

Учебная литература  
для студентов медицинских вузов

Т.Т.Березов, Б.Ф.Коровкин

# Биологическая ХИМИЯ

Издание третье,  
переработанное и дополненное

*Рекомендован Управлением научных  
и образовательных медицинских учреждений  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
в качестве учебника для студентов  
медицинских вузов*



Москва  
"Медицина"  
1998

УДК 577.1(075.8)  
ББК 28.902  
Б 48

**Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф.**

Б 48 Биологическая химия: Учебник.— 3-е изд., перераб. и доп.— М.: Медицина, 1998.— 704 с.: ил.— (Учеб. лит. Для студентов мед. вузов). ISBN 5-225-02709-1

В третьем издании учебника (второе вышло в 1990 г.) в сжатой форме представлены новейшие сведения и факты о биогенезе главных классов органических веществ в организме человека и животных. Приведены новые данные о химии углеводов и липидов, расширен раздел медицинской энзимологии.

В новой главе «Биомембраны и биоэнергетика» отражены современные представления о структуре биомембран, образовании и трансформации энергии в биосистемах.

**ББК 28.902**

Учебник

**ТЕМИРБОЛАТ ТЕМБОЛАТОВИЧ БЕРЕЗОВ,  
БОРИС ФЕДОРОВИЧ КОРОВКИН**

**Биологическая химия**

Зав. редакцией *Т. П. Осокина*. Научный редактор *С. С. Шишкин*.  
Редактор издательства *М. Г. Фомина*. Худ. ред. *Т. С. Тихомирова*.  
Технический редактор *В. И. Табенская*. Корректор *Л. П. Колокольцева*.

ЛР № 010215 от 29.04.97. Сдано в набор 29.12.97. Подписано к печати 16.07.98. Формат бумаги 70 x 100 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная № 1. Гарнитура таймс. Печать офсетная. Усл. печ. л. 57,20. Усл. кр.-отг. 110,50. Уч.-изд. л. 54,87. Тираж 15000 экз. Заказ № 62

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Медицина»  
101000, Москва, Петроверигский пер., 6/8

Отпечатано в ОАО «Можайский полиграфический комбинат».  
143200, г. Можайск, ул. Мира, 93

ISBN 5-225-02709-1

© Издательство «Медицина», 1982

© Издательство «Медицина», Москва, 1998

*Все права авторов защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.*

# СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие к первому изданию	9	<b>Глава 2. Химия сложных белков.</b>	78
Предисловие ко второму изданию	11	Хромопротеины.	78
Предисловие к третьему изданию	12	Гемопротеины.	78
Список сокращений.	13	Флавопротеины.	85
Введение.	15	Нуклеопротеины.	86
<b>Глава 1. Химия белков</b>	19	Липопротеины.	88
Функции белков.	20	Фосфопротеины.	89
Содержание белков в органах и тканях.	22	Гликопротеины.	90
Методы выделения и очистки белков.	23	Металлопротеины.	94
Гомогенизация биологического материала.	23	<b>Глава 3. Химия нуклеиновых кислот.</b>	96
Экстракция белков.	24	Химический состав нуклеиновых кислот.	97
Фракционирование и очистка белков.	26	Структура нуклеиновых кислот	101
Очистка белков от низкомолекулярных примесей.	32	Первичная структура нуклеиновых кислот.	105
Определение гомогенности белков.	32	Вторичная структура нуклеиновых кислот.	108
Аминокислотный состав белков	33	Третичная структура нуклеиновых кислот.	111
Классификация аминокислот	34	<b>Глава 4. Ферменты</b>	114
Общие свойства аминокислот	37	Понятие о ферментах.	114
Физико-химические свойства белков.	44	Краткая история развития учения о ферментах.	116
Молекулярная масса белков	44	Химическая природа ферментов	118
Форма белковых молекул.	47	Строение ферментов.	120
Денатурация белков.	47	Активный центр ферментов	122
Изоэлектрическая и изоионная точки белков.	49	Изоферменты.	126
Структурная организация белков	49	Мультимолекулярные ферментные системы.	129
Первичная структура белка	52	Механизм действия ферментов	129
Методы определения N-концевой аминокислоты.	53	Кинетика ферментативных реакций.	134
Методы определения C-концевой аминокислоты.	54	Основные свойства ферментов	139
Вторичная структура белка	60	Факторы, определяющие активность ферментов.	143
Третичная структура белка	63		
Четвертичная структура белка	68		
Классификация белков.	71		
Химия простых белков.	73		
Природные пептиды.	74		

Влияние концентраций субстрата и фермента на скорость ферментативной реакции . . . . .	144	Витамины группы А . . . . .	210
Активирование и ингибирование ферментов . . . . .	145	Витамины группы D . . . . .	213
Регуляция активности ферментов . . . . .	152	Витамины группы К . . . . .	216
Определение активности ферментов . . . . .	157	Витамины группы Е . . . . .	218
Внутриклеточная локализация ферментов . . . . .	158	Витамины, растворимые в воде . . . . .	220
Классификация и номенклатура ферментов . . . . .	159	Витамин В <sub>1</sub> . . . . .	220
Список ферментов . . . . .	162	Витамин В <sub>2</sub> . . . . .	223
Применение ферментов . . . . .	163	Витамин РР . . . . .	225
Проблемы медицинской энзимологии . . . . .	165	Витамин В <sub>6</sub> . . . . .	226
<b>Глава 5. Химия углеводов</b> . . . . .	169	Биотин (витамин Н) . . . . .	228
Биологическая роль углеводов . . . . .	169	Фолиевая кислота . . . . .	230
Классификация углеводов . . . . .	170	Витамин В <sub>12</sub> . . . . .	232
Моносахариды . . . . .	170	Пантотеновая кислота (витамин В <sub>3</sub> ) . . . . .	236
Основные реакции моносахаридов, продукты реакций и их свойства . . . . .	174	Витамин С . . . . .	238
Олигосахариды . . . . .	179	Витамин Р . . . . .	239
Полисахариды . . . . .	180	Витаминоподобные вещества . . . . .	240
Гомополисахариды . . . . .	181	Парааминобензойная кислота . . . . .	240
Гетерополисахариды . . . . .	186	Витамин В <sub>15</sub> . . . . .	241
<b>Глава 6. Химия липидов</b> . . . . .	188	Инозит (инозитол) . . . . .	242
Биологическая роль липидов . . . . .	188	Коэнзим Q (убихинон) . . . . .	242
Классификация липидов . . . . .	188	Пирролохинолинохинон (PQQ) . . . . .	243
Жирные кислоты . . . . .	189	Витамин U . . . . .	244
Глицериды (ацилглицеролы) . . . . .	192	Липоевая кислота . . . . .	245
Воска . . . . .	194	Холин . . . . .	245
Фосфолипиды . . . . .	194	Антивитамины . . . . .	246
Глицерофосфолипиды . . . . .	195	<b>Глава 8. Гормоны</b> . . . . .	248
Сфинголипиды (сфингофосфолипиды) . . . . .	198	Общее понятие о гормонах . . . . .	248
Гликолипиды (гликосфинголипиды) . . . . .	199	Номенклатура и классификация гормонов . . . . .	250
Стероиды . . . . .	200	Гормоны гипоталамуса . . . . .	251
<b>Глава 7. Витамины</b> . . . . .	204	Гормоны гипофиза . . . . .	255
История развития витаминологии и общие представления о витаминах . . . . .	204	Вазопрессин и окситоцин . . . . .	256
Методы определения витаминов . . . . .	207	Меланоцитстимулирующие гормоны (МСГ, меланотропины) . . . . .	258
Классификация витаминов . . . . .	208	Адренокортикотропный гормон (АКТГ, кортикотропин) . . . . .	258
Витамины, растворимые в жирах . . . . .	210	Соматотропный гормон (СТГ, гормон роста, соматотропин) . . . . .	259
		Лактотропный гормон (пролактин, лютеотропный гормон) . . . . .	260
		Тиреотропный гормон (ТТГ, тиротропин) . . . . .	260
		Гонадотропные гормоны (гонадотропины) . . . . .	261
		Липотропные гормоны (ЛТГ, липотропины) . . . . .	261
		Гормоны парашитовидных желез (паратгормоны) . . . . .	263
		Гормоны щитовидной железы . . . . .	264
		Гормоны поджелудочной железы . . . . .	267

Инсулин . . . . .	268
Глюкагон . . . . .	271
Гормоны надпочечников . . . . .	272
Гормоны мозгового вещества надпочечников . . . . .	273
Гормоны коркового вещества надпочечников . . . . .	274
Химическое строение, биосинтез и биологическое действие кортикостероидов . . . . .	275
Половые гормоны . . . . .	280
Женские половые гормоны . . . . .	280
Мужские половые гормоны . . . . .	282
Простагландины . . . . .	283
Гормоны вилочковой железы (тимуса) . . . . .	288
Молекулярные механизмы передачи гормонального сигнала . . . . .	289
Аденилатциклазная мессенджерная система . . . . .	290
Гуанилатциклазная мессенджерная система . . . . .	293
Ca <sup>2+</sup> - мессенджерная система . . . . .	296
<b>Глава 9. Биомембраны и биоэнергетика . . . . .</b>	<b>298</b>
Основные принципы организации биомембран . . . . .	298
Биоэнергетика . . . . .	305
Генерация свободных радикалов в клетке . . . . .	314
Мембранные механизмы регуляции метаболизма . . . . .	316
<b>Глава 10. Метаболизм углеводов . . . . .</b>	<b>319</b>
Переваривание и всасывание углеводов . . . . .	319
Синтез и распад гликогена . . . . .	321
Синтез гликогена (гликогенез) . . . . .	322
Распад гликогена (гликогенолиз) . . . . .	324
Гликолиз . . . . .	327
Спиртовое брожение . . . . .	334
Включение других углеводов в процесс гликолиза . . . . .	335
Глюконеогенез . . . . .	338
Аэробный метаболизм пирувата . . . . .	343
Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты . . . . .	344
Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса) . . . . .	345

Эффект Пастера . . . . .	353
Пентозофосфатный путь окисления углеводов . . . . .	353
Регуляция метаболизма углеводов . . . . .	357
Нарушения углеводного обмена . . . . .	359
<b>Глава 11. Метаболизм липидов . . . . .</b>	<b>363</b>
Роль липидов в питании . . . . .	363
Переваривание и всасывание липидов . . . . .	363
Жировая ткань и ее участие в обмене липидов . . . . .	370
Окисление жирных кислот . . . . .	373
Окисление ненасыщенных жирных кислот . . . . .	377
Окисление жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов . . . . .	377
Метаболизм кетонных тел . . . . .	379
Биосинтез насыщенных жирных кислот . . . . .	381
Незаменимые жирные кислоты . . . . .	388
Эйкозаноиды . . . . .	389
Биосинтез триглицеридов . . . . .	392
Метаболизм фосфолипидов . . . . .	395
Распад и обновление фосфолипидов . . . . .	397
Биосинтез холестерина . . . . .	398
Регуляция липидного обмена . . . . .	403
Нарушения липидного обмена . . . . .	404
Липосомы . . . . .	406
<b>Глава 12. Обмен простых белков . . . . .</b>	<b>409</b>
Динамическое состояние белков организма . . . . .	410
Факторы, определяющие состояние белкового обмена . . . . .	411
Нормы белка в питании . . . . .	412
Биологическая ценность белков . . . . .	413
Резервные белки . . . . .	416
Парентеральное белковое питание . . . . .	417
Переваривание белков . . . . .	417
Эндопептидазы . . . . .	419
Переваривание белков в желудке . . . . .	424
Переваривание белков в кишечнике . . . . .	425
Всасывание продуктов распада белков . . . . .	425

Превращения аминокислот под действием микрофлоры кишечника . . . . .	426	Распад пуриновых нуклеозидов . . . . .	500
Судьба всосавшихся аминокислот . . . . .	428	Распад пиримидиновых нуклеозидов . . . . .	501
Транспорт аминокислот через клеточные мембраны . . . . .	430	Обмен хромопротеинов . . . . .	503
Промежуточный обмен аминокислот в тканях . . . . .	431	Биосинтез гемоглобина . . . . .	504
Общие пути обмена аминокислот . . . . .	431	Распад гемоглобина в тканях (образование желчных пигментов) . . . . .	506
Дезаминирование аминокислот . . . . .	431	<b>Глава 14. Биосинтез белка</b> . . . . .	509
Трансаминирование аминокислот . . . . .	435	Трансляция и общие требования к синтезу белка в бесклеточной системе . . . . .	511
Декарбоксилирование аминокислот . . . . .	440	Рибосомы . . . . .	513
Обезвреживание аммиака в организме . . . . .	446	Аминоацил-тРНК-синтетазы . . . . .	515
Орнитиновый цикл мочевинообразования . . . . .	448	Транспортные РНК . . . . .	517
Специфические пути обмена некоторых аминокислот . . . . .	451	Матричная РНК . . . . .	518
Обмен глицина и серина . . . . .	451	Природа генетического кода . . . . .	520
Обмен серосодержащих аминокислот . . . . .	453	Этапы синтеза белка . . . . .	523
Обмен фенилаланина и тирозина . . . . .	456	Активирование аминокислот . . . . .	523
Обмен триптофана . . . . .	458	Процессы трансляции . . . . .	524
Обмен аминокислот с разветвленной цепью . . . . .	459	Транспорт синтезированных белков через мембраны . . . . .	530
Обмен дикарбоновых аминокислот . . . . .	459	Синтез митохондриальных белков . . . . .	531
Патология азотистого обмена . . . . .	464	Постсинтетическая модификация белков . . . . .	531
<b>Глава 13. Обмен сложных белков</b> . . . . .	469	Регуляция синтеза белка . . . . .	534
Обмен нуклеиновых кислот . . . . .	469	Ингибиторы синтеза белка . . . . .	540
Биосинтез пуриновых нуклеозидов . . . . .	470	<b>Глава 15. Взаимосвязь процессов обмена веществ в организме</b> . . . . .	545
Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов . . . . .	474	<b>Глава 16. Печень</b> . . . . .	551
Биосинтез нуклеиновых кислот . . . . .	478	Химический состав печени . . . . .	551
Биосинтез ДНК . . . . .	478	Роль печени в углеводном обмене . . . . .	552
Биосинтез РНК . . . . .	487	Роль печени в липидном обмене . . . . .	556
Биогенез матричных РНК . . . . .	489	Роль печени в обмене белков . . . . .	558
Биогенез транспортных РНК . . . . .	493	Детоксикация различных веществ в печени . . . . .	559
Биогенез рибосомных РНК . . . . .	494	Роль печени в пигментном обмене . . . . .	561
Синтез РНК на матрице РНК . . . . .	495	Желчь . . . . .	565
Распад нуклеиновых кислот . . . . .	498	<b>Глава 17. Кровь</b> . . . . .	567
		Химический состав крови . . . . .	567
		Белки плазмы крови . . . . .	568

Характеристика основных белковых фракций . . . . .	570
Липопротеины плазмы крови	574
Отдельные наиболее изученные и интересные в клиническом отношении белки плазмы . . . . .	577
Ферменты плазмы (сыворотки) крови . . . . .	579
Небелковые азотистые компоненты крови . . . . .	580
Безазотистые органические компоненты крови . . . . .	582
Электролитный состав плазмы крови . . . . .	582
Клетки крови . . . . .	585
Буферные системы крови и кислотно-основное равновесие . . . . .	586
Буферные системы крови . . . . .	586
Нарушения кислотно-основного равновесия . . . . .	589
Дыхательная функция крови . . . . .	591
Перенос кислорода кровью	591
Различные формы гипоксии	595
Перенос углекислого газа кровью от тканей к легким . . . . .	596
Система свертывания крови . . . . .	599
Современные представления о свертывании крови . . . . .	600
Факторы плазмы крови . . . . .	600
Факторы тромбоцитов . . . . .	602
«Внешний» и «внутренний» пути свертывания крови . . . . .	603
Противосвертывающая система крови . . . . .	605
Фибринолиз . . . . .	606
<b>Глава 18. Почки и моча</b>	<b>608</b>
Особенности строения почек . . . . .	608
Механизм образования мочи	608
Роль почек в поддержании кислотно-основного равновесия . . . . .	614
Некоторые особенности обмена веществ в почечной ткани в норме и при патологии . . . . .	615
Общие свойства и составные части мочи . . . . .	616
Общие свойства мочи . . . . .	616
Химический состав мочи . . . . .	618
Органические вещества мочи	619
Неорганические (минеральные) компоненты мочи . . . . .	621

Патологические компоненты мочи . . . . .	622
Мочевые камни . . . . .	624
<b>Глава 19. Нервная ткань</b>	<b>625</b>
Структура нейрона . . . . .	625
Строение миелина . . . . .	626
Химический состав мозга . . . . .	628
Белки . . . . .	628
Липиды . . . . .	630
Углеводы . . . . .	631
Адениновые нуклеотиды и креатинфосфат . . . . .	632
Минеральные вещества . . . . .	632
Особенности метаболизма нервной ткани . . . . .	632
Дыхание . . . . .	632
Метаболизм углеводов . . . . .	633
Метаболизм лабильных фосфатов (макроэргов) . . . . .	634
Метаболизм аминокислот и белков . . . . .	634
Метаболизм липидов . . . . .	636
Химические основы возникновения и проведения нервных импульсов . . . . .	636
Роль медиаторов в передаче нервных импульсов . . . . .	637
Механизмы памяти . . . . .	641
Пептиды и болевые реакции	643
Цереброспинальная жидкость	643
<b>Глава 20. Мышечная ткань</b>	<b>645</b>
Морфологическая организация поперечно-полосатой мышцы . . . . .	645
Химический состав поперечно-полосатой мышцы . . . . .	647
Мышечные белки . . . . .	648
Небелковые азотистые экстрактивные вещества . . . . .	651
Безазотистые вещества . . . . .	652
Некоторые особенности химического состава сердечной мышцы и гладкой мускулатуры . . . . .	652
Изменение химического состава мышечной ткани в онтогенезе	653
Функциональная биохимия мышц	653
Источники энергии мышечной деятельности . . . . .	654

---

Механизм мышечного сокращения. . . . .	656
Биохимические изменения в мышцах при патологии. . . . .	658

**Глава 21. Соединительная ткань. . . . . 661**

Межклеточный органический матрикс соединительной ткани . . . .	662
Коллаген. . . . .	662
Эластин. . . . .	664
Протеогликаны. . . . .	665
Гликозаминогликаны (мукополисахариды). . . . .	665
Образование и катаболизм протеогликанов. . . . .	669

---

---

Биохимические изменения соединительной ткани при старении и некоторых патологических процессах. . . . .	670
---	-----

**Глава 22. Костная ткань 672**

Химический состав костной ткани	673
Формирование кости. . . . .	675
Факторы, оказывающие влияние на метаболизм костной ткани	676
Основные группы болезней кости	678
Рекомендуемая литература. . . . .	679
Предметный указатель. . . . .	680



## ПРЕДИСЛОВИЕ К ПЕРВОМУ ИЗДАНИЮ

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 перво-степенное 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 биохимию 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.

Данный учебник предназначен в первую очередь для студентов медицинских институтов и по структуре и объему в основном соответствует программе курса биохимии, утвержденной Министерством здравоохранения СССР. Некоторые главы его могут быть использованы студентами биологических факультетов университетов и других высших учебных заведений, где преподается биохимия.

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, пер-

вая 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 авитаминозов 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 Университете 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 и А.Н. Климову, члену-корреспонденту АМН СССР Ю.А. Панкову и профессорам Ю.Б. Филипповичу, Л.М. Гинопману и Г.С. Хачатряну.

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. Опущены данные о первичной структуре ряда пептидных и белковых гормонов, зато приведены новейшие результаты по биогенезу простагландинов и родственных соединений: простаглицлинов, 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 15–20 – Б.Ф. Коровкиным. Критические замечания, пожелания и предложения по содержанию второго издания учебника будут встречены авторами с благодарностью.

*Т. Березов, Б. Коровкин*

## ПРЕДИСЛОВИЕ К ТРЕТЬЕМУ ИЗДАНИЮ

В последнее время получено немало дополнительных доказательств того, что биохимия является средством выражения понятий и явлений не только в области фундаментальной биологической науки, но и в области клинической медицины. Биохимия, изучающая химические основы жизнедеятельности организмов в норме и при патологии, призвана установить связь между молекулярной структурой и биологической функцией химических компонентов живой материи. Авторы не стремились, как и в двух предыдущих изданиях, охватить все разделы курса общей биохимии. Главная цель данного издания – сохранив основные разделы и понятия биохимии, представить в сжатой форме новейшие сведения и факты о биогенезе главных классов органических веществ в организме человека и животных.

Принимая во внимание все возрастающий объем биохимической информации, многие разделы пришлось заново написать или существенно переработать: например, о структуре и функциях белков и нуклеиновых кислот, регуляции экспрессии генов, молекулярных механизмов биогенеза ДНК и РНК, биосинтеза белка, механизмах регуляции метаболизма и роли гормонрецепторной системы и вторичных внутриклеточных мессенджеров в передаче нервного и гуморального сигналов, механизмах ферментативного катализа, особенностях обмена веществ в нервной ткани (нейрохимия), печени, мышечной и соединительной тканях и др.

Представлена новая глава «Биомембраны и биоэнергетика», объединяющая прежние две главы учебника: «Обмен веществ и энергии» и «Биологическое окисление».

Новые сведения о химии углеводов и липидов рассмотрены в первой, специальной, «химической» части учебника в соответствии с предложениями ряда коллег и рецензента.

Учитывая основополагающую роль биохимии для теории и практики медицины, особое внимание в учебнике уделено изложению как регуляции и патологии обмена веществ, так и молекулярных основ соматических и наследственных болезней человека. В главе «Ферменты» значительно расширен раздел медицинской энзимологии. Обсуждаются проблемы энзимопатологии и применения ферментов в качестве диагностических средств и лечебных препаратов, а также в качестве инструментов при биотехнологическом производстве лекарственных препаратов и пищевых веществ.

Главы 1–4, 7, 8 и 12–15 написаны акад. РАМН Т.Т. Березовым, главы 5, 6, 10, 11 и 16–22 – чл.-корр. РАМН Б.Ф. Коровкиным, а глава 9 написана проф. А.А. Болдыревым.

Авторы выражают глубокую признательность многим преподавателям и студентам за ценные советы и критические замечания, большая часть которых была учтена при подготовке данного издания. С благодарностью будут встречены новые предложения, пожелания и замечания.

*Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин*

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ААП	– аланинаминопептидаза
АДФ	– аденозиндифосфат
АДГ	– антидиуретический гормон
АКТГ	– адренокортикотропный гормон
АлАТ	– аланинаминотрансфераза
АМК	– аминокислоты
АМФ	– аденозинмонофосфат
цАМФ	– циклический аденозин-3',5'-монофосфат
АПБ	– ацилпереносящий белок
АсАТ	– аспартатаминотрансфераза
АТФ	– аденозинтрифосфат
АТФаза	– аденозинтрифосфатаза
ГАМК	– $\gamma$ -аминомасляная кислота
ГДФ	– гуанозиндифосфат
ГМФ	– гуанозинмонофосфат
цГМФ	– циклический аденозин-3',5'-монофосфат
ГТФ	– гуанозинтрифосфат
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
ДНП	– дезоксирибонуклеопротеины
ДОФА	– диоксифенилаланин
Дофамин	– диоксифенилэтиламин
ДСН	– додецилсульфат натрия
ДФФ	– диизопропилфторфосфат
ДЭАЭ	– диэтиламиноэтил
ИМФ	– инозинмонофосфат
КоА	кофермент (коэнзим) А
КоQ	– кофермент (коэнзим) Q (убихинон)
КОР	– кислотно-основное равновесие
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	– липопротеины очень низкой плотности
МАО	– моноаминоксидаза
Мол. масса	– молекулярная масса
НАД <sup>+</sup>	– окисленный никотинамидадениндинуклеотид
НАДН + Н <sup>+</sup>	– восстановленный никотинамидадениндинуклеотид

НАДФ <sup>+</sup>	- окисленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НАДФН + Н <sup>+</sup>	- восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ПВК	- пировиноградная кислота
ПФ	- пиридоксальфосфат
РДФ	- рибонуклеотиддифосфат
Р <sub>i</sub>	- фосфат неорганический
РР <sub>i</sub>	- пирофосфат неорганический
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РНКаза	- рибонуклеаза
мРНК	- матричная РНК
рРНК	- рибосомная РНК
тРНК	- транспортная РНК
РНП	- рибонуклеопротеины
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
ФАДН <sub>2</sub>	- восстановленный флавинадениндинуклеотид
ФАФС	- 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат
ФДНБ	- фтординитробензол
ФМН	- окисленный флавинмоноклеотид
ФМНН <sub>2</sub>	- восстановленный флавинмоноклеотид
ФРПФ	- 5-фосфорибозил-1-пирофосфат
ЦДФ	- цитидиндифосфат
ЦМФ	- цитидинмонофосфат
ЦНС	- центральная нервная система
ЦТК	- цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса)
ЦТФ	- цитидинтрифосфат
ЭДТА	- этилендиаминтетраацетат

# ВВЕДЕНИЕ

Биологическая химия—это наука о молекулярной сущности жизни. Она изучает химическую природу веществ, входящих в состав живых организмов, их превращения, а также связь этих превращений с деятельностью клеток, органов и тканей и организма в целом. Из этого определения вытекает, что биохимия занимается выяснением химических основ важнейших биологических процессов и общих путей и принципов превращений веществ и энергии, лежащих в основе разнообразных проявлений жизни. Таким образом, главной задачей биохимии является установление связи между молекулярной структурой и биологической функцией химических компонентов живых организмов.

В зависимости от объекта исследования биохимию условно подразделяют на биохимию человека и животных, биохимию растений и биохимию микроорганизмов. Несмотря на биохимическое единство всего живого, существуют и коренные различия как химического состава, так и обмена веществ в животных и растительных организмах. Обмен веществ, или метаболизм,— это совокупность всех химических реакций, протекающих в организме и направленных на сохранение и самовоспроизведение живых систем. Известно, что растения строят сложные органические вещества (углеводы, жиры, белки) из таких простых, как вода, углекислый газ и минеральные вещества, причем энергия, необходимая для этой синтетической деятельности, образуется за счет поглощения солнечных лучей в процессе фотосинтеза. Животные организмы, напротив, нуждаются в пище, состоящей не только из воды и минеральных компонентов, но содержащей сложные вещества органической природы: белки, жиры, углеводы. У животных проявления жизнедеятельности и синтез веществ, входящих в состав тела, обеспечиваются за счет химической энергии, освобождающейся при распаде (окислении) сложных органических соединений.

Растения, не использующие для своей жизнедеятельности вещества органической природы, называются аутотрофными организмами; животные являются гетеротрофными организмами. Среди микроорганизмов встречаются как аутотрофы, так и гетеротрофы. Кроме того, для микроорганизмов характерным признаком считается наличие специфических химических веществ и реакций, не встречающихся в клетках животных и растений.

Современная биохимия как самостоятельная наука сложилась на рубеже XIX и XX вв. До этого времени вопросы, рассматриваемые биохимией, входили в органическую химию и физиологию. 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 неправильных обобщений и представлений, господствовавших в науке в то время. В XVI—XVII вв. 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 причинной основой любого заболевания является нарушение «хода» химических процессов в организме. В связи с этим, по мнению Т. Парацельса, для лечения следует использовать химические средства. К данному периоду относится и смелая для того времени идея И. Ван-Гельмонта о наличии в «соках» живого тела особых веществ—«ферментов», участвующих в разнообразных химических превращениях.

В целом познание закономерностей химических и ферментативных процессов, лежащих в основе жизнедеятельности, 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, ятрохимии, так же как и алхимии, по своему мировоззрению были метафизиками и придерживались виталистических взглядов.

В XVII—XVIII вв. широкое признание среди ученых получила теория горячего начала—флогистона, сформулированная немецким химиком и врачом Г. Шталем. Несмотря на ошибочность основных положений, теория флогистона (объяснявшая процессы горения выделением из горящего 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 в науке основные законы сохранения энергии и вещества, справедливые и для биологических объектов. Кроме того, А. Лавуазье показал, что при дыхании, как и при горении органических веществ, поглощается кислород и выделяется углекислый газ.

С середины XVIII в. начинается период открытия и выделения большого числа новых органических веществ растительного и животного происхождения. Крупным событием второй половины XVIII в. стали исследования Л. Спалланцани по физиологии пищеварения, которые положили начало изучению ферментов пищеварительных соков. Русский химик К.С. Кирхгоф в 1814 г. описал ферментативный процесс осахаривания крахмала под влиянием вытяжки из проросших семян ячменя. К середине XIX в. 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 в 1828 г. удалось 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. Л. Пастер ошибочно считал брожение биологическим процессом, 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. 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.

Накопленные сведения о химическом составе растительных и животных организмов и химических процессах, протекающих в них, были впервые систематизированы в учебниках И. Зимоны (1842) и Ю. Либиха (1847). В России первый учебник физиологической химии был издан А.И. Ходневым (1847).

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

Подлинный расцвет биологической химии относится к XX в., когда важные открытия во многих ее областях следовали одно за другим. Биохимия открыла новые пути поиска с целью познания сущности биологических процессов, помогла человеку получить множество фактов о самом себе и условиях своего существования.

Последние годы характеризуются развитием методологических принципов и методических приемов исследования живой природы и накоплением фактических данных, позволивших изучать и объяснять метаболические процессы в биологии на молекулярном уровне.

Традиционный термин «биохимия», кажется, уже не в полной мере отражает профессиональную активность современных исследователей-биохимиков. Несмотря на то что один из выдающихся биохимиков недавнего прошлого С. Очоа полагал, что молекулярная биология—это в сущности «биохимия без лицензии», многие в наши дни считают оба термина синонимами. Более того, созданы совместные национальные и международные научные общества, объединяющие биохимиков и молекулярных биологов. В ряде случаев кафедры называются кафедрами биохимии и молекулярной биологии. Все это имеет не только чисто академический, но и политический смысл, препятствующий возможности организации других кафедр и имеющий бесспорные преимущества при получении грантов. Помимо старых терминов «физиологическая химия», «физико-химическая биология», появилось много новых: в частности, «медицинская химия», изучающая химическую природу веществ, используемых с лечебной целью; «медицинская биохимия», основной целью которой является изучение структуры и обмена индивидуальных биомолекул в норме и при болезнях человека. Имеют права «гражданства» и такие названия, как «клиническая химия», «клиническая биохимия» и «химическая патология» (или «патобиохимия»), скорее всего, являющиеся синонимами и изучающие химические компоненты организма для использования их в клинической медицине. Наконец, появился совсем новый термин «молекулярная медицина»

(даже в названиях учебников), цели и задачи которой остаются неясными. Надо ли в корне менять наши современные представления о структуре и функции биомолекул, сложившиеся в процессе изучения их в курсе биохимии и молекулярной биологии?

Наиболее важными и приоритетными фундаментальными направлениями научных исследований в биохимии и молекулярной биологии являются генетическая инженерия и биотехнология, которым придается исключительное значение. Усилия ученых сосредоточены на создании и производстве препаратов для медицины (гормоны, ферменты, моноклональные антитела, биоактивные пептиды, вакцины, интерферон, простагландины и др.), сельского хозяйства (регуляторы роста растений, феромоны для борьбы с вредителями растений), промышленности (пищевые и вкусовые добавки). Эта новая технология может решать ряд важных проблем в медицине (пренатальная диагностика болезней, генотерапия и др.).

В настоящее время перед биологической наукой поставлена задача — обеспечить преимущественное развитие научных 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 и создание на этой основе методов диагностики и лечения опухолевых заболеваний человека; исследования проблем биоэнергетики, питания, психики и 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:

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, общебиологические, включая проблему зависимости человека от экосистемы, которую необходимо не только понимать, но защищать и научиться разумно ею пользоваться.

# Глава 1

## ХИМИЯ БЕЛКОВ

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—это 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 термины «белки» и «белковые вещества» связаны с обнаружением в тканях животных и растений веществ, имеющих сходство с белком куриного яйца. 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 реализуется генетическая информация. Без белков, в частности ферментов, ДНК не может реплицироваться, не может самовоспроизводиться, 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 пространстве. Удивительная способность живых организмов к воспроизведению себе подобных также связана с белками. Сократимость, движение — неперенные атрибуты живых систем—имеют прямое отношение к белковым структурам мышечного аппарата. Наконец, жизнь немислима 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 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 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 (см. далее). Каждый организм характеризуется уникальным набором белков. Фенотипические признаки и многообразие функций обусловлены специфичностью объединения этих белков, во многих случаях в виде над- 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 более 100000 разнообразных белков. Самое удивительное, что все природные белки состоят из небольшого числа сравнительно простых структурных блоков, представленных мономерными молекулами—аминокислотами, связанными друг с другом в полипептидные цепи. Природные белки построены из 20 различных аминокислот. Эти аминокислоты могут объединяться в самой разной последовательности, поэтому они могут образовывать громадное количество разнообразных белков. Число изомеров, которое можно получить при всевозможных перестановках указанного числа аминокислот в полипептиде, исчисляется огромными величинами. Так, если из 2 аминокислот возможно образование только двух изомеров, то уже из 4 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 остатков 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 последовательности аминокислотных остатков. Учитывая ведущую роль белков в живой природе и тот факт, что белки, составляя почти половину сухой массы живого организма, наделены удивительным разнообразием функций, изучение курса биохимии в медицинских высших учебных заведениях обычно начинают с этого класса органических веществ.

## ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

Белки выполняют множество самых разнообразных функций, характерных для живых организмов, с некоторыми из которых мы познакомимся более подробно при дальнейшем изучении курса. Ниже рассматриваются главные и в некотором смысле уникальные биологические функции белков, несвойственные или лишь частично присущие другим классам биополимеров.

**Каталитическая функция.** К 1995 г. было идентифицировано более 3400 ферментов. Большинство известных в настоящее время ферментов,

называемых биологическими катализаторами, является белками. Эта функция белков, хотя и не оказалась уникальной, определяет скорость химических реакций в биологических системах\*.

**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, вирусов или чужеродных белков. Высокая специфичность взаимодействия антител с антигенами (чужеродными веществами) по типу белок-белковое взаимодействие способствует узнаванию и нейтрализации биологического действия антигенов. Защитная функция белков проявляется и в способности ряда белков плазмы крови, в частности фибриногена, к свертыванию. В результате свертывания фибриногена образуется сгусток крови, предохраняющий 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 структурную (опорную) функцию, занимают по количеству первое место среди других белков тела человека. Среди них важнейшую роль играют фибриллярные белки, в частности 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, с фосфолипидами) белки участвуют в образовании биомембран клеток.

**Гормональная функция.** Обмен веществ в организме регулируется разнообразными механизмами. В этой регуляции важное место занимают гормоны, синтезируемые не только в железах внутренней секреции, но и во многих других клетках организма (см. далее). Ряд гормонов представлен белками или полипептидами, например гормоны гипофиза, поджелудочной железы и др. Некоторые гормоны являются производными аминокислот.

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

Можно назвать еще некоторые другие жизненно важные функции белков. Это, в частности, экспрессия генетической информации, генерирование и передача нервных импульсов, способность поддерживать онкотическое

\* Получены экспериментальные доказательства, что, помимо белков, ферментативной, каталитической активностью наделен и ряд других макромолекул, в частности РНК (названы рибозимами) и моно- и поликлональные антитела (абзимы)—см. главу «Ферменты».

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 выделить 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 (сродство) обеспечивает взаимодействие ферментов с субстратами, антител с антигенами, транспортных белков крови с переносимыми молекулами других веществ и т.д. Это взаимодействие основано на принципе биоспецифического узнавания, завершающегося связыванием фермента с соответствующей молекулой субстрата, что содействует протеканию химической реакции. Высокой специфичностью действия наделены также белки, которые участвуют в таких процессах, как дифференцировка и деление клеток, развитие живых организмов, определяя 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 белков хорошо растворимо в воде. Некоторые органические вещества, выделенные из хряща, волос, ногтей, рогов, костной ткани и нерастворимые в воде, также были отнесены к белкам, поскольку по своему химическому составу оказались близки к белкам мышечной ткани, сыворотки крови, яйца.

В мышцах, легких, селезенке, почках на долю белков приходится более 70–80% от сухой массы, а во всем теле человека—45% от сухой массы (табл. 1.1)\*. В отличие от животных тканей в растениях содержится значительно меньше белков (табл. 1.2).

Таблица 1.1. Содержание белков в органах и тканях человека

Органы и ткани	Содержание белков, %		Органы и ткани	Содержание белков, %				
	от сухой массы	от общего количества белка тела		от сухой массы	от общего количества белка тела			
Кожа	63	11,5	Почки	72	0,5			
Кости (твердые ткани)	20	18,7	Поджелудочная железа	47	0,1			
Зубы (твердые ткани)	18	0,1	Пищеварительный тракт	63	1,8			
Поперечнополосатые мышцы	80	34,7						
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						
Легкие	82	3,7				плотные	54	14,6
Селезенка	84	0,2				Все тело	45	100

\* Ряд таблиц и рисунков учебника заимствован из руководств Б.И. Збарского, И.И. Иванова, С.Р. Мардашева (М., 1972) и Ю.Б. Филипповича (М., 1994).

