- NH_2 -группе. После этого отщепляется молекула воды и второе кольцо замыкается. В результате образуется первый пуриновый нуклеотид – ИМФ, которая является предшественником пуриновых нуклеотидов в составе нуклеиновых кислот.

Биосинтез пуриновых нуклеотидов. Образование АМФ и ГМФ осуществляется из ИМФ. Причем в синтезе обоих мононуклеотидов участвуют по два фермента, отличных по своему механизму действия. Образование ГМФ из ИМФ катализирует ИМФ-дегидрогеназа и ГМФ-синтетаза, а образование АМФ из того же предшественника катализируется последовательным действием аденилосукцинатсинтетазы и аденилосукцинат-лиазы. Механизм двухэтапного синтеза АМФ и ГМФ можно представить следующими химическими реакциями:

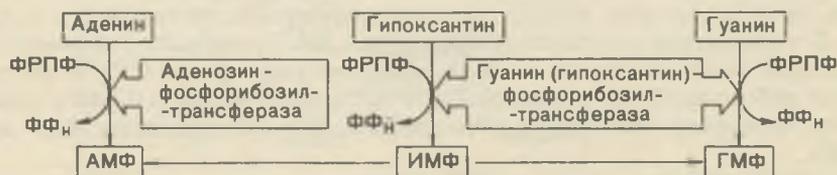


В ферментативном синтезе АМФ из ИМФ специфическое участие принимает аспарагиновая кислота, являющаяся донором NH_2 -группы, и ГТФ в качестве источника энергии; промежуточным продуктом реакции является аденилоянтарная кислота. Биосинтез ГМФ, напротив, начинается с дегидрогеназной реакции ИМФ с образованием кантозиловой кислоты; в аминировании последней используются только амидный азот глутамина.

Превращение АМФ и ГМФ в соответствующие нуклеозидди- и трифосфаты также протекает в две стадии при участии специфических нуклеозидмонофосфат- и нуклеозиддифосфаткиназ¹:



Быстрорастущие ткани (эмбриональная, опухолевая, регенерирующая) используют также резервные (запасные) пути синтеза пуриновых нуклеотидов из свободных азотистых оснований: аденина, гуанина и гипоксантина. Ферменты, катализирующие синтез нуклеотидов, требуют наличия ФРПФ. В общей форме реакции протекают следующим образом:

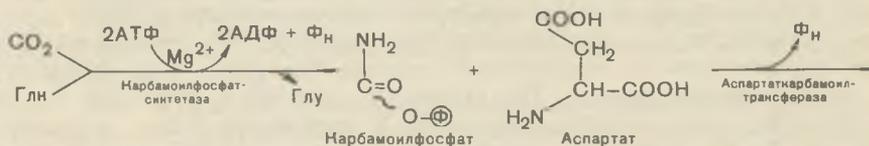


Следует указать на существование в клетках весьма тонкого механизма регуляции синтеза пуриновых нуклеотидов. Синтез их тормозится конечными продуктами по принципу обратной связи, т.е. ингибированием первой стадии переноса аминогруппы глутамина на ФРПФ. Фермент, катализирующий эту стадию, оказался аллостерическим регуляторным ферментом. Вторая особенность механизма регуляции заключается в том, что избыток ГМФ в клетках оказывает аллостерическое торможение только на собственный синтез, не влияя на синтез АМФ, и, наоборот, накопление АМФ подавляет свой синтез, не ингибируя синтез ГМФ.

Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов

Механизм синтеза пиримидиновых нуклеотидов почти полностью расшифрован благодаря исследованиям П. Рейхарда. Показано, что в клетках животных и микроорганизмах промежуточными продуктами синтеза не являются свободные пиримидиновые основания и что остаток рибозы присоединяется к уже сформировавшемуся пиримидиновому кольцу.

Последовательность химических реакций синтеза пиримидиновых нуклеотидов, в частности УМФ, можно представить в следующем виде:



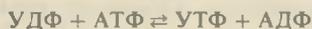
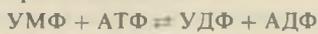
¹ Следует, однако, напомнить, что основным механизмом синтеза самого АТФ из АДФ и неорганического фосфата в живых организмах является окислительное фосфорилирование (см. главу 8).



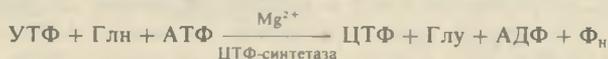
Как видно из уравнений, первая стадия синтеза УМФ включает катализируемое цитоплазматической карбамоилфосфатсинтетазой образование карбомилфосфата из глутамина (см. главу 11).

На второй стадии карбамоилфосфат реагирует с аспаратом с образованием N-карбамоиласпарагиновой кислоты. Последняя подвергается циклизации (под действием дигидрооротазы) с отщеплением молекулы воды, при этом образуется дигидрооротовая кислота, которая, подвергаясь дегидрированию, превращается в оротовую кислоту. В этой реакции участвует специфический НАД-содержащий фермент дегидрооротатдегидрогеназа. Оротовая кислота обратимо реагирует с ФРПФ, являющимся донатором рибозо-фосфата, с образованием оротидин-5'-фосфата (ОМФ). Декарбоксилирование последнего приводит к образованию первого пиримидинового нуклеотида — УМФ.

Превращение УМФ в УДФ и УТФ осуществляется, как и в случае пуриновых нуклеотидов, путем фосфорилирования:



Биосинтез цитидиловых нуклеотидов. Предшественником цитидиловых нуклеотидов является УТФ, который превращается в ЦТФ:

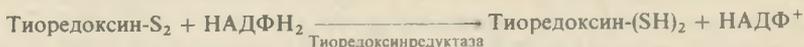
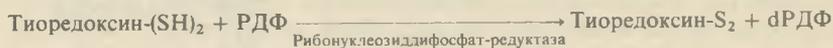


У прокариот в этой реакции используется преимущественно свободный аммиак, в то время как в клетках животных ЦТФ-синтетазы катализируют включение амидной группы глутамина в 4-е положение пиримидинового кольца УТФ. Следует отметить, что образующийся ЦТФ служит отрицательным эффектором регуляторного, аллостерического фермента аспарат-карбамоилтрансферазы, ингибируя таким образом по типу обратной связи начальную стадию биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов. АТФ предотвращает это ингибирование.

Биосинтез тимидиловых нуклеотидов. Поскольку тимидиловые нуклеотиды входят в состав ДНК, содержащей дезоксирибозу, рассмотрим сначала механизмы синтеза дезоксирибонуклеотидов. При помощи метода меченых атомов было показано, что этот синтез начинается не со свободной дезоксирибозы, а путем прямого восстановления рибонуклеотидов у 2'-го атома углерода. При инкубации меченых предшественников (рибонуклеотидов) в бесклеточной системе бактерий метку обнаружили в составе дезоксирибонуклеотидов. По данным П. Рейхарда, у *E. coli* все четыре рибонуклеозиддифосфата восстанавливаются в соответствующие дезоксианалоги: dАДФ, dГДФ, dЦДФ, dУДФ при участии сложной ферментной системы, состоящей по меньшей мере из четырех разных ферментов.

Химический смысл превращения рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды сводится к элементарному акту — восстановлению рибозы в 2-дезоксирибозу, тре-

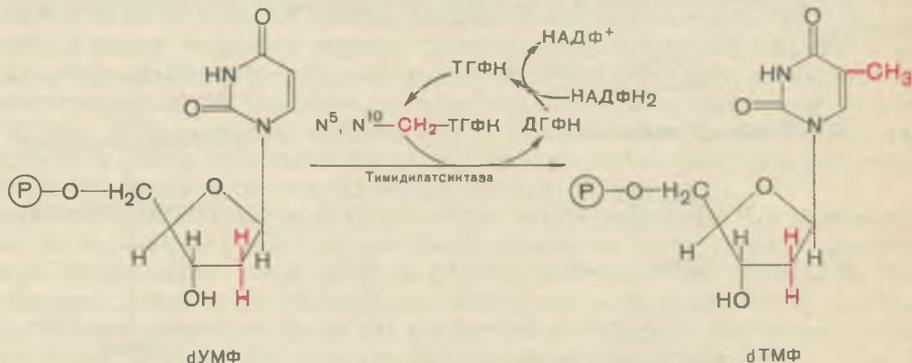
бующему наличию двух атомов водорода; непосредственным их источником оказался восстановленный термостабильный белок — т и о р е д о к с и н, содержащий две свободные SH-группы на 108 аминокислотных остатков. Тиоредоксин легко окисляется, превращаясь в дисульфидную S-S-форму; для его восстановления в системе имеется специфический ФАД-содержащий фермент тиоредоксинредуктаза (молекулярная масса 68 000 Да), требующая наличия восстановленного НАДФН₂. Обозначив условно рибонуклеозиддифосфат символом РДФ, образование дезоксирибонуклеотидов можно представить следующим образом:



Обе стадии могут быть представлены в виде схемы:

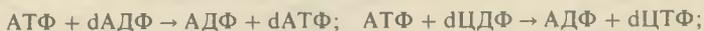


Для синтеза тимидиловых нуклеотидов, помимо дезоксирибозы, требуется также метилированное производное урацила — тимин. Оказалось, что в клетках имеется особый фермент тимидилатсинтаза, катализирующий метилирование не свободного урацила, а dУМФ; реакция протекает по уравнению:

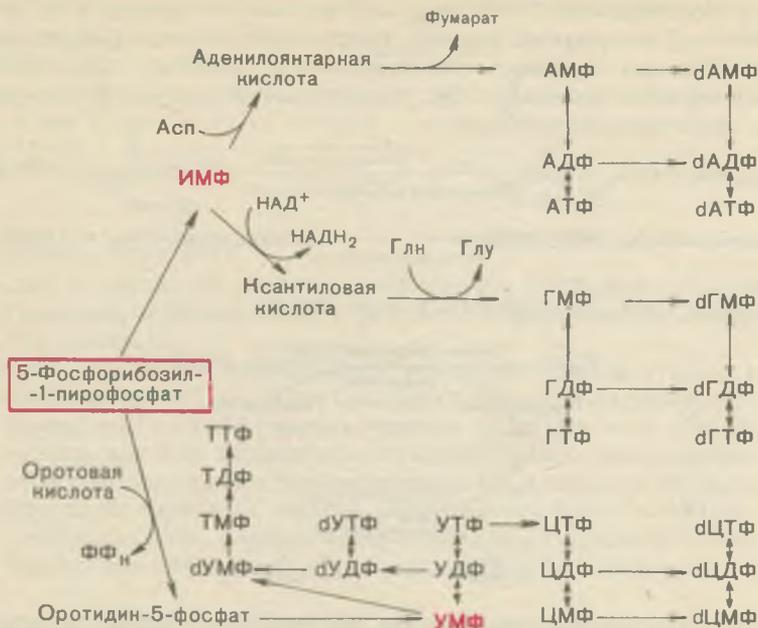


Донором метильной группы в тимидилатсинтазной реакции является N⁵,N¹⁰-метилен-ТГФК, которая одновременно отдает и водородный протон, поэтому конечным продуктом кофермента является не тетрагидро-, а дигидрофолиевая кислота (ДГФК). Последняя вновь восстанавливается до ТГФК под действием НАДФН₂-зависимой дигидрофолатредуктазы. Из образовавшегося ТМФ путем фосфотрансферных реакций образуются dТДФ и dТТФ.

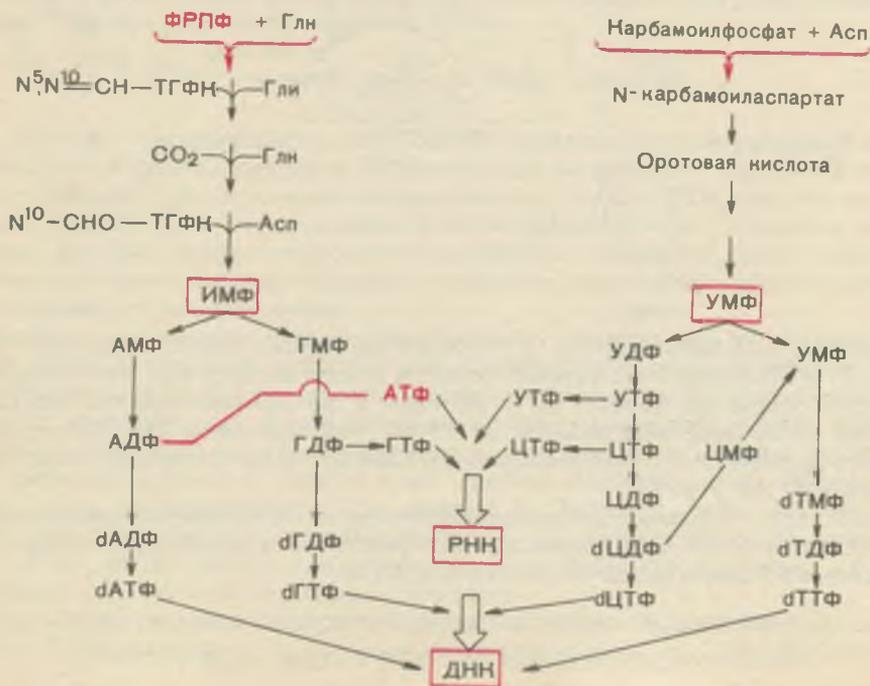
Синтез всех остальных дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов, непосредственно участвующих в синтезе ДНК, также осуществляется путем фосфорилирования дезоксирибонуклеозид-5'-дифосфатов в присутствии АТФ:



Ниже на двух схемах суммированы имеющиеся данные о взаимопревращениях пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, а также о связи их с синтезом нуклеиновых кислот. Как видно из представленных данных, в образовании пуриновых и



пиримидиновых нуклеотидов специфическое участие принимает ФРПФ, являющийся донором фосфорибозильного остатка в биосинтезе как оротидин-5'-фосфата, так и ИМФ; последние считаются ключевыми субстратами в синтезе нуклеиновых кислот в клетках.



БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Проблема биосинтеза нуклеиновых кислот является предметом пристального внимания многих исследователей и целых научных коллективов. Следует прежде всего указать на исключительную трудность решения этой важнейшей проблемы, связанную с неполными представлениями о природе белковых факторов и механизмах регуляции синтеза нуклеиновых кислот.

До сих пор не раскрыты в деталях молекулярные механизмы передачи генетической информации, записанной, закодированной в нуклеотидной последовательности ДНК. Различают три основных этапа реализации генетической информации. На первом этапе, получившем наименование репликации, происходит образование дочерних молекул ДНК, первичная структура которых идентична родительской ДНК (копирование ДНК). Репликация ДНК является ключевой функцией делящейся клетки и частью таких биологических процессов, как рекомбинация, транспозиция и репарация. На втором этапе, названном транскрипцией, генетическая информация, записанная в первичной структуре ДНК, переписывается в нуклеотидную последовательность РНК (т. е. синтез молекулы РНК на матрице ДНК). На третьем этапе, называемом трансляцией, генетическая информация, содержащаяся уже в нуклеотидной последовательности молекулы РНК, переводится в аминокислотную последовательность белка. Ниже будут представлены основные итоги исследований, касающиеся биосинтеза полимерных молекул ДНК, РНК и белка, полученные к середине 1987 г.

Биосинтез ДНК

Прежде чем изложить современные представления о механизме биосинтеза ДНК, следует представить те сведения, которыми располагает биохимия, о синтезе этого соединения в бесклеточной системе. Известно, что для любого синтеза полимерной органической молекулы, осуществляемого *in vitro* или *in vivo*, требуется энергия. Источником энергии в реакциях полимеризации мононуклеотидов служит энергия, освобождаемая всеми четырьмя типами дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, участвующих в синтезе ДНК. Образующийся пиродифосфат под действием пиродифосфатазы также расщепляется на две молекулы ортофосфата, давая дополнительную энергию для биосинтеза ДНК, который требует, кроме того, наличия специфических ферментов, катализирующих отдельные этапы синтеза, и белковых факторов, абсолютно необходимых для проявления каталитических свойств ферментов.

Ферментная система синтеза ДНК до конца не расшифрована. По имеющимся сведениям, в репликации ДНК, включающей узнавание точки начала процесса, расплетение родительских цепей ДНК в репликационной вилке, инициацию биосинтеза дочерних цепей и дальнейшую их элонгацию и, наконец, окончание (терминацию) процесса, участвует более 20 ферментов и белковых факторов, объединенных в единую ДНК-репликационную систему, называемую реписомой.

После открытия в 1958 г. А. Корнбергом у *E. coli* фермента, катализирующего биосинтез ДНК и названного ДНК-полимеразой I, в течение почти 10-летнего периода считалось, что этот фермент является единственной полимеразой, принимающей участие в репликации ДНК *in vitro*¹. Однако позже был открыт мутант *E. coli*, лишенный ДНК-полимеразы I, но способный синтезировать ДНК с нормальной скоростью. Оказалось, что для репликации ДНК *E. coli* необходимо несколько ферментов. ДНК-полимераза I не наделена способностью инициировать синтез цепей ДНК *de novo*. Одним из хорошо изученных ферментов, участвующих в стадии

¹ За выдающийся вклад, внесенный в решение проблем биосинтеза ДНК и РНК, А. Корнберг и С. Очоа были удостоены Нобелевской премии в 1959 г.

инициации репликации ДНК, является специфическая клеточная РНК-полимераза, названная п р а й м а з о й, которая катализирует синтез короткого олигорибонуклеотида (от 4 до 10 нуклеотидов), т. е. п р а й м е р а, с которого затем начинается синтез ДНК. Праймазы различаются как по структуре, так и по специфичности действия. Получены новые данные о существенной роли праймасы в каталитическом действии фермента. П р а й м а с о м а представлена ансамблем из 7 различных субъединиц, включающих около 20 полипептидов общей массой 70 000 Да. При помощи белка п' праймасама подвергается быстрому перемещению к отстающей цепи ДНК за счет энергии, генерируемой АТФазной активностью белка п'. В состав праймасы входит также комплекс белков dna В и dna С, который вблизи репликационной вилки периодически участвует в формировании специфической вторичной структуры ДНК, подходящей для узнавания праймазой.

Основным ферментом, катализирующим биосинтез новообразовавшейся ДНК, точнее стадию элонгации репликации ДНК, является ДНК-полимераза III, представляющая собой мультисубъединичный комплекс собственно ДНК-полимеразы (молекулярная масса 400 000 Да) и ряда других белков. Более точно выяснена также роль ДНК-полимеразы I (Корнберга); она катализирует отщепление затравочного олигорибонуклеотидного праймера и заполнение образующихся после этого пробелов дезоксирибонуклеотидами. Относительно роли ДНК-полимеразы II E. coli (молекулярная масса 120 000 Да) пока не получено достоверных данных. Укажем также, что ДНК-полимераза I в качестве матрицы требует одноцепочечные участки, в то время как ДНК-полимераза III использует двухцепочечные ДНК, в которых имеются короткие одноцепочечные последовательности.

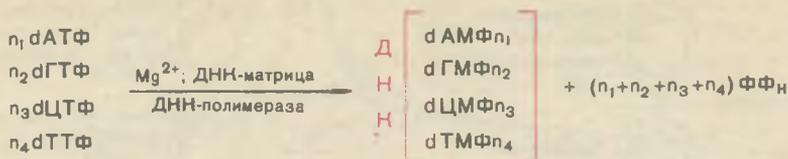
Кроме того, важную функцию соединения двух цепей ДНК или замыкание двух концов одной цепи ДНК в процессе репликации или репарации ДНК выполняет особый фермент — ДНК-лигаза, катализирующая за счет энергии АТФ образование фосфодиэфирной связи между 3'-ОН-группой дезоксирибозы одной цепи и 5'-фосфатной группой другой цепи ДНК.

Функцию раскручивания (расплетения) двойной спирали ДНК в репликационной вилке, происходящего за счет энергии гидролиза АТФ, выполняет специфический гер-белок, названный х е л и к а з о й. Образовавшиеся на некоторое время одноцепочечные участки ДНК служат в качестве матрицы при репликации и стабилизируются при помощи особых белков, связывающихся с одноцепочечной ДНК (ДНК-связывающие белки) и препятствующих обратному комплементарному взаимодействию цепей ДНК; поэтому их иногда называют дестабилизирующими двойную спираль белками. Имеется, кроме того, особый фермент т о п о и з о м е р а з а, названный у прокариот ДНК-гиразой, который удаляет положительные и вносит отрицательные супервитки, способствуя тем самым расщеплению спирали ДНК в области репликационной вилки. Наконец, открыты специальные ферменты, «редактирующие» ДНК, т. е. осуществляющие вырезание и удаление ошибочно включенных нуклеотидов или репарирующие повреждения ДНК, вызванные физическими или химическими факторами (рентгеновское или УФ-облучение, химический мутагенез и др.).

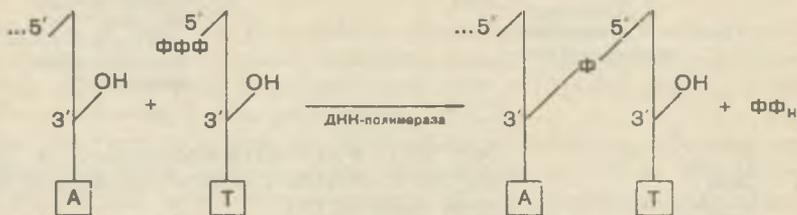
Из животных тканей выделено несколько ДНК-полимераз и, поскольку в разных лабораториях они получили самые разные наименования, была созвана специальная международная конференция по унификации номенклатуры ДНК-полимераз эукариот. В настоящее время принято считать, что в клетках присутствуют: ДНК-полимераза-α (молекулярная масса 100 000 Да), активная в присутствии биспиральной молекулы ДНК, ДНК-полимераза-β (50 000 Да), относительно стабильная к действию SH-блокирующих реагентов, и ДНК-полимераза-γ (100 000 Да), активность которой, напротив, определяется сохранностью SH-группы. Последняя отвечает за синтез митохондриальной ДНК.

Общий механизм синтеза ДНК. Основываясь на данных биспиральной антипараллельной структуры и химического состава ДНК (см. главу 3), а также на данных о значении «активированной» формы энергии для биосинтеза полимерных молекул,

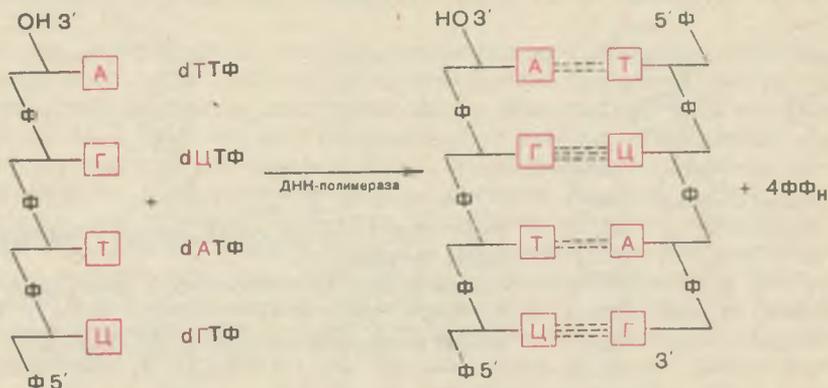
А. Корнберг еще в 1955 г. впервые указал на возможность синтеза ДНК энзиматическим путем в бесклеточной системе в присутствии изолированной из *E. coli* ДНК-полимеразы и предшественников дезоксирибонуклеозидтрифосфатов; реакция, практически осуществленная в 1967 г., сводится к синтезу новой молекулы ДНК:



Химический смысл полимеризации состоит в том, что свободная 3'-гидроксильная группа матрицы атакует α -атом фосфора соответствующего нуклеозидтрифосфата (определяемого затравкой); при этом происходит отщепление остатка пирофосфата и образование фосфодиэфирной связи. Далее 3'-гидроксил вновь образованного нуклеотида атакует α -атом фосфора следующего нуклеозидтрифосфата, и таким путем продолжается процесс полимеризации, идущий в направлении $5' \rightarrow 3'$, в противоположность матрице, оканчивающейся 5'-фосфатом:



Реакция требует присутствия одноцепочечной ДНК или в крайнем случае небольших полинуклеотидов. Пока еще не выяснено значение преобразованной ДНК в действии ДНК-полимераз. Наиболее вероятно, что ДНК служит не только затравкой, но и матрицей, на которой фермент комплементарно и антипараллельно синтезирует новую цепь ДНК; это можно представить в виде схемы:



Были предприняты другие подходы к выяснению механизма полимеразной реакции. В лаборатории А. Корнберга был открыт фаг (φX174), содержащий одноцепочечную кольцевую ДНК; эту молекулу использовали в качестве матрицы в ДНК-полимеразной реакции и получили биологически активную ДНК фага, используя фермент ДНК-лигазу, обладающий способностью катализировать репарацию ДНК (соединение концов разрывов в молекуле ДНК). Было показано, что в процессе



Рис. 12.1. Роль ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы в синтезе кольцевой одноцепочечной ДНК фага ΦX174.

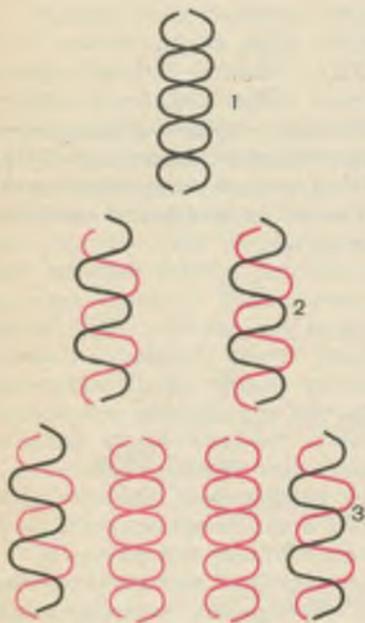


Рис. 12.2. Полуконсервативная репликация ДНК *in vivo*.

Каждая из двух цепей родительской ДНК служит матрицей для синтеза дочерних молекул ДНК. 1 – родительская молекула; 2 – дочерние молекулы (первая генерация); 3 – дочерние молекулы (вторая генерация).

репликации одноцепочечная ДНК фага ΦX174 проходит стадию образования двухцепочечной кольцевой ДНК. Применив ряд остроумных подходов, А. Корнберг и сотр. в опытах *in vitro* создали искусственную молекулу фага ΦX174, обладающую способностью поражать (инфицировать) *E. coli*, вызывая лизис бактерии. Последовательность событий может быть представлена на схеме, где исходная молекула кольцевой ДНК фага ΦX174 обозначена плюсом (+), а вновь синтезируемая молекула – минусом (-) (рис. 12.1).

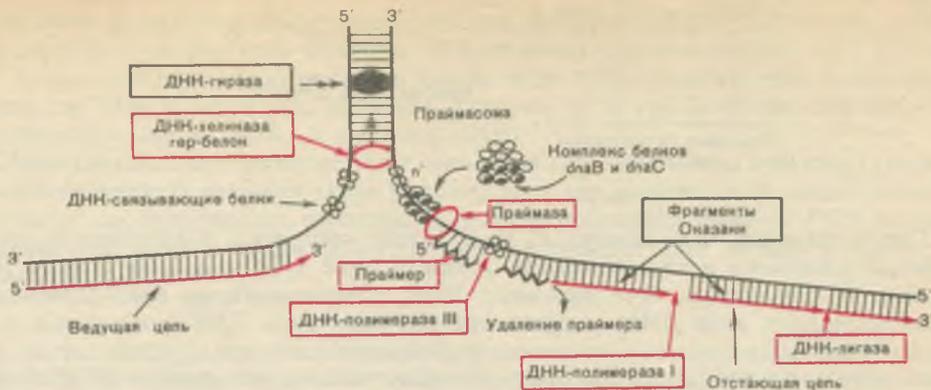


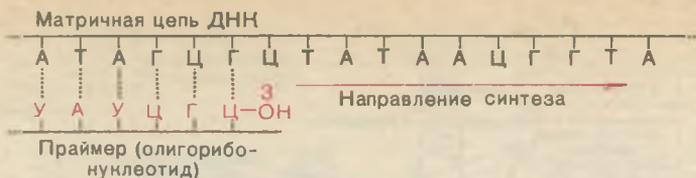
Рис. 12.3. Основные этапы репликации ДНК (схема).

М. Мезельсон и Ф. Сталь показали полуконсервативный механизм репликации ДНК, включающий образование дочерних молекул ДНК, в каждой из которых сохраняется лишь одна родительская цепь (рис. 12.2). На рис. 12.3 схематически представлены основные этапы репликации ДНК.

Сложность процесса репликации ДНК объясняется тем, что обе цепи реплицируются одновременно, хотя имеют разное направление ($5' \rightarrow 3'$ и $3' \rightarrow 5'$), кроме того, рост дочерних цепей также должен происходить в противоположных направлениях. Но поскольку элонгация каждой дочерней цепи может осуществляться только в направлении $5' \rightarrow 3'$, Р. Оказаки было высказано предположение, подтвержденное экспериментальными данными, что синтез одной из дочерних цепей осуществляется непрерывно в одном направлении, в то время как синтез второй дочерней цепи происходит прерывисто путем соединения коротких фрагментов, называемых фрагментами Оказаки, в свою очередь синтезируемых в противоположном направлении; указанные фрагменты имеют небольшие размеры (у *E. coli* около 2000 нуклеотидов, у эукариот около 200).

Получены доказательства, что образование каждого фрагмента Оказаки требует наличия короткого затравочного и комплементарного праймера, участка РНК, синтез которого катализируется праймазой. Затем при участии ДНК-полимеразы III синтезируется ДНК. РНК-затравки вырезаются при участии специфических ферментов, а места их замещаются комплементарными дезоксирибонуклеотидами; это замещение катализируется ДНК-полимеразой I, а сшивание участков с отстающей цепью осуществляется при помощи ДНК-лигаз. Подобный механизм челночного синтеза ДНК легко объясняет фактические данные о накоплении коротких фрагментов ДНК у *E. coli* во время репликации ДНК. Имеются экспериментальные доказательства многоточечного механизма начала репликации ДНК у эукариот: из каждой точки одновременно и в противоположных направлениях движутся две репликационные вилки; репликация продолжается до тех пор, пока не будут синтезированы две дочерние молекулы ДНК, в каждой из которых содержится одна родительская цепь.

Как было указано выше, инициация биосинтеза дочерних цепей ДНК требует предварительного синтеза на матрице ДНК необычного затравочного олигорибонуклеотида, названного праймером, со свободной гидроксильной группой у С-3' рибозы. Этот олигорибонуклеотид, содержащий от 4 до 10 нуклеотидных остатков, синтезируется комплементарно на матрице ДНК при участии особого фермента — РНК-полимеразы:



Предполагается, что именно с этой точки конечного 3'-гидроксила рибозы праймера начинается истинный синтез дочерней цепи ДНК, комплементарной родительской. В дальнейшем этот фрагмент РНК, комплементарно присоединенный к новообразованной цепи ДНК, разрушается под действием ДНК-полимеразы и возникшая брешь застраивается олигодезоксирибонуклеотидом при помощи той же ДНК-полимеразы I. Вполне допустимо предположение, что синтез праймера из олигорибонуклеотида имеет глубокий биологический смысл, поскольку в этом случае могут устраняться ошибки, неизбежно возникающие при инициации репликации ДНК.

Этапы биосинтеза ДНК. Предложен ряд моделей механизма биосинтеза ДНК с участием указанных выше ферментов и белковых факторов, однако детали некоторых этапов этого синтеза еще не выяснены. Предполагается, что условно механизм синтеза может быть подразделен на три этапа: инициацию, т. е. начало, элонгацию, т. е. продолжение, и терминацию, т. е. завершение (прекращение) синтеза.

Первый этап — инициация биосинтеза ДНК — является началом синтеза дочерних нуклеотидных цепей и сводится, как указано выше, к ферментативному биосинтезу на матрице ДНК необычного затравочного олигорибонуклеотида (праймера) со свободной гидроксильной группой у С-3' рибозы. При инициации к цепям ДНК последовательно присоединяются ДНК-связывающие и ДНК-раскручивающие белки, а затем комплексы ДНК-полимераз и ДНК-зависимая РНК-полимераза (праймаза).

Второй этап — элонгация синтеза ДНК — включает стадию репликации обеих материнских цепей ДНК и стадию связывания друг с другом фрагментов новообразуемых цепей ДНК. Первая стадия осуществляется при помощи ДНК-полимеразы III, причем синтез на одной цепи идет непрерывно, а на другой фрагментарно. Фрагменты всякий раз синтезируются раздельно, начиная с праймера, который может переноситься с готового фрагмента при помощи одного из белковых факторов репликации в точку старта биосинтеза последующего фрагмента, направляемого противоположно по биспиральной молекуле ДНК. Второй этап завершается отделением олигорибонуклеотидных праймеров, объединением отдельных фрагментов ДНК при помощи ДНК-лигаз и формированием дочерней цепи ДНК.

Третий этап — терминация синтеза ДНК — наступает скорее всего, когда исчерпана ДНК-матрица и трансферазные реакции прекращаются. Точность репликации ДНК чрезвычайно высока; возможна одна ошибка на 10^{10} трансферазных реакций, однако подобная ошибка обычно легко исправляется за счет процессов репарации.

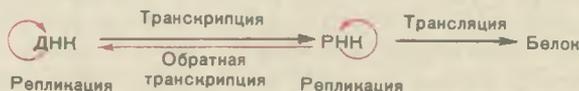
Синтез ДНК на матрице РНК. Выдающимся достижением биохимии нуклеиновых кислот является открытие в составе онковирусов (Раушера и саркомы Рауса) фермента обратной транскриптазы, или ревертазы (РНК-зависимая ДНК-полимераза), катализирующего биосинтез молекулы ДНК на матрице РНК. Накоплены данные, показывающие, что многие РНК-содержащие онкогенные вирусы, получившие наименование онкорнавирусов, содержат ревертазу в составе покровных белков. Фермент открыт также во многих клетках прокариот и эукариот, в частности в лейкозных клетках, пролиферирующих тканях, включая эмбриональные ткани. Ревертаза онкорнавирусов содержит ионы Zn^{2+} и активируется катионами Mn^{2+} и Mg^{2+} . Предполагается, что механизм синтеза ДНК на матрице РНК включает три стадии. На первом этапе фермент ревертаза синтезирует на матрице вирусной РНК комплементарную цепь ДНК, что приводит к формированию гибридной молекулы. На

втором этапе происходит разрушение исходной вирусной РНК из комплекса гибридной молекулы под действием РНКазы. Наконец, на третьем этапе на матрице цепи ДНК комплементарно синтезируются новые цепи ДНК. Ревертазной активностью обладают и ДНК-полимеразы, например фермент из *E. coli* обладает способностью катализировать синтез ДНК на матрице рРНК.

Открытие обратной транскриптазы имеет большое значение не только для выяснения закономерностей процесса малигнизации, но и для всей науки о живом, поскольку указывает на возможность передачи наследственной информации от РНК на ДНК, не подчиняясь основному постулату (поток информации идет только в одном направлении):



В настоящее время можно дополнить эту основную схему передачи генетической информации в живой клетке и представить ее в более полной форме:



На схеме стрелки вокруг ДНК и РНК указывают на возможность молекул копировать самих себя в живых системах при участии соответствующих ферментов. Как знать, не станем ли мы свидетелями открытия принципиальной возможности поворота стрелки и на следующей стадии — от белка на РНК, что могло происходить на Земле при зарождении первичных живых существ?

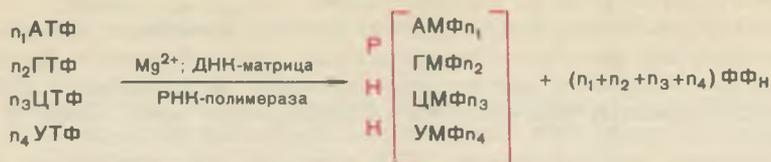
Биосинтез РНК

Поток генетической информации, обозначаемый как *экспрессия генов*, включает процесс транскрипции — биосинтез матричных РНК (как и других типов клеточных РНК) на молекуле ДНК и процесс трансляции — биосинтез белка на мРНК, т. е. генетическая информация ДНК реализуется путем программированного через мРНК синтеза белков, определяющих в конечном счете фенотипические признаки живых организмов. Подсчитано, что около 90–95% ДНК *E. coli* экспрессируется в мРНК, хотя большая часть последней не кодирует синтеза белка; небольшая часть ДНК кодирует синтез двух других клеточных РНК, т. е. рРНК и тРНК. Главное отличие процесса транскрипции от процесса репликации ДНК состоит в том, что в первом случае в основном транскрибируются отдельные гены или группы генов, в то время как при репликации кодируется вся родительская ДНК.

Современным представлениям о механизме синтеза РНК в клетках мы в значительной степени обязаны открытию в 1960 г. в двух лабораториях США (Дж. Хервиц и С. Вейс) особого фермента — РНК-полимеразы, — катализирующего синтез РНК из свободных нуклеозидтрифосфатов. Фермент зависит от наличия ионов Mg^{2+} или Mn^{2+} и требует одновременного присутствия всех четырех типов рибонуклеозидтрифосфатов. Самым удивительным свойством фермента оказалось, что для включения нуклеотидов в РНК необходимо обязательное присутствие преобразованной ДНК-матрицы¹. При тщательном изучении механизма синтеза РНК при участии РНК-полимеразы, обозначаемой также ДНК-зависимая РНК-полимераза (или транскриптаза), было установлено, что молекула преобразованной ДНК, необходимая для реакции полимеризации, всецело определяет последовательность рибонуклеотидов во вновь синтезированной молекуле РНК. Другими словами, на матрице ДНК

¹ Позже были открыты также ферменты (преимущественно в составе оболочек фагов и у ряда бактерий), катализирующие синтез РНК на матрице РНК.

комплементарно строится полирибонуклеотид, являющийся копией первичной структуры ДНК, с той только разницей, что вместо тимидилового нуклеотида ДНК в РНК включается УМФ. Реакция синтеза РНК в общем виде может быть представлена следующим образом:



В синтезируемой молекуле РНК отдельные мононуклеотиды, как и в ДНК, связаны между собой 3'-5'-фосфодиэфирными мостиками. Кроме того, механизм действия РНК-полимераз во многом совпадает с таковым у ДНК-полимераз. Синтез также идет в направлении 5' → 3' и цепь РНК имеет противоположную полярность цепи преобразованной ДНК. Однако имеются и существенные различия. РНК-полимераза *E. coli* предпочтительнее функционирует в присутствии нативной двухцепочечной ДНК и в опытах *in vitro* обе цепи ДНК копируются РНК-полимеразой; *in vivo* транскрибируется, вероятнее всего, только одна цепь ДНК. Предполагается, что РНК-полимераза связывается с одной цепью нативной ДНК в определенной точке, вызывая расплетение биспиральной структуры на ограниченном участке, где и происходит синтез РНК. Фермент как будто бы не нуждается в присутствии праймера, как ДНК-полимераза. Имеющиеся данные свидетельствуют, что у *E. coli* скорее всего имеется единственная ДНК-зависимая РНК-полимераза, которая синтезирует все типы клеточных РНК.

РНК-полимераза *E. coli* изучена наиболее подробно. Это олигомерный фермент, состоящий из двух α -, двух β - (β_1 , β_2) и одной σ -субъединицы, с общей молекулярной массой около 500 кДа. Считается, что функцией σ -субъединицы, называемой σ -фактором, является узнавание определенного участка на матрице ДНК, названного промотором, куда присоединяется РНК-полимераза. Другим субъединицам фермента приписываются функции инициации биосинтеза РНК (α -субъединица), связывания субстратов и элонгации синтеза (β -субъединицы). Кроме того, открыт ряд белков, принимающих участие в механизме синтеза РНК в клетке, в частности исследуется природа репрессорных белков и белка-терминатора (ρ -фактора). Последний обладает способностью обратимо связываться с терминирующим участком ДНК, исключая действие РНК-полимеразы. При отсутствии этого белка образуются исключительно длинные цепи РНК.

Менее полно изучены РНК-полимеразы эукариот. Из клеток животных выделены три группы РНК-полимераз: А, В и С, принимающие участие в синтезе соответственно рРНК, мРНК и тРНК.

Процесс образования молекулы мРНК на матрице ДНК — биогенез мРНК — в прокариотических клетках представляется относительно простым и включает главным образом транскрипцию соответствующего гена при участии РНК-полимеразы. Во многих случаях первичным продуктом экспрессии гена является молекула мРНК, уже способная к функционированию.

Биогенез мРНК у эукариот существенно отличается не только по механизму регуляции транскрипции, но и многоступенчатостью формирования активной молекулы. До открытия феномена сплайсинга (от англ. splicing — созревание, сращивание) мРНК было известно, что многие мРНК эукариот синтезируются в виде гигантских высокомолекулярных предшественников (пре-мРНК), которые уже в ядре подвергаются посттранскрипционному процессингу. Предполагалось, что процессинг включает удаление длинных 5'- и 3'-концевых участков, которые якобы выполняют регуляторные функции. Оказалось, что ген эукариот представляется не непрерывной, а мозаичной структурой, содержащей наряду с кодирующими (так называемые

экзоны), также некодирующие (интроны) последовательности. Фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза катализирует транскрипцию как экзонов (от англ. exit — выход, поскольку продукты транскрипции — участки мРНК — выходят из ядра в цитоплазму и выполняют функцию матрицы в синтезе белка), так и интронов с образованием гетерогенной ядерной РНК (гяРНК), называемой также первичным транскриптом. Термин интроны означает вставочные, нетранслирующие последовательности нуклеотидов в ДНК эукариот; этот термин применим и к вставочным нуклеотидным последовательностям первичного РНК-транскрипта. Интроны вместе с экзонами транскрибируются; однако еще в ядре интроны вырезаются, что приводит к образованию функционирующей мРНК. Ферментативный процесс удаления интронов из РНК-транскрипта и объединение (соединение) соседствующих экзонов получил название сплайсинга.

Последовательность нуклеотидов в молекуле мРНК начинается с пары ГУ (5'-конец) и заканчивается парой АГ (3'-конец). Эти последовательности служат сайтами (местами) узнавания для ферментов сплайсинга. Поскольку ни (5')ГУ, ни АГ(3') последовательности не открываются в молекулах предшественников тРНК, было высказано предположение о существовании по меньшей мере двух типов ферментов сплайсинга, один для мРНК и другой для тРНК. Имеются, кроме того, достоверные данные о том, что интроны часто оказываются длиннее экзонов и что внутри гена на интроны приходится значительно большая часть нуклеотидных пар. Подсчитано, например, что ген овальбумина содержит 7 интронов, в общей сложности насчитывающих 7700 пар оснований, в то время как сформировавшаяся после сплайсинга мРНК насчитывает всего 1859 оснований. Почти во всех эукариотических клетках синтезируемые на структурных генах первичные транскрипты подвергаются процессингу, прежде чем выполняют свои уникальные функции в белковом синтезе. Во многих случаях процессинг имеет место главным образом в ядре, хотя этот процесс продолжается и после транспортировки молекул РНК из ядра в цитоплазму. Процессинг включает следующие основные процессы: образование шапочки (кэпирование от англ. cap — шапка), нуклеолитические и лигазные реакции (сплайсинг), терминальные реакции полиаденилирования и химические модификации остатков нуклеозидов (метилирование).

Химический смысл «кэпирования» сводится к присоединению остатка 7-метилгуанозина посредством трифосфатной связи к 5'-концу молекулы мРНК; полиаденилирование заключается в последовательном ферментативном присоединении от 100 до 200 остатков АМФ и фрагментов ААУАА к 3'-концу мРНК. Имеются данные, что «кэп» добавляется еще в ядре, а полиаденилирование протекает или в ядре, или в цитоплазме; в то же время вторичные химические модификации метилирования мРНК, в частности метилирование 2'-гидроксильных групп рибозы и N⁶-атомов АМФ, происходят после появления молекулы мРНК в цитоплазме. «Кэп», по-видимому, участвует в узнавании подходящего сайта на молекуле мРНК и, возможно, защищает саму молекулу от ферментативного распада. Не имеется данных о функции поли-А на 3'-конце; показано, например, что не все поли-А-содержащие мРНК принимают участие в синтезе белка или что не все цитоплазматические мРНК содержат участки поли-А на 3'-концах. Известно только, что в цитоплазме клеток животных происходит как присоединение, так и удаление поли-А-участка из молекулы мРНК. Следует отметить, что размер молекулы цитоплазматической мРНК даже после удаления 3'-поли-А все же оказывается намного большим, чем размер молекулы, требуемый для синтеза кодируемого белка. В частности, размер мРНК белка глобина (эритроцитов кролика) составляет 550 нуклеотидов, в то же время кодирующий участок состоит из 430 нуклеотидов (размер поли-А — 40 нуклеотидов); второй пример: размер мРНК тяжелого иммуноглобулина (из клеток миеломы мышей) составляет 1800 нуклеотидных остатков, а кодирующая часть — 1350 нуклеотидов (размер поли-А — 150—200 нуклеотидов). Конечный продукт подвергается затем процессу ядерно-цитоплазматического транспорта. Интересно, что

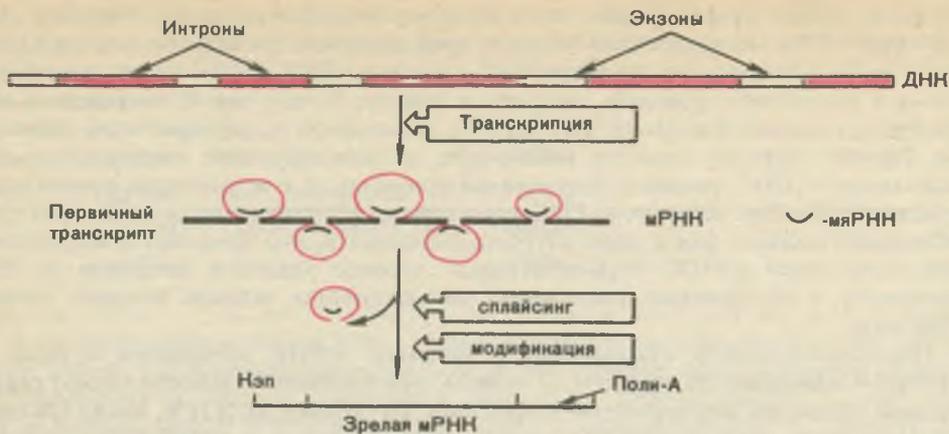


Рис. 12.4. Биогенез мРНК.

большинство, если не все указанные процессы, могут регулироваться независимо, изменяя уровень экспрессии гена. Более того, даже после завершения формирования мРНК изменения ее стабильности могут оказывать существенное влияние на экспрессию гена.

Для полного понимания сложного процесса биогенеза мРНК предстоит решить множество вопросов, в частности выделить и охарактеризовать факторы, действующие в этой сложной регуляторной системе; выяснить механизм узнавания промотора и его функции, механизмы терминации и антитерминации, а также механизм избирательного метилирования и тонкие молекулярные детали сплайсинга. Решение указанных проблем будет, несомненно, способствовать лучшему пониманию регуляции экспрессии генов эукариотических клеток в норме и при патологии.

Касясь проблемы биогенеза мРНК, нельзя не упомянуть об открытых в ядрах всех эукариотических клеток богатых уридином низкомолекулярных РНК (около 100 нуклеотидов), получивших наименование малых ядерных РНК (мяРНК) (рис. 12.4); в каждой клетке их насчитывается около 10^4 – 10^6 копий. Функции мяРНК долго оставались неизвестными; в настоящее время получены доказательства участия их в процессе сплайсинга интронов из гяРНК. При этом мяРНК соединяются с обоими концами интрона, способствуя формированию специфической конформации (необходимой для ее узнавания участвующими в процессе ферментами), сближению двух экзонов, удалению интронов и воссоединению кодирующих экзонов (сплайсинг).

Биогенез транспортных РНК

Транспортные РНК в клетке выполняют адапторную функцию при трансляции информации мРНК в первичную структуру белка. Молекулы тРНК как у эукариот, так и у прокариот синтезируются в виде больших предшественников, часто содержащих последовательности более одной тРНК, которые затем подвергаются процессингу при участии специфических рибонуклеаз. Гены некоторых тРНК содержат вблизи участка ДНК, ответственного за синтез антикодонной петли, интронные последовательности (около 18 нуклеотидов); эти участки также транскрибируются; поэтому процессинг тРНК включает, помимо удаления 18-членного рибонуклеотидного интрона, также необходимый сплайсинг антикодонной области. Дальнейшая модификация включает присоединение триплета ЦЦА и образование акцепторного участка (на 3'-конце молекулы), к которому присоединяется аминокислота. Имеются данные, что метилирование предшественников тРНК у эукариот осуществляется в

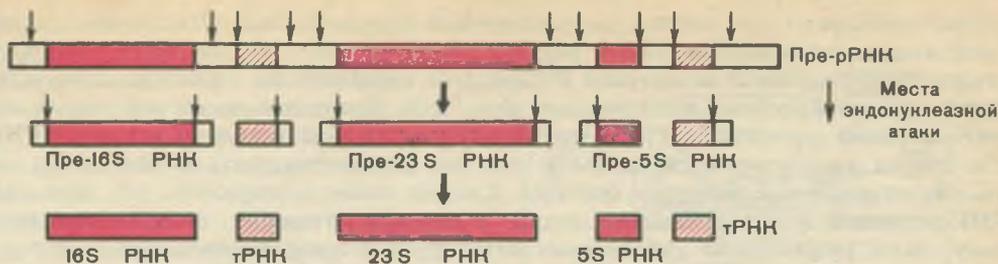


Рис. 12.5. Постсинтетическая модификация пре-рРНК прокариот (по Николу).

ядре, в то время как ферментативные процессы удаления интрона и присоединения триплета ЦЦА происходят скорее всего в цитоплазме. Помимо акцепторного и антикодонного участков, тРНК содержит специфичные участки узнавания ферментов — аминоксил-тРНК-синтетаз и участки связывания с большими субчастицами рибосом.

Биогенез рибосомных РНК

У прокариот синтез 23S, 16S и 5S рРНК осуществляется из более длинного 30S предшественника, названного прерибосомной РНК (пре-рРНК) (рис. 12.5). Под действием специфических нуклеаз и метилаз из этого общего предшественника в результате процессинга сначала образуются промежуточные рибосомные РНК, которые, подвергаясь дальнейшей нуклеазной атаке и метилированию, превращаются в зрелые молекулы (см. рис. 12.5).

Для ряда эукариотических клеток доказана транскрипция двух высокомолекулярных рРНК (18S и 28S) и одной низкомолекулярной рРНК (5,8S) из одного общего предшественника (45S); последний представляет собой продукт генов рРНК, более тысячи копий которых содержит клетка. Первичный транскрипт 45S рРНК высокометилирован, причем метилированию в ядрышках подвергаются только те участки первичного транскрипта, из которых в процессе реакций процессинга образуются рРНК. Сам механизм процессинга первичного транскрипта резко отличается от процессинга гяРНК при образовании мРНК. Образовавшаяся, например, молекула 28S рРНК еще в ядрышке подвергается дальнейшему метилированию, затем взаимодействует с синтезированными в цитоплазме рибосомными белками и формируется 60S рибосомная субчастица; 18S рРНК аналогичным способом участвуют в формировании 40S рибосомной субчастицы. Обе субчастицы стабильны в делящихся клетках и нестабильны в неделящихся клетках.

Следует указать, что синтез РНК при участии ДНК-зависимой РНК-полимеразы специфически тормозится антибиотиком актиномицином D, который обладает способностью связываться водородными связями с ДНК по месту остатков гуанина. Актиномицин D тормозит синтез РНК в интактных клетках. Он нашел широкое применение при определении процессов, зависящих от транскрипции ДНК.

Синтез РНК на матрице РНК

ДНК-зависимая РНК-полимераза может осуществлять транскрипцию ДНК нормальных клеток и ДНК-вирусов. Как же осуществляется синтез РНК у тех вирусов, которые в геноме вместо ДНК содержат РНК? Оказывается, в этих случаях вирусная РНК индуцирует образование в клетках хозяина (например, у *E. coli*) РНК-зависимой РНК-полимеразы, которая участвует в репликации вирусной РНК (отсюда второе название фермента — РНК-репликаза). Фермент также использует нук-

леозидтрифосфаты для синтеза одноцепочечной вирусной РНК. Этот синтез должен пройти через стадию образования репликативной формы. Следовательно, на первой стадии РНК-репликаза на матрице РНК-вируса специфически строит комплементарную, с противоположной полярностью цепь РНК. Последняя на второй стадии служит матрицей для синтеза РНК, совершенно однотипной исходной вирусной РНК; обе стадии катализируются одним и тем же ферментом, хотя в каждой из них участвуют различные белковые факторы. Следует особо подчеркнуть, что, поскольку РНК-репликаза имеет отношение только к вирусам, очевидно, на этом основании могут быть разработаны эффективные противовирусные лекарственные препараты.

Синтез РНК из нуклеозиддифосфатов. М. Грюнберг-Манаго и С. Очоа в 1955 г. в клетках *E. coli* открыли особый фермент — полинуклеотид-фосфорилазу, — наделенный способностью синтеза полимерной молекулы РНК из однотипных или разных рибонуклеозиддифосфатов. Рибонуклеозидтрифосфаты и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты не являются субстратами фермента. Фермент не нуждается в матрице, однако для синтеза необходима затравочная цепь РНК со свободной 3'-гидроксильной группой, к которой присоединяются остатки мононуклеотидов. Образовавшаяся полимерная молекула РНК не имеет заданной специфической последовательности мононуклеотидов, но содержит 3' → 5' фосфодиэфирные связи, легко разрываемые рибонуклеазой. Относительно биологической роли этого фермента у бактерий можно предположить его каталитическое фосфоролитическое действие на короткоживущие мРНК.

Полученные в последние годы в лаборатории С. С. Дебова данные свидетельствуют о более широком распространении полирибонуклеотид-фосфорилазы в живых организмах, чем это признавалось ранее. Фермент открыт также в клетках животных. Кроме того, получены экспериментальные доказательства синтетической функции полинуклеотид-фосфорилазы. Вполне правомерно допущение, что этот фермент может принимать участие в синтезе коротких полирибонуклеотидов в клетках эукариот в норме и при некоторых экстремальных условиях.

Проблемы генетической инженерии. Целью генетической инженерии является получение организмов (животных и растений) с новыми наследственными свойствами с помощью чисто лабораторных приемов. Для достижения этой пока еще отдаленной цели необходимо ввести в организм соответствующий ген или гены. Ген, представленный определенным участком ДНК и соответствующий определенному белку, можно или выделить из другого организма, или синтезировать химическим или биологическим путем. Впервые в 1969 г. из *E. coli* был выделен участок ДНК с геном, ответственным за синтез фермента, катализирующего усвоение молочного сахара (лактозы), — так называемый лактозный оперон. Химический синтез гена аланиновой тРНК впервые осуществил Хар Гобинд Корана в 1970 г. Состоящий из 72 нуклеотидов, этот ген, однако, был лишен функциональной активности, так как в клетках тРНК синтезируется не в готовом виде, а в форме предшественника. Эти данные послужили для Кораны основой для синтеза уже гена предшественника тирозиновой тРНК (из 126 нуклеотидов), хотя сама тирозиновая тРНК состоит из 85 нуклеотидов. Ввиду громоздкости, а также недостаточной эффективности химического синтеза в последние годы все большее место занимают биологические методы синтеза генов при помощи обратной транскриптазы (ревертазы). Для этого необходимо иметь мРНК, с помощью которой можно воспроизвести соответствующий ген. С 1972 г. этим путем синтезированы ДНК-копии на мРНК, кодирующие синтез белка глобина (человека, кролика, мыши, голубя, утки), иммуноглобулина и белка хрусталика глаза. Однако на этом пути синтеза генов встречаются большие трудности, связанные с выделением из огромного разнообразия клеточных мРНК нужной для синтеза гена.

Следующий этап генетической инженерии — перенос генов в клетку — осуществляется тремя способами: *т р а н с ф о р м а ц и е й* (перенос генов посредством выделенной из клеток и освобожденной от примесей ДНК), *т р а н с д у к ц и е й* (перенос генов посредством вирусов) или *г и б р и д и з а ц и е й* клеток, полученных из разных орга-

низмов (высших животных, микроорганизмов и др.) (рис. 12.6 и 12.7). Заключительный этап этих экспериментов сводится к адаптации введенного гена в организме хозяина и почти не зависит от искусства экспериментатора.

Исследования в области генетической инженерии могут служить основой для решения практических задач здравоохранения и сельского хозяйства. Полученные в лаборатории гены, помимо широкого использования в микробиологической промышленности для приготовления лекарственных препаратов белковой природы (гормонов, ферментов и др.), возможно, смогут применяться при лечении многих наследственных заболеваний (их насчитывается более 2000), генетический дефект которых точно известен пока только для небольшого числа (не более 50) болезней. Первые попытки применения лактозного оперона при галактоземии (наследственном заболевании, связанном с непереносимостью галактозы из-за отсутствия фермента гексозо-1-фосфатуридилтрансферазы; см. главу 9) вселяют надежду на реальные практические возможности генетической инженерии, хотя вполне обоснованы тревога и опасения, связанные с вмешательством человека в сферу тончайших биологических процессов наследственного аппарата целостного организма. В последние годы, после бурного периода расцвета в генетической инженерии, наблюдается некоторый спад, обусловленный недостаточностью знаний о структуре и функционировании генома клеток эукариот. Переход от исследований на клетках прокариот к исследованиям на клетках эукариот встретил ряд технических трудностей из-за мозаичности структуры генов ДНК последних. В частности, открытие экзонов и интронов в геноме ДНК, открытие явления сплайсинга (формирование зрелой матричной РНК) указывают на необходимость соблюдения высочайшей точности процедуры вырезания необходимого гена

Трансформация

Трансдукция

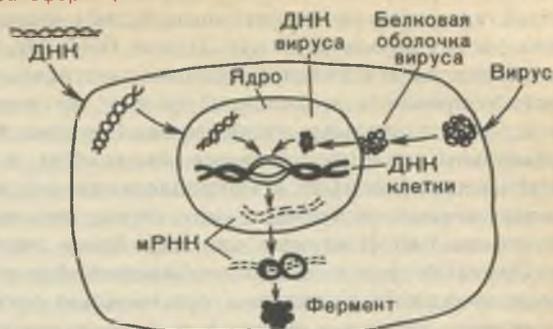


Рис. 12.6. Схематическое представление двух способов введения генов в клетку – трансформацией и трансдукцией (по А. А. Баеву).



Рис. 12.7. Получение гибридной молекулы, содержащей одновременно ДНК вируса SV40, ДНК фага λ и галактозный оперон (схема по А. А. Баеву).

Под действием эндонуклеазы R_1 *E. coli* кольцевые ДНК разрываются в одной точке и образуются линейные нити. Под действием другого фермента – экзонуклеазы (из фага) укорачиваются нити ДНК с противоположных концов. Далее при помощи фермента концевой трансферазы наращиваются нити ДНК, причем у одной ДНК новые концы состоят из адениловых (А), у другой – из тимидиловых (Т) остатков. При смешивании молекул концевые остатки А и Т образуют комплементарные пары, замыкая линейные молекулы в кольца. Вначале эти кольца содержат четыре разрыва, которые затем закрываются при участии еще одного фермента – ДНК лигазы.

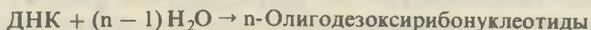
из ДНК генома соответствующими рестриктазами. В противном случае могут быть получены не структурные, транскрибируемые гены, а интроны или участки экзонов, не кодирующие белок. После того как были разработаны методы искусственного синтеза и сшивки отдельных участков молекулы ДНК, появилась возможность конструирования и создания новых не известных ранее в природе организмов, с заранее заданными свойствами. Современная биотехнология явилась логическим развитием этого направления науки. Она сложилась на основе фундаментальных достижений биохимии и микробиологии, открыв широкие возможности для создания новых сортов растений, новых пород животных и т. д. Учитывая исключительную важность биотехнологии для народного хозяйства, в 1985 г. в нашей стране был создан межотраслевой научно-технический комплекс (МНТК) «Биоген». Комплекс призван обеспечить создание и организацию промышленного производства новых биологически активных веществ и препаратов для медицины, ветеринарии, растениеводства, используя прогрессивные биотехнологические методы, в том числе методы клеточной и генетической инженерии.

РАСПАД НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Полимерные молекулы нуклеиновых кислот расщепляются в тканях преимущественно гидролитическим путем при участии специфических ферментов, относящихся к нуклеазам. Различают эндонуклеазы, разрывающие внутренние межнуклеотидные связи в молекуле ДНК и РНК, вызывающие деполимерацию нуклеиновых кислот с образованием олигонуклеотидов, и экзонуклеазы, катализирующие гидролитическое отщепление концевых мононуклеотидов от ДНК и РНК или олигонуклеотидов.

Помимо гидролитических нуклеаз, имеются ферменты, катализирующие распад нуклеиновых кислот, например посредством трансферазной реакции. Они катализируют перенос остатка фосфорной кислоты от 5'-го углеродного атома рибозы одного мононуклеотида ко 2'-му углеродному атому соседнего мононуклеотида, сопровождающийся разрывом межнуклеотидной связи и образованием фосфодиэфирной связи между 2'-м и 3'-м углеродными атомами рибозы одного и того же мононуклеотида. Сейчас открыты следующие группы нуклеаз, катализирующие распад ДНК и РНК.

Дезоксирибонуклеазы I катализируют разрыв внутренних фосфодиэфирных связей в одной из двух цепей молекулы ДНК между 3'-м углеродным атомом дезоксирибозы и остатком фосфата с образованием низкомолекулярных олигодезоксирибонуклеотидов:



Среди продуктов реакции открываются также моно- и динуклеотиды. Типичными представителями этих ферментов является ДНКазы поджелудочной железы. Одна из них была получена в чистом виде, расшифрована последовательность всех ее 257 аминокислот. Фермент наиболее активен при pH 6,8–8,0, активируется двухвалентными ионами Mg^{2+} и Mn^{2+} и ингибируется конечными продуктами ферментативной реакции — олигонуклеотидами.

Дезоксирибонуклеазы II вызывают деполимеризацию молекулы ДНК в результате парных разрывов фосфодиэфирных связей обеих цепей ДНК с образованием более крупных олигодезоксирибонуклеотидов. Представителем их является ДНКазы II, выделенная из селезенки, имеющая молекулярную массу 38 000 Да и состоящая из 343 аминокислотных остатков. В составе этой ДНКазы открыт глюкозамин. Фермент также активируется ионами металлов, ингибируется анионами; его оптимум pH колеблется между 5,5 и 5,8.

Помимо этих ферментов, открыты (преимущественно у микроорганизмов) еще экзодезоксирибонуклеазы, гидролизующие фосфодиэфирные связи молекулы ДНК с отщеплением концевых 5'-дезоксирибонуклеотидов; например, из *E. coli* выделено 4 таких фермента, обозначенных экзодезоксирибонуклеазами I, II, III и IV.

Рестриктазы — ферменты ДНКазного типа действия, катализируют распад чуже-

родной (в основном фаговой) ДНК в строго определенных участках молекулы, имеющих структуру палиндромов. Из *E. coli* выделены и охарактеризованы две такие рестриктазы, обозначаемые EcoRI и EcoRII соответственно. Рестриктазы обладают строгой специфичностью действия, поэтому они используются для расшифровки последовательности нуклеотидных остатков в ДНК фагов и вирусов. Кроме этого, уникальное свойство рестриктаз находит все большее практическое применение в генетической инженерии при «вырезании» определенных фрагментов ДНК и «встраивании» их в геном бактериальной ДНК (получение рекомбинантных ДНК), способствуя тем самым передаче клетке ряда не свойственных ей прежде наследственных свойств. Теоретическое и главным образом практическое значение подобных исследований трудно переоценить. Свидетельством огромного интереса к проблемам генетической инженерии является создание и успешное выполнение в рамках АН СССР комплексной программы — проекта «Рестриктазы». Многие сотни рестриктазы выделены в очищенном состоянии и уже являются коммерческими препаратами.

Из ферментов, катализирующих гидролитический распад РНК, наиболее изучены рибонуклеазы I. Они гидролизуют фосфодиэфирные связи внутри молекулы РНК. Выделенная из поджелудочной железы многих животных РНКаза состоит из 124 аминокислот во всех случаях, хотя ферменты несколько различаются по последовательности аминокислотных остатков; выяснена третичная структура ряда РНКаз (см. главу 4). Получен в гомогенном состоянии из плесневого гриба аспергилла фермент — гуанилрибонуклеаза, катализирующая эндонуклеолитическое расщепление РНК.

Из ферментов, осуществляющих распад ДНК и РНК не по гидролитическому пути, следует назвать полинуклеотид-фосфорилазу и группу ДНК-гликозидаз. В настоящее время подробно изучены физико-химические свойства и биологическая роль микробной полинуклеотид-фосфорилазы в лаборатории С. С. Дебова; в той же лаборатории фермент открыт в животных тканях. Механизм действия фермента сводится к переносу нуклеотидных остатков с РНК на неорганический фосфат; при этом образуется рибонуклеотиддифосфат (РДФ):



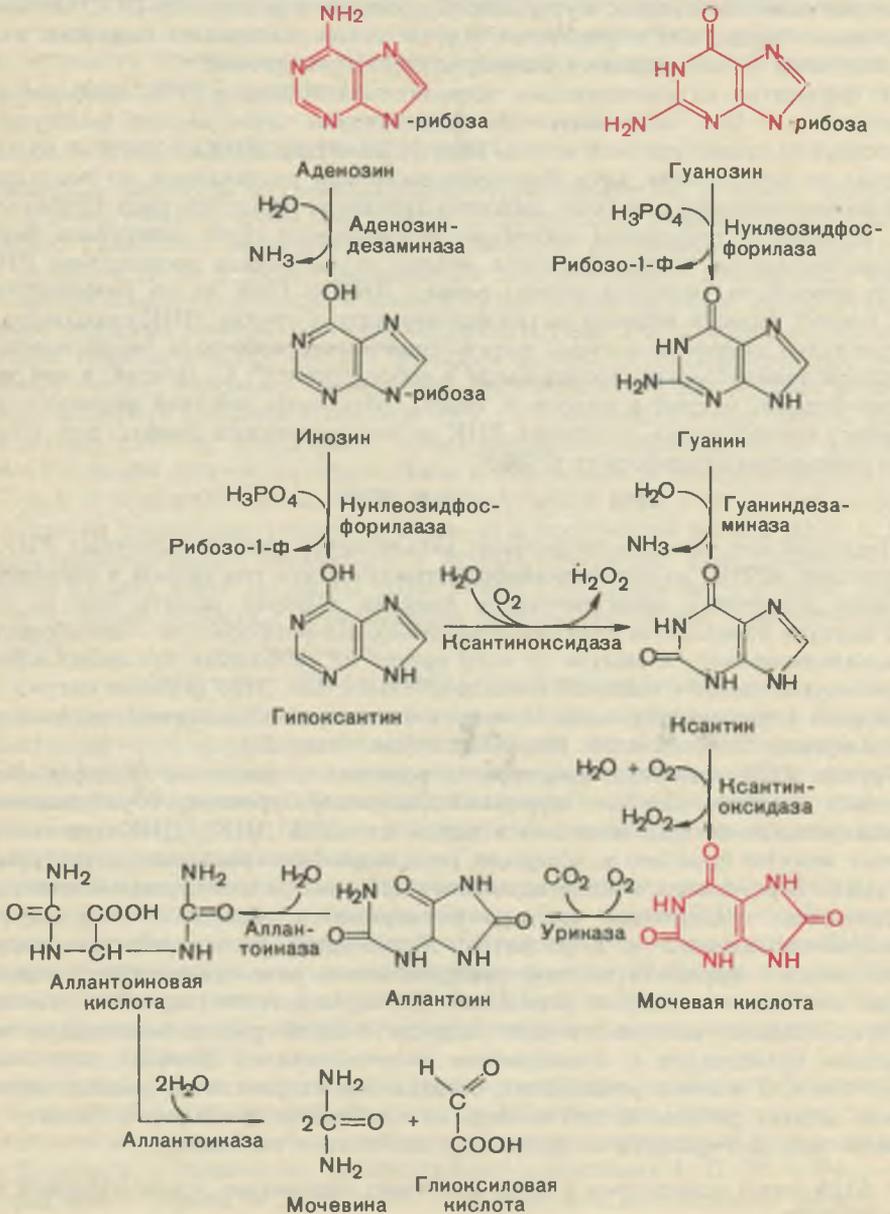
Предполагают, что *in vivo* фермент катализирует распад клеточных РНК, предпочтительнее мРНК, до нуклеозиддифосфатов, участвуя тем самым в регуляции концентрации клеточного неорганического фосфата. Следует указать еще на одну не менее важную, уникальную функцию полинуклеотид-фосфорилазы — способность фермента катализировать в опытах *in vitro* синтез из свободных нуклеозиддифосфатов полирибонуклеотидов с заданной последовательностью. Этот фермент сыграл выдающуюся роль в расшифровке кода белкового синтеза в лабораториях лауреатов Нобелевской премии С. Очоа и М. Ниренберга (см. главу 13).