Таблица 1.2. Содержание белков в органах животных и в растениях

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

Для изучения химического состава, строения и свойств белков их обычно выделяют или из тканей, или из культивируемых клеток, или биологических жидкостей, например сыворотки крови, молока, мышц, печени, кожи и др. 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 присутствуют в небольших количествах фосфор, железо, марганец, магний, йод и др.

Таким образом, помимо углерода, кислорода и водорода, входящих в состав почти 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 содержанию белкового азота.

## МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ

Для подробного исследования физико-химических и биологических свойств белков, а также для изучения их химического состава и структуры непременным условием является получение белков из природных источников в химически чистом, гомогенном состоянии. Последовательность операций по выделению белков обычно состоит в следующем: измельчение биологического материала (гомогенизация); извлечение белков, точнее, перевод белков в растворенное состояние (экстракция); выделение исследуемого белка из смеси других белков, т.е. очистка и получение индивидуального белка.

Белковые вещества весьма чувствительны к повышению температуры и действию многих химических реагентов (органические растворители, кислоты, щелочи). Поэтому обычные методы органической химии, применяемые для выделения того или иного вещества из смеси (нагревание, перегонка, возгонка, кристаллизация и др.), в данном случае неприемлемы. Белки в этих условиях подвергаются денатурации, т.е. теряют некоторые существенные природные (нативные) свойства, в частности растворимость, биологическую активность. Разработаны эффективные методы выделения белков в «мягких» условиях, при низкой температуре (не выше 4°C), 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 гомогенного состояния, т.е. подвергают дезинтеграции

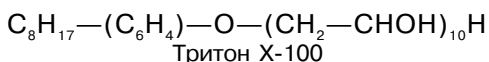
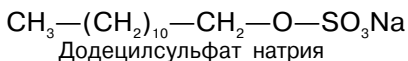
вплоть до разрушения клеточной структуры. Эту процедуру, называемую гомогенизацией, проводят при помощи ножевых гомогенизаторов типа Уорринга или пестикового гомогенизатора Поттера–Эльвегейма. Для выделения ряда белков из плотных животных и растительных объектов часто используют валковые или шаровые мельницы (рис. 1.1). Успешно применяется также метод попеременного замораживания и оттаивания ткани, в основе действия которого лежит разрушение клеточной оболочки, вызванное кристаллами льда. Для дезинтеграции тканей используют также ультразвук, пресс-методы (замороженный биоматериал пропускают 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 — выделяющийся газообразный азот как бы «взрывает» клетки.

## Экстракция белков

Современные методы измельчения тканей обычно сочетают с одновременной экстракцией белков из гомогенатов тканей. Большинство белков тканей хорошо растворимо в 8–10% растворах солей. При экстракции белков широко применяют 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.

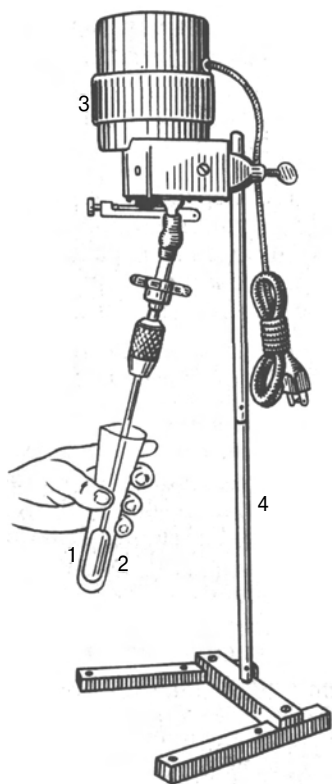
Из органических соединений, помимо давно применяемых водных растворов глицерина, широко используют (особенно для солюбилизации) слабые растворы сахарозы. На растворимость белков при экстракции большое влияние оказывает рН среды, поэтому в белковой химии применяют фосфатные, цитратные, боратные буферные 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 обозначают «трис») с 0,1 М раствором хлороводородной кислоты в разных соотношениях. Для выделения белков сыворотки крови используют способы их осаждения этанолом (см. метод Кона), ацетоном, бутанолом и их комбинации. Почти все органические растворители разрывают белок-липидные связи, способствуя лучшей экстракции белков.

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

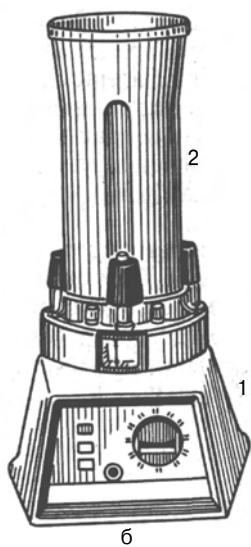
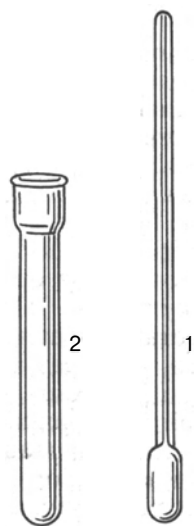


\* Здесь имеется в виду разрушение так называемых слабых связей (см. далее). Пептидные и другие ковалентные связи в белковых молекулах стараются сохранять.

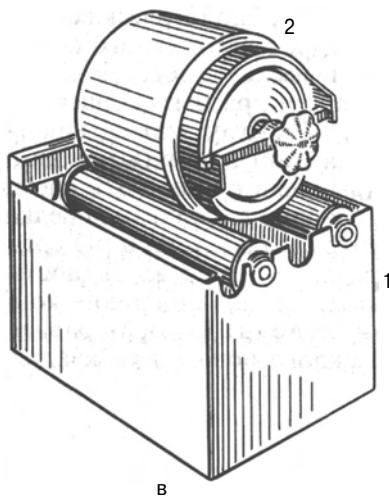




а



б



в

**Рис. 1.1.** Лабораторное оборудование.

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

Следует, однако, иметь в виду, что детергенты, вызывая разрыв белок-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  $-40^{\circ}\text{C}$ . 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.) наблюдаются дегидратация молекул белка и их выпадение в осадок.

**Высаливание.** При добавлении растворов 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 гельхроматографии. Высаливанием белков обычно пользуются в клинической практике при анализе белков сыворотки крови и других биологических жидкостей, а также в препаративной энзимологии для предварительного осаждения и удаления балластных белков или выделения исследуемого фермента. Различные белки высаливаются из растворов при разных концентрациях нейтральных растворов сульфата аммония. Поэтому 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 оказывают влияние не только природа и концентрация соли, но и рН среды и температура. Считают, что главную роль при этом играет валентность ионов. Действие разных ионов принято сравнивать не по молярной концентрации соли, а по так называемой ионной силе ( $\mu$ ), 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 использовании различных концентраций этанола при низкой температуре (от  $-3$  до  $-5^{\circ}\text{C}$ ) по методу Кона (рис. 1.2). В этих условиях белки сохраняют свои нативные свойства. Указанным методом часто пользуются для получения отдельных фракций крови, используемых в качестве кровезаменителей.



**Рис. 1.2.** Диаграмма фракционирования белков плазмы крови человека этанолом (по методу Кона).

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

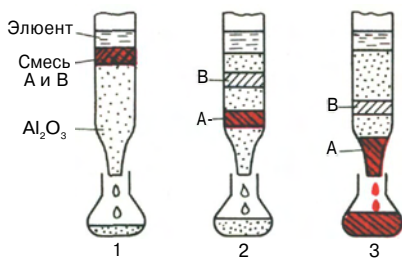
**Хроматография.** Принцип хроматографии, разработанный в 1903 г. русским ученым М. С. Цветом, основан на способности пигментов (или любых других окрашенных и неокрашенных веществ) специфически адсорбироваться на адсорбенте, заключенном в колонку\*.

В результате происходит разделение анализируемых веществ и их концентрирование в строго определенном слое адсорбента. Затем через колонку пропускают подходящие элюенты, которые ослабляют силы адсорбции и выносят с током раствора индивидуальные вещества. Последние последовательно собирают в коллекторе фракций (принцип сорбции-десорбции).

Чрезвычайно эффективным средством фракционирования белков из смеси оказалась колоночная хроматография 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 (хроматография по сродству)—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 на колонку —

\* Это выдающееся открытие русского ученого было 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 позволил установить факт наличия в природе разнообразия родственных соединений».



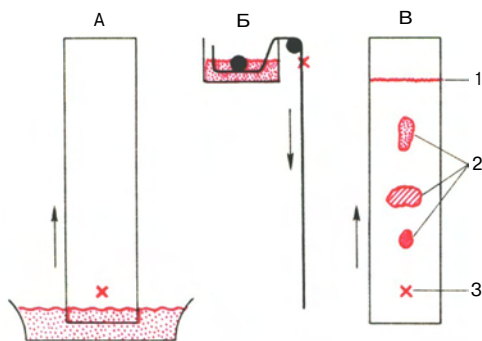
**Рис. 1.3.** Абсорбционная хроматография (схема). Разделение двух разных веществ (А и В), перемещающихся по колонке с разной скоростью.

1 - нанесение образца на колонку; 2 - середина опыта; 3 - окончание опыта.

компоненты разделяемой смеси адсорбируются на адсорбенте. Затем приступают к стадии освобождения—десорбции компонентов из колонки, применяя подходящие элюенты (рис. 1.3). Сбор фракций осуществляют при помощи автоматического коллектора фракций.

**Распределительная хроматография.** В отличие от адсорбционной твердая фаза служит только опорой (основой) для стационарной жидкой фазы. Один из типов распределительной хроматографии, как и адсорбционная, осуществляется на колонках, в которых в качестве стационарной фазы применяют влажный крахмал или силикагель. Образец растворяют в подходящем растворителе, затем наносят на колонку; разделяемые вещества, подвергаясь 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, соединяют для выделения этого вещества в чистом виде.

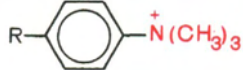
Разновидностью распределительной хроматографии является хроматография на бумаге, широко используемая в биохимических лабораториях, в том числе клинических, для разделения пептидов, аминокислот и других веществ (рис. 1.4). В качестве стационарной фазы при этом служит вода, адсорбированная целлюлозными цепями фильтровальной бумаги. Образец помещают на одном конце бумажной полосы, этим же концом бумагу погружают в подходящую смесь органических растворителей (например, бутанол—уксусная кислота—вода в определенных соотношениях). При движении растворителя по бумаге благодаря силе капиллярности происходит разделение компонентов смеси. Проявленную хроматограмму высушивают, а местоположение каждого из разделяемых веществ определяют химическими или физико-химическими методами.



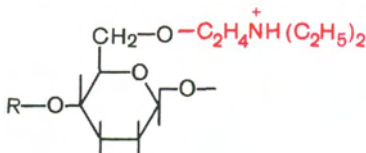
**Рис. 1.4.** Хроматография на бумаге (схема).

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.

**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 функциональные группы:



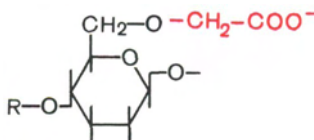
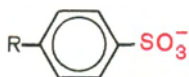
Триметиламинополистирол



Диэтиламиноэтилцеллюлоза  
(ДЭАЭ-целлюлоза)

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

Катионообменники представлены сульфонированными полистиролами (производные винилбензола или дивинилбензола) и карбоксиметилцеллюлозой, имеющими следующие функциональные группы:



В зависимости от заряда разделяемых белков используют подходящую ионообменную смолу, с функциональными группами которой обменивается и задерживается на колонке часть белков, в то время как другие белки беспрепятственно элюируются с колонки. «Осажденные» на колонке белки снимают с колонки, применяя более концентрированные солевые растворы или изменяя pH 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 (хроматография по сродству).** Основана аффинная хроматография 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. 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 pH или

измененной ионной силой, а также введением в состав элюента детергентов, ослабляющих связи между белками и лигандами. Несомненным достоинством 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-синтетаз на полиакрилгидразидагаровом геле, к которому в качестве лигандов были присоединены определенные тРНК (транспортные РНК).

**Гель-хроматография.** В препаративных целях, особенно при очистке белков от примесей, широко используют метод молекулярных сит, или гель-хроматографию. При обработке эпихлоргидрином полисахарида декстрана\* образуются различной 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 двигаются 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 после выхода из колонки  $V_0$ , а первое – только после выхода объема  $V_0 + V_i$ .

Поскольку молекулы белков, обладающие большими молекулярной массой и размерами, 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  $V_0 + K \cdot V_i$ .

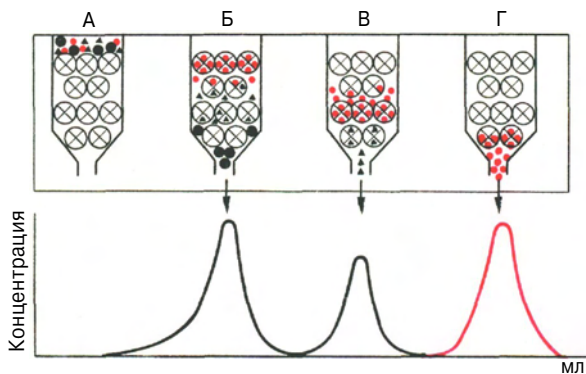
Метод нашел широкое применение в препаративной энзимологии. С помощью сефадекса можно разделить белки с разной молекулярной массой.

**Электрофорез.** Метод свободного электрофореза, детально разработанный лауреатом Нобелевской премии А. Тизелиусом, основан на различии в скорости движения (подвижности) белков в электрическом поле, которая

\* 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 для разделения белков и других биомолекул используют 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.



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 состоят 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 рН и разной степени пористости гель. Следует отметить высокую разрешающую способность гель-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 10В, 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, особенно при фракционировании белков с высокой молекулярной массой, превышающей 50000—100000.

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 рН. 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 рН равен нулю. При использовании

метода изоэлектрического фокусирования применяют смеси синтетических полиаминополикарбоновых кислот (амфолины) для создания градиента рН в диапазоне от 3,0 до 10,0.

В последние годы широкое распространение для фракционирования белков получили различные сочетания изоэлектрофокусирования и диск-электрофореза в полиакриламидном геле—методы двухмерного электрофореза, которые позволяют параллельно анализировать сотни и даже тысячи белковых фракций.

## **Очистка белков от низкомолекулярных примесей**

Применение в определенной последовательности ряда перечисленных 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, гельхроматографии, кристаллизации, ультрафильтрации. При диализе применяют 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 белков\*. 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 получают с помощью гельхроматографии и ультрафильтрации. 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.

## **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 в градиенте плотности сахарозы или хлорида цезия, диск-электрофорез в полиакриламидном геле, изоэлектрическое фокусирование, иммунохимические методы и определение растворимости белка. Действительно, если при гель-электрофорезе белок движется в виде одной узкой полосы и в этой зоне сосредоточена его биологическая активность (ферментативная, гормональная, токсическая

\* Первый кристаллический фермент уреазы был получен Д. Самнером в 1926 г.



и т.д.), то эти данные с большой долей вероятности могут свидетельствовать об однородности исследуемого белка.

В основе иммунохимического метода контроля гомогенности исследуемого белка лежит реакция преципитации его с соответствующей антисывороткой, полученной от иммунизированных этим белком животных. Для строгого доказательства гомогенности белка требуется одновременное использование нескольких методов.

Не потерял своего значения и метод кристаллизации белков с использованием сульфата аммония, а также метод определения растворимости белка. Последний, предложенный еще Д. Норттропом\*, 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.

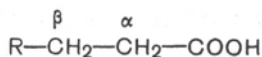
## АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ

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 в. Большая заслуга в этом принадлежит работам Н.Н. Любавина, который в 1871 г. установил, что под действием ферментов пищеварительных соков белки расщепляются на аминокислоты.

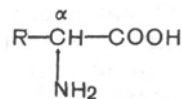
Были сделаны два важных вывода: 1) в состав белков входят аминокислоты; 2) методами гидролиза может быть изучен химический, в частности аминокислотный, состав белков.

Для изучения аминокислотного состава белков пользуются сочетанием кислотного (HCl), щелочного [Ba(OH)<sub>2</sub>] и, реже, ферментативного гидролиза\*\* или одним из них. Установлено, что при гидролизе чистого белка, не содержащего примесей, освобождаются 20 различных α-аминокислот. Все другие открытые в тканях животных, растений и микроорганизмов аминокислоты (более 300) существуют в природе в свободном состоянии либо 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 (—NH<sub>2</sub>), например:



Жирная кислота



α-Аминокислота

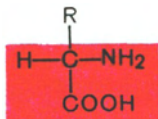
\* В лаборатории Норттропа в 1930-1931 гг. впервые получены в химически индивидуальном и кристаллическом состоянии пепсин, химотрипсин и трипсин.

\*\* При кислотном и щелочном гидролизе белков наблюдается почти полный распад триптофана и цистеина, поэтому для их определения предложены специальные методы.

Следует подчеркнуть, что все аминокислоты, входящие в состав природных белков, являются  $\alpha$ -аминокислотами, хотя аминогруппа в свободных аминокарбоновых кислотах может находиться, как увидим ниже, в  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - и  $\varepsilon$ -положениях.

## Классификация аминокислот

Все встречающиеся в природе аминокислоты обладают общим свойством — амфотерностью (от греч. *amphoterós*—двусторонний), т.е. каждая аминокислота содержит как минимум одну кислотную и одну основную группы. Общий тип строения  $\alpha$ -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  $\alpha$ -углеродным атомом и не участвующую в образовании пептидной связи при синтезе белка. Почти все  $\alpha$ -амино- и  $\alpha$ -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.

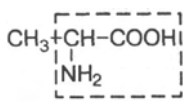
Классификация аминокислот разработана на основе химического строения радикалов, хотя были предложены и другие принципы. Различают ароматические и алифатические аминокислоты, а также аминокислоты, содержащие серу или гидроксильные группы. Часто классификация основана на природе заряда аминокислоты. Если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

Современная рациональная классификация аминокислот основана на полярности радикалов (R-групп), т.е. способности их к взаимодействию с водой при физиологических значениях pH (близких к pH 7,0). Различают 5 классов аминокислот, содержащих следующие радикалы: 1) неполярные (гидрофобные); 2) полярные (гидрофильные); 3) ароматические (большой частью неполярные); 4) отрицательно заряженные и 5) положительно заряженные. В представленной классификации аминокислот (табл. 1.3) приведены наименования, сокращенные английские и русские обозначения и однобуквенные символы аминокислот, принятые в отечественной и иностранной литературе, а также значения изоэлектрической точки (pI) и молекулярной массы (M). Отдельно даются структурные формулы всех 20 аминокислот белковой молекулы.

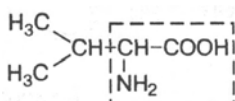
Таблица 1.3. Классификация аминокислот, основанная на полярности радикалов

Аминокислоты	Принятые сокращенные обозначения и однобуквенные символы			M/pI	Среднее содержание в белках, %
	англ.	символ	русск.		
<b>I. Неполярные R-группы</b>					
Глицин	Gly	G	Гли	75/5,97	7,5
Аланин	Ala	A	Ала	89/6,02	9,0
Валин	Val	V	Вал	117/5,97	6,9
Лейцин	Leu	L	Лей	131/5,97	7,5
Изолейцин	Ile	I	Иле	131/5,97	4,6
Пролин	Pro	P	Про	115/6,10	4,6
<b>II. Полярные, незаряженные R-группы</b>					
Серин	Ser	S	Сер	105/5,68	7,1
Треонин	Thr	T	Тре	119/6,53	6,0
Цистеин	Cys	C	Цис	121/5,02	2,8
Метионин	Met	M	Мет	149/5,75	1,7
Аспарагин	Asn	N	Асн	132/5,41	4,4
Глутамин	Gln	Q	Глн	146/5,65	3,9
<b>III. Ароматические R-группы</b>					
Фенилаланин	Phe	F	Фен	165/5,98	3,5
Тирозин	Tyr	Y	Тир	181/5,65	3,5
Триптофан	Trp	W	Трп	204/5,88	1,1
<b>IV. Отрицательно заряженные R-группы</b>					
Аспарагиновая кислота	Asp	D	Асп	133/2,97	5,5
Глутаминовая кислота	Glu	E	Глу	147/3,22	6,2
<b>V. Положительно заряженные R-группы</b>					
Лизин	Lys	K	Лиз	146/9,74	7,0
Аргинин	Arg	R	Арг	174/10,76	4,7
Гистидин	His	H	Гис	155/7,59	2,1

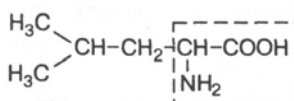
Неполярные R-группы



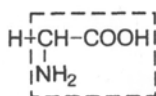
L-аланин



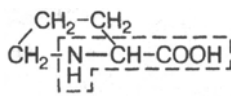
L-валин



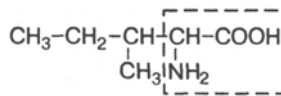
L-лейцин



L-глицин

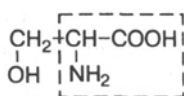


L-пролин

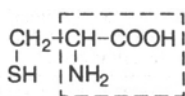


L-изолейцин

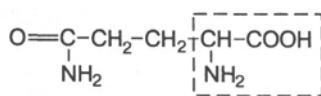
Полярные, незаряженные R-группы



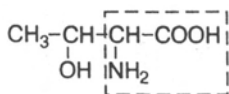
L-серин



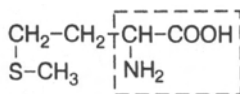
L-цистеин



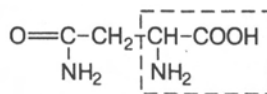
L-глутамин



L-треонин

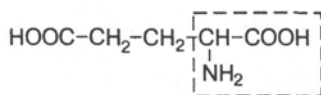


L-метионин

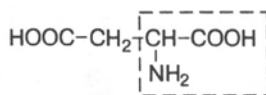


L-аспарагин

Отрицательно заряженные R-группы

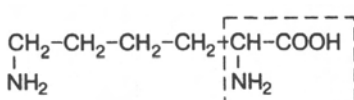


L-глутаминовая кислота

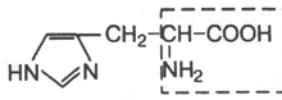


L-аспарагиновая кислота

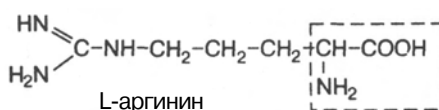
Положительно заряженные R-группы



L-лизин

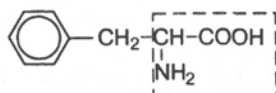


L-гистидин

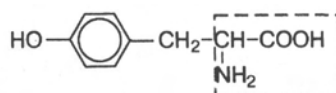


L-аргинин

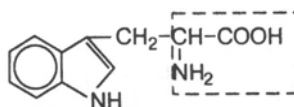
Ароматические R-группы



L-фенилаланин

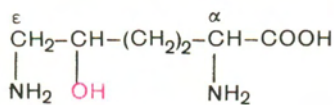


L-тирозин

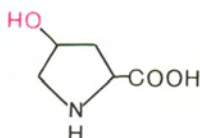


L-триптофан

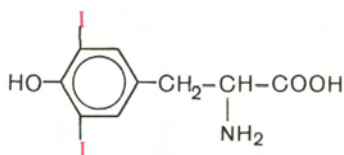
Перечисленные аминокислоты присутствуют в разных количественных соотношениях и последовательностях в тысячах белков, хотя отдельные индивидуальные белки не содержат полного набора всех этих аминокислот. Помимо наличия в большинстве природных белков 20 аминокислот, в некоторых белках обнаружены производные аминокислот\*: оксипролин, оксилизин, диодтирозин, фосфосерин и фосфотреонин (последние две аминокислоты представлены в главе 2):



Оксилизин

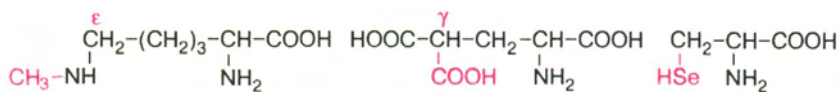


Оксипролин



3,5-Дийодтирозин

Первые две аминокислоты содержатся в белке соединительной ткани — коллагене, а диодтирозин является основой структуры гормонов щитовидной железы. В мышечном белке миозине обнаружен также  $\epsilon$ -N-метиллизин; в состав протромбина (белок свертывания крови) входит  $\gamma$ -карбоксиглутаминовая кислота, а в глутатионпероксидазе открыт селеноцистеин, в котором OH-группа серина заменена на селен (Se):



$\epsilon$ -N-метиллизин

$\gamma$ -Карбоксиглутаминовая кислота

Селеноцистеин

Помимо указанных, ряд  $\alpha$ -аминокислот выполняет важные функции в обмене веществ, хотя и не входит в состав белков, в частности орнитин, цитруллин, гомосерин, гомоцистеин, цистеинсульфиновая кислота, диоксифенилаланин и др.

## Общие свойства аминокислот

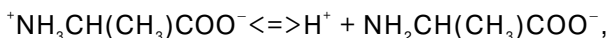
**Кислотно-основные свойства.** Эти свойства аминокислот определяют многие физико-химические и биологические свойства белков. На этих свойствах основаны, кроме того, почти все методы выделения и идентификации аминокислот. Аминокислоты легко растворимы в воде. Они кристаллизуются из нейтральных водных 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).



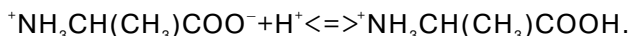
Цвиттерион

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

При растворении в воде кристаллическая аминокислота, например аланин, может реагировать или как кислота (донатор протона):



или как основание (акцептор протона):



Если радикалы аминокислот нейтральные, то они почти не оказывают влияния на диссоциацию  $\alpha$ -карбоксильной группы или  $\alpha$ -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 кислоту (0,1 М раствор НСl) или сильную щелочь (0,1 М раствор NaOH), то получим кривую титрования аланина, типичную для всех нейтральных аминокислот (рис. 1.6).

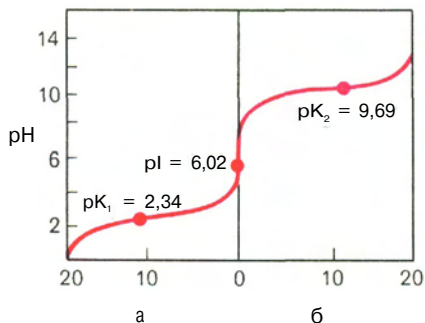
Кажущиеся величины рК' для  $\alpha$ -карбоксильной группы и  $\alpha$ -аминогрупп (т.е. значения рН, при которых эти группы в среднем наполовину диссоциированы) довольно сильно различаются, составляя  $\text{pK}'_1 = 2,34$  и  $\text{pK}'_2 = 9,69$ . При низком значении рН (ниже  $\text{pK}'_1$ ) почти 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 рН 6,02. Это означает, что при данном значении рН 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 рН получило название изоэлектрической точки и обозначается рI. Изоэлектрическая точка аминокислот, не содержащих дополнительных  $\text{NH}_2$ - или  $\text{COOH}$ -групп, представляет собой среднее арифметическое между двумя значениями рК':

$$\text{pI} = \frac{\text{pK}'_{\text{COOH}} + \text{pK}'_{\text{NH}_2}}{2} ,$$

соответственно для аланина

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

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, рI должна вычисляться из полусуммы значений рК' для  $\alpha$ - и  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$ -групп. Таким образом, в интервале рН от 4,0 до 9,0 почти все аминокислоты существуют преимущественно в форме цвиттерионов с протонированной аминогруппой и диссоциированной карбоксильной группой. Следует отме-

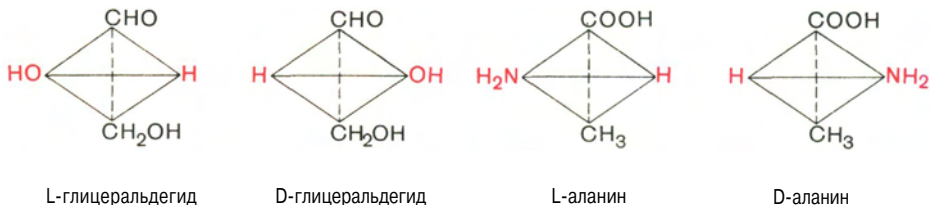


**Рис. 1.6.** Кривые, полученные при титровании 0,1 М раствора аланина 0,1 М раствором HCl (а) и 0,1 М раствором NaOH (б).

тить, что при физиологических значениях pH тканей и крови (7,1 и 7,4 соответственно) аминокислоты (за исключением гистидина) не обладают измеримой буферной емкостью. Эту способность они приобретают только при значениях pH, близких к величинам их pK (т.е. при pH 1,7–3,2 и 8,6–10,8).

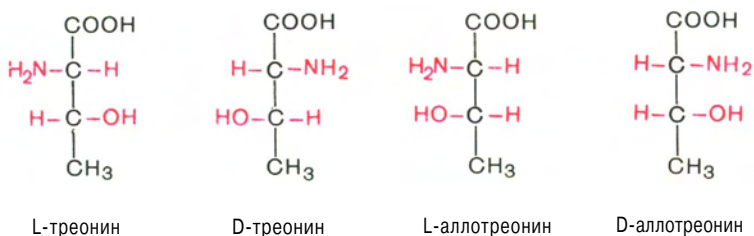
**Стереохимия аминокислот.** Важнейшим свойством аминокислот, освобождающихся в процессе гидролиза природных белков в условиях, исключающих рацемизацию, является их оптическая активность. Будучи растворенными в воде (или в HCl), они способны вращать плоскость поляризованного луча (исключение составляет глицин). Это свойство связано с наличием в молекуле всех природных аминокислот (за исключением глицина) в  $\alpha$ -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  $[\alpha]_D^{25}$  составляет от 10 до 30°. Примерно половина аминокислот белков оказалась правовращающей, их обозначают знаком «+» (Ала, Иле, Глу, Лиз и др.), а чуть меньше половины – левовращающей (Фен, Трп, Лей и др.), их обозначают знаком «-». 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 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 знак «+» или «-» указывает на направление изменения плоскости поляризации светового луча. Среди 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 аминокислот\*. Для треонина известны все четыре изомера. Если условно обозначить 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:



Как отмечалось, в белковой молекуле D-аминокислоты не обнаружены\*\*, 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 и S, содержатся аминокислоты D-конфигурации.

Аминокислотный состав (качественный и количественный) многих тысяч белков, полученных из разных источников, выяснен (табл. 1.4).

При анализе данных 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, метионин, триптофан, гистидин, приходится не более 1,5–3,5%. В протаминах и гистонах отмечено высокое содержание основных аминокислот аргинина и лизина, соответственно 26,4 и 85,2% (см. «Химия простых белков»).

**Химические реакции для открытия и определения аминокислот в гидролизатах белков.** В курсе органической химии подробно рассмотрено множество химических реакций, характерных для α-амино- и α-карбоксильных групп аминокислот (ацилирование, алкилирование, нитрование, этерификация

\* 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.

\*\* 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. главу 12 «Промежуточный обмен аминокислот в тканях»). L- и D-аминокислоты различаются, кроме того, по вкусу: первые – горькие, вторые – сладкие.

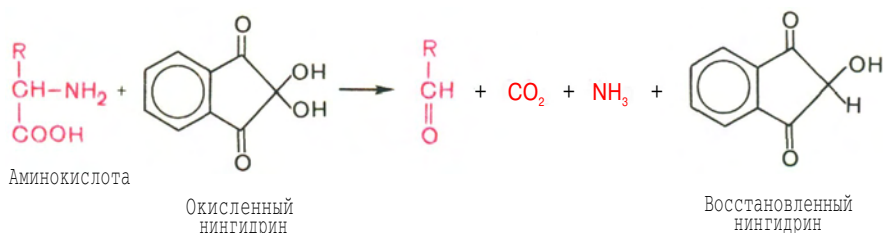


Таблица 1.4. Аминокислотный состав некоторых природных белков, в процентах

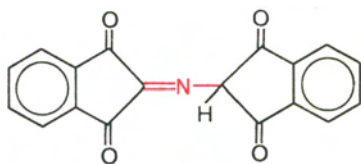
Белок	Сальмин	Гистон (печень теленка)	Казеин	Альбумин (сыворотка человека)	γ-Глобулин (человека)	Пепсин	Инсулин	Коллаген
Аминокислота								
Аланин	1,1	7,6	3,2	—	—	—	4,5	9,5
Глицин	2,9	5,8	2,0	1,6	4,2	6,4	4,3	27,2
Валин	3,1	5,5	7,2	7,7	9,7	7,1	7,7	3,4
Лейцин	0	9,1	9,2	11,0	9,3	10,4	13,2	—
Изолейцин	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 кислота	0	5,5	7,1	9,0	8,8	16,0	6,8	6,3
Глутаминовая кислота	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

и др.). Здесь будут рассмотрены общие цветные реакции для обнаружения индивидуальных аминокислот и аминокислот, входящих в состав белков, основанные на химической природе радикалов аминокислот (табл. 1.5).

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



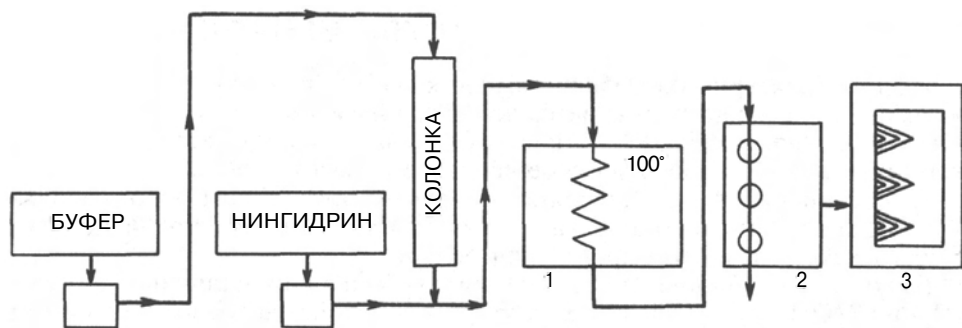
На II стадии образовавшийся аммиак реагирует с эквимольными количествами окисленного и восстановленного нингидрина, образуя синевioletовый продукт, интенсивность окраски которого (при 570 нм) пропорциональна количеству аминокислоты:



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). После разделения смеси аминокислот в колонках, заполненных специальными ионообменными смолами (сульфополистирольный катионит), 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 биологи-

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

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



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

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

ческих жидкостях и выявить наличие в них необычных азотсодержащих веществ, что имеет важное диагностическое и прогностическое значение.

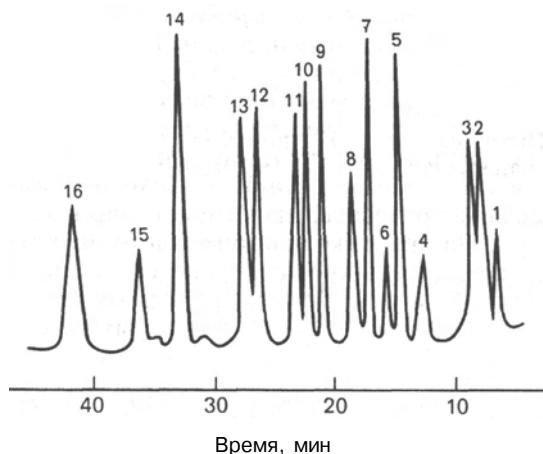
Автоматические анализаторы аминокислот все время совершенствуются, повышаются чувствительность методов и скорость проведения анализа. Так, в современных приборах высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) удастся проводить анализ гидролизата белка за 45 мин, определяя при этом концентрацию аминокислот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

Смесь аминокислот может быть успешно разделена также методом электрофореза на бумаге. При pH 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 их разделения электрофорез обычно проводят при pH 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.

**Рис. 1.8.** ВЭЖХ аминокислот по Цеху и Вольтеру. Разделение на колонке (3 x 250 мм), наполненной ионообменной смолой — полистиролдивинилбензолом. Концентрация аминокислот 500 пмоль/л, реактив для детектирования — флуорескамин, образующий с аминокислотами сильно флуоресцирующее соединение.

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



## 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 свойство, обусловленное наличием в белках ароматических аминокислот, используется для количественного определения белков).

Белки, как и аминокислоты, амфотерны благодаря наличию свободных  $\text{NH}_2$ - и  $\text{COOH}$ -групп. Для них характерны все свойства 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. Растворы белков имеют очень низкое осмотическое давление, высокую вязкость и незначительную способность 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 проникать через полупроницаемые искусственные мембраны (целлофан, пергамент, коллодий), а также биомембраны растительных и животных тканей, хотя при органических поражениях, например, почек капсула почечного клубочка (Шумлянско-Боумана) становится проницаемой для альбуминов сыворотки крови и последние 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 1000000 и выше в зависимости от количества отдельных полипептидных цепей в составе единой молекулярной структуры белка. Такие полипептидные цепи получили название субъединиц. Их мол. масса варьирует в широких пределах—от 6000 до 100000 и более.

Аминокислотный состав и последовательность аминокислот выяснены для многих тысяч белков. В связи с этим стало возможным вычисление их молекулярной массы химическим путем с высокой точностью. Однако для огромного количества встречающихся в природе белков химическое строение не выяснено, поэтому основными методами определения молекулярной массы все еще остаются физико-химические методы (гравиметрические, осмометрические, вискозиметрические, электрофоретические, оптические и др.). На практике наиболее часто используются методы седиментационного анализа, гель-хроматография и гель-электрофорез. Определение молекулярной массы белков методами седиментационного анализа проводят в ультрацентрифугах \*, в которых удается создать центробежные ускорения

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

(г), превышающие в 200000 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 (регистрируется 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;  $\omega$  – 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, 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.

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;  $\rho$  – плотность растворителя;  $\bar{v}$  – парциальный удельный объем молекулы белка;  $D$  – коэффициент диффузии.

Определение молекулярной массы белков методом ультрацентрифугирования требует много времени и сложной и дорогостоящей аппаратуры. Поэтому в последние годы разработаны два более простых метода (гель-хроматография и электрофорез). При использовании 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 логарифмом молекулярной массы белка, имеющего сферическую форму, и элюционным объемом существует прямая зависимость. Поэтому легко определить молекулярную массу исследуемого белка, зная его объем элюции. Второй разновидностью этого метода является тонкослойная гель-хроматография. Длина пробега белка (в миллиметрах)

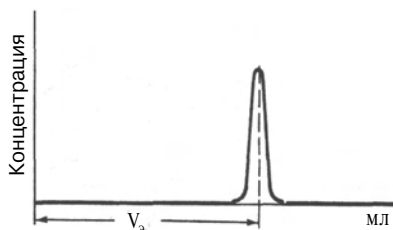


Рис. 1.9. Измерение объема элюции ( $V_0$ ).



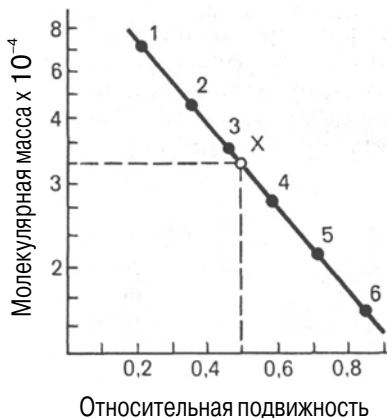
**Рис. 1.10.** Зависимость между длиной пробега белковых частиц при гель-хроматографии в тонком слое сефадекса Г-150 (сверхтонкого) и их молекулярными массами (в полулогарифмической системе координат).

1 - рибонуклеаза; 2 - химотрипсिनоген; 3 - яичный альбумин; 4 - сывороточный альбумин; 5 -  $\gamma$ -глобулин; X - белок с неизвестной молекулярной массой.

через тонкий слой сефадекса находится в логарифмической зависимости от молекулярной массы белка (рис. 1.10).

Гель-хроматография, кроме простоты и быстроты, имеет дополнительное преимущество: 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 использовании 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 подвижностью белков. Белки с четвертичной структурой при этих условиях распадаются на субъединицы, поэтому метод находит широкое применение для определения молекулярной массы субъединиц белка.



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

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

Недавно предложен новый масс-спектрометрический метод (так называемый лазерный десорбционно-ионизационный метод), позволяющий определять молекулярную массу небольших пептидов (вазопрессин, инсулин) и крупных биополимерных молекул и, кроме того, структуру биомолекул.

## **Форма белковых молекул**

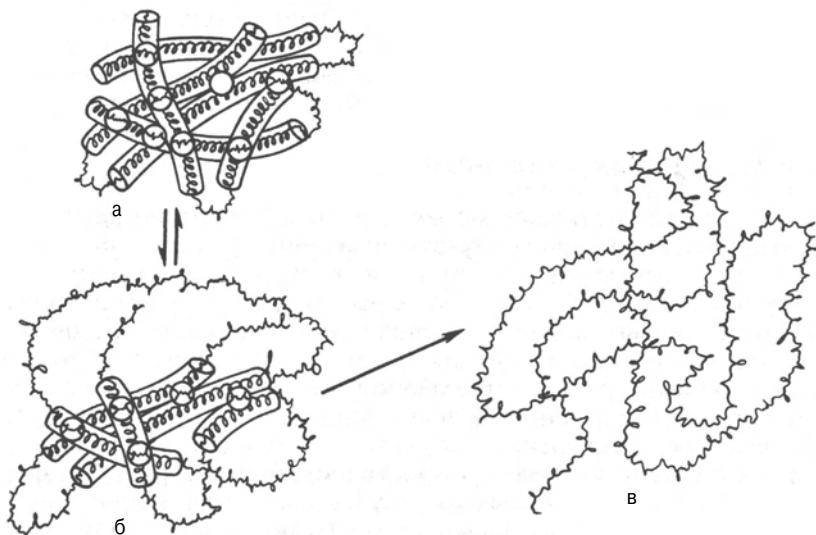
О величине и форме белковых молекул раньше судили по данным ультрацентрифугирования, двойного лучепреломления и диффузии. Эти данные указывали на существование в природе глобулярных (шарообразных) и фибриллярных (нитевидных) белков. В настоящее время общие представления о форме белковых молекул в основном подтвердились, однако только современные методы исследования позволили установить детали пространственной конфигурации (трехмерной структуры) белковых молекул. Благодаря применению сканирующей микроскопии и рентгеноструктурного анализа (высокое разрешение, порядка 0,2–0,3 нм) удалось в деталях расшифровать не только полную пространственную структуру, 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 рН 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, преимущественно ее третичной структуры, приводящее к потере характерных для нее свойств (растворимость, электрофоретическая подвижность, биологическая активность и т.д.). Большинство белков денатурирует при нагревании их растворов выше 50–60°C.

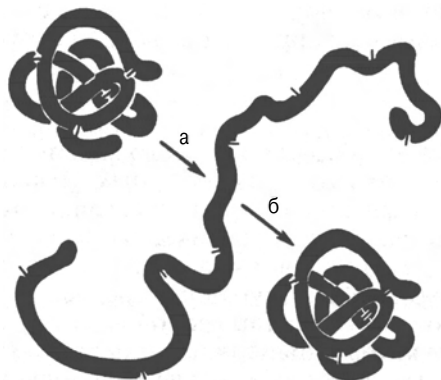
Внешние проявления денатурации сводятся к потере растворимости, особенно в изоэлектрической точке, повышению вязкости белковых растворов, увеличению количества свободных функциональных SH-групп и изменению характера рассеивания рентгеновских лучей. Наиболее характерным признаком денатурации является резкое снижение или полная потеря белком его биологической активности (каталитической, антигенной или гормональной). При денатурации белка, вызванной 8M мочевиной или другим агентом, разрушаются в основном нековалентные связи (в частности, гидрофобные взаимодействия и водородные связи). Дисульфидные связи в присутствии восстанавливающего агента меркаптоэтанола разрываются, в то время как пептидные связи самого остова полипептидной цепи не затрагиваются. В этих условиях разворачиваются глобулы нативных белковых молекул и образуются случайные и беспорядочные структуры (рис. 1.12).

При непродолжительном действии и быстром удалении денатурирующих агентов возможна ренатурация белка с полным восстановлением



**Рис. 1.12.** Денатурация белковой молекулы (схема).

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.

исходной трехмерной структуры и нативных свойств его молекулы (рис. 1.13), включая биологическую активность. Таким образом, при денатурации белковая молекула полностью теряет биологические свойства, демонстрируя тем самым тесную связь между структурой и функцией. 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 рН\*. При лиофилизации белков (высушивание в вакууме путем возгонки влаги из замороженного состояния) для предотвращения денатурации часто пользуются химическими веществами (простые сахара, глицерин, органические анионы).

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

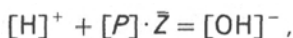


## Изоэлектрическая и изоионная точки белков

В изоэлектрической точке суммарный заряд белков, обладающих амфотерными свойствами, равен нулю и белки не перемещаются в электрическом поле. Зная аминокислотный состав белка, можно приближенно определить изоэлектрическую точку (pI); pI 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 в крайних значениях pH среды. В частности, величина pI пепсина (фермент желудочного сока) равна 1, а сальмина (основной белок из молока 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 «изоионная точка 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 его раствор пропускают через колонку, наполненную смесью анионо- и катионообменников. Изоионной точкой данного белка принято называть значение pH изоионного раствора этого белка:



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

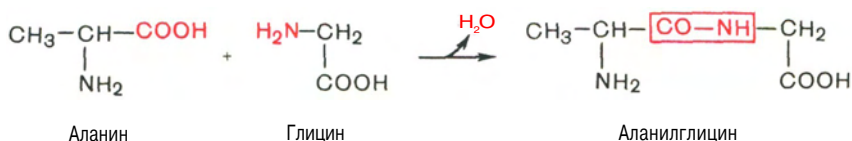
## СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВ

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 14). 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 и связей, аналогичных биурету  $NH_2-CO-NH-CO-NH_2$ . Тем самым А.Я. Данилевский первый указал на связь  $-NH-CO-$  (позднее получившую название пептидной связи) как на наиболее вероятный способ соединения аминокислот в белковой молекуле.

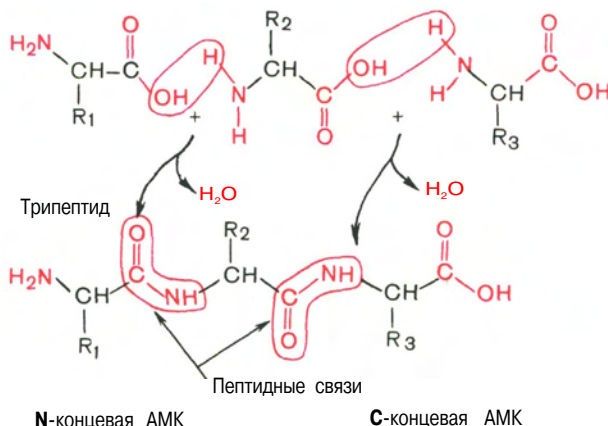
Однако только Э. Фишер (1902) сформулировал полипептидную теорию строения. Согласно этой теории, белки представляют собой сложные полипептиды, в которых отдельные аминокислоты связаны друг с другом пептидными связями, возникающими при взаимодействии  $\alpha$ -карбоксылных

COOH- и  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-групп аминокислот. На примере взаимодействия аланина и глицина образование пептидной связи и дипептида (с выделением молекулы воды) 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 NH<sub>2</sub>-группой (с окончанием -ил, типичным для ацилов), названий последующих аминокислот (также с окончаниями -ил) и полного названия С-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-Ала\*.

Образование пептидных связей, 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 NH<sub>2</sub>-групп, поскольку абсолютное их большинство находится в связанном состоянии, участвуя в образовании пептидных связей; титрованию доступны в основном свободные COOH- и NH<sub>2</sub>-группы у N- и С-концевых аминокислот пептида.

2. В процессе кислотного или щелочного гидролиза белка образуются стехиометрические количества титруемых COOH- и NH<sub>2</sub>-групп, что свидетельствует о распаде определенного числа пептидных связей.

\* Синтез полипептидов (белков) в клетках живых организмов протекает значительно сложнее с участием нуклеиновых кислот. Этот процесс детально рассматривается в главе 14.

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

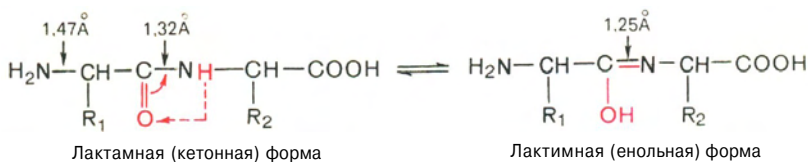
4. Биуретовую реакцию (сине-фиолетовое окрашивание в присутствии раствора сульфата меди в щелочной среде) дают как биурет, содержащий пептидную связь, так и белки, что также является доказательством наличия в белках аналогичных связей.

5. Анализ рентгенограмм кристаллов белков подтверждает полипептидную структуру белков. Таким образом, рентгеноструктурный анализ при разрешении 0,15–0,2 нм позволяет не только вычислить межатомные расстояния и размеры валентных углов между атомами С, Н, О и N, но и «увидеть» картину общего 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 – 129 аминокислотных остатков, рибонуклеазы – 124 аминокислотных остатка\*. Синтезированные белки обладали аналогичными природным белкам физико-химическими свойствами и биологической активностью.

Полипептидная теория строения не отрицает существования в молекуле белка и других связей, включая ковалентные (например, дисульфидные –S–S–связи) и нековалентные (например, водородные связи и др.). Они будут рассмотрены далее.

Пептидные связи играют исключительную роль как в «архитектуре», так и в функции белков. Поэтому следует указать на некоторые особенности строения полипептидной цепи. Во-первых, это своеобразие 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 своеобразие пептидной связи. Расстояние между атомами С и N в пептидной связи (равное 0,132 нм) является промежуточным между простой (ординарной) связью (связь –C–N–, равная 0,147 нм) и двойной связью (связь –C=N–, равная 0,125 нм). Это создает предпосылки для осуществления по месту двойной связи таутомерных перегруппировок и для образования енольной (лактимной) формы. Последняя в свою очередь дает молекуле белка ряд преимуществ (повышение реакционной способности, возникновение дополнительных возможностей вращения и др.):



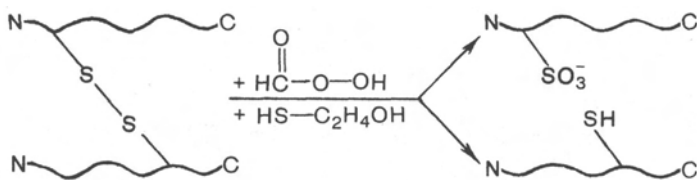
\* Полный синтез рибонуклеазы осуществлен одновременно и независимо друг от друга Б. Меррифилдом и Р. Хиршманом. Этот метод реализован в автоматическом синтезаторе пептидов.

Наконец, следует указать на своеобразии радикалов, которые являются полифункциональными, несущими свободные  $\text{NH}_2$ -,  $\text{COOH}$ -,  $\text{OH}$ -,  $\text{SH}$ -группы и, как было указано, определяют структуру (пространственную) и многообразие функций молекул белка. Взаимодействуя с окружающими молекулами растворителя ( $\text{H}_2\text{O}$ ), функциональные группы (в частности,  $\text{NH}_2$ - и  $\text{COOH}$ -группы) ионизируются, что приводит к образованию анионных и катионных центров белковой молекулы. В зависимости от соотношения ионов молекулы белка получают суммарный положительный (+) или отрицательный (-) заряд с определенным значением изоэлектрической точки.

Получены доказательства предположения К. Линдерстрёма-Ланга о существовании 4 уровней структурной организации белковой молекулы: первичной, вторичной, третичной и четвертичной структуры. Техника современной белковой химии разработана настолько хорошо, что позволяет в принципе расшифровать структурную организацию любого белка.

## Первичная структура белка

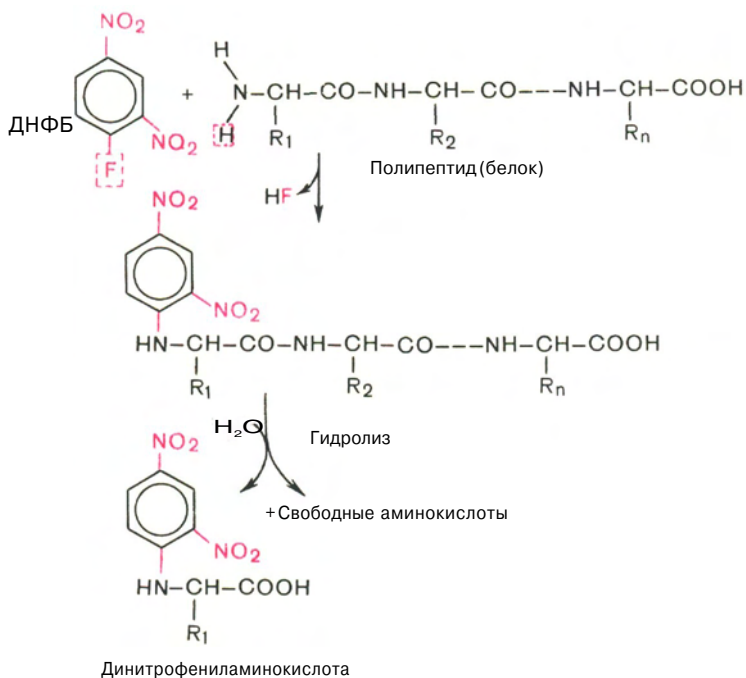
К настоящему времени расшифрована первичная структура десятков тысяч разных белков, что является несомненным достижением биохимии. Однако это число ничтожно мало, если учесть, что в природе около  $10^{12}$  разнообразных белков. Под первичной структурой подразумевают порядок, последовательность расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Зная первичную структуру, местоположение каждого остатка аминокислоты, можно точно написать структурную формулу белковой молекулы, если она представлена одной полипептидной цепью. Если в состав белка входит несколько полипептидных цепей, объединенных в одну белковую молекулу посредством дисульфидных связей и нековалентных взаимодействий, или если одна полипептидная цепь содержит внутренние дисульфидные связи, то задача определения первичной структуры несколько осложняется, так как необходимо предварительное разъединение этих цепей и связей. Разъединение таких полипептидных цепей производят с помощью денатурирующих агентов (растворы 8М мочевины или 6М гуанидингидрохлорида), разрывающих нековалентные связи. Дисульфидные связи разрушают путем окисления или восстановления (надмуравьиной кислотой или  $\beta$ -меркаптоэтанолом соответственно), при этом образуются свободные полипептиды, содержащие или остатки цистеиновой кислоты, или цистеина:



Для определения первичной структуры отдельной, химически гомогенной полипептидной цепи в первую очередь методами гидролиза выясняют аминокислотный состав, точнее, соотношение каждой из 20 аминокислот в образце гомогенного полипептида. Затем приступают к определению химической природы концевых аминокислот полипептидной цепи, содержащей одну свободную  $\text{NH}_2$ -группу и одну свободную  $\text{COOH}$ -группу.

## Методы определения N-концевой аминокислоты

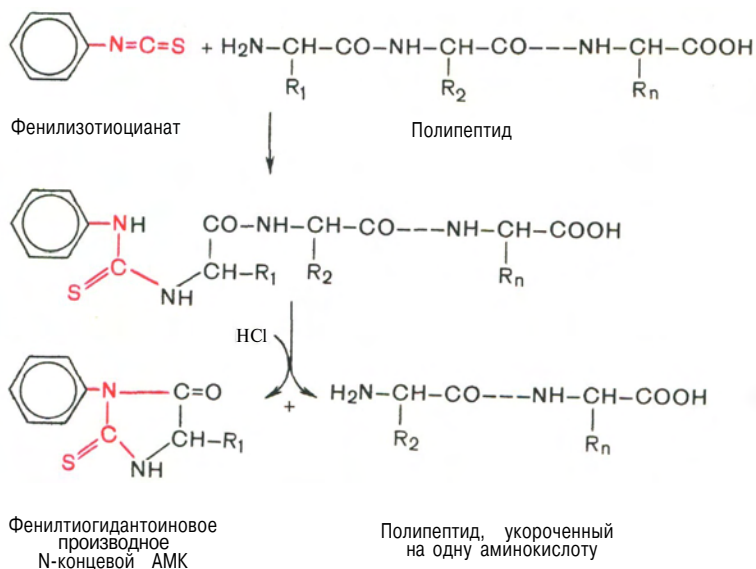
Для определения природы N-концевой аминокислоты предложен ряд методов, в частности метод Сэнджера (F. Sanger), основанный на реакции арирования полипептида 2,4-динитрофторбензолом (ДНФБ), что приводит к образованию окрашенного в желтый цвет 2,4-динитрофенильного производного N-концевой аминокислоты \*. Раствор полипептида обрабатывают ДНФБ, который взаимодействует со свободной  $\text{NH}_2$ -группой N-концевой аминокислоты пептида.



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

Для определения N-концевой аминокислоты значительно более широко применяется фенилтиогидаптоиновый метод Эдмана благодаря своей высокой чувствительности и возможности многократного использования в одной и той же пробе. Фенилтиоцианат реагирует со свободной  $\alpha$ - $\text{NH}_2$ -группой N-концевой аминокислоты полипептида с образованием фенилтиокарбамоилпептида.

\* За разработку этого метода Ф. Сэнджер 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. Укороченный на одну аминокислоту полипептид подвергают дальнейшему анализу.

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, 1-диметиламинонафтил-5-сульфонилхлорид — дансилхлорид и дабсилхлорид. Для этих же целей иногда применяют ферменты экзопептидазы, в частности аланин- и лейцинаминопептидазу. Эти ферменты разрывают пептидные связи с того конца полипептида, где имеется свободная  $\text{NH}_2$ -группа, освобождая N-концевую аминокислоту (механизм действия экзопептидаз см. в главе 12).

## Методы определения C-концевой аминокислоты

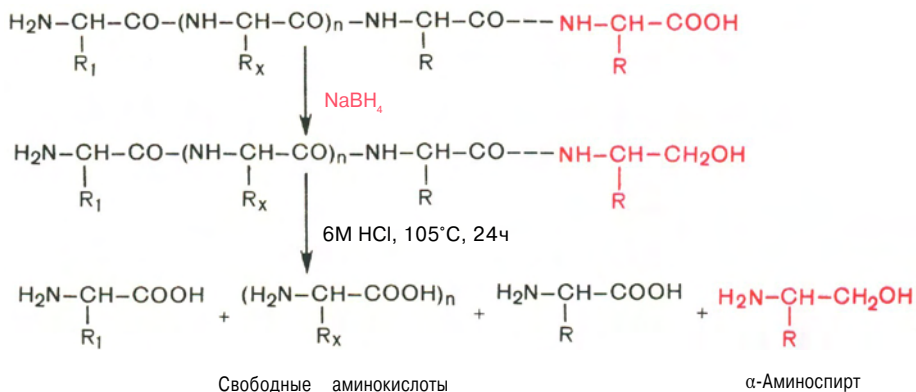
Для определения природы C-концевой аминокислоты часто используют ферментативные методы. Обработка полипептида карбоксипептидазой, которая разрывает пептидную связь с того конца пептида, где содержится свободная  $\text{COOH}$ -группа, приводит к освобождению C-концевой аминокислоты, природа которой может 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 С-концевой аминокислоты, поскольку ее карбоксильная группа не участвует в образовании пептидной связи. При этом образуется смесь аминоацилгидразинов и свободной С-концевой аминокислоты. Последнюю после обработки всей смеси ДНФБ отделяют и идентифицируют хроматографически, для чего образовавшиеся динитрофенилпроизводные аминоацилгидразинов предварительно экстрагируют уксусно-этиловым 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  $\alpha$ -аминоспирт, легко идентифицируемый методом хроматографии. Таким образом, при помощи указанных методов определяют природу N- и С-концевых аминокислот.

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 пептидные фрагменты, последовательность аминокислот в которых может быть точно определена описанными ранее методами.

Химические методы избирательного и неполного гидролиза основаны на применении таких химических реактивов, которые вызывают селективный, высокоспецифический разрыв пептидных связей, образованных определенными аминокислотами, оставляя незатронутыми остальные пептидные связи. К этим избирательно гидролизующим веществам относятся цианогенбромид, CNBr (по остаткам метионина), гидроксиламин (по связям между остатками аспарагиновой кислоты и глицина), N-бромсукцина-

мид (по остаткам триптофана). Метионина в составе белков содержится обычно меньше, чем других аминокислот, поэтому обработка CNBr предпочтительнее, так как при этом образуется небольшое число пептидов, первичную структуру которых определяют с помощью рассмотренных ранее методов, всякий раз начиная с определения природы N- и C-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 неполного гидролиза белков. 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 определяют 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 «метод отпечатков пальцев», используется при определении сходства или различия гомологичных 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 с помощью хроматографии в одном направлении и электрофореза — в другом, под углом  $90^\circ$  от первого (пептидная карта).

Дальнейшие задачи — установление последовательности расположения аминокислот в каждом из выделенных пептидов (фенилтиогиогидантоиновым или другими методами), сопоставление полученных данных и установление первичной структуры всей молекулы.

Возможность применения рентгеноструктурного анализа для определения последовательности аминокислот в белковой молекуле была рассмотрена ранее. Следует отметить совершенно новый подход к решению этой важной проблемы — определение последовательности аминокислот в белковой молекуле с использованием данных о комплементарной нуклеотидной последовательности ДНК. Этому способствуют как методы быстрого секвенирования ДНК, так и техника изолирования и доступности самого гена\*.

В настоящее время выяснение первичной структуры белков является вопросом времени и технического оснащения лабораторий. Полностью выяснена первичная структура многих природных белков и прежде всего инсулина, содержащего 51 аминокислотный остаток [Сэнджер Ф., 1954]. Более крупным белком с выясненной первичной структурой оказался иммуноглобулин, в четырех полипептидных цепях которого насчитывается 1300 аминокислотных остатков. За эту работу Дж. Эдельман и Р. Портер были удостоены Нобелевской премии (1972).

\* Описана первичная структура многих белков и ферментов, в частности репликазы фага MS2 (544 аминокислотных остатка), установленная этим методическим приемом.



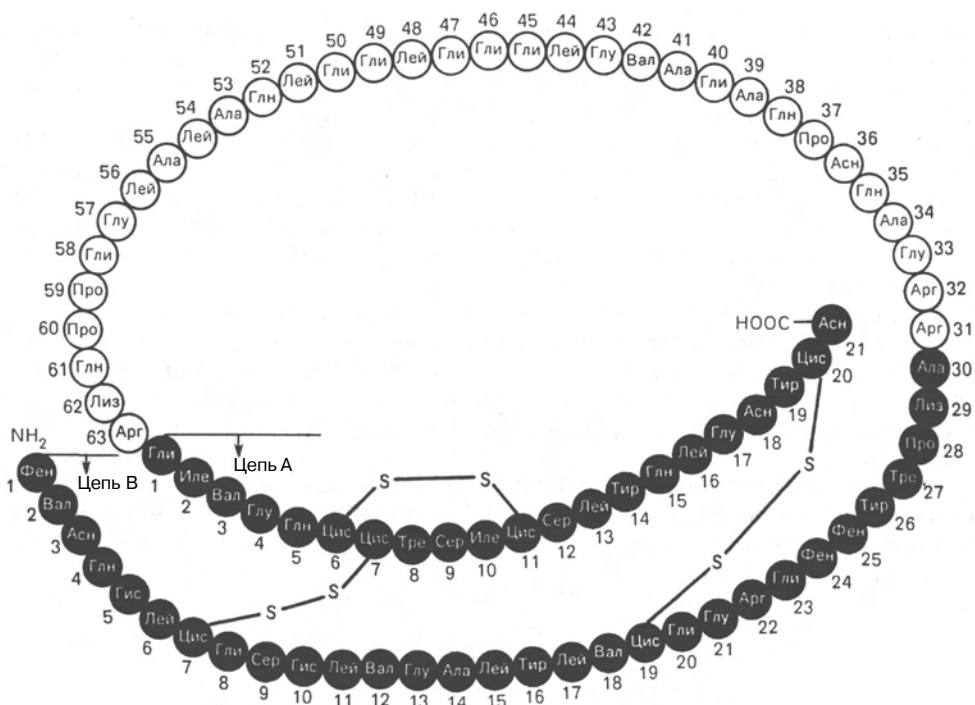
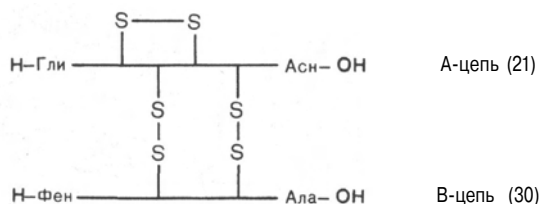


Рис. 1.14. Структура проинсулина.

Расшифрованы первичные структуры миоглобина человека (153 аминокислотных остатка),  $\alpha$ -цепи (141) и  $\beta$ -цепи (146) гемоглобина человека, цитохрома С 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 инсули-

нов, 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.

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 С-концевым валином, между остатками цистеина образуются дисульфидные (—S—S—) связи в 4 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 С-концевым лейцином.

Отечественными исследователями установлена первичная структура многих белков и полипептидов, в том числе крупного белка РНК-полимеразы (в частности, последовательности ее β- и β<sup>1</sup>-субъединиц, 1342 и 1407

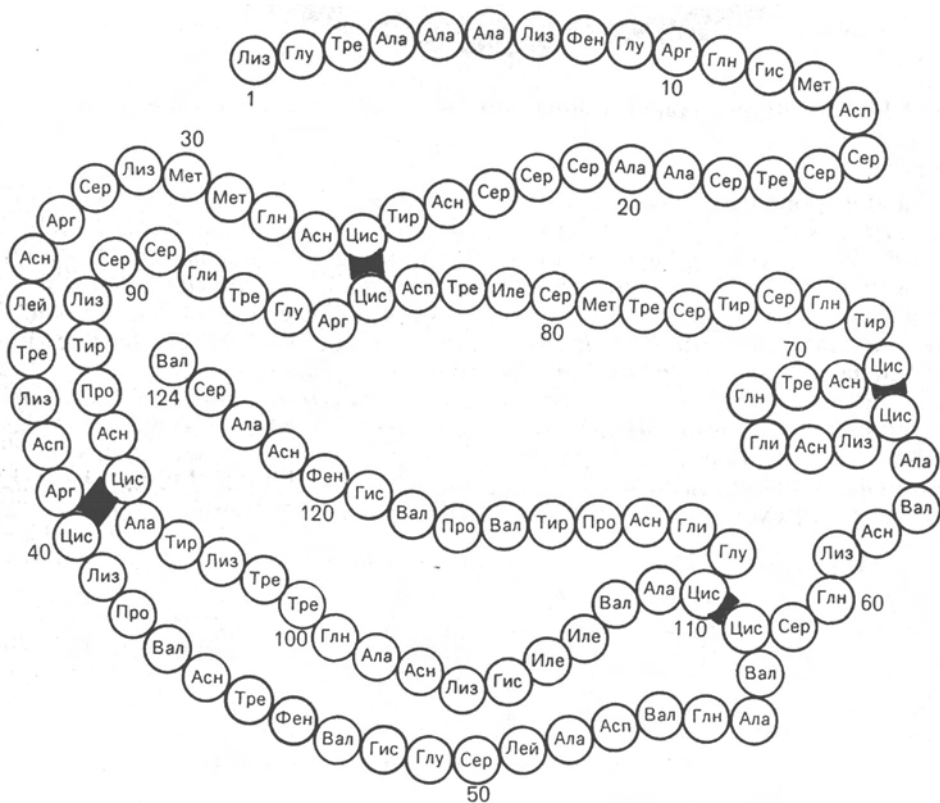
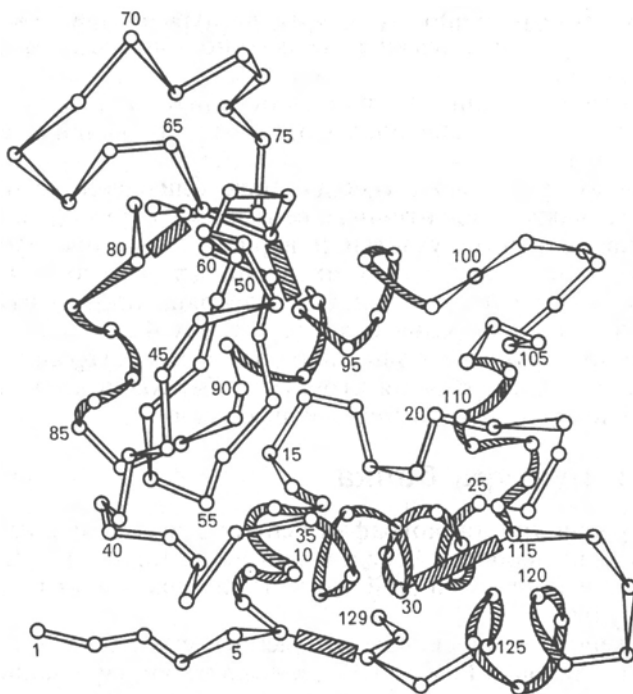


Рис. 1.15. Первичная структура РНКазы. Цветом выделены четыре дисульфидные связи.



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

аминокислотных остатков соответственно \* фактора элонгации G из *E.coli* (701 аминокислота) (Ю.А. Овчинников и др.), фермента аспаратамино-трансферазы, 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.), L-липотропина и лактогенного гормона быка (Н.А. Юдаев, Ю.А. Панков) и др.

Исследования первичной структуры  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей гемоглобина способствовали выяснению структуры необычных, так называемых аномальных, гемоглобинов, встречающихся в крови больных гемоглинопатиями. Иногда развитие болезни, как и изменение пространственной структуры гемоглобина человека, обусловлено заменой лишь одной какой-либо аминокислоты в структуре  $\beta$ -цепей (реже  $\alpha$ -цепей) гемоглобина (см. главу 2).

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

1. Первичная структура белков уникальна и детерминирована генетически. Каждый индивидуальный гомогенный белок характеризуется уникальной последовательностью аминокислот: частота замены аминокислот приводит не только к структурным перестройкам, но и к изменениям физико-химических свойств и биологических функций.

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

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

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

4. В некоторых ферментах, обладающих близкими каталитическими свойствами, встречаются идентичные пептидные структуры, содержащие неизменные (инвариантные) участки и вариабельные последовательности аминокислот, особенно в областях их активных центров. Этот принцип структурного подобия наиболее типичен для ряда протеолитических ферментов: трипсина, химотрипсина и др. (см. главу 4).

5. В первичной структуре полипептидной цепи детерминированы вторичная, третичная и четвертичная структуры белковой молекулы, определяющие ее общую пространственную конформацию.

## Вторичная структура белка

Рентгеноструктурная кристаллография решает две главные проблемы белковой химии: закономерности чередования последовательности аминокислотных остатков в полипептидной цепи и закономерности конфигурации белковой молекулы.

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

Под вторичной структурой белка подразумевают конфигурацию полипептидной цепи, т. е. способ свертывания, скручивания (складывание, упаковка) 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:  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структуры.

Благодаря исследованиям Л. Полинга\* наиболее вероятным типом строения глобулярных белков принято считать  $\alpha$ -спираль (рис. 1.17). Закручивание полипептидной цепи происходит по часовой стрелке (правый ход спирали), что обусловлено L-аминокислотным составом природных белков. Движущей силой в возникновении  $\alpha$ -спиралей (так же как и  $\beta$ -структур) является способность аминокислот к образованию водородных связей. В структуре  $\alpha$ -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  $26^\circ$ , через 5 витков спирали (18 аминокислотных остатков) структурная конфигурация полипептидной цепи повторяется. Это означает, что период повторяемости (или идентичности)  $\alpha$ -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

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

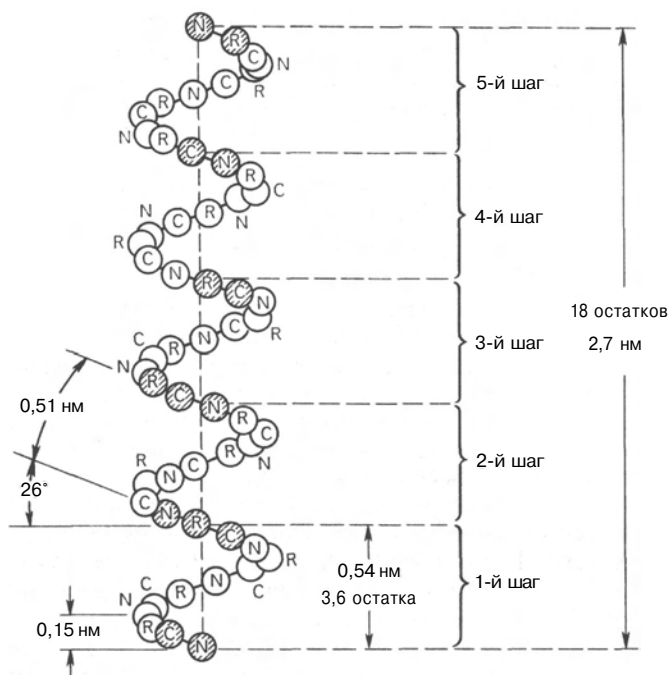


Рис. 1.17. Структура и параметры  $\alpha$ -спирали.

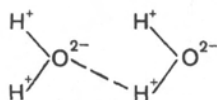
последнего находится в прямой зависимости от степени спирализации белковой молекулы. Не все глобулярные белки спирализованы на всем протяжении полипептидной цепи. В молекуле белка  $\alpha$ -спиральные участки чередуются с линейными. В частности, если  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи гемоглобина спирализованы, например, на 75%, то лизоцима — на 42%, а пепсина — всего на 30%.

Таким образом, стабильность вторичной структуры обеспечивается в основном водородными связями (определенный вклад вносят и главное-валентные связи — пептидные и дисульфидные).

Водородная связь представляет собой слабое электростатическое притяжение (взаимодействие, связь) между одним электроотрицательным атомом (например, кислородом или азотом) и водородным атомом, ковалентно связанным со вторым электроотрицательным атомом. Типы водородных связей представлены далее.

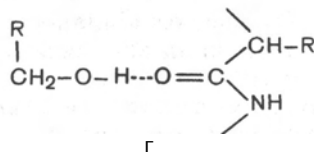
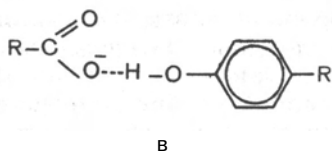
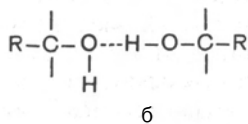
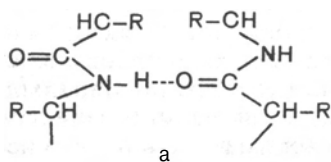
По современным представлениям, водородная связь включает не только электростатические силы притяжения между полярными группами (взаимодействие атомов водорода с электроотрицательными элементами: кислородом, азотом, хлором), но и электронные связи такого же типа, как в ряде комплексных соединений. Водородные 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. Поскольку в белковой молекуле число водородных связей очень велико (в образование водородных связей вовлечены все пептидные группы), они в сумме обеспечивают скручивание полипептидной цепи в спиральную структуру, сообщая ей компактность и стабильность.