Группа ДНК-гликозидаз участвует в реакциях отщепления модифицированных пуриновых и пиримидиновых оснований (например, урацила, образующегося при дезаминировании остатка цитозина в одной из цепей ДНК). ДНК-гликозидазы выполняют важную функцию в процессах репарации (восстановления структуры) молекулы ДНК. В результате последовательного действия разнообразных клеточных экзонуклеаз нуклеиновые кислоты подвергаются распаду до стадии рибо- и дезоксирибонуклеозид-3' и 5'-фосфатов. Дальнейший распад образовавшихся продуктов связан с ферментативными превращениями мононуклеотидов¹, нуклеозидов и далее свободных азотистых оснований. На первом этапе гидролиза действуют 3'- и 5'-нуклеотидазы, катализирующие гидролитический распад мононуклеотидов до свободных нуклеозидов с отщеплением неорганического фосфата, соответственно от С-3' или С-5' атомов углеводного остатка. На втором этапе распада происходит перенос остатка рибозы от нуклеозида на свободную фосфорную кислоту с образованием рибозо-1-фосфата и свободного азотистого основания.

¹ АМФ может подвергаться в животных тканях обратимому дезаминированию в инозидиновую кислоту.

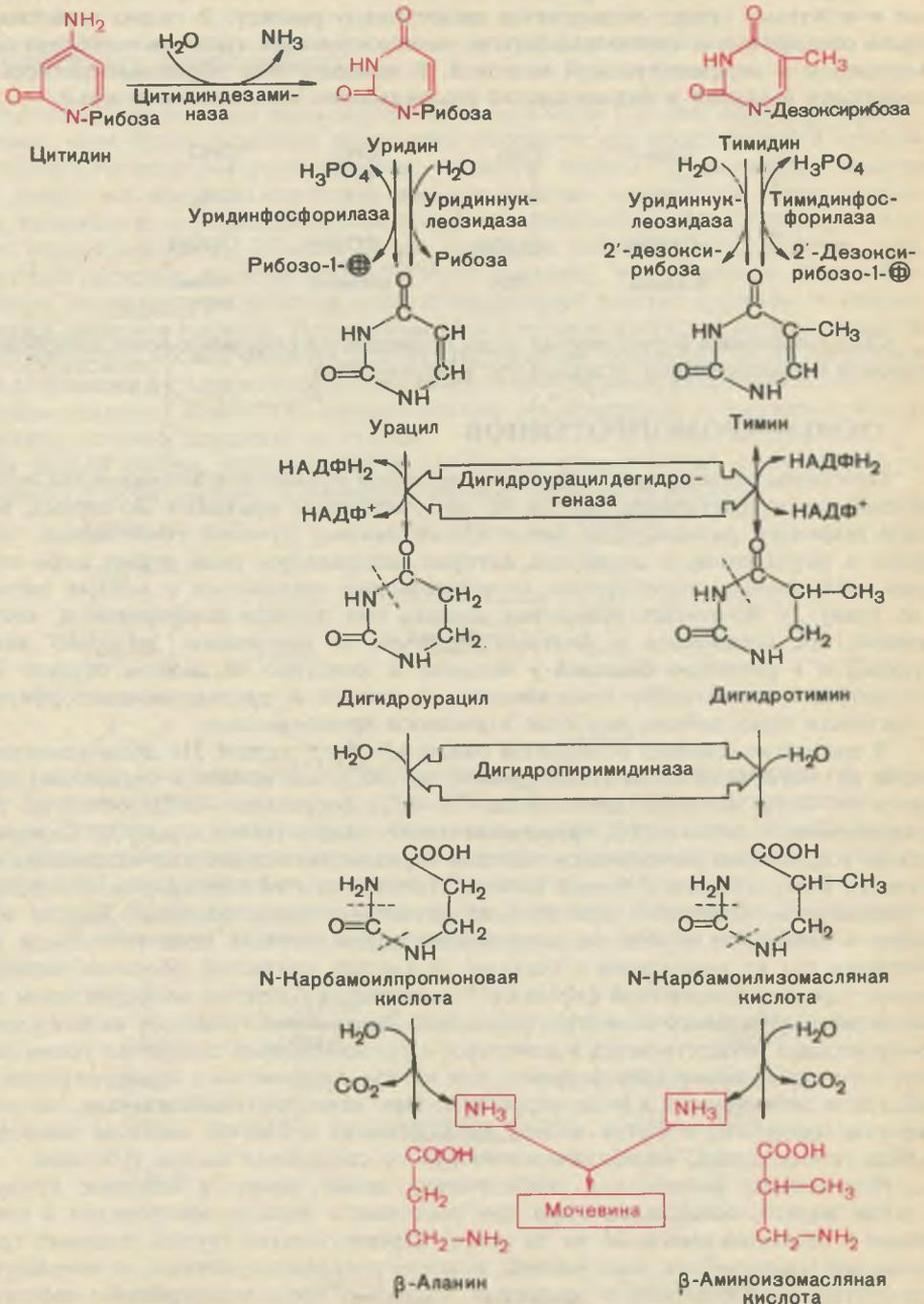
Распад пуриновых нуклеозидов

Образовавшиеся при гидролизе пуриновые нуклеозиды — аденозин и гуанозин — подвергаются ферментативному распаду в организме животных вплоть до образования конечного продукта — мочевой кислоты, которая выводится с мочой из организма. У человека, приматов, большинства животных, птиц и некоторых рептилий мочевая кислота является конечным продуктом пуринового обмена; у других рептилий и некоторых млекопитающих мочевая кислота расщепляется до аллантаина, а у рыб — до аллантииновой кислоты и мочевины. Последовательность всех этих превращений, катализируемых специфическими ферментами, можно представить на следующей схеме:

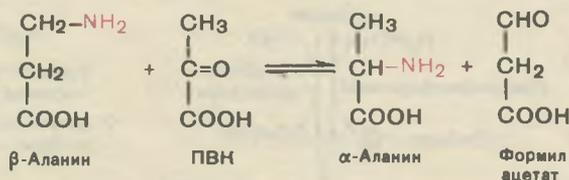


Распад пиримидиновых нуклеозидов

Последовательность ферментативных реакций гидролиза пиримидиновых нуклеозидов можно представить в виде схемы:



Начальные этапы реакции распада пиримидиновых нуклеозидов катализируются специфическими ферментами; конечными продуктами реакции являются CO_2 , NH_3 , мочевины, β -аланин и β -аминоизомасляная кислота. Следует указать, что гидролитический путь распада пиримидинов является, очевидно, главным путем образования β -аланина, который может служить источником для синтеза ансерина и карнозина (см. главу 19), а также для образования коэнзима А. Известно, кроме того, что β -аланин в животных тканях подвергается дальнейшему распаду. В тканях животных открыта специфическая аминотрансфераза, катализирующая трансминирование между β -аланином и пировиноградной кислотой. В процессе этой обратимой реакции синтезируются α -аланин и формулацетат (полуальдегид малоновой кислоты):



Образовавшийся формулацетат далее подвергается окислительному декарбоксилированию с образованием углекислоты и ацетил-КоА.

ОБМЕН ХРОМОПРОТЕИНОВ

Проблемы синтеза и распада хромопротеинов привлекают внимание как исследователей, так и практических врачей по двум основным причинам. Во-первых, вследствие широкого разнообразия биологически важных функций гемоглобина, хлорофилла и цитохромов, в молекулах которых центральную роль играет ядро порфирина, обладающее способностью координационно связываться с ионами металлов (см. главу 2). Во-вторых, изменения синтеза или распада порфиринов и, соответственно, их комплексов с белками приводят к нарушению жизненно важных функций и к развитию болезней у человека и животных. В данном разделе будут рассмотрены современные представления о синтезе и распаде железопорфиринов, в частности гемоглобина, наиболее изученного хромопротеина.

В организме человека содержится около 4,5–5,0 г железа. На долю гемоглобина крови из этого количества (если принять за 100% все железо в организме) приходится 60–70%, на долю миоглобина – 3–5%, ферритина – 20% (от 17 до 23%), трансферрина – около 0,18%, функционального железа тканей – до 5%. Содержание железа в организме регулируется главным образом интенсивностью всасывания в кишечнике поступающего с пищей железа. Избыток его не всасывается. Потребность в железе резко возрастает при анемиях различного происхождения. Железо всасывается в кишечнике в виде неорганического двухвалентного иона Fe^{2+} после освобождения его из комплексов с белками. В клетках слизистой оболочки кишечника железо уже в трехвалентной форме Fe^{3+} соединяется с белком апоферритином с образованием стабильного комплекса ферритина. Дальнейший транспорт железа к местам кроветворения осуществляется в комплексе с β_1 -глобулинами сыворотки крови (комплекс получил название трансферрина) или железо соединяется с апоферритином тканей, где и депонируется в виде ферритина. При некоторых заболеваниях (например, при гемохроматозе) избыток железа откладывается в клетках системы макрофагов в виде гемосидерина, метаболически инертного соединения железа с белком.

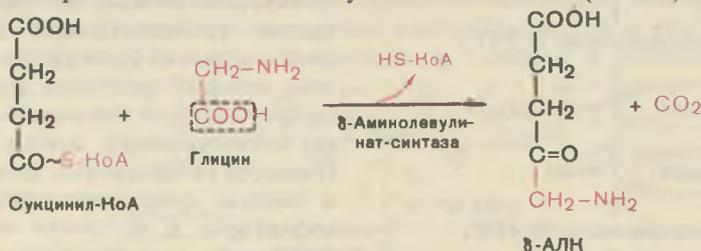
Источниками железа для синтетических целей являются пищевые продукты, а также железо, освобождающееся при постоянном распаде эритроцитов в клетках печени и селезенки (около 25 мг за сутки). Простетические группы пищевых хромопротеинов (гемоглобина, миоглобина), включая хлорофиллпротеины, не используются для синтеза железопротеинов организма, поскольку после переваривания небелковый

компонент — гем — подвергается окислению в гематин, который, так же как и хлорофилл, не всасывается в кишечнике. Обычно эти пигменты выделяются с калом в неизменной форме или в виде продуктов распада под действием ферментов кишечных бактерий. Следовательно, синтез сложного пиррольного комплекса в организме протекает из низкомолекулярных предшественников *de novo*, а не путем обращения химических реакций распада гемсодержащих соединений.

Биосинтез гемоглобина

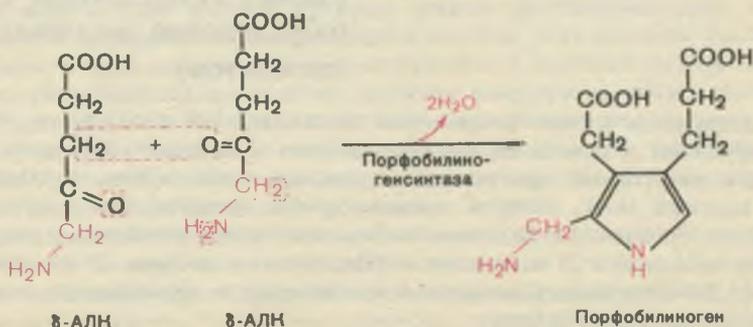
Учитывая, что белковая часть молекулы гемоглобина (глобин) синтезируется как все белки, ниже будет подробно рассмотрен биосинтез его простетической группы, т. е. синтез тетрапиррольного соединения — гема (см. главу 2). К настоящему времени почти полностью выяснены основные пути образования порфиринов и протопорфиринов, являющихся непосредственными предшественниками гема и хлорофилла. Благодаря исследованиям Д. Шемина и др. выяснены основные пути синтеза гема. С помощью меченых предшественников было показано, что в синтезе гема в бесклеточных экстрактах эритроцитов птиц специфическое участие принимают глицин, уксусная и янтарная кислоты. Источником всех 4 атомов азота и 8 атомов углерода тетрапиррольного кольца является глицин. Источником остальных 26 из 34 атомов углерода является янтарная кислота (сукцинат), точнее ее производное сукцинил-КоА. Последовательность химических реакций синтеза тетрапирролов в организме животных можно условно разделить на стадии.

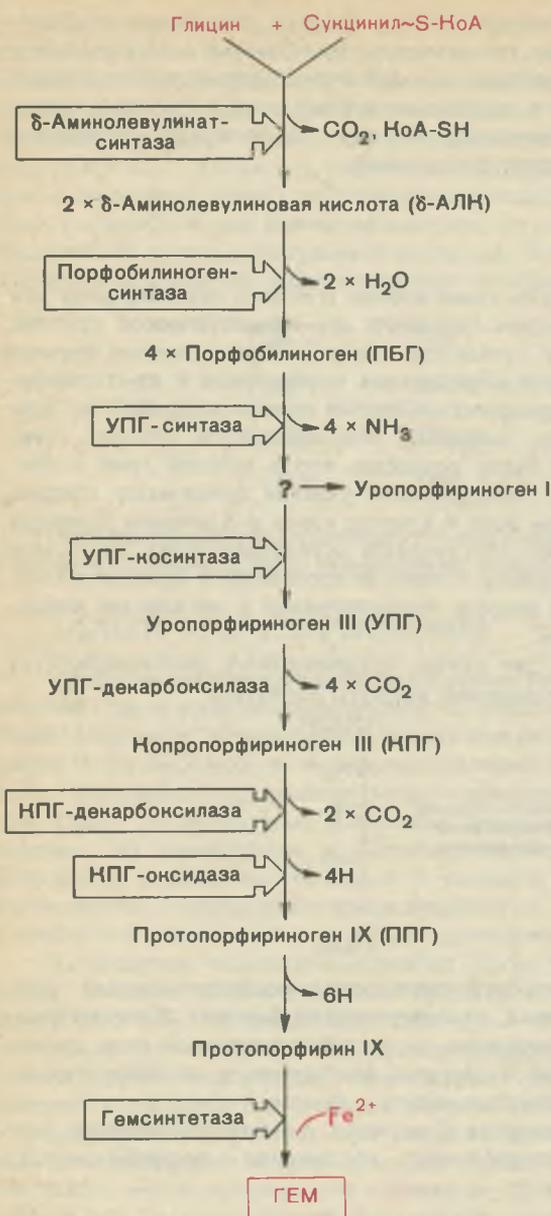
На первой стадии, протекающей в два этапа, сукцинил-КоА взаимодействует с глицином с образованием δ -аминолевулиновой кислоты (δ -АЛК):



Эту стадию катализирует специфический пиридоксальфосфатзависимый фермент — δ -аминолевулинатсинтаза — ключевой, аллостерический фермент синтеза тетрапирролов. Впервые эта синтаза была обнаружена в эндоплазматической сети клеток печени. Фермент индуцируется стероидами и другими факторами и ингибируется по типу обратной связи конечным продуктом биосинтеза — гемом.

На второй стадии происходит конденсация 2 молекул δ -аминолевулиновой кислоты с образованием первого монопиррольного соединения — порфобилиногена (ПБГ):





Фермент, катализирующий эту стадию, порфобилиногенсинтаза, также является регуляторным ферментом, ингибируемым конечными продуктами синтеза. Предполагается, что механизм этой сложной реакции дегидратации включает образование кетиминной связи (шиффово основание) между кетогруппой одной молекулы δ-аминолевулиновой кислоты и δ-аминогруппой лизина молекулы фермента.

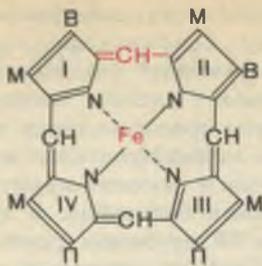
В следующей многоступенчатой стадии, катализируемой соответствующими ферментами, из 4 монопиррольных молекул порфобилиногена синтезируется тетрапиррольный комплекс протопорфирин IX, являющийся непосредственным предшественником гема. Некоторые этапы сложного пути синтеза окончательно не установлены.

В заключительной стадии протопорфирин IX присоединяет молекулу железа при участии гемсинтазы (феррохелатазы) и образуется гем. Последний используется для биосинтеза всех гемсодержащих хромопротеинов. Источником железа для этой реакции является ферритин, который считается резервным гемопротейном, откладывающимся в клетках костного мозга, печени и селезенки. Имеются указания, что, помимо железа, в синтезе гема участвуют некоторые кофакторы, в частности витамин B₁₂, ионы меди, хотя конкретная их роль не установлена.

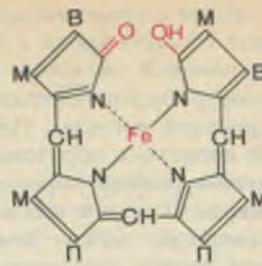
Таким образом, весь путь синтеза гема может быть представлен на схеме слева, в которой даны полные и сокращенные обозначения промежуточных метаболитов и ферментов.

Распад гемоглобина в тканях (образование желчных пигментов)

Продолжительность жизни эритроцитов составляет 120 дней; после этого происходит их разрушение и освобождение гемоглобина. Главными органами, в которых осуществляется разрушение эритроцитов и распад гемоглобина, являются печень, селезенка и костный мозг, хотя, в принципе, оба процесса могут происходить и в клетках других органов. Распад гемоглобина в печени начинается с разрыва α-метиновой связи между I и II кольцами порфиринового кольца. Этот процесс катализируется НАДФ-содержащей оксидазой и приводит к образованию зеленого пигмента вердоглобина (холеглобина):



Гем (в составе гемоглобина)



Гем (в составе вердоглобина)

Гем-оксигеназа
(дециклизующая)

В приведенных структурных формулах здесь и ниже в желчных пигментах: М — метильная CH_3 -группа, В — $(-\text{CH}=\text{CH}_2)$ — винильная группа и П — $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH})$ — остаток пропионовой кислоты.

Как видно из приведенных формул, в молекуле вердоглобина еще сохраняются атом железа и белковый компонент. Имеются экспериментальные доказательства, что в этом окислительном превращении гемоглобина принимают участие витамин С, ионы Fe^{2+} и другие кофакторы.

Дальнейший распад вердоглобина, вероятнее всего, происходит спонтанно с освобождением железа, белка-глобина и образованием одного из желчных пигментов — биливердина. Спонтанный распад сопровождается перераспределением двойных связей и атомов водорода в пиррольных кольцах и метиновых мостиках. Образовавшийся биливердин ферментативным путем восстанавливается в печени в билирубин, являющийся основным желчным пигментом у человека и плотоядных животных:



Основным местом образования билирубина являются печень, селезенка и, по-видимому, эритроциты (при распаде которых иногда разрывается одна из метиновых связей в протопорфирине). Образовавшийся во всех этих клетках билирубин поступает в печень, откуда вместе с желчью изливается в желчный пузырь (см. главу 15). Билирубин, образовавшийся в клетках системы макрофагов, имеет название свободного, или непрямого билирубина, поскольку из-за плохой растворимости в воде он легко адсорбируется на белках плазмы крови, и для его определения в крови необходимо предварительное осаждение белков спиртом. После этого билирубин вступает во взаимодействие с диазореактивом Эрлиха.

В крови взрослого здорового человека содержится относительно постоянное количество «общего» билирубина — от 4 до 26 мкмоль/л, в среднем 15 мкмоль/л. Около 75% этого количества приходится на долю непрямого билирубина. Повышение его концентрации в крови до 35 мкмоль/л приводит к развитию желтухи. Более высокий

уровень билирубина в крови вызывает явления тяжелого отравления. Непрямой билирубин, поступающий с током крови в печень, подвергается обезвреживанию путем связывания с глюкуроновой кислотой. В этом процессе принимает участие особый фермент УДФ-глюкуронилтрансфераза и УДФ-глюкуроновая кислота, являющаяся донором глюкуроновой кислоты. При этом к билирубину присоединяются два остатка глюкуроновой кислоты с образованием сравнительно индифферентного комплекса — билирубин-диглюкуронида, хорошо растворимого в воде и дающего прямую реакцию с диазореактивом. В желчи всегда присутствует прямой билирубин. В крови количество и соотношение между прямым и непрямым билирубином резко меняются при поражениях печени, селезенки, костного мозга, болезнях крови и т. д., поэтому определение обеих форм билирубина в крови имеет существенное значение в клинике при дифференциальной диагностике различных форм желтухи. При желчнокаменной болезни в состав желчных камней наряду с основным их компонентом — холестерином — всегда обнаруживается непрямой билирубин. Из-за плохой растворимости в воде он выпадает в осадок в желчном пузыре в виде билирубината кальция, участвующего в формировании камней.

Дальнейшая судьба желчных пигментов, точнее билирубина, связана с их превращениями в кишечнике под действием бактерий. Сначала глюкуроновая кислота отщепляется от комплекса с билирубином, и освободившийся билирубин подвергается восстановлению в стеркобилиноген, который и выводится с калом. В сутки человек выделяет около 300 мг стеркобилиногена. Последний легко окисляется под действием света и воздуха в стеркобилин. Механизм бактериальных превращений билирубина до стеркобилина во многих отношениях еще не расшифрован. Имеются данные, что промежуточными продуктами восстановления являются последовательно мезобилирубин и затем мезобилиноген (уробилиноген). После всасывания небольшая часть мезобилиногена поступает через воротную вену в печень, где подвергается разрушению с образованием моно- и дипиррольных соединений. Кроме того, очень небольшая часть стеркобилиногена после всасывания через систему геморроидальных вен попадает в большой круг кровообращения, минуя печень, и в таком виде выводится почками с мочой. Однако называть его уробилиногеном не совсем точно (см. главу 17). Суточное содержание стеркобилиногена в моче составляет около 4 мг, и, пожалуй, именно стеркобилиноген является нормальной органической составной частью мочи. Если же с мочой выделяется повышенное содержание уробилиногена (точнее мезобилиногена), то это является свидетельством недостаточности функции печени, например при печеночной или гемолитических желтухах, когда печень частично теряет способность извлекать этот пигмент из крови воротной вены. Однако химически уробилиноген (мезобилиноген) не является идентичным стеркобилиногену (уробилиногену) мочи. Исчезновение стеркобилиногена (уробилиногена) из мочи при наличии билирубина и биливердина является свидетельством полного прекращения поступления желчи в кишечник. Такое состояние часто наблюдается при закупорке протока желчного пузыря (желчнокаменная болезнь) или общего желчного протока (желчнокаменная болезнь, раковые поражения поджелудочной железы человека и др.).

Таким образом, количественный и качественный анализ желчных пигментов в моче может представлять большой клинический интерес.

*Целое есть нечто большее, чем
простая сумма его частей.*

ПЛАТОН

Одной из основных задач современной биологии и ее новейших разделов — молекулярной биологии, биоорганической химии, физико-химической биологии — является расшифровка механизмов синтеза молекулы белка, содержащей сотни, а иногда и тысячи остатков L-аминокислот. Последние располагаются не хаотично, а в строго заданной последовательности, которая обеспечивает уникальность структуры синтезированной белковой молекулы, обладающей уникальной функцией. Другими словами, механизм синтеза должен обладать точной кодирующей системой, которая автоматически программирует включение каждого аминокислотного остатка в определенное место полипептидной цепи. Кодирующая система определяет первичную структуру, а вторичная и третичная структуры белковой молекулы определяются физико-химическими свойствами и химическим строением аминокислот в полипептиде.

Первоначальные представления, согласно которым синтез белка могут катализировать те же протеолитические ферменты, что и вызывающие его гидролиз, но путем обратимости химической реакции, не подтвердились. Оказалось, что синтетические и катаболические реакции протекают не только различными путями, но даже в разных субклеточных фракциях. Не подтвердилась также гипотеза о предварительном синтезе коротких пептидов с их последующим объединением в единую полипептидную цепь. Более правильным оказалось предположение, что для синтеза белка требуются источники энергии, наличие активированных свободных аминокислот и нескольких видов нуклеиновых кислот.

В современные представления о механизме синтеза белка большой вклад внесли советские биохимики. Так, в лаборатории А. Е. Браунштейна было впервые указано на участие АТФ в синтезе квазипептидных связей (на примерах гиппуровой кислоты, глутамина, глутатиона и ацетанилида). В. Н. Ореховичем еще в 50-е годы было показано, что перенос аминоацильных или пептидных группировок на NH_2 -группу аминокислот может осуществляться не только с амидной или пептидной, но и со сложэфирной связи. Как будет показано ниже, именно этот механизм лежит в основе реакции транспептидирования в 50S рибосоме в стадии элонгации синтеза белка.

Значительно позже были получены доказательства, что в синтезе белка, протекающем в основном в цитоплазме, решающую роль играют нуклеиновые кислоты, в частности ДНК. После того как было установлено, что ДНК является носителем и хранителем наследственной информации, был поставлен вопрос о том, каким образом эта генетическая информация, записанная (зашифрованная) в химической структуре ДНК, трансформируется в фенотипические признаки и функциональные свойства живых организмов, передающиеся по наследству. В настоящее время можно дать однозначный ответ на этот вопрос: генетическая информация программирует синтез специфических белков, определяющих в свою очередь специфичность структуры и функции клеток, органов и целостного организма (рис. 13.1). В природе, как известно, существуют два типа биополимерных макромолекул, так называемые неинформативные биополимеры (они представлены повторяющимися мономерными единицами и/или разветвленными структурами, например полисахариды, поли-АДФ-рибоза, пептидогликаны, гликопротеины) и информативные биополимеры, несущие

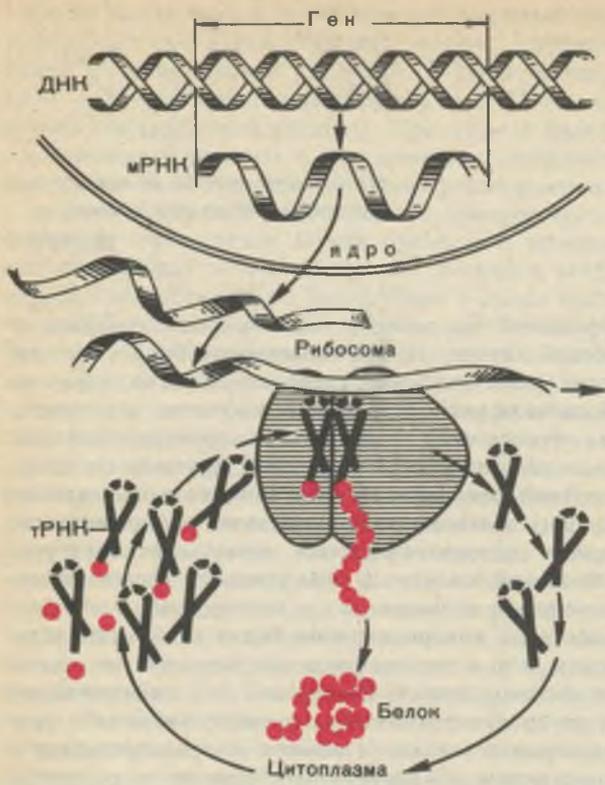


Рис. 13.1. Принципиальная схема биосинтеза белка (по А. С. Спирина). Красными шариками обозначены свободные аминокислоты и их остатки в составе полипептидной цепи.

первичную генетическую информацию (нуклеиновые кислоты) и вторичную генетическую, точнее фенотипическую информацию (белки). Эти общие представления могут быть выражены следующей последовательностью событий (поток информации):

ДНК → РНК → Белок → Клетка → Организм

Значительный вклад в современные представления о месте, факторах и механизме синтеза белка внесли исследования Т. Касперсона, М. Хогланда, П. Берга, П. Замечника, С. Очоа, М. Ниренберга, Н. Горовица, Ф. Гауровица, С. Вейсса и советских биохимиков А. А. Баева, А. Н. Белозерского, А. С. Спирина и др.

Не останавливаясь на всех исторических аспектах развития этой важнейшей проблемы, следует напомнить, что еще в 40-х годах было установлено, что ДНК локализована в ядре клетки, в то время как синтез белка протекает главным образом в микросомах цитоплазмы. Первые экспериментальные доказательства о необходимости нуклеиновых кислот для синтеза белка были получены в лаборатории Т. Касперсона. Было показано также, что присутствующие в цитоплазме рибонуклеиновые кислоты контролируют синтез цитоплазматических белков. Таким образом, уже тогда вырисовывалась картина тесной связи между ДНК, локализованной в ядре¹, и синтезом белка, протекающим в цитоплазме и регулирующимся рибонуклеиновыми кислотами, которые были открыты как в цитоплазме, так и в ядре. На основании этих чисто морфологических данных было сделано заключение, полностью подтвержденное в настоящее время, что биосинтез белка, хотя непосредственно и регулируется рибонуклеиновыми кислотами, опосредованно связан с контролирующим влиянием ДНК ядра и что РНК сначала

¹ Получены экспериментальные доказательства наличия ДНК также в митохондриях (около 1–2% от суммарной ДНК клеток). Она не гомологична и не комплементарна ядерной ДНК. Предполагается, что митохондриальная ДНК кодирует синтез части структурных белков самих митондрий.

синтезируется в ядре, затем поступает в цитоплазму, где выполняет роль матрицы в синтезе белка. Полученные значительно позже экспериментальные данные подтвердили гипотезу о том, что основной функцией нуклеиновых кислот является не только хранение генетической информации, но и реализация этой информации путем программированного синтеза специфических белков.

Однако в этой последовательности ДНК → РНК → Белок недоставало сведений о том, каким образом происходят расшифровка наследственной информации и синтез специфических белков, определяющих многообразие признаков живых существ. В настоящее время выяснены основные процессы, посредством которых осуществляется передача наследственной информации: они включают репликацию, т. е. синтез ДНК на матрице ДНК, транскрипцию, т. е. перевод языка и типа строения ДНК на молекулу РНК, и трансляцию — процесс, в котором генетическая информация, содержащаяся в молекуле мРНК, направляет синтез соответствующей аминокислотной последовательности в белке. Многие тонкие механизмы транскрипции и трансляции окончательно не выяснены.

ТРАНСЛЯЦИЯ И ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К СИНТЕЗУ БЕЛКА В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ

Прямое отношение к механизмам передачи наследственной информации имеет процесс трансляции, означающий перевод «четырёхбуквенного языка нуклеиновых кислот на двадцатибуквенную речь белков». Другими словами, трансляция сводится к синтезу белка в рибосомах; в этом синтезе последовательность расположения нуклеотидов в мРНК определяет первичную структуру белка, т. е. строго упорядоченную последовательность расположения отдельных аминокислот в молекуле синтезируемого белка.

Остановимся прежде всего на анализе тех условий, которые необходимы для осуществления синтеза белка в бесклеточной системе, а затем рассмотрим современные представления о механизме этого синтеза в клетке. В классических исследованиях П. Замечника и сотр. при использовании меченых аминокислот было впервые точно установлено, что местом синтеза белка являются рибосомы. При определении радиоактивности белков в различных субклеточных фракциях печени, полученных методом дифференциального центрифугирования через различные промежутки времени, было показано, что радиоактивная метка в первую очередь появляется во фракции микросом и лишь затем в других субклеточных образованиях. После установления места включения радиоактивной метки было выяснено участие других субклеточных фракций и низкомолекулярных клеточных компонентов в синтезе белка. При инкубации фракции микросом печени крыс с ^{14}C -лизином включение радиоактивной метки в белки рибосом наблюдалось при наличии в системе, помимо фракции микросом, еще некоторых растворимых компонентов цитоплазмы, источника энергии в форме АТФ (или АТФ-генерирующей системы), а также ГТФ.

Дальнейшие исследования были направлены на поиск других компонентов белок-синтезирующей системы.

Белоксинтезирующая система включает: набор всех 20 аминокислот, входящих в состав белковых молекул; минимум 20 разных тРНК, обладающих специфичностью к определенному ферменту и аминокислоте; набор минимум 20 различных ферментов — аминоацил-тРНК-синтетаз, также обладающих двойной специфичностью к какой-либо определенной аминокислоте и одной тРНК; рибосомы (точнее полисомы: состоящие из 4—12 монорибосом с присоединенной к ним матричной мРНК); АТФ и АТФ-генерирующую систему ферментов; ГТФ, принимающий специфическое участие в инициации и элонгации синтеза белка в рибосомах; ионы Mg^{2+} в концентрации 0,005—0,008 М; мРНК в качестве главного компонента системы, несущей информацию о структуре белка, синтезирующегося в рибосоме; наконец, белковые факторы, участвующие в синтезе на разных уровнях трансляции.

Рассмотрим более подробно структуру и функцию главных компонентов белок-синтезирующей системы.

Рибосомы

Живые организмы, как известно, в зависимости от структуры клеток делятся на две группы: прокариоты и эукариоты. Первые не содержат ограниченного мембраной ядра и митохондрий или хлоропластов; они представлены главным образом микроорганизмами. Клетки эукариот животных и растений, включая грибы, напротив, содержат ядра с мембранами, а также митохондрии (и в ряде случаев хлоропласты).

Оба типа клеток содержат рибосомы, причем рибосомы эукариот (клетки животных) примерно в 2 раза больше рибосом прокариот (бактерий). Обычно рибосомы характеризуют по скорости их седиментации в центрифужном поле, которая количественно выражается константой седиментации s , выражаемой в единицах Сведберга S (см. главу 1).

Величина s зависит не только от размера частиц, но и от формы и плотности, так что она не пропорциональна размеру. Число рибосом в микробной клетке примерно равно 10^4 , а эукариот — около 10^5 .

Химически рибосомы представляют собой нуклеопротеины, состоящие только из РНК и белка, причем 80S рибосомы эукариот содержат примерно равное их количество, а у 70S рибосом прокариот соотношение РНК и белка составляет 2:1 (рис. 13.2). РНК рибосом принято называть рибосомными и обозначать рРНК. Как 80S, так и 70S рибосомы состоят из двух субчастиц; это можно показать при помощи электронной микроскопии или путем обработки рибосом растворами, содержащими низкие концентрации ионов Mg^{2+} . При этих условиях рибосомы диссоциируют на субчастицы; последние могут быть отделены друг от друга методом ультрацентрифугирования. Одна из субчастиц по размерам в 2 раза превышает размер второй; так, у 70S рибосом величины S для субчастиц равны 50S и 30S, у 80S рибосом — соответственно 60S и 40S (см. рис. 12.2). Укажем также, что у *E. coli* большая и малая субчастицы содержат 34 и 21 белок соответственно и, кроме того, две молекулы рРНК с коэффициентами седиментации 23S и 5S в большой и одну молекулу рРНК (16S) в малой субчастице. Субчастицы рибосом клеток эукариот построены более сложно: более 70 разных белков в обеих субчастицах, при этом большая субчастица содержит 28S, 5,8S и 5S рРНК, а малая содержит 18S рРНК¹.

Для выяснения тонких молекулярных механизмов синтеза белка в рибосомах необходимы сведения о структуре и функциях рибосом. В последнее время получены данные, свидетельствующие о вероятной пространственной трехмерной структуре как целых рибосом, так и их субчастиц. В частности, выяснено, что форму и размеры 30S и 40S субчастиц рибосом предопределяют не белковые молекулы этих частиц, а третичная структура входящих в их состав 16S и 18S рРНК. Более того, по данным акад. А. С. Спирина, для сохранения пространственной морфологической модели всей 30S субчастицы оказалось достаточным наличие только двух белков, содержащихся в определенных топографических участках молекулы 16S рРНК.

Относительно происхождения рибосом известно, что рРНК происходит из общего предшественника всех клеточных РНК, в свою очередь синтезирующегося на матрице ДНК в ядре; рибосомные белки имеют цитоплазматическое происхождение, затем они транспортируются в ядрышки, где и происходит спонтанное образование рибосомных субчастиц путем объединения белков с соответствующими рРНК. Объединенные субчастицы вместе или врозь транспортируются через поры ядерной мембраны обратно в цитоплазму, где ряд рибосом вместе с мРНК образуют полисомы или полирибосомы.

¹ К настоящему времени полностью расшифрована первичная структура всех рРНК в 70S и 80S рибосомах и аминокислотная последовательность всех 55 белков 70S рибосом и частично белков 80S рибосом.

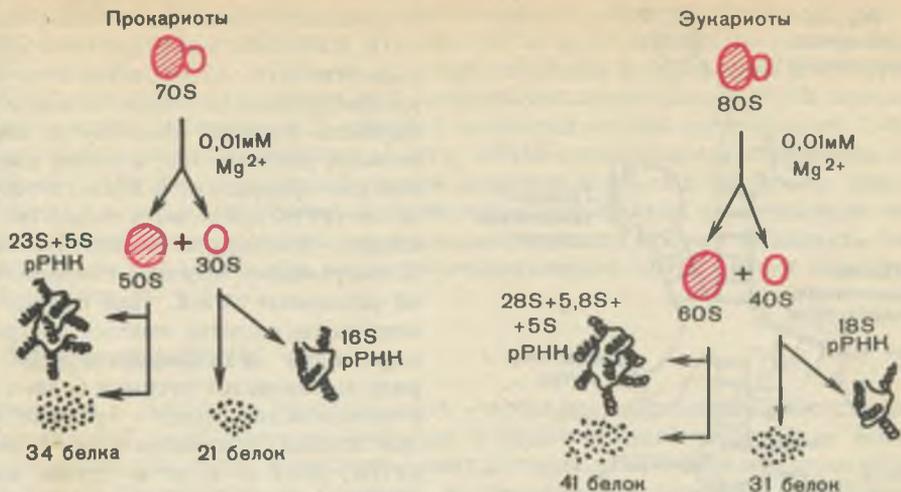


Рис. 13.2. Строение рибосом прокариот и эукариот (схема).

Аминоацил-тРНК-синтетазы

Экспериментально доказано существование в любых клетках живых организмов специфических ферментов, катализирующих активирование аминокислот и связывание последних с определенными тРНК. Все эти ферменты выделены в чистом виде из *E. coli*.

Молекулярная масса почти всех синтетаз равна 100 000 Да, за исключением фенилаланил-тРНК-синтетазы (180 000 Да). Все они оказались чувствительными к реагентам на SH-группы и требуют присутствия ионов Mg²⁺. Ферменты обладают абсолютной специфичностью действия, поскольку они узнают только одну какую-либо L-аминокислоту или одну тРНК; это обстоятельство чрезвычайно важно, поскольку в дальнейшем в белковом синтезе «узнавание» аминоацил-тРНК основано не на при-^ороде аминокислоты, а на химической природе антикодона тРНК. Считается, что в молекуле каждой аминоацил-тРНК-синтетазы имеются по крайней мере три центра связывания: для аминокислоты, тРНК и АТФ; ферменты весьма чувствительны также к аналогам аминокислот, которые ингибируют активирование соответствующих аминокислот. Некоторые ферменты состоят из одной полипептидной цепи, другие из двух или четырех гомологичных или гетерогенных субъединиц.

Аминоацил-тРНК-синтетазы в активном центре содержат гистидин, имидазольное кольцо которого участвует в связывании АТФ посредством ионов Mg²⁺. Наибольшим сходством эти ферменты, как было указано, обладают по отношению к молекулам специфических тРНК, хотя конкретный механизм, посредством которого ферменты узнают подходящую РНК, пока не ясен. В то же время эти ферменты отличаются низкой молярной активностью (число оборотов не превышает нескольких сот каталитических актов в минуту).

Транспортные РНК

В лаборатории М. Хогланда было выяснено, что при инкубации ¹⁴C-аминокислоты с растворимой фракцией цитоплазмы в присутствии АТФ и последующим добавлением трихлоруксусной кислоты в образовавшемся белковом осадке метка не обнаруживается. Было сделано заключение, что меченая аминокислота не включается в белковую молекулу. Метка оказалась связанной ковалентно с РНК, содержащейся в

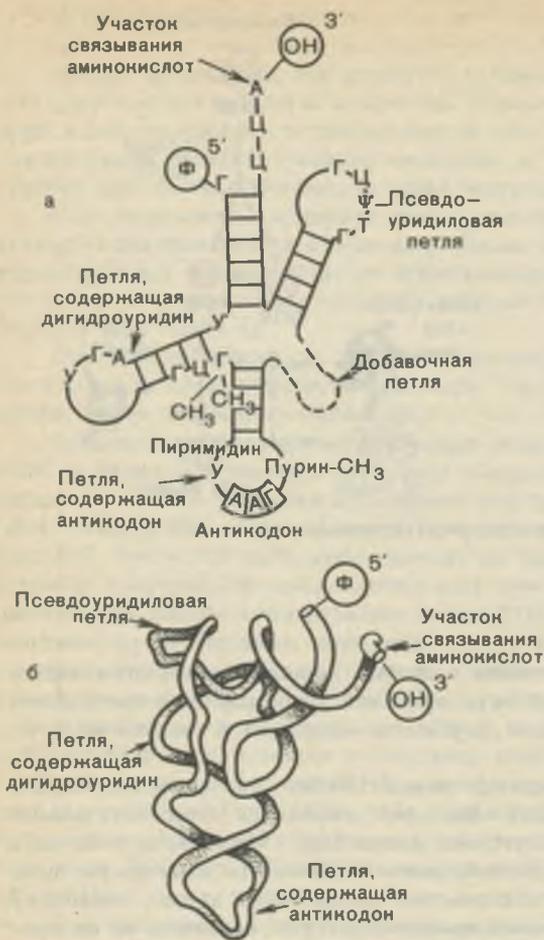


Рис. 13.3. Структура тРНК.

а — общая структура различных тРНК; б — пространственная структура тРНК.

рентгеноструктурного анализа и названная первоначально конформацией клеверного листа; на самом деле эта конформация имеет неправильную, Г-образную, форму (см. рис. 13.3).

Определение структуры тРНК позволило выявить ряд отличительных участков; так, на 3'-гидроксильном конце располагается одинаковая для всех тРНК последовательность триплета ЦЦА-ОН, к которой присоединяется посредством эфирной связи специфическая аминокислота. Связывание в основном происходит через 3'-ОН-группу концевого аденилового нуклеотида, хотя получены доказательства возможности присоединения аминокислоты и через 2'-ОН-группу. Тимидин-псевдоуридин-цитидиловая (ТΨЦ) петля, по-видимому, обеспечивает связывание аминоацил-тРНК с поверхностью рибосомы. Имеется, кроме того, добавочная петля, состав которой варьирует у разных типов молекул тРНК; ее назначение неизвестно. Дигидроурициловая петля, с другой стороны, оказалась необходимой как сайт (место) для узнавания специфическим ферментом — аминоацил-тРНК-синтетазой. Имеется также антикодоновая петля, несущая триплет, названный а н т и к о д о н о м, и расположенная на противополож-

безбелковом фильтрате. Показано, что РНК, к которой присоединяется меченая аминокислота, имеет небольшую молекулярную массу и сосредоточена в растворимой фракции, поэтому ее сначала назвали растворимой, а позже адапторной или транспортной РНК (тРНК). На долю тРНК приходится около 10–15% общего количества клеточной РНК. К настоящему времени открыто более 60 различных тРНК. Для каждой аминокислоты в клетке имеется по крайней мере одна специфическая РНК (для ряда аминокислот открыто более одной, в частности для серина — 5 разных тРНК, для лизина и глицина — по 4 разных тРНК, хотя и в этом случае каждая тРНК связана со специфической аминоацил-тРНК-синтетазой). Молекулярная масса большинства тРНК колеблется от 24 000 до 29 000 Да. Они содержат от 75 до 85 нуклеотидов. Аминокислоты присоединяются к свободной 3'-ОН-группе концевого мононуклеотида, представленного во всех тРНК АМФ, путем образования эфирной связи. Интересно, что почти все тРНК обладают не только удивительно сходными функциями, но и очень похожей трехмерной структурой (рис. 13.3).

Установлена первичная структура (см. главу 3) почти всех 60 открытых тРНК; знание последовательности нуклеотидов и, следовательно, состава тРНК дало в руки исследователей много ценных сведений о биологической роли отдельных компонентов тРНК. Общей для тРНК оказалась также нативная конформация, установленная методом

ной стороне от того конца, куда присоединяется аминокислота (см. рис. 13.3). Антикодон является специфичным и комплементарным к соответствующему кодоону мРНК, причем оба они являются антипараллельными в своей комплементарности.

Тщательный анализ нуклеотидной последовательности разных тРНК показал, что все они содержат одинаковый 5'-концевой нуклеотид — ГМФ со свободной 5'-фосфатной группой. Адапторная функция молекул тРНК заключается в связывании каждой молекулы тРНК со своей специфической аминокислотой. Но поскольку между нуклеиновой кислотой и специфической функциональной группой аминокислоты не существует соответствия и сродства, эту функцию узнавания должна выполнять белковая молекула, которая узнает как молекулу специфической тРНК, так и специфической аминокислоты.

Матричная РНК

Выше было указано на необходимость участия преобразованной молекулы РНК для правильной расстановки аминокислот в полипептидной цепи. Было высказано предположение, что такой молекулой может служить рРНК. Это предположение как будто бы подтверждалось и опытами по заражению клеток *E. coli* ДНК фага. Оказалось, что немедленно после заражения синтез нормальных клеточных ДНК прекращался и начинался интенсивный синтез фаговой ДНК. Более того, весь белоксинтезирующий аппарат клеток перестраивался на синтез только фаговых белков. Но поскольку состав синтезированных фаговых белков отличался от состава белков бактерии, было высказано предположение, что при заражении фагом, очевидно, меняется последовательность оснований в РНК. Однако и эта гипотеза не подтвердилась. Было высказано мнение, что преобразованная РНК, необходимая для изменения типа синтезируемого белка, должна обладать высокой скоростью обновления своего состава, т. е. молекула такой РНК должна синтезироваться и распадаться с такой скоростью, чтобы обеспечить быструю обновляемость нуклеотидного состава. Фактически же рРНК оказалась метаболически весьма стабильной, поэтому стало очевидным, что она не может служить в качестве матрицы.

В ряде лабораторий (в частности, в лаборатории С. Бреннера) были получены данные о существовании в клетках в соединении с рибосомами короткоживущей РНК¹, названной информационной РНК (иРНК); сейчас она обозначается как матричная РНК (мРНК), потому что ее роль заключается в переносе информации от ДНК в ядре (где она синтезируется под действием ДНК-зависимой РНК-полимеразы) до цитоплазмы, где она соединяется с рибосомами и служит матрицей, на которой происходит синтез белка. Эта блестящая гипотеза затем экспериментально была доказана в лаборатории М. Ниренберга. Последний изучал влияние различных фракций РНК на способность рибосом, выделенных из *E. coli*, к синтезу белка. Некоторые фракции РНК стимулировали включение ¹⁴C-аминокислот в белки. Добавление синтетического полинуклеотида, в частности полиуридилата (поли-У), в белоксинтезирующую систему приводило к включению в синтезирующуюся белковую молекулу единственной аминокислоты — фенилаланина. Поли-У вызывал синтез в бесклеточной системе необычного полипептида полифенилаланина. Таким образом, специфической полинуклеотид, добавленный к препаратам рибосом, включавшим известные к тому времени факторы белкового синтеза и источники энергии, вызывал синтез специфического полипептида.

Эти опыты открыли прямую дорогу для экспериментальной расшифровки кода, при помощи которого информация от РНК передается на синтезируемый белок. Последовательность нуклеотидов РНК реализуется в специфической последовательности аминокислот синтезируемой полипептидной цепи. Опыты Ниренберга свиде-

¹ Впервые на возможность существования в клетках быстро обменивающейся молекулы РНК было указано в работах А. Н. Белозерского и А. С. Спирина.

тельствуют также о том, что не рибосома и не рРНК являются матрицей, на которой синтезируются специфические белки, а эту роль выполняют поступающие извне матричные РНК. Итак, ДНК передает информацию на РНК, которая синтезируется в ядре и затем поступает в цитоплазму. Здесь РНК выполняет матричную функцию для синтеза специфической белковой молекулы. Матричная гипотеза синтеза белка, как и других полимерных молекул ДНК и РНК, получила в настоящее время полное подтверждение. Ее правильность была доказана в экспериментах, которые обещали точное воспроизведение первичной структуры полимерных молекул; причем этот синтез в отличие от беспорядочного химического синтеза отличался не только высокой скоростью и специфичностью, но и направленностью самого процесса, в строгом соответствии с программой, записанной в линейной последовательности молекулы матрицы.

Природа генетического кода

Генетическая информация, закодированная в первичной структуре ДНК, переводится еще в ядре в нуклеотидную последовательность мРНК. Однако вопрос о том, каким образом эта информация передается на белковую молекулу, долго не был выяснен. Первые указания на существование прямой линейной зависимости между структурой гена и его продуктом — белком можно найти у Ч. Яновского, который в серии изящных опытов с применением методов генетического картирования и секвенирования показал, что порядок изменений в структуре мутантного гена триптофансинтазы у *E. coli* в точности соответствует порядку соответствующих изменений в аминокислотной последовательности молекулы белка-фермента.

Ранее было известно, что молекулы мРНК не обладают средством к аминокислотам, поэтому для перевода нуклеотидной последовательности мРНК на аминокислотную последовательность белков требуется некий посредник, названный адаптором. Молекула адаптора должна быть в свою очередь наделена способностью узнавать нуклеотидную последовательность специфической мРНК и соответствующую аминокислоту. Обладая подобной адапторной молекулой клетка может включать каждую аминокислоту в подходящее место полипептидной цепи, в строгом соответствии с нуклеотидной последовательностью мРНК. Остается, таким образом, неизблемым положение, что сами по себе функциональные группы аминокислот не обладают способностью вступать в контакт с матрицей информационной мРНК.

Было показано, что в нуклеотидной последовательности молекулы мРНК имеются кодовые слова для каждой аминокислоты — генетический код. Проблема, однако, сводится к тому, из чего состоит этот таинственный код? Вероятнее всего, он заключается в определенной последовательности расположения нуклеотидов в молекуле ДНК. Вопросы о том, какие нуклеотиды ответственны за включение определенной аминокислоты в белковую молекулу и какое количество нуклеотидов определяет это включение, оставались нерешенными до 1961 г. Теоретический разбор показал, что код не может состоять из одного нуклеотида, поскольку в этом случае только 4 аминокислоты могут кодироваться. Но код не может быть и дуплетным, т. е. комбинация двух нуклеотидов из четырехбуквенного «алфавита» не может охватить всех аминокислот, так как подобных комбинаций теоретически возможно только 16 ($4^2 = 16$), а в состав белка входят 20 аминокислот. Для кодирования всех аминокислот белковой молекулы было бы достаточно взять триплетный код, когда число возможных комбинаций составит 64 ($4^3 = 64$).

Из приведенных выше данных М. Ниренберга становится очевидным, что поли-У, т. е. РНК, гипотетически содержащая остатки только одного уридилевого мононуклеотида, способствует синтезу белка, построенного из остатков одной аминокислоты — фенилаланина. На этом основании был сделан вывод, что кодоном для включения фенилаланина в белковую молекулу может служить триплет, состоящий из 3 уриди-

ловых нуклеотидов — УУУ. Вскоре было показано, что синтетическая матричная полицитидиловая кислота (поли-Ц) кодирует образование полипролина, а матричная полиадениловая кислота (поли-А) — полилизина; соответствующие триплеты — ЦЦЦ и ААА — действительно оказались триплетами (названными кодонами) для кодирования пролина и лизина.

М. Ниренберг, С. Очоа и Х. Корана, пользуясь искусственно синтезированными мРНК, представили доказательства не только состава, но и последовательности триплетов всех кодонов, ответственных за включение каждой из 20 аминокислот белковой молекулы. Полный кодовый «словарь» представлен в табл. 13.1.

Таблица 13.1. Генетический код

		Второй нуклеотид кодона				
		У	Ц	А	Г	
Первый нуклеотид кодона	У	УУУ } Фен	УЦУ } Сер	УАУ } Тир	УГУ } Цис	Третий нуклеотид кодона
		УУЦ } Фен	УЦЦ } Сер	УАЦ } Тир	УГЦ } Цис	
		УУА } Лей	УЦА } Сер	УАА } Терм	УГА } Терм	
		УУГ } Лей	УЦГ } Сер	УАГ } Терм	УГГ } Трп	
	Ц	ЦУУ } Лей	ЦЦУ } Про	ЦАУ } Гис	ЦГУ } Арг	
		ЦУЦ } Лей	ЦЦЦ } Про	ЦАЦ } Гис	ЦГЦ } Арг	
		ЦУА } Иле	ЦЦА } Про	ЦАА } Гли	ЦГА } Арг	
		ЦУГ } Иле	ЦЦГ } Про	ЦАГ } Гли	ЦГГ } Арг	
	А	АУУ } Иле	АЦУ } Тре	ААУ } Асп	АГУ } Сер	
		АУЦ } Иле	АЦЦ } Тре	ААЦ } Асп	АГЦ } Сер	
		АУА } Мет+Иниц	АЦА } Тре	ААА } Лиз	АГА } Арг	
		АУГ } Мет+Иниц	АЦГ } Тре	ААГ } Лиз	АГГ } Арг	
	Г	ГУУ } Вал	ГЦУ } Ала	ГАУ } Асп	ГГУ } Гли	
		ГУЦ } Вал	ГЦЦ } Ала	ГАЦ } Асп	ГГЦ } Гли	
		ГУА } Вал	ГЦА } Ала	ГАА } Глу	ГГА } Гли	
		ГУГ } Вал+Иниц	ГЦГ } Ала	ГАГ } Глу	ГГГ } Гли	

Как видно из данных табл. 13.1, генетический код для аминокислот является вырожденным. Это означает, что подавляющее большинство аминокислот кодируется несколькими кодонами; за исключением метионина и триптофана, по существу все остальные аминокислоты имеют более одного специфического кодона. Вырожденность кода оказывается неодинаковой для разных аминокислот. Так, если для серина, аргинина и лейцина имеется по 6 кодовых слов, то ряд других аминокислот, в частности глутаминовая кислота, гистидин и тирозин, имеют по 2 кодона, а триптофан — только 1. Следует отметить, что вырожденность чаще всего касается только третьего нуклеотида, в то время как для многих аминокислот первые два нуклеотида являются общими. Вполне допустимо поэтому предположение, что последовательность первых двух нуклеотидов определяет в основном специфичность каждого кодона, в то время как третий нуклеотид, очевидно, менее существен. В последнее время появились дока-

зательства гипотезы два из трех, означающей, что код белкового синтеза, возможно, является квази- или псевдодуплетным.

Имеются доказательства, что вырожденность генетического кода имеет несомненный биологический смысл, обеспечивая организму ряд преимуществ. В частности, она способствует «совершенствованию» генома, так как в процессе мутации могут наступать различные аминокислотные замены, наиболее ценные из которых отбираются в процессе эволюции.

Другой отличительной особенностью генетического кода является его непрерывность, отсутствие «знаков препинания», т. е. сигналов, указывающих на конец одного кодона и начало другого. Другими словами, код является линейным, однонаправленным и непрерывающимся: АЦГУЦГАЦЦ. Это свойство генетического кода обеспечивает синтез в высшей степени упорядоченной последовательности молекулы белков. Во всех других случаях последовательность нуклеотидов в кодонах будет нарушаться и приводить к синтезу «бессмысленной» полипептидной цепи с измененной структурой. Следует указать еще на одну весьма существенную особенность кода — его универсальность для всех живых организмов: от *E. coli* до человека.

Из табл. 13.1 видно, что среди 64 мыслимых кодонов 61 имеет смысл, т. е. кодирует определенную аминокислоту. В то же время три кодона, а именно УАГ, УАА, УГА, оказываются «бессмысленными», нонсенс-кодонами, так как они не кодируют ни одной из 20 аминокислот. Однако эти кодона не лишены смысла, поскольку выполняют важную функцию в синтезе белка в рибосомах (функцию окончания, терминации синтеза).

При исследовании генетического кода в опытах *in vivo* были также получены доказательства универсальности кода. Однако в последние годы выяснены некоторые отличия кода в митохондриях эукариот животных, включая человека, отличающегося четырьмя кодонами от генетического кода цитоплазмы, даже тех же клеток. В частности АУГ, который обычно является инициаторным кодоном, кодирует также метионин в цепи, и УГА, являющийся нонсенс-кодоном, кодирует в митохондриях триптофан (см. табл. 13.1). Кроме того, кодона АГА и АГГ являются для митохондрий скорее терминирующими, а не кодирующими аргинин. Как результат этих изменений, для считывания генетического кода митохондрий требуется меньше разных тРНК, в то время как цитоплазматическая система трансляции обладает полным набором тРНК.

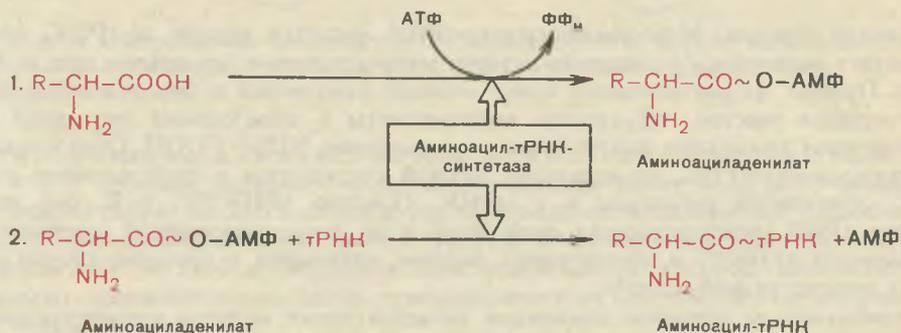
ЭТАПЫ СИНТЕЗА БЕЛКА

Синтез белка представляет собой циклический энергозависимый многоступенчатый процесс, в котором свободные аминокислоты полимеризуются в генетически детерминированную последовательность с образованием полипептидов. Система белкового синтеза, точнее система трансляции, которая использует генетическую информацию, транскрибированную в мРНК, для синтеза полипептидной цепи с определенной первичной структурой, включает около 200 типов макромолекул — белков и нуклеиновых кислот. Среди них около 100 макромолекул, участвующих в активировании аминокислот и их переносе на рибосомы (все тРНК, аминоацил-тРНК-синтетазы), более 60 макромолекул, входящих в состав 70S или 80S рибосом, и около 10 макромолекул (называемых белковыми факторами), принимающих непосредственное участие в системе трансляции. Не разбирая подробно природу других важных для синтеза факторов, рассмотрим подробно механизм индивидуальных путей синтеза белковой молекулы в искусственной синтезирующей системе. Прежде всего при помощи изотопного метода было выяснено, что синтез белка начинается с N-конца и завершается С-концом, т. е. процесс протекает в направлении: $\text{NH}_2 \rightarrow \text{COOH}$.

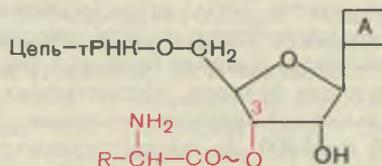
Белковый синтез, или процесс трансляции, может быть условно разделен на два этапа: активирование аминокислот и собственно процесс трансляции.

Активирование аминокислот

Необходимым условием синтеза белка, который в конечном счете сводится к полимеризации аминокислот, является наличие в системе не свободных, а так называемых активированных аминокислот, располагающих своим внутренним запасом энергии. Активация свободных аминокислот осуществляется при помощи специфических ферментов аминоксил-тРНК-синтетаз в присутствии АТФ. Этот процесс протекает в две стадии:



Обе стадии катализируются одним и тем же ферментом. На первой стадии аминокислота реагирует с АТФ и образуется пиррофосфат и промежуточный продукт, который на второй стадии реагирует с соответствующей 3'-ОН-тРНК, в результате чего образуется аминоксил-тРНК (аа-тРНК) и освобождается АМФ. Аминоацил-тРНК располагает необходимым запасом энергии; она имеет следующее строение:

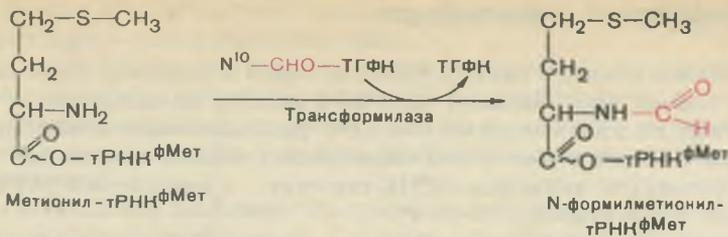


Необходимо еще раз подчеркнуть, что аминокислота присоединяется к концевому 3'-ОН-гидроксилу (или 2'-ОН) АМФ, который вместе с двумя остатками ЦМФ образует концевой триплет ЦЦА, являющийся одинаковым для всех транспортных РНК.

Процессы трансляции

Второй этап матричного синтеза белка, собственно трансляцию, протекающую в рибосоме, условно делят на три стадии: инициацию, элонгацию и терминацию.

Инициация трансляции. Стадия инициации, являющаяся «точкой отсчета» начала синтеза белка, требует соблюдения ряда условий, в частности наличия в системе, помимо 70S (или 80S) рибосом, инициаторной аминоксил-тРНК (аа-тРНК), инициаторных кодонов в составе мРНК и белковых факторов инициации. Экспериментально доказано, что у бактерий, в частности у *E. coli*, инициаторной аа-тРНК является формилметионил-тРНК, в образовании которой специфическое участие принимают соответствующая тРНК, обозначаемая тРНК^{ФМет}, и N¹⁰-формил-тетрагидрофолиевая кислота (N¹⁰-СНО-ТГФК):



Таким образом, N-формилметионил-tРНК является первой aa-tРНК, которая определяет включение N-концевого остатка аминокислоты и тем самым начало трансляции. Процесс формилирования имеет важный химический и биологический смысл, предотвращая участие NH_2 -группы аминокислоты в образовании пептидной связи и обеспечивая тем самым синтез белка в направлении $\text{NH}_2 \rightarrow \text{COOH}$. Образовавшаяся формилметионил-tРНК, по-видимому, первой связывается в определенном участке с 30S субчастицей рибосомы и с мРНК. Помимо tRNA^{Met} , у *E. coli* имеется обычная tРНК, акцептирующая свободный, а не формилированный метионин. Она обозначается tRNA^{Met} и обеспечивает перенос метионина в процессе сборки (элонгации) полипептидной цепи¹.

Необходимым условием инициации является также наличие иницирующих кодонов, кодирующих формилметионин. У бактерий эту функцию выполняют триплеты АУГ и ГУГ мРНК. Однако эти триплеты кодируют формилметионин (или начальный метионин) только будучи начальными триплетами при считывании матричной мРНК. Если же эти триплеты являются обычными, т. е. внутренними, то каждый из них кодирует свою аминокислоту, в частности АУГ-метионин и ГУГ-валин. Ясно, что инициаторный 5'-АУГ-кодон должен отличаться от других АУГ-кодонов. Предполагается, что инициаторному 5'-АУГ-кодону предшествует полипуриновая последовательность, которая узнается полипиримидиновой последовательностью в молекуле 16S рРНК. Возможно, кроме того, существование различий во вторичной структуре мРНК в районе иницирующего кодона, способствующих его узнаванию.

К настоящему времени выяснена природа белковых факторов инициации. У *E. coli* открыты три таких иницирующих фактора, обозначаемых соответственно IF-1, IF-2, IF-3. Все они получены в высокоочищенном состоянии с примерными молекулярными массами 9000, 100 000 и 22 000 Да соответственно. IF-3 обеспечивает узнавание участка на мРНК, куда присоединяется формилметионил-tРНК. Этот белковый фактор первым связывается со свободной 30S субчастицей рибосомы. IF-1 способствует связыванию формилметионил-tРНК с 30S субчастицей рибосомы и присоединению к последней мРНК. Белковый фактор IF-2, вероятнее всего, способствует объединению 30S и 50S субчастиц после того, как на первой уже присутствуют иницирующие кодоны мРНК, N-формилметионил-tРНК, IF-3, IF-1 и ГТФ. Этот белок рассматривают как фактор стабилизации всего комплекса.

Аналогичные белковые факторы инициации обнаружены также в эукариотических клетках. Открыты около 10 эукариотических белковых факторов инициации, их принято обозначать eIF. Хотя все они, по-видимому, важны для инициации, однако только три из них абсолютно необходимы для белкового синтеза — это eIF-2, eIF-3 и eIF-5; последние выделены в чистом виде, состоят из нескольких субъединиц: молекулярные массы их сильно различаются: от 86 000 Да для eIF-2 и 160 000 Да для eIF-3 до 500 000 Да для eIF-5. Укажем также, что в синтезе белка их роль тождественна роли инициаторных белков у прокариот.

¹ У эукариот подобной tРНК, специфичной для начального метионина, не подвергающегося формилированию (из-за отсутствия соответствующего фермента), является tRNA^{Met} , которая по своей структуре отличается от обычной tRNA^{Met} , обеспечивающей перенос остатка метионина в процессе элонгации полипептидной цепи.

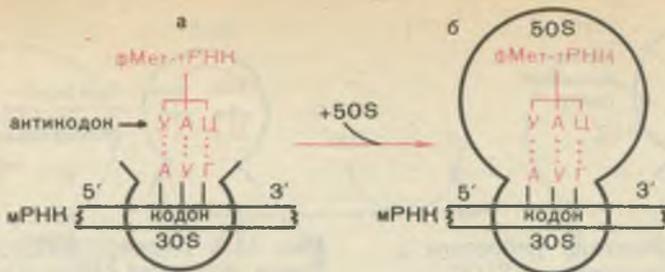


Рис. 13.4. Схематическое изображение взаимодействия формилметионил-тРНК и мРНК с 30S субчастицей рибосомы (а) и транслирующей (функционально активной) 70S рибосомой (б).

Образование инициаторного комплекса. Экспериментально доказано, что в процессе белкового синтеза наблюдается постоянная диссоциация 70S рибосомы на 30S и 50S субчастицы и последующая их реассоциация. Сначала образуется инициаторный комплекс путем присоединения белковых факторов, формилметионил-тРНК и ГТФ к 30S субчастице рибосомы, к которой комплементарно антикодону формилметионил-тРНК присоединяется мРНК при участии кодона АУГ (рис. 13.4).

Следует указать на особую роль формилметионил-тРНК, которая помогает мРНК найти на 30S субчастице определенное положение, обеспечивающее точную трансляцию информации о последовательности аминокислот в полипептидной цепи (установление рамки). Как только мРНК присоединяется к комплексу, высвобождается белковый фактор IF-3; оставшийся комплекс легко присоединяет 50S субчастицу, образуя транслирующую, т. е. функционально-активную, 70S рибосому. В процессе этих перестроек рибосомы освобождают остальные белковые факторы инициации и продукты гидролиза ГТФ (ГДФ и неорганический фосфат), энергия которого расходуется, по-видимому, на формирование иницирующего 70S комплекса рибосомы, в котором формилметионил-тРНК оказывается прикрепленной к пептидилсвязывающему центру рибосомы. В гидролизе ГТФ принимает участие IF-2. У образовавшейся активной 70S рибосомы, содержащей формилметионил-тРНК, оказывается свободным аминокильный центр, который может реагировать с определенной аа-тРНК, соответствующей очередному кодону мРНК. С этого момента начинается второй этап синтеза белка — элонгация.

Элонгация трансляции. Процесс элонгации полипептидной цепи у *E. coli* непосредственно, точнее топографически, связан с большой субчастицей (50S) рибосомы, содержащей два центра для связывания тРНК: один из них называется аминокильным (А), другой — пептидильным (П) центром (рис. 13.5).

В процессе элонгации у *E. coli* также участвуют три белковых фактора EF-Tu, EF-Ts и EF-G (элонгационные факторы трансляции, сокращенно обозначаемые Tu, Ts и G); у эукариот известны два таких фактора, названных трансляционными факторами: TF-1 и TF-2. Почти все они получены в чистом виде — это белки с большой молекулярной массой (от 70 000 до 200 000 Да). Процесс элонгации требует также наличия ГТФ, энергия гидролиза которого необходима для сближения аа-тРНК, расположенной на аминокильном центре, и формилметионил-тРНК, локализованной на пептидильном центре. Элонгация начинается со связывания следующей аа-тРНК (аминокислотный остаток которой является вторым с N-конца после формилметионина) с белковыми факторами и присоединения всего комплекса к аминокильному центру в соответствии с кодовым триплетом на мРНК.

Далее в пептидильном центре осуществляется ферментативная реакция транспептидирования между формилметионил-тРНК и новой аа-тРНК; в процессе этой реакции остаток формилметионина переносится на свободную NH_2 -группу аа-тРНК

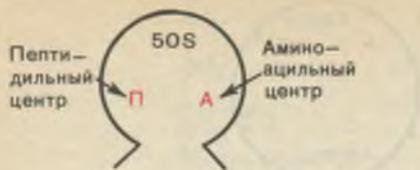


Рис. 13.5. 50S субчастица рибосомы с двумя центрами связывания тРНК.

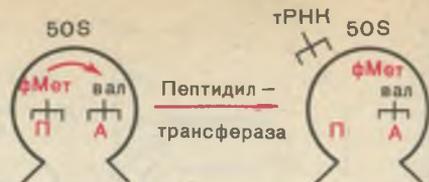


Рис. 13.6. Перенос фМет-тРНК между двумя центрами (П и А) на большой 50S субчастице рибосомы.

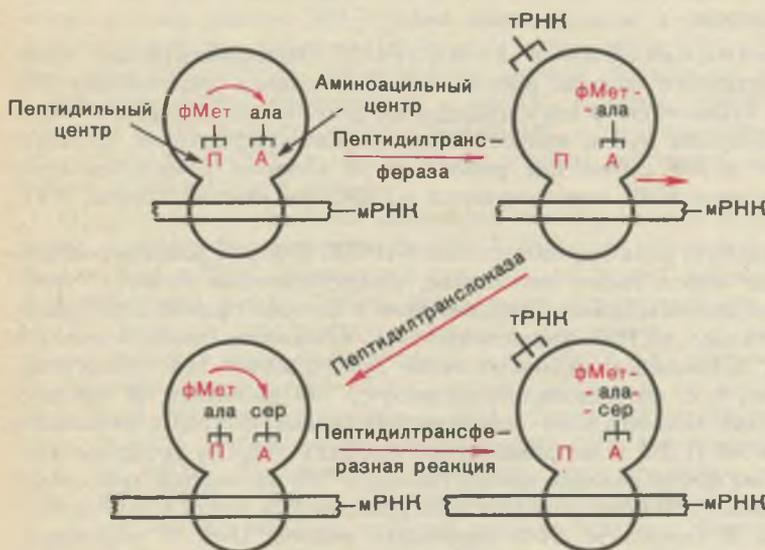


Рис. 13.7. Процесс элонгации полипептидной цепи (схема).