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 приходится на атомы водорода, а избыток отрицательных — на атомы кислорода.



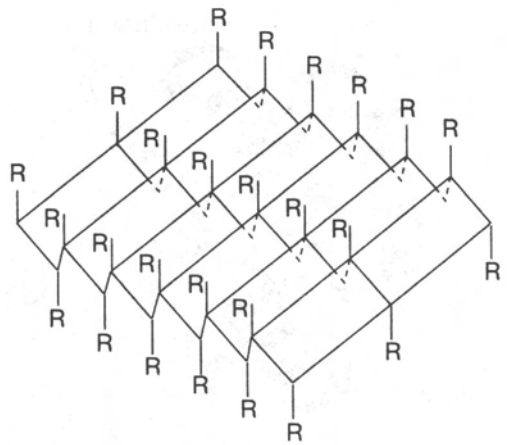
Благодаря особенностям строения атома водорода при достаточном сближении двух молекул воды возникает электростатическое взаимодействие между атомом кислорода одной молекулы и атомом водорода второй молекулы воды. Следствием этого является ослабление связи между атомом водорода и кислорода в каждой молекуле 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: а) между пептидными цепями; б) между двумя гидроксильными группами; в) между ионизированной СООН-группой и ОН-группой тирозина; г) между ОН-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<sub>2</sub>O, в которой вместо обычного водорода содержится его тяжелый изотоп дейтерий).

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



**Рис. 1.18.**  $\beta$ -Структура полипептидных цепей.

В природе существуют белки, строение которых, однако, не соответствует ни  $\beta$ -, ни  $\alpha$ -структуре. Типичным примером таких белков является коллаген — фибриллярный белок, составляющий основную массу соединительной ткани в организме человека и животных (см. главу 21).

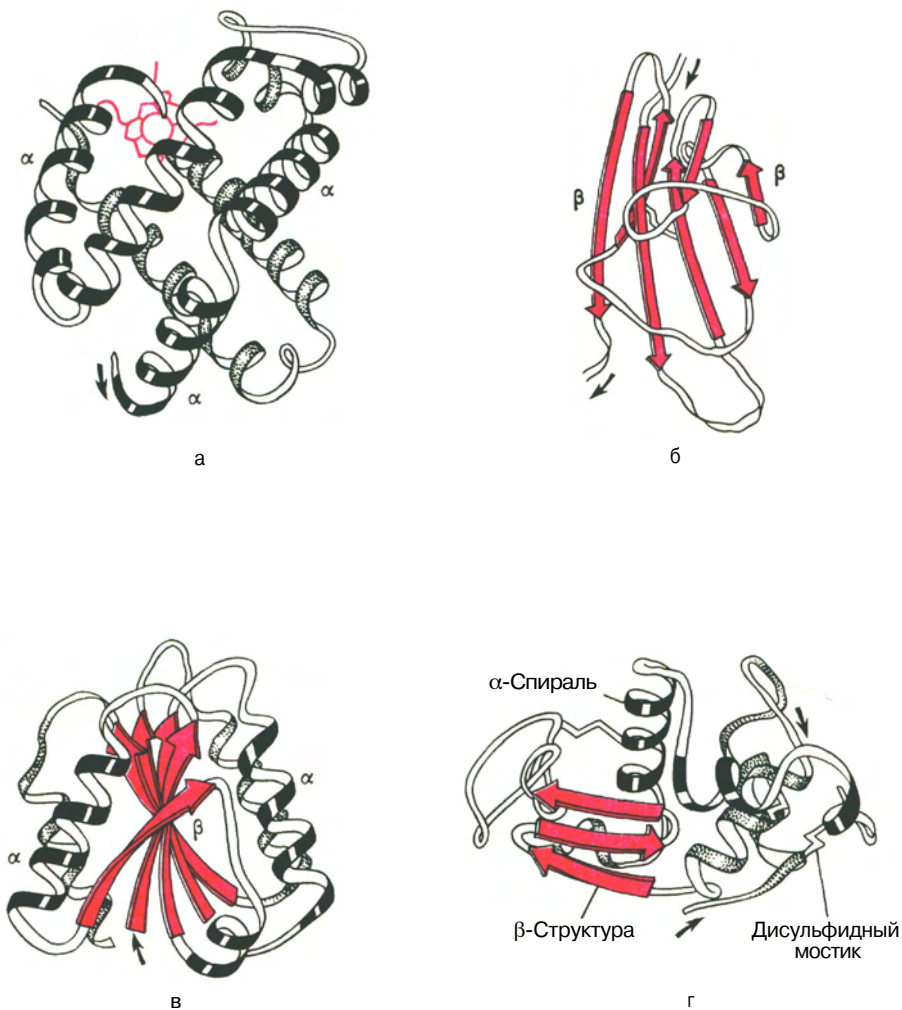
Методами рентгеноструктурного анализа в настоящее время доказано существование еще двух уровней структурной организации белковой молекулы, оказавшихся промежуточными между вторичной и третичной структурами. Это так называемые надвторичные структуры и структурные домены.

Надвторичные структуры 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 (представлены двумя параллельными  $\beta$ -цепями, связанными сегментом  $\alpha$ ),  $\beta\alpha\beta\beta$ -элементы (представлены двумя сегментами  $\alpha$ -спирали, вставленными между тремя параллельными  $\beta$ -цепями) и др. В больших 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 дубликации генов — во втором. Домены создаются объединением и чередованием  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев, между которыми открываются более рыхлые структуры (рис. 1.19).

Домен — это компактная глобулярная структурная единица внутри полипептидной цепи. Домены могут выполнять разные функции и подвергаться складыванию (свертыванию) в независимые компактные глобулярные структурные единицы, соединенные между собой гибкими участками внутри белковой молекулы. Открыто много белков (например, иммуноглобулины), состоящих из разных по структуре и функциям доменов, кодируемых разными генами.

## 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

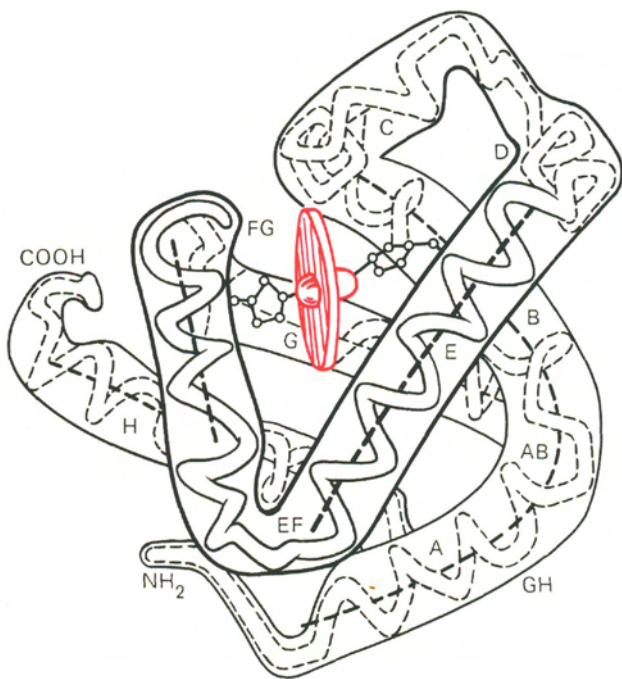


**Рис. 1.19.** Доменное строение глобулярных белков (по А. А. Болдыреву).

а -  $\beta$ -субъединица гемоглобина; б - константный домен иммуноглобулина; в - флаводоксин; г - лизоцим куриного яйца.

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. Как было отмечено, метод успешно решает две главные проблемы химии белков: закономерность последовательностей аминокислотных остатков в полипептиде и закономерность конфигурации молекулы белка. 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





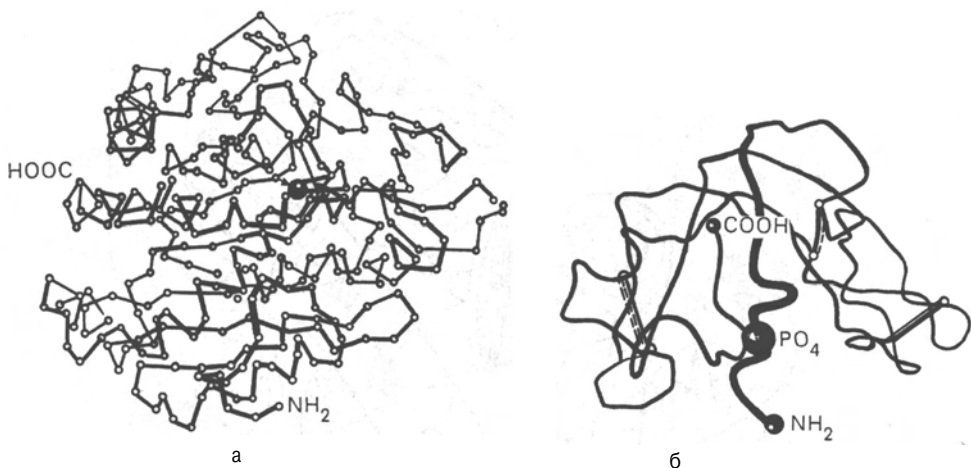
**Рис. 1.20.** Модель третичной структуры молекулы миоглобина (по Дж. Кендрью). Латинскими буквами обозначены структурные домены, красным цветом — гем.

(последние благодаря своей высокой электронной плотности используются в качестве точек отсчета при математической обработке рентгенограмм).

Первым белком, третичная структура которого была выяснена Дж. Кендрью на основании рентгеноструктурного анализа, оказался миоглобин кашалота. Это сравнительно небольшой белок с мол. м. 16700, содержащий 153 аминокислотных остатка (полностью выяснена первичная структура), представленный одной полипептидной цепью. Основная функция миоглобина — перенос кислорода в мышцах. Полипептидная цепь миоглобина (рис. 1.20) представлена в виде изогнутой трубки, компактно уложенной вокруг гема (небелковый компонент, содержащий железо; см. главу 2).

На протяжении последних десятилетий в связи с повышением разрешающей способности рентгеноструктурного метода была расшифрована третичная структура более 1000 белков, в том числе гемоглобина, пепсина, химотрипсина, рибонуклеазы, лизоцима, трипсина и его ингибитора, ряда фрагментов иммуноглобулинов человека, цитохрома С, карбоангидразы человека, аспаратаминотрансферазы, инсулина и др. Примеры трехмерной структуры некоторых из них представлены на рис. 1.21.

Рентгеноструктурный анализ позволяет определить конформацию и ход полипептидной цепи в пространстве, поэтому 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



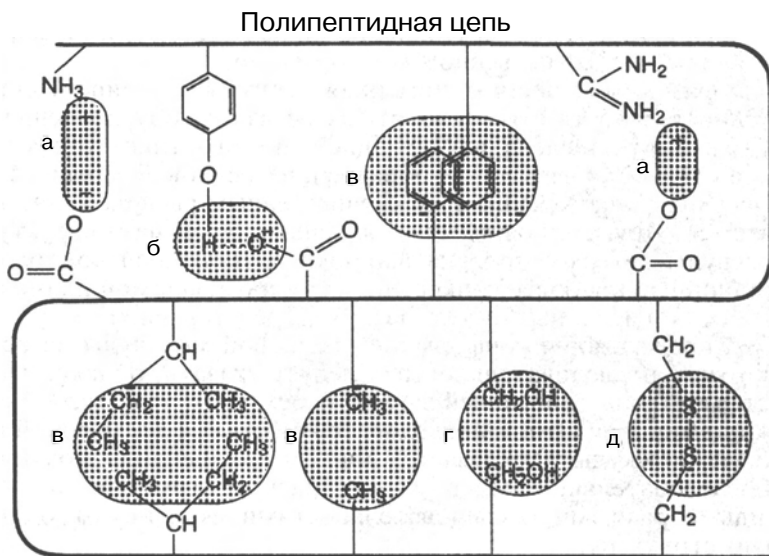
**Рис. 1.21.** Пространственная конфигурация карбоксипептидазы (а) и рибонуклеазы (б).

позволили расшифровать кристаллическую структуру более 100 ферментов. Для выяснения трехмерной структуры белков в последнее время успешно применяются также методы низкотемпературной вычислительной техники, а также математические и компьютерные методы определения объемной структуры на основании данных последовательностей аминокислот.

В настоящее время получены бесспорные доказательства, что в стабилизации пространственной структуры белков, помимо ковалентных связей (пептидные и дисульфидные связи), основную роль играют так называемые нековалентные связи (рис. 1.22). 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.

По современным представлениям, третичная структура белка после завершения его синтеза в рибосомах (см. главу 14) формируется совершенно автоматически, самопроизвольно 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 стабильная конформация\* молекулы. В такой форме белковая молекула характеризуется минимальной свободной энергией. Молекулы белков в водных растворах обычно принимают ряд стабильных конформаций, индуцируемых не только изменениями рН и температуры, но и низкомолекулярными соединениями. Различают две основные формы конформаций: Т-форму (от англ. tensed—напряженная) и R-форму (от англ. relaxed—рас-

\* Конформацией принято называть пространственное расположение атомов в молекуле белка. Этот термин означает структурное состояние молекулы белка, которое может переходить без разрыва ковалентных связей в другое структурное состояние, вызванное, например, вращением вокруг единственной связи.



**Рис. 1.22.** 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.

слабленная). Между этими формами осуществляются переходы, соответственно отражающиеся в биологических свойствах.

В процессе укладки синтезированной полипептидной цепи, получившем название фолдинга – формирование нативной пространственной структуры, в клетках происходит отбор из множества стерически возможных состояний одной-единственной стабильной и биологически активной конформации, определяемой, вероятнее всего, первичной структурой. Описан ряд наследственных заболеваний человека, развитие которых связывают с нарушением вследствие мутаций процесса фолдинга (пигментозы, фиброзы и др.). Поэтому в настоящее время пристальное внимание исследователей приковано к выяснению зависимости между аминокислотной последовательностью синтезированной в клетке полипептидной цепи (первичная структура) и формированием пространственной трехмерной структуры, обеспечивающей белковой молекуле ее нативные свойства. Имеется немало экспериментальных доказательств, что этот процесс не является автоматическим, как предполагалось ранее, и, вероятнее всего, регулируется и контролируется также внутриклеточными молекулярными механизмами, детали которых пока полностью не раскрыты. Из клеток выделено несколько классов белков, названных шаперонами, или белками теплового шока, которые располагаются между N-концевым сигнальным пептидом и матричным белком. Предполагается, что основными функциями шаперонов являются способность предотвращать образование из полипептидной цепи неспецифических (хаотичных) беспорядочных клубков, или агрегатов белков, и обеспечение доставки (транспорта) их к субклеточным мишеням, создавая условия для завершения свертывания белковой молекулы. Эти результаты наводят на мысль о возможности существования «второй половины генетического кода», определяя тем самым повышенный интерес

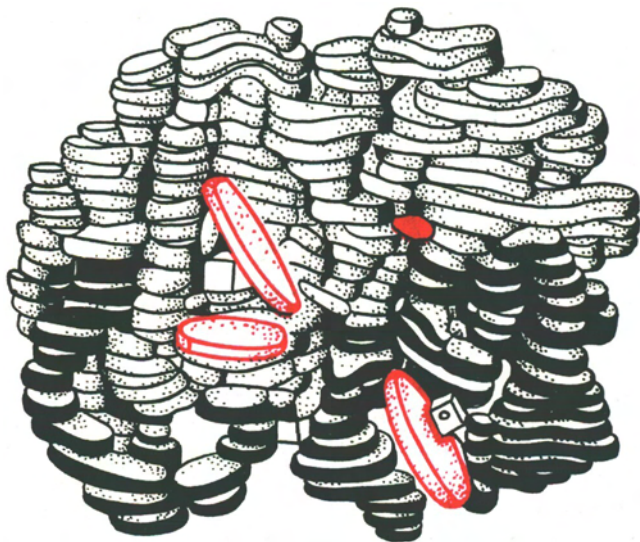
исследователей к проблеме свертывания полипептидной цепи и формирования ее нативной пространственной конформации.

Таким образом, линейная одномерная структура полипептидной цепи (т.е. последовательность аминокислотных остатков, обусловленная кодом белкового синтеза) наделяет информацией другого типа—конформационной, которая представляет 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. Следует указать, однако, что до сих пор представляется интригующей загадкой механизм этой тесной и тонкой связи между аминокислотной последовательностью и трехмерной структурой белковой молекулы. Оказывается, иногда полипептиды почти с одинаковыми последовательностями образуют разные структуры и, наоборот, полипептиды с разными последовательностями формируют одинаковую трехмерную структуру.

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 далее, все биологические свойства белков (каталитические, гормональные, антигенные и др.) связаны с сохранностью их третичной структуры, которую принято называть нативной конформацией. Любые воздействия (термические, физические, 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 или третичной структурой, и формирование единого в структурном и функциональном отношениях 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, мономера или субъединицы, чаще всего не обладает биологической активностью. Эту способность белок приобретает при определенном способе пространственного объединения входящих в его состав протомеров, т.е. возникает новое качество, не свойственное мономерному белку. Образовавшуюся молекулу принято называть олигомером (или мультимером). Олигомерные белки чаще построены из четного числа протомеров (от 2 до 4, реже от 6 до 8) с одинаковыми или разными молекулярными массами—от нескольких тысяч до сотен тысяч. В частности, молекула гемоглобина состоит из двух одинаковых  $\alpha$ - и двух  $\beta$ -полипептидных цепей, т.е. представляет собой тетрамер. На рис. 1.23 представлена структура молекулы гемоглобина, а на рис. 1.24 хорошо видно, что молекула гемоглобина содержит четыре полипептидные цепи,

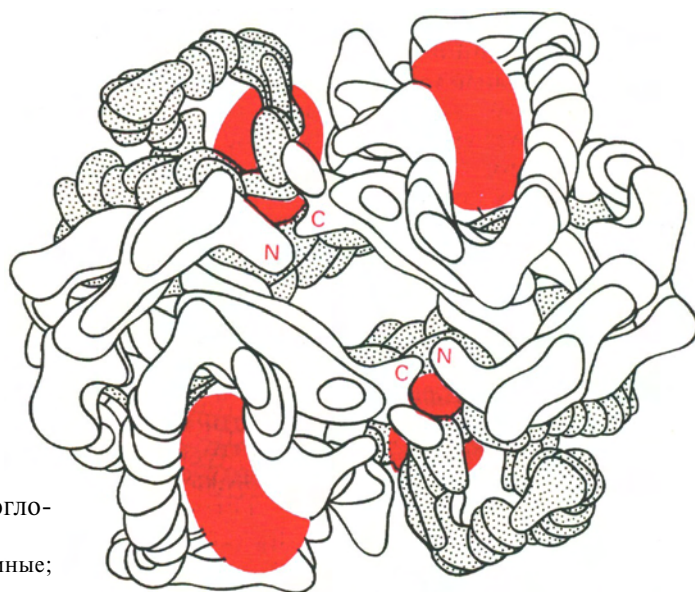


**Рис. 1.23.** Олигомерная молекула гемоглобина (красные диски—группы гема).

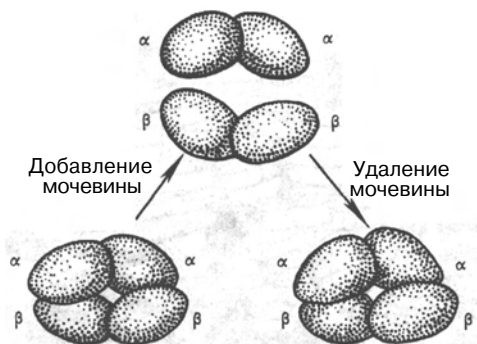
каждая из которых окружает группу гема – пигмента, придающего крови ее характерный красный цвет (см. главу 2).

В определенных условиях (присутствие солей, 8М мочевины или резкие изменения pH) молекула гемоглобина обратимо диссоциирует на две  $\alpha$ - и две  $\beta$ -цепи. Эта диссоциация обусловлена разрывом водородных связей. После удаления солей или мочевины происходит автоматическая ассоциация исходной молекулы гемоглобина (рис. 1.25).

Классическим примером олигомерной молекулы, или надмолекулярной структуры, является вирус табачной мозаики, представляющий собой гигантскую молекулу с мол. м. около  $40 \cdot 10^6$ . Он состоит из одной молекулы



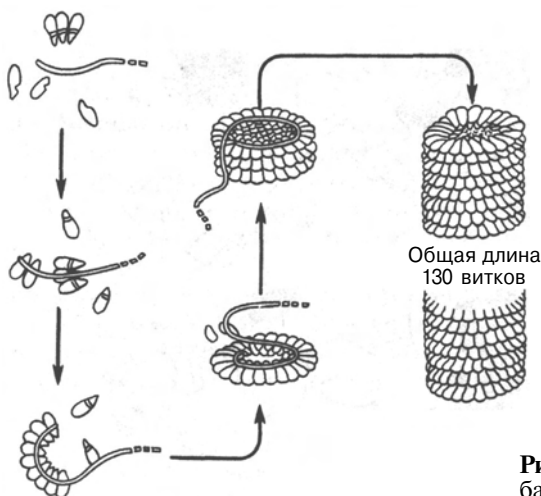
**Рис. 1.24.** Модель гемоглобина (по Перутцу).  
 $\alpha$ -Цепи светлые;  $\beta$ -цепи темные; группы гема красные.



**Рис. 1.25.** Обратимая диссоциация молекулы гемоглобина.

РНК (см. главу 3) и 2130 белковых субъединиц, масса каждой из которых составляет 17500. Длина вируса примерно 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. 1.26). Удивительной особенностью вируса является то, что после разъединения соответствующими приемами (добавление детергента) РНК и белковых субъединиц и последующего их смешивания (с предварительным удалением детергента) наблюдаются 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 фосфорилаза *a*, состоящая из двух идентичных субъединиц, в каждой из которых по две пептидные цепи. Вся молекула фосфорилазы *a*, таким образом, представляет собой тетрамер. Отдельные субъединицы чаще всего не обладают каталитической активностью; вообще регуляторные ферменты



**Рис. 1.26.** Самосборка вируса табачной мозаики.

(см. главу 4) имеют четвертичную олигомерную структуру. Они наделены функцией обеспечения в клетке требуемых скоростей химических реакций.

Наиболее изученным олигомерным 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 4 субъединиц. Этот фермент благодаря различным сочетаниям субъединиц может существовать в 5 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 структура\*. 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. Структура белка после его синтеза в рибосоме может частично подвергаться модификации (посттрансляционный процессинг): например, при превращении предшественников ряда ферментов или гормонов (инсулин).

Таким образом, имеются все основания для подтверждения мнения о существовании 4 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.

Некоторые исследователи склонны рассматривать, и не без основания, существование пятого уровня структурной организации белков. Речь идет о полифункциональных макромолекулярных комплексах, или ассоциатах из разных ферментов, получивших название метаболических олигомеров, или метаболонов, и катализирующих весь путь превращений субстрата (синтазы высших жирных кислот, пируватдегидрогеназный комплекс, дыхательная цепь).

## **КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ**

В настоящее время еще не разработана стройная система номенклатуры и классификации белков. Традиционная классификация белков по группам, основанная, скорее, на случайных показателях (физико-химические свойства, форма молекул, локализация и происхождение, аминокислотный состав), уже не отвечает полностью возросшему уровню знаний о их структуре и функциях. Из огромного количества природных белков структура и функции расшифрованы для относительно небольшого числа (не более нескольких сотен), и поэтому структура и функции белков пока не могут служить основой для их рациональной классификации. Пожалуй, только для одной группы белков, обладающих способностью катализиро-

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

вать 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 3000). Тем не менее функциональный принцип, рекомендуемый некоторыми авторами, хотя и не может служить универсальной основой для классификации всех белков, представляет определенный интерес. В соответствии с функциональным принципом различают 12 главных классов белков: 1) каталитически активные белки (ферменты); 2) белки-гормоны (хотя есть и стероидные гормоны); 3) белки-регуляторы активности генома; 4) защитные белки (антитела, белки свертывающей и антисвертывающей систем крови); 5) токсические белки; 6) транспортные белки; 7) мембранные белки; 8) сократительные белки; 9) рецепторные белки; 10) белки-ингибиторы ферментов; 11) белки вирусной оболочки; 12) белки с иными функциями.

Были предприняты также попытки классифицировать белки, исходя из особенностей вторичной и третичной структуры. В соответствии с этим различают  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\alpha\beta$ - и  $\alpha/\beta$ -белки.  $\alpha$ -Белки содержат только  $\alpha$ -спирали (не менее 60%),  $\beta$ -белки – только  $\beta$ -структуры (не менее двух антипараллельных цепей),  $\alpha\beta$ -белки – те и другие структуры в пределах одной полипептидной цепи (пример – молекулы лизоцима), а класс  $\alpha/\beta$ -белков содержит множество  $\alpha$ - и  $\beta$ -структур, чередующихся вдоль полипептидной цепи или домена (см. рис. 1.19). Домены создаются объединением и чередованием  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев, между которыми открываются более рыхлые структуры.

Учитывая необходимость для студента-медика основательного знакомства с отдельными группами белков, которые могут служить предметом изучения в его будущей профессиональной деятельности (например, белки крови), приводим старую классификацию белков с краткой характеристикой новых данных о структуре, составе и свойствах отдельных представителей. Согласно этой классификации, обширный класс белковых веществ в зависимости от химического состава делят на простые и сложные белки\*.

**Простые белки** построены из остатков аминокислот и при гидролизе распадаются соответственно только на свободные 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, освобождается 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 (см. главу 2) 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).

\* Деление белков на простые и сложные, по всей вероятности, является условным, поскольку многие белки, традиционно рассматриваемые как простые (например, яичный альбумин), на самом деле оказываются сложными, так как содержат небелковый компонент, чаще всего углеводной или липидной природы, либо 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 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—клупейн, выделенный из молок сельди: из 30 аминокислот в нем на долю аргинина приходится 21 остаток. Расшифрована первичная структура клупейна. 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. Они составляют белковый компонент в структуре ряда сложных белков.

Гистоны также являются белками основного характера. В их состав входят лизин и аргинин, содержание которых, однако, не превышает 20–30%. Молекулярная масса гистонов намного больше нижнего предела молекулярной массы белков. Эти белки сосредоточены в основном в ядрах клеток в составе дезоксирибонуклеопротеинов и играют важную роль в регуляции экспрессии генов (см. главы 2 и 3).

**Проламины и глютелины.** Это белки растительного происхождения, отличаются своеобразием аминокислотного состава и физико-химических свойств. Они содержатся в основном 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 простые белки в этих условиях обычно выпадают в осадок. Наиболее изучены оризенин (из риса), глютелин 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.** Эти белки относятся к белкам, широко распространенным в органах и тканях животных. Наиболее богаты ими белки сыворотки крови, молока, яичный белок, мышцы и др. В плазме крови человека в норме содержится около 7% белков, представленных преимущественно альбуминами и глобулинами. Альбумины и глобулины—это глобулярные белки, различающиеся по растворимости (табл. 1.6).

Необходимо отметить, что само определение «альбумины» и «глобулины» основано на их растворимости в дистиллированной воде и полунасы-

Таблица 1.6. Растворимость альбуминов и глобулинов

Растворитель	Альбумины	Глобулины
Дистиллированная вода	Растворимы	Нерастворимы
Слабые солевые растворы NaCl	»	Растворимы
Насыщенный раствор Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	»	Нерастворимы
Насыщенный раствор NaCl	»	»
Полунасыщенный раствор (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	»	»
Насыщенный раствор (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Нерастворимы	»

щенном растворе  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Однако, как показывают данные табл. 1.6, глобулины растворимы только в разбавленных солевых растворах.

Различную растворимость альбуминов и глобулинов сыворотки крови раньше широко использовали в клинической практике для их фракционирования и количественного определения (см. главу 17).

В настоящее время качественный состав и содержание сывороточных белков определяют с помощью электрофореза на бумаге и в полиакриламидном геле в небольшом количестве сыворотки крови. Типичная электрофореграмма белков сыворотки крови, а также соотношение отдельных фракций представлены в главе 17. Альбумины и глобулины отличаются друг от друга также по молекулярной массе—соответственно 40000—70000 и 150000 и более.

Из сыворотки крови не только выделен альбумин в чистом виде, но и определена первичная структура его единственной полипептидной цепи (575 аминокислотных остатков). Альбумин имеет относительно низкую изоэлектрическую точку (4,7) и высокий отрицательный заряд при pH 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, основной функцией их считают транспорт жирных кислот. Однако точная функция альбуминов не совсем ясна. Известны случаи, когда у некоторых людей в крови фактически отсутствуют альбумины (врожденная аномалия), но они практически здоровы.

Глобулины, представленные  $\alpha_1$ -фракцией, содержатся в крови в комплексе с билирубином и с липопротеинами высокой плотности. Глобулины, мигрирующие при электрофорезе в виде  $\alpha_2$ -фракции, содержат глобулин и неизвестный гликопротеин.  $\beta$ -Глобулины включают ряд важных в функциональном отношении белков, в частности трансферрин—белок, ответственный за транспорт железа. С этой же фракцией связан 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 дефицит синтеза церулоплазмينا. Наконец, во фракции  $\beta$ -глобулинов содержится протромбин, являющийся предшественником тромбина—белка, ответственного за превращение фибриногена крови в фибрин при свертывании крови.

Фракция  $\gamma$ -глобулинов является наиболее гетерогенной. Известно множество антител, различающихся первичной структурой. Электрофоретически они открываются главным образом в  $\gamma$ -глобулиновой и частично в  $\beta_2$ -глобулиновой фракциях. Структура и функция  $\gamma$ -глобулинов более подробно рассмотрены далее (см. главу 2, «Гликопротеины»).

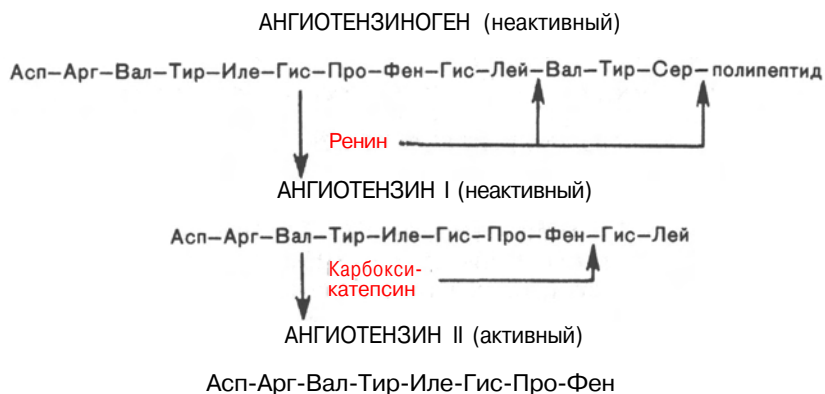
## **ПРИРОДНЫЕ ПЕПТИДЫ**

В последние годы значительно повысился интерес к структуре и функциям встречающихся в свободном состоянии в организме низкомолекулярных пептидов, выполняющих ряд специфических биологических функций. Короткие пептиды, содержащие до 10 аминокислот, принято называть олигопептидами; в то же время полипептиды и белки считаются взаимозаменяемыми, хотя термином «полипептиды» чаще обозначают продукты с мол.м. менее 10000. В некоторых биоактивных пептидах имеются необычные аминокислоты, не встречающиеся в природных белках, или производные обычных аминокислот (гормоны, антибиотики). Мнение

о том, что пептиды могут играть роль промежуточных продуктов на пути синтеза белка, не подтвердилось, поскольку, как показано в главе 14, этот процесс во всех клетках у всех живых организмов осуществляется de novo матричным путем.

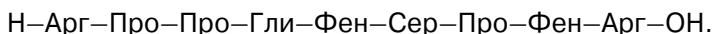
Природные пептиды, наделенные биологической активностью, в зависимости от характера действия и происхождения принято делить на 4 группы: 1) пептиды, обладающие гормональной активностью (вазопрессин, окситоцин, кортикотропин, глюкагон, кальцитонин, меланоцитстимулирующий гормон, рилизинг-факторы гипоталамуса и др.; см. главу 8); 2) пептиды, принимающие участие в процессе пищеварения (в частности, гастрин и секретин; см. главу 12); 3) пептиды, источник которых —  $\alpha_2$ -глобулиновая фракция 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 (постсинтетические превращения белковой молекулы). Известно, например, что ангиотензины (представленные октапептидами), оказывающие выраженное сосудосуживающее действие, образуются из присутствующего в сыворотке крови неактивного белка ангиотензиногена в результате последовательного действия ряда протеолитических ферментов (ренина и особого фермента, участвующего в превращении неактивного ангиотензина I в активный ангиотензин II).

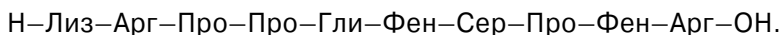


К группе вазоактивных (оказывающих влияние на тонус сосудов) пептидов относятся, кроме того, широко применяемые в медицинской практике брадикинин и каллидин.

Брадикинин представляет собой нонапептид:



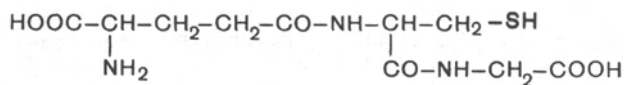
Каллидин представлен декапептидом, образующимся из неактивного плазменного белка кининогена, и отличается от брадикинина присутствием на N-конце еще одного аминокислотного остатка (Лиз):



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 ренин—ангиотензин—альдостерон. Он выражается в сосудорасширяющем действии, усилении клубочковой фильтрации и стимуляции выведения натрия и хлоридов за счет угнетения их реабсорбции в канальцах. Эти пептиды получили название атриопептидов (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 цистеина.

Внутриклеточным посредником действия атриопептидов оказался циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), синтез которого осуществляется в результате активирования мембранного фермента гуанилатциклазы; действие аденилатциклазы, напротив, тормозится под влиянием атриопептидов.

Во всех животных тканях и в некоторых растениях широко распространен низкомолекулярный трипептид глутатион, функции которого пока не выяснены достаточно полно, хотя он открыт сравнительно давно. Глутатион представляет собой атипичный трипептид (в котором в образовании одной из пептидных связей участвует не  $\alpha$ -карбоксильная, а  $\gamma$ -карбоксильная группа глутамата) следующего строения:  $\gamma$ -глутамил-цистеинил-глицин:



Глутатион (восстановленный)

Цистеин является составной частью глутатиона, поэтому последний может находиться в восстановленной (SH) и в окисленной (S-S) формах (сокращенно обозначаются 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 быстрый распад их 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 из гормонов гипофиза, в частности эндорфинов и энкефалинов, наделенных мощным обезболивающим действием (путем связывания рецепторов определенных клеток мозга), в сотни и тысячи раз превосходящим анальгезирующий эффект морфина, описано в главе 8.

Из ткани мозга выделен также  $\delta$ -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 химического синтеза пептидов, в которых один или

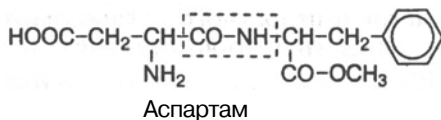
несколько аминокислотных остатков L-ряда замещают остатками D-аминокислот. Подобная замена, не вызывая снижения биоактивности, защищает пептид от воздействия протеиназ тканей, способствуя пролонгированию эффекта препарата.

Среди естественно встречающихся небольших пептидов следует указать на антибиотик грамицидин S, выделенный из *Bacillus brevis* и представляющий собой циклический декапептид:



Как видно, в структуре грамицидина S имеются 2 остатка орнитина (Орн), производные аминокислоты аргинина и 2 остатка неприродных D-изомеров фенилаланина. Стрелки указывают направление синтеза от NH<sub>2</sub>-групп к COOH-группам каждого остатка, и вследствие цикличности грамицидин S не имеет конца.

Широкое применение, особенно в пищевой промышленности, в качестве заменителя сахара получил искусственный (генноинженерный синтез) дипептид, состоящий из L-изомеров аспарагиновой кислоты и метилового эфира фенилаланина, названный аспартамом:



Аспартам в сотни раз слаще сахара и легко распадается в организме на две свободные аминокислоты, абсолютно безвредные для организма; поэтому он рекомендован в качестве заменителя сахара больным диабетом. Это пример пептида, наделенного огромным биологическим эффектом.

## Глава 2

# ХИМИЯ СЛОЖНЫХ БЕЛКОВ

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

### ХРОМОПРОТЕИНЫ

Хромопротеины (от греч. *chroma*—краска) состоят из простого белка и связанного с ним окрашенного небелкового компонента. Различают гемопроотеины (содержат в качестве простетической группы железо), магнийпорфирины и флавопротеины (содержат 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 диоксида углерода, окислительно-восстановительные реакции, свето- и цветовосприятие и др.

Таким образом, хромопротеины играют исключительно важную роль в процессах жизнедеятельности. Например, подавление дыхательной функции гемоглобина путем введения оксида углерода (СО) либо утилизации (потребление) кислорода в тканях путем введения синильной кислоты или ее солей (цианидов), ингибирующих ферментные системы клеточного дыхания, моментально приводит к смерти организма.

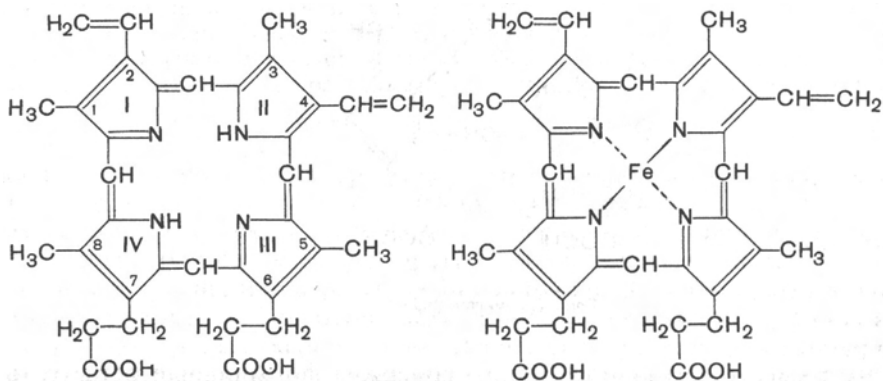
Хромопротеины являются неизменными и активными участниками аккумуляции энергии, начиная от фиксации солнечной энергии в зеленых растениях и утилизации ее до превращений в организме животных и человека. Хлорофилл (магнийпорфирин) вместе с белком обеспечивает фотосинтетическую активность растений, катализируя расщепление молекулы воды на водород и кислород (поглощением солнечной энергии). Гемопроотеины (железопорфирины), напротив, катализируют обратную реакцию—образование молекулы воды, связанное с освобождением энергии.

### Гемопроотеины

К группе гемопротеинов 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. Далее более подробно рассмотрено 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 время как гем одинаков у всех видов гемоглобина.

Основу структуры простетической группы большинства гемосодержащих белков составляет порфириновое кольцо, являющееся в свою очередь производным тетрапиррольного соединения — порфирина. Последний состоит из четырех замещенных пирролов:



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

Гем

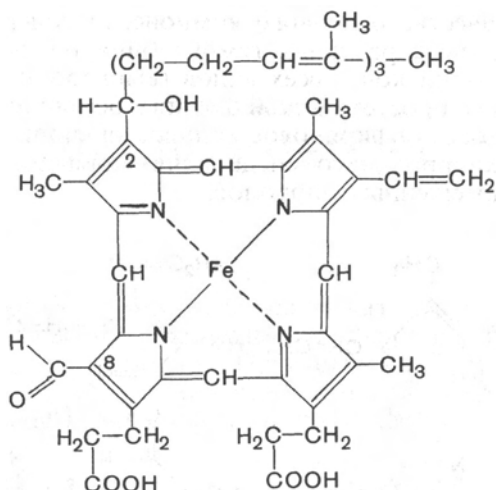
соединенных между собой метиновыми мостиками ( $-\text{CH}=\text{}$ ). Незамещенный порфирин называется порфином. В молекуле гема порфин представлен в виде протопорфирина IX, содержащего четыре метильные группы ( $-\text{CH}_3$ ), две винильные группы ( $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) и два остатка пропионовой кислоты. Протопорфирин, присоединяя железо, превращается в гем\*.



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

Гем в виде гем-порфирина является простетической группой не только гемоглобина и его производных, но и миоглобина, каталазы, пероксидазы и цитохромов *b*, *c* и *c*<sub>1</sub> (см. главу 9); в то же время в цитохромах *a* и *a*<sub>3</sub>, входящих в состав интегрального комплекса, названного цитохромоксидазой, содержится гем *a*, называемый также формилпорфирином:

\* Структура гема расшифрована в основном благодаря работам М.В. Ненцкого и Г. Фишера.



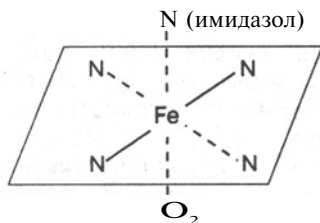
Гем а (формилпорфирин)

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 атомом азота имидазольной группы гистидина белковой молекулы. Шестая координационная связь железа предназначена для присоединения кислорода (с образованием оксигемоглобина и оксимиоглобина) или других лигандов: CO, цианидов и др. (рис. 2.1). В цитохромах, напротив, и 5-я, и 6-я координационные связи железа соединены с остатками гистидина и метионина (в цитохроме *c* обе винильные группы соединены 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 железо остается двухвалентным независимо от присоединения или отдачи кислорода.

Структурная организация гемоглобина (и миоглобина) была описана в главе 1. Дж. Кендрью и М. Перуц расшифровали конформацию этих молекул (Нобелевская премия 1962 г.). Дыхательная функция гемоглобина крови подробно рассматривается в курсе физиологии. Здесь следует указать на уникальную роль гемоглобина в транспорте кислорода от легких к тканям и диоксида углерода от тканей к легким. Это элементарное проявление жизни—дыхание, хотя и выглядит простым, основано на взаимодействии многих типов атомов в гигантской молекуле гемоглобина. Подсчитано, что в одном эритроците содержится около 340000000 молекул гемоглобина, каждая из которых состоит примерно из  $10^3$  атомов C, H, O, N, S и 4 атомов железа.

Атом железа расположен в центре гема-пигмента, придающего крови характерный красный цвет. Каждая из 4 молекул гема «обернута» одной полипептидной цепью. В молекуле гемоглобина взрослого человека HbA





**Рис. 2.1.** Координационные связи атома железа в молекуле гема. Все 4 связи с атомами азота пиррольных колец расположены в одной плоскости, 5-я и 6-я координационные связи (с атомом азота имидазольного кольца гистидина и с кислородом соответственно)—по разные стороны перпендикулярно к этой плоскости.

(от англ. *adult*—взрослый) содержатся четыре полипептидные цепи, которые вместе составляют белковую часть молекулы—глобин. Две из них, называемые  $\alpha$ -цепями, имеют одинаковую первичную структуру и по 141 аминокислотному остатку. Две другие, обозначаемые  $\beta$ -цепями, также идентично построены и содержат по 146 аминокислотных остатков. Таким образом, вся молекула белковой части гемоглобина состоит из 574 аминокислот. Во многих положениях  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи содержат разные аминокислотные последовательности, хотя и имеют почти одинаковые пространственные структуры. Получены доказательства, что в структуре гемоглобинов более 20 видов животных 9 аминокислот в последовательности оказались одинаковыми, консервативными (инвариантными), определяющими функции гемоглобинов; некоторые из них находятся вблизи гема, в составе участка связывания с кислородом, другие—в составе неполярной внутренней структуры глобулы.

В дополнение к основному гемоглобину  $\text{HbA}_1$  в крови взрослого человека доказано существование мигрирующего с меньшей скоростью при электрофорезе гемоглобина  $\text{HbA}_2$ , также состоящего из 4 субъединиц: двух  $\alpha$ -цепей и двух  $\delta$ -цепей. На долю  $\text{HbA}_2$  приходится около 2,5% от всего гемоглобина. Известен, кроме того, фетальный гемоглобин (гемоглобин новорожденных), обозначаемый  $\text{HbF}$  и состоящий из двух  $\alpha$ -цепей и двух  $\gamma$ -цепей. Фетальный гемоглобин отличается от  $\text{HbA}_1$  не только составом аминокислот, но и физико-химическими свойствами: спектральным показателем, электрофоретической подвижностью, устойчивостью к щелочной денатурации и др. Кровь новорожденного содержит до 80%  $\text{HbF}$ , но к концу 1-го года жизни он почти целиком заменяется на  $\text{HbA}$  (все же в крови взрослого человека открывается до 1,5%  $\text{HbF}$  от общего количества гемоглобина). Последовательность аминокислот в  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепях гемоглобина окончательно не расшифрована.

Установление первичной структуры субъединиц молекулы гемоглобина стимулировало исследование по расшифровке структуры так называемых аномальных гемоглобинов. В крови человека в общей сложности открыто около 150 различных типов мутантных гемоглобинов. Появляются мутантные формы гемоглобинов в крови вследствие мутации генов. Обычно мутации делят на 3 класса в соответствии с топографией измененного участка молекулы. Если замена аминокислоты происходит на поверхности молекулы гемоглобина, то это мутация первого класса; подобные мутации обычно не сопровождаются развитием тяжелой патологии, и болезнь протекает бессимптомно; исключение составляет серповидно-клеточная анемия. При замене аминокислоты вблизи гема нарушается связывание

кислорода—это мутация второго класса, сопровождающаяся развитием болезни. И наконец, если замена происходит во внутреннем участке молекулы гемоглобина, говорят о третьем классе мутации; подобные мутации приводят к нарушению пространственной структуры и соответственно функции гемоглобина.

Аномальные гемоглобины, различающиеся по форме, химическому составу и величине заряда, были выделены при помощи электрофореза и хроматографии. Передающиеся по наследству изменения чаще всего являются результатом мутации единственного триплетта, приводящей к замене одной какой-либо аминокислоты в полипептидных цепях молекулы гемоглобина на другую. В большинстве случаев происходит замена кислой аминокислоты на основную или нейтральную (табл. 2.1). Поскольку это замещение осуществляется в обеих полипептидных цепях одной из пар ( $\alpha$  или  $\beta$ ), образовавшийся аномальный гемоглобин будет отличаться от нормального величиной заряда и соответственно электрофоретической подвижностью.

Таблица 2.1. Замены аминокислот в аномальных гемоглобинах человека

Тип гемоглобина	Состав пептидных цепей	Нормальный остаток и его положение в цепи	Замена
A <sub>1</sub>	$\alpha_2\beta_2$		
A <sub>2</sub>	$\alpha_2\delta_2$		
C	$\alpha_2\beta_2$	Глу 6 в $\beta$ -цепи	Лиз
D <sub><math>\alpha</math></sub>	$\alpha_2\beta_2$	Глу 23 в $\alpha$ -цепи	?
D <sub><math>\beta</math></sub>	$\alpha_2\beta_2$	Лей 28 в $\beta$ -цепи	Глу
E	$\alpha_2\beta_2$	Глу 26 в $\beta$ -цепи	Лиз
F	$\alpha_2\gamma_2$		
G	$\alpha_2\beta_2$	Глу 43 в $\beta$ -цепи	Ала
G <sub>p</sub> H	$\alpha_2\beta_2$	Асп 68 в $\alpha$ -цепи	Лиз
H	$\beta_4$		
I	$\alpha_2\beta_2$	Лиз 16 в $\alpha$ -цепи	Асп
M	$\alpha_2\beta_2$	Вал 67 в $\beta$ -цепи	Глу
O	$\alpha_2\beta_2$	Глу 116 в $\alpha$ -цепи	Лиз
S	$\alpha_2\beta_2$	Глу 6 в $\beta$ -цепи	Вал

В табл. 2.1 представлены некоторые типы аномальных гемоглобинов, составы их полипептидных цепей с указанием известной или вероятной локализации замены либо в  $\alpha$ -, либо в  $\beta$ -цепях. Замены необычной аминокислотой в аномальных гемоглобинах имеют место как в  $\alpha$ -, так и в  $\beta$ -цепях. Исключение составляет гемоглобин H, все 4 полипептида которого представлены  $\beta$ -цепями, идентичными по структуре  $\beta$ -цепям нормального гемоглобина A<sub>1</sub>.

Следует указать, что некоторые мутации, вызывающие существенное изменение структуры и соответственно функции гемоглобина, оказываются летальными, и индивидуумы с подобным гемоглобином 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



Рис. 2.2. Нормальные и серповидные эритроциты.

нормального гемоглобина (часто их относят также к «молекулярным болезням»), и талассемии (обусловленные наследственным нарушением синтеза какой-либо нормальной цепи гемоглобина. Различают также железодефицитные анемии.

Классическим примером наследственной гемоглинопатии 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. 2.2). Гемоглобин S, как показали Л. Полинг и др., отличается рядом свойств от нормального гемоглобина: в частности, после отдачи кислорода в тканях он превращается в плохо растворимую дезокси-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, гомозиготные по мутантному гену, часто умирают 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  $\beta$ -цепях молекулы гемоглобина HbS (см. табл. 2.1, рис. 2.2). Это результат мутации в молекуле ДНК, кодирующей синтез  $\beta$ -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
НбА :	Вал-	Гис-	Лей-	Тре-	Про-	Глу-	Глу-Лиз...
НбS :	Вал-	Гис-	Лей-	Тре-	Про-	Вал-	Глу-Лиз...

Одной этой замены оказалось достаточно не только для нарушения формы эритроцита, но и для развития тяжелой наследственной болезни — серповидно-клеточной анемии.

Талассемии, строго говоря, не являются гемоглинопатиями. Это генетически обусловленное нарушение синтеза одной из нормальных цепей гемоглобина. Если угнетается синтез  $\beta$ -цепей, то развивается  $\beta$ -талас-

семия; при генетическом дефекте синтеза  $\alpha$ -цепей развивается  $\alpha$ -талассемия. При  $\beta$ -талассемии в крови наряду с  $HbA_1$  появляется до 15%  $HbA_2$  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 объяснить пока не удалось.

В медицинской практике часто проводят анализ кровяных пигментов, который основан на исследовании спектроскопических свойств гема гемоглобина, точнее продуктов его окисления (хлорида гемина и гематина, образующихся соответственно при обработке гемоглобина уксусной кислотой в присутствии хлорида натрия или разведенными 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  $HbO_2$ —соединение молекулярного кислорода с гемоглобином. Кислород присоединяется к каждому гему молекулы гемоглобина при помощи координационных связей железа, причем присоединение одной молекулы кислорода к тетрамеру облегчает присоединение второй молекулы, затем третьей и т.д. Поэтому кривая насыщения гемоглобина кислородом имеет сигмоидную форму, свидетельствующую о кооперативности связывания кислорода. Эта кооперативность обеспечивает не только связывание максимального количества кислорода в легких, но и освобождение кислорода в периферических тканях; этому способствует также наличие  $H^+$  и  $CO_2$  в тканях с интенсивным обменом. В свою очередь кислород ускоряет высвобождение  $CO_2$  и  $H^+$  в легочной ткани. Эта аллостерическая зависимость между присоединением  $H^+$ ,  $O_2$  и  $CO_2$  получила название эффекта Бора.

Помимо кислорода, гемоглобин легко соединяется 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 вследствие высокого сродства к  $CO$  гемоглобин теряет способность связывать кислород и наступает смерть от удушья, недостаточного снабжения тканей кислородом. Однако при быстром повышении парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе можно добиться частичного вытеснения  $CO$  из связи с гемоглобином и предотвратить летальный исход.

При отравлении оксидами азота, парами нитробензола и другими соединениями часть гемоглобина окисляется в метгемоглобин ( $HbOH$ ), содержащий трехвалентное железо. Метгемоглобин также теряет способность к переносу кислорода от легких к тканям, поэтому при 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.

Следует отметить, 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 гемсодержащим хромопротеинам, хотя в их названиях 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 (гемэритрин) и меди (гемоцианин) с кислородом и др. (табл. 2.2).

Таблица 2.2. Некоторые свойства белков-переносчиков кислорода (по Г. Эйхгорну)

Свойства	Гемоглобин	Гемэритрин	Гемоцианин
Металл	Fe	Fe	Cu
Степень окисления металла в дезоксигенированном белке	II	II	I
Стехиометрия взаимодействия с кислородом	Fe:O <sub>2</sub>	2Fe:O <sub>2</sub>	2Cu:O <sub>2</sub>
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	65000	108000	400000-2000000
Число субъединиц	4	8	Много

Трансферрины (сидерофилины)—группа сложных белков, полученных из разных источников и характеризующихся способностью специфично, прочно и обратимо 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 ксантин-оксидаза, альдегидоксидаза, СДГ, дигидрооротатдегидрогеназа, ацил-КоА-дегидрогеназа и транспортирующий электроны флавопротеин. На долю двух последних приходится до 80% митохондриальных флавопро-

теинов, выполняющих важную роль в биоэнергетике клетки (см. главу 9). 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 освобождается железо и  $H_2S$ . Несмотря на структурные отличия от цитохромов, негемовые флавопротеины выполняют аналогичную функцию в транспорте электронов благодаря способности переходить из окисленного в восстановленное состояние.

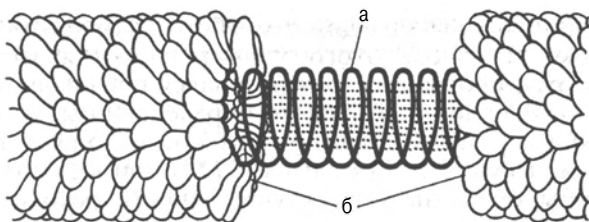
## НУКЛЕОПРОТЕИНЫ

Нуклеопротеины состоят из белков и нуклеиновых кислот. Последние рассматриваются как простетические группы. В природе обнаружено 2 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. Термин «нуклеопротеины» связан 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. 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 проявлений жизни 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 служит явление трансформации, наблюдаемое у бактерий и открытое также в культуре клеток человека. Сущность явления заключается в превращении одного 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 нуклеопротеинами 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 одна хромосома содержит одну молекулу ДНК, имеющую длину несколько сантиметров. Вообще ДНП входит в состав моноклеосом, являющихся составной частью



**Рис. 2.3.** Модель вируса мозаичной болезни табака, а - спираль РНК; б - субъединицы белка.

хромосомы. Таким образом, в состав хроматина входят молекула ДНК, пять различных классов белков—гистонов и так называемые негистоновые белки. Количество ДНК в ядре составляет до 6 пг ( $10^{-12}$  г) на одну клетку у 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, выделяют гистоны, богатые лизином (Н1), молекулярная масса которых составляет в среднем 20000, и богатые аргинином с мол. массой до 15000. 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 достаточно выяснена. Негистоновые белки в настоящее время интенсивно изучаются. В их состав входят сложные белки, ферменты, а также регуляторные белки. По своим свойствам последние отличаются от гистонов и представлены кислотными белками.

В различных нуклеопротеинах количество нуклеиновой кислоты колеблется от 40 до 65% (например, в рибосомах про- и эукариот). В вирусных нуклеопротеинах количество нуклеиновых кислот не превышает 2–5% от общей массы. Так, у вируса табачной мозаики (ВТМ) на долю РНК\*, правда, с огромной молекулярной массой—около 2000000, приходится всего около 2%. Остальная часть этой гигантской вирусной частицы приходится на долю однотипных белковых субъединиц (рис. 2.3). Ионная связь между РНК и белковыми молекулами ВТМ весьма непрочная 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 происходит 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. Акад. А.С. Спирин и одновременно М. Номура разделили 70S рибосомы (рибонуклеопротеины) на их состав-

\* Растительные вирусы чаще всего содержат РНК, а 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.

ляющие и разработали 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 белковых молекул и в какой последовательности должно присоединиться к единственной молекуле РНК (в случае ВТМ) или к 3 молекулам РНК (в рибосомах), чтобы обеспечить высокую точность реконструкции надмолекулярных структур.

В настоящее время и ядерный хроматин (ДНП), и рибосомы, и вирусные нуклеопротеиды обычно рассматривают именно как надмолекулярные комплексы или структуры, а отнесение этих образований в раздел «Сложные белки»—в значительной степени дань традиции.

## ЛИПОПРОТЕИНЫ

В последние годы достигнут определенный прогресс в выяснении химической природы и структуры липопротеинов (ЛП). Этот класс сложных белков состоит из белка и простетической 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. Они входят в состав клеточной мембраны и внутриклеточных биомембран ядра, митохондрий, микросом (структурированные липопротеины), а также присутствуют в свободном состоянии (главным образом в плазме крови). К липопротеинам относятся, кроме того, тромбопластический 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.

Большинство ЛП синтезируется в печени или в слизистой оболочке кишечника. Они содержат гидрофобное липидное ядро, окруженное полярными липидами и оболочкой из белков, получивших название апобелки. Различают 8 типов апобелков: апо-АI, АII, В, СI, СII, СIII, D и E. Обычно ЛП содержат до 5% углеводов (глюкоза, галактоза, гексозамины, фукоза, сиаловая кислота), поэтому некоторые из них являются и гликопротеинами.

Липопротеины сыворотки крови подразделяют на отдельные классы в зависимости от электрофоретической подвижности (с белками крови) и от плотности при ультрацентрифугировании. Различают ЛП низкой плотности (ЛПНП), очень низкой плотности (ЛПОНП), высокой плотности (ЛПВП), очень высокой плотности (ЛПОВП) и ЛП промежуточной плотности (ЛППП) (табл. 2.3).

Функции и значение отдельных классов ЛП в развитии артерио- и атеросклероза подробно рассматриваются в главе 17.

**Механизм 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



Таблица 2.3. Классификация и основные свойства ЛП сыворотки крови человека

Электрофоретическая фракция	Фракция при ультрацентрифугировании	Плотность, г/см <sup>3</sup>	Процент белка	Содержание, миллиграммов на 100 мл плазмы	Липидный компонент (высокое содержание)
Хиломикроны	—	< 0,96	1–2	10–50	Свободные жирные кислоты
Пре-β-ЛП	ЛПОНП	0,96–1,006	7	150–250	То же
α <sub>2</sub> -β <sub>1</sub> -ЛП	ЛПНП	1,006–1,019	11	50–100	Эфиры холестерина
β-ЛП	ЛПНП	1,019–1,063	21–23	315–385	То же
α <sub>1</sub> -ЛП	ЛПВП	1,063–1,200	35–50	270–380	Фосфолипиды
α <sub>1</sub> -ЛП	ЛПОВП <sub>1</sub>	> 1,210	65	?	Свободные жирные кислоты
Альбумин	ЛПОВП <sub>2</sub>	> 1,210	97	?	То же

жирных кислот) и белковой молекулы. Чаще в липопротеинах действуют комбинированно разные нековалентные силы, способствуя образованию в высшей степени упорядоченной двойной белково-липидной структуры биомембран.

## 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 клетках 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 сложной эфирной связью с белковой молекулой через

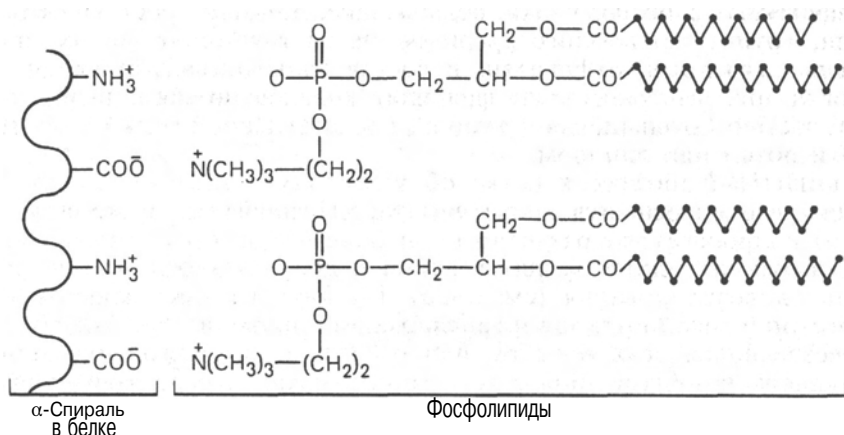
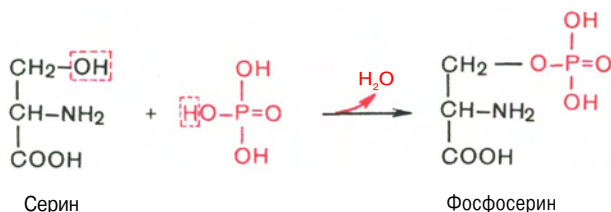


Рис. 2.4. Ионный тип связи между белками и фосфолипидами.

гидроксильные группы β-оксиаминокислот, главным образом серина и в меньшей степени треонина. На одну молекулу белка обычно приходится 2–4 остатка фосфата.



Новые данные свидетельствуют о том, что в клетках фосфопротеины синтезируются в результате посттрансляционной модификации, подвергаясь фосфорилированию при участии протеинкиназ. Этот процесс подробно рассматривается в главе 14. Здесь лишь укажем на существенную роль специфической протеинкиназы, катализирующей фосфорилирование OH-группы тирозина, в биосинтезе онкобелков. Таким образом, уровень фосфопротеинов в клетке зависит в значительной степени от регулирующего действия ферментов, катализирующих фосфорилирование (протеинкиназы) и дефосфорилирование (протеинфосфатазы). Следует отметить, что фосфопротеины содержат органически связанный, лабильный фосфат, абсолютно необходимый для выполнения клеткой ряда биологических функций. Кроме того, они являются ценным источником энергетического и пластического материала в процессе эмбриогенеза и дальнейшего постнатального роста и развития организма.

Особо следует отметить, что некоторые ключевые ферменты, регулирующие процессы внутриклеточного обмена веществ, также существуют как в фосфорилированной, так и в дефосфорилированной форме. Этим подчеркивается значение фосфорилирования–дефосфорилирования в процессах химической модификации макромолекул, участвующих в интегральных процессах метаболизма.

## ГЛИКОПРОТЕИНЫ

**Гликопротеины** – сложные белки, содержащие, помимо простого белка или пептида, группу гетероолигосахаридов. В настоящее время их принято называть гликоконъюгатами. В состав гликоконъюгата входит углеводный компонент (гликановая фракция), ковалентно связанный с углеводной частью (агликановая фракция), представленной белком, пептидом, аминокислотой или липидом.

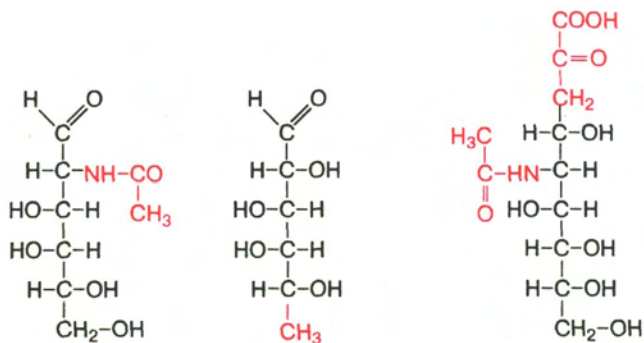
Повышенный интерес к науке об углеводах – **гликобиологии** – в настоящее время объясняется открытием существенной роли изменений структуры гликоконъюгатов в развитии таких болезней, как рак, иммунодефицит человека, ревматоидные артриты, астма и др. Оказалось, что нарушение реакции гликозилирования (см. главу 14) двух главных классов гликоконъюгатов (гликопротеинов и ганглиозидов) приводит или к накоплению предшественников этих веществ, или к синтезу «укороченных» сахарных цепей гликоконъюгатов. Более того, установлено, что во взаимодействии между некоторыми вирусами и клетками-мишенями главную роль играют углеводные компоненты. В частности, гликопротеин gp120 вируса иммунодефицита человека (содержит большой процент углевода) имеет высокое

сродство к гликопротеину CD<sub>4</sub> Т-лимфоцита. В этом взаимодействии, узнавании, являющемся высокоспецифичным, гликозилированные фрагменты, вероятнее всего, играют важную патогенетическую роль. Известно также, что при ревматоидных артритах часто синтезируются аномальные антитела (аномальные иммуноглобулины—все гликопротеины) с необычайно короткими сахарными цепями, что вызывает стимуляцию иммунной системы против самого организма. Из этих примеров видно, что, помимо гликобиологии, наступило время признания и таких наук, как гликопатология и гликотерапия.

Помимо гликопротеинов, различают также протеогликаны, состоящие из белка и гликозаминогликанов (прежнее название мукополисахариды); последние состоят из цепей сложных углеводов: аминсахаров, уроновых кислот, серной кислоты и отдельных моносахаридов. Типичными гликозаминогликанами являются гиалуроновая кислота, хондроитинсерная кислота и гепарин, химический состав, структура и функция которых подробно рассматриваются в главе 21.

К типичным гликопротеинам относят большинство белковых гормонов, секретируемые в жидкие среды организма вещества, мембранные сложные белки, все антитела (иммуноглобулины), белки плазмы крови, молока, овальбумин, интерфероны, факторы комплемента, группы крови, рецепторные белки и др. Из этого далеко не полного перечня гликопротеинов видно, что все они выполняют специфические функции: обеспечивают клеточную адгезию, молекулярное и клеточное узнавание, антигенную активность опухолевых клеток, оказывают защитное и гормональное, а также антивирусное действие.

Химический состав гликопротеинов более или менее установлен, структура определена только у ряда из них. К полипептиду присоединяются гетероолигосахаридные цепи, содержащие от 2 до 10, реже 15 мономерных остатков гексоз (галактоза и манноза, реже глюкоза), пентоз (ксилоза, арабиноза) и конечный углевод, чаще всего представленный N-ацетилгалактозамин, L-фукозой или сиаловой кислотой; в отличие от протеогликанов гликопротеины не содержат уроновых кислот и серной кислоты.



N-ацетилгалактозамин

L-фукоза  
(6-дезоксигалактоза)

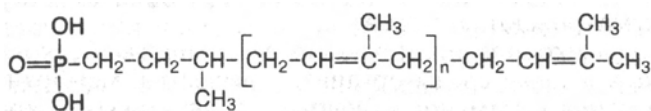
Сиаловая кислота  
(N-ацетилнейраминная кислота)

Типы связей между углеводными компонентами и белками определены только у ряда гликопротеинов, аминокислотный состав и структура которых известны (иммуноглобулины, гормоны); они включают O-гликозидные

связи (с ОН-группами серина, треонина и оксализина), N-гликозидные связи (с амидными группами аспарагина, реже глутамина или ω-NH<sub>2</sub>-группами лизина и аргинина) и эфирные гликозидные связи со свободными СООН-группами глутаминовой и аспарагиновой кислот.

Синтез гликопротеинов осуществляется в рибосомах эндоплазматического ретикулума (в цистронах), затем присоединяются сахарные цепи (постсинтетическое гликозилирование), и далее белок транспортируется до биомембран клетки и включается в состав мембранных белков или секретируется.

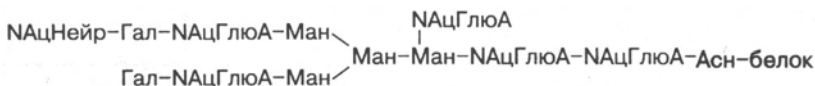
Углеводные компоненты соединены ковалентно с азотом аспарагина молекулы белка. Однако предварительно олигосахаридная часть соединяется с липидным переносчиком — долихолфосфатом (липид, содержащий от 15 до 20 изопреновых остатков) и переносится на полипептидную цепь в эндоплазматическом ретикулуме, при этом транспортер освобождается:



Долихолфосфат (n = 15–30)

Синтезированные гликопротеины далее переносятся в аппарат Гольджи, где осуществляются окончательное гликозилирование и сортировка по назначению.

Структура одного из нескольких гетероолигосахаридных остатков в молекуле гликопротеинов, в частности иммуноглобулинов, может быть представлена в виде следующей схемы (использованы сокращения: Глю — глюкоза, NAцГлюА — N-ацетилглюкозамин; Гал — галактоза; Ман — манноза; NAцНейр — N-ацетилнейраминавая кислота):



Рассмотрим известные к настоящему времени данные о синтезе, строении (структуре) и свойствах ряда гликопротеинов.

**Интерфероны.** Интерфероны — это ингибиторы размножения многих типов вирусов. Открыто несколько типов интерферонов (α, β и γ), некоторые из них получены методами генетической инженерии. Это сравнительно небольшие сложные белки с мол. массой у разных видов животных и человека от 25000 до 38000–40000). Они образуются в клетке в ответ на внедрение вирусной нуклеиновой кислоты, ограничивая вирусную агрессию (инфекцию). Известно также, что группа видоспецифических α-интерферонов синтезируется макрофагами, в то время как γ-интерферон продуцируется Т-клетками и стимулируется интерлейкином-2 (см. «Лимфокины»). Показано также, что γ-интерферон в свою очередь повышает цитотоксическую активность макрофагов, Т-клеток и естественных клеток-киллеров. Интерфероны наделены антипролиферативной активностью и считаются основными защитными белками не только против вирусной инфекции, но и при опухолевых поражениях.

Следует отметить, однако, что до сих пор не раскрыты молекулярные механизмы, при помощи которых интерфероны тормозят размножение вирусов. Известно только, что интерфероны ингибируют биосинтез всех белков (и хозяйских, и вирусных), вероятнее всего, на уровне процесса трансляции. Возможно, что интерферон индуцирует синтез особого белка-ингибитора, который затем связывается с рибосомами и блокирует трансляцию, или интерферон переводит один из активных эукариотических белковых факторов инициации в неактивный фактор путем фосфорилирования.

**Иммуноглобулины.** Иммуноглобулины, или антитела, также относятся к классу гликопротеинов, выполняют защитную функцию, обезвреживая поступающие в организм чужеродные вещества—антигены любой химической природы. Синтезируются иммуноглобулины плазматическими клетками, образовавшимися из лимфоцитов. Учение об иммунитете оформилось в самостоятельную науку—иммунологию, изучающую структуру и функции антител вообще и иммуноглобулинов в частности. Мы представим современные сведения о некоторых физико-химических свойствах и структуре иммуноглобулинов человека (табл. 2.4). Различают 5 классов иммуноглобулинов: IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. Детально изучены структура и функция IgG.

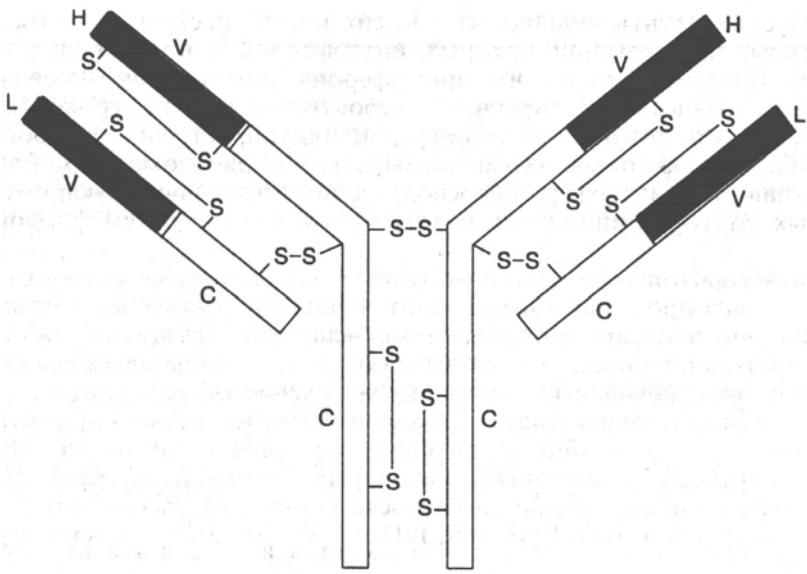
Таблица 2.4. Свойства иммуноглобулинов человека

Свойство	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Коэффициент седиментации, S	6,5–7	19	7	8	8,2
Молекулярная масса	150000	950000	180000	175000	200000
Углеводный состав, %	2–3	10–12	8–10	12,7	10–12
Концентрация в крови, мг%	1300	140	210	3	0,1
Период полужизни, дни	8–21	5,1	5,8	2,8	2–3

Разные классы иммуноглобулинов сильно различаются не только по молекулярной массе, но и по концентрации в крови; имеются данные, что различаются они и по биологическим свойствам.

Подробно изучена структура IgG. Он имеет Y-образную форму и тетрамерное строение; состоит из двух идентичных легких L-цепей (от англ. light) и двух идентичных тяжелых H-цепей (от англ. heavy) с мол. массой 23000–24000 и 50000–70000 соответственно. Известно также, что каждая из этих цепей имеет 2 типа доменов—вариабельные (V) участки, состоящие из 108 аминокислотных остатков, и константные (C) участки, состоящие из 110 и 350 аминокислотных остатков соответственно в L- и H-цепях (рис. 2.5).

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



**Рис. 2.5.** Структура IgG человека. Показаны легкие (L) и тяжелые (H) цепи, дисульфидные связи и вариабельные V (красные) и константные C (светлые) участки.

значительно повышают стабильность 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 мембраны, 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 металла или нескольких металлов (табл. 2.5). 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 мол. массой 400000, 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  $(\text{FeO} \cdot \text{OH})_8 \cdot (\text{FeO} \cdot \text{O} \cdot \text{PO}_3\text{H}_2)_2$ , 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 (называемая апоферритином), а атомы железа координационно связываются с атомами азота пептидных групп.

Трансферрин — растворимый в воде железопrotein (мол. масса 90000), гликопротеин, обнаруживаемый главным образом в сыворотке

Таблица 2.5. Металлопротеины

Металл	Тип биомолекулы	Лиганд	Биологическая функция
Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	Гемоглобин, миоглобин, каталаза, пероксидаза, металлофлавопротеины, цитохромы, железосерные белки, трансферрин, ферритин, нитрогеназа	Гемопорфирины, сера, изоаллоксазин	Транспорт O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , транспорт электронов (окислительно-восстановительные реакции), транспорт и депонирование железа, восстановление N <sub>2</sub> в NH <sub>3</sub>
Cu <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	Цитохромоксидаза, церулоплазмин и др.	Азотистые основания	Окисление, депонирование и транспорт меди
Co <sup>2+</sup>	Витамин B <sub>12</sub> и его коферментные формы	Коррин, бензимидазол, CH <sub>3</sub> -группа	Перенос CH <sub>3</sub> -группы, синтез метионина
Mn <sup>2+</sup>	Аргиназа, декарбоксилазы аминокислот, фосфотрансферазы и др.	Фосфат, имидазол	Декарбоксилирование, перенос фосфатных групп
Mo <sup>2+</sup>	Нитрогеназа, нитратредуктаза, ксантиноксидаза	Не идентифицирован	Связывание и активирование N <sub>2</sub> → NH <sub>3</sub> , окисление пуринов
Zn <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	Карбоангидраза, пептидазы, фосфатазы, НАДФ-ферменты, инсулин	Имидазол, НАД	Связывание субстратов, разрыв пептидной связи
K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	Фосфоенолпируваткарбоксикиназы, АТФазы		Транспорт и освобождение фосфатных групп

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 селезенки. Биологическая роль гемосидерина изучена недостаточно.