и замыкается первая пептидная связь в будущей цепи; параллельно из пептидильного центра освобождается тРНК^{фМет} в цитозоль. Фермент, катализирующий эту реакцию, получил название пептидилтрансферазы (рис. 13.6); он входит в состав белков 50S субчастиц. Таким образом, в процессе транспептидазной реакции на А-центре образуется дипептидил-тРНК, а П-участок остается свободным, «вакантным».

Для дальнейшего процесса элонгации требуется освободить аминоацильный центр для присоединения следующей аа-тРНК. Для этого на следующей стадии благодаря процессу т р а н с л о к а ц и и образовавшийся дипептидил-тРНК фрагмент переносится от аминоацильного на пептидильный центр. Достигается транслокация благодаря передвижению рибосомы относительно мРНК при участии фермента транслоказы (функцию которой выполняет фактор элонгации G у E. coli и TF-2 у эукариот) за счет использования энергии распада еще одной молекулы ГТФ. В результате транслокации дипептидил-тРНК занимает место на пептидильном центре рибосомы, а аминоацильный центр, освободившись, может присоединить новую следующую аа-тРНК, соответствующую кодону мРНК. Укажем также, что в процессе транслокации рибосома перемещается вдоль мРНК по направлению к ее 3'-концу на расстояние в один кодон, т. е. точно на один триплет. На рис. 13.7 видно, что рибосома вступает в следующий цикл — происходит присоединение третьего аминокислотного остатка и т. д.

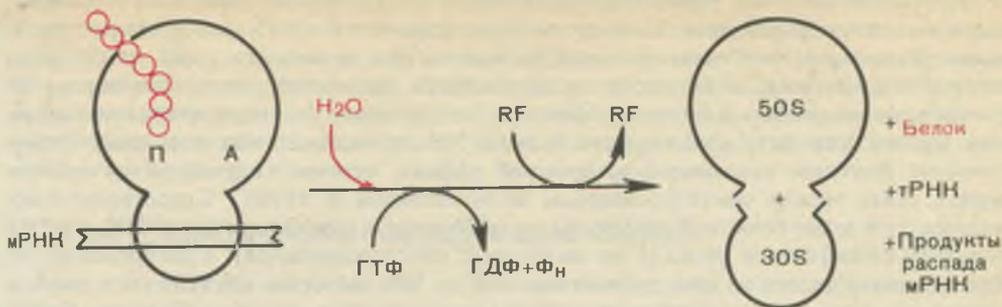


Рис. 13.8. Процесс терминации синтеза белка (схема).

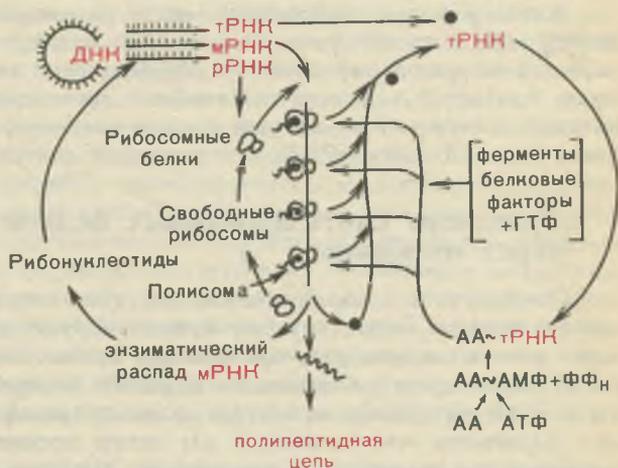


Рис. 13.9. Схематическое изображение роли РНК в синтезе белка (по Уотсону).

Таким образом, на стадии элонгации происходит последовательное наращивание полипептидной цепи по одной аминокислоте в строгом соответствии с порядком триплетов (кодонов) в молекуле мРНК.

Важным является вопрос о количестве энергии, необходимой для синтеза одной пептидной связи при биосинтезе белка. Как было отмечено выше, при активировании аминокислоты еще до стадии инициации трансляции, т. е. при формировании аа-тРНК, расходуется энергия распада АТФ на АМФ и пирофосфат, что приблизительно эквивалентно гидролизу 2 молекул АТФ до 2 молекул АДФ. Для включения аминоксил-тРНК в аминокислотный центр используется энергия гидролиза молекулы ГТФ на ГДФ и неорганический фосфат. Наконец, транслокация транслирующей 70S рибосомы также нуждается в энергии гидролиза еще одной молекулы ГТФ. Таким образом, энергетические потребности синтеза каждой пептидной связи эквивалентны энергии гидролиза 2 молекул АТФ и 2 молекул ГТФ до соответствующих нуклеозиддифосфатов. Легко представить, насколько велики энерготраты каждой клетки при синтезе не только одной молекулы белка, а множества молекул самых разнообразных белков в единицу времени.

Терминация трансляции. Завершение синтеза полипептидной цепи в 70S рибосоме осуществляется при участии трех белковых факторов терминации. Эти белки обозначаются RF-1, RF-2 у прокариот. В клетках животных открыт единственный белок с аналогичным свойством — фактор R. Первые два фактора у *E. coli* обладают свойством распознавания в молекуле мРНК терминирующих кодонов (УАГ, УАА

и УГА). После того как терминирующий кодон мРНК займет свое место в аминоканальном центре рибосомы, к нему не присоединяется тРНК, отсутствуют антикодоны, узнающие этот терминальный сигнал, а присоединяется один из белковых факторов терминации и блокируется дальнейшая элонгация цепи. Считается, что терминирующие кодоны и белковые факторы индуцируют пептидилэстеразную активность одного или двух рибосомных белков 50S субчастицы или что сами терминирующие факторы оказывают эстеразный эффект, причем гидролизуется сложноэфирная связь между синтезированным полипептидом и тРНК. Следствием этого являются отделение белковой молекулы от рибосомы и освобождение тРНК и мРНК (последняя подвергается распаду до свободных рибонуклеотидов); одновременно 70S рибосома распадается на две субчастицы 30S и 50S, которые поступают в свободный пул и могут вновь использоваться для реассоциации новой рибосомы. Схематически этот процесс представлен на рис. 13.8. ГТФ в терминации трансляции у *E. coli* рассматривается в качестве аллостерического регулятора, а у эукариот ГТФ, вероятнее всего, распадается на ГДФ и P_i .

В общей форме зависимость между репликацией ДНК, транскрипцией и трансляцией мРНК представлена на рис. 13.9. Видно, что одна матричная мРНК транслируется не одной рибосомой, а одновременно многими рибосомами, расположенными близко друг к другу. Подобные «скопления» рибосом на мРНК получили название полирибосом или полисом; они значительно повышают эффективность использования мРНК, т. е. ускоряют синтез белка.

Транспорт синтезированных белков через мембраны

Помимо использования белков для нужд самой клетки, многие так называемые экспортируемые белки, которые функционируют вне клетки, подвергаются переносу через клеточную мембрану при помощи особых низкомолекулярных пептидов (от 15 до 30 аминокислот), получивших название лидирующих, или сигнальных, пептидов. Особенностью их состава является преимущественное содержание гидрофобных радикалов, что позволяет им легко проникать через бислойную липидную мембрану или встраиваться в мембрану. Эти сигнальные последовательности в рибосомах образуются первыми с N-конца при синтезе белка по программе сигнальных кодонов, расположенных сразу после инициаторного кодона, и легко узнаются рецепторными участками мембраны эндоплазматической сети. При этом образуется комплекс между мРНК, рибосомой и мембранными рецепторными белками, формируя своеобразный канал в мембране, через который сигнальный пептид проникает внутрь цистерны эндоплазматической сети, увлекая и протаскивая за собой синтезируемую и растущую молекулу секреторного белка. В процессе прохождения или после проникновения полипептида в цистерны N-концевая сигнальная последовательность отщепляется под действием особой лидирующей (сигнальной) пептидазы, а зрелый белок через пластинчатый комплекс (аппарат Гольджи) может покидать клетку в форме секреторного пузырька. Следует указать на возможность активного участия в транспорте белков и других полимерных молекул через мембраны, помимо сигнальных пептидов, также особых белков, получивших наименование поринов; химическая природа и механизм их действия выяснены пока недостаточно.

Синтез митохондриальных белков

В митохондриях клеток высших организмов содержится до 2% клеточной ДНК, отличающейся от ДНК ядра. Митохондрии содержат весь аппарат, включая рибосомы, тРНК и мРНК, необходимый для синтеза определенных белков. Синтезируемые в митохондриях белки в основном относятся к нерастворимым белкам, участвующим в организации структуры этих органелл, в то время как источником синтеза рас-

творимых митохондриальных белков являются рибосомы цитоплазмы, откуда они затем транспортируются в митохондрии. Рибосомы в митохондриях имеют меньший размер, чем 80S рибосомы в цитоплазме. Интересно отметить, что в качестве иницирующей аминокислоты при синтезе белка в митохондриях эукариот может участвовать N-формилметионин, а не свободный метионин, как в цитоплазме. Это обстоятельство свидетельствует о том, что митохондриальный синтез белка по своему механизму, очевидно, близок к синтезу белка у прокариот.

Постсинтетическая модификация белков

Синтезированная на рибосоме в строгом соответствии с генетической программой линейная полипептидная цепь уже содержит информацию конформационную, т. е. она претерпевает не хаотичные структурные изменения, а подвергается превращению в определенное трехмерное тело, которое само наделено информацией, но уже функциональной. Указанное положение справедливо для молекул белков, выполняющих в основном структурные функции, но не для биологически неактивных молекул — предшественников белков, функциональная активность которых проявляется позже в результате разнообразных превращений, объединенных понятием постсинтетическая, или посттрансляционная, модификация. Подобные модификации структуры полипептида начинаются или сразу после трансляции, или во всяком случае еще до окончания формирования третичной структуры белковой молекулы. Помимо указанного выше процесса протеолитического удаления сигнального пептида, во многих белках отщепляется начальный N-концевой метионин. Оказалось, что в прокариотических клетках имеются особые ферменты, в частности деформилаза, катализирующая отщепление формильной группы от N-концевого метионина, а также аминопептидазы, катализирующие отщепление не только N-концевого формилметионина (или метионина у эукариот), но, возможно, и других остатков аминокислот с N-конца пептида. Аналогичному, так называемому ограниченному постсинтетическому протеолизу подвергаются проферменты (например, трипсиноген, химо трипсиноген и др.) или предшественники гормонов (например, проинсулин, пре- β -липотропин и др.).

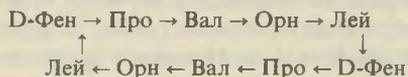
Как известно, участок ДНК, несущий информацию о синтезе индивидуального белка, называется геном, а участок, контролирующий синтез единственной полипептидной цепи, — цистроном. Следовательно, если в состав белка может входить несколько (более одного) полипептидов, то естественно предположить, что в синтезе такого белка должны участвовать несколько (более одного) цистронов. Однако это не всегда соответствует действительности, особенно в тех случаях, когда полипептидные цепи являются идентичными (например, α_2 - и β_2 -цепи Hb). С другой стороны, если, например, пептидные цепи какой-либо белковой молекулы являются неидентичными, то это не всегда означает, что они синтезируются как результат действия разных цистронов. Подобный белок мог синтезироваться в виде единственной полипептидной цепи с последующими разрывами в одном или нескольких местах. Типичным примером подобной химической модификации является гормон инсулин, синтезирующийся в виде единого полипептида препроинсулина, который после ферментативного гидролиза превращается сначала в неактивный предшественник проинсулин, а затем в активный гормон инсулин, содержащий две разные полипептидные цепи (см. рис. 1.14).

Следует подчеркнуть, однако, что значительно больший удельный вес занимает посттрансляционная химическая модификация белков, затрагивающая радикалы аминокислот. Одной из таких существенных модификаций является ковалентное присоединение простетической группы к молекуле белка; например, только после присоединения пиридоксальфосфата к белковой части — апоферменту — образуется биологически активная трехмерная конфигурация аминотрансфераз. Некоторые белки подвергаются гликозилированию, присоединяя олигосахаридные остатки (образование

гликопротеинов). Широко представлены химические модификации белков, связанные с реакциями гидроксирования остатков пролина, лизина (при формировании молекул коллагена), реакциями метилирования (остатки лизина, глутамата), карбоксилирования (остатки аспартата и глутамата) или ацетилирования ряда N-концевых аминокислот. Одной из широко распространенных химических постсинтетических модификаций является фосфорилирование остатков серина, треонина, например, в молекуле гистоновых и негистоновых белков, а также казеина молока. Фосфорилирование некоторых остатков тирозина в молекуле белка в настоящее время рассматривается как один из специфических этапов формирования онкобелков при малигнизации нормальных клеток.

В заключение следует отметить, что хотя биосинтез белка, представляющий сложный многоступенчатый процесс, подробно описан во многих обзорах и монографиях, однако наши знания о структурно-функциональных взаимоотношениях различных его этапов все еще недостаточны. Действительно, выделены и охарактеризованы рибосомы (более полно у *E. coli*), состоящие из множества индивидуальных белков и трех типов молекул РНК; более того, выяснена аминокислотная последовательность всех 55 белковых РНК, как и первичная, и вторичная структура трех типов РНК, и интенсивно изучается трехмерная структура отдельных белков рибосом прокариот. Тем не менее многие существенные детали механизма белкового синтеза не ясны и наши знания находятся на уровне гипотез. Например, недостаточно известно, какие участки или составные части рибосом ответственны за инициацию, элонгацию и терминацию белкового синтеза или каков молекулярный механизм процессов транслокации, пептидилтрансферазной реакции и взаимодействия рибосом с белковыми факторами, мРНК, тРНК и антибиотиками. Потребуется еще немало усилий для определения молекулярной архитектуры рибосом и отдельных ее составных частей, а также для получения точных данных об их структуре, форме и размерах, достаточных для понимания на молекулярном уровне функций рибосомы в сложном процессе синтеза белка.

Мультиферментный механизм синтеза пептидов. Матричный механизм синтеза лежит в основе синтеза почти всех белков живых организмов. Тем не менее синтез ряда низкомолекулярных пептидов может осуществляться не только без участия нуклеиновых кислот, в частности без мРНК, но даже при отсутствии рибосом. Еще на X Международном биохимическом конгрессе в Гамбурге в 1976 г. Ф. Липман (США) и К. Курахаси (Япония) представили экспериментальные доказательства синтеза двух природных пептидных антибиотиков — грамицидина S и тироцидина в экстрактах, полученных из *Bacillus brevis*. В частности, выделенные из экстракта *B. brevis* две белковые фракции обеспечивали точность сборки циклического полипептида — грамицидина S, состоящего из 10 аминокислотных остатков, расположенных в строгой последовательности. Очищенные белковые фракции (с молекулярными массами 100 000 и 180 000 Да) требовали присутствия только свободных аминокислот, АТФ и ионов Mg^{2+} для синтеза этого циклического декапептида (D-фенилаланилпролилвалилорнитиллейцин)₂:



Показано, что именно легкая белковая фракция (молекулярная масса 100 000 Да) обеспечивает рацемизирование и включение D-фенилаланина в первую полипептидную цепь, а тяжелая (молекулярная масса 180 000 Да) — включение 4 остальных L-аминокислот. Аналогично синтезируется такой же пентапептид на расположенном рядом мультиферментном комплексе, затем оба пентапептида соединяются по типу «голова к хвосту» с замыканием цепи и образованием циклического декапептида. В механизме синтеза предполагается предварительное образование аминокислотиденилатов (при участии этих же ферментов), из которых остатки аминокислот затем

переносятся на SH-группы ферментов. Аналогичный механизм синтеза доказан и для декапептида — антибиотика тироцидина и 13-членного циклического пептида — антибиотика микобациллина.

Таким образом, природа (условно в лице бактериальной клетки), очевидно, не утратила полностью существовавший до матричного, рибосомного пути атактистический механизм синтеза белковых тел, пользуясь для этого, может быть, весьма примитивными, но достаточно эффективными приемами.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА БЕЛКА

Основным условием существования любых живых организмов является наличие тонкой, гибкой, согласованно действующей системы регулирования, в которой все элементы тесно связаны друг с другом. В белковом синтезе не только количественный и качественный состав белков, но и время синтеза имеет прямое отношение ко многим проявлениям жизни. В частности, от этого зависит приспособление микроорганизмов к условиям окружающей питательной среды как биологической необходимости или приспособление сложного многоклеточного организма к физиологическим потребностям при изменении внутренних и внешних условий.

Клетки живых организмов обладают способностью синтезировать огромное количество разнообразных белков. Однако они никогда не синтезируют все белки. Количество и разнообразие белков, в частности ферментов, определяются степенью их участия в метаболизме. Более того, интенсивность обмена регулируется скоростью синтеза белка и параллельно контролируется аллостерическим путем. Таким образом, синтез белка регулируется внешними и внутренними условиями, которые диктуют клетке синтез такого количества белка и таких белков, которые необходимы для выполнения физиологических функций. Все это свидетельствует о весьма сложном, тонком и целесообразном механизме регуляции синтеза белка в клетке.

Общую теорию регуляции синтеза белка разработали Ф. Жакоб и Ж. Моно. Сущность этой теории сводится к «выключению» или «включению» генов как функционирующих единиц, к возможности или невозможности проявления их способности передавать закодированную в структурных генах ДНК генетическую информацию для синтеза специфических белков. Эта теория, доказанная в опытах на бактериях, получила широкое признание, хотя в эукариотических клетках механизм регуляции синтеза белка вероятно более сложный. У бактерий доказана индукция ферментов (т. е. синтез ферментов *de novo*) при добавлении в питательную среду субстратов этих ферментов. Добавление конечных продуктов реакции, образование которых катализируется этими же ферментами, напротив, вызывает уменьшение количества синтезируемых ферментов. Это последнее явление получило название репрессии и синтеза ферментов. Оба явления — индукция и репрессия — взаимосвязаны.

Согласно теории Жакоба и Моно в биосинтезе белка у бактерий участвуют по крайней мере три типа генов: структурные гены, ген-регулятор и ген-оператор. Структурные гены определяют первичную структуру синтезируемого белка. Именно эти гены в цепи ДНК являются основой для биосинтеза мРНК, которая затем поступает в рибосому и, как было указано выше, служит матрицей для биосинтеза белка. Регуляция синтеза белка путем индукции представлена на рис. 13.10.

Видно, что синтез мРНК на структурных генах молекулы ДНК непосредственно контролируется определенным участком, называемым геном-оператором. Он служит как бы пусковым механизмом для функционирования структурных генов. Ген-оператор локализован на крайнем отрезке структурного гена или структурных генов, регулируемых им. «Считывание» генетического кода, т. е. формирование мРНК, начинается с промотора — участка ДНК, являющегося точкой инициации для синтеза мРНК, и далее распространяется последовательно вдоль оператора и структурных генов. Координированный одним оператором одиночный ген или группа структурных генов образует оперон.

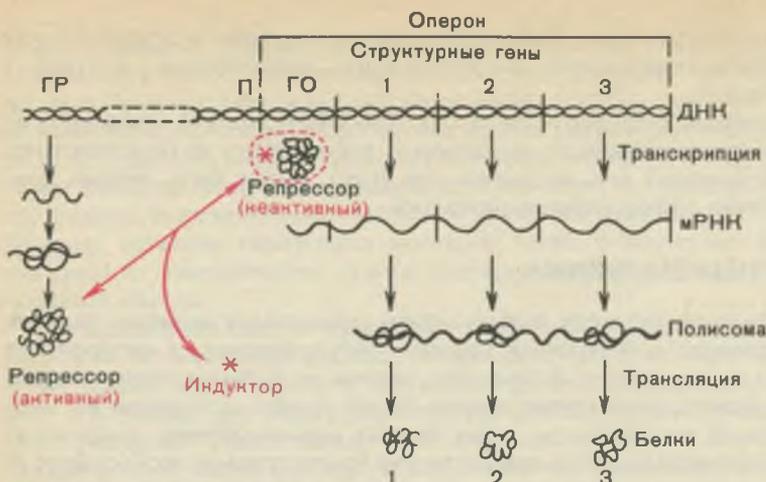


Рис. 13.10. Регуляция синтеза белка путем индукции (схема).

ГР — ген-регулятор; П — промотор; ГО — ген-оператор.

В свою очередь деятельность оперона находится под контролирующим влиянием другого участка цепи ДНК, получившего название гена-регулятора. Поскольку структурные гены и ген-регулятор находятся в разных участках цепи ДНК, связь между ними, как предполагают Ф. Жакоб и Ж. Моно, осуществляется при помощи вещества-посредника, оказавшегося белком и названного репрессором. Образование репрессора происходит в рибосомах ядра на матрице специфической мРНК, синтезированной на гене-регуляторе. Репрессор имеет сродство к гену-оператору и обратимо соединяется с ним в комплекс. Образование такого комплекса приводит к блокированию синтеза мРНК и, следовательно, синтеза белка, т. е. функция гена-регулятора состоит в том, чтобы через белок-репрессор прекращать деятельность структурных генов, синтезирующих мРНК. Репрессор, кроме того, обладает способностью строго специфически связываться с определенными низкомолекулярными веществами, называемыми индукторами, или эффекторами. Когда такой индуктор соединяется с репрессором, последний теряет способность связываться с геном-оператором, который таким образом выходит из-под контроля гена-регулятора, и начинается синтез мРНК.

Это типичный пример отрицательной формы контроля, когда индуктор, соединяясь с белком-репрессором, вызывает изменения его третичной структуры настолько, что репрессор теряет способность связываться с геном-оператором. Этот процесс аналогичен взаимоотношениям аллостерического центра фермента с эффектором, под влиянием которого изменяется третичная структура фермента и он теряет способность связываться со своим субстратом.

Механизм описанной регуляции синтеза белка и взаимоотношения репрессора со структурными генами были доказаны в опытах на *E. coli*, на примере синтеза β -галактозидазы (лактазы) — фермента, гидролизующего молочный сахар на глюкозу и галактозу. Дикая штамм *E. coli*, обычно растущий на глюкозе, не может расти, если вместо глюкозы в питательную среду добавить лактозу (новый источник энергии и углерода) до тех пор, пока не будут синтезированы соответствующие ферменты (адаптивный синтез). При поступлении в клетку лактозы (индуктора) молекулы ее связываются с белком-репрессором и блокируют связь между репрессором и геном-оператором. При этом ген-оператор и структурные гены начинают снова функционировать и синтезировать необходимую мРНК, которая «дает команду» рибосомам синтезировать β -галактозидазу. Одновременно ген-регулятор продолжает вырабатывать репрессор, но он блокируется новыми молекулами лактозы, поэтому синтез фермента продолжается. Как только молекулы лактозы будут полностью расщеплены, репрессор освобождается и, поступив в ДНК, связывает ген-оператор и блокирует синтез мРНК, а следовательно, синтез β -галактозидазы в рибосомах.

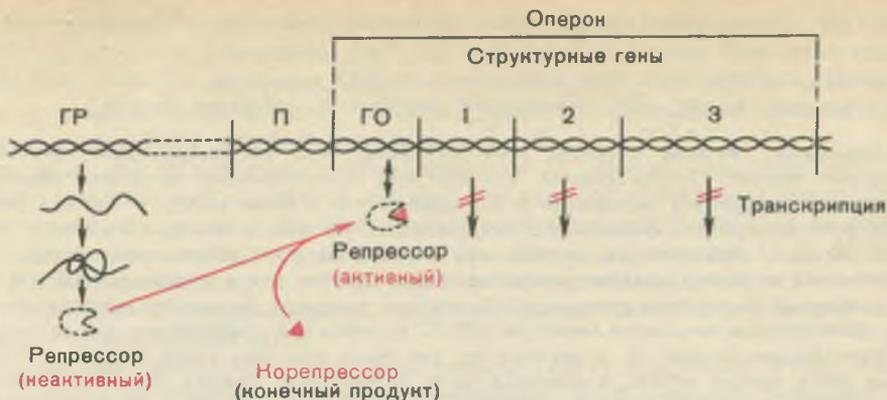


Рис. 13.11. Регуляция синтеза белка путем репрессии (схема). Обозначения те же, что на рис. 13.10.

Таким образом, биосинтез мРНК, контролирующей синтез белка в рибосомах, зависит от функционального состояния репрессора. Если репрессор, который представляет собой белок, построенный из 4 субъединиц с общей молекулярной массой около 150 000 Да, находится в активном состоянии, не связан с индуктором, то он блокирует ген-оператор и синтез мРНК не происходит. При поступлении метаболита-индуктора в клетку его молекулы связывают репрессор, превращая его в неактивную форму (или, возможно, снижая его средство к гену-оператору). Структурные гены выходят из-под запрещающего контроля и начинают синтезировать нужную мРНК.

Выше было указано, что концентрация ряда ферментов в клетках резко снижается при увеличении концентрации отдаленных конечных продуктов, образующихся в цепи последовательных ферментативных реакций. Такой эффект, получивший название репрессии ферментов, часто наблюдается при реакциях биосинтеза. В этих случаях оказалось, что молекулы репрессора, также образующиеся в рибосомах ядра по «команде» гена-регулятора, являются неактивными и сами по себе не обладают способностью подавлять деятельность гена-оператора и, следовательно, всего оперона, но приобретают такую способность после образования комплекса с конечным или одним из конечных продуктов биосинтетического процесса (рис. 13.11).

Конечный продукт выступает, таким образом, в качестве корепрессора. Имеются данные, показывающие, что в качестве корепрессоров в синтезе ферментов обмена аминокислот выступает не свободная аминокислота как конечный продукт биосинтетической реакции, а комплекс ее с тРНК — aa-тРНК.

В регуляции экспрессии структурных генов специфическое участие принимает особый белок, получивший название катаболитный ген-активирующий белок (от англ. catabolite gene activation protein, сокращенно обозначаемый CAP); этот белок взаимодействует с цАМФ, образуя комплекс, способствующий прикреплению РНК-полимеразы к промоторному участку генома. В присутствии комплекса CAP-цАМФ фермент может начать транскрипцию оперона, включая структурные гены, т. е. в клетках имеется еще один, дополнительный CAP-цАМФ регулятор, действующий скорее всего в качестве положительного регулятора, поскольку его присутствие необходимо для начала экспрессии гена. Таким образом, концепции Жакоба и Моно о механизме проявления активности генов признана одним из блестящих достижений молекулярной биологии. Она явилась логическим развитием многочисленных исследований, проведенных генетиками и биохимиками в предшествующие десятилетия.

В заключение следует вкратце рассмотреть вопрос о регуляции процессов дифференцировки клеток высших организмов. ДНК, присутствующая во всех соматических клетках, вероятно всего, имеет одинаковую первичную структуру у данного организма и соответственно располагает информацией для синтеза любых или всех

белков тела. Тем не менее клетки печени, например, синтезируют сывороточные белки, а клетки молочной железы — белки молока. Нет сомнения в том, что в дифференцированных клетках, очевидно, существует тонкий механизм контроля деятельности ДНК в разных тканях, обеспечивающий синтез многообразия белков.

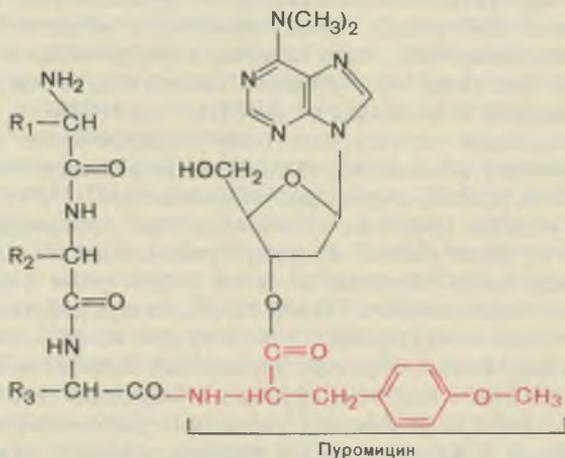
Механизмы, лежащие в основе этой регуляции, пока неизвестны. Для объяснения их имеется ряд гипотез. Предполагается, что контроль осуществляется на уровне транскрипции по аналогии с индукцией ферментов у бактерий и что в этом случае в клетках животных должны функционировать аналогичные репрессоры. Поскольку с молекулой ДНК у эукариот связаны гистоны, считается, что именно они выполняют роль репрессоров. Однако прямые доказательства их роли в качестве репрессоров отсутствуют, как и точные данные о существовании и природе каких-либо репрессоров в клетках эукариот. Высказано предположение, что в ядре синтезируется гигантская молекула мРНК, содержащая информацию для синтеза широкого разнообразия белков, но в цитоплазму, как было показано выше, попадает только небольшая часть зрелой мРНК, а основная часть распадается. Неясны, однако, биологический смысл и назначение этого механизма избирательного распада и, соответственно, траты огромной части молекулы мРНК.

Существует еще одно предположение, что на ДНК клетки синтезируются все возможные мРНК, которые поступают в цитоплазму, и процесс трансляции регулируется путем специфического и избирательного взаимодействия с определенными молекулами мРНК.

ИНГИБИТОРЫ СИНТЕЗА БЕЛКА

Одним из путей выяснения механизмов синтеза нуклеиновых кислот и белков в клетках является использование таких лекарственных препаратов, которые могли бы избирательно тормозить эти процессы у бактерий, не оказывая влияния на организм человека. Некоторые препараты действительно обладают таким действием, однако многие из них оказываются токсичными и для человека. В настоящее время в медицинской практике применяются многие антибиотики, часть из которых будет рассмотрена ниже с целью выяснения механизма их действия на ключевые химические реакции синтеза белка и нуклеиновых кислот.

Одним из мощных ингибиторов белкового синтеза является пурамицин. В результате структурного сходства с концевым остатком АМФ в аминоксил-тРНК¹ он легко взаимодействует с А-участком пептидил-тРНК с образованием пептидил-пурамицина.



¹ Более точно пурамицин является структурным аналогом тирозинил-тРНК; связываясь с аминокислотным участком рибосомы, он тормозит связывание новой aa-тРНК на стадии элонгации синтеза белка.

Поскольку пептидил-пуromицин не несет на себе триплета антикодона, он тем самым тормозит элонгацию пептидной цепи, вызывая обрыв реакции. При помощи пуromицина было доказано, например, что гормональный эффект в ряде случаев зависит от синтеза белка *de novo*. Укажем также, что пуromицин тормозит синтез белка как у прокариот, так и у эукариот.

Белковый синтез тормозится актиномицином D, обладающим противоопухолевым эффектом, который вследствие высокой токсичности применяется редко. Он оказывает тормозящее влияние на синтез всех типов клеточной РНК, в особенности мРНК. Это свойство вызвано тормозящим влиянием актиномицина D на ДНК-зависимую РНК-полимеразу, поскольку он связывается с остатками дезоксигуанозина цепи ДНК, выключая матричную функцию последней. Можно считать, что актиномицин D ингибирует транскрипцию ДНК.

Другим антибиотиком, также тормозящим синтез клеточной РНК, является используемый при лечении туберкулеза рифамицин. Этот препарат тормозит ДНК-зависимую РНК-полимеразу путем связывания с ферментом. Наиболее чувствительна к нему бактериальная РНК-полимераза. На организм животных этот антибиотик оказывает незначительное влияние. По механизму действия он резко отличается от актиномицина D. Следует указать на недавно открытое противовирусное действие рифамицина, в частности, он успешно используется при лечении трахомы, которая вызывается ДНК-содержащим вирусом. По-видимому, этот антибиотик найдет применение в лечении опухолей, вызываемых вирусами.

Выяснены механизмы действия ряда других антибиотиков, применяемых при лечении тифозных инфекций. Так, хлорамфеникол оказывает ингибирующее влияние на пептидилтрансферазную реакцию (на стадии элонгации) синтеза белка в 70S рибосоме бактерий. На этот процесс в 80S рибосоме он не действует. Противоположное тормозящее действие на синтез белка в 80S (без поражения процесса в 70S рибосоме) оказывает циклогексимид, являющийся ингибитором транслоказы.

Весьма интересен молекулярный механизм действия дифтерийного токсина. Он оказался наделен способностью катализировать реакцию АДФ-рибозилирования фактора элонгации (трансляционный фактор-2, TF-2), выключая тем самым его из участия в синтезе белка. Резистентность многих животных к дифтерийному токсину обусловлена трудностью проникновения токсина через мембрану клеток.

Противотуберкулезные и антибактериальные антибиотики, в частности стрептомицин и неомицин, действуют на белоксинтезирующий аппарат чувствительных к ним штаммов бактерий. Высказано предположение, что эти антибиотики вызывают ошибки в трансляции мРНК, приводящие к нарушению соответствия между кодонами и включаемыми аминокислотами; например, кодон УУУ вместо фенилаланина начинает кодировать лейцин — в результате образуется аномальный белок, что приводит к гибели бактерий.

Широко применяемые в клинике тетрациклины также оказались ингибиторами синтеза белка в 70S рибосоме (меньше тормозится синтез в 80S рибосоме). Они легко проникают через клеточную мембрану. Считается, что тетрациклины тормозят связывание аминоацил-тРНК с аминоацильным центром в 50S субчастице рибосомы. Возможно, что тетрациклины химически связываются с этим центром, выключая тем самым одну из ведущих стадий процесса трансляции.

Пенициллины не являются истинными ингибиторами синтеза белка, однако их антибактериальный эффект связан с торможением синтеза гексапептидов, входящих в состав клеточной стенки. Механизм их синтеза отличается от рибосомального механизма синтеза белка. Эритромицин и олеандомицин тормозят активность транслоказы в процессе трансляции, подобно циклогексимиду, исключительно в 80S рибосомах, т. е. тормозят синтез белка в клетках животных.

Полученные к настоящему времени данные по механизму действия антибиотиков на синтез белка с учетом стадии и топографии процесса трансляции суммированы в табл. 13.2 (по Харперу).

Таблица 13.2. Антибиотики — ингибиторы трансляции

Стадия трансляции	Эукариоты		Прокариоты
	цитоплазма	митохондрия	
<i>I. Инициация</i>			
Ауринтрикарбоновая кислота	—	—	+
<i>II. Элонгация</i>			
Амицетин	?	?	+
Анизомидин	—	?	+
Линкомицин	—	?	+
Неомицин	+	+	+
Пуромицин	+	+	+
Спарсомидин	+	+	+
Тетрациклины	—	+	+
Фузидовая кислота	—	—	+
Хлорамфеникол	—	+	+
Циклогексимид	+	—	—
<i>III. Терминация</i>			
Амицетин	?	?	+
Анизомидин	?	?	*
Линкомицин	?	?	+
Спарсомидин	+	+	+
Стрептомицин	+	+	+
Хлорамфеникол	—	—	+
Эритромицин	—	+	+

+ — торможение; — — отсутствие торможения; * — стимулирование; ? — не известно.

Следует еще раз подчеркнуть, что нарушение или выпадение любого звена, участвующего в синтезе белка, почти всегда приводит к развитию патологии, причем клинические проявления болезни будут определяться природой и функцией белка, синтез которого оказывается нарушенным (структурный или функциональный белок). Иногда синтезируются так называемые аномальные белки как результат действия мутагенных факторов и, соответственно, изменения генетического кода (например, гемоглобин при серповидно-клеточной анемии). Последствия этих нарушений могут выражаться в развитии самых разнообразных синдромов или заканчиваться летально. Следует отметить, что организм располагает мощными механизмами защиты: подобные изменения генетического аппарата быстро распознаются специфическими ферментами — рестриктазами, измененные последовательности вырезаются и вновь замещаются соответствующими нуклеотидами при участии полимераз и лигаз.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ОБМЕНА БЕЛКОВ, ЖИРОВ И УГЛЕВОДОВ

Живой организм и условия его существования находятся в постоянной зависимости от влияния окружающей среды. «Жизнь есть способ существования белковых тел, и этот способ существования состоит по своему существу в постоянном самообновлении химических составных частей этих тел»¹.

Обмен веществ в организме человека протекает не хаотично, а строго интегрирован и «тонко настроен». Все превращения органических веществ, процессы анаболизма и катаболизма тесно связаны друг с другом. В частности, процессы синтеза и распада взаимосвязаны, координированы и регулируются нейрогормональными механизмами, придающими химическим процессам нужное направление. В организме человека, как и в живой природе вообще, не существует самостоятельного обмена белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот. Все превращения объединены в единый процесс метаболизма, подчиняющийся диалектическим закономерностям взаимозависимости и взаимообусловленности.

Однако, помимо взаимных переходов между разными классами веществ в организме, доказано существование более сложных форм связи. В частности, интенсивность, направление любой химической реакции определяются ферментами, т. е. белками, которые оказывают прямое влияние на обмен липидов, углеводов и нуклеиновых кислот. В свою очередь синтез любого белка-фермента требует участия ДНК и всех трех типов рибонуклеиновых кислот — тРНК, мРНК и рРНК. Если к этому добавить влияние гормонов, а также продуктов распада какого-либо одного класса веществ (например, биогенных аминов) на обмен других классов органических веществ, то становится понятным удивительная согласованность и координированность огромного разнообразия химических процессов, совершающихся в организме. Многие из этих процессов были освещены при описании обмена отдельных классов веществ; в данной главе кратко будут представлены примеры взаимных переходов отдельных структурных элементов белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот в процессе их превращений и обмена.

В настоящее время экспериментально обосновано существование трех главных этапов распада молекул углеводов, белков и жиров, которые интегрируют образование энергии из основных пищевых источников. На первом этапе полисахариды расщепляются до моносахаридов (обычно гексоз); жиры распадаются на глицерин и высшие жирные кислоты, а белки — на составляющие их свободные аминокислоты. Следует подчеркнуть, что указанные процессы в основном являются гидролитическими, поэтому освобождающаяся в небольшом количестве энергия почти целиком используется организмами в качестве тепла. На втором этапе мономерные молекулы (гексозы, глицерин, жирные кислоты и аминокислоты) подвергаются дальнейшему распаду, в процессе которого образуются богатые энергией фосфатные соединения и ацетил-КоА. На третьем этапе, как ацетил-КоА, так и промежуточные метаболиты (α -кетоглутарат, сукцинат и оксалоацетат), образующиеся из сотен органических веществ

¹ Маркс К., Энгельс Ф. Соч. 2-е изд., т. 20, с. 82.

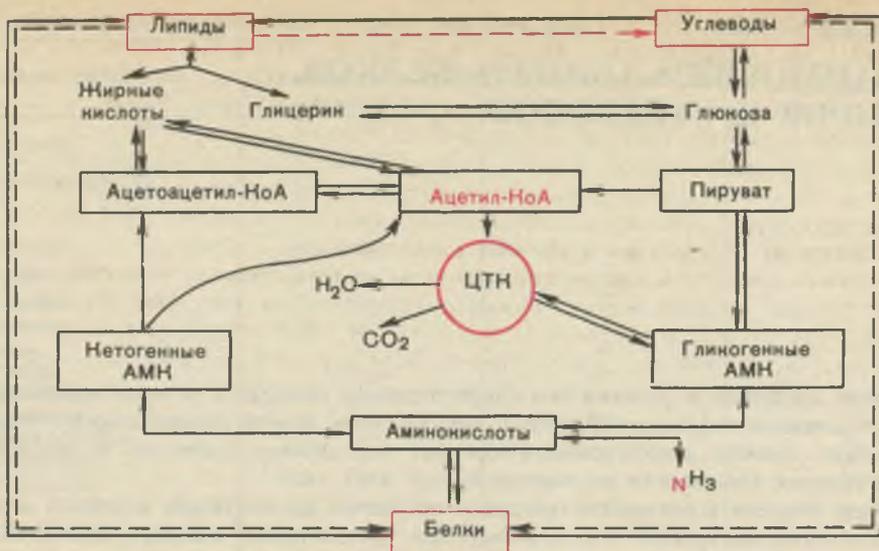


Рис. 14.1. Взаимодействие белков, жиров и углеводов.

пищи, подвергаются окислению («сгоранию») в цикле Кребса, давая энергию в виде АТФ; последний образуется в процессе окислительного фосфорилирования в митохондриях при переносе электронов от восстановленных пиридиновых и флавиновых нуклеотидов на молекулярный кислород.

Интенсивность обмена веществ регулируется как гормональными факторами, так и внутриклеточными регулирующими системами; более того, имеется немало доказательств, что живые организмы наделены удивительной способностью контролировать свой метаболизм. Однако необходимы дальнейшие усилия и знания, чтобы понять тонкости тех механизмов благодаря которым в целостном организме достигается постоянство среды.

Основные пути взаимопревращений белков, жиров и углеводов представлены на рис. 14.1. Помимо прямых переходов метаболитов этих классов веществ друг в друга, существует тесная энергетическая связь, когда энергетические потребности организма могут обеспечиваться окислением какого-либо одного класса органических веществ при недостаточном поступлении с пищей других. Важность белков (в частности, ферментов, гормонов и др.) в обмене всех типов химических соединений слишком очевидна и не требует доказательств. Выше также было указано на большую роль белков и аминокислот для синтеза ряда специализированных соединений (пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, порфиринов, биогенных аминов и др.). Кетогенные аминокислоты, образуя в процессе обмена ацетоуксусную кислоту (ацетоацетил-КоА), могут непосредственно участвовать в синтезе жирных кислот и стероидов. Аналогично могут использоваться гликогенные аминокислоты через ацетил-КоА, но после предварительного превращения в пируват. Некоторые структурные компоненты специализированных липидов, в частности фосфолипидов, имеют своим источником аминокислоты и их производные, например серин, этаноламин, сфингозин и холин. Необходимо подчеркнуть, что путь превращения углеродных скелетов кетогенных или гликогенных аминокислот в жирные кислоты является необратимым процессом, хотя нельзя исключить возможности частичного синтеза глутамата и опосредованно других аминокислот из продуктов распада жирных кислот — ацетил-КоА — через цикл трикарбоновых кислот, включающий α -кетоглутарат.

В то же время из глицерина нейтральных жиров через пируват полностью осуществляется синтез углеродных скелетов некоторых гликогенных аминокислот.

Продукты гидролиза пищевых и тканевых триглицеридов, в частности высшие жирные кислоты, участвуют непосредственно в образовании сложных белков — липопротеинов плазмы крови. В составе липопротеинов, являющихся, таким образом, транспортной формой жирных кислот, они доставляются в органы-мишени, в которых жирные кислоты служат или источником энергии (сердечная и поперечнополосатая мускулатура), или предшественниками синтеза тканевых триглицеридов с последующим их отложением в органах (депо липидов).

Получены доказательства синтеза глюкозы из большинства аминокислот. В некоторых случаях (аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты) эта связь является непосредственной, в других — осуществляется через побочные каналы. Следует особо подчеркнуть, что три α -кетокислоты (пируват, оксалоацетат и кетоглутарат), образующиеся соответственно из аланина, аспартата и глутамата, не только служат исходным материалом для синтеза глюкозы, но и являются своеобразными катализаторами в превращении ацетильных остатков всех классов пищевых веществ в цикле Кребса для получения энергии.

Синтез незаменимых аминокислот из продуктов обмена углеводов и жиров в организме не происходит. Клетки животных не содержат ферментных систем, катализирующих синтез углеродных скелетов этих аминокислот. Этим объясняется незаменимость белков в питании для человека и животных. В то же время организм может нормально развиваться исключительно при белковом питании, что также свидетельствует о возможности синтеза углеводов из белков. Процесс синтеза углеводов из аминокислот получил название г л ю к о н е о г е н е з а, который доказан прямым путем в опытах на животных с экспериментальным диабетом, когда более 50% введенного белка превращается в глюкозу. Как известно, при диабете организм теряет способность утилизировать глюкозу и энергетические потребности покрываются за счет окисления аминокислот и жирных кислот. Доказано также, что исходными субстратами для глюконеогенеза являются те аминокислоты, распад которых сопровождается образованием прямо или опосредованно пировиноградной кислоты (например, аланин, серин, треонин и цистеин). Более того, имеются доказательства существования в организме своеобразного циклического процесса, названного г л ю к о з о - а л а н и н о в ы м ц и к л о м, участвующего в тонкой регуляции концентрации глюкозы в крови в тех условиях, когда в период между приемами пищи организм испытывает дефицит глюкозы; источниками пирувата при этом являются указанные выше аминокислоты, образующиеся в мышцах при распаде белков и поступающие в печень, в которой они подвергаются дезаминированию; образовавшийся аммиак там же обезвреживается, участвуя в синтезе мочевины, которая выделяется из организма. Дефицит мышечных белков затем восполняется за счет поступления аминокислот пищи.

Энергетическая ценность пищи оказывает определенное влияние на белковый обмен, контролируемый азотистым балансом. Так, если потребляемая энергия пищи ниже минимального уровня, то наблюдается увеличение экскреции азота, и, наоборот, при увеличении энергетической ценности пищи экскреция азота с мочой снижается. Энергетическая ценность пищи, следовательно, является лимитирующим фактором в утилизации пищевых белков.

Из приведенной выше схемы видно также, что имеются различные пути взаимопревращений жиров и углеводов. Практика откорма сельскохозяйственных животных давно подтвердила возможность синтеза жиров из углеводов пищи. С энергетической точки зрения превращение углеводов в жиры следует рассматривать как накопление и депонирование энергии, хотя синтез жира сопровождается затратой энергии, которая вновь освобождается при окислении жиров в организме. Глицерин, входящий в состав триглицеридов и фосфоглицеридов, может легко образоваться из промежуточных метаболитов гликолиза, в частности из глицеральдегид-3-фосфата.

Следует, однако, подчеркнуть, что основным путем превращения углеводов в жиры является путь образования высших жирных кислот из ацетил-КоА, который образуется при окислительном декарбоксилировании пирувата. Последняя реакция практически необратима, поэтому образования углеводов из высших жирных кислот почти не происходит. Таким образом, синтез углеводов из жиров в принципе может происходить только из глицерина, хотя в обычных условиях реакция протекает в обратную сторону, т. е. в сторону синтеза жиров из глицерина, образующегося при окислении углеводов.

Ацетил-КоА, образующийся в процессе обмена углеводов, жиров и ряда аминокислот, служит нусковым субстратом как для синтеза жирных кислот (а следовательно, и липидов вообще), так и для цикла трикарбоновых кислот. Для окисления ацетил-КоА в этом цикле требуется оксалоацетат, который является вторым ключевым субстратом в цикле Кребса. Оксалоацетат может синтезироваться из пировиноградной кислоты и углекислого газа благодаря реакции карбоксилирования или образоваться из аспарагиновой кислоты в процессе трансминирования. Две молекулы ацетил-КоА, конденсируясь, образуют ацетоуксусную кислоту (ацетоацетат), которая является источником других кетоновых тел в организме, в частности β -оксимасляной кислоты (β -оксипутирата) и ацетона (см. главу 10). Следует подчеркнуть, что ацетоуксусная и β -оксимасляная кислоты часто рассматриваются как транспортные формы активной уксусной кислоты, доставляющие ее для окисления в цикле Кребса в периферические ткани. Эти же реакции конденсации двух молекул ацетил-КоА составляют начальные этапы синтеза холестерина, в свою очередь являющегося предшественником гормонов стероидной природы, витамина D_3 , а также желчных кислот; последние в виде парных желчных кислот выполняют важную функцию эмульгаторов при переваривании липидов пищи в кишечнике и способствуют всасыванию высших жирных кислот.

Следует указать также на использование галактозы и частично глюкозы для биосинтеза цереброзидов и гликолипидов, выполняющих специфические функции в деятельности ЦНС. В этих синтезах участвуют не свободные моносахариды, а галактозамин и глюкозамин, биосинтез которых в свою очередь требует доставки амидного азота глутамина, интегрируя, таким образом, обмен углеводов, липидов и белков.

Перечисленными примерами абсолютно не исчерпывается все многообразие взаимопревращений органических веществ, которое постоянно совершается в живых организмах. Здесь были приведены лишь главные, магистральные каналы и пути превращения общих классов веществ и указаны ключевые субстраты и ферментные системы, обеспечивающие постоянство химических компонентов и тканей и динамичность живых структур.

Таким образом, скорости распада одних питательных веществ и биосинтеза других прежде всего определяются физиологическим состоянием и потребностями организма в энергии и метаболитах. Этими факторами в значительной степени может быть объяснено существование постоянного динамического состояния химических составных компонентов организма как единого целого.

Благодаря этой динамичности и координации метаболической активности обеспечивается макро- и микроскопическое постоянство всех форм живого. Выяснение фундаментальных проблем структуры и функций отдельных биомолекул может служить основой для раскрытия как молекулярных механизмов химических процессов, лежащих в основе состава и функций отдельных клеток и целостного организма, так и процессов, обеспечивающих биологическую индивидуальность живых организмов. Любые нарушения этого динамического статуса организма сопровождаются развитием патологии, тяжесть и продолжительность которой будет определяться степенью повреждения структуры и функций клеток.

Важнейшее значение печени в обмене веществ в первую очередь определяется тем, что она является как бы большой промежуточной станцией между порталным и общим кругом кровообращения. Более 70% крови в печень человека поступает через воротную вену, остальная часть крови попадает в печень через печеночную артерию. Кровь воротной вены омывает всасывающую поверхность кишечника, и в результате большая часть веществ, всасывающихся в кишечнике, проходит через печень (кроме липидов, транспорт которых в основном осуществляется через лимфатическую систему).

Таким образом, печень функционирует как первичный регулятор содержания в крови веществ, поступающих в организм с пищей. Доказательством справедливости данного положения является следующий общеизвестный факт: несмотря на то что всасывание питательных веществ из кишечника в кровь происходит прерывисто, непостоянно, в связи с чем в порталном круге кровообращения могут наблюдаться изменения концентрации ряда веществ (глюкоза, аминокислоты и др.), в общем же круге кровообращения изменения в концентрации указанных соединений незначительны. Все это подтверждает важную роль печени в поддержании постоянства внутренней среды организма. Печень выполняет также крайне важную экскреторную функцию, теснейшим образом связанную с ее детоксикационной функцией.

В целом же без преувеличения можно сказать, что в организме нет путей обмена веществ, которые прямо или косвенно не контролировались бы печенью, в связи с чем многие важнейшие функции печени уже обсуждены в соответствующих главах учебника. Поэтому в данной главе будет сделана попытка дать обобщающие представления о роли печени в обмене веществ целостного организма.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПЕЧЕНИ

У взрослого здорового человека масса печени составляет в среднем 1,5 кг. Некоторые исследователи считают, что эту величину следует рассматривать как нижнюю границу нормальной при диапазоне колебаний в пределах 20–60 г на 1 кг массы тела.

В табл. 15.1 представлены некоторые данные о химическом составе печени в норме.

Таблица 15.1. Химический состав печени млекопитающих

Составные части	Содержание, %	Составные части	Содержание, %
Вода	70–75	Фосфолипиды	1,5–3,0
Сухой остаток	25–30	Холестерин	0,3–0,5
Белок	12–24	Гликоген	2–8
Липиды	2–6	Железо	0,02
Триацилглицеролы	1,5–2,0		

Из таблицы видно, что более 70% от массы печени составляет вода. Однако следует помнить, что масса печени и ее состав подвержены значительным колебаниям как в норме, так и особенно при патологических состояниях. Например, при отеках количество воды может составлять до 80% от массы печени, а при избыточном отложении жира количество воды в печени может снизиться до 55%. Более половины сухого остатка печени приходится на долю белков, причем примерно 90% из них — на долю глобулинов. Печень также богата различными ферментами. Около 5% от массы печени составляют липиды: нейтральные жиры (триглицериды), фосфолипиды, холестерин и др. При выраженном ожирении содержание липидов может достигать 20% от массы органа, а при жировом перерождении печени количество липидов в этом органе может составлять 50% от сырой массы.

В печени может содержаться 150–200 г гликогена. Как правило, при тяжелых паренхиматозных поражениях печени количество гликогена в ней уменьшается. Напротив, при некоторых гликогенозах содержание гликогена может достигать 20% и более от массы печени.

Разнообразен и минеральный состав печени. Количество железа, меди, марганца, никеля и некоторых других элементов превышает их содержание в других органах и тканях. Ниже будет рассмотрена роль печени в разных видах обмена веществ.

РОЛЬ ПЕЧЕНИ В УГЛЕВОДНОМ ОБМЕНЕ

Основная роль печени в углеводном обмене заключается в обеспечении постоянства концентрации глюкозы в крови. Это достигается регуляцией соотношения между синтезом и распадом гликогена, депонируемого в печени.

Синтез гликогена в печени и его регуляция в основном аналогичны тем процессам, которые протекают в других органах и тканях, в частности в мышечной ткани. Синтез гликогена из глюкозы обеспечивает в норме временный резерв углеводов, необходимый для поддержания концентрации глюкозы в крови в тех случаях, когда ее содержание значительно уменьшается (например, у человека это происходит при недостаточном поступлении углеводов с пищей или в период ночного «голодания»).

Говоря об утилизации глюкозы печенью, необходимо подчеркнуть важную роль фермента глюкокиназы в этом процессе. Глюкокиназа, подобно гексокиназе, катализирует фосфорилирование глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата (см. главу 9). При этом активность глюкокиназы в печени почти в 10 раз превышает активность гексокиназы. Важное различие между этими двумя ферментами заключается в том, что глюкокиназа в противоположность гексокиназе имеет высокое значение K_m для глюкозы и не ингибируется глюкозо-6-фосфатом.

После приема пищи содержание глюкозы в воротной вене резко возрастает; в тех же пределах увеличивается и ее внутривенная концентрация¹. Повышение концентрации глюкозы в печени вызывает существенное увеличение активности глюкокиназы и автоматически увеличивает поглощение глюкозы печенью (образовавшийся глюкозо-6-фосфат либо затрачивается на синтез гликогена, либо расщепляется).

Считают, что основная роль печени — расщепление глюкозы — сводится прежде всего к запасанию метаболитов-предшественников, необходимых для биосинтеза жирных кислот и глицерина, и в меньшей степени к окислению ее до CO_2 и H_2O . Синтезируемые в печени триглицериды в норме выделяются в кровь в составе липопротеинов и транспортируются в жировую ткань для более «постоянного» хранения.

¹ При всасывании углеводов из кишечника содержание глюкозы в крови воротной вены может повышаться до 20 ммоль/л, а в периферической крови ее содержится не более 5 ммоль/л.

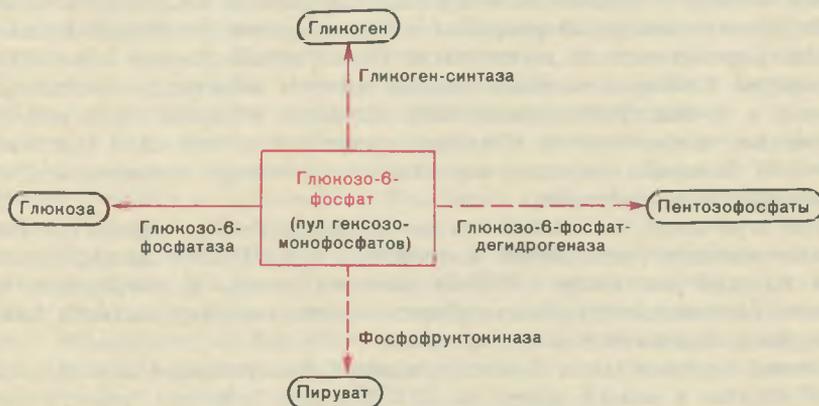
В реакциях пентозофосфатного пути в печени образуется НАДФН₂, используемый для восстановительных реакций в процессах синтеза жирных кислот, холестерина и других стероидов. Кроме того, при этом образуются пентозофосфаты, необходимые для синтеза нуклеиновых кислот.

Наряду с утилизацией глюкозы в печени, естественно, происходит и ее образование. Непосредственным источником глюкозы в печени служит гликоген. Распад гликогена в печени в основном происходит фосфоролитическим путем. В регуляции скорости гликогенолиза в печени большое значение имеет система циклических нуклеотидов. Кроме того, глюкоза в печени образуется также в процессе глюконеогенеза.

Основными субстратами глюконеогенеза служат лактат, глицерин и аминокислоты. Принято считать, что почти все аминокислоты, за исключением лейцина, могут пополнять пул предшественников глюконеогенеза.

При оценке углеводной функции печени необходимо иметь в виду, что соотношение между процессами утилизации и образования глюкозы регулируется прежде всего нейрогуморальным путем при участии желез внутренней секреции.

Центральную роль в превращениях углеводов и саморегуляции углеводного обмена в печени играет глюкозо-6-фосфат. Он резко тормозит фосфоролитическое расщепление гликогена, активирует ферментативный перенос глюкозы с уридиндифосфоглюкозы на молекулу синтезирующегося гликогена, является субстратом для дальнейших гликолитических превращений, а также окисления глюкозы, в том числе по пентозофосфатному пути. Наконец, расщепление глюкозо-6-фосфата фосфатазой обеспечивает поступление в кровь свободной глюкозы, доставляемой током крови во все органы и ткани:



Рассматривая промежуточный обмен углеводов в печени, необходимо также остановиться на превращениях фруктозы и галактозы. Поступающая в печень фруктоза может фосфорилироваться в положении 6 до фруктозо-6-фосфата под действием гексокиназы, обладающей относительной специфичностью и катализирующей фосфорилирование, кроме глюкозы и фруктозы, еще и маннозы. Однако в печени существует и другой путь: фруктоза способна фосфорилироваться при участии и более специфического фермента — фруктокиназы. В результате образуется фруктозо-1-фосфат. Эта реакция не блокируется глюкозой. Далее фруктозо-1-фосфат под действием альдолазы расщепляется на две триозы: диоксиацетонфосфат и глицеральдегид. Под влиянием соответствующей киназы (триокиназы) и при участии АТФ глицеральдегид подвергается фосфорилированию до глицеральдегид-3-фосфата. Образовавшийся глицеральдегид-3-фосфат (в последний легко переходит и диоксиацетонфосфат) подвергается обычным превращениям, в том числе с образованием в качестве промежуточного продукта пировиноградной кислоты.

Галактоза в печени сначала фосфорилируется при участии АТФ и фермента галактокиназы с образованием галактозо-1-фосфата. Галактокиназа печени плода и ребенка характеризуется K_m и V_{max} , примерно в 5 раз превосходящими таковые у ферментов взрослого человека. Большая часть галактозо-1-фосфата в печени превращается в ходе реакции, катализируемой гексозо-1-фосфат-уридилтрансферазой:



Эта уникальная трансферазная реакция возвращения галактозы в основное русло углеводного метаболизма. Наследственная утрата гексозо-1-фосфат-уридилтрансферазы приводит к галактоземии — заболеванию, для которого характерны умственная отсталость и катаракта хрусталика. В этом случае печень новорожденных теряет способность метаболизировать D-галактозу, входящую в состав лактозы молока.

РОЛЬ ПЕЧЕНИ В ЛИПИДНОМ ОБМЕНЕ

Ферментативные системы печени способны катализировать все или подавляющее большинство реакций метаболизма липидов. Совокупность этих реакций лежит в основе таких процессов, как синтез высших жирных кислот, триглицеридов, фосфолипидов, холестерина и его эфиров, а также липолиз триглицеридов, окисление жирных кислот, образование ацетоновых (кетонowych) тел и т. д.

Напомним, что ферментативные реакции синтеза триглицеридов в печени и жировой ткани сходны. А именно, КоА-производные жирной кислоты с длинной цепью взаимодействуют с глицерол-3-фосфатом с образованием фосфатидной кислоты, которая затем гидролизуется до диглицерида. Путем присоединения к последнему еще одной молекулы КоА-производного жирной кислоты образуется триглицерид. Синтезированные в печени триглицериды либо остаются в печени, либо секретируются в кровь в форме липопротеинов. Секреция происходит с известной задержкой (у человека 1—3 ч). Задержка секреции, вероятно, соответствует времени, необходимому для образования липопротеинов.

Как уже отмечалось, основным местом образования плазменных пре- β -липопротеинов (липопротеинов очень низкой плотности — ЛПОНП) и α -липопротеинов (липопротеинов высокой плотности — ЛПВП) является печень. К сожалению, пока нет точных данных о последовательности сборки липопротеиновых частиц в гепатоцитах, не говоря уже о механизмах этого процесса.

У человека основная масса β -липопротеинов (липопротеинов низкой плотности — ЛПНП) образуется в плазме крови из ЛПОНП при действии липопротеинлипазы. В ходе этого процесса образуются сначала промежуточные короткоживущие липопротеины (Пр.ЛП). Через стадию образования промежуточных липопротеинов формируются частицы, обедненные триглицеридами и обогащенные холестерином, т. е. образуются ЛПНП (рис. 15.1).

При высоком содержании жирных кислот в плазме их поглощение печенью возрастает, усиливается синтез триглицеридов, а также окисление жирных кислот, что может привести к повышенному образованию кетонowych тел.

Следует подчеркнуть, что кетонowych тела образуются в печени в ходе так называемого β -окси- β -метилглутарил-КоА пути. Как уже отмечалось, прежние представления о том, что кетонowych тела являются промежуточными продуктами окисления жирных кислот в печени, оказались ошибочными. Из печени кетонowych тела током крови доставляются в ткани и органы (мышцы, почки, мозг и др.), где они быстро окисляются при участии соответствующих ферментов. В самой же ткани печени кетонowych тела не окисляются, т. е. в этом плане по сравнению с другими тканями печень является исключением.

В печени происходит как интенсивный распад фосфолипидов, так и их синтез. Помимо глицерина и жирных кислот, которые входят в состав нейтральных жиров, для синтеза фосфолипидов необходимы неорганические фосфаты и азотистые основания, в частности холин для синтеза фосфатидилхолина. Неорганические фосфаты в печени имеются в достаточном количестве. Другое дело — холин. При недостаточном образовании или недостаточном поступлении его в печень синтез фосфолипидов из компонентов нейтрального жира становится либо невозможным, либо резко снижается, и нейтральный жир откладывается в печени. В этом случае говорят о жировой инфильтрации печени, которая может затем перейти в ее жировую дистрофию. Иными словами, синтез фосфолипидов лимитируется количеством азотистых оснований, т. е. для синтеза фосфоглицеридов необходимы либо холин, либо соединения, которые могут являться донорами метильных групп и участвовать в образовании холина (например, метионин). Последние соединения получили название липотропных веществ. Отсюда становится ясным, почему при жировой инфильтрации печени весьма полезен творог, содержащий белок казеин, в составе которого имеется большое количество остатков аминокислоты метионина.

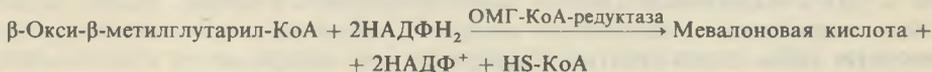


Рис. 15.1. Схематическое изображение образования липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) (по А. Н. Климову).

Пр. ЛП — промежуточные липопротеины; НЭЖК — неэтерифицированные жирные кислоты; СНО — углеводы.

Рассмотрим роль печени в обмене стероидов, в частности холестерина. Часть холестерина поступает в организм с пищей, но значительно большее количество его синтезируется в печени из ацетил-КоА. Биосинтез холестерина в печени подавляется экзогенным холестерином, т. е. получаемым с пищей.

Таким образом, биосинтез холестерина в печени регулируется по принципу отрицательной обратной связи. Чем больше холестерина поступает с пищей, тем меньше его синтезируется в печени, и наоборот. Принято считать, что действие экзогенного холестерина на биосинтез его в печени связано с торможением β-оксиг-метилглутарил-КоА-редуктазной реакции:



Часть синтезированного в печени холестерина выделяется из организма совместно с желчью, другая часть превращается в желчные кислоты и используется в других органах для синтеза стероидных гормонов и других соединений.

В печени холестерин может взаимодействовать с жирными кислотами (в виде ацил-КоА) с образованием эфиров холестерина. Синтезированные в печени эфиры холестерина поступают в кровь, в которой содержится также определенное количество свободного холестерина.

РОЛЬ ПЕЧЕНИ В БЕЛКОВОМ ОБМЕНЕ

Печень играет центральную роль в обмене белков. Она выполняет следующие основные функции: синтез специфических белков плазмы; образование мочевины и мочевой кислоты; синтез холина и креатина; трансаминирование и дезаминирование

аминокислот, что весьма важно для взаимных превращений аминокислот, а также для процесса глюконеогенеза и образования кетоновых тел. Все альбумины¹ плазмы, 75–90% α -глобулинов и 50% β -глобулинов синтезируются гепатоцитами. Лишь γ -глобулины продуцируются не гепатоцитами, а системой макрофагов, к которой относятся звездчатые ретикулоэндотелиоциты (клетки Купфера). В основном же γ -глобулины образуются вне печени. Печень является единственным органом, где синтезируются такие важные для организма белки, как протромбин, фибриноген, проконвертин и проакцелерин.

В связи с изложенным, при заболеваниях печени определение фракционного состава белков плазмы (или сыворотки) крови нередко представляет интерес как в диагностическом, так и в прогностическом плане. Известно, что патологический процесс в гепатоцитах резко снижает их синтетические возможности; в результате содержание альбумина в плазме крови резко падает, что может привести к снижению онкотического давления плазмы крови, развитию отеков, а затем асцита. Отмечено, что при циррозах печени, протекающих с явлениями асцита, содержание альбуминов в сыворотке крови на 20% ниже, чем при циррозах без асцита.

Нарушение синтеза ряда белковых факторов системы свертывания крови при тяжелых заболеваниях печени может приводить к геморрагическим явлениям.

При поражениях печени нарушается также процесс дезаминирования аминокислот, что приводит к увеличению их концентрации в крови и моче. Так, если в норме содержание азота аминокислот в сыворотке крови составляет примерно 2,9–4,3 ммоль/л, то при тяжелых заболеваниях печени (атрофические процессы) эта величина увеличивается до 21 ммоль/л, что приводит к аминоацидурии. Например, при острой атрофии печени содержание тирозина в суточном количестве мочи может достигать 2 г (при норме 0,02–0,05 г/сут).

В организме образование мочевины в основном происходит в печени. Синтез мочевины связан с затратой довольно значительного количества энергии (на образование 1 молекулы мочевины расходуются 3 молекулы АТФ). При заболеваниях печени, когда количество АТФ в гепатоцитах уменьшено, синтез мочевины нарушается. Показательно в этих случаях определение в сыворотке отношения азота мочевины к аминоказоту. В норме это отношение равно 2:1, а при тяжелом поражении печени оно становится равным 1:1.

Большая часть мочевой кислоты у человека также образуется в печени, где много фермента ксантинооксидазы, при участии которого оксипурины (гипоксантин и ксантин) превращаются в мочевую кислоту. Нельзя забыть о роли печени и в синтезе креатина. Имеются два источника, обуславливающих нахождение креатина в организме. Существует экзогенный креатин, т. е. креатин пищевых продуктов (мясо, печень и др.) и эндогенный креатин, синтезирующийся в тканях. Синтез креатина в основном происходит в печени (см. главу 11), откуда он с током крови поступает в мышечную ткань. Здесь креатин, фосфорилируясь, превращается в креатинфосфат, а уже из последнего образуется креатинин.

Детоксикация различных веществ в печени

Чужеродные вещества (ксенобиотики) в печени нередко превращаются в менее токсичные, а подчас индифферентные вещества. По-видимому, только в этом смысле можно говорить об «обезвреживании» их в печени. Происходит это путем окисления, восстановления, метилирования, ацетилирования и конъюгации с теми или иными веществами. Необходимо отметить, что в печени окисление, восстановление и гидролиз чужеродных соединений осуществляют в основном микросомальные ферменты.

¹ Печень здорового человека может ежедневно синтезировать 13–18 г альбуминов.

Наряду с микросомальным (см. главу 8) в печени существует также пероксисомальное окисление. Пероксисомы — микротельца, обнаруженные в гепатоцитах; их можно рассматривать как специализированные окислительные органеллы. Эти микротельца содержат оксидазу мочевой кислоты, лактатоксидазу, оксидазу D-аминокислот, а также каталазу. Последняя катализирует расщепление перекиси водорода, образующейся при действии указанных оксидаз — отсюда и название этих микротельца — пероксисомы. Пероксисомальное окисление, так же как и микросомальное, не сопровождается образованием макроэргических связей.

В печени широко представлены также «защитные» синтезы, например синтез мочевины, в результате которого обезвреживается весьма токсичный аммиак. В результате гнилостных процессов, протекающих в кишечнике, из тирозина образуются фенол и крезол, а из триптофана — скатол и индол. Эти вещества всасываются и с током крови поступают в печень, где обезвреживаются путем образования парных соединений с серной или глюкуроновой кислотой (см. главу 11).

Обезвреживание фенола, крезола, скатола и индола в печени происходит в результате взаимодействия этих соединений не со свободными серной и глюкуроновой кислотами, а с их так называемыми активными формами: ФАФС и УДФГК¹.

Глюкуроновая кислота участвует не только в обезвреживании продуктов гниения белковых веществ, образовавшихся в кишечнике, но и в связывании ряда других токсичных соединений, образующихся в процессе обмена в тканях. В частности, свободный, или не прямой, билирубин, обладающий значительной токсичностью, в печени взаимодействует с глюкуроновой кислотой, образуя моно- и диглюкурониды билирубина. Нормальным метаболитом является и гиппуровая кислота, образующаяся в печени из бензойной кислоты и глицина.