Ко второй группе металлопротеинов относится ряд ферментов: ферменты, содержащие связанные с молекулой белка ионы металлов, определяющих их функцию,— металлоферменты (в процессе очистки металлы остаются связанными с ферментами); ферменты, активируемые ионами металлов, менее прочно связаны с металлами, но для проявления своей активности нуждаются в добавлении в реакцию среду определенного металла. Предполагают, что механизмы участия металла в акте катализа в обоих случаях, вероятнее всего, сходны; ионы металла участвуют в образовании тройного комплекса: активный центр фермента—металл—субстрат (E—M—S), или M—E—S, или E—S—M. Есть доказательства, что в активном центре многих ферментов в связывании металла участвует имидазольная группа гистидина.

## Глава 3

# ХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В наше время трудно назвать область естествознания, которую не интересовала бы проблема структуры и функций нуклеиновых кислот. Несмотря на огромный прогресс, достигнутый в последние 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 полимерным веществам. В частности, они обеспечивают хранение и передачу наследственной информации и принимают непосредственное участие в механизмах реализации этой информации путем программирования синтеза всех клеточных белков. Структурные компоненты нуклеиновых кислот выполняют, кроме того, функции кофакторов (коэнзим А, уридиндифосфатглюкоза и др.), аллостерических эффекторов, входят в состав коферментов (никотинамидадениндинуклеотид, флавинадениндинуклеотид и др.), принимая тем самым непосредственное участие в обмене веществ, а также в аккумуляции (накоплении), переносе и трансформации энергии. Они являются предшественниками вторичных посредников (мессенджеров)—циклических мононуклеотидов (цАМФ и цГМФ), выполняющих важную функцию в передаче внутриклеточных сигналов. Подробно основные функции нуклеиновых кислот рассмотрены в главе 14.

**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 (обусловлены 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 с полиаминами (спермин, спермидин) 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 холоде добавлением 2–3 объемов этанола. Этим методом удается получить достаточно очищенные препараты нуклеиновых кислот.

В настоящее время применяют ряд усовершенствованных методов разделения нуклеиновых кислот на фракции из суммарного препарата, полученного описанным методом. Это прежде всего хроматография на геле фосфата кальция, ионообменная хроматография (в качестве адсорбентов используют 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 обнаруживают пуриновые и пиримидиновые основания, углеводы (рибоза и дезоксирибоза) и фосфорную кислоту\*:

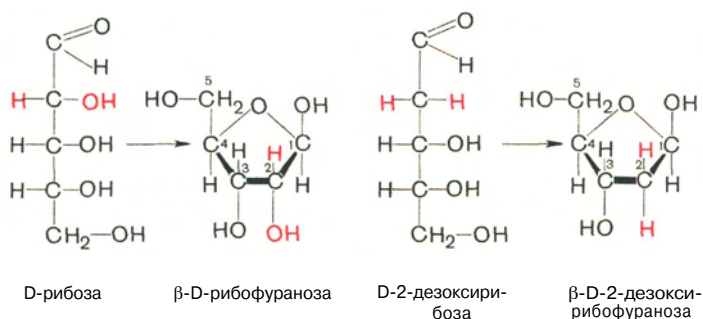
<u>ДНК</u>	<u>РНК</u>
$H_3PO_4$	$H_3PO_4$
Дезоксирибоза	Рибоза
Аденин	Аденин
Гуанин	Гуанин
Цитозин	Цитозин
Тимин	Урацил

В молекуле ДНК углевод представлен дезоксирибозой, а в молекуле РНК – рибозой, отсюда их названия: дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК) кислоты. Кроме того, они содержат фосфорную кислоту, по два пуриновых и по два пиримидиновых основания; различия только в пиримидиновых основаниях: в ДНК содержится тимин, а в РНК – урацил. В составе ДНК и РНК открыты так называемые минорные

\* В составе ДНК открыт также кремний в количестве 0,26–0,31%, поэтому предполагают, что он в нуклеиновых кислотах изоформен фосфору и способен включаться в полинуклеотидную последовательность.

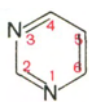
(экзотические) азотистые основания (строение некоторых из них приводится далее).

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

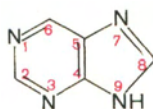


В составе некоторых фаговых ДНК обнаружена молекула глюкозы, которая соединяется гликозидной связью с 5-оксиметилцитозином.

Основу структуры пуриновых и пиримидиновых оснований составляют два ароматических гетероциклических соединения – пиримидин и пурин\*:



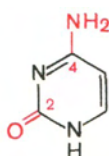
Пиримидин



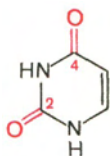
Пурин

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

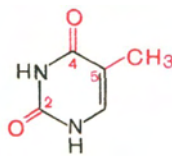
В составе нуклеиновых кислот встречаются три главных пиримидиновых основания: цитозин, урацил и тимин.



Цитозин



Урацил



Тимин

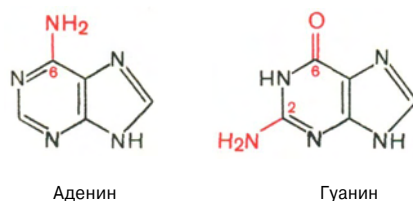
Помимо главных пиримидиновых оснований, в составе нуклеиновых кислот открыты минорные пиримидиновые основания, 5-метил- и 5-оксиметилцитозин, дигидроурацил, псевдоурацил, 1-метилурацил, оротовая кислота, 5-карбоксиурацил, 4-тиоурацил и др. Забегая несколько вперед, укажем, что только для тРНК список минорных оснований приближается к 50. На долю минорных оснований приходится до 10% всех нуклеотидов тРНК, что имеет, очевидно, важный физиологический смысл (защита

\* Для удобства представления структурных формул азотистых оснований и углеводов в дальнейшем в структуре колец опущены атомы С и Н.

молекулы РНК от действия гидролитических ферментов). Структурные формулы ряда минорных пириимидиновых оснований представлены в форме нуклеозидов—соединений с углеводным компонентом:



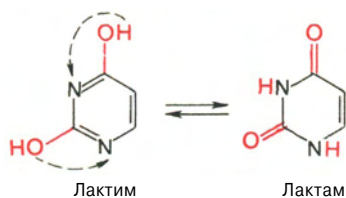
Два пуриновых основания, постоянно встречающихся в гидролизатах нуклеиновых кислот, имеют следующее строение:



К минорным нуклеозидам пуринового ряда, обнаруживаемым в составе ДНК и РНК, относятся инозин, N<sup>6</sup>-метиладенозин, N<sup>2</sup>-метилгуанозин, ксантин, гипоксантин, 7-метилгуанозин и др.



Одним из важных свойств свободных азотистых оснований (содержащих оксигруппы) является возможность их существования в двух таутомерных формах, в частности лактим- и лактамной формах, в зависимости от значения рН среды: при рН 7,0 они представлены в лактамной форме, при снижении величины рН—в лактимной форме. Таутомерные превращения можно представить на примере урацила.



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

О локализации и количественном содержании 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. О количестве РНК нет точных 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 массы. Выделяют три главных вида РНК: матричную (информационную) – мРНК, которая составляет 2–3% от всей клеточной РНК; рибосомную – рРНК, составляющую 80–85% и транспортную – тРНК, которой около 16%. Эти 3 вида различаются нуклеотидным составом и функциями (табл. 3.1).

Таблица 3.1. Свойства РНК у *E.coli* (по А. Ленинджеру)

Тип РНК	Скорость седиментации, ед. Сведберга (S)	Молекулярная масса	Число нуклеотидных остатков	% от общей РНК
мРНК	6–25	250000–1000000	75–3000	2
тРНК	4	23000–30000	75–90	16
рРНК	5	~ 35000	~ 120	82
рРНК	16	~ 550000	~ 1500	
рРНК	23	~ 1100000	~ 3100	

Матричная РНК (мРНК) синтезируется в ядре на матрице ДНК, затем поступает в рибосому, выполняя матричную функцию при синтезе белка (см. главу 14). По предположению акад. А.С. Спирина, часто мРНК при поступлении из ядра в цитоплазму образует со специфическими РНК-связывающими белками комплексы – так называемые информосомы, способные к обратимой диссоциации. Информосомы рассматриваются как транспортная форма мРНК, способствующая образованию полирибосом в цитоплазме. Транспортные РНК (тРНК) имеют небольшую молекулярную массу и содержатся в растворимой фракции цитоплазмы, выполняя функцию переноса аминокислот к месту белкового синтеза – рибосоме. Рибосомные РНК (рРНК), как видно из данных 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).

Субчастица 60S содержит три разных рРНК (5S, 5,8S и 28S рРНК), в то время как субчастица 40S – одну молекулу 18S рРНК. Детально роль рРНК в белковом синтезе пока не выяснена (см. главы 13, 14).

Таблица 3.2. Состав рибосомных РНК эукариот

Размер субчастицы, ед. Сведберга (S)	Молекулярная масса субчастицы	Размер РНК, ед. Сведберга (S)	Молекулярная масса РНК
60 (более 50 белков)	$2,7 \cdot 10^6$	5 5,8	35000 45000
40 (более 30 белков)	$1,3 \cdot 10^6$	28 18	$1,5 \cdot 10^6$ 750000

## СТРУКТУРА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Для понимания ряда особенностей структуры ДНК важное значение имели закономерности состава и количественного содержания азотистых оснований, установленные впервые Э. Чаргаффом. Оказалось, что азотистые основания ДНК обычно варьируют у разных видов организмов, однако почти не претерпевают изменений у одного и того же вида в процессе развития или в зависимости от изменений окружающей среды либо характера питания. Показано также, что ДНК, выделенная из разных тканей одного и того же вида, имеет одинаковый состав азотистых оснований. Полученные количественные соотношения были названы правилами Чаргаффа. При анализе состава очищенной ДНК, выделенной из разных источников, были сделаны следующие выводы:

1) молярная доля пуринов\* 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:

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

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

$$\frac{A}{T} = 1; \quad \frac{G}{C} = 1;$$

4) существенным для характеристики вида (таксономическое значение) оказался так называемый коэффициент специфичности, отражающий отношение

$$\frac{G + C}{A + T}$$

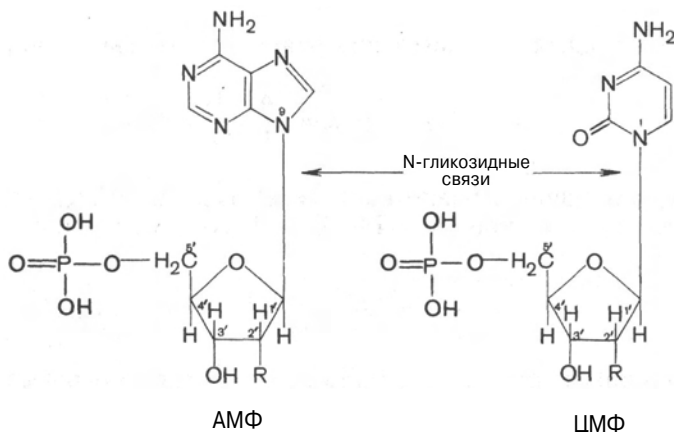
\* Здесь и далее пуриновые и пиримидиновые основания обозначены начальными буквами соответствующего названия.

Это отношение часто выражают в молярных процентах (Г + Ц), или процентах ГЦ-пар. Для животных и большинства растений этот коэффициент ниже 1 (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 (у недрожжевидных грибов, актиномицетов, ряда бактерий и вирусов).

Известно, что структурными единицами нуклеиновых кислот являются мономерные молекулы—моноклеотиды. Следовательно, нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды. Это продукты полимеризации моноклеотидов, число и последовательность расположения которых в цепях ДНК и РНК определяются в строгом соответствии с программой, заложенной в молекуле матрицы (см. главу 14). Моноклеотиды легко образуются при гидролизе ДНК и РНК в присутствии нуклеаз, состоят из трех специфических компонентов: азотистого основания, углевода и фосфорной кислоты. В этой «триаде» моноклеотид углевод занимает среднее положение. Соединения азотистого (любого) основания и углевода (рибозы или дезоксирибозы), получившие название нуклеозидов, легко образуются из моноклеотида 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. Примером могут служить два моноклеотида: аденозин-5'-монофосфорная кислота (АМФ) и цитидин-5'-монофосфорная кислота (ЦМФ):



Р у 2' углерода представлен Н- или ОН-группой в зависимости от типа нуклеиновой кислоты—ДНК или РНК. В образовании N-гликозидной связи в пуриновых нуклеотидах принимают участие N-9 пурина и С-1' пентозы, а в пиримидиновых нуклеотидах—N-1 пиримидина и С-1' пентозы. Чтобы отличить углеродные атомы рибозы или дезоксирибозы от углеродных атомов, входящих в состав пуриновых и пиримидиновых

оснований, первые принято обозначать символом «штрих»: например, атомы у 3-го и 5-го углерода обозначают 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 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.

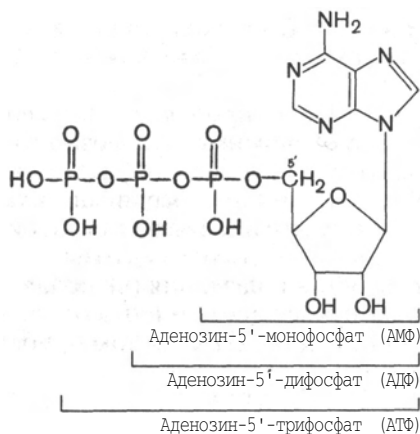
В табл. 3.3 приведены состав и названия (включая тривиальные), а также сокращенные обозначения нуклеозидов и нуклеотидов (для РНК они называются рибонуклеотидами, а для ДНК — дезоксирибонуклеотидами).

Таблица 3.3. Состав нуклеозидов и мононуклеотидов

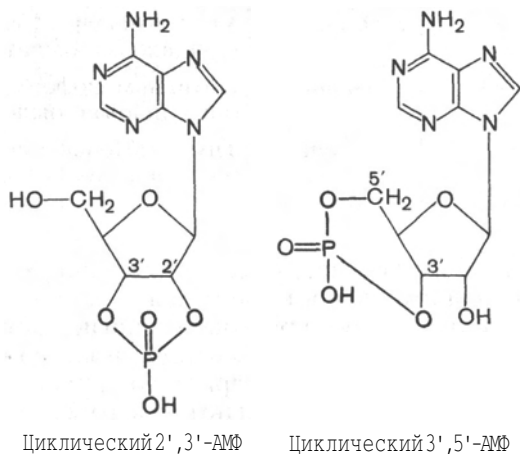
Азотистые основания	Нуклеозиды (основание + углевод)	Мононуклеотиды (нуклеозиды + $H_3PO_4$ )	Сокращенное обозначение	
Пуриновые	Аденин	Аденозин	Аденозинмонофосфат (адениловая кислота)	АМФ
	Гуанин	Гуанозин	Гуанозинмонофосфат (гуаниловая кислота)	ГМФ
Пиримидиновые	Урацил	Уридин	Уридинмонофосфат (уридиловая кислота)	УМФ
	Цитозин	Цитидин	Цитидинмонофосфат (цитидиловая кислота)	ЦМФ
	Тимин	Тимидин	Тимидинмонофосфат (тимидиловая кислота)	ТМФ

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 (соответственно они обозначаются сокращенно АДФ, ГДФ, УДФ, ЦДФ и ТДФ). Последние, присоединяя еще один остаток фосфата, образуют нуклеозидтрифосфаты (соответственно обозначаются АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ и ТТФ).

Следует особо указать, что только свободные нуклеозидтрифосфаты в клетках являясь предшественниками ферментативного синтеза ДНК и РНК (см. главу 13). Однако в клетках имеются свободные, также природные нуклеозидтрифосфаты, не принимающие участия в синтезе белка, но выполняющие жизненно важные функции. В частности, одной из важнейших функций нуклеозидтрифосфатов и особенно АТФ является их участие в биоэнергетике всех живых организмов (см. главу 13). Приводим схему образования молекул аденозинди- и аденозинтрифосфатов (некоторые атомы водорода, как и углерода, в пуриновом ядре и в кольце рибозы опущены):



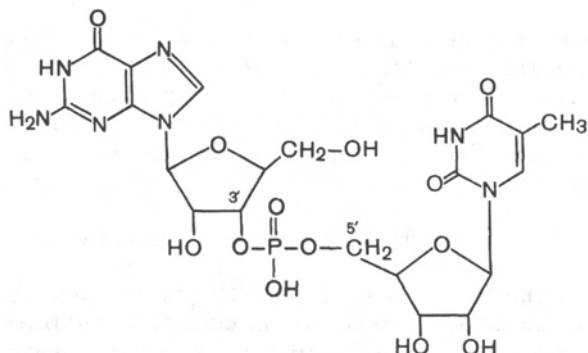
Необходимо указать на существование в организме еще двух типов фосфорных эфиров нуклеотидов, когда фосфат связывает 2 атома кислорода пентозного остатка в одном и том же нуклеотиде и когда фосфатный мостик объединяет два разных мононуклеотида. Примером первого типа являются циклические нуклеотиды 2',3'- 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 (цАМФ) является естественно встречающимся рибонуклеотидом (он образуется из АТФ в процессе реакции, катализируемой ферментом аденилатциклазой). цАМФ наделен рядом уникальных функций и высокой биологической активностью в регуляции процессов обмена, выполняя роль медиатора внеклеточных сигналов в клетках животных. Аналогичной функцией наделены цГМФ, производные УДФ, ЦТФ и нуклеотиды в составе кофакторов и коферментов (см. главу 4).

Примером, когда одна фосфатная группа связывает два разных рибонуклеотида, является структура гуанозилтимидинфосфата:





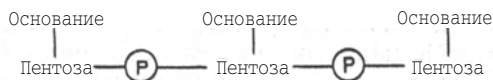
Это соединение хотя и не обнаружено в природе, но содержит тип связи, характерный для природных нуклеиновых кислот. Видно, что С-3' рибозы одного нуклеотида соединяется посредством фосфодиэфирной связи с С-5' рибозы второго нуклеотида.

В медицинской практике, в частности в онкологии, нашли широкое применение синтетические аналоги как азотистых оснований, так нуклеозидов и нуклеотидов. Эти аналоги, имеющие небольшие модификации в структуре основания или углевода, встраиваясь в соответствующие клеточные компоненты, оказывают заметный цитотоксический эффект. К наиболее распространенным лекарственным препаратам—аналогам пуриновых и пиримидиновых оснований (и соответствующим нуклеотидам) относятся 5-фторурацил, 6-тио- и 6-меркаптопурин, 8-азагуанин, 6-азауридин и 6-азациитидин, а также 5-йодпроизводное дезоксиуридина.

Помимо сокращенных названий и обозначений нуклеозидов и нуклеотидов (см. табл. 3.3), приняты буквенные обозначения нуклеозидов (и нуклеотидов): в частности, для аденозина (и АМФ) это 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. Такая цепь 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 весьма сложно. 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:



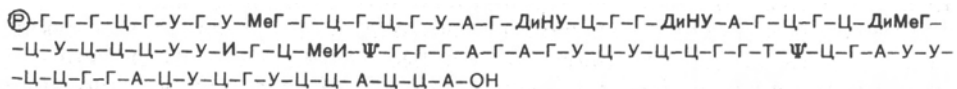
Установлено, что в образовании межнуклеотидной связи участвуют гидроксильные группы в 3'- и 5'-положениях остатков углевода.

К настоящему времени удалось определить первичную структуру почти всех тРНК, ряда молекул 5S рРНК, 16S рРНК *E.coli*, 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 одноцепочечной 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 молекулу РНК, то в качестве конечного нуклеотида будут обнаружены ЦМФ 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:



В этой структуре Р—остаток фосфата,  $\psi$ —псевдоУМФ, МеГ—метилгуанин, ДиНУ—дигидроурацил, ДиМеГ—диметилгуанин, МеИ—метилюозин.

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

Между этими 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 около 75 нуклеотидов.

Матричные (информационные) РНК относятся к наиболее гетерогенному классу нуклеиновых кислот, отличающихся по массе (см. табл. 3.1), структуре, размерам, стабильности и функциям. Основной функцией мРНК является перенос информации от ДНК (точнее, от гена) на белоксинтезирующую систему клетки. мРНК выполняет роль матрицы и, следовательно, определяет первичную структуру синтезируемого белка (подробнее см. главу 14). мРНК наделены рядом особенностей первичной структуры; в частности, на 5'-конце все они содержат определенную после-

\* Другие особенности структуры тРНК рассматриваются в главе 14.

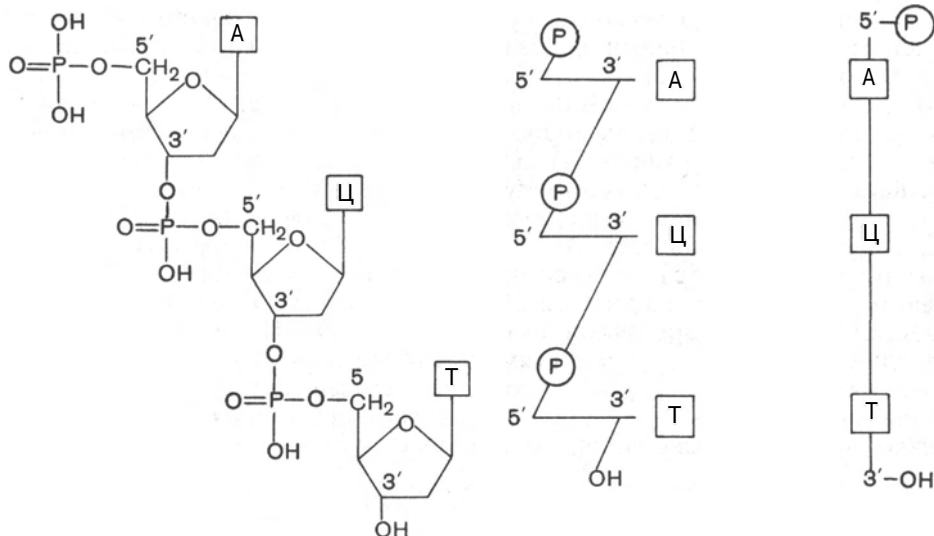
довательность рибонуклеотидов, получившую название шапочки (кэп). Первым нуклеотидом является 7-метилгуанозинтрифосфат, который присоединяется к 5'-гидроксилу соседнего моонуклеотида, представленного 2'-О-метилпуриновым нуклеотидом. На другом 3'-конце большинства (но не всех) мРНК содержится полиадениловая последовательность (поли-А), насчитывающая от 150 до 200 нуклеотидов.

Роль «кэпирования» и «полиаденилирования» мРНК в белковом синтезе окончательно не выяснена. Предполагают, что кэп необходим для специфического узнавания в процессе трансляции, в то время как поли-А отводится роль фактора стабилизации всей молекулы мРНК.

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, уже выяснены нуклеотидные последовательности 23S рРНК *E.coli* и 25S рРНК дрожжевой клетки, а также первичные структуры высокомолекулярных (28S) рРНК клеток эукариот, насчитывающих около 4700 нуклеотидов.

В настоящее время проводятся исследования первичных структур различных молекул ДНК. Около 15 лет назад была полностью расшифрована нуклеотидная последовательность митохондриальной ДНК человека (16569 пар нуклеотидов). Известны полные нуклеотидные последовательности ДНК ряда вирусов и плазмид. Совсем недавно завершено определение нуклеотидных последовательностей геномов двух прокариотических организмов (*Haemophilus influenzae* и *Mycoplasma genitalum*) и появились сообщения о расшифровке генома первого эукариотического организма — дрожжей. Близки к завершению аналогичные исследования генома *E.coli* и генома нематоды *Caenorhabditis elegans*. Исследователи активно работают над полной расшифровкой генома человека.

Результаты секвенирования (определение нуклеотидной последовательности) разных молекул ДНК накапливаются в виде компьютерных банков данных, которые уже доступны для пользователей международных компьютерных сетей (например, «Internet»). Ниже представлены три варианта схемы нуклеотидной последовательности ДНК:



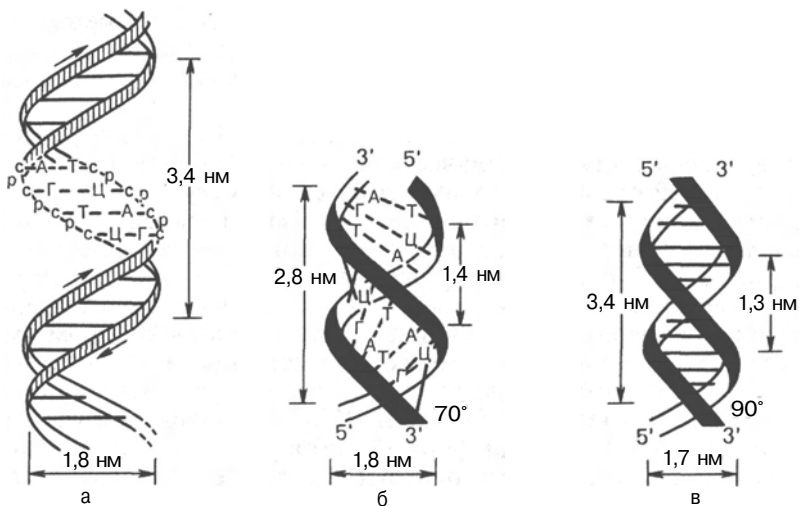
В последнее время о первичной структуре ДНК (точнее, отдельных ее фрагментов) судят по ряду косвенных данных, например, по степени сплоченности нуклеотидных звеньев в молекуле ДНК (определение сводится в конечном счете к выяснению числа и структуры отдельных фракций нуклеотидов, так называемых изоплитов), также по кинетике реассоциации ДНК (метод позволяет выявить наличие в молекуле повторяющихся последовательностей нуклеотидов). О первичной структуре ДНК судят, кроме того, по распределению минорных оснований (имеются данные о существовании подобной закономерности) и 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 методы, а также на методы выделения некоторых генов (или их фрагментов) из природных источников и синтеза генов на мРНК при участии фермента обратной транскриптазы. Для установления первичной структуры ДНК недавно предложен экспресс-метод, включающий применение двух ДНК-полимераз (из *E.coli* и из бактериофага Т4). Однако во всех этих случаях определяется структура небольшого участка ДНК, поэтому полная расшифровка первичной структуры ДНК генома человека ждет своего решения.

## 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 (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 — снаружи\*.

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 ориентация оснований на плоскости не является, очевидно, произвольной, и основания в полинуклеотидах представлены в лактамной форме, наиболее вероятными были признаны пары аденин—тимин и гуанин—цитозин. Этот способ спаривания получил в дальнейшем экспериментальное подтверждение. Избирательность взаимодействия пар А—Т и Г—Ц принято выражать термином «комплементарность», а соответствующие азотистые основания называют комплементарными. Стабильность А—Т оснований обеспечивается двумя водородными связями, а пар Г—Ц — 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

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

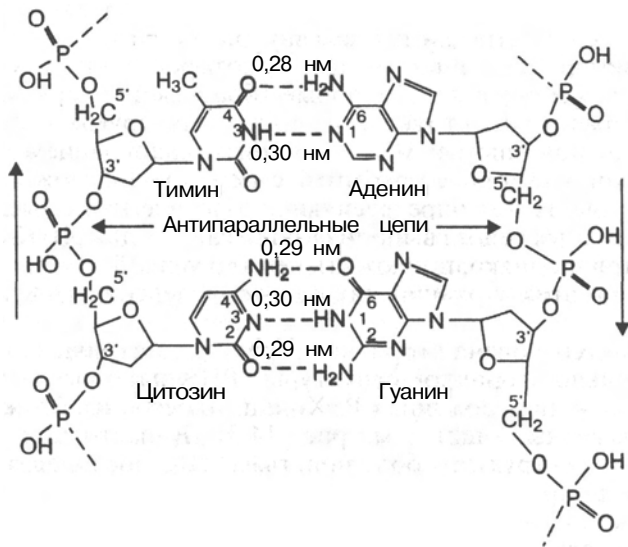


**Рис. 3.1.** Схематическое изображение двойной спирали ДНК.

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

в целом, способствующие образованию весьма компактной структуры и стабилизации всей молекулы\*.

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



\* 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.

На модели ДНК (см. рис. 3.1) видно, что расстояние между витками (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 6 форм ДНК, названных А-, В-, С-, D-, E- и Z-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 моноклеотидов; меняется расстояние между нуклеотидами и др.). Если А- и В-формы представляют собой правозакрученную двойную спираль, то Z-форма (зигзагообразная) ДНК имеет левозакрученную конфигурацию, в которой фосфодиэфирный остов располагается зигзагообразно вдоль оси молекулы. Параллельно фосфодиэфирному остову в структуре А- и В-форм ДНК имеются большая и малая бороздки (желобки) — сайты, где присоединяются белки, выполняющие, очевидно, регуляторные функции при экспрессии генов. В настоящее время есть основание считать, что между А- и В-формами ДНК осуществляются взаимные переходы при изменении концентрации соли и степени гидратации. В-форма ДНК больше всего подходит к модели Уотсона и Крика. В этих переходах, которые могут быть вызваны растворителями или белками, очевидно, заключен определенный биологический смысл. Предполагают, 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).

В структуре ДНК, как и в структуре РНК, открыты нуклеотидные последовательности, получившие название «палиндромы», или перевернутые повторы. Они встречаются как внутри одной цепи, так и в двойной спирали. Например, как слово ротатор, которое одинаково читается как справа налево, так и обратно. Подобные обратные повторы могут служить основой для образования структуры шпикел или других вариаций с измененным внутривещечным и межвещечным спариванием и формированием на отдельных участках тройной спирали. Возможно, эти палиндромные структуры имеют определенный биологический смысл в регуляции экспрессии отдельных генов, выполняя роль сайтов для ДНК-связывающих белков. Предстоит, однако, приложить немало усилий для установления как точной структуры этих вариаций, так и для определения их функциональной роли.

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 (см. рис. 14.3). В настоящее время, когда известна первичная структура большинства тРНК, последовательность всех или почти всех природных тРНК как будто бы укладывается в эту схему «клеверного листа» (см. главу 14). При сравнении этих структур выявляется ряд закономерностей, несомненно, имеющих определенный биологический смысл. Во всех тРНК есть участки, взаимодействующие с рибосомами, места для связывания с аминокислотами и ферментами, а также специфическая последовательность трех нуклеотидов (триплет), называемая антикодонами, которая оказывается комплементарной тринуклеотидной после-

довательности мРНК (кодону), кодирующей включение в белковую молекулу определенной аминокислоты.

Независимо от типа РНК синтезированный в клетке продукт транскрипции (см. главу 13) всегда представлен единственной цепью, упакованной во вторичную структуру не случайно, а в соответствии с программой ДНК. Поскольку в составе РНК имеются свободные 2'-оксигруппы рибозы, не связанные со стандартным крик-уотсоновским спариванием азотистых оснований, появляются дополнительные возможности образования вторичной и третичной структур, содержащих выпуклости, шпильки, или крестообразные структуры. Особенности структуры тРНК имеют прямое отношение к процессу трансляции, поэтому более подробно они рассмотрены в разделе биосинтеза белка (глава 14).

## Третичная структура нуклеиновых кислот

Выделить нативную молекулу ДНК (рис. 3.2) из большинства источников, в частности хромосом, чрезвычайно трудно из-за высокой чувствительности молекулы ДНК к нуклеазам тканей и гидродинамической деструкции\*.

Удалось выделить в интактном (неповрежденном) виде только некоторые ДНК вирусов, митохондрий и хлоропластов. Исследования этих молекул при помощи физических (в частности, кристаллографических) и физико-химических методов показали, что двойная спираль ДНК на некоторых участках может подвергаться дальнейшей спирализации с образованием суперспирали или открытой 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 форм (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 составляет 5 нм. Обычно в ДНК встречаются положительные и отрицательные супервитки, образованные за счет скручивания по часовой (правосторонней) или против часовой стрелки двойной спирали. Образование подобных супервитков катализируется специфическими ферментами, получившими название топоизомераз. Подобные суперспирали соединяются с белками (гистонами), упакованными в бороздках, обеспечивая тем самым стабильность третичной структуры ДНК. Степень суперспиральности (наличие супервитков) молекулы ДНК обычно устанавливают по изменению константы седиментации в определенных условиях. Суперспирализация ДНК может быть нарушена разрывом в одной из цепей или в 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 кра-

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

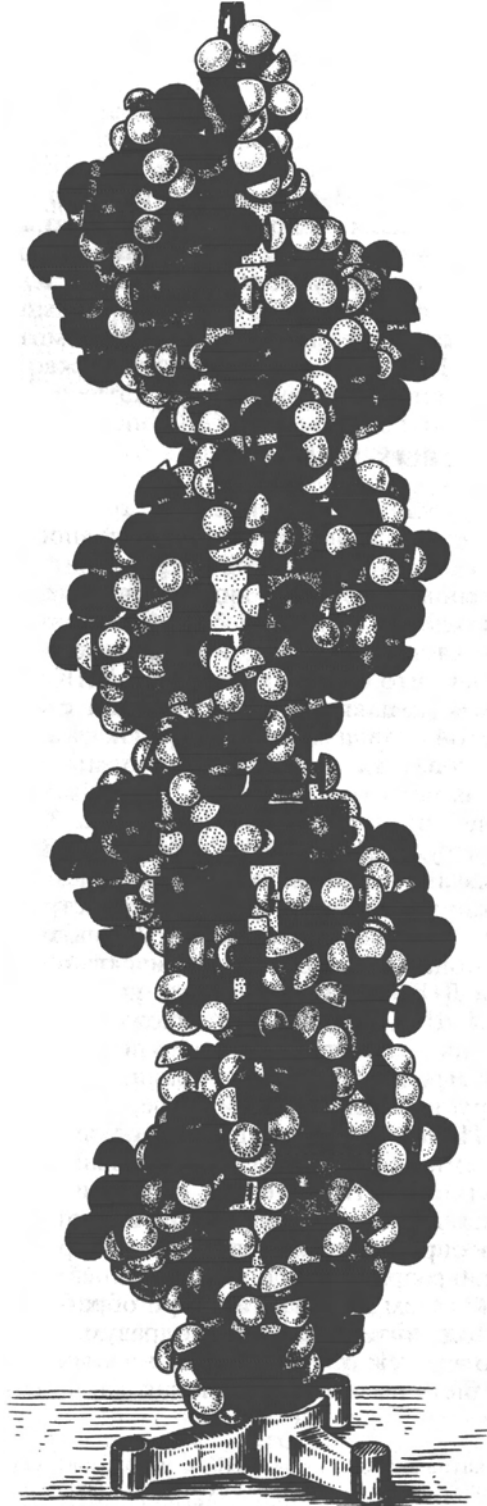


Рис. 3.2. Модель молекулы ДНК.

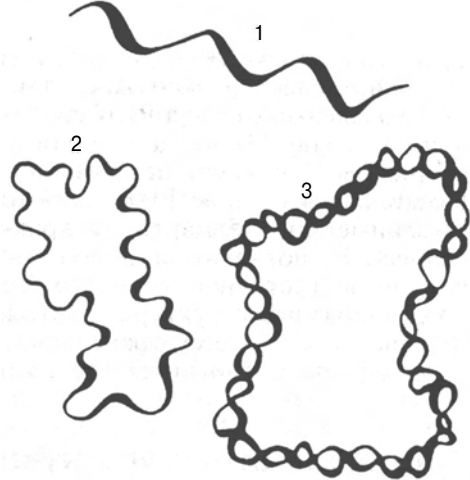


Рис. 3.3. Третичная структура ДНК (схема).

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

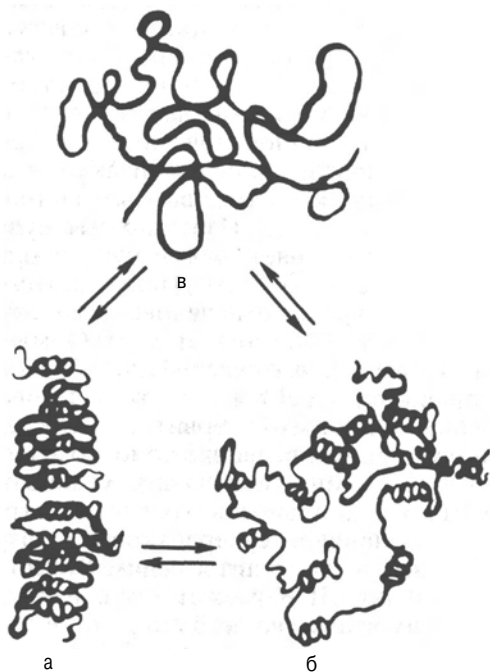


Рис. 3.4. Третичная структура РНК в растворе в зависимости от ионной силы, температуры и рН среды (схема) (по А.С. Спирину и Л.П. Гавриловой).

а - компактная палочка, б - компактный клубок; в - развернутая цепь.



сителями; в интактных клетках она может быть обусловлена ароматическими кольцами аминокислот, что имеет, очевидно, определенный биологический смысл в проблеме белково-нуклеинового узнавания.

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 за счет складывания различных частей молекулы. Следует указать на существование у ряда вирусов (реовирус, вирус раневых опухолей растений и др.) природных двухцепочечных РНК, обладающих однотипной с ДНК структурой. При физиологических значениях рН среды, ионной силы и температуры создаются условия для образования в одноцепочечных матричных и рибосомных РНК множества участков с двойной спиралью («шпильки») и дальнейшего формирования комплементарных участков, определяющих в известной степени жесткость их третичной структуры (рис. 3.4). 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 с высокой скоростью многих тысяч взаимосвязанных химических реакций, включая синтез, распад и взаимопревращение огромного множества разнообразных 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 аппаратом, основой молекулярных механизмов интенсивности 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 используются 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 экспрессия (реализация) наследственной информации, биоэнергетика, синтез и распад биомолекул (обмен веществ). Изучение их способствует 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.

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



**Рис. 4.1.** Области применения ферментов в биологии и медицине (по Грину).

так и посредством определенных низкомолекулярных соединений, в частности субстратов и продуктов реакций, катализируемых этими же ферментами, ингибиторов и др. 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 научно-исследовательские институты по изучению ферментов, издаются специальные журналы, 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: определение структурной макромолекулярной организации ферментов и изучение природы химических взаимодействий, лежащих в основе ферментативного катализа. Накопление экспериментальных данных и развитие теоретических представлений происходят настолько быстро, что любой учебник к моменту выхода в свет уже не отражает достаточно полно современное состояние вопроса о структуре и функциях ферментов.

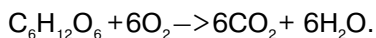
Важно подчеркнуть, что изучение ферментов имеет огромное значение для любой фундаментальной и прикладной области биологии, а также для многих практических отраслей химической, пищевой и фармацевтической индустрии, занятых приготовлением катализаторов, антибиотиков, витаминов и многих других биологически активных веществ, используемых в народном хозяйстве и медицине (рис. 4.1). В фармакологии действие многих лекарственных препаратов основано на определенном, хотя часто

еще не выявленном, механизме взаимодействия их с ферментами. Успехи общей и молекулярной энзимологии способствуют развитию новой ее ветви—медицинской энзимологии, цели и задачи, методологические подходы которой связаны с решением проблем энзимопатологии, энзимодиагностики и энзимотерапии (см. далее). Наука о питании базируется на точных знаниях поэтапного расщепления питательных веществ под влиянием ферментов пищеварительного аппарата, на количественный и качественный состав которых существенное влияние оказывает характер поступающих с пищей веществ. Многие проблемы наследственной патологии человека, развитие врожденных пороков обмена тесно связаны с дефектами или полным отсутствием синтеза специфических ферментов. Проблемы клеточного роста и развития, дифференцировки клеток высших организмов, физиологических функций (движение, перемещение в пространстве, транспорт веществ и ионов, 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 отмечает акад. А.Е. Браунштейн, но и медицина «говорит на языке энзимологии».

## **КРАТКАЯ ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ УЧЕНИЯ О ФЕРМЕНТАХ**

Явления брожения и переваривания известны с незапамятных времен, однако зарождение учения о ферментах (энзимология) относится к первой половине XIX в. Первое научное представление о ферментах было дано еще 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. Этот агент был назван эмульсином. В последующие годы были описаны другие ферменты, в частности пепсин и трипсин, вызывающие распад (гидролиз) белков в пищеварительном тракте.

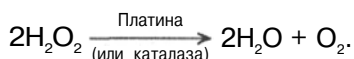
Наибольшее внимание исследователей привлекали процессы окисления в организме. Уже был известен феномен химического катализа, означающий, что многие реакции *in vitro* протекают быстро и энергично в присутствии ничтожных количеств примесей, как будто не участвующих в реакции. Так, была установлена большая каталитическая роль ряда неорганических веществ. Горение глюкозы на воздухе, например, протекает очень медленно, а если 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.  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , 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  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  участвует последовательно около 15 различных ферментов (см. главу 10).

Биологические катализаторы, т.е. ферменты, как оказалось, не вызывают в отличие от неорганических катализаторов каких-либо побочных реакций и не участвуют в реакциях, невозможных по термодинамическим условиям; и те, и другие катализаторы только ускоряют химические реакции, обычно протекающие очень медленно. Примером может служить реакция расщепления перекиси водорода на кислород и воду, медленно протекающая в отсутствие катализатора. При добавлении мелкодробленой платины скорость этой реакции резко возрастает:



Эта же реакция будет протекать 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 вне клетки), если экспериментатору удастся выделить соответствующий фермент (или систему ферментов), катализирующий данную реакцию, и создать оптимальные условия для его действия.

**Горизонты энзимологии.** В литературе появляются работы, в которых делаются попытки прогнозирования дальнейшего развития энзимологии на ближайшее десятилетие. Перечислим основные направления исследований энзимологии будущего. Во-первых, это исследования более тонких деталей молекулярного механизма и принципов действия 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 (синтетические аналоги ферментов), наделенных аналогично нативным ферментам высокой специфичностью действия и каталитической активностью, но лишенных побочных антигенных свойств. В-пятых, исследования в области инженерной энзимологии (белковая инженерия), 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. Наконец, исследования в области медицинской энзимологии, основной целью которых является выяснение молекулярных основ наследственных и соматических болезней человека, в основе развития которых лежат дефекты синтеза ферментов или нарушения регуляции активности ферментов.

## ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА ФЕРМЕНТОВ

В настоящее время получены неопровержимые экспериментальные доказательства белковой природы ферментов \*.

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 сомнений 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 даже при высокой удельной активности оказывалась ниже пороговой чувствительности химического теста на белок.

О белковой природе ферментов свидетельствует факт инактивирования (потеря 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, осаждение 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 ферментов \*\*.

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. В связи с этим 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 1000 кристаллических ферментов. 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 неспособны к диализу через полупрони-

\* Единственным исключением из этого положения является обнаружение у молекулы ряда предшественников РНК ферментативной активности, получившей название рибозима и катализирующей самосплайсинг, т.е. отщепление интронных нетранслируемых последовательностей от предшественника РНК (см. главу 13).

\*\* Некоторые ферменты, помимо белковой части, содержат небелковый компонент, образуя молекулу сложного белка (см. далее).

чаемые мембраны. При помощи диализа их растворы можно освободить от низкомолекулярных примесей. Как и белки, они легко осаждаются из водных растворов при низких температурах методами высаливания или осторожным добавлением ацетона, этанола и других веществ и при этом не теряют своих каталитических свойств.

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

Таблица 4.1. Молекулярная масса ферментов

Фермент	Молекулярная масса	Фермент	Молекулярная масса
Рибонуклеаза	13700	Лактатдегидрогеназа	140000
Цитохром с	15000	Альдолаза	142000
Трипсин	23800	Каталаза	248000
Пепсин	32100	Глутаматдегидрогеназа	336000
Гексокиназа	45000	Уреаза	480000
Щелочная фосфатаза	80000	Пируватдегидрогеназа (комплекс)	4500000

Ферменты оказывают высокоспецифическое действие, 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-Йорке\*.

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 поджелудочной железы\*\*.

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

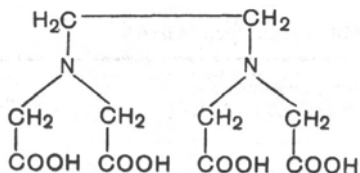
Принимая во внимание перечисленные обстоятельства, при получении ферментов в чистом виде и при их хранении следует учитывать одно важное свойство белков, а именно стабильность, которая определяется рядом факторов. Одним из общих правил при работе с ферментами является оптимальная температура, обычно соответствующая температуре тела, а для препаративных целей—использование температуры около 0°C.

Следует, однако, иметь в виду, что несколько ферментов, весьма чувствительных к пониженной температуре, в частности митохондриальный фермент (АТФаза), катализирующий распад АТФ, при 0°C подвергается инактивации, в то время как при комнатной температуре остается стабильным. Большинство ферментов сохраняет стабильность при рН 6,0–8,0, хотя имеются исключения. Для препаративных целей часто прибегают к обезво-

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

\*\* Осуществлен также искусственный синтез второго фермента—лизоцима, состоящего из 118 аминокислотных остатков.

живанию фермента (удаление воды) в вакууме из замороженного раствора (метод получил название «лиофилизация»). Осаждение из раствора ферментов спиртом или ацетоном также проводят при низкой температуре, поскольку при комнатной температуре эти процедуры приводят к почти полной потере ферментативной активности. Для стабилизации фермента часто пользуются хелатообразующими агентами: например, к ферменту добавляют этилендиаминтетраацетат (ЭДТА):



ЭДТА может связывать нежелательные примеси (следы ионов тяжелых металлов: меди, свинца, ртути и др.—в реактивах), тормозящие активность фермента. Одно из неперенных условий сохранения стабильности ферментов—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. Такими ферментами (простые белки) являются гидролитические ферменты, в частности пепсин, трипсин, папаин, уреаса, лизоцим, рибонуклеаза, фосфатаза и др. Большинство природных ферментов относится к классу сложных белков, содержащих, помимо полипептидных цепей, какой-либо небелковый компонент (кофактор), присутствие которого является абсолютно необходимым для каталитической активности. Кофакторы могут иметь различную химическую природу и различаться 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 (холоэнзим), а кофактор—простетической группы, рассматривающейся как интегральная часть 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» (апофермент), «кофермент» (коэнзим) и «простетическая группа». Под коферментом часто подразумевают дополнительную группу, легко отделяемую от апофермента при диссоциации. Предполагают, что простетическая группа может быть связана с белком ковалентными и нековалентными связями. Так, в молекуле ацетилкоэнзим-А-карбоксилазы кофактор биотин ковалентно связан с апоферментом посредством амидной связи (см. главу 7). 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 фер-



ментативной активности, пока не будет добавлен извне недостающий кофактор. Именно к подобным изолированным низкомолекулярным органическим веществам применим термин «кофермент», типичными представителями которых являются витамины В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, 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 функциональных групп (например, аминных, ацетильных, карбоксильных). В подобных случаях кофермент рассматривают в качестве второго субстрата, или косубстрата.

Роль кофермента (Ко) в качестве переносчика, например, атомов водорода может быть представлена в виде схемы, где SH—субстрат, КоЕ—холофермент, А—акцептор протона:



Субстрат подвергается окислению, отдавая электроны и протоны, а КоЕ—восстановлению, принимая электроны и протоны. В следующей полуреакции восстановленный КоЕН может отдавать электроны и протоны на какой-либо другой промежуточный переносчик электронов и протонов или на конечный акцептор (см. главу 9).

*Коэнзим, кофактор, простетическая группа*—двусмысленный биохимический жаргон. До сих пор продолжается терминологический спор, поскольку часто определения «коэнзим», «кофактор» и «простетическая группа» рассматриваются через призму их роли в реакциях энзиматического (ферментативного) катализа. Следует, однако, считаться с тем неоспоримым фактом, что во многих случаях небелковые органические молекулы, как и ионы металлов, абсолютно необходимы белковому компоненту при выполнении определенной биологической функции, не имеющей отношения к биокатализу. Несомненно, имеют значение также тип и характер связи небелкового компонента с молекулой белка. Поэтому очевидно, что *кофактором* может служить любой фактор, абсолютно необходимый для выполнения белком его каталитической или любой другой биологической роли. С другой стороны, *коферментом* может быть любой небелковый фактор, который непосредственно вовлечен в реакцию энзиматического катализа. Кофактор, который непосредственно не участвует в акте катализа, не является коэнзимом. В то же время *простетическую группу* (ковалентно связанный небелковый компонент, необходимый для определенной функции) можно назвать коферментом, если она непосредственно участвует в энзиматической реакции. Простетическая группа, которая не вовлечена в акт катализа, но функционально является существенным как для фермента, так и для некаталитического белка, может быть названа кофактором. И наконец, кофактор и кофермент, непрочно связанные (или слабо связанные) с ферментом или белком, тем не менее не классифицируются в качестве простетических групп.

Многие двухвалентные металлы ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), как будет показано далее, также выполняют роль кофакторов, хотя они не относятся ни к коферментам, ни к простетическим группам. Известны примеры, когда ионы металлов прочно связаны с белковой молекулой, выполняя функции

простетической группы. В частности, очищенный фермент, катализирующий окисление аскорбиновой кислоты (витамин С) в дезоксиаскорбиновую кислоту, содержит 8 атомов меди на одну молекулу; все они настолько прочно связаны с белковой молекулой, что даже не обмениваются с ионообменными смолами и не отделяются методом диализа. Более того, с помощью метода электронного парамагнитного резонанса показано участие ионов меди в промежуточном переносе электронов. Интересно отметить, что свободные ионы меди также наделены каталитической активностью при окислении аскорбиновой кислоты, однако эта активность повышается во многие тысячи раз, если ионы меди соединяются с апоферментом в единый комплекс—холофермент.

Данные о важнейших коферментах и простетических группах ферментов, включая их наименования и структуру, химическую природу витамина, входящего в их состав, и характер выполняемой биохимической функции в метаболизме, детально рассмотрены в главах 7 и 9–13.

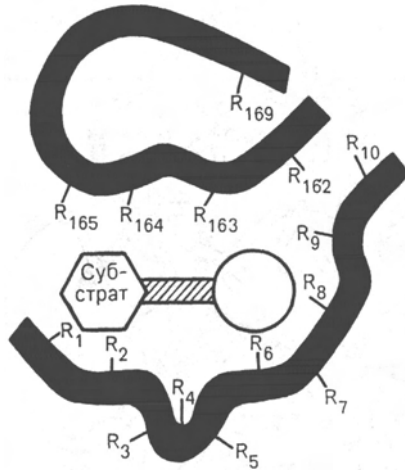
Получены доказательства кофакторной функции в ферментативных реакциях и ряда других биологически активных соединений, не относящихся к витаминам: HS-глутатиона, АТФ, липоевой кислоты, производных нуклеозидов (уридинфосфат, цитидинфосфат, фосфоаденозинфосфосульфат), порфиринсодержащих веществ и др. Сюда же могут быть отнесены тРНК, которые в составе ферментов аминокислот-тРНК-синтетаз принимают активное участие в транспорте аминокислот в рибосоме, где осуществляется синтез белка (см. главу 14).

Следует отметить одну отличительную особенность двухкомпонентных ферментов: ни кофактор отдельно (включая большинство коферментов), ни сам по себе апофермент каталитической активностью не наделены, и только их объединение в одно 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 ферментом, 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 (субстраты) и высокую каталитическую активность. Речь идет, следовательно, о точном знании геометрии и третичной структуры фермента, а также химической природы того участка (участков) молекулы фермента, который обеспечивает высокую скорость каталитической реакции. Участвующие в ферментативных реакциях молекулы субстратов часто имеют небольшие размеры по сравнению с молекулами ферментов, поэтому 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 связывание 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 каталити-



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

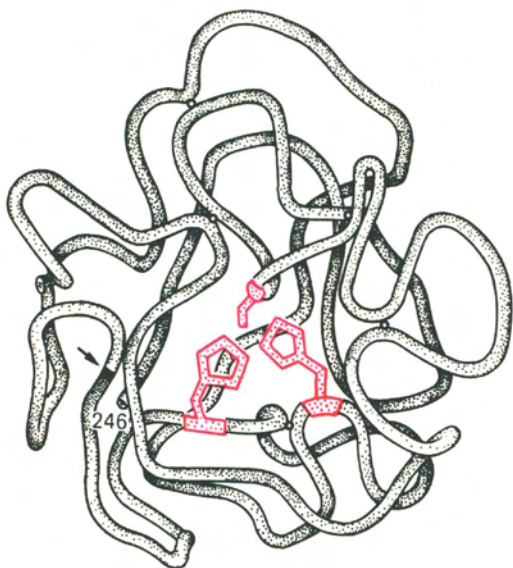
Темные полосы - участки полипептидной цепи фермента; R - аминокислотные остатки и их порядковые номера (с N-конца).

ческий 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 специфическую 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 — проблема первостепенной важности. Она сводится к определению природы аминокислот, их последовательности и взаиморасположения в активном центре. Для идентификации так называемых существенных аминокислотных остатков используют специфические ингибиторы ферментов (часто это субстратоподобные вещества или аналоги коферментов), методы «мягкого» (ограниченного) гидролиза в сочетании с химической модификацией, включающей избирательное окисление, связывание, замещение остатков аминокислот и др.

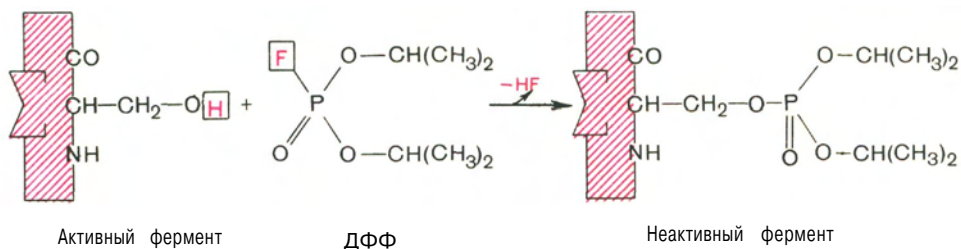
При помощи методов ингибиторного анализа были предприняты попытки установить закономерности состава и структуры активных центров у ферментов, относящихся к разным группам. В частности, при использо-



**Рис. 4.3.** Гипотетическая модель третичной структуры молекулы предшественника химотрипсина (по Нейрату).

Цветом выделены остатки серина и гистидина; стрелкой обозначено место отщепления N-концевого участка полипептидной цепи.

вании диизопропилфторфосфата (ДФФ), принадлежащего к так называемым нервным ядам, наблюдается 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, 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 (табл. 4.2).

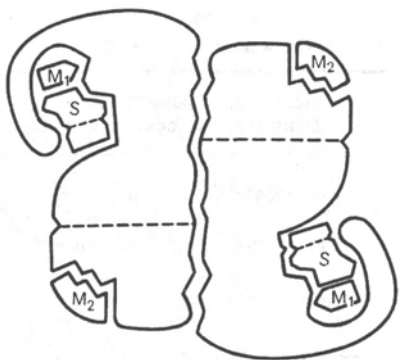
Из данных табл. 4.2 видно, что ферменты, сходные по типу действия, хотя и различаются специфичностью, могут иметь почти одинаковую последовательность аминокислотных остатков в тех участках, которые примыкают к остатку серина, несущему функционально активную гидроксильную группу. Существенное значение ОН-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 (E. coli)	–Тре–Асп–Сер–Ала–Сер–Ала–
Субтилизин (B. subtilis)	–Гли–Тре–Сер–Мет–Ала–
Протеаза (Aspergillus orizae)	–Тре–Сер–Мет–Ала–
Фосфоглюкомутаза	–Тре–Ала–Сер–Гис–Асп–
Фосфоорилаза	–Гли–Иле–Сер–Вал–Арг–

Предполагают, что формирование активного центра фермента начинается уже на ранних этапах синтеза белка-фермента (см. главу 14) на рибосоме, когда линейная одномерная структура пептидной цепи превращается в трехмерное тело строго определенной конфигурации. Образовавшийся белок приобретает информацию совершенно нового типа, а именно функциональную (в частности, каталитическую). 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 (см. рис. 1.13).

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 (эффекторы, или модификаторы), молекулы которых отличаются по структуре от субстратов. Присоединение эффектора к аллостерическому центру изменяет третичную и часто также четвертичную структуру молекулы фермента и соответственно конфигурацию активного центра, вызывая снижение или повышение энзиматической активности. Ферменты, активность каталитического центра которых



**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).

подвергается изменению под влиянием аллостерических эффекторов, связывающихся с аллостерическим центром, получили название аллостерических ферментов\*.

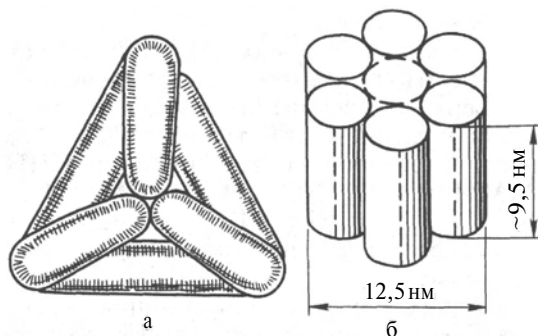
Отличительной особенностью ряда аллостерических ферментов является наличие в молекуле олигомерного фермента нескольких активных центров и нескольких аллостерических регуляторных центров, пространственно удаленных друг от друга. В аллостерическом ферменте каждый из двух симметрично построенных протомеров содержит один активный центр, связывающий субстрат S, и один аллостерический центр, связывающий эффектор  $M_2$ , т.е. 2 центра в одной молекуле фермента (рис. 4.4). Получены доказательства, что для субстрата аллостерические ферменты, помимо активного центра, содержат и так называемые эффекторные центры; 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 называть гомотропными взаимодействиями, а взаимодействия между центрами, связывающими лиганды разных типов, — гетеротропными взаимодействиями.

Таким образом, приведенные сведения о химической природе активного центра и аллостерических участках свидетельствуют о том, что в энзиматическом катализе, как и в реакции связывания субстрата, участвует не ограниченная и небольшая часть фермента, как предполагалось ранее, а значительно большая часть молекулы белка-фермента. Этими обстоятельствами, вероятнее всего, можно объяснить большие размеры и объемность трехмерной структуры молекулы фермента; эти же обстоятельства следует учитывать в программах создания искусственных низкомолекулярных аналогов ферментов (синзимов), обладающих свойствами нативных ферментов (см. ранее).

## ИЗОФЕРМЕНТЫ

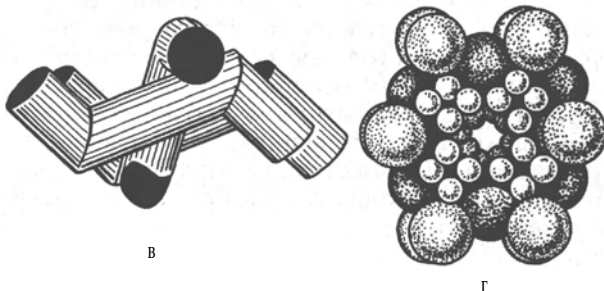
Изоферменты, или изоэнзимы, — это множественные формы фермента, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся друг от друга по физическим и химическим свойствам, в частности по сродству к субстрату,

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



**Рис. 4.5.** Модели строения некоторых олигомерных ферментов.

а - молекула глутаматдегидрогеназы, состоящая из 6 протомеров (общая мол. м. 336000); б - молекула РНК-полимеразы; в - половина молекулы каталазы; г - молекулярный комплекс пивуатдегидрогеназы.



максимальной скорости катализируемой реакции (активности), электрофоретической подвижности или регуляторным свойствам.

В живой природе имеются ферменты, молекулы которых состоят из двух и более субъединиц, обладающих одинаковой или разной первичной, вторичной или третичной структурой. Субъединицы нередко называют протомерами, а объединенную олигомерную молекулу – мультимером (рис. 4.5; см. главу 1).

Считают, что процесс олигомеризации придает субъединицам белков повышенную стабильность и устойчивость по отношению к действию денатурирующих агентов, включая нагревание, влияние протеиназ и др. Однако на нынешнем этапе 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 методы жесткой обработки (экстремальные значения рН, высокие концентрации гуанидинхлорида 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.

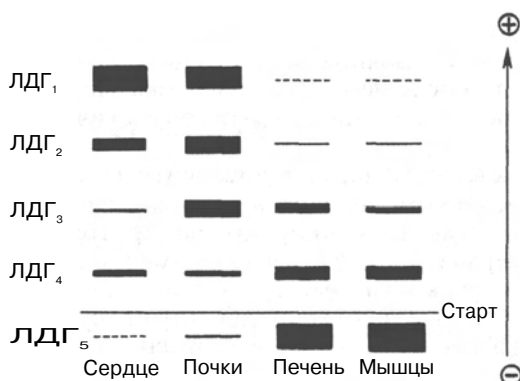
Следует указать на отсутствие ковалентных, главновалентных связей между субъединицами. Связи в основном являются нековалентными, поэтому такие ферменты довольно легко диссоциируют на протомеры. Удивительной особенностью таких ферментов является зависимость активности всего комплекса от способа упаковки между собой отдельных субъединиц. Если генетически различимые 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 получили название изоферментов (изоэнзимов или, реже, изозимов). В частности, если фермент состоит из 4 субъединиц двух разных типов—Н и М (сердечный и мышечный), то активный фермент может представлять собой одну из следующих комбинаций: НННН, НННМ, ННММ, НМММ, ММММ, или  $H_4$ ,  $H_3M$ ,  $H_2M_2$ ,  $HM_3$ ,  $M_4$ , соответствующую изоферментам ЛДГ<sub>1</sub>, ЛДГ<sub>2</sub>, ЛДГ<sub>3</sub>, ЛДГ<sub>4</sub> и ЛДГ<sub>5</sub>. При этом синтез Н- и М-типов осуществляется различными генами и в разных органах экспрессируется по-разному.

В одних случаях субъединицы имеют почти идентичную структуру и каждая содержит каталитически активный участок (например,  $\beta$ -галактозидаза, состоящая из 4 субъединиц). В других случаях субъединицы оказываются неидентичными. Примером последних может служить триптофансинтаза, состоящая из 2 субъединиц, каждая из которых наделена собственной (но не основной) 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 4 ферментов, множественность форм которого детально изучена методом гель-электрофореза, является ЛДГ, катализирующая обратимое превращение пировиноградной 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 ( $H_4$ ), при электрофорезе будет мигрировать с наибольшей скоростью в электрическом поле к положительному электроду (аноду). С наименьшей скоростью будет продвигаться к аноду изофермент  $M_4$ , в то время как остальные изоферменты будут занимать промежуточные позиции. Следует подчеркнуть, что изоферменты ЛДГ, обладая почти одинаковой ферментативной активностью, различаются некоторыми физико-химическими свойствами: молекулярной массой, электрофоретической подвижностью, отношением к ак-



**Рис. 4.6.** Распределение и относительные количества изоферментов ЛДГ в различных органах. Экстракты нанесены на линию, отмеченную надписью «Старт». При заданных условиях опыта (рН) 4 изофермента ЛДГ движутся к аноду, а один (ЛДГ<sub>5</sub>) — к катоду. Красным цветом выделены основные изоформы ЛДГ для данного органа.



тиваторам 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. ЛДГ<sub>1</sub>, а в скелетных мышцах и печени —  $M_4$  (ЛДГ<sub>5</sub>) (рис. 4.6). Эти обстоятельства широко используются в клинической практике, поскольку изучение появления изоферментов ЛДГ (и ряда других ферментов) в сыворотке крови может представлять 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 прочность ассоциации ферментов и определенная последовательность прохождения промежуточных стадий во времени, обусловленная порядком расположения каталитически активных (различных) белков в пространстве («путь» превращения в пространстве и времени). Типичными примерами подобных мультиферментных комплексов являются пируватдегидрогеназа и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа, катализирующие соответственно окислительное декарбоксилирование пирувиновой и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот в животных тканях (см. главу 10), и синтетаза высших жирных кислот (см. главу 11). Молекулярные массы этих комплексов в зависимости от источника их происхождения варьируют от  $2,3 \cdot 10^6$  до  $10 \cdot 10^6$ . 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 продуктов 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 надмолекулярные системы, обеспечивающие жизненно важные функции, например тканевое дыхание (перенос электронов от субстратов к кислороду через систему дыхательных ферментов).

## **МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ**

Структура и функции ферментов, а также механизм их действия почти ежегодно подробно обсуждаются на многих международных симпозиумах и конгрессах. Важное место отводится рассмотрению структуры всей молекулы фермента и ее активных центров, молекулярному механизму действия различных типов ферментов, общей теории энзиматического катализа. Тем не менее до сих пор нет полной ясности по двум кардинальным проблемам энзимологии: чем вызваны специфичность действия и высокая каталитическая эффективность ферментов?

До установления химической природы ферментов гипотезы о механизме их действия опирались на исследования кинетики и модельные опыты химического гомогенного катализа. Повышение скорости химических реак-

ций под действием ферментов объясняли следующим: а) активированием субстрата в результате образования адсорбционных или молекулярных, обратимо диссоциирующих фермент-субстратных комплексов; б) цепным механизмом 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 80 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 и продуктов реакции P. Благодаря высокому средству связывания и образованию ES-комплекса резко возрастает число молекул субстрата, вступающих в реакции. Эти представления легли в основу теории «ключа-замка» Э. Фишера, которую иногда называют теорией «жесткой матрицы». Таким образом, жесткая структура активного центра оказывается элементарной молекулярной структуре субстрата, обеспечивая тем самым высокую специфичность фермента.

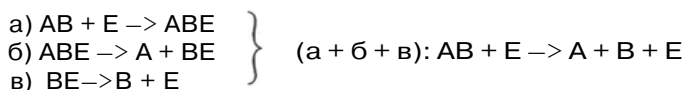
Л. Михаэлис не только постулировал образование промежуточного фермент-субстратного ES-комплекса, но и рассчитал влияние концентрации субстрата на скорость реакции. В процессе реакции различают несколько стадий: присоединение молекулы субстрата к ферменту, преобразование первичного промежуточного соединения в один или несколько последовательных (переходных) комплексов и протекающее в одну или несколько стадий отделение конечных продуктов реакции от фермента. Это 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:

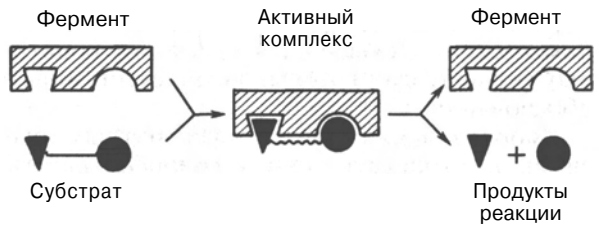


В реакциях катаболизма, например  $AB \rightarrow A + B$ :

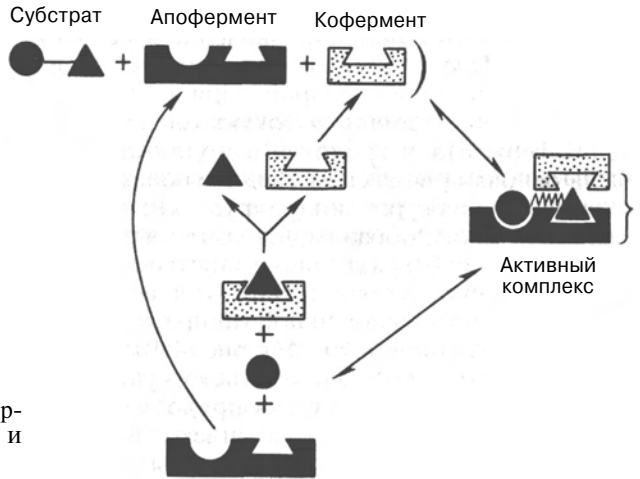


На рис. 4.7 представлена схема образования промежуточного фермент-субстратного комплекса. Если фермент в активном центре содержит кофермент, то предполагается образование тройного комплекса (рис. 4.8).

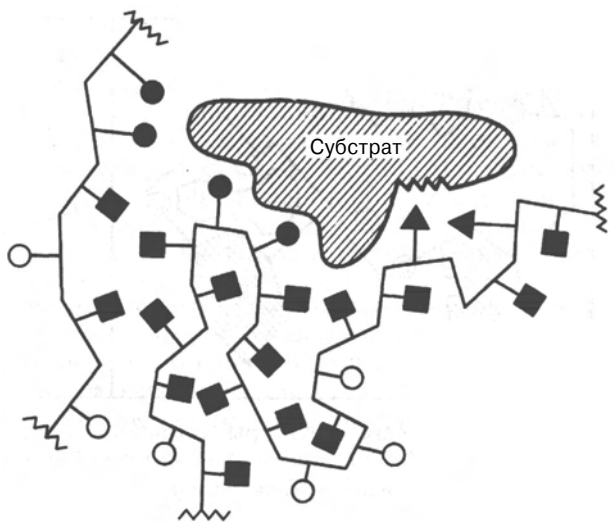
Фермент вступает во взаимодействие с субстратом на очень короткий период, поэтому долгое время не удавалось показать образование такого комплекса. Прямые доказательства существования фермент-субстратного комплекса были получены в лабораториях Д. Кейлина и Б. Чанса. В настоящее время экспериментальные и математические методы кинетики, термодинамики и статической механики химических реакций позволяют



**Рис. 4.7.** Образование нестойкого фермент-субстратного комплекса согласно теории Э. Фишера «ключ-замок».



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

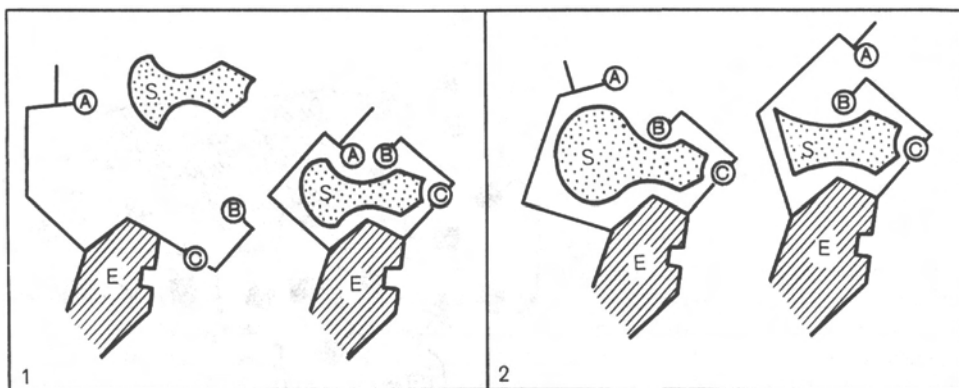


**Рис. 4.9.** Образование нековалентных связей между ферментом и субстратом (схема).

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 в ряде случаев также ковалентные, координационные связи (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  $\alpha$ -спиралей чередуются с гибкими, эластичными линейными отрезками, обеспечивающими динамические изменения белковой молекулы фермента. Этим изменениям придается большое значение в некоторых теориях ферментативного катализа. Так, в противоположность модели Э. Фишера «ключ-замок» Д. Кошлендом была разработана теория «индуцированного соответствия», допускающая высокую конформационную лабильность молекулы белка-фермента и гибкость и подвижность активного центра. Эта теория была основана на весьма убедительных экспериментах, свидетельствующих о том, что субстрат индуцирует конформационные изменения молекулы фермента таким образом, что активный центр принимает необходимую для связывания субстрата пространственную ориентацию. Иными словами, фермент только в присутствии (точнее, в момент присоединения) субстрата будет находиться в активной (напряженной) Т-форме в отличие от неактивной R-формы (рис. 4.10). На рис. 4.10 видно, что присоединение субстрата S к ферменту E, вызывая соответствующие изменения конформации активного центра, в одних случаях приводит к образованию активного комплекса, в других — неактивного комплекса вследствие нарушения пространственного расположения функциональных групп активного центра в промежуточном комплексе. Получены экспериментальные доказательства нового положения о том, что постулированное Д. Кошлендом «индуцированное соответствие» субстрата и фермента создается не обязательно изменениями

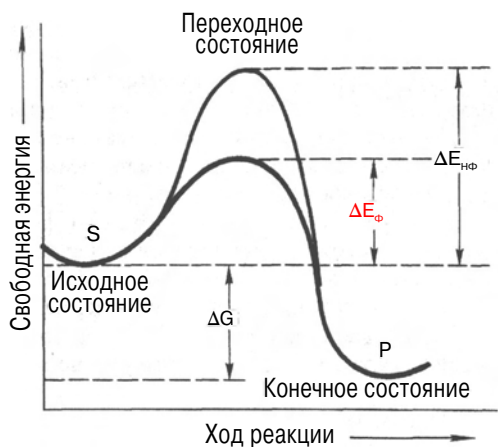


**Рис. 4.10.** Изменения структуры активного центра фермента, вызванные субстратом, согласно модели «индуцированного соответствия» Д. Кошленда.

A, B, C - функциональные группы активного центра; 1 - активный комплекс; 2 - неактивный комплекс.

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

S - исходный субстрат; P - продукт;  $\Delta E_{\text{нф}}$  - энергия активации неферментативной реакции;  $\Delta E_{\text{Ф}}$  - энергия активации ферментативной реакции;  $\Delta G$  - стандартное изменение свободной энергии.



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 активации\*. 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). На рисунке видно, что ферментативная реакция имеет более низкую энергию активации. Следует отметить, что как катализируемая ферментом, так и не катализируемая им реакция независимо от ее пути имеет одинаковую величину стандартного изменения свободной энергии ( $\Delta G$ ). Действуя на скорость реакции, ферменты не изменяют равновесия между прямой и обратной реакциями, как и не влияют на величину свободной энергии реакции; они лишь ускоряют наступление равновесия химической реакции.

Зависимость между константой равновесия и изменением свободной энергии реагирующих веществ математически принято выражать уравнением  $\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K$ , где  $R$  – газовая постоянная;  $T$  – абсолютная температура в Кельвинах;  $\ln K$  – натуральный логарифм константы равновесия;  $\Delta G$  – стандартное изменение свободной энергии, Дж/моль. Из представленного уравнения вытекает, что при

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

высоком значении  $K$  величина  $\Delta G$  оказывается отрицательной. Подобные реакции сопровождаются уменьшением свободной энергии. При низком значении  $K$  величина  $\Delta G$  оказывается положительной. Если константа равновесия равна единице, то изменение свободной энергии будет равно нулю и реакция легкообратима.