Учитывая, что синтез гиппуровой кислоты у человека протекает преимущественно в печени, в клинической практике довольно часто для выяснения антитоксической функции печени применяют пробу Квика — Пытеля (при нормальной функциональной способности почек). Проба заключается в нагрузке бензоатом натрия с последующим определением в моче образовавшейся гиппуровой кислоты. При паренхиматозных поражениях печени синтез гиппуровой кислоты снижен.

В печени широко представлены процессы метилирования. Так, перед выделением с мочой амид никотиновой кислоты (витамин РР) метилируется в печени; в результате образуется N-метилникотинамид. Наряду с метилированием интенсивно протекают и процессы ацетилирования². В частности, в печени ацетилированию подвергаются различные сульфаниламидные препараты.

Примером обезвреживания токсичных продуктов в печени путем восстановления является превращение нитробензола в парааминофенол. Многие ароматические углеводороды обезвреживаются путем окисления с образованием соответствующих карбоновых кислот.

Печень также принимает активное участие в инактивации различных гормонов. В результате попадания гормонов с током крови в печень активность их в большинстве случаев резко снижается или полностью утрачивается. Так, стероидные гормоны, подвергаясь микросомальному окислению, инактивируются, превращаясь затем в соответствующие глюкурониды и сульфаты. Под влиянием аминоксидаз в печени происходит окисление катехоламинов и т. д.

Из приведенных примеров видно, что печень способна инактивировать ряд сильнодействующих физиологических и чужеродных (в том числе токсичных) веществ.

¹ Индол и скатол, прежде чем вступить во взаимодействие с ФАФС или УДФГК, окисляются в соединения, содержащие гидроксильную группу (индоксил и скатоксил). Поэтому парными соединениями будут скатоксилсерная кислота или соответственно скатоксилглюкуроновая кислота.

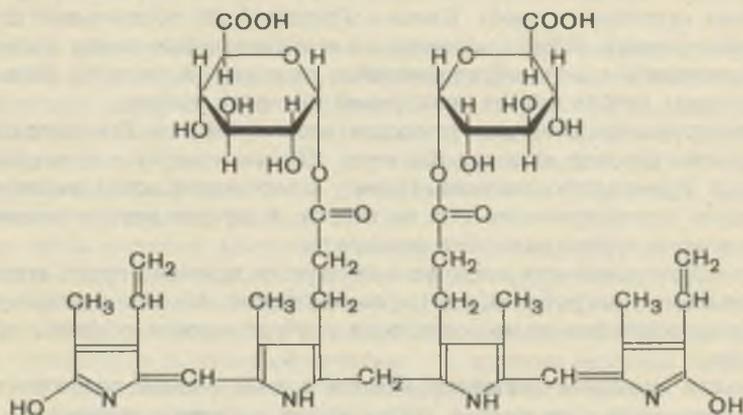
² В печени содержание кофермента ацетилирования (HS-KoA) в 20 раз превышает его концентрацию в мышечной ткани.

Роль печени в пигментном обмене

Рассмотрим лишь гемохромогенные пигменты, которые образуются в организме при распаде гемоглобина (в значительно меньшей степени при распаде миоглобина, цитохромов и др.). Распад гемоглобина протекает в клетках макрофагов; в частности в звездчатых ретикулоэндотелиоцитах, а также в гистиоцитах соединительной ткани любого органа.

Как уже отмечалось (см. главу 12), начальным этапом распада гемоглобина является разрыв одного метинового мостика с образованием вердоглобина. В дальнейшем от молекулы вердоглобина отщепляются атом железа и белок глобин. В результате образуется биливердин, который представляет собой цепочку из четырех пиррольных колец, связанных метиновыми мостиками. Затем биливердин, восстанавливаясь, превращается в билирубин — пигмент, выделяемый с желчью и поэтому называемый желчным пигментом. Образовавшийся билирубин называется непрямым (неконъюгированным) билирубином. Он нерастворим в воде, дает непрямую реакцию с диазореактивом, т. е. реакция получается только после предварительной обработки спиртом.

В печени билирубин соединяется (конъюгирует) с глюкуроновой кислотой. Эта реакция катализируется ферментом УДФ-глюкуронилтрансферазой. При этом глюкуроновая кислота вступает в реакцию в активной форме, т. е. в виде УДФГК. Образующийся глюкуронид билирубина получил название прямого билирубина (конъюгированного билирубина). Он растворим в воде и дает прямую реакцию с диазореактивом. Большая часть билирубина соединяется с двумя молекулами глюкуроновой кислоты, образуя диглюкуронид билирубина:



Диглюкуронид билирубина

Образовавшийся в печени прямой билирубин вместе с очень небольшой частью непрямого билирубина выводится с желчью в тонкий кишечник. Здесь от прямого билирубина отщепляется глюкуроновая кислота и происходит его восстановление с последовательным образованием мезобилирубина и мезобилиногена (уробилиногена). Принято считать, что около 10% билирубина восстанавливается до мезобилиногена на пути в тонкий кишечник, т. е. во внепеченочных желчных путях и желчном пузыре. Из тонкого кишечника часть образовавшегося мезобилиногена (уробилиногена) резорбируется через кишечную стенку, попадает в *v. portae* и током крови переносится в печень, где расщепляется полностью до ди- и трипирролов. Таким образом, в норме в общий круг кровообращения и мочу мезобилиноген не попадает.

Основное количество мезобилиногена из тонкого кишечника поступает в толстый кишечник, где восстанавливается до стеркобилиногена при участии анаэробной

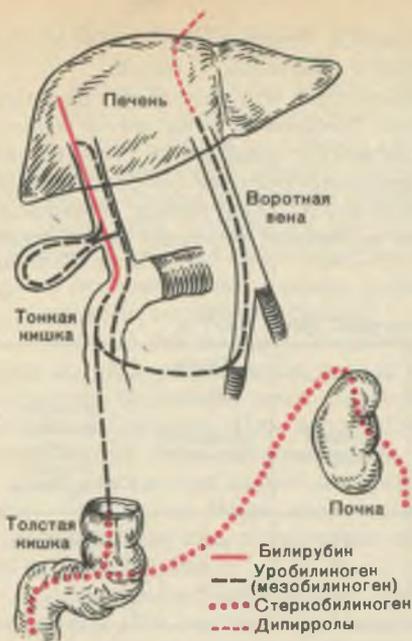


Рис. 15.2. Нормальный обмен уробилиногеновых тел (схема).

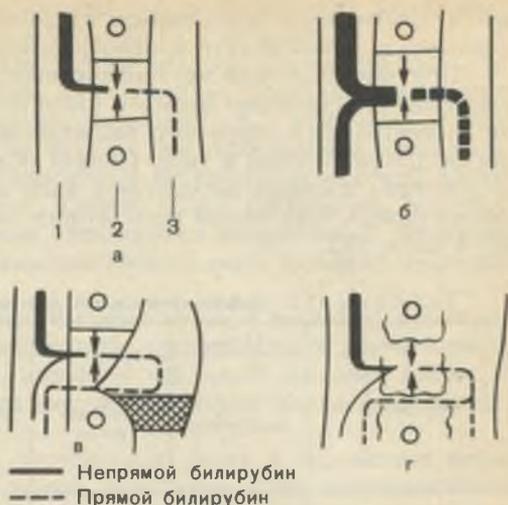


Рис. 15.3. Патогенез билирубинемий при различных состояниях (схема).

а — норма; б — гемолиз; в — застой в желчных капиллярах; г — поражение паренхиматозных клеток печени; 1 — кровеносные капилляры; 2 — клетки печени; 3 — желчные капилляры.

микрофлоры. Образовавшийся стеркобилиноген в нижних отделах толстого кишечника (в основном в прямой кишке) окисляется до стеркобилина и выделяется с калом. Лишь небольшая часть стеркобилиногена всасывается в нижних участках толстого кишечника в систему нижней полой вены (попадает сначала в vv. haemorrhoidalis) и в дальнейшем выводится с мочой почками. Следовательно, в норме моча человека содержит следы стеркобилиногена (за сутки его выделяется с мочой до 4 мг). К сожалению, до последнего времени в клинической практике стеркобилиноген, содержащийся в нормальной моче, продолжают называть уробилиногеном. Это неверно. На рис. 15.2 схематично показаны пути образования уробилиногеновых тел в организме человека.

Определение в клинике содержания общего билирубина и его фракций, а также уробилиногеновых тел имеет важное значение при дифференциальной диагностике желтух различной этиологии. При гемолитической желтухе гипербилирубинемия возникает в основном в результате образования непрямого билирубина. Вследствие усиленного гемолиза происходит его интенсивное образование в клетках системы макрофагов из разрушающегося гемоглобина. Печень оказывается неспособной образовать столь большое количество билирубин-глюкуронидов, что приводит к накоплению непрямого билирубина в крови и тканях (рис. 15.3). Известно, что непрямой билирубин не проходит через почечный порог, поэтому билирубин в моче при гемолитической желтухе, как правило, не определяется.

При печеночной желтухе наступает деструкция печеночных клеток, нарушается экскреция прямого билирубина в желчные капилляры и он попадает непосредственно в кровь, содержание его значительно увеличивается. Кроме того, снижается способность печеночных клеток синтезировать билирубин-глюкурониды; вследствие этого количество непрямого билирубина в сыворотке крови также увеличивается. Поражение гепатоцитов сопровождается нарушением их способности разрушать до

ди- и трипирролов всосавшийся из тонкого кишечника мезобилиноген. Последний попадает в большой круг кровообращения и выделяется почками с мочой.

При обтурационной желтухе нарушается желчевыделение, что приводит к резкому увеличению содержания прямого билирубина в крови. Несколько повышается в крови концентрация и непрямого билирубина. Резко снижается содержание стеркобилиногена (стеркобилина) в кале. Полная обтурация желчного протока сопровождается отсутствием желчных пигментов в кале (ахолический стул). Характерные изменения лабораторных показателей пигментного обмена при различных желтухах представлены в табл. 15.2.

Таблица 15.2. Дифференциальная диагностика различных типов желтух

Желтуха	Моча	Кал		Кровь		
	билирубин	уробилиноген	стеркобилиноген	прямой билирубин	непрямой билирубин	отношение прямого билирубина к общему билирубину
Гемолитическая	0	↓ или N	↑	N	↑	0,2
Печеночная	+	↑	N или ↓	↑	↑	0,2–0,7
Обтурационная	+	↓ или N	↓↓	↑	↑	0,5

N – норма; ↑ – повышено; ↓ – снижено; + – определяется; 0 – не определяется.

ЖЕЛЧЬ

Желчь – жидкий секрет желтовато-коричневого цвета, отделяемый печеночными клетками. В сутки у человека образуется 500–700 мл желчи (10 мл на 1 кг массы тела). Желчеобразование происходит непрерывно, хотя интенсивность этого процесса на протяжении суток резко колеблется. Вне пищеварения печеночная желчь переходит в желчный пузырь, где происходит ее сгущение в результате всасывания воды и электролитов. Относительная плотность печеночной желчи 1,01, а пузырной – 1,04. Концентрация основных компонентов в пузырной желчи в 5–10 раз выше, чем в печеночной (табл. 15.3).

Таблица 15.3. Содержание основных компонентов желчи человека

Компоненты	Печеночная желчь	Пузырная желчь	Компоненты	Печеночная желчь	Пузырная желчь
Вода, %	97,4	86,65	Ионы, ммоль/л: катионы: Na ⁺ K ⁺ Ca ²⁺ анионы: Cl ⁻ ClO ₃ ⁻	145 5 2,5 100 28	130 9 6 75 10
Плотные вещества, %	2,6	13,35			
желчнокислые соли	1,03	9,14			
пигменты и муцин	0,53	2,98			
холестерин	0,06	0,26			
жирные кислоты и липиды	0,14	0,32			
неорганические соли	0,84	0,65			

Предполагают, что образование желчи начинается с активной секреции гепатоцитами воды, желчных кислот и билирубина, в результате которой в желчных канальцах появляется так называемая первичная желчь. Последняя, проходя по желчным ходам, вступает в контакт с плазмой крови, в результате чего между желчью

и плазмой устанавливается равновесие электролитов, т. е. в образовании желчи принимают участие в основном два механизма — фильтрация и секреция.

В печеночной желчи можно выделить две группы веществ. Первая группа — это те вещества, которые присутствуют в желчи в количествах, мало отличающихся от их концентрации в плазме крови (например, ионы Na^+ , K^+ , креатинин и др.), что в какой-то мере служит доказательством наличия фильтрационного механизма. Ко второй группе относятся соединения, концентрация которых в печеночной желчи во много раз превышает их содержание в плазме крови (билирубин, желчные кислоты и др.), что свидетельствует о наличии секреторного механизма. В последнее время появляется все больше данных о преимущественной роли активной секреции в механизме желчеобразования.

Как уже указывалось, холестерин, подобно высшим жирным кислотам, представляет собой нерастворимое в воде соединение, которое удерживается в желчи в растворенном состоянии лишь благодаря присутствию в ней солей желчных кислот и фосфатидилхолина. При недостатке желчных кислот холестерин выпадает в осадок, способствуя образованию камней.

Обычно камни имеют внутреннее ядро, состоящее из белка и окрашенное желчным пигментом. Чаще всего встречаются камни, у которых ядро окружено чередующимися слоями холестерина и билирубината кальция. Такие камни содержат до 80 % холестерина.

Интенсивное образование камней имеет место при застое желчи и наличии инфекции. При застое желчи встречаются камни, содержащие 90—95 % холестерина. В случае инфекции могут образовываться камни, состоящие из билирубината кальция. Принято считать, что присутствие бактерий сопровождается увеличением β -глобуриноидной активности желчи, что приводит к расщеплению конъюгатов билирубина, и освобождающийся билирубин служит субстратом для образования камней.

В желчи обнаружен целый ряд ферментов, из которых особо следует отметить щелочную фосфатазу печеночного происхождения. При нарушении оттока желчи активность данного фермента в сыворотке крови возрастает. Заметим, что в сыворотке крови имеется также щелочная фосфатаза костного происхождения, т. е. синтезируемая остеобластами. Это другая изоформа щелочной фосфатазы, активность которой увеличивается в сыворотке крови при поражении костей.

Кровь — жидкая ткань, осуществляющая в организме транспорт химических веществ (в том числе кислорода), благодаря чему происходит интеграция биохимических процессов, протекающих в различных клетках и межклеточных пространствах, в единую систему. Кроме того, кровь выполняет защитную, регуляторную, терморегуляторную и другие функции.

Кровь состоит из плазмы и взвешенных в ней форменных элементов. К последним относятся эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. Объем крови в норме составляет в среднем у мужчин 5200 мл, у женщин — 3900 мл.

На долю плазмы приходится около 55% от объема крови. Эритроциты составляют основную массу форменных элементов — 44% от общего объема крови, в то время как на долю других клеток приходится лишь около 1%.

В норме относительная плотность цельной крови 1,050—1,064, плазмы — 1,024—1,030, клеток — 1,080—1,097. Кровь обладает значительной вязкостью благодаря высокому содержанию белка и эритроцитов. Вязкость крови в 4—5 раз выше вязкости воды.

Важный физико-химический показатель крови — осмотическое давление плазмы крови. Оно определяется осмотической концентрацией, т. е. суммой всех частиц, находящихся в единице объема. При температуре тела 37 °С осмотическое давление плазмы крови ~ 7,6 атм. В основном эта величина обусловлена содержащимися в крови хлоридом натрия и другими низкомолекулярными веществами; ~ 0,03 атм приходится на долю белков, главным образом альбуминов, и называется коллоидно-осмотическим, или онкотическим, давлением.

Тесная взаимосвязь крови со всеми тканями организма позволяет обнаруживать (путем исследования крови больного) патологические изменения в организме, следить за развитием патологического процесса и судить об эффективности терапевтических мероприятий.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КРОВИ

Химический состав крови в норме относительно постоянен. Это объясняется наличием в организме мощных регулирующих механизмов (ЦНС, гормональные системы и др.), обеспечивающих четкую взаимосвязь в работе таких важных для жизнедеятельности органов и тканей, как печень, почки, легкие и сердечно-сосудистая система.

Все случайные колебания в составе крови в здоровом организме быстро выравниваются. Напротив, при многих патологических процессах отмечаются более или менее резкие сдвиги в химическом составе крови.

Важнейшие органические компоненты цельной крови и плазмы человека приведены в табл. 16.1.

Таблица 16.1. Органические составные компоненты цельной крови и плазмы человека

Составные части (компоненты)	Цельная кровь	Плазма
Вода, %	75–85	90–91
Сухой остаток, %	15–25	9–10
Гемоглобин, г/л	130–160	—
Общий белок, г/л	—	65–85
Фибриноген, г/л	—	2–4
Глобулины, г/л	—	20–30
Альбумины, г/л	—	40–50
Азот небелковых соединений, ммоль/л	15,0–25,0	14,3–21,4
Мочевина, ммоль/л	3,3–6,6	3,3–6,6
Мочевая кислота, ммоль/л	0,18–0,24	0,24–0,29
Креатинин, ммоль/л	0,06–0,16	0,06–0,16
Креатин, ммоль/л	0,23–0,38	0,08–0,11
Азот аминокислот, ммоль/л	4,3–5,7	2,9–4,3
Индикан, мкмоль/л	—	1–4
Глюкоза, ммоль/л	3,3–5,0	3,6–5,5
Глюкозамин, ммоль/л	—	3,9–5,0
Пентозы, ммоль/л	—	0,13–0,26
Общие липиды, г/л	1,0–7,2	3,8–6,7
Триацилглицерины, ммоль/л	1,0–2,6	1,2–2,8
Холестерин, ммоль/л	3,9–5,2	3,9–6,5
Фосфолипиды, г/л	—	2,2–4,0
Фосфатидилхолин, ммоль/л	3,0	1,5–3,0
Кетоновые тела, ммоль/л в пересчете на ацетон	—	0,2–0,6
Ацетоуксусная кислота, ммоль/л	—	0,05–0,19
Молочная кислота, ммоль/л	—	1,1–1,2
Пировиноградная кислота, ммоль/л	—	0,07–0,14
Лимонная кислота, ммоль/л	—	0,10–0,15
α -Кетоглутаровая кислота, ммоль/л	—	0,02–0,07
Янтарная кислота, ммоль/л	—	0,01–0,04
Билирубин общий, мкмоль/л	—	4–26

Из таблицы видно, что в крови содержится множество различных органических компонентов. Большую часть сухого остатка крови составляют белки.

Белки плазмы крови

Из 9–10% сухого остатка плазмы крови на долю белков приходится 6,5–8,5%. Используя метод высаливания нейтральными солями, белки плазмы крови можно разделить на три группы: альбумин, глобулины, фибриноген. Нормальное содержание альбуминов в плазме крови составляет 40–50 г/л, глобулинов – 20–30 г/л, фибриногена – 2–4 г/л. Плазма крови, лишенная фибриногена, называется сывороткой.

Синтез белков плазмы крови осуществляется преимущественно в клетках печени и ретикулоэндотелиальной системы. Физиологическая роль белков плазмы крови многогранна.

1. Белки поддерживают коллоидно-осмотическое (онкотическое) давление и тем самым постоянный объем крови. Содержание белков в плазме значительно выше, чем в тканевой жидкости. Белки, являясь коллоидами, связывают воду и задерживают ее, не позволяя выходить из кровяного русла. Несмотря на то что онкотическое давление составляет лишь небольшую часть (около 0,5%) общего осмотического давления, именно оно обуславливает преобладание осмотического давления крови над осмотическим давлением тканевой жидкости. Известно, что в артериальной части капилляров в результате гидростатического давления безбелковая жидкость крови проникает в тканевое пространство. Это происходит до определенной мо-



Рис. 16.1. Иммуноэлектрофоретическая диаграмма белков сыворотки крови человека (по Генри).

мента — «поворотного», когда падающее гидростатическое давление становится равным коллоидно-осмотическому. После «поворотного» момента в венозной части капилляров происходит обратный поток жидкости из ткани, так как гидростатическое давление стало меньше, чем коллоидно-осмотическое. При иных условиях в результате гидростатического давления в кровеносной системе вода просачивалась бы в ткани, что вызвало бы отек различных органов и подкожной жировой клетчатки.

2. Белки плазмы принимают активное участие в свертывании крови. Ряд белков плазмы, в том числе фибриноген, являются основными компонентами системы свертывания крови.

3. Белки плазмы в известной мере определяют вязкость крови, которая, как уже отмечалось, в 4–5 раз выше вязкости воды и играет важную роль в поддержании гемодинамических отношений в кровеносной системе.

4. Белки плазмы принимают участие в поддержании постоянного рН крови, так как составляют одну из важнейших буферных систем крови.

5. Важна также транспортная функция белков плазмы крови: соединяясь с рядом веществ (холестерин, билирубин и др.), а также с лекарственными средствами (пенициллин, салицилаты и др.), они переносят их в ткани.

6. Белки плазмы крови играют важную роль в процессах иммунитета (особенно это касается иммуноглобулинов).

7. В результате образования с белками плазмы недифференцируемых комплексов поддерживается уровень катионов в крови. Например, 40–50% кальция сыворотки связано с белками, значительная часть железа, магния, меди и других элементов также связана с белками сыворотки.

8. Наконец, белки плазмы крови могут служить резервом аминокислот.

Современные физико-химические методы исследования позволили открыть и описать около 100 различных белковых компонентов плазмы крови. При этом особое значение приобрело электрофоретическое разделение белков плазмы (сыворотки) крови.

В сыворотке крови здорового человека при электрофорезе на бумаге можно обнаружить 5 фракций: альбумины, α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулины. Методом электрофореза в агаровом геле в сыворотке крови выявляется до 7–8 фракций, а при электрофорезе в крахмальном или полиакриламидном геле — до 16–17 фракций.

Следует помнить, что терминология названий белковых фракций, получаемых при различных видах электрофореза, еще окончательно не установилась. При изменении условий электрофореза, а также при электрофорезе в различных средах (например, в крахмальном или полиакриламидном геле) скорость миграции и, следовательно, порядок белковых зон могут изменяться.

Еще большее число белковых фракций (свыше 30) можно получить, применяя метод иммуноэлектрофореза. Иммуноэлектрофорез представляет собой своеобразную комбинацию электрофоретического и иммунологического методов анализа белков. Иными словами, термин «иммуноэлектрофорез» подразумевает проведение электрофореза и реакции преципитации в одной среде, т. е. непосредственно на гелевом блоке. При данном методе с помощью серологической реакции преципитации достигается значительное повышение аналитической чувствительности электрофоретического метода. На рис. 16.1 представлена тишичная иммуноэлектрофореграмма белков сыворотки крови человека.

Характеристика основных белковых фракций

Альбумины. На долю альбуминов приходится более половины (55–60%) белков плазмы крови человека. Молекулярная масса альбуминов около 70 000 Да. Сывороточные альбумины сравнительно быстро обновляются (период полураспада альбуминов человека равен 7 дням).

Благодаря высокой гидрофильности, особенно в связи с относительно небольшим размером молекул и значительной концентрацией в сыворотке, альбумины играют важную роль в поддержании онкотического давления крови. Известно, что концентрация альбуминов в сыворотке ниже 30 г/л вызывает значительные изменения онкотического давления крови, что приводит к возникновению отеков. Альбумины выполняют важную функцию транспорта многих биологически активных веществ (в частности, гормонов). Они способны связываться с холестерином, желчными пигментами. Значительная часть кальция в сыворотке также связана с альбуминами.

При электрофорезе в крахмальном геле фракция альбуминов у некоторых людей иногда делится на две (альбумин А и альбумин В), т. е. у таких людей имеется два независимых генетических локуса, контролирующих синтез альбуминов. Добавочная фракция (альбумин В) отличается от обычного сывороточного альбумина тем, что молекулы этого белка содержат два остатка дикарбоновых аминокислот или более, замещающих в полипептидной цепи обычного альбумина остатки тирозина или цистеина. Существуют и другие редкие варианты альбумина (альбумин Ридинг, альбумин Джент, альбумин Маки). Наследование полиморфизма альбуминов происходит по аутосомному кодоминантному типу и наблюдается в нескольких поколениях.

Помимо наследственного полиморфизма альбуминов, встречается переходящая бисальбуминемия, которая в некоторых случаях может быть принята за врожденную. Описано появление быстрого компонента альбумина у больных, получавших большие дозы пенициллина. После отмены пенициллина этот быстрый компонент альбумина вскоре исчезал из крови. Существует предположение, что повышение электрофоретической подвижности фракции альбумин–антибиотик связано с увеличением отрицательного заряда комплекса за счет СООН-групп пенициллина.

Глобулины. Сывороточные глобулины при высаливании нейтральными солями можно разделить на две фракции – эуглобулины и псевдоглобулины. Фракция эуглобулинов в основном состоит из γ -глобулинов, а фракция псевдоглобулинов включает α -, β - и γ -глобулины, которые при электрофорезе, особенно в крахмальном или полиакриламидном геле, способны разделяться на ряд подфракций. α - и β -глобулиновые фракции содержат липопротеины, а также белки, связанные с металлами. Большая часть антител, содержащихся в сыворотке, находится во фракции γ -глобу-

линов. Уменьшение содержания белков этой фракции резко снижает защитные силы организма.

В клинической практике встречаются состояния, характеризующиеся изменением как общего количества белков плазмы крови, так и процентного соотношения отдельных белковых фракций.

Гиперпротеинемия — увеличение общего содержания белков плазмы. Диарея у детей, рвота при непроходимости верхнего отрезка тонкой кишки, обширные ожоги могут способствовать повышению концентрации белков в плазме крови. Иными словами, потеря воды организмом, а следовательно и плазмой, приводит к повышению концентрации белка в крови (относительная гиперпротеинемия).

Однако при ряде патологических состояний может наблюдаться и абсолютная гиперпротеинемия, обусловленная увеличением уровня γ -глобулинов, например гиперпротеинемия в результате инфекционного или токсического раздражения системы макрофагов. Сюда же можно отнести гиперпротеинемии при миеломной болезни. В сыворотке крови больных миеломной болезнью появляются специфические «миеломные» белки. Появление в плазме крови белков, не существующих в нормальных условиях, принято называть парапротеинемией. Нередко при этом заболевании содержание белков в плазме достигает 100–160 г/л.

Иногда при миеломной болезни аномальные белки плазмы преодолевают почечный барьер и появляются в моче. Эти белки в моче, представляющие собой легкие цепи иммуноглобулинов, получили название «белок Бенс-Джонса». Явления парапротеинемии можно наблюдать и при макроглобулинемии Вальденстрема. Суть этого синдрома заключается в том, что в плазме крови появляется белок в довольно большой концентрации, с большой молекулярной массой (1 000 000–1 600 000 Да). При болезни Вальденстрема содержание макроглобулинов в плазме крови может достигать 80% от общего количества белка, составляющего в этом случае 150–160 г/л.

Гипопротеинемия, или уменьшение общего количества белка в плазме крови, происходит главным образом за счет уменьшения количества альбуминов. Выраженная гипопротеинемия — постоянный и патогенетически важный симптом нефротического синдрома. Содержание общего белка снижается до 30–40 г/л. Гипопротеинемия наблюдается также при поражении печеночных клеток (острая атрофия печени, токсический гепатит и др.). Кроме того, гипопротеинемия может возникнуть при резко увеличенной проницаемости стенок капилляров, при белковой недостаточности (поражение желудочно-кишечного тракта, карцинома и др.). Следовательно, можно считать, что гиперпротеинемия, как правило, связана с гиперглобулинемией, а гипопротеинемия — с гипоальбуминемией.

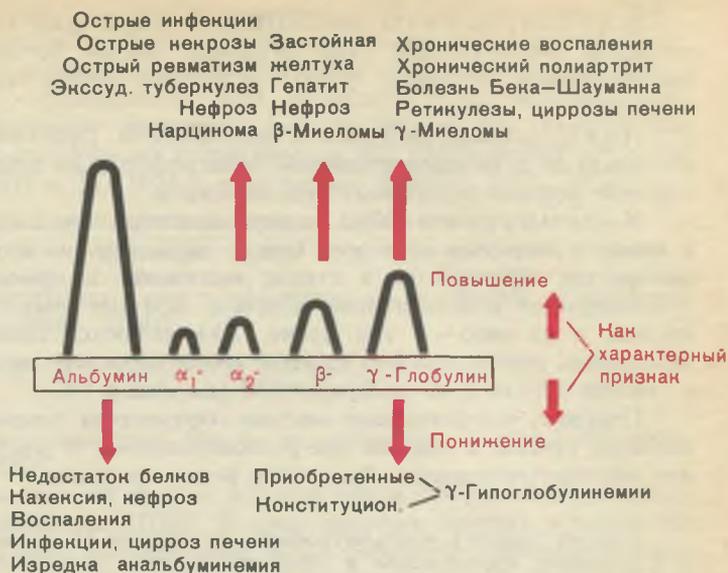
При многих заболеваниях очень часто изменяется процентное соотношение отдельных белковых фракций, хотя общее содержание белка в сыворотке крови остается в пределах нормы. Такое состояние носит название **диспротеинемии**. На рис. 16.2 схематично представлен характер изменения белковых фракций сыворотки крови при ряде заболеваний. При составлении данной схемы не учитывались форма и стадии заболевания.

Для многих болезней, связанных с общим воспалением (инфекционные заболевания, ревматизм и т. д.), отмечается несколько стадий, что, несомненно, сказывается и на белковом спектре крови.

Как отмечалось, α - и β -глобулиновые фракции белков сыворотки крови содержат липопротеины и гликопротеины. В состав углеводной части гликопротеинов крови входят в основном следующие моносахариды и их производные: галактоза, манноза, рамноза, глюкозамин, галактозамин, нейраминная кислота и ее производные (сиаловые кислоты). Соотношение этих углеводных компонентов в отдельных гликопротеинах сыворотки крови различно.

Чаще всего в осуществлении связи между белковой и углеводной частями молекулы гликопротеинов принимают участие аспарагиновая кислота (ее карбоксил)

Рис. 16.2. Изменения электрофореграммы белков сыворотки крови при некоторых заболеваниях (по Эммриху).



и глюкозамин. Несколько реже встречается связь между гидроксилом треонина или серина и гексозаминами или гексозами.

Нейраминовая кислота и ее производные (сиаловые кислоты) — наиболее лабильные и активные компоненты гликопротеинов. Они занимают конечное положение в углеводной цепочке молекулы гликопротеинов и во многом определяют свойства данного гликопротеина.

Гликопротеины имеются почти во всех белковых фракциях сыворотки крови. При электрофорезе на бумаге гликопротеины в большом количестве выявляются в α₁- и α₂-фракциях глобулинов. Гликопротеины, связанные с α-глобулиновыми фракциями, содержат небольшое количество фукозы; в то же время гликопротеины, выявляемые в составе β- и особенно γ-глобулиновых фракций, содержат фукозу в значительном количестве.

Повышенное содержание гликопротеинов в плазме или сыворотке крови наблюдается при туберкулезе, плевритах, пневмониях, остром ревматизме, гломерулонефритах, нефротическом синдроме, диабете, инфаркте миокарда, подагре, а также при остром и хроническом лейкозах, миеломе, лимфосаркоме и некоторых других заболеваниях. У больного ревматизмом увеличение содержания гликопротеинов в сыворотке соответствует тяжести заболевания. Это объясняется, по мнению ряда исследователей, деполимеризацией при ревматизме основного вещества соединительной ткани, что приводит к поступлению гликопротеинов в кровь.

Плазменные липопротеины — это сложные комплексные соединения, имеющие характерное строение: внутри липопротеиновой частицы находится жировая капля (ядро), содержащая неполярные липиды (триглицериды, этерифицированный холестерин). Жировая капля окружена оболочкой, в состав которой входят фосфолипиды, белок и свободный холестерин. Основная функция плазменных липопротеинов — транспорт липидов в организме. В плазме крови человека обнаружено несколько классов липопротеинов (см. рис. 10.3).

α-Липопротеины, или ЛПВП, при электрофорезе на бумаге мигрируют совместно с α-глобулинами. ЛПВП богаты белком и фосфолипидами, постоянно находятся в плазме крови здоровых людей в концентрации 1,25–4,25 г/л у мужчин и 2,5–6,5 г/л у женщин.

β -Липопротеины, или ЛПНП, соответствуют по электрофоретической подвижности β -глобулинам. Они являются самым богатым холестерином классом липопротеинов. Уровень ЛПНП в плазме крови здоровых людей составляет 3,0–4,5 г/л.

Пре- β -липопротеины, или ЛПОНП, расположены на липопротеинограмме между α - и β -липопротеинами (электрофорез на бумаге), служат главной транспортной формой эндогенных триглицеридов.

Хиломикроны (ХМ) не перемещаются при электрофорезе ни к катоду, ни к аноду и остаются на старте (место нанесения исследуемого образца плазмы или сыворотки). Образуются в стенке кишечника в процессе всасывания экзогенных триглицеридов и холестерина. Сначала ХМ поступают в грудной лимфатический проток, а из него — в ток крови. ХМ являются главной транспортной формой экзогенных триглицеридов. Плазма крови здоровых людей, не принимавших пищи в течение 12–14 ч, не содержит ХМ (см. главу 10).

Считают, что основным местом образования плазменных пре- β -липопротеинов является печень, а уже из пре- β -липопротеинов в плазме крови при действии на них липопротеинлипазы образуются β -липопротеины.

Следует заметить, что электрофорез липопротеинов можно проводить как на бумаге, так и в агаровом, крахмальном и полиакриламидном геле, ацетате целлюлозы. При выборе метода электрофореза основным критерием является четкое получение четырех типов липопротеинов. Наиболее перспективен в настоящее время электрофорез липопротеинов в полиакриламидном геле. В этом случае фракция ЛПОНП выявляется между ХМ и ЛПНП.

При ряде заболеваний липопротеиновый спектр сыворотки крови может изменяться. По существующей классификации гиперлиппротеинемий установлены следующие пять типов отклонения липопротеинового спектра от нормы.

Тип I — гиперхиломикронемия. Основные изменения в липопротеинограмме сводятся к следующему: высокое содержание ХМ, нормальное или слегка повышенное содержание ЛПОНП. Резкое повышение уровня триглицеридов в сыворотке крови. Клинически это состояние проявляется ксантоматозом.

Тип II — гипер- β -липопротеинемия. Этот тип делят на два подтипа: IIa, характеризующийся высоким содержанием в крови ЛПНП, и IIb, отличающийся высоким содержанием одновременно двух классов липопротеинов ЛПНП и ЛПОНП. При II типе отмечается высокое, а в некоторых случаях очень высокое содержание холестерина в плазме крови. Содержание триглицеридов в крови может быть либо нормальным (IIa тип), либо повышенным (IIb тип). Тип II клинически проявляется атеросклеротическими нарушениями, нередко развивается ишемическая болезнь сердца.

Тип III — «флотирующая» гиперлиппротеинемия или дис- β -липопротеинемия. В сыворотке крови появляются липопротеины с необычно высоким содержанием холестерина и высокой электрофоретической подвижностью («флотирующие» β -липопротеины). Они накапливаются в крови вследствие нарушения превращения ЛПОНП в ЛПНП. Этот тип гиперлиппротеинемии часто сочетается с различными проявлениями атеросклероза, в том числе с ишемической болезнью сердца и поражением сосудов ног.

Тип IV — гиперпре- β -липопротеинемия. Повышение уровня ЛПОНП, нормальное содержание ЛПНП, отсутствие ХМ. Увеличение уровня триглицеридов при нормальном или слегка повышенном уровне холестерина. Клинически этот тип сочетается с диабетом, ожирением, ишемической болезнью сердца.

Тип V — гиперпре- β -липопротеинемия и хиломикронемия. Наблюдается повышение уровня ЛПОНП, наличие ХМ. Клинически проявляется ксантоматозом, иногда сочетается со скрытым диабетом. Ишемической болезни сердца при этом типе гиперлиппротеинемии не наблюдается.

Можно считать твердо установленным наличие отрицательной корреляции между

уровнем ЛПВП в крови и распространенностью ишемической болезни сердца (ИБС).

Исследования, проведенные во многих странах мира, показали, что у больных ИБС содержание α -липопротеинового холестерина ниже, чем у лиц без признаков ИБС. Холестерин ЛПВП как «предсказатель» ИБС оказался в 8 раз чувствительнее, чем холестерин ЛПНП. Предложено в качестве «предсказателя» рассчитывать так называемый холестериновый коэффициент атерогенности (K), представляющий собой отношение холестерина ЛПНП и ЛПОНП к холестерину ЛПВП:

$$K = \frac{\text{холестерин ЛПНП} + \text{холестерин ЛПОНП}}{\text{холестерин ЛПВП}}$$

В клинике более удобно рассчитывать этот коэффициент на основании определения общего холестерина и холестерина ЛПВП:

$$K = \frac{\text{холестерин общий} - \text{холестерин ЛПВП}}{\text{холестерин ЛПВП}}$$

Чем выше этот коэффициент (у здоровых лиц он не превышает 3), тем выше опасность развития (и наличия) ИБС.

До сих пор не существует единой теории, которая могла бы удовлетворительно объяснить антиатерогенное действие ЛПВП. В предложенных теориях и гипотезах антиатерогенное действие ЛПВП рассматривается на различных физиологических уровнях. При этом особое внимание обращается на возможное участие ЛПВП в удалении холестерина из тканей, на вмешательство ЛПВП в захват холестерина клеткой и на взаимоотношения ЛПВП с липопротеинами, богатыми триглицеридами, в плазме крови (А. Н. Климов).

Отдельные наиболее изученные и интересные в клиническом отношении белки плазмы

Гаптоглобин входит в состав α_2 -глобулиновой фракции. Этот белок обладает способностью соединяться с гемоглобином. Образовавшийся гаптоглобин-гемоглобиновый комплекс может поглощаться системой макрофагов, тем самым предупреждается потеря железа, входящего в состав гемоглобина как при физиологическом, так и при патологическом его освобождении из эритроцитов. Методом электрофореза выявлены три группы гаптоглобинов, которые были обозначены как Нр 1—1, Нр 2—1 и Нр 2—2. Установлено, что имеется связь между наследованием типов гаптоглобинов и резус-антителами.

Ингибиторы трипсина обнаруживаются при электрофорезе белков плазмы крови в зоне α_1 - и α_2 -глобулинов; они способны ингибировать трипсин и другие протеолитические ферменты. В норме содержание этих белков составляет 2,0—2,5 г/л, но при воспалительных процессах в организме, при беременности и ряде других состояний содержание белков — ингибиторов протеолитических ферментов — увеличивается.

Трансферрин относится к β -глобулинам и обладает способностью соединяться с железом. Его комплекс с железом окрашен в оранжевый цвет. В железотрансферриновом комплексе железо находится в трехвалентной форме. Концентрация трансферрина в сыворотке крови составляет около 2,9 г/л. В норме только $\frac{1}{3}$ трансферрина насыщена железом. Следовательно, имеется определенный резерв трансферрина, способного связать железо. Трансферрин у различных людей может принадлежать к разным типам. Выявлено 19 типов трансферрина, различающихся по величине заряда белковой молекулы, ее аминокислотному составу и числу молекул сиаловых кислот, связанных с белком. Обнаружение разных типов трансферринов связывают с наследственными особенностями.

Церулоплазмин имеет голубоватый цвет, обусловленный наличием в его составе 0,32% меди. Обладает слабой каталитической активностью, окисляя аскорбиновую

кислоту, адреналин, диоксифенилаланин и некоторые другие соединения. При гепатоцеребральной дистрофии (болезнь Вильсона — Коновалова) содержание церулоплазмينا в плазме крови (в норме 0,15—0,5 г/л) значительно снижается, что является важным диагностическим тестом.

Электрофоретическими методами установлено наличие четырех изоферментов церулоплазмينا. В норме в сыворотке крови взрослых людей обнаруживаются два изофермента, которые заметно различаются по своей подвижности при электрофорезе в ацетатном буфере при pH 5,5. В сыворотке новорожденных детей также были обнаружены две фракции, имеющие большую электрофоретическую подвижность, чем изоферменты церулоплазмينا взрослого человека. Следует отметить, что по своей электрофоретической подвижности изоферментный спектр церулоплазмينا в сыворотке крови при болезни Вильсона — Коновалова сходен с изоферментным спектром новорожденных детей.

С-реактивный белок получил свое название в результате способности вступать в реакцию преципитации с С-полисахаридом пневмококков. С-реактивный белок в сыворотке крови здорового организма отсутствует, но обнаруживается при многих патологических состояниях, сопровождающихся воспалением и некрозом тканей.

Появляется С-реактивный белок в острый период заболевания, поэтому его иногда называют белком «острой фазы». С переходом в хроническую фазу заболевания С-реактивный белок исчезает из крови и снова появляется при обострении процесса. При электрофорезе белок перемещается вместе с α_2 -глобулинами.

Криоглобулин в сыворотке крови здоровых людей также отсутствует и появляется в ней при патологических состояниях. Отличительное свойство этого белка — способность выпадать в осадок или желатинизироваться при температуре ниже 37 °С. При электрофорезе криоглобулин чаще всего передвигается совместно с γ -глобулинами. Криоглобулин можно обнаружить в сыворотке крови при миеломе, нефрозе, циррозе печени, ревматизме, лимфосаркоме, лейкозах и других заболеваниях.

В настоящее время установлено, что один из криоглобулинов идентичен белку фибронектину, связанному с поверхностью фибробластов. Последний был выделен как в мономерной (относительная молекулярная масса 220 000 Да), так и димерной формах. Данный белок широко распространен в соединительной ткани.

Интерферон — специфический белок, синтезируемый в клетках организма в результате воздействия вирусов. В свою очередь этот белок обладает способностью угнетать размножение вируса в клетках, но не разрушает уже имеющиеся вирусные частицы. Образовавшийся в клетках интерферон легко выходит в кровяное русло и оттуда проникает в ткани и клетки. Интерферон обладает специфичностью, хотя и не абсолютной. Например, интерферон обезьян угнетает размножение вируса в культуре клеток человека. Защитное действие интерферона в значительной степени зависит от соотношения между скоростями распространения вируса и интерферона в крови и тканях.

Ферменты плазмы (сыворотки) крови

Ферменты, которые обнаруживаются в норме в плазме или сыворотке крови, условно можно разделить на три группы: секреторные, индикаторные и экскреторные. Секреторные ферменты, синтезируясь в печени, в норме выделяются в плазму крови, где играют определенную физиологическую роль. Типичными представителями данной группы являются ферменты, участвующие в процессе свертывания крови, и сывороточная холинэстераза. Индикаторные (клеточные) ферменты попадают в кровь из тканей, где они выполняют определенные внутриклеточные функции. Одни из них находятся главным образом в цитоплазме клетки (ЛДГ, альдолаза), другие — в митохондриях (глутаматдегидрогеназа), третьи — в лизосомах (β -глюкуронидаза, кислая фосфатаза) и т. д. Большая часть индикаторных

ферментов в сыворотке крови определяется в норме лишь в следовых количествах. При поражении тех или иных тканей ферменты из клеток «вымываются» в кровь и их активность в сыворотке резко возрастает, являясь индикатором степени и глубины повреждения этих тканей.

Экскреторные ферменты синтезируются главным образом в печени (лейцинаминопептидаза, щелочная фосфатаза и др.). Эти ферменты в физиологических условиях в основном выделяются с желчью. Еще не полностью выяснены механизмы, регулирующие поступление данных ферментов в желчные капилляры. При многих патологических процессах выделение указанных ферментов с желчью нарушается и активность экскреторных ферментов в плазме крови повышается.

Особый интерес для клинки представляет исследование активности индикаторных ферментов в сыворотке крови, так как по появлению в плазме или сыворотке крови ряда тканевых ферментов в повышенных количествах можно судить о функциональном состоянии и поражении различных органов (например, печени, сердечной и скелетной мускулатуры). При остром инфаркте миокарда особенно важно исследовать активность креатинкиназы, АсАТ, ЛДГ и оксibuтиратдегидрогеназы.

При заболеваниях печени, в частности при вирусном гепатите (болезнь Боткина), в сыворотке крови значительно увеличивается активность АлАТ и АсАТ, сорбитолдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы и некоторых других ферментов. Большинство ферментов, содержащихся в печени, присутствуют и в других органах и тканях. Однако существуют ферменты, которые более или менее специфичны для печеночной ткани. Органоспецифическими ферментами для печени считаются: гистадаза, сорбитолдегидрогеназа, аргиназа и орнитинкарбамоилтрансфераза. Изменения активности этих ферментов в сыворотке крови свидетельствуют о поражении печеночной ткани.

В последнее десятилетие особо важным лабораторным тестом стало исследование активности изоферментов в сыворотке крови, в частности изоферментов ЛДГ. Известно, что в сердечной мышце наибольшей активностью обладают изоферменты ЛДГ₁ и ЛДГ₂, а в ткани печени — ЛДГ₄ и ЛДГ₅ (см. главу 4 и 9). Установлено, что у больных с острым инфарктом миокарда в сыворотке крови резко повышается активность изоферментов ЛДГ₁, и отчасти ЛДГ₂. Изоферментный спектр ЛДГ в сыворотке крови при инфаркте миокарда напоминает изоферментный спектр сердечной мышцы. Напротив, при паренхиматозном гепатите в сыворотке крови значительно возрастает активность изоферментов ЛДГ₅ и ЛДГ₄ и уменьшается активность ЛДГ₁ и ЛДГ₂.

Диагностическое значение имеет также исследование активности изоферментов креатинкиназы в сыворотке крови. Существуют по крайней мере три изофермента креатинкиназы: ВВ, ММ и МВ. В мозговой ткани в основном присутствует изофермент ВВ (от англ. brain — мозг), в скелетной мускулатуре — ММ-форма (от англ. muscle — мышца). Сердце содержит преимущественно гибридную МВ-форму, а также ММ-форму. Изоферменты креатинкиназы особенно важно исследовать при остром инфаркте миокарда, так как МВ-форма в значительном количестве содержится практически только в сердечной мышце. Поэтому повышение активности МВ-формы в сыворотке крови свидетельствует о поражении именно сердечной мышцы.

По-видимому, возрастание активности ферментов в сыворотке крови при многих патологических процессах объясняется по крайней мере двумя причинами: 1) выходом в кровяное русло ферментов из поврежденных участков органов или тканей на фоне продолжающегося их биосинтеза в поврежденных тканях и 2) одновременным повышением каталитической активности некоторых ферментов, переходящих в кровь. Возможно, что повышение активности ферментов при «поломке» механизмов внутриклеточной регуляции обмена веществ связано с прекращением действия соответствующих регуляторов и ингибиторов ферментов, изменением под влиянием различных факторов строения и структуры макромолекул ферментов.

Небелковые азотистые компоненты крови

Содержание небелкового азота в цельной крови и плазме почти одинаково и составляет в крови 15–25 ммоль/л. Небелковый азот крови включает азот мочевины (50% от общего количества небелкового азота), аминокислот (25%), эрготионеина (8%)¹, мочевой кислоты (4%), креатина (5%), креатинина (2,5%), аммиака и индикана (0,5%) и других небелковых веществ, содержащих азот (полипептиды, нуклеотиды, нуклеозиды, глутатион, билирубин, холин, гистамин и др.). Таким образом, в состав небелкового азота крови входит главным образом азот конечных продуктов обмена простых и сложных белков.

Небелковый азот крови называют также остаточным азотом, т. е. остающимся в фильтрате после осаждения белков. У здорового человека колебания в содержании небелкового, или остаточного, азота крови незначительны и в основном зависят от количества поступающих с пищей белков. При ряде патологических состояний уровень небелкового азота в крови повышается. Это состояние носит название **азотемии**. Азотемия в зависимости от причин, вызывающих ее, подразделяется на ретенционную и продукционную. Ретенционная азотемия наступает в результате недостаточного выделения с мочой азотсодержащих продуктов при нормальном поступлении их в кровяное русло. Она в свою очередь может быть почечной и внепочечной.

При почечной ретенционной азотемии концентрация остаточного азота в крови увеличивается вследствие ослабления очистительной (экскреторной) функции почек. Резкое повышение содержания остаточного азота при ретенционной почечной азотемии происходит в основном за счет мочевины. В этих случаях на долю азота мочевины приходится 90% небелкового азота крови вместо 50% в норме. Внепочечная ретенционная азотемия может возникнуть в результате тяжелой недостаточности кровообращения, снижения артериального давления и уменьшения почечного кровотока. Нередко внепочечная ретенционная азотемия является результатом наличия препятствия оттоку мочи после ее образования в почке.

Продукционная азотемия наблюдается при избыточном поступлении азотсодержащих продуктов в кровь, как следствие усиленного распада тканевых белков при обширных воспалениях, ранениях, ожогах, кахексии и др. Нередко наблюдаются азотемии смешанного типа.

Как уже отмечалось, в количественном отношении главным конечным продуктом обмена белков в организме является мочевина. Принято считать, что мочевина в 18 раз менее токсична, чем остальные азотистые вещества. При острой почечной недостаточности концентрация мочевины в крови достигает 50–83 ммоль/л (норма 3,3–6,6 ммоль/л). Нарастание содержания мочевины в крови до 16–20,0 ммоль/л (в расчете на азот мочевины)² является признаком нарушения функции почек средней тяжести, до 35 ммоль/л – тяжелым и свыше 50 ммоль/л – очень тяжелым нарушением с неблагоприятным прогнозом. Иногда определяют отношение азота мочевины крови к остаточному азоту крови, выраженное в процентах:

$$\frac{\text{Азот мочевины}}{\text{Остаточный азот}} \times 100$$

В норме это отношение меньше 48%. При почечной недостаточности оно повышается и может достигать 90%, а при нарушении мочевинообразовательной функции печени снижается (ниже 45%).

¹ Эрготионеин – бетаин 2-меркаптогистидина – соединение, входящее в состав эритроцитов, обнаружен также в печени и моче.

² Содержание азота мочевины (2 атома с мол. м. 14 Да) в 2,14 раза меньше, чем самой мочевины (мол. м. 60 Да).

К важным небелковым азотистым веществам крови относится также **мочевая кислота**. Напомним, что у человека мочевая кислота является конечным продуктом обмена пуриновых оснований. В норме концентрация мочевиной кислоты в цельной крови составляет 0,18–0,24 ммоль/л (в сыворотке крови – около 0,29 ммоль/л). Повышение содержания мочевиной кислоты в крови (гиперурикемия) – главный симптом подагры. При подагре уровень мочевиной кислоты в сыворотке крови возрастает до 0,5–0,9 ммоль/л и даже до 1,1 ммоль/л.

В состав остаточного азота входит также азот **аминокислот** и **полипептидов**. В крови постоянно содержится некоторое количество свободных аминокислот. Часть из них экзогенного происхождения, т. е. попадает в кровь из желудочно-кишечного тракта, другая часть аминокислот образуется в результате распада белков тканей. Почти пятую часть содержащихся в плазме аминокислот составляют глутаминовая кислота и глутамин (табл. 16.2). Содержание свободных аминокислот в сыворотке и плазме крови практически одинаково, но отличается от уровня их в эритроцитах. В норме отношение концентрации азота аминокислот в эритроцитах к содержанию азота аминокислот в плазме колеблется от 1,52 до 1,82. Это отношение отличается большим постоянством, и только при некоторых заболеваниях наблюдается его отклонение от нормы.

Таблица 16.2. Концентрация свободных аминокислот в плазме крови человека

Аминокислоты	Концентрация, ммоль/л	Аминокислоты	Концентрация, ммоль/л
Аланин	360–630	Лизин	144–363
Аргинин	92–172	Метионин	20–34
Аспарагин	50–150	Орнитин	30–100
Аспарагиновая кислота	2–30	Пролин	50–200
Валин	188–274	Серин	70–150
Глутаминовая кислота	54–175	Треонин	160–176
Глутамин	514–568	Триптофан	30–90
Глицин	100–400	Тирозин	78–83
Гистидин	110–135	Фенилаланин	85–115
Изолейцин	122–153	Цитруллин	10–50
Лейцин	130–252	Цистин	84–125

Суммарное определение уровня пептидов в крови производят сравнительно редко. Однако следует напомнить, что многие пептиды крови являются биологически активными соединениями и их определение представляет большой клинический интерес. К таким соединениям, в частности, относятся кинины.

Безазотистые органические компоненты крови

В группу безазотистых органических веществ крови входят углеводы, жиры, липиды, органические кислоты и некоторые другие вещества. Все эти соединения являются либо продуктами промежуточного обмена углеводов и жиров, либо играют роль питательных веществ. Основные данные, характеризующие содержание в крови различных безазотистых органических веществ, были представлены в табл. 16.1. В клинике большое значение придать количественному определению этих компонентов крови.

Электролитный состав плазмы крови

Известно, что общее содержание воды в организме человека составляет 60–65% от массы тела, т. е. приблизительно 40–45 л (если масса тела 70 кг); $\frac{2}{3}$ общего количества воды приходится на внутриклеточную жидкость, $\frac{1}{3}$ – на внеклеточную

жидкость. Часть внеклеточной воды находится в сосудистом русле (5% от массы тела), большая же часть — вне сосудистого русла — это межтканевая (интерстициальная), или тканевая, жидкость (15% от массы тела). Кроме того, различают «свободную воду», составляющую основу внутри- и внеклеточной жидкостей, и воду, связанную с различными соединениями («связанная вода»).

Распределение электролитов в жидких средах организма очень специфично по своему количественному и качественному составу.

Из катионов плазмы натрия занимает ведущее место и составляет 93% от всего их количества. Среди анионов следует выделить прежде всего хлор, далее бикарбонат. Сумма анионов и катионов практически одинакова, т. е. вся система электронейтральна.

Натрий. Основной осмотически активный ион внеклеточного пространства. В плазме крови концентрация ионов Na^+ приблизительно в 8 раз выше (132–150 ммоль/л), чем в эритроцитах.

При гипернатриемии, как правило, развивается синдром, связанный с гипергидратацией организма. Накопление натрия в плазме наблюдается при особом заболевании почек, так называемом паренхиматозном нефрите, у больных с врожденной сердечной недостаточностью, при первичном и вторичном гиперальдостеронизме.

Гипонатриемия сопровождается дегидратацией организма. Коррекция натриевого обмена осуществляется введением растворов хлорида натрия с расчетом дефицита его во внеклеточном пространстве и клетке.

Калий. Концентрация ионов K^+ в плазме колеблется от 3,8 до 5,4 ммоль/л; в эритроцитах его приблизительно в 20 раз больше. Уровень калия в клетках значительно выше, чем во внеклеточном пространстве, поэтому при заболеваниях, сопровождающихся усиленным клеточным распадом или гемолизом, содержание калия в сыворотке крови увеличивается.

Гиперкалиемия наблюдается при острой почечной недостаточности и гипофункции коркового вещества надпочечников. Недостаток альдостерона приводит к усилению выделения с мочой натрия и воды и задержке в организме калия.

Наоборот, при усиленной продукции альдостерона корковым веществом надпочечников возникает гипокалиемия. При этом увеличивается выделение калия с мочой, которое сочетается с задержкой натрия в тканях. Развивающаяся гипокалиемия вызывает тяжелые нарушения работы сердца, о чем свидетельствуют данные ЭКГ. Понижение содержания калия в сыворотке отмечается иногда при введении больших доз гормонов коркового вещества надпочечников с лечебной целью.

Кальций. В эритроцитах обнаруживаются следы кальция, в то время как в плазме содержание его составляет 2,25–2,80 ммоль/л.

Различают несколько фракций кальция: ионизированный кальций, кальций неионизированный, но способный к диализу, и недиализирующийся (недиффундирующий), связанный с белками кальций.

Кальций принимает активное участие в процессах нервно-мышечной возбудимости (как антагонист ионов K^+), мышечного сокращения, свертывания крови, образует структурную основу костного скелета, влияет на проницаемость клеточных мембран и т. д.

Отчетливое повышение уровня кальция в плазме крови наблюдается при развитии опухолей в костях, гиперплазии или аденоме паращитовидных желез. Кальций в этих случаях в плазму поступает из костей, которые становятся ломкими.

Важное диагностическое значение имеет определение кальция при гипокальциемии. Состояние гипокальциемии наблюдается при гипопаратиреозе. Выпадение функции паращитовидных желез приводит к резкому снижению содержания ионизированного кальция в крови, что может сопровождаться судорожными приступами (тетания). Понижение концентрации кальция в плазме отмечают также при рахите, спру, обтурационной желтухе, нефрозах и гломерулонефритах.

Магний. В основном внутриклеточный двухвалентный ион, содержащийся в организме в количестве 15 ммоль на 1 кг массы тела; концентрация магния в плазме — 0,8—1,5 ммоль/л, в эритроцитах — 2,4—2,8 ммоль/л. Мышечная ткань содержит магния в 10 раз больше, чем плазма крови. Уровень магния в плазме даже при значительных его потерях длительное время может оставаться стабильным, пополняясь из мышечного депо.

Фосфор. В клинике при исследовании крови различают следующие фракции фосфора: общий фосфат, кислоторастворимый фосфат, липоидный фосфат и неорганический фосфат. Для клинических целей чаще пользуются определением неорганического фосфата в плазме (сыворотке) крови.

Содержание неорганического фосфата в плазме крови увеличивается при гипопаратиреозе, гипервитаминозе D, приеме тироксина, УФ-облучении организма, желтой дистрофии печени, миеломе, лейкозах и т. д.

Гипофосфатемия (снижение содержания фосфора в плазме) особенно характерна для рахита. Очень важно, что снижение уровня неорганического фосфата в плазме крови отмечается на ранних стадиях развития рахита, когда клинические симптомы недостаточны выражены. Гипофосфатемия наблюдается также при введении инсулина, гиперпаратиреозе, остеомалации, спру и некоторых других заболеваниях.

Железо. В цельной крови железо содержится в основном в эритроцитах (~18,5 ммоль/л), в плазме концентрация его составляет в среднем 0,02 ммоль/л. Ежедневно в процессе распада гемоглобина эритроцитов в селезенке и печени освобождается около 25 мг железа и столько же потребляется при синтезе гемоглобина в клетках кроветворных тканей. В костном мозге (основная эритропоэтическая ткань человека) имеется лабильный запас железа, превышающий в 5 раз суточную потребность в железе. Значительно больше запас железа в печени и селезенке (около 1000 мг, т. е. 40-суточный запас). Повышение содержания железа в плазме крови наблюдается при ослаблении синтеза гемоглобина или усиленном распаде эритроцитов.

При анемии различного происхождения потребность в железе и всасывание его в кишечнике резко возрастает. Известно, что в кишечнике железо всасывается в двенадцатиперстной кишке в форме двухвалентного железа. В клетках слизистой оболочки кишечника железо соединяется с белком апоферритином и образуется ферритин. Предполагают, что количество поступающего из кишечника в кровь железа зависит от содержания апоферритина в стенках кишечника. Дальнейший транспорт железа из кишечника в кроветворные органы осуществляется в форме комплекса с белком плазмы крови трансферрином. Железо в этом комплексе находится в трехвалентной форме. В костном мозге, печени и селезенке железо депонируется в форме ферритина — своеобразного резерва легко мобилизуемого железа. Кроме того, избыток железа может откладываться в тканях в виде хорошо известного морфологам метаболически инертного гемосидерина (см. главу 12).

Недостаток железа в организме может вызвать нарушение последнего этапа синтеза гема — превращение протопорфирина IX в гем. Как результат этого развивается анемия, сопровождающаяся увеличением содержания порфиринов, в частности протопорфирина IX, в эритроцитах.

Минеральные вещества. Обнаруживаемые в тканях, в том числе и в крови, в очень небольших количествах (10^{-6} — 10^{-12} %) минеральные вещества получили название микроэлементов. К ним относят йод, медь, цинк, кобальт, селен и др. Большинство микроэлементов в крови находятся в связанном с белками состоянии. Так, медь плазмы входит в состав церулоплазмينا, цинк эритроцитов целиком принадлежит карбоангидразе (карбонат-дегидратаза), 65—70% йода крови находится в органически связанной форме — в виде тироксина. В крови тироксин содержится главным образом в связанной с белками форме. Он комплексируется преимущественно со специфически связывающим его глобулином, который располагается при электрофорезе сывороточных белков между двумя фракциями α -глобулина. Поэтому

тироксинсвязывающий белок носит название интеральфаглобулина. Кобальт, обнаруживаемый в крови, также находится в белковосвязанной форме и лишь частично как структурный компонент витамина В₁₂. Значительная часть селена в крови входит в состав активного центра фермента глутатионпероксидазы, а также связана с другими белками.

Клетки крови

У человека в 1 мкл крови содержится $5 \cdot 10^6$ эритроцитов (красные кровяные клетки), которые образуются в костном мозге. Зрелые эритроциты человека и других млекопитающих лишены ядра и почти целиком заполнены гемоглобином. Средняя продолжительность жизни этих клеток 125 дней. Разрушаются эритроциты в селезенке и печени. Концентрация гемоглобина в крови зависит от общего количества эритроцитов и содержания в каждом из них гемоглобина. Поэтому и говорят о гипо-, нормо- или гиперхромной анемии в зависимости от того, сопряжено ли падение уровня гемоглобина крови с уменьшением или увеличением его содержания в одном эритроците.

Большую часть гемоглобина взрослого человека составляет HbA₁ (96–98% от общего содержания гемоглобина), в небольшом количестве присутствуют HbA₂ (2–3%), а также HbF (менее 1%), которого много в крови новорожденных. У некоторых людей в крови обнаруживаются генетически обусловленные аномальные гемоглобины (см. главу 2), всего таких гемоглобинов описано свыше 100. Появление в крови аномальных типов гемоглобинов нередко приводит к возникновению характерных анемий, которые получили название гемоглобинопатии, или гемоглобинозы. Следует заметить, что в эритроцитах интенсивно протекают гликолиз и пентозофосфатный путь.

Содержание лейкоцитов в 1 мкл крови составляет около $7 \cdot 10^3$, т. е. почти в 1000 раз меньше, чем эритроцитов. Лейкоциты в отличие от эритроцитов являются полноценными клетками с большим ядром и митохондриями и высоким содержанием нуклеиновых кислот. В них сосредоточен весь гликоген крови, который служит источником энергии при недостатке кислорода, например, в очагах воспаления.

Лейкоциты представлены клетками трех типов: лимфоцитами (~26%; от общего числа лейкоцитов), моноцитами (~7%) и полиморфно-ядерными лейкоцитами, или гранулоцитами (~70%). При окрашивании теми или иными красителями выявляются три типа гранулоцитов: нейтрофилы, эозинофилы и базофилы.

Лимфоциты образуются в лимфатической ткани, основная их функция — образование антител, в частности иммуноглобулинов. Моноциты вдвое крупнее лимфоцитов; они способны переваривать клетки бактерий. Гранулоциты образуются в красном костном мозге и выполняют различные функции. Например, основная функция нейтрофилов — фагоцитоз.

Наконец, в крови имеются кровяные пластинки, или тромбоциты, которые образуются из цитоплазмы мегакариоцитов костного мозга. Хотя тромбоциты и не могут считаться полноценными клетками, поскольку не содержат ядра, в них протекают все основные биохимические процессы: синтезируется белок, происходит обмен углеводов и липидов, осуществляется биологическое окисление, сопряженное с фосфорилированием, и т. д. Основная физиологическая функция кровяных пластинок — участие в процессе свертывания крови.

БУФЕРНЫЕ СИСТЕМЫ КРОВИ И КИСЛОТНО-ОСНОВНОЕ РАВНОВЕСИЕ

Постоянство pH внутренней среды организма обусловлено совместным действием буферных систем и ряда физиологических механизмов. К последним прежде всего относятся деятельность легких и выделительная функция почек.

Кисотно-основное равновесие — относительное постоянство реакции внутренней среды организма, количественно характеризующееся или концентрацией водородных ионов (протонов), выраженной в молях на 1 л, или водородным показателем — отрицательным десятичным логарифмом этой концентрации — рН (power hydrogen — сила водорода).

«Первая линия защиты» живых организмов, препятствующая изменениям рН их внутренней среды, обеспечивается буферными системами крови и тканей.

Буферная система¹ представляет собой сопряженную кислотно-основную пару, состоящую из донора и акцептора водородных ионов (протонов). Поведение буферных растворов описывается уравнением Гендерсона — Хассельбаха, которое связывает значение рН с константой кислотности (K_a):

$$pH = pK_a + \lg \frac{[\text{акцептор протонов}]}{[\text{донор протонов}]}$$

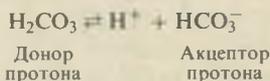
Уравнение Гендерсона — Хассельбаха дает возможность вычислить величину pK_a любой кислоты при данном рН (если известно отношение молярных концентраций донора и акцептора протонов), определить величину рН сопряженной кислотно-основной пары при данном молярном соотношении донора и акцептора протонов (если известна величина pK_a) и рассчитать соотношение между молярными концентрациями донора и акцептора протонов при любом значении рН (если известна величина pK_a слабой кислоты).

Буферные системы крови

Установлено, что состоянию нормы соответствует определенный диапазон колебаний рН крови — от 7,37 до 7,44 со средней величиной 7,40².

Поскольку кровь представляет собой взвесь клеток в жидкой среде, то ее кислотно-основное равновесие поддерживается совместным участием буферных систем плазмы и клеток крови. Важнейшими буферными системами крови являются: бикарбонатная, фосфатная, белковая и особенно гемоглобиновая.

Бикарбонатная буферная система — мощная и, пожалуй, самая управляемая система внеклеточной жидкости и крови. На долю бикарбонатного буфера приходится около 10% всей буферной емкости крови. Бикарбонатная система³ 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:



Для данной буферной системы величину рН в растворе можно выразить через константу диссоциации угольной кислоты ($pK_{H_2CO_3}$) и логарифм концентрации недиссоциированных молекул H_2CO_3 и ионов HCO_3^- :

$$pH = pK_{H_2CO_3} + \lg \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

¹ Буферными свойствами, т. е. способностью противодействовать изменению рН при внесении в систему кислот или оснований, обладают смеси, состоящие из слабой кислоты и ее соли с сильным основанием или слабого основания с солью сильной кислоты.

² В других биологических жидкостях и в клетках рН может отличаться от рН крови. Например, в эритроцитах рН составляет $7,19 \pm 0,02$, отличаясь от рН крови на 0,2.

³ Бикарбонаты во внеклеточной жидкости находятся в виде натриевой соли $NaHCO_3$ и внутри клеток — калиевой соли $KHCO_3$, имеющих общий анион HCO_3^- .

Так как истинная концентрация недиссоциированных молекул H_2CO_3 в крови незначительна¹ и находится в прямой зависимости от концентрации растворенного углекислого газа ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$), то удобнее пользоваться тем вариантом уравнения, в котором $\text{pK}_{\text{H}_2\text{CO}_3}$ заменена «кажущейся» константой диссоциации H_2CO_3 , учитывающей общую концентрацию растворенного CO_2 в крови:

$$\text{pH} = \text{pK}_1 + \lg \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2(\text{p})]}$$

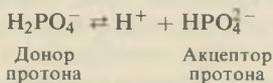
где K_1 — «кажущаяся» константа диссоциации H_2CO_3 ; $[\text{CO}_2(\text{p})]$ — концентрация растворенной CO_2 .

При нормальном значении pH крови (7,4) концентрация ионов бикарбоната HCO_3^- в плазме крови превышает концентрацию CO_2 примерно в 20 раз. Бикарбонатная буферная система функционирует как эффективный регулятор в области pH 7,4.

Механизм действия данной системы заключается в том, что при выделении в кровь относительно 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 выведения CO_2 через легкие в результате их гипервентиляции (напомним, что концентрация H_2CO_3 в плазме крови определяется давлением CO_2 в альвеолярной газовой смеси).

Если же в крови увеличивается количество оснований, то они, взаимодействуя со слабой угольной кислотой, образуют ионы бикарбоната и воду. При этом не происходит сколько-нибудь заметных сдвигов в величине pH. Кроме того, для сохранения нормального соотношения между компонентами буферной системы в этом случае подключаются физиологические механизмы регуляции кислотно-основного равновесия: происходит задержка в плазме крови некоторого количества CO_2 в результате гиповентиляции легких². Как будет показано ниже, данная буферная система тесно связана с гемоглобиновой системой.

Фосфатная буферная система представляет собой сопряженную кислотно-основную пару, состоящую из иона H_2PO_4^- (донор протонов) и иона HPO_4^{2-} (акцептор протонов):



Роль кислоты в этой системе выполняет однозамещенный фосфат — NaH_2PO_4 , а роль соли — двузамещенный фосфат — Na_2HPO_4 .

Фосфатная буферная система составляет всего лишь 1% буферной емкости крови. Однако в тканях эта система является одной из основных. Для фосфатной буферной системы справедливо следующее уравнение:

$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{H}_2\text{PO}_4^-} + \lg \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

Во внеклеточной жидкости, в том числе и в крови, соотношение $[\text{HPO}_4^{2-}] : [\text{H}_2\text{PO}_4^-]$ составляет 4 : 1. Величина $\text{pK}_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}$ равна 6,86.

¹ Молярная концентрация H_2CO_3 по сравнению с концентрацией CO_2 в плазме крови очень низкая. При $\text{P}_{\text{CO}_2} = 53,3$ гПа (40 мм рт. ст.) на 1 молекулу H_2CO_3 приходится примерно 500 молекул CO_2 .

² Следует заметить, что хотя дыхательная система (легкие) значительно влияет на кислотно-основное равновесие (КОР), однако легким требуется около 1–3 мин, чтобы нивелировать сдвиги его в крови, тогда как буферным системам крови для этого нужно всего лишь 30 с.

Буферное действие фосфатной системы основано на возможности связывания водородных ионов ионами HPO_4^{2-} с образованием H_2PO_4^- ($\text{H}^+ + \text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{PO}_4^-$), а также ионов OH^- с ионами H_2PO_4^- ($\text{OH}^- + \text{H}_2\text{PO}_4^- \rightarrow \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O}$). Буферная пара ($\text{H}_2\text{PO}_4^- - \text{HPO}_4^{2-}$) способна оказывать влияние при изменениях рН в интервале от 6,1 до 7,7 и может обеспечивать определенную буферную емкость внутриклеточной жидкости, величина рН которой лежит в пределах 6,9–7,4. В крови максимальная емкость фосфатного буфера проявляется вблизи рН 7,2. Фосфатный буфер в крови находится в тесном взаимодействии с бикарбонатной буферной системой. Органические фосфаты также обладают буферными свойствами, но мощность их слабее, чем неорганического фосфатного буфера.

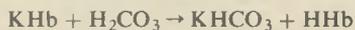
Белковая буферная система имеет меньшее значение для поддержания кислотно-основного равновесия в плазме крови, чем другие буферные системы.

Белки образуют буферную систему благодаря наличию кислотно-основных групп в молекуле белков: белок — H^+ (кислота, донор протонов) и белок $^-$ (сопряженное основание, акцептор протонов). Белковая буферная система плазмы крови эффективна в области рН 7,2–7,4.

Гемоглобиновая буферная система — самая мощная буферная система крови. Она в 9 раз мощнее бикарбонатного буфера; на ее долю приходится 75% всей буферной емкости крови.

Участие гемоглобина в регуляции рН крови связано с его ролью в транспорте кислорода и углекислого газа. Константа диссоциации кислотных групп гемоглобина меняется в зависимости от его насыщения кислородом. При насыщении гемоглобина кислородом он становится более сильной кислотой (HNBO_2). Гемоглобин, отдавая кислород, становится очень слабой органической кислотой (HNB).

Итак, гемоглобиновая буферная система состоит из неионизированного гемоглобина — HNB (слабая органическая кислота, донор протонов) и калиевой соли гемоглобина — KNb (сопряженное основание, акцептор протонов). Точно так может быть рассмотрена оксигемоглобиновая буферная система. Система гемоглобина и оксигемоглобина являются взаимопревращающимися системами и существуют как единое целое. Буферные свойства гемоглобина прежде всего обусловлены возможностью взаимодействия кислореагирующих соединений 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 HNB с образованием эквивалентного количества бикарбоната обеспечивает поддержание рН крови в пределах физиологически допустимых величин, несмотря на поступление в венозную кровь огромного количества углекислого газа и других кислореагирующих продуктов обмена.

Попадая в капилляры легких, гемоглобин (HNB) превращается в оксигемоглобин (HNBO_2), что приводит к некоторому подкислению крови, вытеснению части H_2CO_3 из бикарбонатов и понижению щелочного резерва крови¹.

Перечисленные буферные системы крови играют важную роль в регуляции кислотно-основного равновесия. Как отмечалось, в этом процессе, помимо буферных систем крови, активное участие принимают также система дыхания и мочевыделительная система.

¹ Щелочной резерв крови — способность крови связывать CO_2 — исследуют теми же способами, что и общую CO_2 , но в условиях уравнивания плазмы крови при $\text{P}_{\text{CO}_2} = 53,3$ гПа (40 мм рт. ст.): определяют общее количество CO_2 и количество физически растворенной CO_2 в исследуемой плазме. Вычитая из первой цифры вторую, получают величину, которая называется щелочным резервом крови. Она выражается в объемных процентах CO_2 (объем CO_2 в миллилитрах на 100 мл плазмы). В норме у человека эта величина составляет 50–65 об. % CO_2 .

Нарушения кислотно-основного равновесия

Когда компенсаторные механизмы организма не способны предотвратить сдвиги концентрации водородных ионов, наступает нарушение кислотно-основного равновесия. При этом наблюдаются два противоположных состояния — ацидоз и алкалоз.

При ацидозе концентрация водородных ионов в крови выше нормальных пределов. При этом, естественно, рН уменьшается. Снижение величины рН ниже 6,8 вызывает смерть.

В тех случаях, когда концентрация водородных ионов в крови уменьшается (соответственно рН растет), наступает состояние алкалоза. Предел совместимости с жизнью — рН 8,0. В клинике практически такие величины рН, как 6,8 и 8,0, не встречаются.

В зависимости от механизмов развития нарушений кислотно-основного равновесия разделяют дыхательный и метаболический ацидоз (или алкалоз).

Дыхательный ацидоз возникает в результате уменьшения минутного объема дыхания (например, при бронхиальной астме, отеке, эмфиземе, ателектазе легких, асфиксии механического порядка и т. д.). Все эти заболевания ведут к гиповентиляции и гиперкапнии, т. е. повышению P_{CO_2} артериальной крови. Как следствие увеличивается содержание H_2CO_3 в плазме крови. Увеличение P_{CO_2} приводит также к повышению концентрации ионов HCO_3^- в плазме за счет гемоглобинового буферного механизма. У больных с гиповентиляцией легких может довольно быстро развиться состояние, характеризующееся низким значением рН плазмы, повышением концентраций H_2CO_3 и HCO_3^- . Это и есть дыхательный ацидоз. Одновременно со снижением рН крови повышается выведение с мочой свободных и связанных в форме аммонийных солей кислот.

Метаболический ацидоз — самая частая и тяжелая форма нарушений кислотно-основного равновесия. Он обусловлен накоплением в тканях и крови органических кислот. Этот вид ацидоза связан с нарушением обмена веществ. Метаболический ацидоз возможен при диабете, голодании, лихорадке, заболеваниях желудочно-кишечного тракта, шоках (кардиогенном, травматическом, ожоговом и др.).

Особенно явно проявляется метаболический ацидоз у больных, страдающих тяжелой формой диабета и не получающих инсулина. Увеличение кислотности обусловлено поступлением в кровь больших количеств кетоновых тел. В ответ на постоянную выработку кетоновых тел (β -оксимасляной и ацетоуксусной кислот) в организме компенсаторно снижается концентрация H_2CO_3 — донора протонов в бикарбонатной буферной системе. Снижение концентрации H_2CO_3 достигается в результате ускоренного выведения CO_2 в легких (напомним, что H_2CO_3 обратимо диссоциирует на CO_2 и H_2O). Однако при тяжелом диабете для компенсации ацидоза легкие должны выделять настолько большие количества CO_2 , что концентрация H_2CO_3 и HCO_3^- становится крайне низкой и буферная емкость крови значительно уменьшается, что приводит к неблагоприятным для организма последствиям. При метаболическом ацидозе кислотность мочи и концентрация аммиака в моче увеличены.

Дыхательный алкалоз возникает при резко усиленной вентиляции легких, сопровождающейся быстрым выделением из организма CO_2 и развитием гипокапнии (понижение парциального давления углекислого газа в артериальной крови — менее 35 мм рт. ст.).

Данный вид алкалоза может наблюдаться, например, при вдыхании чистого кислорода, компенсаторной одышке, сопровождающей ряд заболеваний, пребывании в разреженной атмосфере и других состояниях.

Вследствие понижения содержания угольной кислоты в артериальной крови происходит сдвиг в бикарбонатной буферной системе: часть бикарбонатов превращается в угольную кислоту. Снижение концентрации HCO_3^- происходит при участии гемоглобинового буферного механизма. Однако этот механизм не может все же полностью компенсировать уменьшение концентрации H_2CO_3 , и гипервентиляция

способна за несколько минут поднять внеклеточный рН до 7,65. При дыхательном ацидозе снижается щелочной резерв крови.

Метаболический алкалоз развивается при потере большого количества кислотных эквивалентов (например, неукротимая рвота и др.) и всасывании основных эквивалентов кишечного сока, которые не подвергались нейтрализации кислым желудочным соком, а также при накоплении основных эквивалентов в тканях (например, при тетании) и в случае неправильной коррекции метаболического ацидоза. При метаболическом алкалозе повышена концентрация HCO_3^- в плазме, увеличен щелочной резерв крови. Компенсация метаболического алкалоза прежде всего осуществляется за счет снижения возбудимости дыхательного центра при повышении рН, что приводит к урежению частоты дыхания и возникновению компенсаторной гиперкапнии (табл. 16.3). Кислотность мочи и содержание аммиака в ней понижены.

Таблица 16.3. Наиболее простые показатели оценки кислотно-основного равновесия

Сдвиги (изменения) кислотно-основного равновесия	Моча, рН	Плазма, HCO_3^- , ммоль/л	Плазма, H_2CO_3 , ммоль/л
Норма	6—7	25	0,625
Дыхательный ацидоз	↓	↑	↑
Дыхательный алкалоз	↑	↓	↓
Метаболический ацидоз	↓	↓	↓
Метаболический алкалоз	↑	↑	↑

На практике изолированные формы дыхательных или метаболических нарушений встречаются крайне редко. Уточнить характер этих нарушений и степень компенсации помогает определение комплекса показателей кислотно-основного равновесия. В течение последних десятилетий для изучения показателей кислотно-основного равновесия широкое распространение получили чувствительные электроды для прямого изменения рН и P_{CO_2} крови. В клинических условиях удобно пользоваться приборами типа «Аstrup» либо отечественными аппаратами — АЗИВ, АКОР. При помощи этих приборов и соответствующих номограмм можно определить следующие основные показатели кислотно-основного равновесия:

1) актуальный рН крови — отрицательный десятичный логарифм концентрации водородных ионов крови в физиологических условиях;

2) актуальное P_{CO_2} цельной крови — парциальное давление углекислого газа ($\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{CO}_2$) в крови в физиологических условиях;

3) актуальный бикарбонат (АВ) — концентрация бикарбоната в плазме крови в физиологических условиях;

4) стандартный бикарбонат плазмы крови (SB) — концентрация бикарбоната в плазме крови, уравновешенной альвеолярным воздухом и при полном насыщении кислородом;

5) буферные основания цельной крови или плазмы (BB) — показатель мощности всей буферной системы крови или плазмы;

6) нормальные буферные основания цельной крови (NBB) — буферные основания цельной крови при физиологических значениях рН и P_{CO_2} альвеолярного воздуха;

7) излишек оснований (BE) — показатель избытка или недостатка буферных мощностей (BB — NBB).

ДЫХАТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ КРОВИ

Сущность дыхательной функции крови состоит в доставке кислорода от легких к тканям и углекислого газа от тканей к легким (табл. 16.4).

Таблица 16.4. Состав вдыхаемого, альвеолярного и выдыхаемого воздуха (по Уайту и др., 1981)

Газ	Вдыхаемый воздух		Альвеолярный воздух		Выдыхаемый воздух	
	P (гПа)	об. %	P (гПа)	об. %	P (гПа)	об. %
O ₂	210,9	20,95	134,9	14,0	154,9	16,1
CO ₂	0,4	0,04	53,3	5,6	38,0	4,5
N ₂	795,3	79,0	762,4	80,0	757,7	79,2
H ₂ O	6,7	—	62,7	—	62,7	—
Сумма	1013,3	99,99	1013,3	99,6	1013,3	99,8

Перенос кислорода кровью

Кровь осуществляет дыхательную функцию прежде всего благодаря наличию в ней гемоглобина. Физиологическая функция гемоглобина как переносчика кислорода основана на способности обратимо связывать кислород. Поэтому в легочных капиллярах происходит насыщение крови кислородом, а в тканевых капиллярах, где парциальное давление кислорода резко снижено, осуществляется отдача кислорода тканям.

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 в 1 мин). Доставка от легких к тканям такого количества кислорода в виде газа, физически растворенного в плазме, невозможна вследствие малой растворимости кислорода в воде и плазме крови (табл. 16.5).

Таблица 16.5. Коэффициенты абсорбции (растворимости) вдыхаемых газов (в мл/мл среды при давлении 1013,3 гПа — 760 мм рт. ст.)

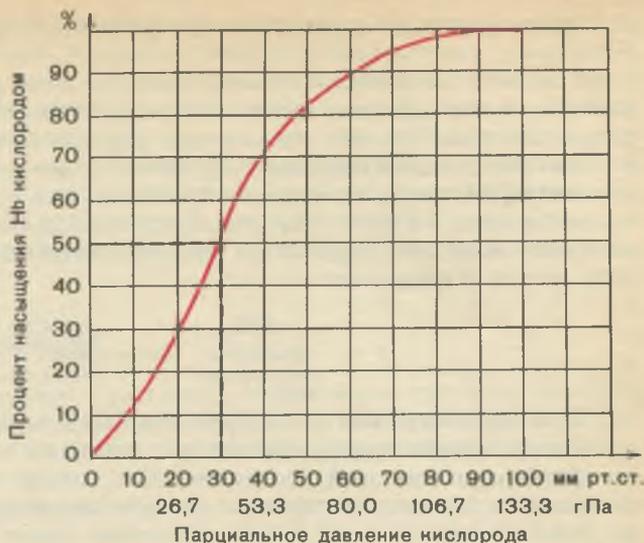
Среда	t °C	Газ		
		O ₂	CO ₂	N ₂
Вода	0	0,049	1,71	0,024
	20	0,031	0,87	0,016
Плазма	40	0,023	0,53	0,012
	38	0,024	0,51	0,012

Исходя из приведенных в таблице данных, а также зная парциальное давление кислорода в артериальной крови — 107—120 гПа (80—90 мм рт. ст.), нетрудно видеть, что количество физически растворенного кислорода в плазме крови не может превышать 0,3 об.%. При расчете кислородной емкости крови этой величиной можно пренебречь.

Итак, функцию переносчика кислорода в организме выполняет гемоглобин. Напомним, что молекула гемоглобина построена из четырех субъединиц (полипептидных цепей), каждая из которых связана с гемом (см. главу 2). Следовательно, молекула гемоглобина имеет четыре гема, к которым может присоединяться кислород. При этом гемоглобин переходит в оксигемоглобин.

Гемоглобин человека содержит 0,335% железа. Каждый грамм-атом железа

Рис. 16.3. Кривая диссоциации оксигемоглобина. Пунктирной линией обозначена величина P_{50} .



(55,84 г) в составе гемоглобина при полном насыщении кислородом связывает 1 грамм-молекулу кислорода (22400 мл). Таким образом, 100 г гемоглобина могут связать

$$\frac{0,335 \cdot 22400}{55,84} = 134 \text{ мл кислорода,}$$

а каждый грамм гемоглобина — 1,34 мл кислорода. Содержание гемоглобина в крови здорового человека составляет 13–16%, т. е. в 100 мл крови находится 13–16 г гемоглобина. При P_{O_2} в артериальной крови 107–120 гПа гемоглобин насыщен кислородом на 96%. Следовательно, в этих условиях 100 мл крови содержат 19–20 об.% кислорода:

$$\frac{15 \cdot 1,34 \cdot 96}{100} = 19,3 \text{ мл кислорода (в среднем 19–20 об.%)}$$

В венозной крови в состоянии покоя $P_{O_2} = 53,3$ гПа, и в этих условиях гемоглобин насыщен кислородом лишь на 70–72%, т. е. содержание кислорода в 100 мл венозной крови не превышает

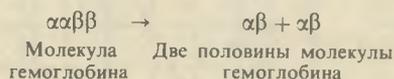
$$\frac{15 \cdot 1,34 \cdot 70}{100} = 14,1 \text{ мл кислорода (~ 14 об.%)}$$

Артериовенозная разница по кислороду будет равна ~6 об.%¹. Таким образом, за 1 мин ткани в состоянии покоя получают 200–240 мл кислорода (при условии, что минутный объем сердца в покое составляет 4 л).

Возрастание интенсивности окислительных процессов в тканях, например при усиленной мышечной работе, всегда связано с более полным извлечением кислорода из крови. Кроме того, при физической работе резко увеличивается скорость кровотока. Зависимость между степенью насыщения гемоглобина кислородом и P_{O_2} можно выразить в виде кривой насыщения гемоглобина кислородом, или кривой диссоциации оксигемоглобина, которая имеет S-образную форму и характеризует сродство гемоглобина к кислороду (рис. 16.3).

¹ Артериовенозная разница по кислороду в разных органах далеко не одинакова и зависит от уровня метаболизма органа. В миокарде она составляет 12, в мозге — 6, в желудочно-кишечном тракте — 3, в почках — 1,5 об.%.

Характерная для гемоглобина S-образная кривая насыщения кислородом свидетельствует, что связывание первой молекулы кислорода одним из гемов гемоглобина облегчает связывание последующих молекул кислорода тремя другими оставшимися гемами. Долгое время механизм, лежащий в основе этого эффекта, оставался загадкой, так как по данным рентгеноструктурного анализа четыре гема в молекуле гемоглобина довольно далеко отстоят друг от друга и вряд ли могут оказывать взаимное влияние. В последнее время принято следующее объяснение происхождения S-образной кривой. Считают, что тетрамерная молекула гемоглобина способна обратимо распадаться на две половинки, каждая из которых содержит одну α -цепь и одну β -цепь:



При взаимодействии молекулы кислорода с одним из четырех гемов гемоглобина происходит присоединение кислорода к одной из половинок молекулы гемоглобина (допустим, к α -цепи этой половинки). Как только такое присоединение произойдет, α -полипептидная цепь претерпевает конформационные изменения, которые передаются на тесно связанную с ней β -цепь, последняя также подвергается конформационным сдвигам. β -Цепь присоединяет кислород, имея уже большее сродство к нему. Таким путем связывание одной молекулы кислорода благоприятствует связыванию второй молекулы (так называемое кооперативное взаимодействие).

После насыщения кислородом одной половины молекулы гемоглобина возникает новое, внутреннее, напряженное состояние молекулы гемоглобина, которое вынуждает и вторую половинку гемоглобина изменить конформацию. Теперь еще две молекулы кислорода, по-видимому, по очереди связываются со второй половинкой¹ молекулы гемоглобина, образуя оксигемоглобин.

S-образная форма кривой насыщения гемоглобина кислородом имеет большое физиологическое значение. При такой форме кривой обеспечивается возможность насыщения крови кислородом при изменении P_{O_2} в довольно широких пределах. Например, дыхательная функция крови существенно не нарушается при снижении P_{O_2} в альвеолярном воздухе с 133,3 до 80–93,3 гПа. Поэтому подъем на высоту до 3–3,5 км над уровнем моря не сопровождается развитием выраженной гипоксемии.

Численно сродство гемоглобина к кислороду принято выражать через величину P_{50} — парциальное напряжение кислорода, при котором 50% гемоглобина связано с кислородом (рН 7,4, температура 37°C). Нормальная величина P_{50} около 34,67 гПа (см. рис. 16.3). Смещение кривой насыщения гемоглобина кислородом вправо означает уменьшение способности гемоглобина связывать кислород и, следовательно, сопровождается повышением P_{50} . Напротив, смещение кривой влево свидетельствует о повышенном сродстве гемоглобина к кислороду, величина P_{50} снижена.

Ход кривой насыщения гемоглобина кислородом или диссоциации оксигемоглобина зависит от ряда 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} . 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 также от температуры. Чем выше температура (в тканях температура выше, чем в легких), тем меньше сродство

¹ Термин «субъединица» не вполне однозначен в применении к молекуле гемоглобина, так как она содержит четыре структурных элемента (две α -цепи и две β -цепи), но имеет при этом только две функциональные субъединицы, а именно две $\alpha\beta$ -половинки.

гемоглобина к кислороду. Напротив, снижение температуры вызывает обратные явления.

Количество гемоглобина в крови, а также в какой-то мере его способность связывать кислород (характер кривой диссоциации оксигемоглобина) несколько меняются с возрастом. Например, у новорожденных содержание гемоглобина доходит до 20—21% (вместо обычных для взрослого 13—16%). У человека имеется несколько гемоглобинов, которые образуются в различном количестве в разные стадии онтогенеза и отличаются по своему сродству к кислороду.

Рассмотрим нарушения дыхательной функции крови при некоторых патологических состояниях.

Различные формы гипоксии

Гипоксия (кислородное голодание) — состояние, возникающее при недостаточном снабжении тканей организма кислородом или нарушении его утилизации в процессе биологического окисления. Согласно классификации, предложенной И. Р. Петровым, гипоксии делятся на две группы:

1. Гипоксия вследствие понижения P_{O_2} во вдыхаемом воздухе (экзогенная гипоксия).

2. Гипоксия при патологических процессах, нарушающих снабжение тканей кислородом при нормальном содержании его в окружающей среде. Сюда относятся следующие типы: а) дыхательный (легочный); б) сердечно-сосудистый (циркуляторный); в) кровяной (гемический); г) тканевый (гистотоксический); д) смешанный.

Гипоксия вследствие понижения парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе. Этот вид гипоксии возникает главным образом при подъеме на высоту. Может наблюдаться и в тех случаях, когда общее барометрическое давление нормально, но P_{O_2} понижено, например при авариях в шахтах, неполадках в системе кислородообеспечения кабины летательного аппарата, в подводных лодках и т. п., а также во время операций при неисправности наркозной аппаратуры.

При экзогенной гипоксии развивается гипоксемия, т. е. уменьшается парциальное давление кислорода в артериальной крови и снижается насыщение гемоглобина кислородом.

Гипоксия при патологических процессах, нарушающих снабжение или утилизацию кислорода тканями. Дыхательный (легочный) тип гипоксии возникает в связи с альвеолярной гиповентиляцией, что может быть обусловлено нарушением проходимости дыхательных путей (воспалительный процесс, инородные тела, спазм), уменьшением дыхательной поверхности легких (отек легкого, пневмония и т. д.). В подобных случаях снижаются P_{O_2} в альвеолярном воздухе и напряжение кислорода в крови, в результате чего уменьшается насыщение гемоглобина кислородом. Обычно нарушается также выведение из организма углекислого газа и к гипоксии присоединяется гиперкапния.

Сердечно-сосудистый (циркуляторный) тип гипоксии наблюдается при нарушениях кровообращения, приводящих к недостаточному кровоснабжению органов и тканей. Для газового состава крови в типичных случаях циркуляторной гипоксии характерны нормальные напряжение и содержание кислорода в артериальной крови, снижение этих показателей в венозной крови и высокая артерио-венозная разница по кислороду.

Кровяной (гемический) тип гипоксии возникает в результате уменьшения кислородной емкости крови при анемиях, обусловленных значительным уменьшением эритроцитарной массы или резким понижением содержания гемоглобина в эритроцитах. В этих случаях P_{O_2} в венозной крови резко снижено.

Гемическая гипоксия наблюдается также при отравлении оксидом углерода (образование карбоксигемоглобина) и метгемоглобинообразователями (метгемоглобинемия), а также при некоторых генетически обусловленных аномалиях гемогло-

бина. При образовании карбоксигемоглобина и метгемоглобина напряжение кислорода в венозной крови и тканях оказывается значительно пониженным при одновременном уменьшении артериовенозной разницы содержания кислорода.

Тканевый (гистотоксический) тип гипоксии обычно обусловлен нарушением способности тканей поглощать кислород из крови. Утилизация кислорода тканями может затрудняться в результате угнетения биологического окисления различными ингибиторами, нарушения синтеза ферментов или повреждения мембранных структур клетки. Типичным примером тканевой гипоксии может служить отравление цианидами. Попадая в организм, ионы CN^- активно взаимодействуют с трехвалентным железом, тем самым блокируя конечный фермент дыхательной цепи — цитохромоксидазу, в результате подавляется потребление кислорода клетками. Иными словами, при гистотоксической гипоксии ткани не в состоянии извлекать кислород из тканевых капилляров даже при высоких значениях P_{O_2} .

Перенос углекислого газа кровью от тканей к легким

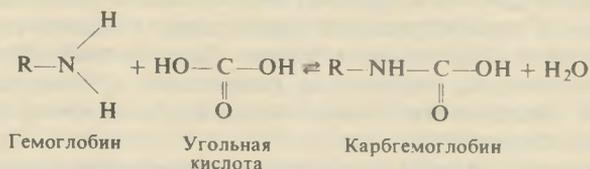
В организме человека, не выполняющего физической работы (состояние покоя), от тканей к легким каждую минуту переносится примерно 180 мл углекислого газа.

Это легко рассчитать. Если дыхательный коэффициент равен 0,85, то при поглощении тканями человека в покое 200 мл кислорода в минуту должно образовываться ($200 \cdot 0,85$) около 170 мл углекислого газа. На самом деле эта величина несколько больше, поскольку количество поглощаемого в покое кислорода колеблется от 200 до 240 мл в 1 мин.

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 942,8 г), что соответствует 21,4 моль углекислого газа.

Организм располагает несколькими механизмами переноса CO_2 от тканей к легким. Часть CO_2 переносится в физически растворенном виде. Хотя растворимость CO_2 в плазме крови в 40 раз превышает растворимость в ней кислорода, тем не менее при небольшой артериовенозной разнице в P_{CO_2} (напряжение CO_2 в венозной крови, протекающей к легким по легочной артерии, равно 60 гПа, а в артериальной крови — около 53,3 гПа) в физически растворенном виде может быть перенесено в покое 12—15 мл CO_2 , что составляет 6—7% от всего количества переносимого углекислого газа.

Некоторое количество CO_2 может переноситься в виде карбаминовой формы. Оказалось, что CO_2 может присоединяться к гемоглобину посредством карбаминовой связи, образуя карбгемоглобин, или карбаминогемоглобин (впервые мысль о наличии углекислого газа, непосредственно связанного с гемоглобином, была высказана И. М. Сеченовым):



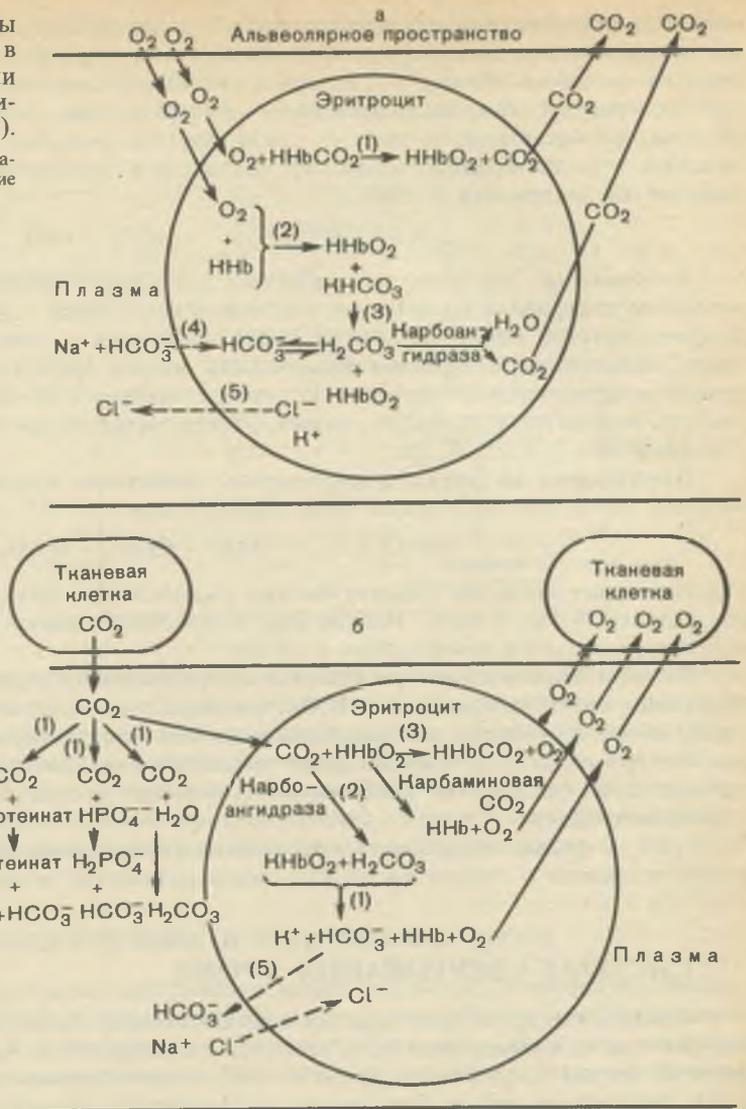
или



Карбгемоглобин — соединение очень нестойкое и чрезвычайно быстро диссоциирует в легочных капиллярах с отщеплением CO_2 . Количество карбаминовой формы

Рис. 16.4. Роль системы «плазма — эритроцит» в дыхательной функции крови (по Г. Е. Владимирову, Н. С. Пантелеевой).

а — химические процессы в капиллярах крови; б — химические процессы в капиллярах ткани.

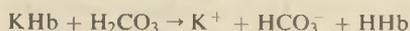


невелико: в артериальной крови оно составляет 3 об.%, в венозной — 3,8 об.%¹. В виде карбаминной формы из тканей к легким переносится от 3 до 10% всего углекислого газа, поступающего из тканей в кровь. Основная масса CO₂ транспортируется с кровью к легким в форме бикарбоната, при этом важнейшую роль играет гемоглобин эритроцитов.

Как уже отмечалось, кислотный характер оксигемоглобина выражен значительно сильнее, чем гемоглобина (константа диссоциации HНbO₂ примерно в 20 раз больше константы диссоциации HНb). Важно также запомнить, что поступающий в ткани с кровью оксигемоглобин, являющийся более сильной кислотой, чем H₂CO₃, связан с катионами калия. Эту калийную соль оксигемоглобина можно обозначить как КНbO₂ (рис. 16.4). В периферических капиллярах большого круга кровообращения

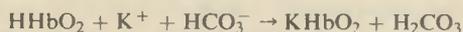
¹ Содержание карбаминной формы CO₂ в венозной крови — 1,5–2,0 ммоль/л, в артериальной — 1,0 ммоль/л.

гемоглобин эритроцитов отдает кислород тканям ($\text{KнbO}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{Kнb}$), его способность связывать ионы водорода увеличивается. Одновременно в эритроцит поступает продукт тканевого обмена — углекислый газ. Под влиянием фермента карбоангидразы¹ 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 анионы HCO_3^- выходят из эритроцита в плазму²:



В обмен на эти ионы в эритроцит поступают анионы хлора, для которых мембрана эритроцита проницаема, 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 . Этот процесс способствует восстановлению щелочного резерва крови, т. е. бикарбонатная буферная система находится в довольно тесных функциональных связях с буферной системой эритроцитов.

В легочных капиллярах, в эритроцитах, происходит процесс вытеснения угольной кислоты из бикарбоната калия оксигемоглобином:



Образующаяся угольная кислота быстро расщепляется при участии карбоангидразы на углекислый газ и воду. Низкое P_{CO_2} в просвете альвеол способствует диффузии углекислого газа из эритроцитов в легкие.

По мере снижения в эритроцитах концентрации бикарбоната из плазмы крови в них поступают новые порции ионов HCO_3^- , а в плазму выходит эквивалентное количество ионов хлора. Концентрация бикарбоната натрия в плазме крови в легочных капиллярах быстро падает, но одновременно в плазме повышается концентрация хлорида натрия, а в эритроцитах свободный гемоглобин превращается в калийную соль оксигемоглобина.

Итак, в форме бикарбоната при участии гемоглобина эритроцитов транспортируется с кровью к легким более 80% всего количества углекислого газа.

СИСТЕМА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Способность крови свертываться с образованием сгустка в просвете кровеносных сосудов при их повреждении была известна с незапамятных времен. Создание первой научной теории свертывания крови в 1872 г. принадлежит А. А. Шмидту, профессору Юрьевского (ныне Тартуского) университета. Первоначально она сводилась к следующему: свертывание крови — ферментативный процесс; для свертывания крови необходимо присутствие трех веществ — фибриногена, фибринопластического вещества и тромбина. В ходе реакции, катализируемой тромбином, первые два вещества, соединяясь между собой, образуют фибрин. Циркулирующая в сосудах кровь не свертывается по причине отсутствия в ней тромбина.

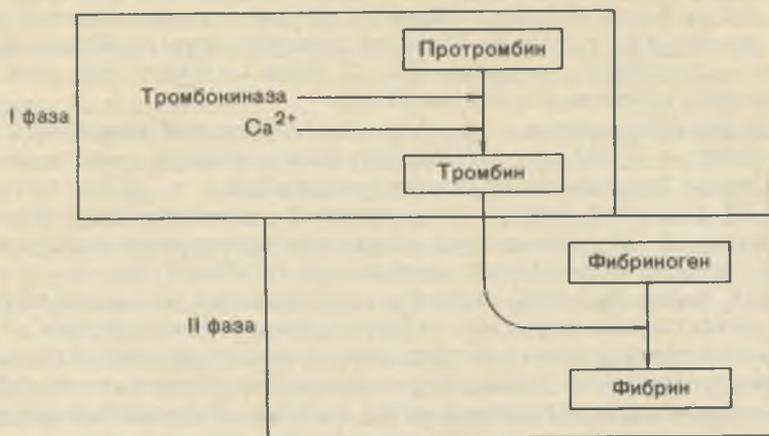
В результате дальнейших исследований А. А. Шмидта и его школы, а также Моравица, Гаммарстена, Спиро и др. было установлено, что образование фибрина происходит за счет одного предшественника — фибриногена. Проферментом тромбина является протромбин, для процесса свертывания необходимы тромбокиназа тромбодитов и ионы кальция.

¹ Карбоангидраза существует в нескольких молекулярных формах (изоферменты А, В и С), которые можно разделить при помощи электрофореза.

² Артериальная кровь содержит 25,5 ммоль/л HCO_3^- в плазме и 12,7 ммоль/л в эритроцитах; венозная кровь — соответственно 26,4 и 13,9 ммоль/л.

Таким образом, через 20 лет после открытия тромбина была сформулирована классическая ферментативная теория свертывания крови, которая в литературе получила название теории Шмидта—Моравица.

В схематической форме теория Шмидта—Моравица может быть представлена в следующем виде:



Протромбин переходит в активный фермент тромбин под влиянием тромбокиназы, содержащейся в тромбоцитах и освобождающейся из них при разрушении кровяных пластинок, и ионов кальция (1-я фаза). Затем под влиянием образовавшегося тромбина фибриноген превращается в фибрин (2-я фаза). Однако сравнительно простая по своей сути теория Шмидта—Моравица в дальнейшем необычайно усложнилась, обросла новыми сведениями, «превратив» свертывание крови в сложнейший ферментативный процесс, разобраться в котором полностью — дело будущего.

Современные представления о свертывании крови

Установлено, что в процессе свертывания крови участвуют компоненты плазмы, тромбоцитов и ткани, которые называются факторами свертывания крови. Факторы свертывания, связанные с тромбоцитами, принято обозначать арабскими цифрами (1, 2, 3 и т. д.), а факторы свертывания, находящиеся в плазме крови, — римскими цифрами (I, II, III и т. д.).

Факторы плазмы крови

Фактор I (фибриноген) — важнейший компонент свертывающей системы крови, так как биологической сущностью процесса свертывания крови является образование фибрина из фибриногена. Фибриноген состоит из трех пар неидентичных полипептидных цепей, которые связаны между собой дисульфидными связями. Каждая цепь имеет олигосахаридную группу. Соединение между белковой частью и углеводными компонентами осуществляется посредством связи остатка аспарагина с N-ацетилглюкозаминном. Общая длина молекулы фибриногена 45 нм, молекулярная масса 330 000—340 000 Да. При электрофоретическом разделении белков плазмы крови на бумаге фибриноген движется между β - и γ -глобулинами. Синтезируется данный белок в печени, концентрация его в плазме крови человека составляет 8,2—12,9 мкмоль/л.

Фактор II (протромбин) является одним из основных белков плазмы крови, определяющих свертывание крови. При гидролитическом расщеплении протромбина обра-

зуется активный фермент свертывания крови — тромбин¹. Концентрация протромбина в плазме крови 1,4–2,1 мкмоль/л. Он является гликопротеином, который содержит 11–14% углеводов, включая гексозы, гексозамины и нейраминоновую кислоту. По электрофоретической подвижности протромбин относится к α_2 -глобулинам, имеет молекулярную массу 68 000–70 000 Да. Размеры большой и малой осей его молекулы соответственно 11,9 и 3,4 нм. Изoeлектрическая точка очищенного протромбина лежит в пределах рН от 4,2 до 4,4. Синтезируется данный белок в печени, в его синтезе принимает участие витамин К. Одна из специфических особенностей молекулы протромбина — способность связывать 10–12 ионов кальция, при этом наступают конформационные изменения молекулы белка.

Преобразование протромбина в тромбин связано с резким изменением молекулярной массы белка (с 70 000 до ~35 000 Да). Есть основания считать, что тромбин является большим фрагментом молекулы протромбина.

Фактор III (тканевый фактор, или тканевый тромбопластин) образуется при повреждении тканей. Это комплексное соединение липопротеиновой природы, отличается очень высокой молекулярной массой — до 167 000 000 Да.

Фактор IV (ионы кальция). Известно, что удаление из крови ионов кальция (осаждение оксалатом или фторидом натрия), а также перевод ионов Ca^{2+} в неионизированное состояние (с помощью цитрата натрия) предупреждают свертывание крови. Следует также помнить, что нормальная скорость свертывания крови обеспечивается лишь оптимальными концентрациями ионов кальция. Для свертывания крови человека, декальцинированной с помощью ионообменников, оптимальная концентрация ионов кальция определена в 1,0–1,2 ммоль/л. Концентрация ионов Ca^{2+} ниже и выше оптимальной обуславливает замедление процесса свертывания. Ионы кальция играют важную роль почти на всех фазах (стадиях) свертывания крови: они необходимы для образования активного фактора X и активного тромбопластина тканей, принимают участие в активации проконвертина, образовании тромбина, лабильзации мембран тромбоцитов и в других процессах.

Фактор V (проакцелерин) относится к глобулиновой фракции плазмы крови. Он является предшественником акцелерина (активного фактора). Фактор V синтезируется в печени, поэтому при поражении этого органа может возникнуть недостаточность проакцелерина. Кроме того, существует врожденная недостаточность в крови фактора V, которая носит название парагемофилии и представляет собой одну из разновидностей геморрагических диатезов.

Фактор VII (антифибринолизин, проконвертин) — предшественник конвертина. Механизм образования активного конвертина из проконвертина изучен мало. Биологическая роль фактора VII сводится прежде всего к участию во внешнем пути свертывания крови.

Синтезируется фактор VII в печени при участии витамина К. Снижение концентрации проконвертина в крови наблюдается на более ранних стадиях заболевания печени, чем падение уровня протромбина и проакцелерина.

Фактор VIII (антигемофильный глобулин А) является необходимым компонентом крови для формирования активного фактора X. Он очень лабилен. При хранении цитратной плазмы его активность снижается на 50% за 12 ч при температуре 37°C. Врожденный недостаток фактора VIII является причиной тяжелого заболевания — гемофилии А — наиболее частой формы коагулопатии.

Фактор IX (антигемофильный глобулин В, кристмас-фактор) принимает участие в образовании активного фактора X. Геморрагический диатез, вызванный недостаточностью фактора IX в крови, называют гемофилией В. Обычно при дефиците фак-

¹ Роль тромбина в процессе свертывания крови не исчерпывается его действием на фибриноген. В зависимости от концентрации тромбин способен активировать или инактивировать протромбин, растворять фибриновый сгусток, а также переводить проакцелерин в акцелерин и др.

тора IX геморрагические нарушения носят менее выраженный характер, чем при недостаточности фактора VIII.

Фактор X (фактор Прауэра—Стюарта) назван по фамилиям больных, у которых был впервые обнаружен его недостаток. Он относится к α -глобулинам, имеет молекулярную массу 87 000 Да. Фактор X участвует в образовании тромбина из протромбина. У пациентов с недостатком фактора X увеличено время свертывания крови, нарушена утилизация протромбина. Клиническая картина при недостаточности фактора X выражается в кровотечениях, особенно после хирургических вмешательств или травм. Фактор X синтезируется клетками печени; его синтез зависит от содержания витамина K в организме.

Фактор XI (фактор Розенталя) — антигемофильный фактор белковой природы. Недостаточность этого фактора при гемофилии C была открыта в 1953 г. Розенталем. Фактор XI называют также плазменным предшественником тромбопластина.

Фактор XII (фактор Хагемана) — участвует в пусковом механизме свертывания крови. Он также стимулирует фибринолитическую активность, кининовую систему и некоторые другие защитные реакции организма. Активация фактора XII происходит прежде всего в результате взаимодействия его с различными «чужеродными поверхностями» — кожей, стеклом, металлом и т. д.

Врожденный недостаток данного белка вызывает заболевание, которое назвали болезнью Хагемана, по фамилии первого обследованного больного, страдавшего этой формой нарушения свертывающей функции крови: увеличенное время свертывания крови при отсутствии геморрагий.

Фактор XIII (фибринстабилизирующий фактор) является белком плазмы крови, который стабилизирует образовавшийся фибрин, т. е. участвует в образовании прочных межмолекулярных связей в фибрин-полимере. Молекулярная масса фактора XIII 330 000—350 000 Да. Он состоит из трех полипептидных цепей, каждая из которых имеет молекулярную массу порядка 110 000 Да.

Факторы тромбоцитов

Кроме факторов плазмы и тканей, в процессе свертывания крови принимают участие факторы, связанные с тромбоцитами. В настоящее время известно около 10 отдельных факторов тромбоцитов; ниже будут перечислены лишь некоторые из них.

Фактор 1 тромбоцитов представляет собой адсорбированный на поверхности тромбоцитов проакцелерин; с тромбоцитами связано около 5% всего проакцелерина крови.

Фактор 3 — один из важнейших компонентов свертывающей системы крови. Вместе с рядом факторов плазмы он необходим для образования тромбина из протромбина.

Фактор 4 является антигепариновым фактором, тормозит антитромбопластиновое и антитромбиновое действие гепарина. Кроме того, фактор 4 принимает активное участие в механизме агрегации тромбоцитов.

Фактор 8 (тромбостенин) участвует в процессе ретракции фибрина, очень лабилен, обладает АТФазной активностью. Освобождается при склеивании и разрушении тромбоцитов в результате изменения физико-химических свойств поверхностных мембран.

До настоящего времени отсутствует общепринятая схема, достаточно полно отражающая сложный, многоступенчатый процесс свертывания крови. Не вдаваясь в ряд недостаточно еще изученных деталей, его можно представить следующим образом.

При повреждении сосудов возникает своеобразная цепная реакция, первым звеном которой является активация фактора XII. Этот фактор при соприкосновении с поврежденной поверхностью сосуда или какой-либо смачиваемой чужеродной поверх-

ностью превращается в активную форму¹. Активный фактор XII (фактор XIIa) вызывает ряд последовательных реакций активации, в которые вовлекаются другие белковые факторы плазмы крови (факторы VIII, IX, X и др.). Кроме того, фактор XIIa способствует изменению свойств мембраны тромбоцитов и освобождению фактора 3 тромбоцитов.

Принято считать, что фактор III, переходящий в плазму крови при повреждении тканей, а также, по-видимому, фактор 3 тромбоцитов создают предпосылки для образования минимального (затравочного) количества тромбина (из протромбина). Этого минимального количества тромбина недостаточно для быстрого превращения фибриногена в фибрин и, следовательно, для свертывания крови. В то же время следы образовавшегося тромбина катализируют превращение проакцелерина и проконвертина в акцелерин (фактор Va) и соответственно в конвертин (фактор VIIa).

В результате сложного взаимодействия перечисленных факторов, а также ионов Ca^{2+} происходит образование активного фактора X (фактор Xa). Затем под влиянием комплекса факторов: Xa, Va, 3 и ионов кальция (фактор IV) происходит образование тромбина из протромбина.

Ряд исследователей выделяют «внутреннюю» и «внешнюю» системы свертывания крови². Под «внешней» системой подразумевают образование активного фактора III и его участие совместно с рядом других факторов в процессах гемокоагуляции. Далее под влиянием фермента тромбина от фибриногена отщепляются два пептида А и два пептида В (молекулярная масса пептида А — 2000, а пептида В — 2400 Да). Установлено, что тромбин разрывает пептидную связь аргинин—лизин.

Таблица 16.6. Участие факторов коагуляции во «внутреннем» и «внешнем» путях свертывания крови

Факторы		Путь коагуляции	
полное название	сокращенное обозначение	«внутренний»	«внешний»
Фибриноген	I	+	+
Протромбин	II	+	+
Тканевый фактор (или тканевый тромбопластин)	III	—	+
Ионы кальция	IV	+	+
Проакцелерин ¹	V	+	+
Проконвертин	VII	—	+
Антигемофильный глобулин А	VIII	+	—
Фактор Кристмаса	IX	+	—
Фактор Прауэра—Стюарта	X	+	+
Фактор Розенталя	XI	+	—
Фактор Хагемана	XII	+	—
Фибринстабилизирующий фактор	XIII	+	+
Фосфолипид тромбоцитов	3	+	+
Тромбостенин тромбоцитов	8	+	+

¹ Активный фактор V (акцелерин) иногда рассматривают как самостоятельный фактор, который обозначают как фактор VI.

После отщепления пептидов, получивших название «фибрин-пептидов», фибриноген превращается в хорошо растворимый в плазме крови фибрин-мономер, который затем быстро полимеризуется в нерастворимый фибрин-полимер. Превращение фибрин-

¹ Активация фактора XII может также происходить при взаимодействии с XIII, при появлении в кровяном русле избытка адреналина, а также при некоторых других условиях.

² По-видимому, обе системы способны независимо одна от другой превращать протромбин в тромбин. Физиологическое значение участия именно обеих систем в процессе свертывания крови окончательно не выяснено.

Контакт крови с поврежденной поверхностью сосудов



а

Повреждение тканей



б

Рис. 16.5. Система свертывания крови. а – «внутренний» путь; б – «внешний» путь.

мономера в фибрин-полимер протекает с участием фибринстабилизирующего фактора – фактора XIII в присутствии ионов Ca^{2+} .

Известно, что вслед за образованием нитей фибрина происходит их сокращение. Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют, что ретракция кровяного сгустка является процессом, требующим энергии АТФ. Необходим также фактор 8 тромбоцитов (тромбостенин). Последний по своим свойствам напоминает актомиозин мышц и обладает АТФазной активностью. Таковы основные стадии свертывания крови.

В табл. 16.6 представлено участие факторов свертывания крови во «внутреннем» и «внешнем» путях гемокоагуляции.

Начиная с этапа образования активного фактора X (фактора Xa), «внутренний» (а) и «внешний» (б) пути свертывания крови совпадают (рис. 16.5).

ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩАЯ СИСТЕМА КРОВИ

Несмотря на наличие очень мощной свертывающей системы, кровь находится в живом организме в жидком состоянии. Многочисленные исследования, направленные на выяснение причин и механизмов поддержания крови в жидком состоянии во время циркуляции ее в кровяном русле, позволили в значительной степени выяснить природу противосвертывающей системы крови. Оказалось, что в образовании ее, так же как и в формировании системы свертывания крови, участвует ряд факторов плазмы крови, тромбоцитов и тканей. К ним относят различные антикоагулянты — антитромбопластины, антитромбины, а также фибринолитическую систему крови. Считается, что в организме существуют специфические ингибиторы для каждого фактора свертывания крови (антиакцелерин, антиконвертин и др.). Снижение активности этих ингибиторов повышает свертываемость крови и способствует образованию тромбов. Повышение активности ингибиторов, наоборот, затрудняет свертывание крови и может сопровождаться развитием геморрагий. Сочетание явлений рассеянного тромбоза и геморрагии может быть обусловлено нарушением регуляторных взаимоотношений свертывающей и противосвертывающей систем.

Наиболее быстро действующими компонентами противосвертывающей системы являются антитромбины. Они относятся к так называемым прямым антикоагулянтам, так как находятся в активной форме, а не в виде предшественников. Предполагают, что в плазме крови существует около шести различных антитромбинов. Наиболее изученным из них является гепарин, который препятствует действию тромбина на фибриноген и тормозит превращение протромбина в тромбин. Гепарин предупреждает свертывание крови как *in vitro*, так и *in vivo*. Действие гепарина в случае его передозировки можно устранить связыванием его рядом веществ — антагонистов гепарина. К ним относится прежде всего протамина сульфат.

В кровеносных сосудах имеются хеморецепторы, способные реагировать на появление в крови активного тромбина, связанные с нейрогуморальным механизмом, регулирующим образование антикоагулянтов. Таким образом, если тромбин появляется в циркулирующей крови в условиях нормального нейрогуморального контроля, то в этом случае он не только не вызывает свертывания крови, но, напротив, рефлекторно стимулирует образование антикоагулянтов и тем выключает свертывающий механизм.

Не менее важно применение так называемых искусственных антикоагулянтов. Например, учитывая, что витамин К стимулирует синтез в печени протромбина, проакцелерина, проконвертина, фактора X, для снижения активности свертывающей системы крови назначают антикоагулянты типа антивитаминов К. Это прежде всего дикумарин, неодикумарин, пелентан, синкумар и др. Антивитамины К тормозят в клетках печени синтез перечисленных выше факторов свертывания крови. Этот способ воздействия дает эффект не сразу, а спустя несколько часов и даже дней.

Фибринолиз

В организме существует также мощная фибринолитическая система, обеспечивающая возможность растворения (фибринолиз) уже сформировавшихся кровяных сгустков (тромбов). Механизм фибринолиза представлен на рис. 16.6.

Ретрагированный сгусток фибрина в организме человека и животных подвергается под влиянием протеолитического фермента плазмы крови — плазмина (фибринолизина) — постепенному рассасыванию с образованием ряда растворимых в воде продуктов гидролиза (пептидов). В норме плазмин находится в крови в форме неактивного предшественника — плазминогена (фибринолизиногена, или профибринолизина). Превращение плазминогена в плазмин сопровождается отщеплением

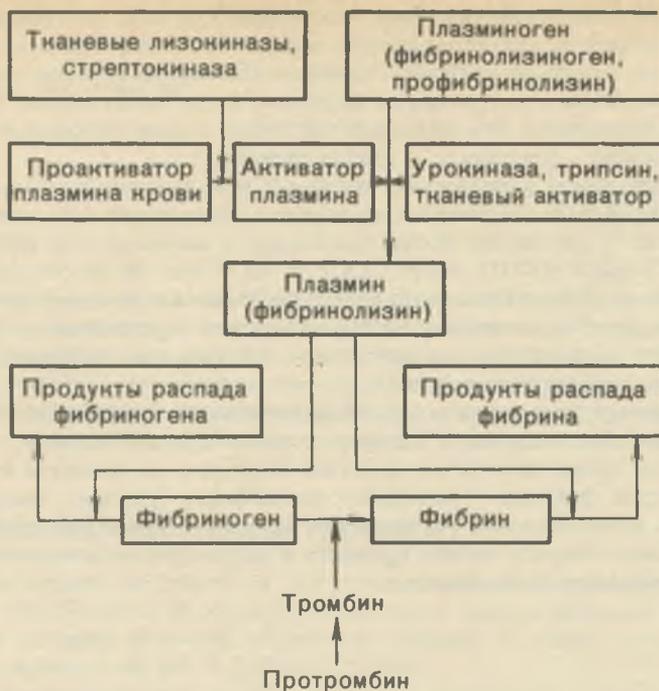


Рис. 16.6. Фибринолиз (схема).

от полипептидной цепи 25% аминокислотных остатков. Катализируется эта реакция как активаторами крови, так и активаторами тканей¹.

Ведущая роль в этом процессе принадлежит кровяным активаторам. Однако в норме активность кровяных активаторов плазминогена крайне низкая, т. е. они находятся в основном в форме проактиваторов. Весьма быстрое превращение кровяного проактиватора в активатор плазминогена происходит под влиянием тканевых лизокиназ, а также стрептокиназы. Стрептокиназа вырабатывается гемолитическим стрептококком и в обычных условиях в крови отсутствует. Однако при стрептококковой инфекции возможно образование стрептокиназы в большом количестве, что иногда приводит к усиленному фибринолизу и развитию геморрагического диатеза.

Необходимо также иметь в виду, что наряду с фибринолитической системой крови человека имеется и система антифибринолитическая. Она состоит из различных антикиназ, антиплазмينا и других антиактиваторов.

В практической медицине в лечебных целях ферментные препараты и их ингибиторы широко используются при нарушении свертывающей и противосвертывающей систем крови. С одной стороны, при тромбоэмболической болезни применяют ферменты, способствующие либо лизису образовавшегося тромба, либо снижению повышенной свертываемости крови. С другой стороны, при состояниях, сопровождающихся развитием фибринолиза, используются ингибиторы ферментов.

¹ Тканевые активаторы плазминогена в наибольшем количестве имеются в легких, матке, предстательной железе. Поэтому при операциях на этих органах вследствие выхода значительного количества активатора из ткани в кровяное русло может возникнуть острый фибринолиз.

Исследования последних лет дают основание считать, что введение плазмина в сочетании с гепарином (антитромбином) может быть эффективным не только при лечении тромбоза легочной артерии, тромбофлебитов, но и при лечении инфаркта миокарда, если вводить эти препараты в первые часы заболевания. В качестве фибринолитических препаратов при инфаркте миокарда можно использовать также активаторы пламиногена — урокиназу и стрептокиназу.

Новое перспективное направление связано с использованием иммобилизованных ферментов. Такие формы ферментов полностью сохраняют каталитическую активность, действие их в организме более длительно, а антигенность снижена. Совместными усилиями ученых ВКНЦ АМН СССР и МГУ им. М. В. Ломоносова созданы иммобилизованные ферментные препараты фибринолитического действия. В частности, получена иммобилизованная водорастворимая стрептокиназа (стрептодеказа), которая оказывает выраженное положительное действие при эмболиях легочной артерии и тромбозах коронарных сосудов.

Следует помнить, что терапия тромболитическими препаратами связана подчас с определенными опасностями и требует хорошо организованного лабораторного контроля, так как протеолитическое действие плазмина не является строго специфическим только для фибрина — основного компонента тромба: введение плазмина может вызывать нежелательное расщепление многих важных для свертывания крови веществ, что в свою очередь может привести к серьезным осложнениям, в частности к развитию геморрагического диатеза.

ПОЧКИ И МОЧА

Масса обеих почек у взрослого человека около 300 г. Почки — один из важнейших органов, основная задача которого заключается в поддержании постоянства внутренней среды организма.

Почки участвуют в регуляции водно-электролитного баланса, поддержании кислотно-основного равновесия, выделения азотистых шлаков, поддержания осмотического давления жидкостей организма, регуляции кровяного давления, стимуляции ритмопоеза и т. д.

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ПОЧЕК

Ткань почки можно разделить на две зоны: внешнюю (корковую) красно-коричневого цвета и внутреннюю (мозговую), имеющую лилово-красный цвет. Основная функциональная единица почечной паренхимы нефрон. В обеих почках человека их около 2 млн, у крысы — 62 000, у собаки 816 000.

В нефроне млекопитающих можно выделить следующие отделы (рис. 17.1): почечное (мальпигиево) тельце, состоящее из сосудистого клубочка Шумлянского и окружающей клубочек капсулы (капсулы Боумена)¹; проксимальный сегмент нефрона, состоящий из проксимального извитого и прямого канальцев; тонкий сегмент, содержащий тонкое нисходящее и тонкое восходящее колена петли нефрона (петли Генле); дистальный сегмент, состоящий из толстого восходящего колена петли нефрона, дистального извитого и связующего канальцев. Связующий каналец соединяется с собирательной трубкой. Последние проходят через корковое и мозговое вещества почки и, сливаясь вместе, образуют в почечном сосочке протоки, открывающиеся в чашечки.

В почке млекопитающих различают два типа нефронов: корковые (85%), почечное тельце которых локализуется в наружной зоне коркового вещества, и юкстамедуллярные (15%), клубочки которых расположены на границе коркового и мозгового вещества почки.

МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ МОЧИ

В нефроне происходят три главных процесса: фильтрация в клубочках, реабсорбция и секреция в канальцах.

Клубочковая фильтрация. Начальным этапом образования мочи является фильтрация в клубочках почечных телец. Клубочковая фильтрация — пассивный процесс. В условиях покоя у взрослого человека около $\frac{1}{4}$ части крови, выбрасываемой в аорту левым желудочком сердца, поступает в почечные артерии. Иными словами, через обе почки у взрослого мужчины проходит около 1300 мл крови в минуту, у женщин несколько меньше. Общая фильтрационная поверхность клубочков почек составляет примерно 1,5 м². В клубочках из кровеносных капилляров в просвет капсулы почечного клубочка происходит ультрафильтрация плазмы крови, в результате

¹ Сосудистый клубочек был открыт русским ученым А. В. Шумлянским, а окружающая его капсула впервые описана в 1842 г. У. Боуменом.

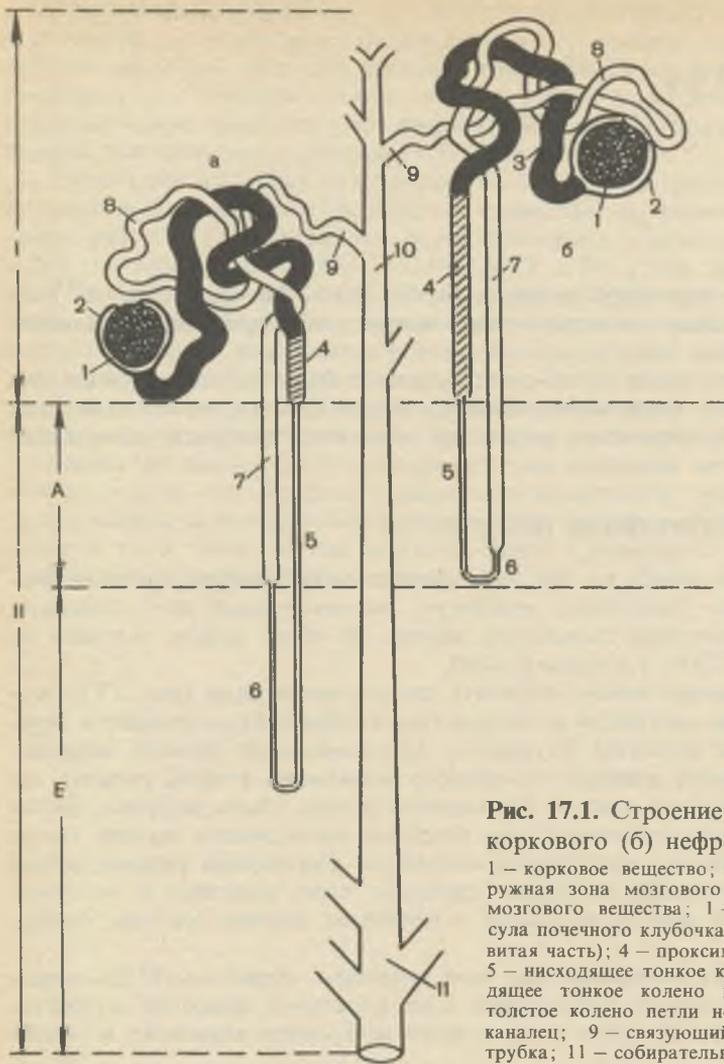


Рис. 17.1. Строение юкстамедуллярного (а) и коркового (б) нефронов.

1 — корковое вещество; 2 — мозговое вещество; А — наружная зона мозгового вещества; Б — внутренняя зона мозгового вещества; 1 — сосудистый клубочек; 2 — капсула почечного клубочка; 3 — проксимальный каналец (извитая часть); 4 — проксимальный каналец (прямая часть); 5 — нисходящее тонкое колено петли нефрона; 6 — восходящее тонкое колено петли нефрона; 7 — восходящее толстое колено петли нефрона; 8 — дистальный извитой каналец; 9 — связующий каналец; 10 — собирательная трубка; 11 — собирательная почечная трубочка.

чего образуется первичная моча, в которой практически отсутствует белок. В норме белки как коллоидные вещества не проходят через стенку капилляров в полость капсул почечного клубочка. При ряде патологических состояний проницаемость мембраны почечного фильтра повышается, что ведет к изменению состава ультрафильтрата. Повышение проницаемости является главной причиной протеинурии, и прежде всего альбуминурии. В норме объемная скорость фильтрации в среднем составляет 125 мл/мин, что в 100 раз превышает продукцию конечной мочи. Скорость фильтрации обеспечивается фильтрационным давлением, которое можно выразить следующей формулой:

$$\text{ФД} = \text{КД} - (\text{ОД} + \text{КапсД}),$$

где ФД — фильтрационное давление; КД — капиллярное давление; ОД — онкотическое давление; КапсД — внутрикапсулярное давление. Следовательно, для обеспечения процесса фильтрации необходимо, чтобы гидростатическое давление крови в капиллярах превышало сумму онкотического и внутрикапсулярного. В норме эта вели-

чина составляет около 40 гПа (30 мм рт. ст.). Вещества, усиливающие кровообращение в почках или увеличивающие количество функционирующих клубочков (например, теобромин, теофиллин, плоды можжевельника, листья толокнянки и др.), обладают мочегонными свойствами.

Капиллярное давление в почках зависит не столько от артериального давления, сколько от соотношения просвета «приносящей» и «выносящей» артериол клубочка. «Выносящая» артериола примерно на 30% меньше по диаметру, чем «приносящая», регуляция их просвета осуществляется прежде всего кининовой системой. Сужение «выносящей» артериолы увеличивает фильтрацию. Напротив, сужение «приносящей» артериолы снижает фильтрацию.

По величине клубочковой фильтрации судят о фильтрационной способности почек. Если ввести в кровяное русло вещество, которое фильтруется в клубочках, но не реабсорбируется и не секретировано канальцами нефронов, то его клиренс численно равен объемной скорости клубочковой фильтрации. Клиренс (очищение) любого соединения принято выражать количеством миллилитров плазмы, которое в 1 мин полностью освобождается от определенного вещества при протекании ее через почки. Веществами, по которым чаще определяют клубочковую фильтрацию, являются инулин и маннитол. Для определения клиренса (например, инулина) необходимо величину минутного диуреза умножить на $K_m/K_{кр}$ (отношение концентраций данного вещества в моче и плазме крови):

$$C = \frac{K_m}{K_{кр}} \cdot V,$$

где C — клиренс; K_m — концентрация данного соединения в моче; $K_{кр}$ — концентрация в плазме крови; V — количество мочи в 1 мин, мл. В случае с инулином в норме получим величину клубочковой фильтрации, равную 100–125 мл за 1 мин¹.

Реабсорбция и секреция. Суточное количество ультрафильтрата в 3 раза превышает общее количество жидкости, содержащейся в организме. Естественно, что первичная моча во время движения по почечным канальцам (общая длина почечных канальцев приблизительно 120 км) отдает большую часть своих составных частей, особенно воду, обратно в кровь. Лишь 1% жидкости, профильтрованной клубочками, превращается в мочу.

В канальцах реабсорбируется 99% воды, натрия, хлора, гидрокарбоната, аминокислот, 93% калия, 45% мочевины и т. д. Из первичной мочи в результате реабсорбции образуется вторичная, или окончательная, моча, которая затем поступает в почечные чашечки, лоханку и по мочеточникам попадает в мочевой пузырь.

Функциональное значение отдельных почечных канальцев в процессе мочеобразования неодинаково. Клетки проксимального сегмента нефрона реабсорбируют попавшие в фильтрат глюкозу, аминокислоты, витамины, электролиты; $2/3$ жидкости, составляющей первичную мочу, подвергается реабсорбции также в проксимальных канальцах. Вода первичной мочи подвергается также частичной (парциальной) реабсорбции в дистальных канальцах. В дистальных канальцах происходит и дополнительная реабсорбция натрия. В этих же канальцах могут секретироваться в просвет нефрона ионы калия, аммония, водорода и др.

В настоящее время в значительной степени изучены молекулярные механизмы реабсорбции и секреции веществ клетками почечных канальцев. Так, установлено, что при реабсорбции натрия пассивно поступает из просвета канальца внутрь клетки, движется по ней к области базальной плазматической мембраны и с помощью «натриевого насоса» поступает во внеклеточную жидкость. До 80% энергии АТФ в клетках канальцев почек расходуется на «натриевый насос». Всасывание воды

¹ Принято считать, что в норме у человека с массой тела 70 кг величина клубочковой фильтрации составляет 125 мл/мин, или 180 л в сутки.

в проксимальном сегменте происходит пассивно в результате активного всасывания натрия. Вода в этом случае «следует» за натрием. Кстати, в дистальном сегменте всасывание воды происходит вне всякой зависимости от всасывания ионов натрия, процесс этот регулируется антидиуретическим гормоном.

В отличие от натрия калий может не только реабсорбироваться, но и секретироваться. При секреции калий из межклеточной жидкости поступает через базальную плазматическую мембрану в клетку канальца за счет работы «натрий-калиевого насоса», а затем выделяется в просвет нефрона через апикальную клеточную мембрану пассивно. Секреция, как и реабсорбция, является активным процессом, связанным с функцией клеток канальцев. Механизмы секреции те же, что и реабсорбции, но только все процессы протекают в обратном направлении — от крови к канальцу.

Вещества, которые не только фильтруются через клубочки, но и реабсорбируются или секретированы в канальцах, имеют клиренс, который показывает целостную работу почек (смешанный клиренс). При этом в зависимости от того, комбинируется ли фильтрация с реабсорбцией или секрецией, выделяют два вида смешанного клиренса: фильтрационно-реабсорбционный клиренс и фильтрационно-секреционный клиренс. Величина смешанного фильтрационно-реабсорбционного клиренса меньше величины клубочкового клиренса, так как часть вещества реабсорбируется из первичной мочи в канальцах. Значение этого показателя тем меньше, чем эффективнее реабсорбция в канальцах. Так, для глюкозы он в норме равен 0. Максимальное всасывание глюкозы в канальцах составляет 350 мг/мин. Принято максимальную способность канальцев к обратному всасыванию обозначать T_m (транспорт максимум). Иногда встречаются больные с заболеванием почек, которые, несмотря на высокое содержание глюкозы в плазме крови, не выделяют глюкозу с мочой, так как фильтруемое количество глюкозы ниже значения T_m . Наоборот, при врожденном заболевании почечная глюкозурия может быть основана на снижении значения T_m .

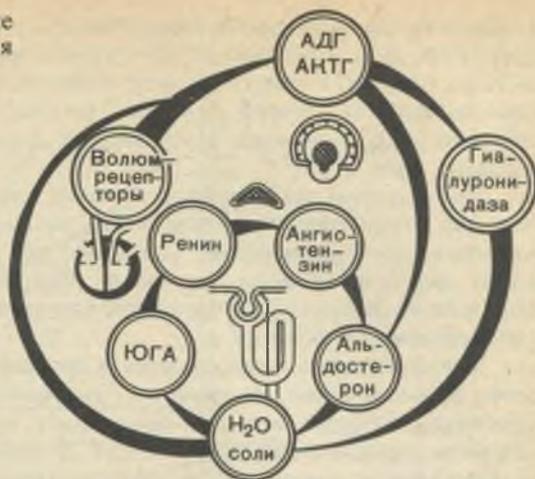
Для мочевины величина смешанного фильтрационно-реабсорбционного клиренса составляет 70. Это значит, что из каждых 125 мл ультрафильтрата или плазмы крови за минуту от мочевины полностью освобождаются 70 мл. Иными словами, определенное количество мочевины, а именно то, которое содержится в 55 мл ультрафильтрата или плазмы, всасывается обратно.

Величина смешанного фильтрационно-секреционного клиренса может быть больше клубочкового клиренса, так как к первичной моче прибавляется дополнительное количество вещества, которое секретировано в канальцах. Этот клиренс тем больше, чем сильнее секреция канальцев. Клиренс некоторых веществ, секретированных канальцами (например, диодраст, парааминогиппуровая кислота), настолько высок, что практически приближается к величине почечного кровотока (количество крови, которое за минуту проходит через почки). Таким образом, по клиренсу этих веществ можно определить величину кровотока.

Реабсорбция и секреция различных веществ регулируются ЦНС и гормональными факторами. Например, при сильных болевых раздражениях или отрицательных эмоциях может возникнуть анурия (прекращение процесса мочеобразования). Всасывание воды возрастает под влиянием антидиуретического гормона вазопрессина. Альдостерон увеличивает реабсорбцию натрия в канальцах, а вместе с ним и воды. Всасывание кальция и фосфата изменяется под влиянием паратиреоидного гормона. Паратгормон стимулирует секрецию фосфата, а витамин D задерживает ее.

Регуляция реабсорбции натрия и воды в почке представлена на рис. 17.2. При недостаточном поступлении крови к почечным клубочкам, что сопровождается небольшим растяжением стенок артериол (снижение давления), происходит возбуждение заложённых в стенках артериол клеток юстагломерулярного аппарата (ЮГА). Они начинают усиленно секретировать протеолитический фермент ренин, катализирующий начальный этап образования ангиотензина. Субстратом ферментативного действия ренина является ангиотензиноген — гликопротеин, относящийся к α_2 -глобулинам и содержащийся в плазме крови и лимфе.

Рис. 17.2. Регуляция реабсорбции в почке (схема по А. П. Зильберу). Объяснения в тексте.



Ренин разрывает в молекуле ангиотензиногена пептидную связь, образованную двумя остатками лейцина, в результате чего освобождается декапептид — ангиотензин I, биологическая активность которого незначительна в среде, близкой к нейтральной.

Считают, что под влиянием специальной пептидазы, обнаруженной в плазме крови и тканях и получившей название ангиотензин I-превращающего фермента (дипептидил-карбоксипептидаза I) из ангиотензина I образуется октапептид ангиотензин II. Главным местом этого превращения являются легкие.

В 1963 г. В. Н. Орехович и соавт. выделили из почек крупного рогатого скота протеолитический фермент, отличающийся по специфичности действия от всех известных к тому времени тканевых протеаз. Этот фермент отщепляет дипептиды от карбоксильного конца различных пептидов. Исключение составляют пептидные связи, образованные при участии иминогруппы пролина. Фермент был назван карбоксикапепсином. Оптимум его действия находится в среде, близкой к нейтральной. Он активируется ионами хлора и относится к металлоферментам. В. Н. Орехович выдвинул предположение, что именно карбоксикапепсин является тем ферментом, который превращает ангиотензин I (Асп—Арг—Вал—Иле—Вал—Гис—Про—Фен—Гис—Лей) в ангиотензин II, отщепляя от ангиотензина I дипептид Гис—Лей. Учитывая широкую специфичность действия карбоксикапепсина, В. Н. Орехович и соавт. предположили возможность участия этого фермента в инактивации антагониста ангиотензина — брадикинина. В 1969—1970 гг. были опубликованы работы, подтверждающие данные положения. Одновременно было доказано, что превращение ангиотензина I в ангиотензин II происходит не только в тканях легких, но и в почках (сейчас уже известно, что карбоксикапепсин имеется практически во всех тканях).

В отличие от своего предшественника (ангиотензина I) ангиотензин II обладает очень высокой биологической активностью. В частности, ангиотензин II способен стимулировать секрецию надпочечниками альдостерона, который увеличивает реабсорбцию натрия в канальцах, а вместе с ним и воды. Объем циркулирующей крови возрастает, давление в артериоле повышается и восстанавливается равновесие системы.

При снижении кровенаполнения предсердий и, возможно, каротидных сосудов реагируют волюморецепторы (объемные рецепторы), их импульс передается на гипоталамус, где образуется АДГ (вазопрессин). По портальной системе гипофиза этот гормон попадает в заднюю долю гипофиза, концентрируется там и выделяется в кровь. Основной точкой приложения действия АДГ является, по-видимому, стенка дистальных канальцев нефрона, где он повышает уровень активности гиалуронидазы.

Последняя, деполимеризуя гиалуруновую кислоту, повышает проницаемость стенок канальцев. Вода пассивно диффундирует через мембраны клетки вследствие осмотического градиента между гиперосмотической межклеточной жидкостью организма и гипосмотической мочой, т. е. АДГ регулирует реабсорбцию свободной воды. Таким образом, АДГ понижает осмотическое давление в тканях организма, а альдостерон повышает его.

Почки имеют также важное значение как инкреторный (внутрисекреторный) орган. Как уже отмечалось, в клетках ЮГА, расположенного в области сосудистого полюса клубочка, образуется ренин. Известно, что ренин через ангиотензин влияет на кровяное давление во всем организме. Ряд исследователей считают, что повышенное образование ренина является одной из главных причин развития определенных форм гипертонической болезни.

В почках также вырабатывается эритропоэтин, который стимулирует костномозговое кроветворение (эритропоэз). Эритропоэтин — вещество белковой природы. Его биосинтез почками активно происходит при различных стрессовых состояниях — гипоксии, кровопотере, шоке и т. д. В последние годы установлено, что в почках осуществляется также синтез простагландинов, которые способны менять чувствительность почечной клетки к действию некоторых гормонов.

РОЛЬ ПОЧЕК В ПОДДЕРЖАНИИ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО РАВНОВЕСИЯ

Почки обладают значительным влиянием на кислотно-основное равновесие, но оно сказывается по истечении значительно большего времени, чем влияние буферных систем крови и деятельности легких. Влияние буферных систем крови обнаруживается в течение 30 с. Примерно 1—3 мин требуется легким для того, чтобы сгладить наметившийся сдвиг концентрации водородных ионов в крови, около 10—20 ч необходимо почкам для восстановления нарушенного кислотно-основного равновесия. Основным механизмом поддержания концентрации водородных ионов в организме, реализуемым в клетках почечных канальцев, являются процессы реабсорбции натрия и секреции ионов водорода (рис. 17.3).

Этот механизм осуществляется с помощью нескольких химических процессов. Первый из них — реабсорбция натрия при превращении двузамещенных фосфатов в однозамещенные. Почечный фильтрат, формирующийся в клубочках, содержит достаточное количество солей, в том числе и фосфатов. Однако концентрация двузамещенных фосфатов постепенно убывает по мере продвижения первичной мочи по почечным канальцам. Так, в крови отношение однозамещенного фосфата к двузамещенному составляет 1 : 4, в клубочковом фильтрате — 9 : 1; в моче, которая проходит через дистальный сегмент нефрона, 50 : 1. Это объясняется избирательным всасыванием канальцевыми клетками ионов натрия. Вместо них из канальцевых клеток в просвет почечного канальца выделяются ионы водорода. Таким образом, двузамещенный фосфат Na_2HPO_4 превращается в однозамещенный NaH_2PO_4 и в таком виде выделяется с мочой. В клетках канальцев из угольной кислоты образуется бикарбонат, увеличивая тем самым щелочной резерв крови.

Второй химический процесс, который обеспечивает задержку натрия в организме и выведение излишка водородных ионов, — это превращение в просвете канальцев бикарбонатов в угольную кислоту. В клетках канальцев при реакции воды с углекислым газом под влиянием карбоангидразы образуется угольная кислота. Водородные ионы угольной кислоты выделяются в просвет канальца и соединяются там с анионами бикарбоната; эквивалентный этим анионам натрий поступает в клетки почечных канальцев. Образовавшаяся в просвете канальца H_2CO_3 легко распадается на CO_2 и H_2O и в таком виде покидает организм.

Третьим процессом, который также способствует сохранению натрия в организме,

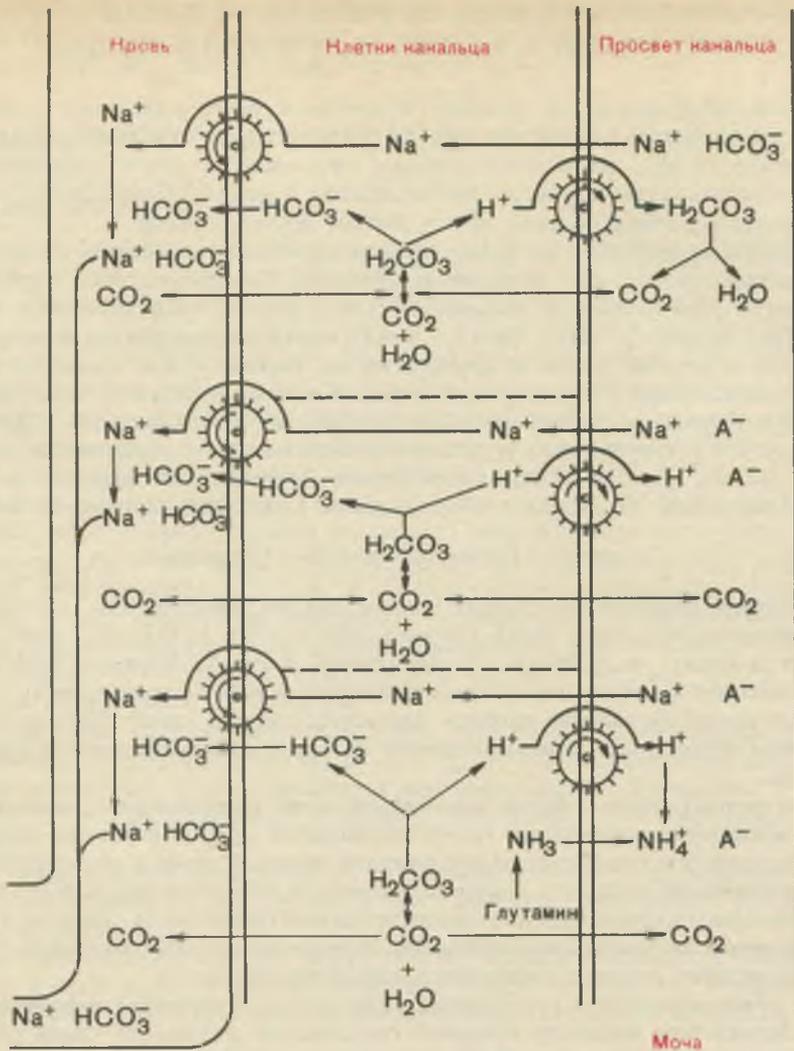


Рис. 17.3. Схематическое изображение почечного механизма поддержания кислотно-основного равновесия.

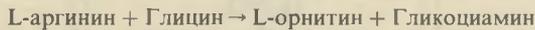
является образование в почках аммиака и использование его вместо других катионов для нейтрализации и выведения кислых эквивалентов с мочой. Основным источником для этого являются процессы дезаминирования глутамин, а также окислительного дезаминирования аминокислот, главным образом глутаминовой кислоты.

Распад глутамин происходит при участии фермента глутаминазы, при этом образуются глутаминовая кислота и свободный аммиак (см. главу 11). Глутаминаза найдена в различных органах и тканях человека, однако наибольшая ее активность отмечается в ткани почек. В общем итоге соотношение между концентрацией водородных ионов в моче и крови может составить 800:1, настолько велика способность почек выводить из организма ионы водорода. Процесс усиливается в тех случаях, когда возникает тенденция к накоплению ионов водорода в организме.

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Сложные физиологические процессы в почечной ткани протекают с постоянным потреблением большого количества энергии, получаемой в ходе метаболических реакций. Не менее 8—10% всего поглощаемого человеком в покое кислорода используется на окислительные процессы, происходящие в почках. Потребление энергии на единицу массы в почках больше, чем в любом другом органе.

В корковом веществе почки ярко выражен аэробный тип обмена веществ. В мозговом веществе преобладают анаэробные процессы. Почка относится к органам, наиболее богатым ферментами. Большинство из этих ферментов встречаются и в других органах. Так, например, ЛДГ, АсАТ, АлАТ, глутаматдегидрогеназа широко представлены как в почках, так и в других тканях. Вместе с тем имеются ферменты, которые в значительной степени специфичны для почечной ткани. К таким ферментам прежде всего относится глицин-амидинотрансфераза (трансамидиназа). Данный фермент содержится в тканях почек и поджелудочной железы и практически отсутствует в других тканях. Глицин-амидинотрансфераза осуществляет перенос амидиновой группы с L-аргинина на глицин с образованием L-орнитина и гликоциамин¹:



Эта реакция является начальным этапом синтеза креатина (см. главы 11 и 19). Глицин-амидинотрансфераза была открыта еще в 1941 г. Однако лишь в 1965 г. У. Хорнер и соавт., а затем С. Р. Мардашев и А. А. Карелин (1967) впервые отметили диагностическую ценность определения фермента в сыворотке крови при заболевании почек. Появление данного фермента в крови может быть связано либо с поражением почек, либо с начинающимся или развившимся некрозом поджелудочной железы.

При различных типах и фазах заболеваний почек наибольшая активность глицин-амидинотрансферазы в сыворотке крови наблюдается при хроническом пиелонефрите в фазе нарушения азотовыделительной функции почек, а далее в убывающем порядке следуют хронический нефрит с гипертензионным и отеочно-гипертензионным синдромами и умеренным нарушением азотовыделительной способности, хронический нефрит с изолированным мочевым синдромом без нарушения азотовыделительной функции, остаточные явления острого диффузного гломерулонефрита.

Ткань почек относится к типу тканей с высокой активностью изоферментов ЛДГ₁ и ЛДГ₂. Однако при изучении тканевых гомогенатов различных слоев почек обнаруживается четкая дифференциация изоферментных спектров ЛДГ. В корковом веществе преобладает активность ЛДГ₁ и ЛДГ₂, а в мозговом — ЛДГ₅ и ЛДГ₄. При острой почечной недостаточности в сыворотке крови повышается активность анодных изоферментов ЛДГ, т. е. изоферментов с высокой электрофоретической подвижностью (ЛДГ₁ и ЛДГ₂).

Определенный интерес представляет также исследование изоферментов аланинаминопептидазы (ААП). Известно, что существуют пять изоферментов ААП. В отличие от изоферментов ЛДГ изоферменты ААП определяются в различных органах не в виде полного спектра (пять изоферментов), а чаще как один изофермент. Так, изофермент ААП₁ представлен главным образом в ткани печени, ААП₂ — в поджелудочной железе, ААП₃ — в почках, ААП₄ и ААП₅ — в различных отделах стенки кишок. При повреждении ткани почек изофермент ААП₃ обнаруживается в крови и моче, что является специфическим признаком поражения почечной ткани.

Не менее важно в диагностике заболеваний почек исследование активности фермента мочи, так как при острых воспалительных процессах почек прежде всего развивается повышенная проницаемость клубочковых мембран, что обуславливает выделение белка, в том числе ферментов, с мочой. В целом же сдвиги в обмене

веществ почечной ткани могут быть вызваны блокадой клубочкового кровотока, нарушением фильтрации и реабсорбции, блокадой оттока мочи, поражением юкстагломерулярного аппарата, нарушением секреции и т. д.

ОБЩИЕ СВОЙСТВА И СОСТАВНЫЕ ЧАСТИ МОЧИ

Общие свойства мочи

Количество выделяемой за сутки мочи (диурез) в норме у взрослых людей колеблется от 1000 до 2000 мл, составляя в среднем 50–80% от объема принятой жидкости. Суточное количество мочи ниже 500 мл и выше 2000 мл у взрослого считается патологическим. Увеличение объема мочи (полиурия) наблюдается при приеме большого количества жидкости, употреблении пищевых веществ, повышающих диурез (арбуз, тыква и др.). При патологии полиурия отмечается при заболеваниях почек (хронические нефриты и пиелонефриты), сахарном диабете и других патологических состояниях. Большое количество мочи выделяется при несахарном диабете (*diabetes insipidus*) — за сутки 15 л и более.

Уменьшение суточного количества мочи (олигурия) наблюдается при недостаточном приеме жидкости, лихорадочных состояниях (при этом значительное количество воды удаляется из организма через кожу), рвоте, поносе, токсикозах, остром нефрите и т. д. В случае тяжелых поражений почечной паренхимы (при острых диффузных нефритах), мочекаменной болезни (закупорка мочеточников), отравлениях свинцом, ртутью, мышьяком; при сильных нервных потрясениях возможно почти полное прекращение выделения мочи (анурия). Длительная анурия ведет к уремии.

В норме днем выделяется больше мочи, чем ночью. Соотношение между дневным и ночным диурезом составляет от 4:1 до 3:1. При некоторых патологических состояниях (начальные формы сердечной декомпенсации, цистопиелиты и т. д.) моча в большем количестве выделяется ночью, чем днем. Это состояние называется *никтурия*.

Цвет мочи в норме колеблется от соломенно-желтого до насыщенного желтого. Окраска мочи зависит от содержания в ней пигментов: урохрома¹, уробилина, уроэритрина, урозеина и др.

Моча насыщенного желтого цвета обычно концентрированная, имеет высокую плотность и выделяется в относительно небольшом количестве. Бледная (соломенного цвета) моча чаще имеет низкую относительную плотность и выделяется в большом количестве.

При патологии цвет мочи может быть красным, зеленым, коричневым и т. д., что обуславливается наличием в моче не встречающихся в норме красящих веществ. Например, красный или розово-красный цвет мочи наблюдается при гематурии и гемоглобинурии, а также после приема антипирина, амидопирина, сантонина и других лекарственных веществ. Коричневый или красно-бурый цвет встречается при высокой концентрации уробилина и билирубина в моче.

В мочу здорового человека в очень незначительных количествах попадает стеркобилиноген, всасывающийся по системе геморроидальных вен. На свету и на воздухе бесцветный стеркобилиноген окисляется в окрашенный пигмент (стеркобилин) (см. главу 15). Часто в клинической практике стеркобилин мочи неверно называют уробилином. При заболеваниях печени, когда она теряет способность разрушать всосавшийся из тонкой кишки мезобилиноген (уробилиноген) до ди- и трипирролов, в моче в большом количестве появляется уробилиноген (на свету и на воздухе превращается в уробилин). В таких случаях моча приобретает темный цвет.

¹ Считается, что нормальная окраска мочи на 95% обусловлена присутствием урохрома. Химическое строение урохрома недостаточно выяснено. По-видимому, этот пигмент образуется в организме при распаде триптофана.

Зеленый или синий цвет мочи отмечается при введении в организм метиленового синего, а также усилении процессов гниения белков в кишечнике. В последнем случае в моче появляется повышенное количество индоксилсерных кислот, которые могут разлагаться с образованием индиго.

Нормальная моча прозрачна. Мутность мочи может быть вызвана солями, клеточными элементами, бактериями, слизью, жиром (липурия). Причину помутнения мочи можно определить либо под микроскопом (исследование осадка мочи), либо путем химического анализа.

Относительная плотность мочи у взрослого человека в течение суток колеблется в довольно широких пределах (от 1,002 до 1,035), что связано с периодическим приемом пищи, воды и потерей жидкости организмом (потоотделение и др.). Чаше она равна 1,012—1,020. Плотность мочи дает определенное представление о количестве растворенных в ней веществ. В сутки с мочой выделяется от 50 до 75 г плотных веществ. Приближенный расчет содержания плотного остатка в моче (в граммах на 1 л) можно произвести, умножив две последние цифры относительной плотности на коэффициент 2,6.

Лишь при тяжелой недостаточности почек они все время выделяют мочу с одинаковой относительной плотностью, равной плотности первичной мочи, или ультрафильтрата ($\sim 1,010$).

Это состояние носит название *изостенурии*.

Постоянно низкое значение плотности мочи указывает на нарушение концентрационной функции¹ почек. Это отмечается при хроническом нефрите, первично или вторично сморщенной почке. При несахарном диабете также выделяется моча с низкой плотностью (1,001—1,004), что связано с нарушением обратной реабсорбции воды в канальцах. При олигурии (понижение суточного количества мочи), например при остром нефрите, моча имеет высокую плотность. Высокая плотность характерна для сахарного диабета при полиурии, в этом случае она обусловлена содержанием в моче большого количества глюкозы.

Реакция мочи (рН) в норме при смешанной пище кислая или слабокислая (рН 5,3—6,5)². Обычно за сутки с мочой выводится от 40 до 75 мэкв кислот. На величину рН мочи влияет характер пищи. При употреблении преимущественно мясной пищи моча имеет более кислую реакцию, при овощной диете реакция мочи щелочная.

Кислая реакция мочи у человека зависит от присутствия в ней главным образом однозамещенных фосфатов (например, KH_2PO_4 или NaH_2PO_4). В щелочной моче преобладают двузамещенные фосфаты или бикарбонаты калия либо натрия.

Резко кислая реакция мочи наблюдается при лихорадочных состояниях, сахарном диабете (особенно при наличии кетоновых тел в моче), голодании и т. д. Щелочная реакция мочи отмечается при циститах и пиелитах (микроорганизмы способны разлагать мочевины с образованием аммиака уже в полости мочевого пузыря), после сильной рвоты, приеме некоторых лекарственных средств (например, бикарбоната натрия), употреблении щелочных минеральных вод и т. д.

Химический состав мочи

Плотные вещества мочи (около 60 г в суточном количестве) представлены как органическими, так и неорганическими веществами. В табл. 17.1 приведены средние данные, характеризующие содержание ряда органических и неорганических веществ в суточном количестве мочи человека при смешанном питании.

¹ Способность почек концентрировать и разводить первичную мочу имеет большое значение для поддержания постоянства осмотического давления крови.

² Реакция мочи обычно определяется по лакмусовой бумаге. Если синяя бумага краснеет, а красная не изменяет своего цвета, то реакция мочи кислая; если красная бумага синеет, а синяя не изменяется, то реакция мочи щелочная. При нейтральной реакции мочи оба вида бумаги не меняют своего цвета.

Таблица 17.1. Компоненты мочи взрослого человека

Компонент	Содержание (в расчете на суточное количество мочи)		Молярное отношение к содержанию в плазме крови
	г/сут	ммоль/сут	
Натрий	3—6	130—260	0,8—1,10
Калий	1,5—3,2	38—82	7—12
Магний	0,1—0,2	4,2—8,4	4—5
Кальций общий	0,1—0,25	2,5—6,2	0,8—1,5
Азот аммиака	0,5—1,0	36—71	2000—3500
Хлорид (Cl ⁻)	3,6—9,0	100—250	0,8—2
Фосфор неорганический	0,9—1,3	29—45	22—29
Мочевая кислота	0,2—1,2	1,2—7,1	4—16
Мочевина	20—35	333—583	50—80
Креатинин:			
у мужчин	1,0—2,0	8,8—17,7	70—98
у женщин	0,8—1,8	7,1—15,9	66—80
Индикан	0,01—0,012	0,047—0,056	10—30

Всего в моче в настоящее время обнаружено свыше 150 химических ингредиентов. Далее представлены данные лишь о наиболее важных компонентах мочи человека в норме и при некоторых патологических состояниях.

Органические вещества мочи

Мочевина составляет большую часть органических веществ, входящих в состав мочи. В среднем за сутки с мочой взрослого человека выводится около 30 г мочевины (от 12 до 36 г). Общее количество азота, выделяемое с мочой за сутки, колеблется от 10 до 18 г, из них при смешанной пище на долю азота мочевины приходится 80—90%. Количество мочевины в моче обычно повышается при употреблении пищи, богатой белками, при всех заболеваниях, сопровождающихся усиленным распадом белков тканей (лихорадочные состояния, опухоли, гипертиреоз, диабет и т. д.), а также приеме некоторых лекарственных веществ (например, ряда гормонов). Содержание выделяемой с мочой мочевины уменьшается при тяжелых поражениях печени (печень является основным местом синтеза мочевины в организме), заболеваниях почек (особенно когда нарушается фильтрационная способность почек), а также применении инсулина и др.

Креатинин также является конечным продуктом азотистого обмена. Он образуется в мышечной ткани из фосфокреатина. Суточное выделение креатинина для каждого человека — величина довольно постоянная и отражает в основном его мышечную массу. У мужчин на каждый 1 кг массы тела за сутки выделяется с мочой от 18 до 32 мг креатинина, а у женщин — от 10 до 25 мг. Эти цифры мало зависят от белкового питания. В связи с этим определение суточной экскреции креатинина с мочой во многих случаях может быть использовано для контроля полноты сбора суточной мочи.

Креатин в норме в моче взрослых людей практически отсутствует. Он появляется в ней либо при употреблении значительных количеств креатина с пищей, либо при патологических состояниях. Как только уровень креатина в сыворотке крови достигает 0,12 ммоль/л, креатин появляется в моче.

В первые годы жизни ребенка возможна «физиологическая креатинурия». По-видимому, появление креатина в моче у детей в раннем возрасте связано с усиленным синтезом креатина, опережающим развитие мускулатуры. Некоторые исследователи к физиологическим явлениям относят и креатинурию стариков, которая возникает как следствие атрофии мышц и неполного использования образующегося в печени креатина. Наибольшее содержание креатина в моче наблюдается при патологических

состояниях мышечной системы и прежде всего при миопатии, или прогрессирующей мышечной дистрофии.

Д. Л. Фердман (1957), Дж. Дрейфус и С. Шапиро (1962) считают, что креатин в моче (креатинурия) больных миопатией может появляться в результате нарушения в скелетной мускулатуре процессов его фиксации (удержания) и фосфорилирования. Если нарушен процесс синтеза фосфокреатина, то не образуется и креатинин; содержание последнего в моче резко снижается. В результате креатинурии и нарушения синтеза креатинина резко повышается креатининный показатель мочи $\left(\frac{\text{количество креатина} + \text{количество креатинина}}{\text{количество креатинина}} \right)$. В норме этот показатель близок к 1,1.

Известно также, что креатинурию можно наблюдать при поражениях печени, сахарном диабете, эндокринных расстройствах (гипертиреоз, аддиссонова болезнь, акромегалия и др.), инфекционных заболеваниях.

Аминокислоты в суточном количестве мочи составляют около 1,1 г. Соотношение между содержанием отдельных аминокислот в крови и моче неодинаково. Концентрация той или иной аминокислоты, выделяемой с мочой, зависит от ее содержания в плазме крови и степени ее реабсорбции в канальцах, т. е. от ее клиренса. В моче выше всего концентрация глицина и гистидина, затем глутамина, аланина, серина.

Гипераминоацидурия встречается при заболеваниях паренхимы печени. Это объясняется нарушением в печени процессов дезаминирования и трансаминирования. Наблюдается гипераминоацидурия также при тяжелых инфекционных заболеваниях, злокачественных новообразованиях, обширных травмах, миопатии, коматозных состояниях, гипертиреозе, лечении кортизоном и АКТГ и других состояниях.

Известны также нарушения обмена отдельных аминокислот. Многие из этих заболеваний носят врожденный, или наследственный характер (см. главу 11). Примером может служить **фенилкетонурия**. Причина заболевания — наследственно обусловленный недостаток фенилаланин-4-монооксигеназы в печени, вследствие чего метаболическое превращение аминокислоты фенилаланина в тирозин блокировано. Результатом этого является накопление в организме фенилаланина и его кетопроизводных и их появление в большом количестве в моче. Обнаружить фенилкетонурию очень просто с помощью хлорида железа: спустя 2—3 мин после добавления в мочу нескольких капель раствора хлорида железа появляется оливково-зеленая окраска.

Другим примером может служить **алкаптонурия** (синоним: гомогентизинурия). При алкаптонурии в моче резко увеличивается концентрация гомогентизиновой кислоты — одного из метаболитов обмена тирозина. В результате моча, оставленная на воздухе, резко темнеет. Причина нарушений метаболизма при алкаптонурии состоит в недостатке оксидазы гомогентизиновой кислоты. Для качественного и количественного определений гомогентизиновой кислоты в моче применяют тест восстановления серебра на фотографических пластинках.

Известны также врожденные заболевания: **гиперпролинемия** (возникает в результате недостатка фермента пролиноксидазы и как следствие — пролинурия); **гипервалинемия** (врожденное нарушение обмена валина, что сопровождается резким повышением концентрации валина в моче); **цитруллинемия** (врожденное нарушение цикла образования мочевины, обусловленное недостатком фермента аргининсукцинат-синтетазы, с мочой выделяется увеличенное количество цитруллина) и др.

Мочевая кислота является конечным продуктом обмена пуриновых оснований. За сутки с мочой выделяется около 0,7 г мочевой кислоты. Обильное потребление пищи, содержащей нуклеопротеины, вызывает через некоторое время увеличенное выделение с мочой мочевой кислоты экзогенного происхождения. И, наоборот, при питании, бедном пуринами, выделение мочевой кислоты снижается до 0,2 г в сутки.

Повышенное выделение мочевой кислоты наблюдается при лейкемии, полиците-

мии, гепатитах и подагре. Содержание мочевой кислоты в моче повышается также при приеме ацетилсалициловой кислоты и ряда стероидных гормонов.

Наряду с мочевой кислотой в моче всегда содержится небольшое количество пуринов как эндо-, так и экзогенного происхождения.

Гиппуровая кислота в небольшом количестве всегда определяется в моче человека (около 0,7 г в суточном объеме). Она представляет собой соединение глицина и бензойной кислоты. Повышенное выделение гиппуровой кислоты отмечается при употреблении преимущественно растительной пищи, богатой ароматическими соединениями, из которых образуется бензойная кислота.

В 1940 г. А. Квик и А. Я. Пытель ввели в клиническую практику гиппуровую пробу (проба Квика — Пытеля). При нормальных условиях клетки печени обезвреживают введенную бензойную кислоту (больной принимает после легкого завтрака 3—4 г бензоата натрия), соединяя ее с глицином (см. главу 15). Образовавшаяся гиппуровая кислота выводится с мочой. В норме при проведении пробы Квика — Пытеля с мочой выводится 65—85 % принятого бензоата натрия. При поражении печени образование гиппуровой кислоты нарушается, поэтому количество последней в моче резко падает.

Безазотистые органические компоненты мочи — это щавелевая, молочная и лимонная (цитрат), а также масляная, валериановая, янтарная (сукцинат), β -оксимасляная, ацетоуксусная и другие кислоты. Общее содержание органических кислот в суточном количестве мочи обычно не превышает 1 г.

В норме содержание каждой из этих кислот в суточном объеме мочи исчисляется миллиграммами, поэтому количественно определять их очень сложно. Однако выведение многих из них при тех или иных состояниях увеличивается и тогда их проще обнаружить в моче. Например, при усиленной мышечной работе повышается уровень молочной кислоты, количество цитрата и сукцината увеличивается при алкалозе.

Неорганические (минеральные) компоненты мочи

Из минеральных веществ в моче практически содержатся все элементы, которые входят в состав крови и других тканей организма. Из 50—65 г сухого остатка, образующегося при выпаривании суточного количества мочи, на долю неорганических компонентов приходится 15—25 г.

Натрий и хлор. В норме около 90 % принятых с пищей хлоридов выделяется с мочой (8—15 г NaCl в сутки). Отмечено, что при ряде патологических состояний (хронический нефрит, диарея, острый суставной ревматизм и др.) выведение хлоридов с мочой может быть снижено. Максимальная концентрация ионов Na^+ и Cl^- (в моче по 340 ммоль/л) может наблюдаться после введения в организм больших количеств гипертонического раствора.

Калий, кальций и магний. Многие исследователи считают, что практически все количество калия, которое имеется в клубочковом фильтрате, всасывается обратно из первичной мочи в проксимальном сегменте нефрона. В дистальном сегменте происходит секреция ионов калия, которая в основном связана с обменом между ионами калия и водорода. Следовательно, обеднение организма калием сопровождается выделением кислой мочи.

Ионы кальция и магния выводятся через почки в небольшом количестве (см. табл. 17.1). Принято считать, что с мочой выделяется лишь около 30 % всего количества ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , подлежащего удалению из организма. Основная масса щелочноземельных металлов выводится с калом.

Бикарбонаты, фосфаты и сульфаты. Количество бикарбонатов в моче в значительной мере коррелирует с величиной pH мочи. При pH 5,6 с мочой выделяется 0,5 ммоль/л, при pH 6,6 — 6 ммоль/л, при pH 7,8 — 9,3 ммоль/л бикарбонатов. Уровень бикарбонатов повышается при алкалозе и понижается при ацидозе. Обычно с мочой выводится менее 50 % всего количества выделяемых организмом фосфатов. При ацидозе выведение фосфатов с мочой возрастает. Повышается содержание фосфатов

в моче при гиперфункции паращитовидных желез. Введение в организм витамина D снижает выделение фосфатов с мочой.

Серосодержащие аминокислоты — цистеин, цистин и метионин — являются источниками сульфатов мочи. Эти аминокислоты окисляются в тканях организма с образованием ионов серной кислоты. Общее содержание сульфатов в суточном количестве мочи обычно не превышает 1,8 г (в расчете на серу).

Аммиак. Как уже отмечалось, существует специальный механизм образования аммиака из глутамина при участии фермента глутаминазы, которая в большом количестве содержится в почках. Аммиак выводится с мочой в виде аммонийных солей. Содержание их в моче человека в определенной степени отражает кислотно-основное равновесие. При ацидозе их количество в моче увеличивается, а при алкалозе снижается. Количество аммонийных солей в моче может быть также снижено при нарушении в почках процессов образования аммиака из глутамина.

Патологические компоненты мочи

Широко используемое понятие «патологические компоненты мочи» в известной мере условно, так как большинство соединений, рассматриваемых как патологические компоненты мочи, хотя и в небольшом количестве, но всегда присутствует в нормальной моче. Иными словами, речь идет о веществах, которые в нормальной моче не встречаются в аналитически определяемых количествах. Это прежде всего белки, глюкоза, ацетоновые (кетоновые) тела, желчные и кровяные пигменты.

Белок. В нормальной моче человека содержится минимальное количество белка, присутствие которого не может быть доказано обыкновенными качественными пробами на белок. При ряде заболеваний, особенно болезнях почек, содержание белка в моче может резко возрасти (протеинурия). Источником белка мочи являются белки сыворотки крови, а также в какой-то степени белки почечной ткани.

Протеинурии делятся на две большие группы: почечные и внепочечные. При почечных протеинуриях белки (в основном белки плазмы крови) попадают в мочу вследствие органического повреждения нефрона, увеличения размеров пор почечного фильтра, а также вследствие замедления тока крови в клубочках. Внепочечные протеинурии связаны с поражением мочевых путей или предстательной железы.

Часто употребляемое в клинической практике название «альбуминурия» (при обнаружении в моче белка) неправильно, ибо с мочой выделяются не только альбумины, но и глобулины. Например, при нефрозах общее содержание белка в моче может достигать 26 г/л, при этом концентрация альбуминов 12 г/л, а глобулинов — 14 г/л.

В моче человека можно обнаружить активность ряда ферментов: липазы, рибонуклеазы, ЛДГ, аминотрансфераз, урокиназы, фосфатаз, α -амилазы, лейцинаминопептидазы и др. Основные трудности при исследовании активности ферментов мочи, за исключением α -амилазы и некоторых других, могут быть сведены к двум моментам: необходимости сгущения (концентрирования) мочи и предотвращению ингибирования ферментов в процессе этого сгущения.

Кровь. В моче кровь может быть обнаружена либо в форме красных кровяных клеток (гематурия), либо в виде растворенного кровяного пигмента (гемоглобинурия). Гематурии бывают почечные и внепочечные. Почечная гематурия — основной симптом острого нефрита. Внепочечная гематурия наблюдается при воспалительных процессах или травмах мочевых путей. Гемоглобинурии обычно связаны с гемолизом и гемоглобинемией. Принято считать, что гемоглобин появляется в моче после того, как содержание его в плазме превысит 1 г на 1 л. Гематурию диагностируют, как правило, с помощью цитологического исследования (исследования осадка мочи под микроскопом), а гемоглобинурию — химическим путем.

Глюкоза. Нормальная моча человека содержит минимальные количества глюкозы, которые не обнаруживаются обычными качественными пробами. Однако при патологических состояниях содержание глюкозы в моче увеличивается (глюко-

з у р и я). Например, при сахарном диабете количество глюкозы, выделяемое с мочой, может достигать нескольких десятков граммов в сутки (см. главу 9).

Иногда в моче обнаруживаются и другие углеводы, в частности фруктоза, галактоза, пентозы. Фруктозурия наблюдается при врожденной недостаточности ферментов, превращающих фруктозу в глюкозу; встречаются также и врожденная пентозурия, и врожденная галактозурия (см. главу 9).

Кетоновые (ацетоновые) тела. В нормальной моче эти соединения встречаются лишь в самых ничтожных количествах (не больше 0,01 г в сутки). Они не обнаруживаются обычными качественными пробами (нитропруссидные пробы Легала, Ланге и др.). При выделении больших количеств кетоновых тел качественные пробы становятся положительными — это явление патологическое и называется кетонурией. Например, при сахарном диабете ежедневно может выделяться до 150 г кетоновых тел.

С мочой никогда не выделяется ацетон без ацетоуксусной кислоты и наоборот. Обычные нитропруссидные пробы устанавливают не только присутствие ацетона, но также и ацетоуксусной кислоты, к которой они даже более чувствительны, чем к ацетону; β -оксимасляная кислота появляется в моче лишь при сильном увеличении количества кетоновых тел (сахарный диабет и др.).

Наряду с сахарным диабетом кетоновые тела выделяются с мочой при голодании, исключении углеводов из пищи. Кетонурия наблюдается при заболеваниях, связанных с усиленным расходом углеводов, например при тиреотоксикозе, а также подпаутиных кровоизлияниях, черепно-мозговых травмах. В раннем детском возрасте продолжительные заболевания желудочно-кишечного тракта (дизентерия, токсикозы) могут вызвать кетонемия и кетонурию в результате голода и истощения. Кетонурия нередко наблюдается при инфекционных заболеваниях: скарлатине, гриппе, туберкулезе, менингите. При этих заболеваниях кетонурия не имеет диагностического значения и является вторичным явлением.

Билирубин. В норме моча содержит минимальные количества билирубина, которые не могут быть обнаружены обычными качественными пробами. Повышенное выделение билирубина, при котором обычные качественные пробы на билирубин в моче становятся положительными, называется б и л и р у б и н у р и е й. Она встречается при закупорке желчного протока и заболевании паренхимы печени.

Выделение билирубина в мочу особенно сильно выражено при обтурационных желтухах. При застое желчи переполненные желчью каналцы травмируются и пропускают билирубин в кровяные капилляры. Если поражена паренхима печени, билирубин проникает через разрушенные печеночные клетки в кровь. Билирубинурия появляется при содержании прямого билирубина в крови выше 3,4 мкмоль/л. Кстати, непрямой билирубин не может пройти через почечный фильтр. Это становится возможным при значительных поражениях почек.

Уробилин. Уробилин, точнее стеркобилин, всегда находится в незначительном количестве в моче, однако концентрация его резко возрастает при гемолитической и печеночной желтухах. Это связано с потерей печенью способности задерживать и разрушать мезобилиноген (уробилиноген), всосавшийся из кишечника. Напротив, отсутствие в моче уробилиногена при наличии желчных пигментов (билирубина) указывает на прекращение поступления желчи в кишечник вследствие закупорки желчного протока (см. главу 15).

Порфирины. В норме моча содержит лишь очень малые количества порфиринов I типа (до 300 мкг в суточном количестве). Однако выделение порфиринов может резко возрастать (в 10—12 раз) при заболеваниях печени и пернициозной анемии. При врожденной порфирии имеет место сверхпродукция порфиринов I типа (уропорфирина I и копропорфирина I). В этих случаях в суточном количестве мочи обнаруживается до 10 мг смеси этих порфиринов. При острой порфирии отмечается экскреция с мочой повышенных количеств уропорфирина III, копропорфирина III, а также порфобилиногена.

Нервная ткань имеет, с одной стороны, общие черты, которые присущи клеткам любой ткани, с другой — специфические особенности, определяемые характером функций, выполняемых нервной системой в целостном организме. Эти особенности проявляются как в химическом составе, так и в характере метаболизма нервной ткани.

Нервная ткань состоит из трех клеточных элементов: нейронов (нервных клеток); нейроглии — системы клеток, непосредственно окружающих нервные клетки в головном и спинном мозге; мезенхимных элементов, включающих микроглию — глиальные макрофаги (клетки Ортеги).

Основная масса головного мозга представлена первыми двумя типами клеточных элементов. Нейроны сосредоточены в сером веществе (60—65% от вещества головного мозга), тогда как белое вещество ЦНС и периферические нервы состоят главным образом из элементов нейроглии и их производного — миелина.

СТРУКТУРА НЕЙРОНА

Нейрон состоит из тела клетки, многочисленных ветвящихся коротких отростков — дендритов и одного длинного отростка — аксона, длина которого может достигать нескольких десятков сантиметров (рис. 18.1).

Объем цитоплазмы, содержащейся в отростках нервной клетки, может в несколько раз превышать ее количество в теле клетки. Тело нейрона окружено плазматической мембраной — плазмалеммой (рис. 18.2). В тесной связи с плазмалеммой¹ в теле нейрона и проксимальных отрезках дендритов находится так называемая подповерхностная мембранная структура. Это — цистерны, которые расположены параллельно поверхности плазмалеммы и отделены от нее очень узкой светлой зоной. Предполагают, что цистерны играют важную роль в мета-

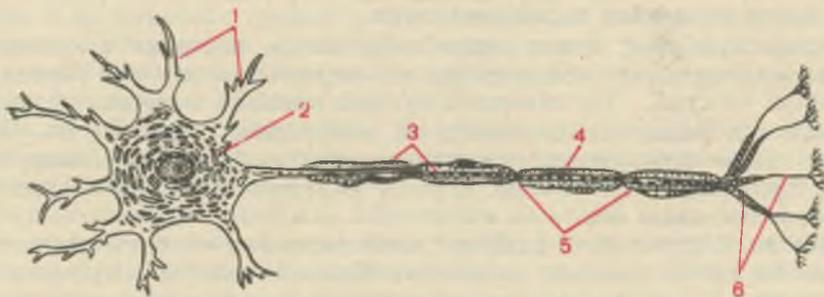


Рис. 18.1. Строение нейрона (схема по Шмитту).

1 — дендриты; 2 — тело нейрона; 3 — аксон; 4 — миелиновая оболочка; 5 — перехваты узла; 6 — окончания.

¹ При возбуждении нейрона проницаемость плазматической мембраны изменяется.

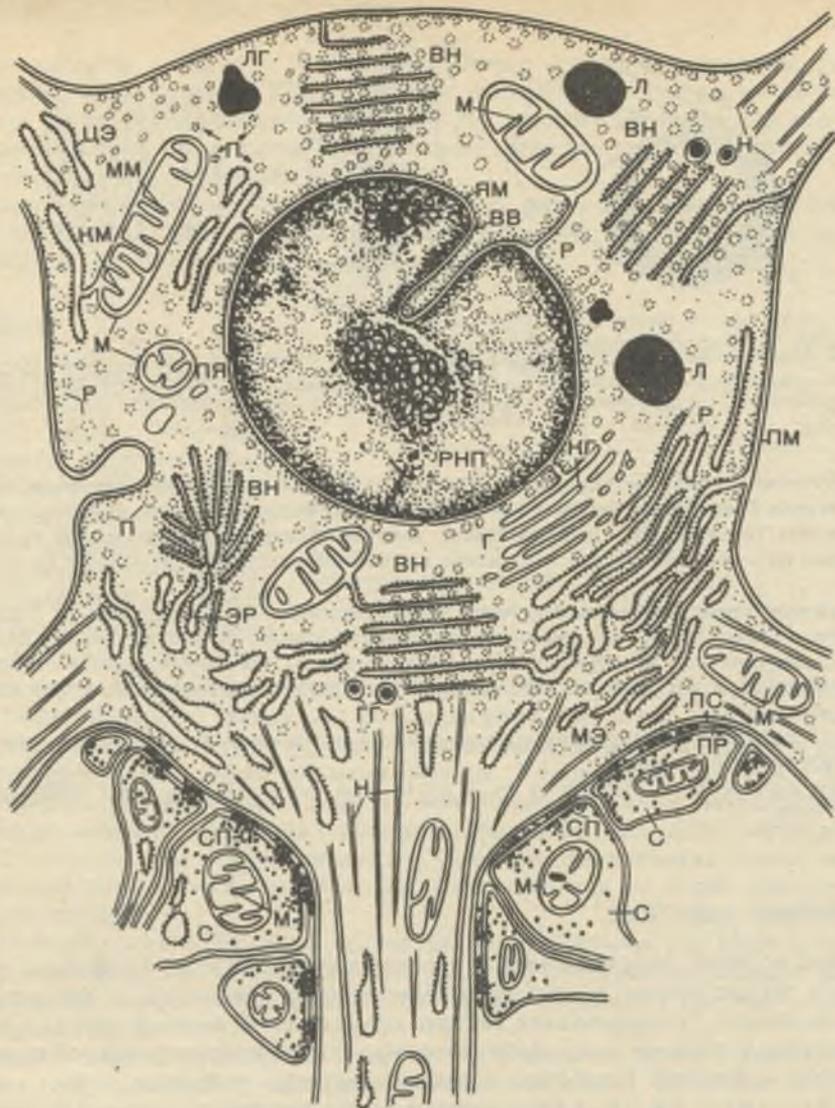


Рис. 18.2. Схематическое изображение ультратонкого строения нервной клетки по данным электронной микроскопии (по А. А. Маниной).

ВВ — впячивание ядерных мембран; ВН — вещество Ниссля; Г — пластинчатый комплекс (аппарат Гольджи); ГГ — гранулы гликогена; КГ — каналцы пластинчатого комплекса; КМ — кристы митохондрий; Л — лизосомы; ЛГ — липидные гранулы; М — митохондрии; ММ — мембрана митохондрий; МЭ — мембраны эндоплазматической сети; Н — нейропрофибриллы; П — полисомы; ПМ — плазматическая мембрана; ПР — пресинаптическая мембрана; ПС — постсинаптическая мембрана; ПЯ — поры ядерной мембраны; Р — рибосомы; РНП — рибонуклеопротеиновые гранулы; С — синапс; СП — синаптические пузырьки; ЦЭ — цистерны эндоплазматической сети; ЭР — эндоплазматическая сеть; Я — ядро; ЯМ — ядерная мембрана.

близме нейрона. Основной ультраструктурой цитоплазмы нейрона является эндоплазматическая сеть — система ограниченных мембраной пузырьков, трубочек и уплощенных мешочков, или цистерн. Мембраны эндоплазматической сети связаны определенным образом с плазмалеммой и оболочкой ядра нейрона.

Гранулы, локализованные на мембранах эндоплазматической сети, а также свободно расположенные в цитоплазме, являются рибосомами.

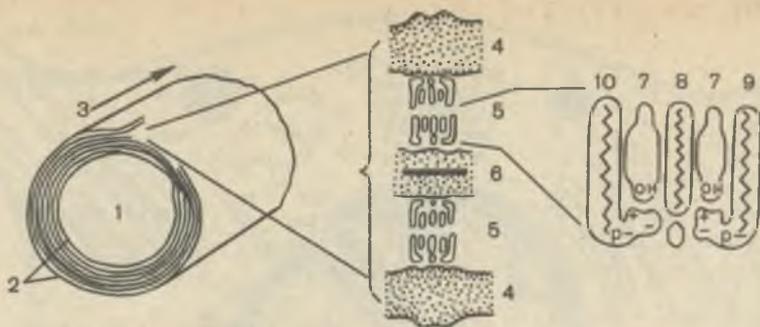


Рис. 18.3. Молекулярная организация миелиновой оболочки (по Х. Хидену).
 1 — аксон; 2 — миелин; 3 — ось волокна; 4 — белок (наружные слои); 5 — липиды; 6 — белок (внутренний слой); 7 — холестерин; 8 — цереброзид; 9 — сфингомиелин; 10 — фосфатидилсерин.

Характерной структурной основой нервной клетки является базофильное вещество (вещество, субстанция Ниссля), состоящее из рибонуклеиновых кислот и белков. В цитоплазме также выявляется сеть тонких нитей — нейрофибрилл, которые в совокупности образуют густую сеть. Нейрофибриллы — это структурное выражение правильной линейной ориентации белковых молекул.

Важный компонент цитоплазмы нейрона — пластинчатый комплекс (аппарат Гольджи), где сосредоточены главным образом липидные компоненты клетки. Одной из особенностей митохондрий, изолированных из нервных клеток, является то, что они содержат меньше ферментов, участвующих в процессах окисления жирных кислот и аминокислот, чем митохондрии из других тканей.

В ЦНС лизосомы обнаруживаются постоянно и выполняют те же функции, что и лизосомы других органов и тканей.

Размер ядра нейрона колеблется от 3 до 18 мкм, достигая в крупных нейронах $\frac{1}{4}$ величины их тела.

Строение миелина

Нервные волокна, образующиеся из аксонов нервных клеток, по своему строению могут быть подразделены на два типа: миелиновые (мякотные) и безмиелиновые (бедные миелином). Проводниковая система соматической нервной системы, а также ЦНС относятся к первому типу, функционально более совершенному, обладающему способностью с высокой скоростью передавать нервные импульсы.

Миелиновое вещество — понятие чисто морфологическое. По сути миелин — система, образованная многократно наслаивающимися мембранами клеток нейроглии¹ вокруг нервных отростков (в периферических нервных стволах нейроглия представлена леммоцитами, или шванновскими клетками, а в белом веществе ЦНС — астроцитами).

По химическому составу миелиновое вещество является сложным белково-липидным комплексом.

На долю липидов приходится до 80% плотного остатка; 90% всех липидов миелина представлены холестерином, фосфолипидами и цереброзидами. Считают, что в липоидных слоях миелиновых оболочек молекулы различных липидов имеют строго определенное расположение (рис. 18.3).

¹ Тонкая структура нейроглии рассматривается в специальных руководствах, посвященных гистологии и морфологии нервной системы.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МОЗГА

Серое вещество головного мозга представлено в основном телами нейронов, а белое вещество — аксонами. В связи с этим указанные отделы мозга значительно отличаются по своему химическому составу. Эти отличия носят прежде всего количественный характер. Содержание воды в сером веществе головного мозга заметно больше, чем в белом веществе (табл. 18.1).

В сером веществе белки составляют половину плотных веществ, а в белом веществе — одну треть¹. На долю липидов в белом веществе приходится более половины сухого остатка, в сером веществе — лишь около 30%.

Белки

На долю белков приходится примерно 40% сухой массы головного мозга. Мозговая ткань является трудным объектом для изучения белкового состава вследствие большого содержания липидов и наличия белково-липидных комплексов.

Впервые А. Я. Данилевский разделил белки мозговой ткани на растворимые в воде и со-

левых растворах белки и нерастворимые белки. Обширные исследования в этой области были проведены также А. В. Палладиным и сотр., которые разделили белки нервной ткани на четыре фракции: извлекаемые водой; 4,5% раствором KCl; 0,1% раствором NaOH; нерастворимый остаток. Установлено, что серое вещество богаче белками, растворимыми в воде, чем белое вещество: соответственно 30 и 19%. Белое вещество, напротив, содержит гораздо больше (22%) нерастворимого белкового остатка, чем серое вещество (5%). В дальнейшем было выделено 5–10 фракций растворимых белков мозга, отличающихся по своей электрофоретической подвижности.

В настоящее время, сочетая методы экстракции буферными растворами, хроматографии на колонках с ДЭАЭ-целлюлозой и диск-электрофореза в полиакриламидном геле, удалось из ткани мозга выделить около 100 различных растворимых белковых фракций.

В нервной ткани содержатся как простые, так и сложные белки. Простые белки — альбумины (нейроальбумины), глобулины (нейроглобулины), катионные белки (гистоны и др.) и опорные белки (нейросклеропротейны).

Поскольку альбумины и глобулины по своим физико-химическим свойствам несколько отличаются от аналогичных белков сыворотки крови, они, как правило, называются **нейроальбуминами** и **нейроглобулинами**. Количество нейроглобулинов в головном мозге относительно невелико — в среднем 5% по отношению ко всем растворимым белкам. Нейроальбумины являются основным белковым компонентом фосфопротеинов нервной ткани, на их долю приходится основная масса растворимых белков (89–90%). В свободном состоянии нейроальбумины встречаются редко. В частности, они легко соединяются с липидами, нуклеиновыми кислотами, углеводами и другими небелковыми компонентами.

Белки, которые в процессе электрофоретического разделения при pH 10,5–12,0 движутся к катоду, получили название **к а т и о н н ы х**. Главнейшими представителями

Таблица 18.1. Химический состав серого и белого вещества головного мозга человека (в процентах от массы сырой ткани)

Составные части	Серое вещество	Белое вещество
Вода	84	70
Сухой остаток	16	30
Белки	8	9
Липиды	5	17
Минеральные вещества	1	2

¹ При расчете на сырую массу ткани белки распределяются примерно поровну между серым (8%) и белым (9%) веществом головного мозга.

этой группы белков в нервной ткани являются **гистоны**, которые делятся на пять основных фракций в зависимости от содержания в их полипептидных цепях остатков лизина, аргинина и глицина.

Нейросклеропротейны можно охарактеризовать как структурно-опорные белки. Основные представители этих белков — нейроколлагены, нейроластины, нейростромины и др. Они составляют примерно 8–10% от всех простых белков нервной ткани и локализованы в основном в белом веществе головного мозга и в периферической нервной системе.

Сложные белки нервной ткани представлены нуклеопротеинами, липопротеинами, протеолипидами, фосфопротеинами, гликопротеинами и т. д. В мозговой ткани содержатся в значительном количестве еще более сложные надмолекулярные образования, такие как липонуклеопротеины, липогликопротеины, возможно, и липогликопротеиновые комплексы.

Нуклеопротеины — белки, которые принадлежат либо к ДНП, либо к РНП. Часть этих белков из мозговой ткани извлекается водой, другая часть — солевыми средами, а третья — 0,1 М раствором щелочи.

Липопротеины составляют значительную часть водорастворимых белков мозговой ткани. Их липидный компонент состоит в основном из фосфоглицеридов и холестерина.

Протеолипиды — единственные сложные белки, которые извлекаются органическими растворителями, например смесью хлороформа и метанола. В отличие от липопротеинов в них липидный компонент преобладает над белковым. Наибольшее количество протеолипидов сосредоточено в миелине, в небольших количествах они входят в состав синаптических мембран и синаптических пузырьков.

Фосфопротеины в головном мозге содержатся в большем количестве, чем в других органах и тканях, — около 2% по отношению ко всем сложным белкам мозга. Фосфопротеины обнаружены в мембранах различных морфологических структур нервной ткани.

Гликопротеины представляют собой чрезвычайно гетерогенную группу белков. По количеству белка и углеводов, входящих в состав гликопротеинов, их можно разделить на две основные группы. Первая группа — это гликопротеины, содержащие от 5 до 40% углеводов и их производных; белковая часть преимущественно из альбуминов и глобулинов. В гликопротеинах, составляющих вторую группу, содержится 40–85% углеводов, часто обнаруживается липидный компонент; по своему составу они могут быть отнесены к гликолипопротеинам.

В последние годы в нервной ткани обнаружен ряд специфических белков. К таким белкам, в частности, относятся белок S-100 и белок 14-3-2. Белок S-100, или белок Мура, называют также кислым белком, так как он содержит большое количество остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот. Этот белок сосредоточен в основном в нейроглии (85–90%), в нейронах его не более 10–15% от общего количества в головном мозге. Установлено, что концентрация белка S-100 возрастает при обучении (тренировках) животных. Однако пока нет оснований считать, что белок S-100 непосредственно участвует в формировании и хранении памяти. Не исключено, что его участие в этих процессах опосредовано. Белок 14-3-2 также относится к кислым белкам. В отличие от белка S-100 он локализован в основном в нейронах: в нейроглиальных клетках его содержание невелико. Пока неясна роль белка 14-3-2 в выполнении специфических функций нервной ткани.

Ферменты. В мозговой ткани содержится большое количество ферментов, катализирующих обмен углеводов, липидов и белков. Однако до сих пор в кристаллическом виде из ЦНС млекопитающих выделены лишь некоторые ферменты, в частности ацетилхолинэстераза и креатинкиназа.

Значительное количество ферментов в мозговой ткани находится в нескольких молекулярных формах (изоферменты): ЛДГ, альдолаза, креатинкиназа, гексокиназа, малатдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа, холинэстераза, кислая фосфатаза, моноаминоксидаза и другие.

Среди химических компонентов головного мозга особое место занимают липиды, высокое содержание и специфическая природа которых придают мозговой ткани характерные особенности. В группу липидов головного мозга входят фосфоглицериды, холестерин, сфингомиелины, цереброзиды, ганглиозиды и очень небольшое количество нейтрального жира (табл. 18.2). Кроме того, многие липиды нервной ткани находятся в тесной взаимосвязи с белками, образуя сложные системы типа протеолипидов.

В сером веществе головного мозга фосфоглицериды составляют более 60% от всех липидов, а в белом веществе — около 40%. Напротив, в белом веществе содержание холестерина, сфингомиелинов и особенно цереброзидов больше, чем в сером веществе.

	Серое вещество	Белое вещество	Миелин
Общее содержание липидов, % от сухой массы	32,7	54,9	70
<i>В процентах к общим липидам</i>			
Холестерин	22,0	27,5	27,7
Цереброзиды	5,4	19,8	22,7
Ганглиозиды	1,7	5,4	3,8
Фосфатидилэтаноламины	22,7	14,9	15,6
Фосфатидилхолины	26,7	12,8	11,2
Фосфатидилсерины	8,7	7,9	4,8
Фосфатидилинозитолы	2,7	0,9	0,6
Плазмалогены	8,8	11,2	12,3
Сфингомиелины	6,9	7,7	7,9

Углеводы

В мозговой ткани имеются гликоген и глюкоза. Однако по сравнению с другими тканями ткань мозга бедна углеводами. Общее содержание глюкозы в головном мозге разных животных составляет в среднем 1–4 мкмоль на 1 г ткани, а гликоген — 2,5–4,5 мкмоль на 1 г ткани (в расчете на глюкозу). Интересно отметить, что общее содержание гликогена в мозге эмбрионов и новорожденных животных значительно выше, чем в мозге взрослых. Например, у новорожденных мышей в отличие от взрослых особей уровень гликогена в 3 раза выше. По мере роста и дифференцировки мозга концентрация гликогена быстро снижается и остается относительно постоянной у взрослого животного.

В мозговой ткани имеются также промежуточные продукты обмена углеводов: гексозо- и триозофосфаты, молочная, пировиноградная и другие кислоты. В табл. 18.3 приведены данные о содержании некоторых промежуточных компонентов обмена углеводов в головном мозге крыс.

Таблица 18.3. Средние данные о содержании некоторых метаболитов обмена углеводов в головном мозге крыс

Метаболит	Содержание, мкмоль на 1 г сырой массы ткани	Метаболит	Содержание, мкмоль на 1 г сырой массы ткани
Глюкозо-6-фосфат	0,039–0,049	3-Фосфоглицерат	0,085–0,100
Фруктозо-6-фосфат	0,017–0,023	2-Фосфоглицерат	0,010–0,016
Фруктозо-1,6-бисфосфат	0,010–0,017	Фосфоенолпируват	0,035–0,097
Диоксиацетонфосфат	0,024	Пируват	0,120–0,190
Глицеральдегид-3-фосфат	0,021–0,046	Лактат	1,26–1,70

Адениновые нуклеотиды и креатинфосфат

Из свободных нуклеотидов в мозговой ткани на долю адениновых нуклеотидов приходится около 84%. Большую часть оставшихся нуклеотидов составляют производные гуанина. В целом количество высокоэнергетических соединений в нервной ткани невелико. Содержание нуклеотидов и креатинфосфата в головном мозге крыс в среднем составляет (в мкмоль на 1 г сырой массы): АТФ — 2,30–2,90; АДФ — 0,30–0,50; АМФ — 0,03–0,05; ГТФ — 0,20–0,30; ГДФ — 0,15–0,20; УТФ — 0,17–0,25; креатинфосфат — 3,50–4,75. Распределение основных макроэнергетических соединений примерно одинаково во всех отделах мозга.

Содержание циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ) в головном мозге значительно выше, чем во многих других тканях. Уровень цАМФ в мозге составляет в среднем 1–2, а цГМФ — до 0,2 нмоль на 1 г ткани. Для мозга характерна также высокая активность ферментов метаболизма циклических нуклеотидов. Большинство исследователей считают, что циклические нуклеотиды участвуют в синаптической передаче нервного импульса.

Минеральные вещества

Na, K, Cu, Fe, Ca, Mg и Mn распределены в головном мозге относительно равномерно между серым и белым веществом. Содержание фосфора в белом веществе выше, чем в сером.

В табл. 18.4 представлены средние данные о содержании основных минеральных компонентов в головном мозге и плазме крови человека.

Таблица 18.4. Содержание основных минеральных компонентов в ткани головного мозга и в плазме крови человека

Компонент	Мозговая ткань, ммоль/кг	Плазма крови, ммоль/л
Na ⁺	57	141
K ⁺	96	5
Ca ²⁺	1	2,5
Cl ⁻	37	101
HCO ₃ ⁻	12	28

Из таблицы 18.4 видно, что концентрация ионов калия, натрия, а также хлора в мозге резко отличается от концентрации их в жидкостях тела.

Количественное соотношение неорганических анионов и катионов в мозговой ткани свидетельствует о дефиците анионов. Расчет показывает, что для покрытия дефицита анионов потребовалось бы в 2 раза больше белков, чем их имеется в мозговой ткани. Принято считать,

что остающийся дефицит анионов покрывается за счет липидов. Вполне возможно, что участие липидов в ионном балансе — одна из их функций в деятельности головного мозга.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА НЕРВНОЙ ТКАНИ

Дыхание

На долю головного мозга приходится 2–3% от массы тела. В то же время потребление кислорода головным мозгом в состоянии физического покоя достигает 20–25% от общего потребления его всем организмом, а у детей в возрасте до 4 лет мозг потребляет даже 50% кислорода, утилизируемого всем организмом.

О размерах потребления головным мозгом из протекающей крови различных веществ, в том числе и кислорода, можно судить по артериовенозной разнице. Установлено, что во время прохождения через мозг кровь теряет около 8 об.% кислорода. В 1 мин в расчете на 100 г мозговой ткани протекает 53–54 мл крови.

Следовательно, 100 г мозга потребляют в 1 мин 3,7 мл кислорода, а весь головной мозг (1500 г) — 55,5 мл кислорода¹.

Газообмен мозга значительно выше, чем газообмен других тканей, в частности он превышает газообмен мышечной ткани почти в 20 раз. Интенсивность дыхания для различных областей головного мозга неодинакова. Например, интенсивность дыхания клеточек вещества в 2 раза ниже, чем серого (правда, в белом веществе меньше клеток). Особенно интенсивно расходуют кислород клетки коры мозга и мозжечка.

Поглощение кислорода головным мозгом значительно уменьшается при наркозе. Напротив, интенсивность дыхания мозга возрастает при увеличении функциональной активности.

Обмен глюкозы и гликогена

Основным субстратом дыхания мозговой ткани является глюкоза. В 1 мин 100 г ткани мозга человека потребляют в среднем 5 мг глюкозы. Подсчитано, что более 90 % утилизируемой глюкозы в ткани мозга окисляются до CO_2 и H_2O при участии цикла трикарбоновых кислот. В физиологических условиях роль пентозофосфатного пути окисления глюкозы в мозговой ткани невелика. Однако этот путь окисления глюкозы присущ всем клеткам головного мозга. Образующаяся в процессе пентозофосфатного цикла восстановленная форма НАДФ (НАДФН₂) используется на синтез жирных кислот и стероидов.

Интересно отметить, что в расчете на всю массу головного мозга содержание глюкозы в нем составляет около 750 мг. За 1 мин тканью мозга окисляются 75 мг глюкозы. Следовательно, количество глюкозы, имеющееся в ткани головного мозга, могло бы быть достаточным лишь на 10 мин жизни человека. Данный расчет, а также величина артериовенозной разницы по глюкозе доказывают, что основным субстратом дыхания головного мозга является глюкоза крови. По-видимому, глюкоза легко диффундирует из крови в ткань головного мозга (содержание глюкозы в мозговой ткани — 0,05 %, а в артериальной крови — 4,44 ммоль/л, или 80 мг/100 мл).

Между глюкозой и гликогеном мозговой ткани имеется тесная связь, выражающаяся в том, что при недостаточном поступлении глюкозы из крови гликоген головного мозга является источником глюкозы, а глюкоза при ее избытке — исходным материалом для синтеза гликогена. Распад гликогена в мозговой ткани происходит путем фосфоролиза с участием системы цАМФ. Однако в целом же использование гликогена в мозге по сравнению с глюкозой не играет существенной роли в энергетическом отношении, так как содержание гликогена в головном мозге невелико.

Наряду с аэробным метаболизмом углеводов мозговая ткань способна к довольно интенсивному анаэробному гликолизу. Значение этого явления пока недостаточно ясно, ибо гликолиз как источник энергии ни в коей мере не может сравниться по эффективности с тканевым дыханием в головном мозге.

Обмен лабильных фосфатов (макроэргов)

Интенсивность обновления богатых энергией фосфорных соединений в головном мозге очень велика. Именно этим можно объяснить, что содержание АТФ и креатинфосфата в мозговой ткани характеризуется значительным постоянством. При прекращении доступа кислорода мозг может «просуществовать» немногим более минуты за счет резерва лабильных фосфатов. Прекращение доступа кислорода даже на 10—15 с нарушает энергетику нервных клеток, что в целомном организме выражается наступ-

¹ В целом потребление кислорода тканями взрослого человека в состоянии покоя составляет 200—240 мл/мин.

лением обморочного состояния. По-видимому, при кислородном голодании мозг может очень недолго получать энергию за счет процессов гликолиза.

Установлено, что при инсулиновой коме содержание глюкозы в крови может снижаться до 1 ммоль/л, потребление кислорода мозгом в этих условиях не более 1,9 мл/100 г в 1 мин. В норме концентрация глюкозы в крови 3,3–5,0 ммоль/л, а мозг потребляет 3,4–3,7 мл кислорода на 100 г массы в 1 мин. При инсулиновой коме нарушаются процессы окислительного фосфорилирования в мозговой ткани, снижается концентрация АТФ и происходит изменение функций мозга.

Возбуждение и наркоз быстро сказываются на обмене лабильных фосфатов. В состоянии наркоза наблюдается угнетение дыхания; содержание АТФ и креатинфосфата повышено, а уровень неорганического фосфата снижен. Следовательно, сокращается потребление мозгом соединений, богатых энергией.

Напротив, при раздражении интенсивность дыхания усиливается в 2–4 раза; уровень АТФ и креатинфосфата снижается, а количество неорганического фосфата увеличивается. Эти изменения наступают независимо от того, каким образом произошло стимулирование нервных процессов, а именно: путем электрического раздражения или химическим путем.

Обмен белков и аминокислот

Общее содержание аминокислот в ткани мозга человека в 8 раз превышает концентрацию их в крови. Аминокислотный состав мозга отличается определенной специфичностью. Так, концентрация свободной глутаминовой кислоты в мозге выше, чем в любом другом органе млекопитающих (10 мкмоль/г). На долю глутаминовой кислоты вместе с ее амидом глутамином и трипептидом глутатионом приходится более 50 % α -аминоазота головного мозга. В мозге содержится ряд свободных аминокислот, которые лишь в незначительных количествах обнаруживаются в других тканях млекопитающих. Это γ -аминомасляная кислота, N-ацетиласпарагиновая кислота и цистатионин (см. главу 11).

Известно, что обмен аминокислот в мозговой ткани протекает в разных направлениях. Прежде всего пул свободных аминокислот используется как источник «сырья» для синтеза белков и биологически активных аминов. Одна из функций дикарбоновых аминокислот в головном мозге – связывание аммиака, освобождающегося при возбуждении нервных клеток.

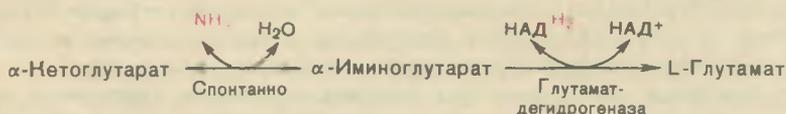
Установлено, что белки в головном мозге находятся в состоянии активного обновления, о чем свидетельствует быстрое включение радиоактивных аминокислот в молекулы белков. Однако в разных отделах головного мозга скорость синтеза и распада белковых молекул неодинакова. Белки серого вещества больших полушарий и белки мозжечка отличаются особенно большой скоростью обновления. Участки головного мозга, богатые проводниковыми структурами – аксонами (белое вещество головного мозга), имеют меньшую скорость синтеза и распада белковых молекул.

При различных функциональных состояниях ЦНС наступают изменения в интенсивности обновления белков. Так, при действии на организм животных возбуждающих агентов (фармакологические средства и электрический ток) в головном мозге усиливается интенсивность обмена белков. Напротив, под влиянием наркоза скорость распада и синтеза белков снижается.

Возбуждение нервной системы сопровождается повышением содержания аммиака в нервной ткани. Это явление наблюдается как при раздражении периферических нервов, так и при раздражении мозга. Считают, что образование аммиака при возбуждении в первую очередь происходит за счет дезаминирования АМФ.

Аммиак – очень ядовитое вещество, особенно для нервной системы. Особую роль в устранении аммиака играет глутаминовая кислота. Она способна связывать

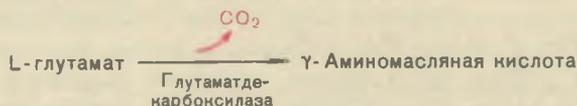
аммиак с образованием глутамина — безвредного для нервной ткани вещества. Данная реакция амидирования протекает при участии фермента глутаминсинтетазы и требует затраты энергии АТФ (см. главу 11). Непосредственный источник глутаминовой кислоты в мозговой ткани — путь восстановительного аминирования α -кетоглутаровой кислоты:



Образование глутаминовой кислоты из α -кетоглутаровой и аммиака является важным механизмом нейтрализации аммиака в ткани мозга, где путь устранения аммиака за счет синтеза мочевины не играет существенной роли.

Кроме того, глутаминовая кислота образуется и в процессе переаминирования. Активность АСАТ в мозговой ткани значительно выше, чем в печени и особенно в почках.

Наконец, глутаминовая кислота в нервной ткани может декарбоксилироваться с образованием ГАМК:



ГАМК в наибольшем количестве содержится в сером веществе головного мозга. В спинном мозге и периферических нервах ее значительно меньше.

Обмен липидов

Липиды составляют около половины сухой массы головного мозга. Как уже отмечалось, в нервных клетках серого вещества особенно много фосфоглицеридов, а в миелиновых оболочках нервных стволов — сфингомиелина. Из фосфоглицеридов серого вещества мозга наиболее интенсивно обновляются фосфатидилхолины и особенно фосфатидилинозитол. Обмен липидов миелиновых оболочек протекает с небольшой скоростью. Холестерин, цереброзиды и сфингомиелины обновляются очень медленно.

Ткань головного мозга взрослого человека содержит много холестерина (около 25 г). У новорожденных в головном мозге всего 2 г холестерина; количество его резко возрастает в первый год жизни (примерно в 3 раза). При этом биосинтез холестерина происходит в самой мозговой ткани. У взрослых же людей синтез холестерина в головном мозге резко снижается, вплоть до полного прекращения.

ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ПРОВЕДЕНИЯ НЕРВНЫХ ИМПУЛЬСОВ

Каковы же химические основы возникновения и поддержания биоэлектрических потенциалов (потенциалов покоя и действия)? Большинство исследователей придерживаются мнения, что явления электрической поляризации клетки обусловлены неравномерным распределением ионов калия и натрия по обе стороны клеточной мембраны. Мембрана обладает избирательной проницаемостью: большей для ионов калия и значительно меньшей для ионов натрия. Кроме того, в нервных клетках существует механизм, который поддерживает внутриклеточное содержание натрия на низком уровне вопреки градиенту концентрации. Этот механизм получил название «натриевого насоса».

При определенных условиях резко повышается проницаемость мембраны для ионов натрия.

В состоянии покоя внутренняя сторона клеточной мембраны заряжена электроотрицательно по отношению к наружной поверхности. Объясняется это тем, что количество ионов натрия, выкачиваемых из клетки с помощью натриевого насоса, не вполне точно уравнивается поступлением в клетку ионов калия. В связи с этим часть катионов натрия удерживается внутренним слоем противоионов (анионов) на наружной поверхности клеточной мембраны.

При возбуждении, вызванном тем или иным агентом, селективно изменяется проницаемость мембраны нервной клетки (аксона): увеличивается избирательно для ионов натрия (примерно в 500 раз) и остается без изменения для ионов калия. В результате ионы натрия устремляются внутрь клетки. Компенсирующий поток ионов калия, направляющийся наружу из клетки, несколько запаздывает. Это приводит к возникновению отрицательного заряда на наружной поверхности клеточной мембраны. Внутренняя поверхность мембраны приобретает положительный заряд; происходит перезарядка клеточной мембраны (в частности, мембраны аксона, т. е. нервного волокна) и возникает потенциал действия, или спайк. Продолжительность спайка не превышает 1 мс. Он имеет восходящую фазу, пик и нисходящую фазу. Нисходящая фаза (падение потенциала) связана с нарастающим преобладанием выхода ионов калия над поступлением ионов натрия — мембранный потенциал возвращается к норме. После проведения импульса в клетке восстанавливается состояние покоя. В этот период ионы натрия, вошедшие в нейрон при возбуждении, заменяются на ионы калия. Этот переход происходит против градиента концентрации, так как ионов натрия во внешней среде, окружающей нейроны, намного больше, чем в клетке после момента ее возбуждения. Переход ионов натрия против градиента концентрации, как уже отмечалось, осуществляется с помощью натриевого насоса, для работы которого необходима энергия АТФ. В конце концов все это приводит к восстановлению исходной концентрации катионов калия и натрия внутри клетки (аксона), и нерв готов для получения следующего импульса возбуждения. Другим не менее важным процессом для нервной ткани является передача нервного импульса от одной нервной клетки к другой или воздействие на клетки эффекторного органа.

Роль медиаторов в передаче нервных импульсов

Связь миллиардов нейронов мозга осуществляется посредством медиаторов. Химическое вещество можно отнести к числу медиаторов лишь в том случае, если оно удовлетворяет ряду критериев. В нервных волокнах должны содержаться ферменты, необходимые для синтеза этого вещества. При раздражении нервов это вещество должно выделяться, реагировать со специфическим рецептором на постсинаптической клетке и вызывать биологическую реакцию. Должны существовать механизмы, быстро прекращающие действие этого химического вещества.

Всем этим критериям удовлетворяют два вещества — ацетилхолин и норадреналин. Содержащие их нервы называют соответственно холинергическими и адренергическими. В соответствии с этим все эфферентные системы делят на холинорецепторы и адренорецепторы.

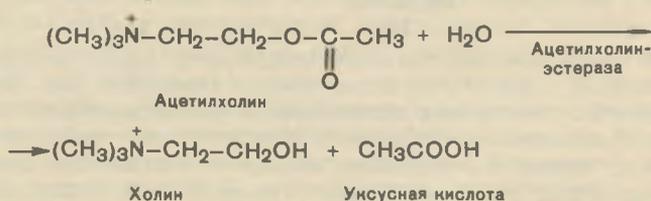
Ряд других химических веществ удовлетворяет многим, но не всем перечисленным критериям. К таким медиаторам относятся дофамин, адреналин, серотонин, октопамин, гистамин, ГАМК и др.

Обширная группа холинорецепторов весьма неоднородна как в структурном, так и в функциональном отношении. Объединяют их медиатор — ацетилхолин — и общая схема строения синапса.

Ацетилхолин представляет собой сложный эфир уксусной кислоты и холина. Он синтезируется в нервной клетке из холина и активной формы ацетата — аце-

рецептором и медиатором запускает ряд реакций, заставляющих постсинаптическую нервную клетку или эффекторную клетку выполнять свою специфическую функцию. После выделения медиатора должна наступить фаза его быстрой инактивации или удаления, чтобы подготовить синапс к восприятию нового импульса. В холинергических синапсах это происходит двумя путями. Прежде всего ацетилхолин подвергается ферментативному гидролизу. Второй путь — это энергозависимый активный транспорт ацетилхолина в нейрон, где он накапливается для последующего повторного использования.

Гидролитический распад ацетилхолина на уксусную кислоту и холин катализируется ферментом, который получил название ацетилхолинэстеразы:



В большинстве отделов головного мозга гидролиз ацетилхолина осуществляется ацетилхолинэстеразой (истинной холинэстеразой, которая гидролизует ацетилхолин быстрее, чем иные эфиры холина). В нервной ткани существуют и другие эстеразы, которые способны гидролизовать ацетилхолин, но значительно медленнее, чем, например, бутирилхолин. Эти эстеразы называются холинэстеразой (или псевдохолинэстеразой). К числу холинергических систем относятся моторные нейроны, образующие нервно-мышечные соединения, все преганглионарные нейроны автономной нервной системы и постганглионарные нейроны парасимпатической нервной системы. Большое количество холинергических симпатических областей обнаружено также в головном мозге. В зависимости от чувствительности к той или иной группе химических соединений холинергические нейроны делятся на «мускариновые» (активируемые мускарином) и «никотиновые» (активируемые никотином). Мускариновые рецепторы ацетилхолина, имеющиеся во многих нейронах автономной системы, специфически блокируются атропином. Никотиновые синапсы присутствуют в ганглиях и скелетных мышцах. Их ингибиторами являются кураре и активный компонент этого яда — D-тубокурарин.

Необходимо подчеркнуть, что в адренорецепторах существует два вида рецепторов для норадреналина: α - и β -адренергические рецепторы. Эти рецепторы можно отличить друг от друга по специфическим реакциям, которые они вызывают, а также по тем специфическим агентам, которые способны блокировать данные реакции.

β -Адренергические рецепторы включают эффекторную клетку с помощью аденозин-3', 5'-монофосфата, или цАМФ — универсального «второго посредника» между гормонами и различными функциями клеток, на которые воздействуют гормоны (см. главу 6).

Установлено, что как только β -адренергический рецептор (расположенный на наружной поверхности мембраны эффекторной клетки) начнет взаимодействовать с норадреналином, на внутренней поверхности клеточной мембраны активируется фермент аденилатциклаза. Затем в клетке аденилатциклаза превращает АТФ в цАМФ; последний в свою очередь способен оказывать влияние на метаболизм клетки. Этот сложный ряд последовательных реакций может быть заблокирован пропранололом — веществом, препятствующим связыванию норадреналина с β -адренергическим рецептором.

Известно, что в метаболизме катехоламиновых медиаторов особая роль принадлежит ферменту моноаминоксидазе (МАО). Этот фермент удаляет аминогруппу ($-\text{NH}_2$) у норадреналина, серотонина, дофамина и адреналина, тем самым инактивируя упомянутые медиаторы. Однако в последние годы было показано, что, помимо ферментативного превращения, существует и другой механизм быстрой инактивации, точнее удаления, медиаторов. Оказалось, что норадреналин быстро исчезает из си-

наптической щели в результате вторичного поглощения симпатическими нервами; вновь оказавшись в нервном волокне, медиатор, естественно, не может воздействовать на постсинаптические клетки. Конкретный механизм этого явления пока не вполне ясен.

Адренергическая и холинергическая системы головного мозга тесно взаимодействуют с другими системами мозга, в частности использующими серотонин в качестве медиатора. В основном серотонинсодержащие нейроны сосредоточены в ядрах мозгового ствола. Нейромедиаторная роль серотонина осуществляется в результате взаимодействия серотонина со специфическими серотонинергическими рецепторами. Исследования, проведенные с ингибитором синтеза серотонина — *n*-хлорфенилаланином, а также с другими ингибиторами, дают основания считать, что серотонин влияет на процессы сна. Выявлено также, что торможение кортикостероидами секреторной активности гипофиза оказывается менее эффективным у тех животных, мозг которых беднее серотонином.

Важным нейромедиатором, выполняющим тормозные функции, является ГАМК, количество которой в головном мозге во много раз выше, чем других нейромедиаторов. Так, в гипоталамусе суммарное содержание ацетилхолина, норадреналина, дофамина и серотонина не превышает 10 мкг/г, в то время как ГАМК в этом отделе головного мозга более 600 мкг/г.

В настоящее время в терапевтической практике применяется большое количество лекарственных средств, которые действуют через систему медиаторов. Многие лекарственные вещества, успешно применяемые при лечении гипертонии, влияют на накопление и выделение адренергических медиаторов. Например, резерпин — понижающее артериальное давление средство — специфически тормозит процесс переноса катехоламинов в специальные гранулы нейронов и тем самым делает эти амины доступными действию эндогенной MAO.

Гипотензивные лекарственные препараты, такие как α -метилдофа, под действием содержащихся в нервной клетке (аксоне) ферментов превращаются в вещества, напоминающие по своему строению норадреналин. Эти «ложные» медиаторы накапливаются и выделяются вместе с естественными медиаторами, разбавляя их и тем самым снижая их эффект.

Многие антидепрессанты (вещества, снимающие депрессию) увеличивают содержание катехоламинов в синаптической щели, т. е. количество медиаторов для стимулирования рецептора возрастает. К таким веществам, в частности, относятся имипрамин (блокирует поглощение норадреналина нервными волокнами), амфетамин (одновременно способствует выделению норадреналина и блокирует его поглощение), ингибиторы MAO (подавляют метаболизм катехоламинов) и др. В связи с этим возникла катехоламиновая гипотеза депрессивных состояний, согласно которой психическая депрессия связана с недостатком катехоламинов в мозге.

В начале 50-х годов фармакологи выяснили, что известный галлюциноген — диэтиламин лизергиновой кислоты (ЛСД) не только сходен по химическому строению с серотонином, но и нейтрализует некоторые его фармакологические эффекты (блокируя рецепторы серотонина). Поэтому было высказано предположение, что нарушение обмена серотонина может быть причиной возникновения особых психических заболеваний.

Считают, что такие антипсихотические средства, как аминазин (хлорпромазин) и галоперидол, усиливая синтез катехоламинов, способны блокировать дофаминовые рецепторы в мозге.

Механизмы памяти

Память не сосредоточена в одном строго локализованном участке мозга, подобно центрам зрения, слуха, речи и т. д. В то же время память — не свойство всего мозга в целом. Субстратом памяти человека являются нейроны.

Память человека нельзя рассматривать в отрыве от его деятельности, так как не познание познает, не мышление мыслит, не память запоминает и воспроизводит, а познает, мыслит, запоминает и воспроизводит человек, определенная личность.

В последние годы отчетливо показано, что обучение животного новым навыкам отражается на химизме мозговых клеток (нейронов): меняются количество уридина в цитоплазматической РНК, степень метилирования ДНК и фосфорилирования

ядерных белков. Применение стимуляторов и веществ — предшественников РНК облегчает обучение, а введение блокаторов синтеза РНК, напротив, затрудняет этот процесс. Существуют данные, что после запоминания информации меняется антигенный состав мозговой ткани. Несомненно, память — цепь процессов, в которых сложные вещества, в частности РНП и в первую очередь информсомы, играют существенную роль. Принято выделять несколько форм биологической памяти: генетическую, иммунологическую и нейробиологическую.

Биохимические основы генетической памяти более или менее ясны. Ее носителем является ДНК клетки. Следующей по сложности формой памяти является иммунологическая. Этот вид памяти хотя и включает элементы генетической памяти, но находится на более высокой степени сложности. Наконец, система нейробиологической памяти еще более сложна. Эта форма в свою очередь может быть разделена на кратковременную память (КП) и долговременную память (ДП). В основе КП, по всей вероятности, лежит «циркуляция» информации, полученной в виде импульсов, по замкнутым цепям нейронов. При этом синаптический эффект, изменения ядерно-ядрышкового аппарата, выброс в цитоплазму нейрона биологически активных веществ и сопутствующая этим процессам перестройка обмена веществ клетки — все это может расцениваться как показатели функционирования КП.

Включение блоков ДП обеспечивается примерно через 10 мин после прихода информации в клетку. За это время происходит перестройка биологических свойств нервной клетки. Ряд исследователей считают, что афферентная импульсация, приходящая в нервные клетки во время обучения, вызывает либо чисто количественную активацию синтеза РНК и белка, что может приводить к установлению новых синаптических связей и перестройке существующих, либо наступающая активация синтеза нуклеиновых кислот и белка носит целенаправленный, специфический характер, а синтезированные молекулы являются хранилищем информации.

Пептиды и болевые реакции

В 70-х годах в головном мозге различных позвоночных животных были обнаружены специфические рецепторы морфина. Эти рецепторы сосредоточены на синаптических мембранах, наиболее богата ими лимбическая система, от которой зависит эмоциональный ответ. В дальнейшем из мозговой ткани выделили эндогенные пептиды, имитирующие при инъекциях различные эффекты морфина. Эти пептиды, обладающие способностью специфически связываться с опиатными рецепторами, получили название **эндорфинов** и **энкефалинов** (см. главу 6).

Оказалось, что пептиды с морфиноподобной активностью являются производными β-липотропного гормона гипофиза. Установлено, что β-эндорфин представляет собой фрагмент β-липотропина с 61-го по 91-й, γ-эндорфин — с 61-го по 77-й и α-эндорфин — с 61-го по 76-й аминокислотный остаток.

Энкефалины — также фрагменты β-липотропина, но они значительно меньше, чем эндорфины. Энкефалины являются пентапептидами. Наиболее изучены два пентапептида: метионинэнкефалин (Тир — Гли — Гли — Фен — Мет) и лейцинэнкефалин (Тир — Гли — Гли — Фен — Лей). Содержание метионинэнкефалинов в головном мозге в 4 раза превышает содержание лейцинэнкефалинов.

СПИННОМОЗГОВАЯ ЖИДКОСТЬ

Общий объем спинномозговой жидкости (ликвора) в норме у взрослого человека составляет около 125 мл, который каждые 3—4 ч обновляется. Ликвор рассматривают иногда как первичный трансудат или ультрафильтрат плазмы. Состав спинномозговой жидкости существенно отличается от состава плазмы крови (см. табл. 16.1), что и позволяет приписывать сосудистому эндотелию в нервной системе главную роль в осуществлении барьерной функции. Вода в спинномозговой жидкости состав-

Таблица 18.5. Химический состав спинномозговой жидкости

Компоненты	Содержание
Белки	0,15—0,40 г/л
Альбумины/глобулины	4 : 1
Остаточный азот	8,57—14,28 ммоль/л
Азот аминокислот	1,14—1,93 »
Азот мочевины	2,86—7,14 »
Глюкоза	2,50—4,16 »
Молочная кислота	1,67 »
Холестерин	2,62—5,20 »
Триацилглицерины	Следы
Лецитин	»
Na ⁺	146 ммоль/л
K ⁺	3,5—4,0 »
Ca ²⁺	1,5 »
Cl ⁻	125 »
HCO ₃ ⁻	25 »

ляет 99 %, на долю плотного остатка приходится около 1 %. Химический состав спинномозговой жидкости представлен в табл. 18.5.

Содержание белка в спинномозговой жидкости незначительно (0,15—0,40 г/л), причем отношение альбумины/глобулины равно 4; липидов в сотни раз меньше, чем в плазме крови. Возможно, что липиды плазмы крови в спинномозговой жидкости отсутствуют. Общее содержание низкомолекулярных азотсодержащих веществ, особенно аминокислот, в 2—2,5 раза меньше, чем в крови. В ткани мозга, как уже отмечалось, количество свободных аминокислот высоко и превышает во много раз концентрацию их в крови и тем более в спинномозговой жидкости. Установлено, что некоторые аминокислоты (например, глутаминовая кислота) почти не проникают через гематоэнцефалический барьер. В то же время амиды аминокислот (в частности, глутамин) легко преодолевают этот барьер. Содержание глюкозы в спинномозговой жидкости относительно велико (2,50—4,16 ммоль/л), но несколько меньше, чем в крови, причем концентрация глюкозы в спинномозговой жидкости может повышаться или снижаться в зависимости от изменений содержания глюкозы в крови.

По содержанию натрия и калия спинномозговая жидкость практически не отличается от плазмы крови. Кальция в спинномозговой жидкости почти в 2 раза меньше, чем в плазме крови. Содержание хлора заметно выше, а концентрация ионов бикарбоната несколько ниже в спинномозговой жидкости, чем в плазме. Таким образом, минеральный состав спинномозговой жидкости также имеет характерные особенности по сравнению с таковым в плазме крови. Все это дает основание считать, что проникновение веществ через мембрану сосудистого эндотелия нервной системы — активный биохимический процесс. Источниками энергии для активного транспорта служат процесс аэробного окисления глюкозы и лишь в незначительной степени гликолиз.

Исследование спинномозговой жидкости при патологических состояниях имеет важное клиническое значение. Установлено, что при остром гнойном менингите содержание белка в спинномозговой жидкости может резко повышаться (5—20 г/л) по сравнению с нормой (0,15—0,40 г/л). Концентрация глюкозы также существенно изменяется. Гипогликорахия (уменьшение содержания глюкозы в спинномозговой жидкости) характерна для менингита, тогда как гипергликорахия (увеличение содержания глюкозы в спинномозговой жидкости) наблюдается при энцефалитах, диабете и т. д. Характерно снижение концентрации хлора в спинномозговой жидкости при менингитах и повышение содержания его при энцефалитах. Показано также, что при менингитах, инсультах, опухолях мозга, травмах в спинномозговой жидкости повышается активность АсАТ, ЛДГ и ряда других ферментов.

МЫШЕЧНАЯ ТКАНЬ

Мышечная ткань составляет 40–42% от массы тела. Основная динамическая функция мышц — обеспечить подвижность путем сокращения и последующего расслабления. При сокращении мышц осуществляется работа, связанная с превращением химической энергии в механическую.

Обычно принято различать три типа мышечной ткани: скелетную мускулатуру, сердечную мышцу и гладкую мускулатуру.

Как известно, существует также деление на гладкие и поперечнополосатые мышцы. К поперечнополосатым мышцам, помимо скелетных, относятся также мышцы языка и верхней трети пищевода, внешние мышцы глазного яблока и некоторые другие. В морфологическом отношении миокард относится к поперечнополосатой мускулатуре, но по ряду других признаков он занимает промежуточное положение между гладкими и поперечнополосатыми мышцами.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТОЙ МЫШЦЫ

Поперечнополосатая мышца состоит из многочисленных удлинённых волокон¹, или мышечных клеток. Двигательные нервы входят в различных точках в мышечное волокно и передают ему электрический импульс, вызывающий сокращение. Мышечное волокно обычно рассматривают как многоядерную клетку гигантских размеров, покрытую эластичной оболочкой — сарколеммой (рис. 19.1). Диаметр функционально зрелого поперечнополосатого мышечного волокна обычно составляет от 10 до 100 мкм, а длина волокна часто соответствует длине мышцы.

В каждом мышечном волокне по длине его в полужидкой саркоплазме расположено, нередко в форме пучков, множество нитевидных образований — миофибрилл (обычно толщиной менее 1 мкм), обладающих, как и все волокно в целом, поперечной исчерченностью. Поперечнополосатая исчерченность волокна, зависящая от оптической неоднородности белковых веществ, локализованных во всех миофибриллах на одном уровне, легко выявляется при исследовании волокон скелетных мышц в поляризационном или фазово-контрастном микроскопах.

В саркоплазме мышечных волокон обнаруживается и ряд других структур: митохондрии, микросомы (рибосомы), трубочки и цистерны саркоплазматической сети, различные вакуоли, глыбки гликогена и включения липидов, играющие роль запасных энергетических материалов, и т. д. (см. рис. 19.1).

¹ Выделяют также белые и красные мышечные волокна. Белые мышечные волокна отличаются более высоким содержанием миофибрилл и в соответствии с этим способностью к более быстрым сокращениям. В красных волокнах содержание миофибрилл относительно меньше, а саркоплазмы больше. Своё название красные волокна получили благодаря высокому содержанию в них миоглобина. Красные мышечные волокна отличаются более выраженным тоническим характером сокращения. У человека белые и красные волокна встречаются обычно вместе в одной и той же мышце.

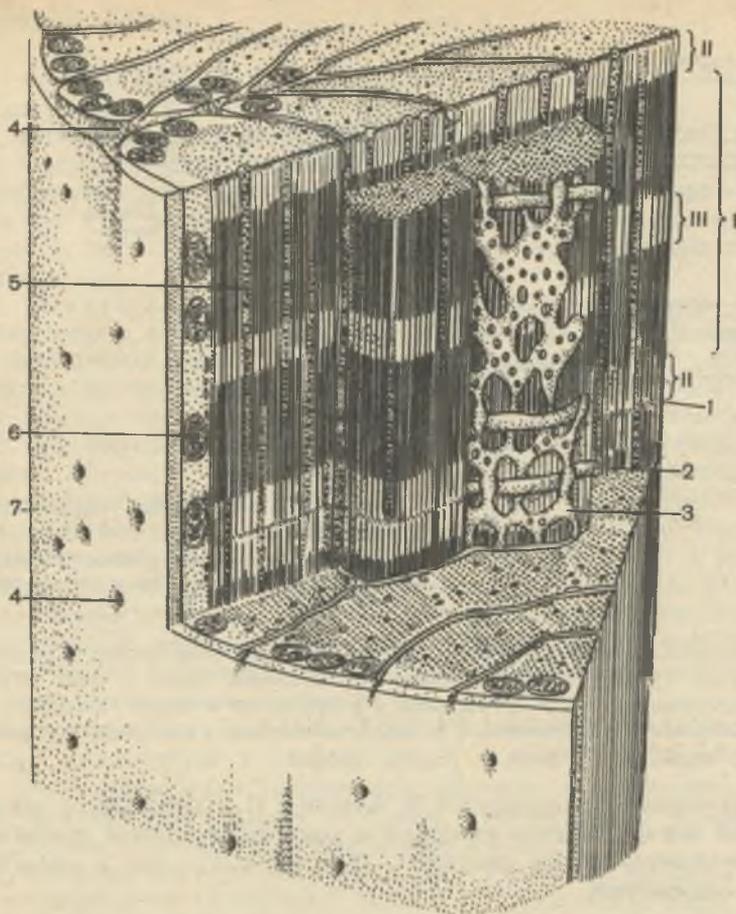


Рис. 19.1. Структура волокна скелетной мышцы (по Гассельбаху).

I — А-диск; II — I-диск; III — Н-зона; 1 — Z-линия; 2 — Т-система; 3 — саркоплазматическая сеть; 4 — устье Т-системы; 5 — гликоген; 6 — митохондрии; 7 — сарколемма.

Повторяющимся элементом поперечнополосатой миофибриллы является саркомер — участок миофибриллы, границами которого служат узкие Z-линии. Каждая миофибрилла состоит из нескольких сот саркомеров. Средняя длина саркомера 2,5–3,0 мкм. В середине саркомера находится зона протяженностью 1,5–1,6 мкм, темная в фазово-контрастном микроскопе и обнаруживающая в поляризованном свете сильное двойное лучепреломление; ее принято называть диском А (анизотропный диск). В центре диска А расположена линия М, которую можно наблюдать только в электронном микроскопе. Среднюю часть диска А занимает зона Н более слабого двойного лучепреломления. Наконец, существуют изотропные диски, или диски I, с очень слабым двойным лучепреломлением, в фазово-контрастном микроскопе они кажутся более светлыми, чем диски А. Длина дисков I около 1 мкм. Каждый из них разделен на две равные половины Z-мембраной, или Z-линией.

Согласно современным представлениям, в дисках А расположены толстые нити, состоящие главным образом из белка миозина, и тонкие нити, состоящие, как правило, из второго компонента актомиозиновой системы — белка актина. Тонкие (актиновые) нити начинаются в пределах каждого саркомера у Z-линии, тянутся через диск I, проникают в диск А и прерываются в области зоны Н (рис. 19.2).

При исследовании тонких срезов мышц под электронным микроскопом было обнаружено, что белковые нити расположены строго упорядоченным образом. Толстые нити диаметром 12–16 нм и длиной примерно 1,5 мкм уложены в форме шестиугольника диаметром

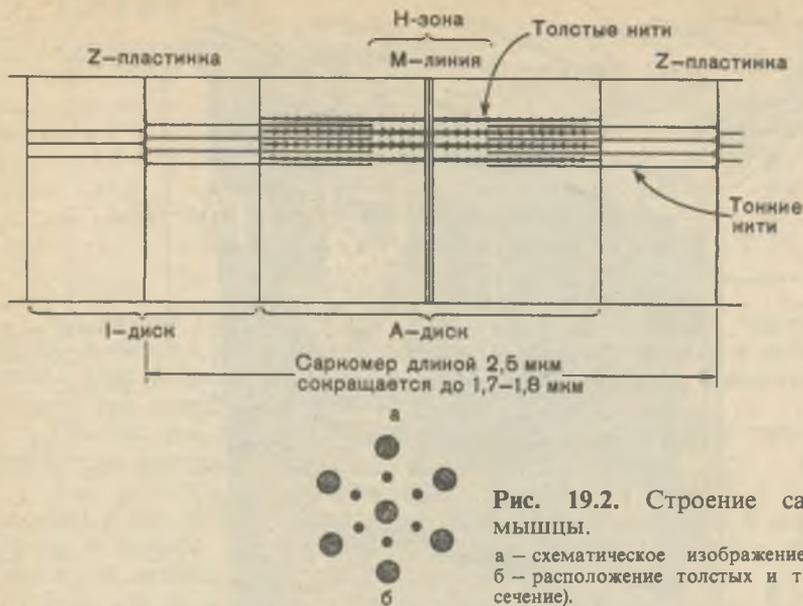


Рис. 19.2. Строение саркомера скелетной мышцы.

а — схематическое изображение структуры саркомера; б — расположение толстых и тонких нитей (поперечное сечение).

40–50 нм и проходят через весь диск А. Между этими толстыми нитями проходят тонкие нити диаметром 8 нм, простираясь от Z-линии на расстояние около 1 мкм. Изучение мышцы в состоянии сокращения показало, что диски I в ней почти исчезают, а область перекрывания толстых и тонких нитей увеличивается (в скелетной мышце в состоянии сокращения саркомер укорачивается до ~ 1,7–1,8 мкм).

Согласно модели, предложенной Э. Хаксли и Р. Нидергерке, а также Х. Хаксли и Дж. Хенсон, при сокращении миофибрилл одна система нитей проникает в другую, т. е. нити начинают как бы скользить друг по другу, что и является причиной мышечного сокращения.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТОЙ МЫШЦЫ

В мышечной ткани взрослых животных и человека содержится от 72 до 80% воды. Около 20–28% от массы мышцы приходится на долю сухого остатка, главным образом белков. Помимо белков, в состав сухого остатка входят гликоген и другие углеводы, различные липиды, экстрактивные азотсодержащие вещества, соли органических и неорганических кислот и другие химические соединения (табл. 19.1).

Таблица 19.1. Химический состав поперечнополосатых мышц млекопитающих (средние значения)

Компонент	В процентах на сырую массу	Компонент	В процентах на сырую массу
Вода	72–80	креатинин	0,003–0,005
Плотные вещества	20–28	АТФ	0,25–0,40
В том числе:		карнозин	0,2–0,3
белки	16,5–20,9	карнитин	0,02–0,05
гликоген	0,3–3,0	ансерин	0,09–0,15
фосфолипиды	0,4–1,0	свободные аминокислоты	0,1–0,7
холестерин	0,06–0,2	молочная кислота	0,01–0,02
креатин + креатинфосфат	0,2–0,55	зола	1,0–1,5

Мышечные белки

Впервые А. Я. Данилевский (1881) разделил экстрагируемые из мышц белки на три класса: растворимые в воде, экстрагируемые 8–12% раствором хлорида аммония и белки, извлекаемые разбавленными растворами кислот и щелочей. В настоящее время белки мышечной ткани делят на три основные группы: саркоплазматические белки, миофибриллярные белки, белки стромы. На долю первых приходится около 35%, вторых – 45% и третьих – 20% всего мышечного белка. Эти группы белков резко отличаются друг от друга по растворимости в воде и солевых средах с различной ионной силой.

Белки, входящие в состав саркоплазмы, принадлежат к числу протеинов, растворимых в солевых средах с низкой ионной силой. Принятое ранее подразделение саркоплазматических белков на миоген, глобулин X, миоальбумин и белки-пигменты в значительной мере утратило смысл, поскольку существование глобулина X и миогена как индивидуальных белков в настоящее время отрицается. Установлено, что глобулин X представляет собой смесь различных белковых веществ со свойствами глобулинов. Термин «миоген» также является собирательным понятием. В частности, в состав белков группы миогена входит ряд протеинов, наделенных ферментативной активностью, например ферменты гликолиза. К числу саркоплазматических белков относятся также дыхательный пигмент миоглобин и разнообразнейшие белки-ферменты, локализованные главным образом в митохондриях и катализирующие процессы тканевого дыхания, окислительно-фосфорилирования, а также многие стороны азотистого и липидного обменов. Недавно была открыта группа саркоплазматических белков – парвальбумины, которые способны связывать ионы кальция. Однако их физиологическая роль остается еще неясной.

К группе миофибриллярных белков относятся миозин, актин и актомиозин – белки, растворимые в солевых средах с высокой ионной силой, и так называемые регуляторные белки: тропомиозин, тропонин, α - и β -акгинин, образующие в мышце с актомиозином единый комплекс. Перечисленные миофибриллярные белки тесно связаны с сократительной функцией мышц.

Миозин составляет 50–55% от сухой массы миофибрилл. Представление о миозине как о главном белке миофибрилл сложилось в результате работ А. Я. Данилевского, О. Фюрта, Э. Вебера и ряда других исследователей. Однако всеобщее внимание к миозину было привлечено лишь после опубликования работ В. А. Энгельгардта и М. Н. Любимовой (1939–1942), в которых впервые было показано, что миозин обладает АТФазной активностью, т. е. способностью катализировать расщепление АТФ на АДФ и H_3PO_4 . Химическая энергия АТФ, освобождающаяся в ходе данной ферментативной реакции, превращается в механическую энергию сокращающейся мышцы. Молекулярная масса миозина скелетных мышц около 500 000 Да (для миозина кролика – 470 000 Да). Молекула миозина (рис. 19.3) имеет сильно вытянутую форму, длину 150 нм. Она может быть расщеплена без разрыва ковалентных связей на субъединицы: две гяжелые полипептидные цепи с относительной молекулярной массой 205 000–210 000 и несколько коротких легких цепей, отно-

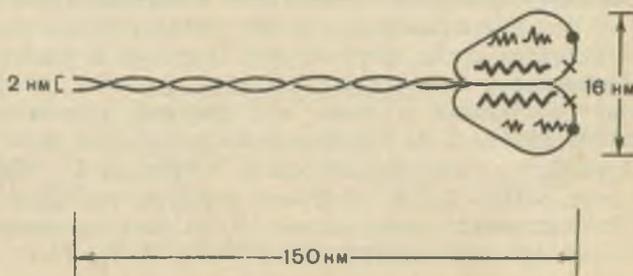


Рис. 19.3. Строение молекулы миозина. Объяснения в тексте.

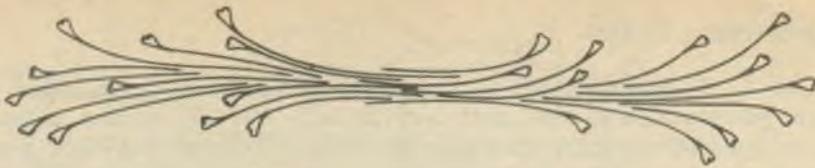


Рис. 19.4. Строение толстого миозинового филамента.

сительная молекулярная масса которых составляет около 20 000. Тяжелые цепи образуют длинную закрученную α -спираль («хвост» молекулы), конец каждой тяжелой цепи совместно с легкими цепями создает глобулу («головку» молекулы), способную соединяться с актином. Эти головки выдаются из основного стержня молекулы. Недавно было показано, что легкие цепи, находящиеся в «головке» миозиновой молекулы и принимающие участие в проявлении АТФазной активности миозина, гетерогенны по своему составу. Количество легких цепей в молекуле миозина у различных видов животных и в разных типах мышц неодинаково.

Кратковременная обработка трипсином расщепляет молекулу миозина на два фрагмента. Из хвостового участка (С-концевой участок молекулы) образуется легкий меромиозин (ЛММ) — фрагмент длиной 90 нм, а из остальной части, включающей «головки», — тяжелый меромиозин (ТММ). ТММ можно расщепить далее путем более длительной обработки трипсином, в результате чего получается один S_2 -фрагмент длиной 40 нм с относительной молекулярной массой 62 000 и два S_1 -фрагмента с относительной молекулярной массой $\sim 110\,000$, представляющие собой «головки».

Толстые нити (толстые миофиламенты) в саркомере надо понимать как образование, полученное путем соединения большого числа определенным образом ориентированных в пространстве молекул миозина (рис. 19.4).

Актин, составляющий $\sim 20\%$ от сухой массы миофибрилл, был открыт Ф. Штраубом в 1942 г. Известны две формы актина: глобулярный (Г-актин) и фибриллярный (Ф-актин) актин. Молекула Г-актина с относительной молекулярной массой 42 000 состоит из одной полипептидной цепочки, в образовании которой принимают участие 374 аминокислотных остатка. Ф-актин является продуктом полимеризации Г-актина и имеет структуру двухцепочечной спирали. Детали этой структуры еще не вполне выяснены.

Актомиозин образуется при соединении миозина с Ф-актином. Актомиозин, как естественный, так и искусственный, т. е. полученный путем соединения *in vitro* высокоочищенных препаратов миозина и Ф-актина, обладает АТФазной активностью. Однако АТФазная активность актомиозина отличается от АТФазной активности миозина. Фермент актомиозин активируется ионами магния и ингибируется этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА) и высокой концентрацией АТФ, тогда как миозиновая АТФаза ингибируется ионами Mg^{2+} , активируется ЭДТА и не ингибируется высокой концентрацией АТФ. Оптимальные значения рН для обоих ферментов также различны.

Как уже отмечалось, кроме рассмотренных основных белков, в миофибриллах содержатся также тропомиозин, тропонин и некоторые другие регуляторные белки. **Тропомиозин** был открыт К. Бейли в 1946 г. Молекула тропомиозина состоит из двух α -спиралей и имеет вид стержня длиной 40 нм, его молекулярная масса 65 000 Да. На долю тропомиозина приходится около 4–7% всех белков миофибрилл. Тропонин — глобулярный белок, открытый С. Эбаси в 1963 г., его молекулярная масса 80 000 Да. В скелетных мышцах взрослых животных и человека тропонин (Тн) составляет лишь около 2% от всех миофибриллярных белков. В его состав входят три субъединицы (Тн-І, Тн-С, Тн-Т). Тн-І (ингибирующий) может ингибиро-

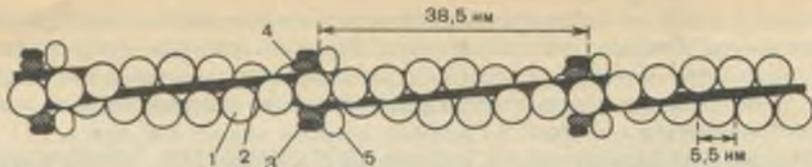


Рис. 19.5. Структура тонкого филамента.

1 – актин; 2 – тропомиозин; 3 – тропонин С; 4 – тропонин I; 5 – тропонин Т.

вать АТФазную активность, Тн-С (кальцийсвязывающий) обладает значительным сродством к ионам кальция, Тн-Т (тропомиозинсвязывающий) обеспечивает связь с тропомиозином. Тропонин, соединяясь с тропомиозином, образует комплекс, названный нативным тропомиозином. Этот комплекс прикрепляется к актиновым филаментам и придает актомиозину скелетных мышц позвоночных чувствительность к ионам кальция (рис. 19.5). В последнее время показано, что тропонин (его субъединицы Тн-Т и Тн-И) способен фосфорилироваться при участии цАМФ-зависимых протеинкиназ. Вопрос о том, имеет ли отношение фосфорилирование тропонина *in vivo* к регуляции мышечного сокращения, остается пока открытым.

Белки стромы в поперечнополосатой мускулатуре представлены в основном коллагеном и эластином. Известно, что строма скелетных мышц, остающаяся после исчерпывающей экстракции мышечной кашицы солевыми растворами с высокой ионной силой, состоит в значительной мере из соединительнотканых элементов стенок сосудов и нервов, а также сарколеммы и некоторых других структур.

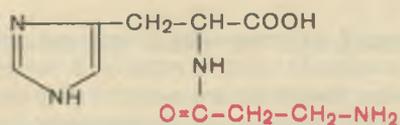
Небелковые азотистые экстрактивные вещества

В скелетных мышцах содержится ряд важных азотистых экстрактивных веществ: адениновые нуклеотиды (АТФ, АДФ и АМФ), нуклеотиды неаденинового ряда, креатинфосфат, креатин, креатинин, карнозин, ансерин, свободные аминокислоты и др. Концентрация адениновых нуклеотидов в скелетной мускулатуре кролика (в микромолях на 1 г сырой массы ткани) составляет: АТФ – 4,43, АДФ – 0,81, АМФ – 0,93. Количество нуклеотидов неаденинового ряда (ГТФ, УТФ, ЦТФ и др.) в мышечной ткани по сравнению с концентрацией адениновых нуклеотидов очень мало.

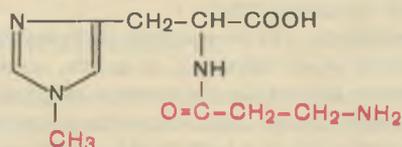
На долю креатина и креатинфосфата приходится до 60% небелкового азота мышц [Фердман Д. Л., 1966]. Креатинфосфат и креатин относятся к тем азотистым экстрактивным веществам мышц, которые участвуют в химических процессах, связанных с мышечным сокращением.

Напомним, что синтез креатина в основном происходит в печени, откуда он с током крови поступает в мышечную ткань. Здесь креатин, фосфорилируясь, превращается в креатинфосфат. В синтезе креатина участвуют три аминокислоты: аргинин, глицин и метионин (см. главу 11).

К числу азотистых веществ мышечной ткани принадлежат и имидазолсодержащие дипептиды – карнозин и ансерин. Карнозин был открыт В. С. Гулевичем в 1900 г.; метилированное производное карнозина – ансерин был обнаружен в мышечной ткани несколько позже.



Карнозин (β-аланил-L-гистидин)



Ансерин (N-метилкарнозин)

Карнозин и ансерин — специфические азотистые вещества скелетной мускулатуры позвоночных — увеличивают амплитуду мышечного сокращения, предварительно сниженную утомлением. Работами акад. С. Е. Северина показано, что имидазолсодержащие дипептиды не влияют непосредственно на сократительный аппарат, но увеличивают эффективность работы ионных насосов мышечной клетки.

Среди свободных аминокислот в мышцах наиболее высокую концентрацию имеет глутаминовая кислота (до 1,2 г/кг) и ее амид — глутамин (0,8—1,0 г/кг). В состав различных клеточных мембран мышечной ткани входит ряд фосфолипидов: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин и др. Кроме того, фосфолипиды принимают участие в обменных процессах, в частности, в качестве субстратов тканевого дыхания. Другие азотсодержащие вещества: мочевины, мочевая кислота, аденин, гуанин, ксантин и гипоксантин — встречаются в мышечной ткани в небольшом количестве и, как правило, являются либо промежуточными, либо конечными продуктами азотистого обмена.

Безазотистые вещества

Одним из основных представителей безазотистых органических веществ мышечной ткани является гликоген; его концентрация колеблется от 0,3 до 2% и выше. На долю других представителей углеводов приходятся десятые и сотые доли процента. В мышцах находят лишь следы свободной глюкозы и очень мало гексофосфатов. В процессе метаболизма глюкозы, а также аминокислот в мышечной ткани образуются молочная, пировиноградная кислоты и много других карбоновых кислот. В мышечной ткани обнаруживаются также в том или ином количестве триглицериды и холестерин.

Состав неорганических солей в мышцах разнообразен. Среди катионов наибольшую концентрацию имеют калий и натрий. Калий сосредоточен главным образом внутри мышечных волокон, а натрий — преимущественно в межклеточном веществе. Значительно меньше в мышцах магния, кальция и железа. В мышечной ткани содержится ряд микроэлементов: кобальт, алюминий, никель, бор, цинк и др.

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ И ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ

Сердечная мышца по содержанию ряда химических соединений занимает промежуточное положение между скелетной мускулатурой и гладкими мышцами. Так, общее содержание белкового азота в скелетных мышцах кролика составляет 30—31 мг/г, а в гладкой мускулатуре (миометрий) — до 20,3 мг/г ткани. В сердечной мышце и особенно в гладкой мускулатуре значительно меньше миофибриллярных белков, чем в скелетной мышце. Общее содержание миофибриллярных белков в гладкой мускулатуре желудка примерно в 2 раза ниже, чем в скелетных мышцах. Концентрация белков стромы в гладкой мышце и миокарде выше, чем в скелетной мускулатуре. Известно, что миозин, тропомиозин и тропонин сердечной мышцы и гладкой мускулатуры заметно отличаются по своим физико-химическим свойствам от соответствующих белков скелетной мускулатуры. Отмечены определенные особенности и во фракциях саркоплазматических белков. Саркоплазма гладкой мускулатуры и миокарда в процентном отношении содержит больше миоальбумина, чем саркоплазма скелетной мускулатуры.

Содержание АТФ в сердечной мышце на 1 г ткани (2,60 мкмоль) ниже, чем в скелетной (4,43 мкмоль), и выше, чем в гладкой мускулатуре (1,38 мкмоль). По содержанию гликогена сердечная мышца также занимает промежуточное положение между скелетной и гладкой мускулатурой. По данным С. Е. Северина (1965), как в сердечной, так и в гладкой мускулатуре обнаруживаются лишь следы ансерина и карнозина (не больше 0,1 г на 1 кг сырой массы).

Имеется определенная зависимость между характером деятельности мышц и содержанием фосфолипидов. Миокард по сравнению с другими мышечными тканями богаче фосфолипидами, при окислении которых, по-видимому, вырабатывается значительная часть энергии, необходимой для его сокращения.

ИЗМЕНЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ В ОНТОГЕНЕЗЕ

Эмбриональная мышечная ткань по своему химическому составу значительно отличается от скелетной мускулатуры взрослых особей. В мышцах эмбрионов содержится больше воды, чем в функционально зрелой мускулатуре. Соответственно общее содержание белка в мышечной ткани эмбрионов, считая на сырую ткань, оказывается более низким, чем в мышцах животных того же вида в постнатальном периоде развития. По сравнению с мышцами взрослого организма в функционально незрелой мышце ниже содержание миофибриллярных белков (миозина и актомиозина) и выше — белков стромы, миоальбумина, а также глобулинов. По мере развития плода количество миофибриллярных белков увеличивается и возрастает АТФазная активность в мышечных экстрактах.

Для эмбриональной мышечной ткани характерно высокое содержание нуклеопротеинов, а также РНК и ДНК. По мере развития эмбриона количество нуклеопротеинов и нуклеиновых кислот в мышечной ткани быстро уменьшается. Высокоэнергетических соединений (АТФ и креатинфосфат) в функционально незрелой мышце значительно меньше, чем в мышцах зрелых особей. Имидазолсодержащие дипептиды (ансерин и карнозин) появляются в мышечной ткани в строго определенный период онтогенеза. Время появления этих дипептидов тесно связано с мышечной функцией и совпадает с формированием рефлекторной дуги, обеспечивающей возможность двигательного рефлекса, появление Ca^{2+} -чувствительности актомиозина и началом работы ионных насосов. Имеются также характерные особенности в ферментных и изоферментных спектрах эмбриональной мышечной ткани. Так, установлено, что в ходе онтогенеза изменяется изоферментный спектр ЛДГ. В экстрактах из скелетных мышц 3—5-месячного эмбриона на долю изоферментов ЛДГ₃ и ЛДГ₂ приходится соответственно 40 и 31% от общей активности ЛДГ. В процессе эмбрионального развития в скелетной мускулатуре происходит постепенно возрастание активности катодных и снижение активности анодных изоферментов ЛДГ, так что у взрослых особей в скелетной мускулатуре наибольшей активностью обладают уже изоферменты ЛДГ₅ и ЛДГ₄. В процессе развития плода изменяется и изоферментный спектр гексокиназы в мышечной ткани; повышается активность изофермента I и снижается активность изофермента II. Все приведенные данные об изменении химического состава мышечной ткани в онтогенезе относятся почти исключительно к скелетной мускулатуре.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ БИОХИМИЯ МЫШЦ

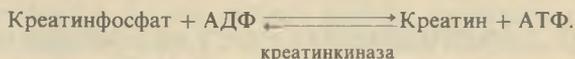
Мышечный аппарат человека и животных характеризуется полифункциональностью. Однако основной функцией мышц является осуществление двигательного акта, т. е. сокращение и расслабление. При сокращении мышц осуществляется работа, связанная с превращением химической энергии в механическую.

Источники энергии мышечной деятельности

В настоящее время принято считать, что процессом, непосредственно связанным с работающим механизмом поперечнополосатого мышечного волокна, является распад АТФ с образованием АДФ и неорганического фосфата. Возникает вопрос, каким образом мышечная клетка может обеспечить свой сократительный аппарат достаточ-

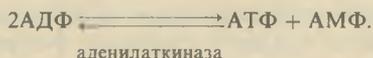
ным количеством энергии в форме АТФ, т. е. каким образом в процессе мышечной деятельности происходит непрерывный ресинтез этого соединения?

Прежде всего ресинтез АТФ обеспечивается трансфосфорилированием АДФ с креатинфосфатом. Данная реакция катализируется ферментом креатинкиназой:



Креатинкиназный путь ресинтеза АТФ является чрезвычайно быстрым и максимально эффективным (за счет каждой молекулы креатинфосфата образуется молекула АТФ). Именно поэтому долгое время не удавалось установить уменьшение концентрации АТФ и соответственно повышение концентрации АДФ даже при достаточно продолжительном тетанусе. Лишь применив специфический ингибитор креатинкиназы (1-фтор-2,4-динитрофенол), а также агенты, препятствующие окислительному фосфорилированию АДФ в АТФ, Т. Кейн и соавт. (1962) смогли продемонстрировать прямой распад АТФ с одновременным приростом неорганического фосфата и АДФ при одиночном сокращении изолированной мышцы лягушки.

Некоторое количество АТФ может ресинтезироваться в ходе аденилаткиназной (миокиназной) реакции:



Запасы креатинфосфата в мышце невелики, а доступность энергии креатинфосфата имеет ценность для работающей мышцы только в том случае, если расход его постоянно возмещается синтезом АТФ в процессе метаболизма. Для любой ткани, в том числе и мышечной, известны два фундаментальных биохимических процесса, в ходе которых регенерируются богатые энергией фосфорные соединения. Один из этих процессов — гликолиз, другой — окислительное фосфорилирование. Наиболее важным и эффективным из них является последний. При достаточном снабжении кислородом мышца, несмотря на анаэробный механизм сокращения, в конечном итоге работает за счет энергии, образующейся при окислении (в цикле Кребса) как продуктов распада углеводов, так и ряда других субстратов тканевого дыхания, в частности жирных кислот, а также ацетата и ацетоацетата.

В последнее время появились данные, доказывающие, что креатинфосфат в мышечной ткани (в частности, в сердечной мышце) способен выполнять не только роль как бы депо легкомобилизуемых макроэргических фосфатных групп, но и играть также роль транспортной формы макроэргических фосфатных связей, образующихся в процессе тканевого дыхания и связанного с ним окислительного фосфорилирования. Предложена схема (рис. 19.6) переноса энергии из митохондрий в цитоплазму клетки миокарда; АТФ, синтезированный в матриксе митохондрий, переносится через внутреннюю мембрану с участием специфической АТФ-АДФ-транслоказы на активный центр митохондриального изофермента креатинкиназы, который расположен на внешней стороне внутренней мембраны; в межмембранном пространстве (в присутствии ионов магния) при наличии в среде креатина образуется равновесный тройной фермент-субстратный комплекс креатин-креатинкиназа-АТФ- Mg^{2+} , который затем распадается с образованием креатинфосфата и АДФ- Mg^{2+} . Креатинфосфат диффундирует в цитоплазму, где используется в миофибриллярной креатинкиназной реакции для рефосфорилирования АДФ, образовавшегося при сокращении. Высказываются предположения, что не только в сердечной мышце, но и в скелетной мускулатуре имеется подобный путь транспорта энергии из митохондрий в миофибриллы.

При работе умеренной интенсивности мышца может покрывать свои энергетические затраты за счет аэробного метаболизма. Однако при больших нагрузках, когда возможность снабжения кислородом отстает от потребности в нем, мышца вынуждена использовать гликолитический путь снабжения энергией. При интенсив-

сократительная активность наблюдается при концентрации ионов кальция около 10^{-6} – 10^{-5} М. При понижении концентрации ионов кальция до 10^{-7} М или ниже мышечные волокна теряют способность к укорочению и развитию напряжения в присутствии АТФ.

По современным представлениям, в покоящейся мышце (миофибриллах и межфибрилярном пространстве) концентрация ионов кальция поддерживается ниже этой пороговой величины в результате связывания их структурами (трубочками и пузырьками) саркоплазматической сети и так называемой Т-системой при участии особого Ca^{2+} -связывающего белка, получившего название кальсеквестрина, входящего в состав этих структур.

Связывание ионов кальция разветвленной сетью трубочек и цистерн саркоплазматической сети не является простой адсорбцией. Это активный физиологический процесс, который осуществляется за счет энергии, освобождающейся при расщеплении АТФ Ca^{2+} -зависимой АТФазой саркоплазматической сети¹. При этом наблюдается весьма своеобразная картина: скорость выкачивания ионов кальция из межфибрилярного пространства стимулируется ионами кальция. В целом этот механизм получил название «кальциевой помпы» по аналогии с хорошо известным в физиологии «натриевым насосом».

Возможность пребывания живой мышцы в расслабленном состоянии при наличии в ней достаточно высокой концентрации АТФ объясняется снижением в результате действия кальциевой помпы концентрации ионов кальция в среде, окружающей миофибриллы, ниже того предела, при котором еще возможно проявление АТФазной активности и сократимости актомиозиновых структур волокна. Быстрое сокращение мышечного волокна при его раздражении от нерва (или электрическим током) является результатом внезапного изменения проницаемости мембран и как следствие выхода из цистерн и трубочек саркоплазматической сети и Т-системы некоторого количества ионов кальция в саркоплазму.

Как уже отмечалось, «чувствительность» актомиозиновой системы к ионам кальция (т. е. потеря актомиозином способности расщеплять АТФ и сокращаться в присутствии АТФ при снижении концентрации ионов кальция до 10^{-7} М) обусловлена присутствием в контрактильной системе (на нитях Ф-актина) белка тропонина, связанного с тропомиозином. В тропонин-тропомиозиновом комплексе ионы кальция связываются именно с тропонином. При этом в молекуле тропонина происходят конформационные изменения, которые, по-видимому, приводят к сдвигу всего тропонин-тропомиозинового стержня и деблокировке активных центров актина, способных взаимодействовать с миозином с образованием сократительного комплекса и активной Mg^{2+} -АТФазы.

В продвижении актиновых нитей вдоль миозиновых, по данным Э. Хаксли, важную роль играют временно замыкающиеся между нитями поперечные мостики, которые являются «головками» миозиновых молекул.

Как видно на рис. 19.7, когда мышца находится в состоянии покоя, головки миозина содержат АТФ (рис. 19.7,а). После поступления в мышцу нервного импульса по саркоплазматической сети проходит волна возбуждения; ионы Ca^{2+} освобождаются и в это время срабатывает мостиковый механизм, миозиновая головка присоединяется к соответствующему центру активной нити (нити Ф-актина) под углом 90° (рис. 19.7,б). Это происходит за счет энергии АТФ. Затем наступает спонтанный поворот головки (рис. 19.7,в) на 45° , развивается натяжение и происходит продвижение актиновой нити на один элементарный шаг (~ 11 нм).

Далее в результате присоединения новой порции АТФ к поперечному мостику наблюдается диссоциация актомиозина на миозин и актин (рис. 19.7,г), т. е. разъеди-

¹ Существует еще один компонент Ca^{2+} -регулирующей системы саркоплазматической сети. Это — ионофор, протеолипид, экстрагируемый из сети; известно, что он ускоряет действие АТФазы как насоса.

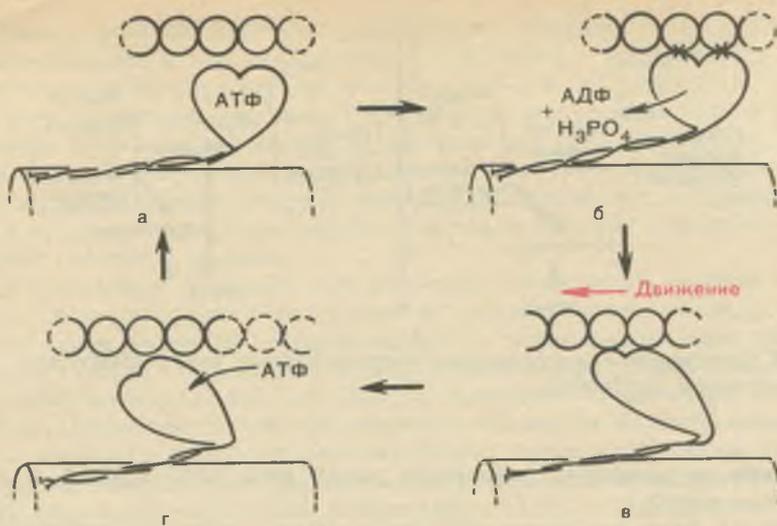


Рис. 19.7. Схематическое изображение функционирования мостиков при сокращении поперечнополосатой мышцы. Объяснения в тексте.

нение миозиновых и актиновых нитей, и одновременно начинается новый акт зарядки (фосфорилирования) свободного миозина путем взаимодействия его с АТФ в присутствии ионов Mg^{2+} (см. рис. 19.7, а). По-видимому, чем большее число мостиков прикреплено в данный момент к актиновым нитям, тем больше сила мышечного сокращения.

Наконец, если возбуждение прекращается, содержание ионов кальция в саркоплазме снижается (кальциевая помпа), то циклы прикрепление — освобождение прекращаются, т. е. головки миозиновых нитей перестают прикрепляться к актиновым нитям. При этом в присутствии АТФ мышца расслабляется и ее длина достигает исходной. Если же прекращается поступление АТФ (аноксия, отравление дыхательными ядами или смерть), то мышца переходит в состояние окоченения. Почти все поперечные мостики толстых (миозиновых) нитей присоединены при этом к тонким актиновым нитям, следствием чего и является полная неподвижность мышцы.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МЫШЦАХ ПРИ ПАТОЛОГИИ

Общим для большинства заболеваний мышц (прогрессирующие мышечные дистрофии, атрофия мышц в результате их денервации, тенотомия, полимиозит, некоторые авитаминозы и т. д.) является резкое снижение в мышцах содержания миофибриллярных белков, возрастание концентрации белков стромы и некоторых саркоплазматических белков, в том числе миоальбумина. Наряду с изменениями фракционного состава мышечных белков при поражениях мышц наблюдается снижение концентрации АТФ и креатинфосфата. Например, через 12 дней после денервации содержание АТФ в денервированной икроножной мышце кролика снижается более чем в 2 раза. Отмечается также снижение АТФазной активности контрактильных белков (миозина), уменьшение количества имидазолсодержащих дипептидов.

При прогрессирующих мышечных дистрофиях и других заболеваниях, связанных с распадом мышечной ткани, часто отмечаются сдвиги в фосфолипидном составе мышц: значительно снижается содержание фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, концентрация же сфингомиелина и лизофосфатидилхолина повышается. До сих пор истинные механизмы изменения фосфолипидного состава мышечной ткани

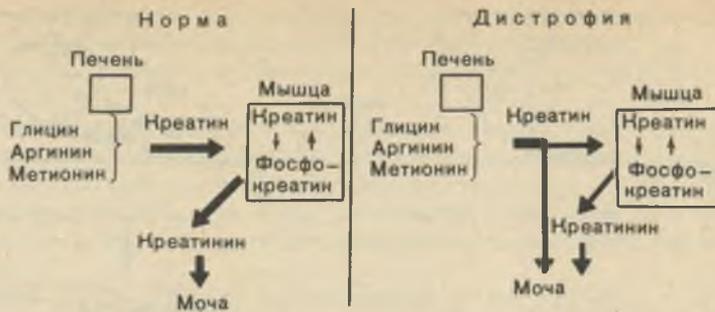


Рис. 19.8. Схематическое изображение происхождения креатинурии при прогрессирующей мышечной дистрофии.

при патологии не выяснены, неизвестна также роль этих сдвигов в патогенезе мышечных дистрофий.

Для многих форм патологии мышечной ткани характерно нарушение метаболизма креатина и его усиленное выделение с мочой (креатинурия). Несмотря на многочисленные исследования и обилие фактического материала, вопрос о причинах креатинурии при заболеваниях мышц не может еще считаться окончательно решенным.

Принято считать, что креатинурия у больных миопатией является результатом нарушения в скелетной мускулатуре процессов фиксации (удержания) креатина и его фосфорилирования. Если нарушен процесс синтеза креатинфосфата, то не образуется и креатинин; содержание последнего в моче резко снижается. В результате креатинурии и нарушения синтеза креатинина резко повышается креатининный показатель (креатин/креатинин) мочи [Фердман Д. Л., 1957]. Данный механизм представлен на рис. 19.8.

При патологии мышечной ткани можно наблюдать определенную закономерность в изменениях активности ферментов в мышцах: уменьшается активность ферментов, локализованных в саркоплазме; незначительно изменяется активность ферментов, связанных с митохондриями; заметно возрастает активность лизосомальных ферментов. Наконец, показано, что при многих заболеваниях мышечной системы наступают сдвиги в системе цАМФ: снижается содержание цАМФ в мышечной ткани, повышается активность фосфодиэстеразы и нарушается способность аденилатциклазы активироваться под влиянием адреналина и фторида натрия.

Нарушение метаболизма сердечной мышцы при ишемической болезни сердца. Ишемизированный миокард характеризуется сниженным окислительным фосфорилированием и повышенным анаэробным обменом. Раннее увеличение гликогенолиза и гликолиза за счет имеющегося в сердечной мышце гликогена и за счет глюкозы, усиленно поглощаемой миокардом в начальной стадии ишемии, происходит в результате повышения внутриклеточной концентрации катехоламинов и цАМФ, что в свою очередь стимулирует образование активной формы фосфорилазы — фосфорилазы *a* и активацию фосфофруктокиназы — ключевого фермента гликолиза. Однако даже максимально усиленный анаэробный метаболизм не способен длительно защищать уже поврежденный гипоксический миокард. Очень скоро запасы гликогена истощаются, гликолиз замедляется вследствие внутриклеточного ацидоза, который ингибирует фосфофруктокиназу.

Содержание АТФ и креатинфосфата в клетке резко снижается в результате нарушения окислительного фосфорилирования в митохондриях. Одно из первых проявлений этого состояния — нарушение мембранной проницаемости. Нарушение целостности мембран приводит к выходу из клетки ионов, в том числе ионов

калия, а также ферментов. Дефицит энергетических ресурсов и нарушение ионного состава, существенные изменения различных мембранных «резервуаров», обеспечивающих контроль за уровнем внутриклеточного кальция, обуславливают торможение функциональной активности мышечных клеток и их постепенную гибель. В этот же период выявляются изменения состава белков миокарда (резкое снижение содержания миофибриллярных белков и накопление белков стромы). Нарушение обмена углеводов, белков и липидов (свободные жирные кислоты не окисляются, а преимущественно включаются в триглицериды) при инфаркте миокарда находит отражение в жировой инфильтрации сердечной мышцы.

Размер повреждения миокарда при возникновении ишемии, падение активности ферментов в сердечной мышце и возрастание активности соответствующих ферментов в сыворотке крови (например, креатинкиназы) в значительной мере коррелируют друг с другом. Следует признать, что в диагностике инфаркта миокарда определение активности креатинкиназы, АсАТ и ЛДГ в сыворотке крови — наиболее чувствительные тесты. Повышение активности указанных ферментов, особенно креатинкиназы, является постоянным и наиболее высоким. Важно также исследование в сыворотке крови изоферментных спектров креатинкиназы (повышение активности изофермента МВ) и ЛДГ (увеличение активности изоферментов ЛДГ₁ и ЛДГ₂).

СОЕДИНИТЕЛЬНАЯ ТКАНЬ

Соединительная ткань в общей сложности составляет примерно 50% от массы тела. Рыхлая соединительная ткань подкожной жировой клетчатки, компактная кость и зубы, сухожилия и межмышечные фасциальные прослойки, кожа и внутриорганный строма паренхиматозных органов, нейроглия и брюшина – все это соединительная ткань.

Все разновидности соединительной ткани, несмотря на их морфологические различия, построены по общим, единым принципам, которые в основном заключаются в следующем (рис. 20.1):

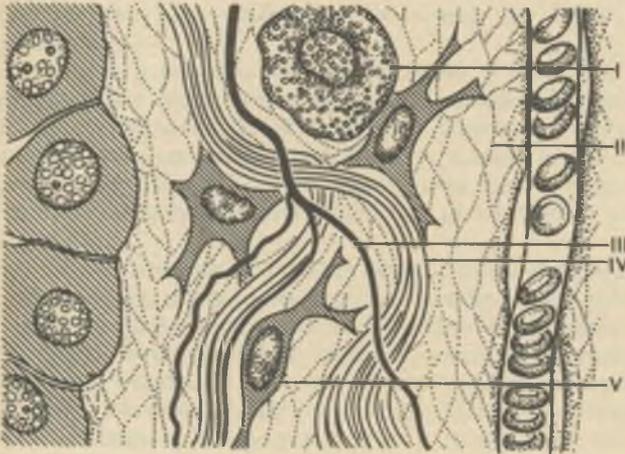


Рис. 20.1. Строение соединительной ткани (схема по А. И. Слуцкому).

I – тучная клетка (гепариноцит); II – ретикулиновые волокна; III – эластическое волокно; IV – коллагеновые волокна; V – фибробласт.

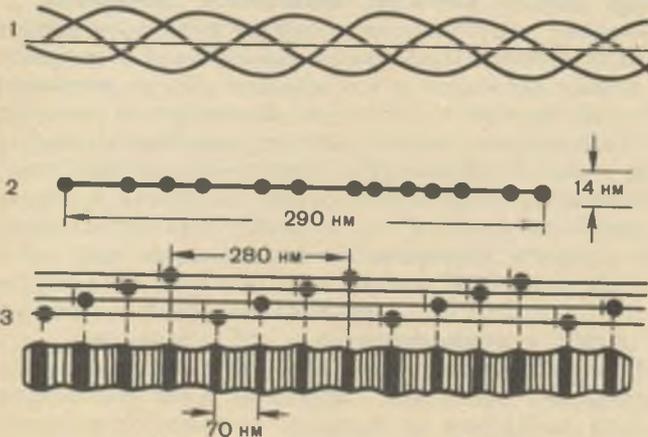


Рис. 20.2. Различные уровни структурной организации коллагена (по Кону).

1 – третичная структура; 2 – молекула тропоколлагена; 3 – коллагеновое волокно.

а) соединительная ткань, как всякая другая ткань, содержит клетки, однако по сравнению с другими тканями их мало. В результате межклеточное вещество занимает больше места, чем клеточные элементы;

б) для соединительной ткани характерно наличие своеобразных волокнистых (фибриллярных) структур — коллагеновых, эластических и ретикулиновых волокон, расположенных в окружении межклеточной субстанции;

в) соединительная ткань богата межклеточным веществом, которое имеет очень сложный химический состав.

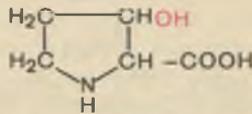
МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ОРГАНИЧЕСКИЙ МАТРИКС СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Коллаген

Характерным компонентом структуры соединительной ткани являются коллагеновые волокна. Они построены в основном из своеобразного белка — коллагена. Коллаген составляет 25–33% от общего количества белка организма взрослого человека или 6% от массы тела.

Видимые в оптическом микроскопе коллагеновые волокна состоят из различных в электронном микроскопе фибрилл. Последние в свою очередь состоят из вытянутых в длину, соединенных между собой конец в конец белковых молекул, названных тропоколлагеном. Тропоколлаген содержит три полипептидные цепи, которые сливаются в спиралевидный триплет (рис. 20.2). Необходимо четко разграничить понятия «коллагеновые волокна» и «коллаген». Первое понятие является по существу морфологическим и не может быть сведено к биохимическим представлениям о коллагене как белке. Коллагеновое волокно представляет собой гетерогенное образование и содержит, кроме белка коллагена, и другие химические компоненты. Молекула тропоколлагена — это белок коллаген. Одной из отличительных черт данного белка является то, что $\frac{1}{3}$ всех его аминокислотных остатков составляет глицин, а $\frac{1}{3}$ — пролин, 4-оксипролин и около 1% — оксилизин (см. главу 1).

Некоторые молекулярные формы коллагена содержат также 3-окси-L-пролин, хотя и в весьма ограниченном количестве:



3-Окси-L-пролин

Каждая полипептидная цепь тропоколлагена содержит около 1000 аминокислотных остатков и имеет относительную молекулярную массу 120 000.

Дальнейшее изучение аминокислотного состава и последовательности чередования аминокислот в полипептидных цепях тропоколлагена показало, что существуют два типа цепей: цепи $\alpha 1$ и цепи $\alpha 2$. Кроме того, имеются четыре разновидности цепи $\alpha 1$: $\alpha 1$ (I), $\alpha 1$ (II), $\alpha 1$ (III) и $\alpha 1$ (IV). В табл. 20.1 представлены данные о структуре тропоколлагенов коллагеновых волокон различных тканей.

Как и все белки, коллаген синтезируется клетками из свободных аминокислот. Однако аминокислотные остатки, специфичные для молекулы коллагена, — оксипролин и оксилизин не образуются из соответствующих свободных аминокислот. Образование этих аминокислотных остатков происходит после включения пролина и лизина в полипептидную цепь с участием ферментов пролингидроксилазы или лизингидроксилазы и кофактора — аскорбиновой кислоты (см. главу 13).

Таблица 20.1. Типы коллагенов и некоторые свойства (по Уайту и др., 1981)

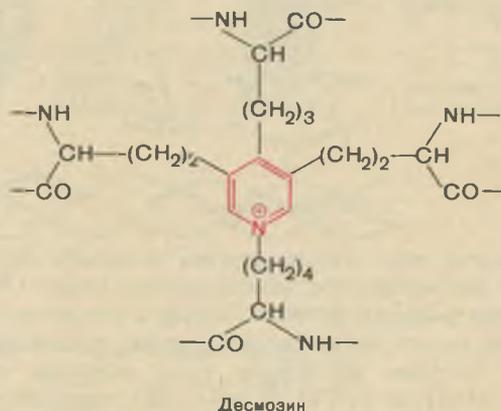
Тип	Ткань	Полипептидные цепи	Дополнительная характеристика
I	Кожа, кость, связки	$[\alpha 1 (I)]_2 \alpha 2$	< 10 остатков оксипролина в цепи
II	Хрящ	$[\alpha 1 (II)]_3$	> 10 остатков оксипролина в цепи
III	Кровеносные сосуды, кожа плода	$[\alpha 1 (III)]_3$	Слишком высокое содержание оксипролина и глицина
IV	Базальная мембрана	$[\alpha 1 (IV)]_3$	Высокое содержание 3-оксипролина; > 20 остатков оксипролина в цепи; низкое содержание аланина

Эластин

Эластин — основной белковый компонент, из которого состоят эластические волокна. Он отличается от коллагена по химическому составу и молекулярной структуре.

Общим для эластина и коллагена является большое содержание глицина и пролина, наличие оксипролина, хотя последнего в эластине примерно в 10 раз меньше, чем в коллагене. Как и в коллагене, в эластине мало метионина и отсутствуют триптофан и цистеин.

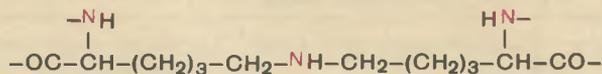
В отличие от коллагена в эластине значительно больше валина и аланина и меньше глутаминовой кислоты и аргинина. В целом характерной особенностью первичной структуры эластина является слишком малое содержание полярных аминокислотных остатков. При ферментативном гидролизе эластина в гидролизате обнаруживаются десмозин и изодесмозин. Эти соединения содержатся только в эластине. Структура их довольно необычна: четыре остатка лизина, соединяясь своими радикалами, образуют замещенное пиридиновое кольцо. Считают, что при образовании десмозина сначала три остатка лизина окисляются до соответствующих ϵ -альдегидов, а затем происходит их соединение с четвертым остатком лизина:



Очевидно, именно благодаря своей структуре десмозин и изодесмозин могут одновременно входить в состав четырех пептидных цепей. По-видимому, этим можно объяснить, что эластин в отличие от других фибриллярных белков способен растягиваться в двух направлениях.

В гидролизатах эластина найдена еще одна необычная «аминокислота», пик которой на хроматограммах располагается между орнитином и лизином. Оказалось,

что это — лизиннорлейцин, который обеспечивает наряду с десмозином и изодесмозином поперечные связи в молекуле эластина:



Остаток лизиннорлейцина

Эластин вместе с коллагеном, протеогликанами и рядом глико- и мукопротеинов является продуктом биосинтетической деятельности фибробластов. Непосредственным продуктом клеточного биосинтеза считается не эластин, а его предшественник — тропоэластин (в коллагене — проколлаген). Тропоэластин не содержит поперечных связей, обладает растворимостью. В последующем тропоэластин превращается в зрелый эластин, нерастворимый, содержащий большое количество поперечных связей¹.

Протеогликаны

Протеогликаны — высокомолекулярные углеводно-белковые соединения. Они образуют основную субстанцию межклеточного матрикса соединительной ткани. На долю протеогликанов приходится до 30% сухой массы соединительной ткани.

Полисахаридная группа протеогликанов сначала получила название мукополисахаридов. Поскольку эти вещества преимущественно обнаруживались в слизистых субстратах, к названию «полисахариды» был добавлен префикс «муко». В дальнейшем эти соединения стали называть гликозаминогликанами. Это название и принято в настоящее время.

ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНЫ (МУКОПОЛИСАХАРИДЫ)

Гликозаминогликаны соединительной ткани — это линейные неразветвленные полимеры, построенные из повторяющихся дисахаридных единиц. В организме гликозаминогликаны не встречаются в свободном состоянии, т. е. в виде «чистых» углеводов. Они всегда связаны с большим или меньшим количеством белка. В их состав обязательно входят остатки мономера либо глюкозамина, либо галактозамина. Второй главный мономер дисахаридных единиц также представлен двумя разновидностями: D-глюкуроновой или L-идуруновой кислотой. В настоящее время четко расшифрована структура шести основных классов гликозаминогликанов (табл. 20.2).

Гиалуриновая кислота впервые была обнаружена в стекловидном теле глаза. Из всех гликозаминогликанов гиалуриновая кислота имеет наибольшую молекулярную массу (10^5 – 10^7 Да). Доля связанного с гиалуриновой кислотой белка в молекуле (частице) протеогликана составляет не более 1–2% от его общей массы. Считают, что основная функция гиалуриновой кислоты в соединительной ткани — связывание воды.

В результате такого связывания межклеточное вещество приобретает характер желеобразного матрикса, способного «поддерживать» клетки. Важна также роль

¹ Десмозин, изодесмозин и лизиннорлейцин, по-видимому, не исчерпывают список соединений, образующих поперечные связи в молекуле эластина.

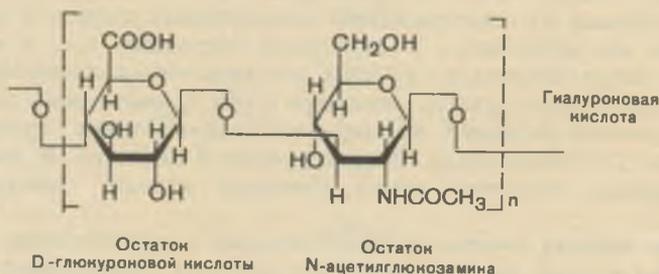
Таблица 20.2. Структура различных классов гликозаминогликанов

Класс гликозаминогликанов	Компоненты, входящие в состав дисахаридных единиц	Структура гликозаминогликанов
Гиалуроновая кислота	1. D-глюкуроновая кислота 2. N-ацетил-D-глюкозамин	D-глюкуроновая кислота ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-ацетилглюкозамин ($\beta 1 \rightarrow 4$) D-глюкуроновая кислота ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-ацетилглюкозамин ($\beta 1 \rightarrow 4$) ...
Хондроитин-4-сульфат (хондроитин-сульфат А)	1. D-глюкуроновая кислота 2. N-ацетил-D-галактозамин-4-сульфат	D-глюкуроновая кислота ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-ацетилгалактозамин-4-сульфат ($\beta 1 \rightarrow 4$) D-глюкуроновая кислота ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-ацетилгалактозамин-4-сульфат ($\beta 1 \rightarrow 4$) ...
Хондроитин-6-сульфат (хондроитин-сульфат С)	1. D-глюкуроновая кислота 2. N-ацетил-D-галактозамин-6-сульфат	D-глюкуроновая кислота ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-ацетилгалактозамин-6-сульфат ($\beta 1 \rightarrow 4$) D-глюкуроновая кислота ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-ацетилгалактозамин-6-сульфат ($\beta 1 \rightarrow 4$) ...
Дерматансульфат ¹	1. L-идуроновая кислота 2. N-ацетил-D-галактозамин-4-сульфат	L-идуроновая кислота ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-ацетилгалактозамин-4-сульфат ($\beta 1 \rightarrow 4$) L-идуроновая кислота ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-ацетилгалактозамин-4-сульфат ($\beta 1 \rightarrow 4$) ...
Кератансульфат	1. D-галактоза 2. N-ацетил-D-глюкозамин-6-сульфат	D-галактоза ($\beta 1 \rightarrow 4$) N-ацетилглюкозамин-6-сульфат ($\beta 1 \rightarrow 3$) D-галактоза ($\beta 1 \rightarrow 4$) N-ацетилглюкозамин-6-сульфат ($\beta 1 \rightarrow 3$) ...
Гепаринсульфат ² и гепарин	1. D-глюкуронат-2-сульфат 2. N-ацетил-D-глюкозамин-6-сульфат	D-глюкуронат-2-сульфат ($\alpha 1 \rightarrow 4$) N-ацетилглюкозамин-6-сульфат ($\alpha 1 \rightarrow 4$) D-глюкуронат-2-сульфат ($\beta 1 \rightarrow 4$) N-ацетилглюкозамин-6-сульфат ($\alpha 1 \rightarrow 4$)

¹ В состав дисахаридной единицы может входить D-глюкуроновая кислота.

² Может содержать N-сульфопроизводное глюкозамина вместо N-ацетилглюкозамина и различное количество идуроновой и глюкуроновой кислот.

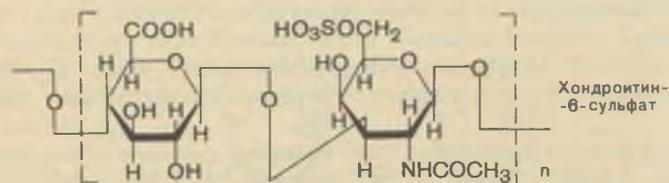
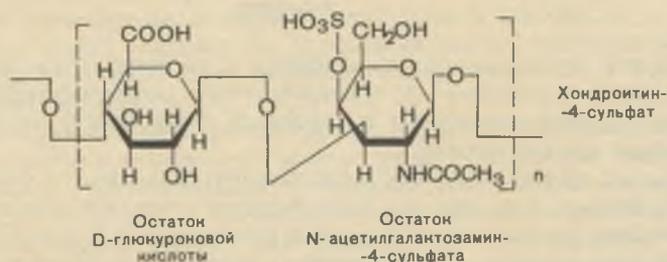
гиалуроновой кислоты в регуляции проницаемости тканей. Ниже приведена структура повторяющейся дисахаридной единицы в молекуле гиалуроновой кислоты:



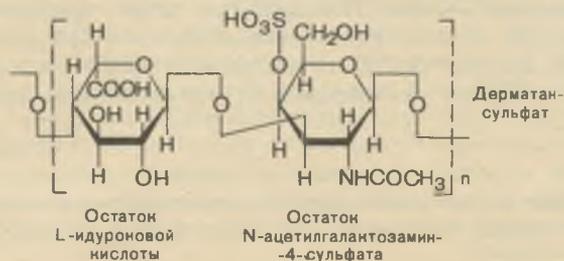
Хондроитин-4-сульфат и **хондроитин-6-сульфат** построены по одному плану. Отличие между ними заключается в локализации сульфатной группы. Несмотря на минимальные различия в химической структуре, физико-химические свойства хондроитин-4-сульфата и хондроитин-6-сульфата существенно отличные; последние различаются также распределением среди разных видов соединительной ткани (табл. 20.3).

Таблица 20.3. Преимущественная локализация различных гликозаминогликанов в тканях

Ткань	Гиалуроно- вая кислота	Хондроитин- 4-сульфат	Хондроитин- 6-сульфат	Дерматан- сульфат	Кератан- сульфат	Гепарин
Кожа	+		+			
Хрящ	+	+		+	+	
Сухожилие			+	+		
Связки			+			
Пупочный канатик	+		+	+		
Стекловидное тело	+					
Синовиальная жидкость	+					
Сердечные клапаны	+		+			
Спинальные диски				+	+	
Кость	+	+			+	
Печень						+
Легкое						+
Сосудистая стенка						+
Хрящ эмбриона	+	+		+		
Роговица глаза		+			+	

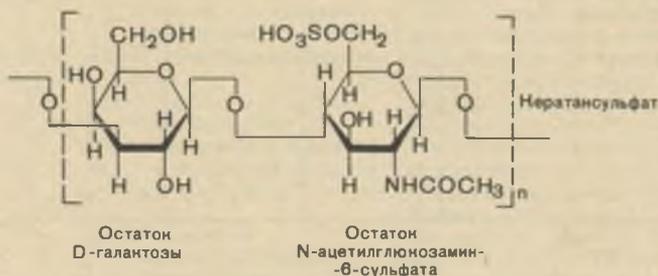


Дерматансульфат особенно характерен для дермы (кожи). Дерматансульфат резистентен к действию гиалуронидаз (тестикулярной и бактериальной). В этом одно из его отличий от хондроитинсульфатов. Кроме того, в состав дисахаридной единицы дерматансульфата входит L-идуроновая, а не D-глюкуроновая кислота (в малом количестве D-глюкуроновую кислоту можно обнаружить в повторяющихся единицах дерматансульфата):



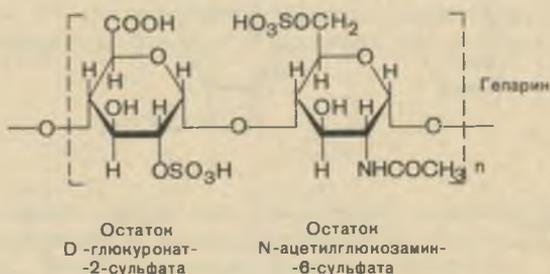
О биологической роли дерматансульфата почти ничего неизвестно. Роль этого гликозаминогликана не может быть сведена только к стабилизации коллагеновых пучков, так как дерматансульфат обнаруживается и в тканях эктодермального происхождения, не содержащих коллагена, например в слизистой оболочке желудка.

Кератансульфат впервые был выделен из роговой оболочки глаза быка, отсюда и название этого гликозаминогликана. В противоположность всем остальным гликозаминогликанам кератансульфат не содержит ни D-глюкуроновой, ни L-идуроновой кислоты:



Установлено, что кератансульфат, выделенный из роговицы глаза (кератансульфат I), и кератансульфат, полученный из хрящевой ткани (кератансульфат II), отличаются по степени сульфатированности и строению связи между кератансульфатом и пептидной частью протеогликана.

Гепарин известен прежде всего как антикоагулянт. Однако его следует относить к гликозаминогликанам, так как он синтезируется тучными клетками, которые являются разновидностью клеточных элементов соединительной ткани. Он может входить в состав протеогликанов; с гликозаминогликанами его объединяет и химическая структура¹.



Гепаринсульфат в отличие от гепарина в дисахаридных единицах чаще содержит N-ацетильные группы, чем N-сульфатные. Кроме того, степень O-сульфатирования гепаринсульфата ниже, чем гепарина.

Биосинтез гликозаминогликанов. Показано, что синтез глюкозамина² и глюкуроновой кислоты, входящих в состав гиалуроновой кислоты, происходит из D-глюкозы. Непосредственным же предшественником гиалуроновой кислоты служат нуклеотидные (уридиндифосфонуклеотидные) производные N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты.

¹ Ряд исследователей считают, что точная структурная формула гепарина еще неизвестна.

² Клетки соединительной ткани могут также использовать для биосинтеза гликозаминогликанов готовый глюкозамин.

Предшественником углеводных остатков сульфатированных гликозаминогликанов, как и у гиалуроновой кислоты, является молекула D-глюкозы. Далее происходит эпимеризация глюкозамина в галактозамин, а глюкуроновой кислоты при синтезе дерматансульфата в идуруновую кислоту. Нуклеотидные производные этих соединений утилизируются при биосинтезе сульфатированных гликозаминогликанов, при этом сульфат включается в биосинтез гликозаминогликанов в виде 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата (ФАФС). В процессе биосинтеза гликозаминогликанов принимает участие большое количество различных ферментов, в том числе трансфераз.

Образование и катаболизм протеогликанов

В соединительной ткани все гликозаминогликаны находятся в соединении с белками. Термин «протеогликан» используют для обозначения веществ, в которых полипептидная и полисахаридная части молекулы соединены прочной ковалентной связью. Примером протеогликана может служить гиалуропротейн, выделенный из синовиальной жидкости и содержащий всего 2,2–2,3% белка. У разных протеогликанов белковые компоненты различны; они не имеют ничего общего с фибриллярными белками соединительной ткани — коллагеном и эластином.

В настоящее время считают, что в большинстве случаев остаток серина служит той точкой полипептидной цепи молекулы протеогликанов, к которой присоединяется гликозаминогликан.

В соединительной ткани протеогликаны образуют ряд «монтажей» последовательно возрастающей сложности, своего рода «иерархии» макромолекулярных агрегатов. Функции протеогликанов в соединительной ткани во многом определяются свойствами входящих в их состав гликозаминогликанов. Так, ионообменная активность гликозаминогликанов как полианионов обуславливает активную роль протеогликанов в распределении ряда катионов в соединительной ткани. Например, накопление кальция в очагах оссификации связано с одновременным накоплением хондроитинсульфатов, активно фиксирующих катионы кальция. Такие функции протеогликанов, как функция связывания экстрацеллюлярной воды и регуляции процессов диффузии, также в значительной мере зависят от свойств входящих в их состав гликозаминогликанов.

При помощи радиоактивных изотопов была установлена высокая скорость обмена протеогликанов. Процессы деполимеризации гликопротеиновых полимеров пока изучены слабо. Из ферментов, способных гидролизовать гликозаминогликаны, наиболее изучена β -гиалуронидаза. Последняя относится к лизосомальным ферментам. β -Гиалуронидаза млекопитающих гидролизует β -1,4-гликозидную связь между дисахаридными единицами гиалуроновой кислоты. В результате образуется дисахарид — глюкуроновая кислота ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-ацетилглюкозамин, который дальше гидролизует под влиянием лизосомальной β -гликозидазы. Хондроитинсульфаты также способны расщепляться под влиянием β -гиалуронидазы.

К факторам, оказывающим регулирующее действие на метаболизм соединительной ткани, следует прежде всего отнести ферменты, гормоны и витамины.

Многие гормональные влияния имеют преимущественное значение для отдельных разновидностей соединительной ткани. В данном разделе рассматриваются те влияния гормонов на соединительную ткань, которые носят общий характер. Так, под влиянием ряда глюкокортикоидных гормонов (кортизона и его аналогов) угнетается биосинтез коллагена фибробластами; тормозится и другая важнейшая метаболическая функция фибробластов — биосинтез гликозаминогликанов.

По-видимому, действие глюкокортикоидных гормонов на соединительную ткань нельзя сводить только к угнетению биосинтетической активности фибробластов. Предполагают, что под их влиянием происходит активация ферментного катаболизма коллагена.

Минералокортикоидные гормоны (альдостерон, дезоксикортикостерон) надпочечников, напротив, стимулируют пролиферацию фибробластов с одновременным усилением биосинтеза «основного вещества» соединительной ткани.

Известно также, что тироксин вызывает усиленную деполимеризацию гиалуроновой кислоты, а соматотропный гормон передней доли гипофиза стимулирует включение пролина в полипептидную цепь тропоколлагена.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ СТАРЕНИИ И НЕКОТОРЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Общим возрастным изменением, которое свойственно всем видам соединительной ткани, является уменьшение содержания воды и отношения: основное вещество/волокна. Уменьшение этого соотношения происходит как за счет нарастания содержания коллагена, так и в результате снижения концентрации гликозаминогликанов. В первую очередь значительно уменьшается содержание гиалуроновой кислоты. Однако не только уменьшается общее количество кислых гликозаминогликанов, но изменяются и количественные соотношения между отдельными гликанами. Одновременно происходит также изменение физико-химических свойств коллагена (увеличение числа и прочности внутри- и межмолекулярных поперечных связей, снижение эластичности и способности к набуханию, развитие резистентности к коллагеназе и т. д.), повышается структурная стабильность коллагеновых волокон (прогрессирование процесса «созревания» фибриллярных структур соединительной ткани). Следует помнить, что старение коллагена *in vivo* не равнозначно износу. Оно является своеобразным итогом протекающих в организме метаболических процессов, влияющих на молекулярную структуру коллагена.

Среди многих поражений соединительной ткани особое место занимают коллагенозы. Для них характерно повреждение всех структурных составных частей соединительной ткани — волокон, клеток и межклеточного основного вещества. К коллагенозам обычно относят ревматизм, ревматоидный артрит, системную красную волчанку, системную склеродермию, дерматомиозит и узелковый периартериит. Однако каждое из этих заболеваний имеет своеобразное течение и сугубо индивидуальные проявления. Среди многочисленных теорий механизма развития коллагенозов наибольшее признание получила теория инфекционно-аллергического происхождения.

Глава 21

КОСТНАЯ ТКАНЬ

Костная ткань — особый вид соединительной ткани. Необходимо различать понятия «кость как орган» и «костная ткань». Кость как орган — сложное структурное образование, содержащее, наряду со специфической костной тканью, надкостницу, костный мозг, кровеносные и лимфатические сосуды, нервы и в ряде случаев хрящевую ткань.

Костная ткань — главная составная часть кости. Она образует костные пластинки. В зависимости от плотности и расположения пластинок различают компактное и губчатое костное вещество. В телах длинных (трубчатых) костей в основном содержится компактное костное вещество. В эпифизах длинных костей, а также в коротких и широких костях преобладает губчатое костное вещество.

Клеточными элементами костной ткани являются остеобласты, остециты и остеокласты.

Остеобласт — клетка костной ткани, участвующая в образовании межклеточного вещества. Отличительной чертой остеобластов является наличие сильно развитого эндоплазматического ретикулума; они обладают мощным аппаратом белкового синтеза. В остеобластах синтезируется проколлаген, который затем перемещается из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи, включается в секретируемые гранулы (везикулы). В результате действия группы специальных пептидаз от проколлагена отщепляется сначала N-концевой, а затем и C-концевой домены и формируется тропоколлаген. Последний в межклеточном пространстве образует фибриллы. В дальнейшем после образования поперечных швов формируется зрелый коллаген.

В остеобластах синтезируются также гликозаминогликаны, белковые компоненты протеогликанов, ферменты и другие соединения, многие из которых затем быстро переходят в состав межклеточного вещества.

Остеоцит (син. клетка костная) — зрелая отростчатая клетка костной ткани, вырабатывающая компоненты межклеточного вещества и обычно замурованная в нем. Как известно, остеоциты образуются из остеобластов при формировании костной ткани.

Остеокласт — гигантская многоядерная клетка костной ткани, способная резорбировать¹ обызвествленный хрящ и межклеточное вещество костной ткани в процессе развития и перестройки кости. Это основная его функция. Следует отметить, что остеокласты, также как и остеобласты, синтезируют РНК, белки. Однако в остеокластах этот процесс протекает менее интенсивно, так как у них слабо развит эндоплазматический ретикулум и имеется небольшое число рибосом, но содержится много лизосом и митохондрий.

¹ Резорбция — рассасывание кости при участии остеокластов, т. е. процесс, характеризующийся образованием углублений (лакун) в костных пластинках.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КОСТНОЙ ТКАНИ

Изучение химического состава костной ткани сопряжено со значительными трудностями, поскольку для выделения органического матрикса требуется провести деминерализацию кости. Кроме того, содержание и состав органического матрикса подвержены значительным изменениям в зависимости от степени минерализации костной ткани.

Известно, что при продолжительной обработке кости в разведенных растворах кислот ее минеральные компоненты растворяются и остается гибкий, мягкий органический остаток (органический матрикс), сохраняющий форму интактной кости.

Межклеточный органический матрикс компактной кости составляет около 20%, неорганические вещества — 70% и вода — 10%. В губчатой кости преобладают органические компоненты, которые составляют более 50%, на долю неорганических соединений приходится 33—40%. Количество воды сохраняется в тех же пределах, что и в компактной кости. (Ю. С. Касавина, В. П. Горбенко).

По данным А. Уайта и соавторов, неорганические компоненты составляют около 1/4 объема кости; остальную часть занимает органический матрикс. Однако вследствие различий в относительной удельной массе органических и неорганических компонентов на долю нерастворимых минералов приходится половина массы кости.

Неорганический состав костной ткани. Более ста лет назад было высказано предположение, что кристаллы костной ткани имеют структуру апатита. В дальнейшем это в значительной мере подтвердилось. Действительно, кристаллы кости относятся к гидроксилатам, имеют форму пластин или палочек и следующий химический состав — $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Кристаллы гидроксилата составляют лишь часть минеральной фазы костной ткани, другая часть представлена аморфным фосфатом кальция — $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Содержание аморфного фосфата кальция подвержено значительным колебаниям в зависимости от возраста. Аморфный фосфат кальция преобладает в раннем возрасте, в зрелой же кости преобладающим становится кристаллический гидроксилатит. Обычно аморфный фосфат кальция рассматривают как лабильный резерв ионов кальция и фосфата.

Заметим, что в организме взрослого человека содержится больше 1 кг кальция, который почти целиком находится в костях и зубах, образуя вместе с фосфатом нерастворимый гидроксилатит. Большая часть кальция в костях постоянно обновляется. Ежедневно кости скелета теряют и вновь восстанавливают примерно 700—800 мг кальция.

В состав минеральной фазы кости входит значительное количество ионов, которые обычно не содержатся в чистом гидроксилатае, например ионы натрия, магния, калия, хлора и др. Высказано предположение, что в кристаллической решетке гидроксилата Ca^{2+} может замещаться другими двухвалентными катионами, тогда как анионы, отличные от фосфата и гидроксила, либо адсорбируются на поверхности кристаллов, либо растворяются в гидратной оболочке кристаллической решетки.

Органический матрикс костной ткани. Приблизительно 95% органического матрикса приходится на коллаген. Вместе с минеральными компонентами коллаген является главным фактором, определяющим механические свойства кости. Коллагеновые фибриллы костного матрикса образованы коллагеном типа I. Известно, что данный тип коллагена входит также в состав сухожилий и кожи. Однако коллаген костной ткани обладает некоторыми особенностями. Есть данные, что он содержит несколько больше оксипролина, чем коллаген сухожилий и кожи. Для костного коллагена характерно большое содержание свободных ε-аминогрупп лизиновых и оксизиновых остатков. Еще одной особенностью костного коллагена является повышенное по сравнению с коллагеном других тканей содержание фосфата. Большая часть этого фосфата связана с остатками серина.

В сухом деминерализованном костном матриксе содержится около 17% некол-

лагеновых белков, среди которых находятся и белковые компоненты протеогликанов. Хотя в целом количество протеогликанов в сформировавшейся плотной кости невелико.

В состав органического матрикса костной ткани входят гликозаминогликаны, основным представителем которых является хондроитин-4-сульфат. Хондроитин-6-сульфат, кератансульфат и гиалуриновая кислота содержатся лишь в небольших количествах.

Принято считать, что гликозаминогликаны имеют непосредственное отношение к оксификации¹. Показано, что окостенение сопровождается изменением гликозаминогликанов: сульфатированные соединения уступают место несulfатированным. Костный матрикс содержит липиды, которые представляют собой непосредственный компонент костной ткани, а не являются примесью в результате недостаточно полного удаления богатого липидами костного мозга. Липиды принимают участие в процессе минерализации. Есть основания полагать, что липиды могут играть существенную роль в образовании ядер кристаллизации при минерализации кости.

Биохимические и цитохимические исследования показали, что остеобласты — основные клетки костной ткани — богаты РНК. Высокое содержание РНК в костных клетках отражает их активность и постоянную биосинтетическую функцию.

Своеобразной особенностью костного матрикса является высокая концентрация цитрата: около 90% его общего количества в организме приходится на долю костной ткани. Принято считать, что цитрат необходим для минерализации костной ткани. Вероятно, цитрат образует комплексные соединения с солями кальция и фосфора, обеспечивая возможность повышения концентрации их в ткани до такого уровня, при котором могут начаться кристаллизация и минерализация.

Кроме цитрата, в костной ткани обнаружены сукцинат, фумарат, малат, лактат и другие органические кислоты.

В табл. 21.1 приведены некоторые данные о химическом составе компактного и губчатого вещества большой берцовой кости (Л. И. Слуцкий)

Таблица 21.1. Химический состав большой берцовой кости человека (в граммах на 100 г сухой обезжиренной кости)

Компоненты	Компактное вещество	Губчатое вещество
Кальций	26,4 ± 0,4	21,4 ± 2,6
Общий белок	5,3 ± 0,4	5,68 ± 0,54
Оксипролин	2,77 ± 0,15	—
Коллаген	15,2 ± 0,2	19,6 ± 4,6
Неколлагеновые белки	5,8 ± 1,1	6,5 ± 1,6
Гексозамины	0,11 ± 0,03	0,18 ± 0,01
Гексуриновая кислота	0,09 ± 0,03	0,13 ± 0,03
Рибонуклеиновая кислота	0,14 ± 0,04	0,18 ± 0,07
Дезоксирибонуклеиновая кислота	0,21 ± 0,05	0,24 ± 0,15

¹ Оксификация (син. окостенение) — физиологический процесс импрегнации межклеточного вещества хрящевой или соединительной ткани минеральными солями; протекает этот процесс при образовании костной ткани.

ФОРМИРОВАНИЕ КОСТИ

Образование межклеточного вещества и минерализация костной ткани является результатом деятельности костеобразующих клеток — остеобластов, которые по мере образования костной ткани замуровываются в межклеточном веществе и становятся остеоцитами. Известно, что костная ткань служит основным депо кальция в организме и активно участвует в кальциевом обмене. Высвобождение кальция достигается путем разрушения (резорбции) костной ткани, а его связывание путем образования костной ткани. С этим связан процесс постоянной перестройки костной ткани, продолжающийся в течение всей жизни организма. При этом происходят изменения формы кости соответственно изменяющимся механическим нагрузкам. Костная ткань скелета человека практически полностью перестраивается каждые 10 лет.

Весьма актуальным является изучение механизма оссификации. Процесс минерализации может осуществляться лишь при наличии строго ориентированных коллагеновых волокон. Как уже было сказано, непосредственное образование коллагенового волокна происходит во внеклеточном пространстве в результате специфического соединения между собой тропоколлагеновых молекул. С помощью рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии показано, что коллагеновое волокно имеет поперечную исчерченность с интервалом 64 нм. Следовательно, период повторяемости структуры (исчерченности) коллагенового волокна в несколько раз меньше, чем длина составляющих волокно молекул тропоколлагена. Это доказывает, что ряды молекул тропоколлагена не лежат точно друг над другом. Иными словами, один ряд тропоколлагенов смещен по отношению к соседнему ряду примерно на $\frac{1}{4}$ длины молекулы. В результате основу структурной организации коллагенового волокна составляют сдвинутые на четверть ступенчато расположенные параллельные ряды тропоколлагеновых молекул. Структурная особенность коллагенового волокна состоит также и в том, что расположенные в ряду молекулы тропоколлагена не связаны «конец в конец». Между концом одной молекулы и началом следующей имеется промежуток. Этот промежуток играет особую роль при формировании кости. Вполне вероятно, что промежутки вдоль ряда молекул тропоколлагена являются первоначальными центрами отложения минеральных составных частей костной ткани.

Образовавшиеся кристаллы в зоне коллагена затем в свою очередь становятся ядрами минерализации, где в пространстве между коллагеновыми волокнами откладывается гидроксилapatит.

Показано, что при формировании кости в зоне кальцификации при участии лизосомных протеиназ происходит деградация протеогликанов. По мере минерализации костной ткани кристаллы гидроксилapatита как бы вытесняют не только протеогликанов, но и воду. Плотная, полностью минерализованная кость практически обезвожена. В этих условиях коллаген составляет примерно 20% по массе и 40% объема костной ткани; остальное приходится на долю минеральных компонентов.

Возникает вопрос, почему не все коллагенсодержащие ткани в организме подвержены оссификации. По-видимому, существуют специфические ингибиторы кальцификации. Ряд исследователей считает, что процессу минерализации коллагена в коже, сухожилиях, сосудистых стенках препятствует постоянное наличие в этих тканях протеогликанов. Существует также мнение, что ингибитором кальцификации может быть неорганический пирофосфат. В минерализующих тканях ингибирующее действие пирофосфата снимается пирофосфатазой, которая, в частности, обнаружена в костной ткани. В целом же биохимические механизмы минерализации костной ткани во многом еще требуют своего дальнейшего исследования.

Сложной является и проблема катаболизма матрикса костной ткани. Как в физиологических, так и в патологических условиях происходит резорбция костной

ткани, при которой практически одновременно имеет место «рассасывание» как минеральных, так и органических структур костной ткани. Что касается минеральных солей, то в их удалении определенная роль принадлежит усиливающейся при остеоллизе¹ продукции органических кислот, в том числе лактата. Известно, что сдвиг рН ткани в кислую сторону, способствует растворению минералов и тем самым их удалению.

Резорбция же органического матрикса требует наличия и действия соответствующих ферментов. К их числу, прежде всего, относятся лизосомные кислые гидролазы, спектр которых в костной ткани довольно широк. Роль кислых гидролаз в процессах катаболизма органического матрикса заключается во внутриклеточном переваривании фрагментов резорбируемых структур. Следовательно, чтобы внутриклеточный гидролиз мог произойти, необходимо структуры органического матрикса предварительно подвергнуть воздействию, в результате которого образовались бы фрагменты полимеров. Так, резорбция коллагеновых волокон требует предварительного воздействия коллагенолитических ферментов. До недавнего времени считали, что коллагеназа отсутствует в животных тканях. Рядом исследователей доказано присутствие коллагенолитических ферментов в некоторых тканях животных, в частности в костной ткани.

ФАКТОРЫ, ОКАЗЫВАЮЩИЕ ВЛИЯНИЕ НА МЕТАБОЛИЗМ КОСТНОЙ ТКАНИ

К факторам, влияющим на метаболизм костной ткани, прежде всего, следует отнести гормоны, ферменты и витамины. Многие аспекты данной проблемы уже рассматривались в предыдущих главах. Поэтому в данном разделе будут приведены лишь краткие сведения.

Известно, что минеральные компоненты костной ткани находятся практически в состоянии химического равновесия с ионами кальция и фосфата сыворотки крови. Поступление, депонирование и выведение кальция и фосфата регулируется весьма сложной системой, в которой среди других факторов важная роль принадлежит паратгормону (гормону окощитовидных желез) и кальцитонину (гормону щитовидной железы). При уменьшении концентрации ионов кальция в сыворотке крови возрастает секреция паратгормона (см. главу 6). Непосредственно под влиянием этого гормона в костной ткани наступает активация клеточных систем, участвующих в резорбции кости (увеличение числа остеокластов и их метаболической активности), т. е. остеокласты способствуют увеличению растворения содержащихся в костях минеральных соединений. Заметим, что паратгормон увеличивает также реабсорбцию ионов кальция в почечных канальцах. Суммарный эффект проявляется в повышении уровня кальция в сыворотке крови.

В свою очередь при увеличении содержания ионов кальция в сыворотке крови секретруется гормон кальцитонин, действие которого состоит в снижении концентрации ионов кальция за счет отложения его в костной ткани. Иными словами, кальцитонин увеличивает минерализацию кости и уменьшает число остеокластов в зоне действия, т. е. угнетает процесс костной резорбции. Все это увеличивает скорость формирования кости.

В табл. 21.2 приведены краткие данные о гормональной регуляции образования и резорбции кости.

¹ Остеоллиз — рассасывание органического участка кости без последующего замещения другой тканью.

Таблица 21.2. Влияние различных гормонов на скорость образования и резорбции кости (по Лайтину)

Гормон	Образование кости	Резорбция кости
Паратгормон	+	++
Кальцитонин	+	-
Тироксин	±	+
Соматотропин	++	+
Кортикостероиды	-	±

+ — стимулирующий эффект; — — угнетающий эффект; ± — влияния нет или оно не четко выражено.

В регуляции содержания ионов кальция важная роль принадлежит витамину D, который участвует в биосинтезе Ca^{2+} -связывающих белков. Эти белки необходимы для всасывания ионов кальция в кишечнике, реабсорбции Ca^{2+} в почках и мобилизации кальция из костей. Поступление в организм оптимальных количеств витамина D является необходимым условием для нормального течения процессов кальцификации костной ткани. При недостаточности витамина D эти процессы нарушаются. Прием в течение длительного времени избыточных количеств витамина D приводит к деминерализации костей.

На развитие кости влияет также витамин А. Прекращение роста костей является ранним проявлением недостаточности витамина А. Считают, что данный факт обусловлен нарушением синтеза хондроитинсульфата. Показано также, что при введении животным высоких доз витамина А, превышающих физиологическую потребность и вызывающих развитие гипервитаминоза А, наблюдается резорбция кости, что может приводить к переломам.

Для нормального развития костной ткани необходим витамин С. Действие витамина С на метаболизм костной ткани обусловлено прежде всего влиянием на процессы биосинтеза коллагена. Аскорбиновая кислота необходима для осуществления реакции гидроксирования пролина и лизина. При недостаточности витамина С остеобласты не синтезируют «нормальный» коллаген, что приводит к нарушениям процессов обызвествления костной ткани. Недостаток витамина С вызывает также изменения в синтезе гликозаминогликанов: содержание гиалуроновой кислоты в костной ткани увеличивается в несколько раз, тогда как биосинтез хондроитинсульфатов замедляется.

Итак, приведенные данные отчетливо демонстрируют, что гормоны и витамины осуществляют регуляцию метаболизма кости, поддерживая тем самым ее структуру и функцию.

ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОСТИ

Общепринятой классификации болезней костей нет. В нашей стране наиболее распространенной является классификация, в основу которой положены этиологический и патогенетический принципы, с указанием сходных по морфологии групп патологических процессов без перечисления отдельных нозологических форм. Различают следующие группы болезней костей: травматические, воспалительные, дистрофические и диспластические заболевания.

Травматические болезни (или повреждения) костей — одна из самых многочисленных групп патологии костей — переломы, травматические артрозы, деформирующий спондилез и другие заболевания.

Воспалительные заболевания костей вызываются стрептококками и стафилококками. Это так называемые неспецифические воспалительные заболевания (остеомиелит, остит и др.).¹ Однако имеются и специфические воспалительные заболевания костей (в том числе и остеомиелит), которые встречаются при туберкулезе, сифилисе, бруцеллезе и др.

Неспецифический остеомиелит возникает либо гематогенно (возбудитель в крови), либо путем распространения воспаления на кость из других органов и тканей, либо в результате экзогенного инфицирования кости при наличии раны.

Дистрофические заболевания костей (или остеохондропатии²), сущность которых состоит в местном нарушении кровообращения кости и появлении участков асептического некроза в губчатом веществе кости.

Дистрофические заболевания костей возникают под влиянием токсических поражений (фосфорные, фтористые, и другие отравления), в результате алиментарных расстройств (цинга, рахит, др.), при эндокринных заболеваниях (паратиреоидная остеодистрофия и др.).

Диспластические заболевания костей — недостаточное или избыточное развитие костей, в том числе гигантизм, пороки развития хрящевой ткани, остеосклероз³.

К этой же группе заболеваний относят опухоли костей — доброкачественные (остеома, хондрома и др.) и злокачественные (первичные — остеогенная саркома, и др.; вторичные — метастатические).

¹ Остит — воспаление или дистрофия компактного вещества кости.

² Остеохондропатия — общее название болезней, характеризующихся дистрофией губчатого вещества коротких или эпифизов длинных трубчатых костей, обычно с патологическими изменениями суставного хряща.

³ Остеосклероз — перестройка костной структуры, характеризующаяся увеличением числа костных перекладин в единице объема кости, их утолщением, деформацией и уменьшением костно-мозговых полостей вплоть до полного их исчезновения.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Арчаков А. И. Микросомальное окисление. — М.: Наука, 1975.
- Ашмарин И. П. Молекулярная биология. — Л.; Изд-во ЛГУ, 1977.
- Балаж А. Биология опухолей: Сомнения и надежды: Пер. с венг. — Мир, 1987.
- Биотехнология./Под ред. А. А. Баева. — М.: Наука, 1984.
- Биохимия гормонов и гормональной регуляции./Под ред. Н. А. Юдаева. — М.: Наука, 1976.
- Браунштейн А. Е. На путях к познанию реакций и ферментов переноса аминогрупп. — М.: Наука, 1974.
- Введение в прикладную энзимологию. Имобилизованные ферменты/Под ред. И. В. Березина, К. Мартынека. — М.: Изд-во МГУ, 1982.
- Вилкинсон Д. Принципы и методы диагностической энзимологии. Пер. с англ. — Медицина, 1981.
- Витамины./Под ред. М. И. Смирнова — М.: Медицина, 1974.
- Зильва Дж. Ф., Пэннелл П. Р. Клиническая химия в диагностике и лечении: Пер. с англ. — М.: Медицина, 1988.
- Кантор Ч., Шиммел П. Биофизическая химия: Пер. с англ. — М.: Мир, 1984.
- Кретович В. Л. Основы биохимии растений. — М.: Высшая школа, 1986.
- Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. — М.: Наука, 1978.
- Ленинджер А. Основы биохимии. Пер. с англ. — М.: Мир, 1985.
- Мардашев С. Р. Биохимические проблемы медицины. — М.: Медицина, 1975.
- Мецлер Д. Биохимия: Пер. с англ. — М.: Мир, 1980.
- Мосс Д., Баттерворт П. Энзимология и медицина: Пер. с англ. — М.: Медицина, 1978.
- Новые физические методы в биологических исследованиях/Под ред. Г. Н. Берестовской. — М.: Наука, 1987.
- Номенклатура ферментов/Под ред. А. Е. Браунштейна. — М.: ВИНТИ, 1979.
- Перспективы биохимических исследований/Под ред. Дж. Гуза и С. Прентиса: Пер. с англ. — М.: Мир, 1987.
- Покровский А. А. Метаболические аспекты фармакологии и токсикологии пищи. — М.: Медицина, 1979.
- Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды: Пер. с англ. — М.: Мир, 1987.
- Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. — М.: Наука, 1972.
- Спирин А. С. Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка. — М.: Высшая школа, 1986.
- Спиричев В. Б., Барашнев Ю. И. Врожденные нарушения обмена витаминов. — М.: Медицина, 1977.
- Страйер Л. Биохимия: Пер. с англ. — М.: Мир, 1984.
- Строев Е. А. Биологическая химия. — М.: Высшая школа, 1986.
- Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. Основы биохимии: Пер. с англ. — М.: Мир, 1981.
- Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК. Краткий курс: Пер. с англ. — М. Мир, 1986.
- Филиппович Ю. Б. Основы биохимии. — М.: Высшая школа, 1985.
- Фридрих П. Ферменты, четвертичная структура и надмолекулярные комплексы: Пер. с англ. — М.: Мир, 1986.
- Шабарова З. А., Богданов А. А. Химия нуклеиновых кислот. — М.: Химия, 1978.
- Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты. Пептиды и белки: Пер. с нем. — М.: Мир, 1985.

Дополнительная литература

- Браунштейн А. Е. На стыке химии и биологии. — М.: Наука, 1987. — 239 с.
- Браунштейн А. Е. Процессы и ферменты клеточного метаболизма. — М.: Наука, 1987. — 548 с.
- Bickerstaff G. H. Enzymes in industry and medicine. — London, Arnold, 1987. — 74 p.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ¹

- Абсорбция 24
Авидин 154
Авитаминозы 134
Адреналин 190
Адсорбция 23
Азотемия продукционная 448
— ретенционная 448
Азотистое равновесие 321
Азотистый баланс 321
— — отрицательный 321
— — положительный 321
— обмен, патология 364
— — тип аммонотелический 354
— — — уреотелический 354
— — — урикоотелический 354
Акромегалия 180
Алкалоз 456
Алкаптонурия 367
Альбинизм 368
Альбумины 61, 441
Альдоза 227
Альдозаза, молекулярная масса 96
Альдостерон 193
Аминоацидурия 366
Аминоацил-мРНК-синтетазы 403
Аминокислоты 29
— гидрофильные см. *Аминокислоты полярные*
— гидрофобные см. *Аминокислоты неполярные*
— дезаминирование 337
— декарбоксилирование 345
— дикарбоновые, обмен 360
— заменимые 323
— идентификация, реакция Гонкинса — Кола 36
— — — ксантопротеиновая 36
— — — Миллона 36
— — — нитропруссидная 36
— — — Паули 36
— — — Сакагучи 36
— — — Салливана 36
— — — Фолина — Чиокалтеу 36
— — — Эрлиха 36
— классификация 29
— концевые, природа, определение, метод Акабори 46
— — — — Сэнгера 45
— — — — Эдмана 45
— незаменимые 323
— неполярные 30
— обмен, нарушения 364
— — промежуточный 337
— обнаружение, реакции химические 36
— определение в гидролизатах белков 35
— — полуколичественные, реакции 36
— превращения под действием микрофлоры кишечника 333
— свойства кислотно-основные 32
— — стереохимия 33
— серосодержащие, обмен 356
— трансминирование 340
— транспорт 336
Аминопептидаза 332
Аминоптерин 120
Аминосакхара 234
Аминотрансферазы 340
Амины биогенные 345
— — распад 350
Аммиак, обезвреживание в организме 350
Анаболизм 209
Ангиотензин 63
Андрогены 197
Андростерон 197
Анемия серповидно-клеточная 69
Антивитамин(ы) 134, 168
— К 145
Антикодон 89, 404
Антиферменты 118
Анурия 481
Апофермент 98
Апоферритин 76
Аспартам 130
Аспаратаминотрансфераза 49
Аспараткарбамоилтрансфераза 123
Атриопептиды 64
N-Ацетил-D-галактозамин 75
N-Ацетил-D-глюкозамин 75
Ацетил-КоА 261
Ацил-КоА 161
Ацидоз 456

Белок (белки), биосинтез 399
— выделение, методы 20
— гомогенность, определение 28
— денатурация 40
— классификация 60
— кристаллизация 27
— митохондриальные, синтез 414
— модификация постсинтетическая 415
— молекулярная масса 38
— мышечные 507
— — актин 508
— — актомиозин 508
— — миозин 507
— — тропомиозин 507

¹ Предметный указатель составлен В. В. Топорковой.

- нормы в питании 322
- негистоновые 72
- обмен, состояние, определяющие факторы 320
- определение полуколичественное, реакции 36
- очистка, методы 20
- — — высаливание 22
- — — хроматография 23
- — — — адсорбционная 23
- — — — ионообменная 24
- — — — распределительная 24
- — от примесей низкомолекулярных 27
- — — — — гель-хроматография 27
- — — — — ультрафильтрация 27
- переваривание 326
- — в желудке 331
- — — в кишечнике 332
- переносчики кислорода, свойства 70
- плазмы крови 439
- продукты распада, всасывание 332
- простые 61
- — обмен 318
- С-реактивный 446
- ренатурация 41
- свойства физико-химические 37
- синтез, ингибиторы 420
- — регуляция путем индукции 417
- — — — репрессии 418
- — трансляция 400
- — этапы 408
- — — активирование аминокислот 409
- — — трансляция 409
- — — — инициация 409
- — — — терминация 413
- — — — элонгация 411
- сложные 65
- — обмен 369
- содержание в тканях 19
- состав аминокислотный 28, 35
- — — гидролиз 28
- структура 42
- — вторичная 51
- — — α -структура 51
- — — β -структура 53
- — первичная 44
- — третичная 54
- — четвертичная 57
- точка изоионная 42
- — изоэлектрическая 42
- фракционирование, методы 22
- функция гормональная 18
- — защитная 18
- — каталитическая 17
- — питательная 18
- — резервная см. *Белки, функция питательная*
- — сократительная 18
- — структурная 18
- — транспортная 18
- — ценность биологическая 322
- — экстракция 20
- Бери-бери 148
- Биотин см. *Витамин Н*
- Биоцитин 154
- Биуретовая реакция 42, 44
- Болезнь Хартнупа 368
- Брадикинин 63
- Вазопрессин 177**
- Вердоглобин 396**
- Вещества витаминоподобные 164**
- Викасол см. *Витамин К₃***
- Витамин(ы) 133**
- антианемический см. *Витамин В₁₂*
- антидерматитный см. *Витамин В₆*
- антиксерофтальмический см. *Витамин А*
- антирахитический см. *Витамин D*
- антискорбутный см. *Витамин С*
- водорастворимые 147
- жирорастворимые 138
- классификация 136
- обмен, нарушения врожденные 135
- определение, методы биологические 136
- — — физико-химические 136
- проницаемости см. *Витамин Р*
- функция(и) биокаталитическая 137
- — нарушения врожденные 135
- А 138
- — распространение в природе 140
- — роль биологическая 139
- — суточная потребность 140
- В₁ 147
- — биологическая роль 148
- — распространение в природе 149
- — суточная потребность 149
- В₂ 149
- — биологическая роль 150
- — распространение в природе 150
- — суточная потребность 150
- В₃ 160
- — биологическая роль 161
- — распространение в природе 161
- — суточная потребность 161
- В₆ 152
- — биологическая роль 153
- — распространение в природе 153
- — суточная потребность 153
- В₁₂ 157
- — биологическая роль 159
- — распространение в природе 160
- — суточная потребность 160
- В₁₅ 165
- С 162
- — биологическая роль 163
- — распространение в природе 163
- — суточная потребность 163
- D 140
- — биологическая роль 142

- — распространение в природе 142
- — суточная потребность 142
- D₁ 141
- D₂ 140
- D₃ 140
- D₄ 140
- E 145
- — биологическая роль 146
- — распространение в природе 147
- — суточная потребность 147
- H 154
- — биологическая роль 154
- — распространение в природе 155
- — суточная потребность 155
- K 143
- — биологическая роль 144
- — распространение в природе 145
- — суточная потребность 145
- K₁ 143
- K₂ 143
- K₃ 144
- P 163
- — биологическая роль 163
- PP 151
- — биологическая роль 151
- — распространение в природе 152
- — суточная потребность 152
- U 166
- Воска 279
- Галактоза, метаболизм 254
- Галактоземия 367
- β-Галактозидаза 129
- Ганглиозиды 283
- Гаптоглобин 445
- Гастрексин 328
- Гастрин 63
- Гексокиназа, молекулярная масса 96
- Гемоглобин(ы) аномальные 67
 - биосинтез 395
 - распад в тканях 396
 - структура 48
 - фетальный 49
- Гемоглобинозы 69
- Гемопротейны 65
- Гемосидерин 76
- Гемоцианин, свойства 70
- Гемэритрин, свойства 70
- Ген, экспрессия 383
- Генетическая инженерия 388
- Генетический код 406
- Ген-оператор 417
- Ген-регулятор 417
- Гены, перенос 388
 - — гибридизация клеток 388
 - — трансдукция 388
 - — трансформация 388
- Гепарин 524
- Гепаринсульфат 524
- Гидролазы 127
- Гидролиз белка 28
- Гипервитаминозы 134
- Гипергликемия 273
- Гиперкалиемия 450
- Гипернатриемия 450
- Гипертиреоз 185
- Гиповитаминозы 134
- Гипогликемия 274
- Гипокалиемия 450
- Гипокальциемия 450
- Гипоксия, типы 461
- Гипонатриемия 450
- Гипотиреозидизм 185
- Гипофосфатемия 451
- Гистоны, свойства 61
- Гликоген 236
 - распад 242
 - синтез 240
- Гликогенозы 275
- Гликогенолиз 251
- Гликозаминогликаны 521
 - биосинтез 524
- Гликолиз 244
- Гликопротеины 75
- Глицин 28
 - обмен 354
- Глобулины 61, 441
- Глутаматдегидрогеназа, молекулярная масса 96
- Глутаминсинтетаза 128
- Глутатион 64
- Глюкагон 188
- Глюкогенез 242
- Глюкоза, образование из глюкозо-6-фосфата 257
- Глюкозо-6-фосфат 245
- Глюкозурия 274
- Глюкокортикоиды 193
- Глюконеогенез 255, 425
 - регуляция 257
- Глютелины, свойства 61
- Гомогенизация 20
- Гонадотропины см. *Гормоны гонадотропные*
- Гормон(ы) 170
 - адренкортикотропный 179
 - белковые 174
 - вещества коркового надпочечников 191
 - — мозгового надпочечников 189
 - гипоталамуса 174
 - — люлиберин 175
 - — меланолиберин 175
 - — меланостатин 175
 - — соматолиберин 175
 - — соматостатин 175
 - — тиреолиберин 175
 - гипофиза 176
 - — адренкортикотропный 179
 - — вазопрессин 177
 - — гонадотропные 181

- — лакотропный 180
- — липотропные 181
- — меланоцитстимулирующие 178
- — окситоцин 177
- — соматотропный 179
- — тиреотропный 180
- гонадотропные 181
- желез(ы) вилочковой 202
- — паразитовидных 182
- — поджелудочной 186
- — — глюкагон 188
- — — инсулин 186
- — щитовидной 183
- классификация 173
- лакотропный 180
- липотропные 181
- лютеинизирующий 181
- меланоцитстимулирующие 178
- надпочечников 189
- номенклатура 173
- пептидные 174
- половые 195
- — женские 196
- — мужские 197
- роста см. *Гормон соматотропный* 179
- тимуса см. *Гормоны железы вилочковой*
- фолликулостимулирующий 181

Дегидрогеназы пиридинзависимые 215

Дегидроэпиандростерон 197

Дезоксикортикостерон 193

Дезоксирибодоксин 120

Дезоксирибонуклеопротеины 71

Дерматансульфат 523

Диабет несахарный 178

— сахарный 273

Дигидроэргокальциферол 140

Диглицеридлипаза 292

Дикумарол 145

Дипептидазы 330

Дисахариды 234

— лактоза 234

— мальтоза 234

— сахароза 234

Дистрофия гепатоцеребральная 367

Диэтилгильбэстрол 197

Желтуха, типы, дифференциация 436

Желчь 436

— компоненты составные 436

Жидкость спинномозговая 502

— — состав химический 503

Жиры нейтральные 278

Зоб эндемический 185

Изомеразы 128

Изопропиладреналин 190

Изостенурия 482

Изоферменты 102

Изоэлектрическая точка 33

Изоэлектрическое состояние 33

Ингибирование бесконкурентное 121

— конкурентное 119

— неконкурентное 120

— необратимое 119

— обратимое 119

Ингибиторы специфические 118

Инженерия генетическая 388

Инозит 165

Инсулин 186

Интерфероны 75, 446

Интроны 385

Ионная сила 23

Йодтиреоглобулин 183

Каллидин 63

Кальмодулин 172

Кальцитонин 183

Кальциферол см. *Витамин D*

Карбамоилфосфат 351

Карбгемоглобин 462

Карбоксигемоглобин 70

Карбоксипептидаза 332

Кардиолипиды 282

Катаболизм 209

Каталаза, молекулярная масса 96

Катализаторы биологические 94

Катехоламины 190

Квашиоркор 365

Кератансульфат 524

Кетозы 227

α -Кетокислоты, превращения 344

Кетонемия 314

Кетоновые тела, метаболизм 298

Кетонурия 314

17-Кетостероиды 198

Кислота(ы) γ -аминоасляная 348

— арахидоновая 199

— аскорбиновая см. *Витамин C*

— аспарагиновая 360

— гиалуроновая 521

— — свойства 75

— гиппуровая 485

— гликохолевая 288

— глутаминовая 361

— дезоксирибонуклеиновая, биосинтез 377

— — — этапы 382

— — репликация 383

— рибонуклеиновая, синтез из нуклеозиддифосфатов 388

— — — на матрице РНК 382

— — структура 81

— дезоксихолевая 287

— жирные 276

— — высшие, синтез 301

- — мононенасыщенные 277
- — насыщенные 277
- — ненасыщенные, образование 305
- — — окисление 297
- — полиненасыщенные 277
- индолилуксусная 360
- липовая 167
- мочева 449, 484
- никотиновая см. *Витамин РР*
- нуклеиновые, биосинтез 377
 - — выделение, методы 77
 - — локализация 80
 - — обмен 369
 - — распад 390
 - — свойства химические 77
 - — содержание количественное в клетках 80
 - — состав химический 78
 - — структура 81
 - — — вторичная 87
 - — — первичная 85
 - — — третичная 89
 - пангамовая см. *Витамин В₁₅*
 - пантотеновая см. *Витамин В₃* 160
 - парааминобензойная 164
 - пировиноградная, декарбоксилирование окислительное 260
 - птерилглутаминовая см. *Кислота фолиевая*
 - рибонуклеиновая, биосинтез 383
 - — матричная 405
 - — репликация 387
 - — рибосомные, биогенез 387
 - — синтез на матрице РНК 387
 - — транспортные 403
 - — — биогенез 386
 - салициловая 145
 - сиаловая 75
 - таурохолевая 288
 - уксусная 500
 - уроновая 232
 - фолиевая 155
 - — биологическая роль 156
 - — распространение в природе 157
 - — суточная потребность 157
 - фумаровая 119
 - хенодзоксиохолевая 287
 - холевая 287
 - хондроитинсерная 75
 - янтарная 119
- Клетка нервная, строение 489
- Клупеин 61
- Кобаламин см. *Витамин В₁₂*
- Кодон 89, 405
- Компартментализация 124
- Константа диссоциации фермент-субстратного комплекса 109
 - Михаэлиса 110
 - равновесия в химических реакциях 109
 - седиментации 38
- Кортикоиды 191
- Кортикостероиды 191
- Кортикотропин см. *Гормон адренокортико-тропный* 179
- Кофермент 98
 - Q 218
 - функция 106
- Коэнзим Q 166
- Крахмал 235
- Кретинизм 185
- Криоглобулин 446
- Кровь 438
 - белки плазмы 439
 - буферные системы 453
 - клетки 452
 - компоненты 439
 - — азотистые небелковые 448
 - — безазотистые органические 449
 - плазма, белки 439
 - — ферменты 446
 - равновесие кислотно-основное 452
 - — — нарушения 456
 - система свертывания 464
 - состав химический 438
 - функция(и) дыхательная 458
 - — перенос кислорода 458
 - — — углекислого газа от тканей к легким 462
- Лактатдегидрогеназа, молекулярная масса 96
- Лактотропин см. *Гормон лактотропный*
- Летальный синтез 122
- Лецитины 280
- Лиазы 127
- Лигазы 128
- Лизофосфолипиды 282
- Лизоцим, полипептидная цепь, структура первичная 51
- Липиды, биосинтез 300
 - всасывание 286
 - классификация 276
 - обмен 276
 - — нарушения 314
 - — промежуточный 292
 - — регуляция 313
 - переваривание 286
 - роль в питании 286
 - свойства 276
 - строение химическое 276
 - транспорт 291
 - функции 276
- Липолиз внутриклеточный 292
- Липопротеины 73
 - плазменные 443
 - состав химический 316
- Липосомы 316
- Липотропины см. *Гормоны липотропные*
- Люлиберин 175
- Лютропин см. *Гормон лютеинизирующий*
- Меланолиберин 175
- Меланостатин 175

- Меланотропины см. *Гормоны меланоцитстимулирующие*
- Мелатонин 203
- Менахинон см. *Витамин K₂*
- Метаболизм, процессы 208
- — анаболизм 209
 - — катаболизм 209
- Метаболический пул 319
- Металлопротеины 76
- Метгемоглобин 70
- S-Метилметионин см. *Витамин U*
- Миелин 490
- Микседема 185
- Минералокортикоиды 193
- Миоглобин, структура 48
- Митохондрии 221
- Мозг, состав химический 491
- — — адениновые нуклеотиды 494
 - — — белки 491
 - — — — гликопротеины 492
 - — — — липопротеины 492
 - — — — нейросклеропотеины 492
 - — — — нуклеопротеины 492
 - — — — протеолипиды 492
 - — — — ферменты 492
 - — — — фосфопротеины 492
 - — — креатинфосфат 494
 - — — липиды 493
 - — — минеральные вещества 494
 - — — углеводы 493
- Моноаминоксидаза 350
- Моноглицериддипаза 292
- Мононуклеосома 72
- Мононуклеотиды 82
- аденозинмонофосфат 83
 - гуанозинмонофосфат 83
 - уридинмонофосфат 83
 - цитидинмонофосфат 83
- Моноксигеназы 224
- Моносахариды 227
- восстановление 232
 - окисление 232
 - реакции полуацетатного гидроксила 231
 - — с участием карбонильной группы 232
 - стереоизометрия 227
 - формы циклические 228
- Моча, вещества органические 483
- образование 473
 - — клубочковая фильтрация 473
 - — реабсорбция 475
 - — секреция 475
 - свойства 481
 - состав, аминокислоты 484
 - — кислота гипшуровая 485
 - — — мочева 484
 - — — компоненты безазотистые 485
 - — — минеральные 485
 - — — — аммиак 486
 - — — — бикарбонаты 485
 - — — — калий 485
- — — — кальций 485
 - — — — магний 485
 - — — — натрий 485
 - — — — сульфаты 485
 - — — — фосфаты 485
 - — — — хлор 485
 - — — патологические 486
 - — — — белок 486
 - — — — билирубин 487
 - — — — глюкоза 486
 - — — — кровь 486
 - — — — порфирины 487
 - — — — тела кетоновые 487
 - — — — уробилин 487
- Мочевина, биосинтез 351
- Мочевинообразование, орнитинный цикл 351
- Мускулатура гладкая, состав химический 510
- Муцин 75
- Мышечная деятельность, источники энергии 511
- Мышечное сокращение, механизм 513
- Мышца поперечнополосатая 504
- — состав химический 506
 - — сердечная, состав химический 510
- Нейроальбумины 491
- Нейроглобулины 491
- Нейрон 488
- строение 488
- Нейрофизин 177
- Неовитамин А 138
- Нервные импульсы, возникновение 497
- — — проведение 497
 - — — роль медиаторов 498
- Ниацин см. *Витамин PP*
- Никотинамид см. *Витамин PP* 151
- Норадреналин 190
- Нуклеозиддифосфаты 83
- Нуклеозидтрифосфаты 83
- Нуклеозиды 81
- аденозин 83
 - гуанозин 83
 - пиримидиновые, распад 393
 - пуриновые, распад 392
 - тимидин 83
 - уридин 83
 - цитидин 83
- Нуклеопротеины 71
- дезоксирибонуклеопротеины 71
 - рибонуклеопротеины 71
- Нуклеотиды пиримидиновые, биосинтез 373
- пуриновые, биосинтез 372
 - тимидиловые, биосинтез 374
 - цитидиловые, биосинтез 374
- Обмен белков 320
- — жиров, углеводов, взаимосвязь 423
 - — веществ 204

- — изучение, методы 210
- — регуляция 212
- жиров 276
- углеводов 226
- энергии 204
- Овомукоид 75
- Окисление биологическое 213
 - микросомальное 224
- Оксиредуктазы 127
- Окситоцин 177
- Олигосахариды 234
 - дисахариды 234
 - трисахариды 235
- Олигурия 481
- Организмы ауотрофные 205
 - гетеротрофные 205
- Отек гипотиреоидный 185
- Память 501
- Паратгормон 182
- Пеллагра 151
- Пепсин 327
 - молекулярная масса 96
- Пептиды природные 63
 - — группы 63
 - синтез, механизмы мультиферментный 416
- Печень 427
 - роль в обмене белковом 431
 - — — — липидном 430
 - — — — пигментном 434
 - — — — углеводном 428
 - состав химический 425
- Пигменты желчные, образование 396
- Пиридоксин см. *Витамин В₆*
- Пируват, метаболизм аэробный 259
- Пируватдегидрогеназа, молекулярная масса 96
- Питание белковое парентеральное 325
 - человека 208
- Плазма крови, белки 439
 - — состав электролитный 449
 - — — — железо 451
 - — — — калий 450
 - — — — кальций 450
 - — — — магний 451
 - — — — минеральные вещества 451
 - — — — натрий 450
 - — — — фосфор 451
 - — факторы 465
 - — ферменты 446
- Плазмалогены 281
- Плазмин 470
- Плазминоген 470
- Полирибосомы 414
- Полисахариды 235
 - гликоген 236
 - крахмал 235
 - хитин 238
 - целлюлоза 237
- Полисомы 414
- Полиурия 481
- Порфобилиноген 395
- Почки 473
 - роль в поддержании кислотно-основного равновесия 478
 - строение 473
- Правила Чаргаффа 81
- Праймаза 378
- Праймасома 378
- Праймер 378
- Препроинсулин 186
- Прогестерон 196
- Проглюкагон 188
- Проинсулин 186
 - структура 49
- Пролактин см. *Гормон лактотропный*
- Проламины, свойства 61
- Проопиокортин 182
- Простагландины 199
- Протамины, свойства 61
- Протеиназы 43
- Протеины плазмы крови 442
- Протеогликаны, катаболизм 525
 - образование 525
- Проферменты, синтез 122
- Равновесие кислотно-основное 452
 - — нарушения 456
 - — поддержание, роль почек 478
- Рахит 142
- Реакция(и) биуретовая 42, 44
 - Гопкинса — Кола 36
 - ксантопротеиновая 36
 - Миллона 36
 - Паули 36
 - Сакагучи 36
 - Салливана 36
 - Фолина — Чиокалтеу 36
 - химические, константа равновесия 109
 - — экзергонические 112
 - — эндергонические 112
 - Эрлиха 36
- Реннин 328
- Репликаза 387
- Ретинол см. *Витамин А*
- Ретроингибирование 123
- Рибонуклеаза, молекулярная масса 96
 - структура 50
- Рибонуклеопротеины 71
- Рибосомы 402
- Рибофлавин см. *Витамин В₂*
- Рилизинг-фактор 171
- Рутин см. *Витамин Р*
- Сальмин 61
- Секретин 63
- Серин, обмен 354
- Сидерофилины см. *Трансферрины*
- Синтетазы 128
- Синэстрол 197
- Система(ы) белоксинтезирующая 401
 - крови антифибринолитическая 471

— — буферные 453
— — — белковая 455
— — — бикарбонатная 453
— — — гемоглобиновая 455
— — — фосфатная 454
— — противосвертывающая 470
— — свертывания 464
— — фибринолитическая 470
Соматолиберин 175
Соматомедин 180
Соматостатин 175
Соматотропин см. *Гормон соматотропный*
Состояния витаминзависимые 135
— витаминрезистентные 135
Спиртовое брожение 251
Сплайсинг 384
Стероиды 284
Сфинголипиды 282
Сфингомиелины 283

Талассемии 69
Тестостерон 197
Тиамин см. *Витамин В₁*
Тимозин α_1 203
Тимопентин-5 203
Тимопозитин II 203
Тиреолиберин 175
Тиреотропин см. *Гормон тиреотропный*
Тирозин, обмен 358
Ткань нервная 488
— — метаболизм, особенности 494
— — — — дыхание 494
— — — — обмен аминокислот 496
— — — — — белков 496
— — — — — гликогена 495
— — — — — глюкозы 495
— — — — — липидов 497
— — — — — фосфатов лабильных 495
— мышечная, изменения биохимические при патологии 515
— — эмбриональная, состав химический 511
— почечная, обмен веществ 480
— соединительная 518
— — изменения биохимические при старении 526
— — компоненты, коллаген 519
— — — протеогликаны 521
— — — эластин 520
Токоферол см. *Витамин E*
Топоизомераза 378
Трансаминазы 340
— активность, определение 343
Трансреаминирование 342
Трансферазы 127
Трансферрин 76, 445
Триглицеридлипаза 292
Триглицериды, биосинтез 305
Трипсин 328
— молекулярная масса 96
Триптофан, обмен 360

Трисахариды 235

Убихинон см. *Коэнзим Q*
Углеводы, всасывание 238
— классификация 227
— обмен 226
— — нарушения 273
— — — гипергликемия 273
— — — гипогликемия 274
— — — гликогенозы 275
— — — глюкозурия 274
— — — сахарный диабет 273
— — процессы 238
— — регуляция 273
— окисление, путь пентозофосфатный 268
— переваривание 238
— химия 226
— эфиры фосфорнокислые 233
Уравнение Бриггса — Холдейна 110
— Лайнуивера — Бэрка 112
— Михаэлиса — Ментен 110
— Сведберга 39
Уреаза, молекулярная масса 96
Уремия 481

Фактор(ы) Касла внутренний 159
— плазмы крови 465
— противоязвенный см. *Витамин U*
— свертывания крови 464
— тромбоцитов 467
Фенилаланин, обмен 358
Фенилкетонурия 367
Ферментативная реакция, кинетика 108
— — скорость, влияние концентрации субстрата 116
— — — — фермента 116
Ферментные системы мультимолекулярные 104
Фермент(ы) 92
— активирование 116
— — металлами 117
— активность, единица 125
— — зависимость от pH среды 113
— — молярная 125
— — определение 124
— — регуляция 122
— — — изменение количества фермента 122
— — — принцип обратной связи 123
— — — роль проферментов 122
— — — химическая модификация фермента 122
— — — удельная 125
— аллостерические 101
— изучение, история 93
— иммобилизованные 129
— ингибирование 116
— классификация 126
— — гидролазы 127
— — изомеразы 128
— — лиазы 127
— — лигазы 128

- — оксиредуктазы 127
- — синтазы см. *Лигазы*
- — трансферазы 127
- локализация внутриклеточная 126
- металлозависимые 76
- механизм действия 105
- молекулярная масса 96
- некротические 131
- номенклатура 126
- олигомерные 103
- плазмы крови 446
- — — индикаторные 446
- — — органоспецифические 447
- — — секреторные 446
- — — экскреторные 447
- применение 129
- природа химическая 95
- простые 97
- свойства основные 112
- — термолабильность 113
- сложные 97
- специфичность 114
- — абсолютная 114
- — относительная 114
- — стереохимическая 115
- строение 97
- флавиновые 216
- формы множественные 103
- центр активный 99
- — аллостерический 101
- — каталитический 99
- — регуляторный см. *Ферменты, центр аллостерический*
- — связывающий 99
- центры, взаимодействия гетеротропные 102
- — — гомотропные 102
- шифр 128
- Ферритин 76
- Фибринолиз 470
- Филлохинон см. *Витамин K₁*
- Флавопротеины 71
- Фоллитропин см. *Гормон фолликулостимулирующий*
- Фосфатидилинозитолы 281
- Фосфатилсерины 281
- Фосфатидилхолины 280
- Фосфатидилэтаноламины 280
- Фосфаты высокоэнергетические 206
- Фосфолипиды 280
- биосинтез 307
- Фосфодиэстераза 172
- Фосфоенолпируват, образование из пирувата 255
- Фосфопротеины 74
- Фосфорилирование окислительное 221
- — механизм 223
- субстратное 248
- Фруктоза, метаболизм 253

Фруктозо-6-фосфат 245
— образование из фруктозо-1,6-бисфосфата 257

Хеликаза 378
Хиломикроны, образование 291
Химотрипсин 329
Хитин 238
Холеглобин 396
Холекальциферол см. *Витамин D₃*
Холестерин 285

- биосинтез 309

Холецистокинин 331
Холин 168
Холофермент 97
Хроматография 23

- адсорбционная 23
- аффинная 25
- гель-хроматография 25
- ионообменная 24
- распределительная 24

Хромопротеины 65

- обмен 394

Целлюлоза 237
Цереброзиды 283
Церулоплазмин 445
Цикл трикарбоновых кислот (Кребса) 261

- — — регуляция 267

Цистиноз 366
Цистинурия 367
Цитохром(ы) 219
Цитрин см. *Витамин P*

Шифр ферментов 128

Щелочная фосфатаза 96

Экзоны 385
Экзопептидаза 330
Экспрессия гена 383
Эластаза 329
Электрофорез 26

- диск-электрофорез 27
- зональный 26
- изоэлектрическое фокусирование 27

Эндопептидазы 327
Энергия активации 107

- химическая, превращение в организме 205

Энзимодиагностика 131
Энзимология инженерная 129
Энзимопатология 131
Энзимы см. *Ферменты*
Энтальпия 206
Энтропия 206
Эстеразы 127
Эстрогены 196
Эстрон 196
Эффект Пастера 267

Учебник

Темирболат Темболатович БЕРЕЗОВ, Борис Федорович КОРОВКИН
БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Зав. редакцией *О. В. Карева*

Редактор *Н. Н. Чернов*

Редактор издательства *И. В. Войтехова*

Мл. редактор *З. В. Колесникова*

Художественный редактор *Т. К. Винокурова*

Технический редактор *Н. А. Пошкрёбнева*

Корректор *М. П. Молокова*

ИБ № 5347

Сдано в набор 29.03.89. Подписано к печати 23.05.90. Формат бумаги 70 × 100^{1/16}. Бумага кн.-журн. офсетная. Гарнитура таймс. Печать офсетная. Усл. печ. л. 44,20. Усл. кр.-отт. 88,40. Уч.-изд. л. 48,16. Тираж 100 000 экз. Заказ 65. Цена 2 р. 10 к.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Медицина». 101000, Москва, Петроверигский пер., 6/8.

Ордена Октябрьской Революции, ордена Трудового Красного Знамени Ленинградское производственно-техническое объединение «Печатный Двор» имени А. М. Горького при Госкомпечати СССР. 197136, Ленинград, П-136, Чкаловский пр., 15.