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- и глюкозо-1-фосфата при достижении химического равновесия. В состоянии равновесия содержание 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 температуре  $25^\circ\text{C}$  происходит уменьшение свободной энергии системы на 7329 Дж.

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

## 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 (ферментов, субстратов) и условий их взаимодействия (концентрация, pH среды, температуры, присутствие активаторов или ингибиторов) на скорость ферментативной реакции. Главной целью изучения кинетики ферментативных реакций является получение информации, которая может способствовать выяснению молекулярного механизма действия фермента.

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 реакции:  $v_{-1} = k_{-1}[C] \cdot [D]$ , т.е.  $v_{+1} = v_{-1}$  соответственно  $k_{+1}[A] \cdot [B] = k_{-1}[C] \cdot [D]$ , или

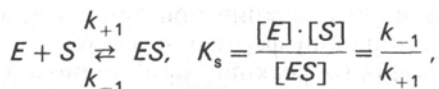
$$\frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]}, \quad \text{отсюда} \quad \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = K_p.$$

**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.



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:

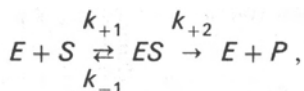
$$v = - \frac{d[S]}{dt} = k'[S],$$

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 ( $\text{мин}^{-1}$  или  $\text{с}^{-1}$ ).

При высокой концентрации субстрата скорость реакции максимальна, 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 протекает в виде следующей химической реакции:



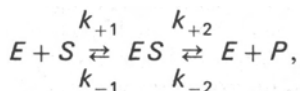
т.е. фермент  $E$  вступает во взаимодействие с субстратом  $S$  с образованием промежуточного комплекса  $ES$ , который далее распадается на свободный фермент и продукт реакции  $P$ . Математическая обработка на основе закона действующих масс дала возможность вывести уравнение, названное в честь авторов 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 влияние на скорость ферментативного процесса продуктов реакции, например в реакции



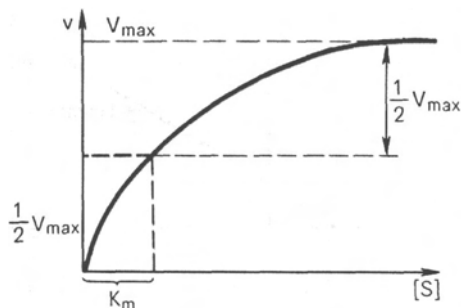
и носит несколько ограниченный характер. Поэтому были предприняты попытки усовершенствовать его. Так, было предложено уравнение Бриггса–Холдейна:

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

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

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





**Рис. 4.13.** Кривая уравнения Михаэлиса-Ментен: гиперболическая зависимость начальных скоростей катализируемой ферментом реакции от концентрации субстрата.

В числителе представлены константы скоростей распада комплекса ES в двух направлениях (в сторону исходных E и S и в сторону конечных продуктов реакции E и P). Отношение  $k_{-1}/k_{+1}$  представляет собой константу диссоциации ферментсубстратного комплекса  $K_s$ , тогда:

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

Отсюда вытекает важное следствие: константа Михаэлиса всегда больше константы 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  $v = 1/2 V_{max}$ . 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

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

Таким образом, константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата (моль/л), при которой скорость данной ферментативной реакции составляет половину от максимальной\*.

Определение величины  $K_m$  имеет важное значение при выяснении механизма действия эффекторов на активность ферментов и т.д. Константу Михаэлиса можно вычислить по графику (рис. 4.13). Отрезок на абсциссе, соответствующий скорости, равной половине максимальной, будет представлять собой  $K_m$ .

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.

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



Рис. 4.14. График Лайнуивера-Бэрка.

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

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

или

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

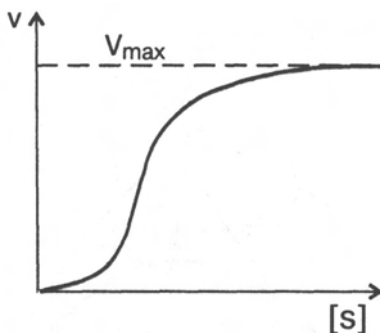
то после преобразования получаем уравнение:

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

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 который будет равен величине  $K_m/V_{max}$ ; отрезок, отсекаемый прямой от оси ординат, представляет собой  $1/V_{max}$  (обратная величина максимальной скорости). Если продолжить прямую линию за ось ординат, тогда на абсциссе отсекается отрезок, соответствующий обратной величине константы Михаэлиса —  $1/K_m$  (см. рис. 4.14). Таким образом, величину  $K_m$  можно вычислить из данных наклона прямой и длины отрезка, отсекаемого от оси ординат, или из длины отрезка, отсекаемого от оси абсцисс в области отрицательных значений.

Следует подчеркнуть, что значения  $V_{max}$ , как и величину  $K_m$ , более точно, чем по графику, построенному в прямых координатах, можно определить по графику, построенному по методу двойных обратных величин. Поэтому данный 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  $[S]$ .

Следует отметить некоторые ограничения применения уравнения Михаэлиса–Ментен, обусловленные множественными формами ферментов и аллостерической природой фермента. В этом случае график зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата (кинетическая



**Рис. 4.15.** Сигмоидная кинетическая кривая насыщения субстратом.

кривая) имеет не гиперболическую форму, а сигмоидный характер (рис. 4.15) наподобие кривой насыщения гемоглобина кислородом. Это означает, что связывание одной молекулы субстрата в одном каталитическом центре повышает связывание субстрата с другим центром, т.е. имеет место кооперативное взаимодействие, как и в случае присоединения кислорода к 4 субъединицам гемоглобина. Для оценки концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной, в условиях сигмоидного характера кинетической кривой обычно применяют преобразованное уравнение Хилла:

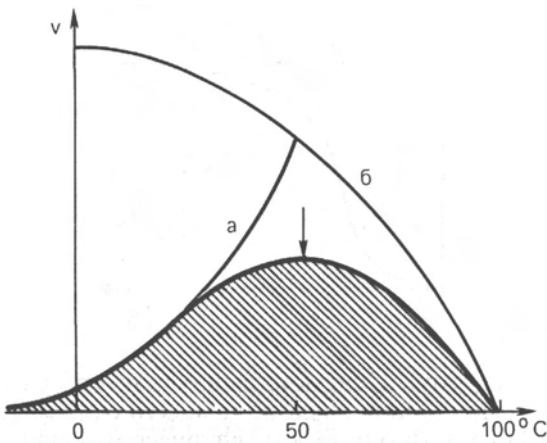
$$\log \frac{v}{V_{\max} - v} = n \log [S] - \log K',$$

где  $K'$  — константа ассоциации;  $n$  — число субстратсвязывающих центров.

## ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

К ферментам применимы три основных критерия, характерных и для неорганических катализаторов. В частности, они остаются неизменными после реакции\*, т.е. освобождаясь, могут вновь реагировать с новыми молекулами субстрата (хотя нельзя исключить побочных влияний условий среды на активность фермента). Ферменты способны оказывать 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 температуре  $37^\circ\text{C}$ ). Наличие либо отсутствие фермента или любого другого катализатора не оказывает влияния на величину константы равновесия и свободной энергии ( $\Delta G$ ). Катализаторы лишь повышают скорость, с которой система приближается к термодинамическому равновесию, не сдвигая точки равновесия. Химические реакции с высокой константой равновесия и отрицательной величиной  $\Delta G$  принято называть экзергоническими. Реакции с низкой константой равновесия и соответственно положительной величиной  $\Delta G$  (они обычно не протекают спонтанно) называются эндергоническими. Для начала и завершения этих реакций необходим приток

\* Доказано, что некоторые ферменты в процессе химической реакции подвергаются модификации и даже распаду под действием конечных продуктов реакции, а не освобождаются в неизменном виде, как утверждал Л. Михаэлис; типичный пример — цитохромы класса P450.



**Рис. 4.16.** Зависимость скорости катализируемой ферментом реакции от температуры.

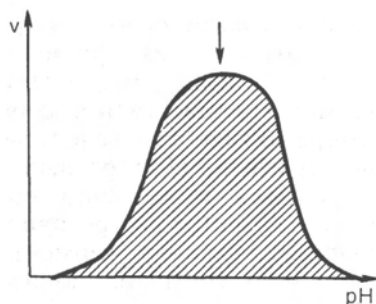
а - повышение скорости реакции как функция температуры; б - снижение скорости реакции как функция денатурации белка-фермента; стрелка указывает оптимум температуры.

энергии извне. В живых системах экзергонические процессы обычно 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.

**Термолабильность ферментов.** Скорость химических реакций зависит от температуры, поэтому катализируемые ферментами реакции также чувствительны к изменениям температуры. Установлено, что скорость большинства биохимических реакций повышается в 2 раза при повышении температуры на  $10^{\circ}\text{C}$  и, наоборот, снижается в 2 раза при понижении температуры на  $10^{\circ}\text{C}$ . Этот показатель получил название температурного коэффициента. 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  $45\text{--}50^{\circ}\text{C}$ , скорость реакции увеличивается согласно теории химической кинетики. При температуре выше  $50^{\circ}\text{C}$  на скорость реакции большое влияние начинает оказывать тепловая денатурация белка-фермента, приводящая к полному прекращению ферментативного процесса (рис. 4.16).

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. 4.16). При температуре  $100^{\circ}\text{C}$  почти все ферменты утрачивают свою активность (исключение составляет, очевидно, только один фермент мышечной ткани—миокиназа, которая выдерживает нагревание до  $100^{\circ}\text{C}$ ). Оптимальной для действия большинства ферментов теплокровных животных является температура  $40^{\circ}\text{C}$ ; в этих условиях скорость реакции оказывается максимальной вследствие увеличения кинетической энергии реагирующих молекул. При низких температурах ( $0^{\circ}\text{C}$  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



**Рис. 4.17.** Зависимость скорости катализируемой ферментом реакции от pH (стрелка указывает оптимум pH).

между скоростью инактивации фермента и степенью денатурации белка. Следует отметить, что на термоллабильность ферментов определенное влияние оказывает концентрация субстрата, pH среды и другие факторы.

**Зависимость активности ферментов от pH среды.** Ферменты обычно наиболее активны в пределах узкой зоны концентрации водородных ионов, соответствующей для животных тканей в основном выработанным в процессе эволюции физиологическим значениям pH среды 6,0–8,0. При графическом изображении на кривой колоколообразной формы имеется определенная точка, в которой фермент проявляет максимальную активность; эту точку называют оптимумом pH среды для действия данного фермента (рис. 4.17). При определении зависимости активности фермента от концентрации водородных ионов реакцию проводят при разных значениях pH среды, обычно при оптимальной температуре и наличии достаточно высоких (насыщающих) концентраций субстрата. В табл. 4.3 приводятся оптимальные значения pH среды для ряда ферментов.

**Таблица 4.3. Оптимальные значения pH для некоторых ферментов**

Фермент	pH	Фермент	pH
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	7,0–8,5
		панкреатическая	
Сахараза кишечная	5,8–6,2	Трипсин	7,5–8,5
Амилаза слюны	6,8–7,0	Аргиназа	9,5–10,0

Из данных табл. 4.3 видно, что pH-оптимум действия ферментов лежит в пределах физиологических значений. Исключение составляют пепсин, pH-оптимум которого 2,0 (при pH 6,0 он не активен и не стабилен). Объясняется это, во-первых, структурной организацией молекулы фермента и, во-вторых, тем, что пепсин является компонентом желудочного сока, содержащего свободную соляную кислоту, которая создает оптимальную кислотную среду для действия этого фермента. С другой стороны, pH-оптимум аргиназы лежит в сильнощелочной зоне (около 10,0); такой среды нет в клетках печени, следовательно, *in vivo* аргиназа функционирует, по-видимому, не в своей оптимальной зоне pH среды.

Согласно современным представлениям, влияние изменений pH среды на молекулу фермента заключается в воздействии на состояние и степень

ионизации кислотных и основных групп (в частности, СООН-группы дикарбоновых аминокислот, SH-группы цистеина, имидазольного азота гистидина, NH<sub>2</sub>-группы лизина и др.). При резких сдвигах от оптимума рН среды ферменты могут подвергаться конформационным изменениям, приводящим к потере активности вследствие денатурации или изменения заряда молекулы фермента. При разных значениях рН среды активный центр может находиться в частично ионизированной или неионизированной форме, что сказывается на третичной структуре белка и соответственно на формировании активного фермент-субстратного комплекса. Имеет значение, кроме того, состояние ионизации субстратов и кофакторов.

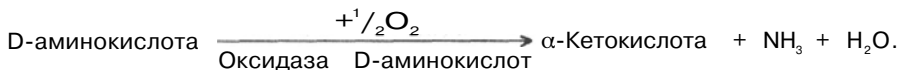
**Специфичность ферментов.** Ферменты обладают высокой специфичностью действия. Это свойство часто существенно отличает их от неорганических катализаторов. Так, мелкоизмельченные платина и палладий могут катализировать восстановление (с участием молекулярного водорода) десятков тысяч химических соединений различной структуры. Высокая специфичность ферментов обусловлена, как было отмечено, конформационной и электростатической комплементарностью между молекулами субстрата и фермента и уникальной структурной организацией активного центра, 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) и абсолютной специфичностью. Так, для действия некоторых гидролитических ферментов наибольшее значение имеет тип химической связи в молекуле субстрата. Например, пепсин в одинаковой степени расщепляет белки животного и растительного происхождения, несмотря на то что эти белки существенно отличаются друг от друга как по химическому строению и аминокислотному составу, так и по физико-химическим свойствам. Однако пепсин не расщепляет ни углеводы, ни жиры. Объясняется это тем, что точкой приложения, местом действия пепсина является пептидная —СО—NH—связь. Для действия липазы, катализирующей гидролиз жиров на глицерин и жирные кислоты, подобным 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 др. Обычно эти ферменты участвуют в процессе пищеварения, и их групповая специфичность, вероятнее всего, имеет определенный биологический смысл. Относительной специфичностью наделены 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 (см. главу 10).

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, уреазы, 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 стереоизомер\*.



Наглядным примером стереохимической специфичности является бактериальная аспартатдекарбоксилаза, катализирующая отщепление  $\text{CO}_2$  только от L-аспарагиновой кислоты с превращением ее в L-аланин. Стереоспецифичность проявляют ферменты, катализирующие и синтетические реакции. Так, из аммиака и  $\alpha$ -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):



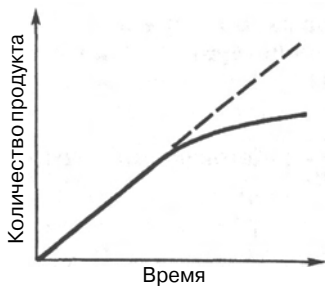
Таким образом, благодаря высокой специфичности действия ферменты обеспечивают протекание с большой скоростью лишь определенных химических реакций из огромного разнообразия возможных превращений в микропространстве клеток и целостном организме, регулируя тем самым интенсивность обмена веществ.

## ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

В этом разделе кратко рассмотрены общие факторы, в частности зависимость скорости ферментативной реакции от времени, влияние концентраций субстрата и фермента на скорость реакций, катализируемых ферментами, и более подробно – вопросы об активировании и ингибировании ферментов. Ранее была отмечена существенность для активности ферментов таких факторов, как температура, pH, т.е. факторов, которые определяют в оптимальных условиях сохранность пространственной конформации молекулы фермента, когда она приобретает максимальную активность.

Как известно, скорость любой химической реакции уменьшается со

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



**Рис. 4.18.** Зависимость скорости ферментативной реакции от времени.

временем, однако кривая зависимости скорости ферментативных реакций от времени не имеет обычно той общей формы, которая характерна для гомогенных химических реакций (рис. 4.18). Такое снижение скорости ферментативных реакций со временем может быть обусловлено тормозящим действием продуктов реакции, уменьшением степени насыщения фермента субстратом (поскольку по мере протекания реакции концентрация субстрата снижается) или частичной инактивацией фермента при заданных значениях температуры и рН 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).

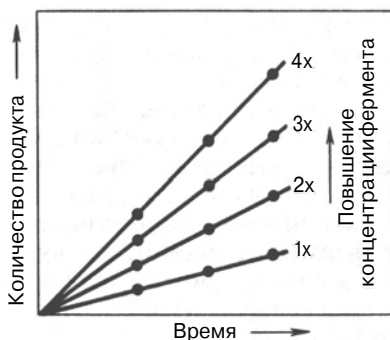
## **Влияние концентраций субстрата и фермента на скорость ферментативной реакции**

Из приведенного ранее материала вытекает важное заключение: одним из наиболее существенных факторов, определяющих скорость ферментативной реакции, является концентрация субстрата (или субстратов) и продукта (продуктов). При постоянной концентрации фермента скорость реакции постепенно увеличивается, достигая определенного максимума (см. рис. 4.12, 4.13), когда дальнейшее увеличение количества субстрата практически не оказывает влияния на скорость ферментативной реакции. В таких случаях принято считать, что субстрат находится в избытке, а фермент полностью насыщен, т.е. все молекулы фермента связаны с субстратом. Ограничивающим скорость реакции фактором в последнем случае становится концентрация фермента. Именно при этих условиях определяют величину максимальной скорости ( $V_{max}$ ) и значения константы Михаэлиса ( $K_m$ ) (см. рис. 4.13; 4.14).

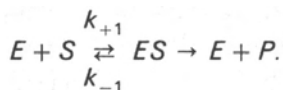
Скорость любой ферментативной реакции непосредственно зависит от концентрации фермента (рис. 4.19). Существующая линейная зависимость между этими величинами, когда скорость реакции прямо пропорциональна количеству присутствующего фермента, справедлива только в определенных условиях, например в начальный период ферментативной реакции, так как в этот период практически не происходит обратной реакции, а концентрация продукта оказывается недостаточной для обратимости реакции. Именно в этом случае скорость реакции (точнее, начальная скорость реакции  $v$ ) будет пропорциональна концентрации фермента. Как было



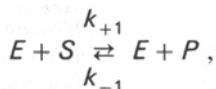
**Рис. 4.19.** Зависимость скорости реакции от концентрации фермента в присутствии насыщающих концентраций субстрата.



отмечено, фермент является одной из реагирующих молекул в химической реакции и при взаимодействии с субстратом образует промежуточный фермент-субстратный комплекс, который далее подвергается распаду на продукт и свободный фермент:



Если упростить это уравнение, исключив промежуточный ES-комплекс:



то в уравнениях для скоростей прямой и обратной реакций обязательным компонентом является концентрация фермента:

$$v_{+1} = k_{+1}[E] \cdot [S]; \quad v_{-2} = k_{-1}[E] \cdot [P].$$

Однако в уравнениях для константы равновесия ( $K_{eq}$  или  $K_p$ ) концентрация фермента уже не имеет значения:

$$K_p = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{[E] \cdot [P]}{[E] \cdot [S]} = \frac{[P]}{[S]}.$$

Как видно, константа равновесия ( $K_p$ ) ферментативной реакции не зависит от концентрации фермента. Определяя скорость и направление химической реакции, фермент тем не менее не оказывает влияния на конечные (равновесные) концентрации реагирующих молекул и продуктов, определяющих величину константы равновесия.

## Активирование и ингибирование ферментов

Скорость ферментативной реакции, как и активность фермента, в значительной степени определяется также присутствием в среде активаторов и ингибиторов: первые повышают скорость реакции, а вторые тормозят эту реакцию. Активирующее влияние на скорость ферментативной реакции оказывают разнообразные вещества органической и неорганической природы. Так, соляная кислота активирует действие пепсина желудочного сока;

желчные кислоты повышают активность панкреатической липазы; некоторые тканевые ферменты (оксидоредуктазы, катепсины, аргиназа), растительная протеиназа и др. в значительной степени активируются соединениями, содержащими свободные SH-группы (глутатион, цистеин), а ряд ферментов—также витамином С. Особенно часто активаторами выступают ионы двухвалентных и, реже, одновалентных металлов. Получены доказательства, что около 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 (карбоангидраза), катализирующая биосинтез и распад  $H_2CO_3$ , практически теряет свою ферментативную активность; более того, цинк при этом не может быть заменен никаким другим металлом. Известны ферменты\*, действие которых активируется ионами нескольких металлов; в частности, енолаза активируется  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $K^+$  (табл. 4.4).

Таблица 4.4. Ферменты, активируемые металлами

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

**Молекулярный механизм действия металлов в энзиматическом катализе, или роль металлов в активировании ферментами.** В ряде случаев ионы металлов ( $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) выполняют функции простетических групп ферментов, или служат акцепторами и донаторами электронов, или выступают в качестве электрофилов либо 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 монофосфатных эфиров органических веществ к активному центру фосфатаз, катализирующих гидролиз этих соединений. Иногда металл соединяется с субстратом, образуя истинный субстрат, на который действует фермент. В частности, ионы  $Mg^{2+}$  активируют креатинфосфокиназу благодаря образованию истинного субстрата—магниевого соли АТФ. Наконец, имеются экспериментальные доказательства прямого участия металлов (например, ионов  $Ca^{2+}$

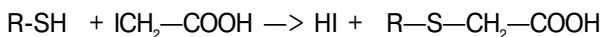
\* Обычно трудно провести границу между металлоферментами (когда металл связан прочно с белком и незаменим) и ферментами, активируемыми металлами (последние лишь ускоряют реакцию и легко диссоциируют).

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 в физиологических концентрациях обычно неэффективны или оказывают небольшое активирующее влияние на ферменты. Исключение составляют пепсин, некоторые оксидоредуктазы, активируемые анионами, а также амилаза слюны, катализирующая гидролиз крахмала, активность которой повышается при действии ионов хлора, и аденилатциклаза, которая активируется анионами галогенов.

Ингибиторы ферментов обычно принято делить на два больших класса: обратимые и необратимые. Это вещества, вызывающие частичное (обратимое) или полное торможение реакций, катализируемых ферментами. Недавно открыты антиферменты (антиэнзимы, или антизимы), представляющие собой белки (или полипептиды), действующие как ингибиторы ферментов. К подобным веществам относятся, например, ингибитор трипсина, обнаруженный в соевых бобах, и сывороточный анти-трипсин. Недавно открыт в печени животных антифермент орнитиндекарбоксилазы (см. главу 12). Антизимы, вероятнее всего, образуют трудно-диссоциируемые комплексы с соответствующими ферментами, выключая их из химических реакций. Иногда ингибитор является составным компонентом предшественника фермента, например пепсина (см. главу 12), или входит в состав сложных комплексов ферментов, например в состав 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 (кислоты, щелочи, соли тяжелых металлов, нагревание), приводят к необратимой 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 какой-либо один фермент или группу родственных ферментов, вызывая обратимое или необратимое ингибирование. Исследование этих ингибиторов имеет важное значение. Во-первых, ингибиторы могут дать ценную информацию о химической природе активного центра фермента, а также о составе его функциональных групп и природе химических связей, обеспечивающих образование фермент-субстратного комплекса. Известны вещества, включая лекарственные препараты, специфически связывающие ту или иную функциональную группу в молекуле фермента, выключая ее из химической реакции. Так, йодацетат  $\text{ICH}_2\text{—COOH}$ , его амид и этиловый эфир, паралломеркурибензоат  $\text{C}_6\text{H}_4\text{—COOH}$  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 (см. ранее).

Во-вторых, ингибиторы нашли широкое применение в энзимологии при исследовании природы множественных форм ферментов и изоферментов, различающихся не столько электрофоретической подвижностью, сколько различной чувствительностью к одному и тому же ингибитору.

При помощи ингибиторов, выключающих отдельные стадии многоступенчатого метаболического процесса, могут быть точно установлены не только последовательность химических реакций, но и природа участвующих в этих превращениях ферментов. Этим путем, применяя йодацетат, фториды и другие специфические ингибиторы, был расшифрован гликолитический путь окислительно-восстановительных превращений глюкозы до стадии образования молочной кислоты в мышечной ткани, насчитывающий 11 стадий с участием 11 ферментов и 10 промежуточных метаболитов.

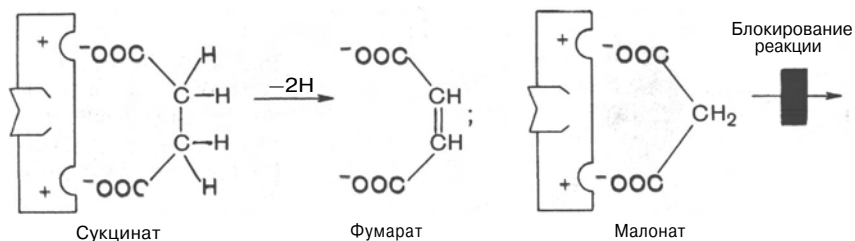
С ингибированием ферментов связан механизм действия многих токсинов и ядов на организм. Известно, что при отравлении солями сенильной кислоты смерть наступает вследствие полного торможения и выключения дыхательных ферментов (цитохромная система) тканей, особенно клеток мозга. Токсическое влияние на организм человека и животных некоторых инсектицидов обусловлено торможением активности холинэстеразы — фермента, играющего ключевую роль в деятельности нервной системы.

Современная, так называемая рациональная, химиотерапия (направленное применение лекарственных препаратов в медицине) должна основываться на точном знании механизма действия лекарственных средств на биосинтез ферментов, на активность уже синтезированных ферментов или на регуляцию их активности в организме. Иногда для лечения некоторых болезней используют избирательно действующие ингибиторы. Так, ингибитор ряда протеиназ (трипсина, химотрипсина и калликреина) трасилол широко применяется для лечения острого панкреатита — болезни, при которой уровень трипсина и химотрипсина в крови резко возрастает. Знание избирательного ингибиторного действия некоторых природных и синтетических соединений (так называемых антиметаболитов) на ферменты может служить методологической основой для разработки эффективных методов синтеза химиотерапевтических препаратов. Этот путь открывает широкие возможности для направленного воздействия на синтез ферментов в организме и регуляции интенсивности метаболизма при патологии.

**Типы ингибирования.** Различают обратимое и необратимое ингибирование. Если ингибитор вызывает стойкие изменения пространственной третичной структуры молекулы фермента или модификацию функциональных групп фермента, то такой тип ингибирования называется необратимым. Чаше, 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, удается или не удается преодолеть торможение ферментативной реакции путем увеличения концентрации субстрата.

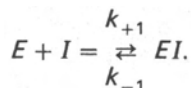
Конкурентное ингибирование может быть вызвано веществами, имеющими структуру, похожую на структуру субстрата, но несколько отличающуюся от структуры истинного субстрата. Такое ингибирование основано на связывании ингибитора с субстратсвязывающим (активным)

центром. Классическим примером подобного типа ингибирования является торможение сукцинатдегидрогеназы (СДГ) малоновой кислотой. Этот фермент катализирует окисление путем дегидрирования янтарной кислоты (сукцината) в fumarовую:



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 взаимодействовать с активным центром с образованием фермент-ингибиторного комплекса, однако при этом полностью исключается перенос атома водорода от малоната. Структуры субстрата (сукцинат) и ингибитора (малонат) все же несколько различаются. Поэтому они конкурируют за связывание с активным центром, и степень торможения будет определяться соотношением концентраций малоната и сукцината, а не абсолютной концентрацией ингибитора. Таким образом, ингибитор может обратимо связываться с ферментом, образуя фермент-ингибиторный комплекс. Этот тип ингибирования иногда называют ингибированием по типу метаболического антагонизма (рис. 4.20).

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

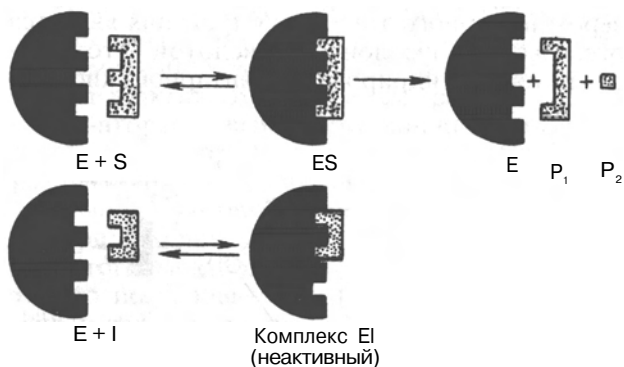


Образовавшийся комплекс, называемый фермент-ингибиторным комплексом  $EI$ , в отличие от фермент-субстратного комплекса  $ES$  не распадается с образованием продуктов реакции. Константу диссоциации комплекса  $EI$ , или ингибиторную константу  $K_i$ , можно, следуя теории Михаэлиса–Ментен, определить 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 комплекса  $EI$ .

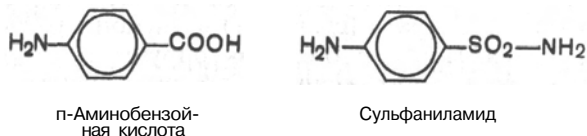
Метод конкурентного торможения нашел широкое применение в медицинской практике. Известно, например, что для лечения некоторых инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями, применяют сульфаниламидные препараты. Оказалось, что эти препараты имеют структурное сходство с парааминобензойной кислотой, которую бактериальная клетка использует для синтеза фолиевой кислоты, являющейся составной частью



**Рис. 4.20.** Действие конкурентного ингибитора (схема по В.Л. Кретовичу).

E - фермент; S - субстрат; P<sub>1</sub> и P<sub>2</sub> - продукты реакции; I - ингибитор.

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.



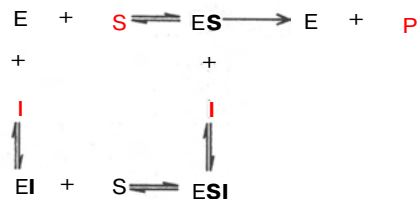
p-Аминобензойная кислота

Сульфаниламид

Некоторые аналоги витамина B<sub>6</sub> и фолиевой кислоты, в частности дезоксипиридоксин и аминоптерин (см. главу 7), действуют как конкурентные, так называемые коферментные, ингибиторы (или авитамины), тормозящие многие интенсивно протекающие при патологии биологические процессы в организме. Применение подобных аналогов в медицинской практике (в частности, в дерматологии и онкологии) основано на конкурентном вытеснении коферментов из субстратсвязывающих центров ключевых ферментов обмена.

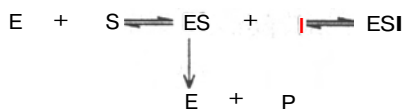
Неконкурентное ингибирование вызывается веществами, не имеющими структурного сходства с субстратами и часто связывающимися не с активным центром, а в другом месте молекулы фермента. Степень торможения во многих случаях определяется продолжительностью действия ингибитора на фермент. При данном типе ингибирования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

Следует указать, что неконкурентное ингибирование также может быть обратимым и необратимым, поскольку отсутствует конкуренция между субстратом и ингибитором за активный центр. Примеры необратимого ингибирования приведены ранее. При обратимом неконкурентном ингибировании субстрат S и ингибитор I связываются с разными центрами, поэтому появляется возможность образования как комплекса EI, так и тройного комплекса EIS; последний может распадаться с освобождением продукта, но с меньшей скоростью, чем комплекс ES.



Этот тип неконкурентного ингибирования чаще всего наблюдается у ферментов, катализирующих превращения более одного субстрата, когда связывание ингибитора не блокирует связывание субстрата с активным центром. Ингибитор при этом соединяется как со свободным ферментом, так и с ES-комплексом.

Известно, кроме того, так называемое бесконкурентное ингибирование, когда ингибитор связывается с ферментом также в некаталитическом центре, однако не со свободным ферментом, а только с ES-комплексом в виде тройного комплекса.

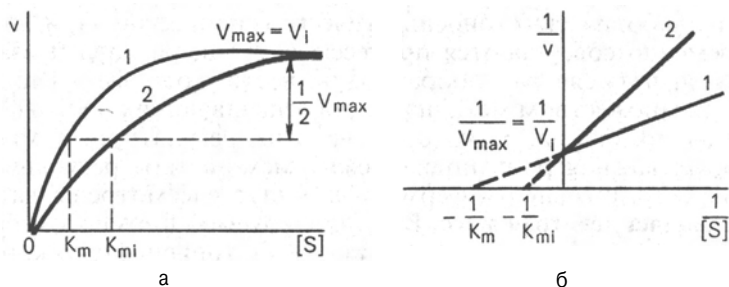


Для выяснения вопроса о типе ингибирования пользуются уравнениями Михаэлиса-Ментен, Лайнуивера-Бэрка или другими, например уравнением Эди-Хофсти:

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

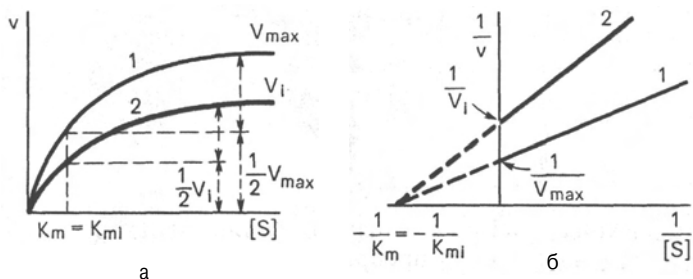
и соответствующими графиками в прямолинейных координатах.

При конкурентном типе ингибирования ингибитор увеличивает значение  $K_m$ , не оказывая влияния на максимальную скорость  $V_{\max}$  (рис. 4.21). Это означает, что при достаточно высокой концентрации субстрата  $[S]$  ингибитор вытесняется молекулами субстрата из комплекса EI. При неконкурентном ингибировании (рис. 4.22) 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



**Рис. 4.21.** Графики зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии конкурентного ингибитора.

а - в координатах  $v$  от  $[S]$ ; б - в координатах  $1/v$  от  $1/[S]$ ;  $V_{\max}$  и  $V_i$  - максимальные скорости реакции;  $K_m$  и  $K_{m_i}$  - константа Михаэлиса соответственно в отсутствие (1) и в присутствии (2) ингибитора.



**Рис. 4.22.** Графики зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии неконкурентного ингибитора.

Обозначения те же, что на рис. 4.21.

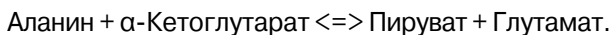
комплексов EI и(или) EIS. Часто, однако, наблюдается смешанный тип ингибирования, иногда называемый частично неконкурентным, или обратимым неконкурентным ингибированием (см. ранее), при котором снижение  $V_{\max}$  сочетается с одновременным увеличением значений  $K_m$ . Это означает, что комплекс EI 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, как отмечено ранее, 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 EIS.

Таким образом, при графическом анализе скоростей ферментативных реакций как функции концентраций субстрата может быть получена ценная информация не только о кинетике ферментативных реакций, но и о молекулярных механизмах ферментативного катализа.

## РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

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

**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:





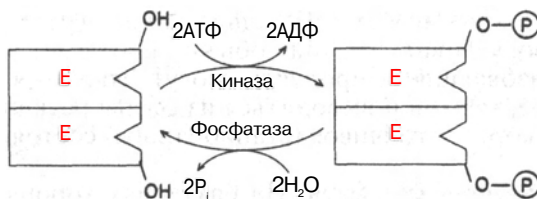
Этот тип регуляции играет, очевидно, лишь ограниченную роль, поскольку в реальных условиях реакция обычно протекает в одном направлении, так как образовавшиеся продукты могут оказаться субстратами для действия других ферментов и выводиться из сферы реакции. В этих случаях устанавливается скорее устойчивое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

**Изменение количества фермента.** На бактериях хорошо изучен феномен индуцированного (индуцирующего) синтеза ферментов при выращивании их на среде, где единственным источником углерода и энергии служит тот или иной углевод, например глюкоза. Замена в среде глюкозы на лактозу (индуктор) 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.

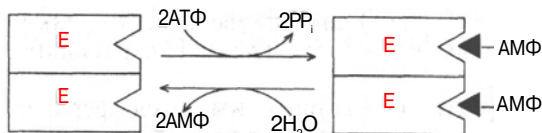
В клетках прокариот и эукариот имеются ферменты, концентрация которых не требует добавления индуктора; это так называемые конститутивные ферменты. Количество фермента в клетке зависит от наличия продукта реакции, катализируемой данным ферментом, причем продукт реакции вызывает торможение синтеза фермента в результате репрессии (см. далее).

В животных тканях быстрый синтез ферментов наблюдается реже. Механизм его (индуцирующий синтез) изучен только для небольшого числа ферментов: тирозинтрансаминазы, серин- и треониндегидратазы, триптофанпирролазы и др.—в ответ на введение гормонов или прием белковой пищи. Однако при поступлении в организм некоторых ядов, канцерогенных веществ, алкалоидов, инсектицидов через несколько дней наблюдается резкое повышение активности (соответственно количества) ферментов-гидроксилаз (монооксигеназ) эндоплазматической сети клеток печени, окисляющих чужеродные вещества в нетоксичные для организма продукты. Вполне допустимо предположить, что в этих случаях имеет место синтез ферментов путем индукции (т.е. *de novo*). 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 пищеварительного тракта, а также 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 или других ферментов—протеиназ. Так, трипсин в поджелудочной железе синтезируется в форме неактивного трипсиногена. Поступив в кишечник, он превращается в активный трипсин в результате аутокатализа или под действием других протеиназ (механизм активации подробно рассматривается в главе 12). Превращение неактивного пепсиногена в активный пепсин происходит аутокаталитически в результате специфического ограниченного протеолиза в присутствии соляной кислоты и также связано с отщеплением от профермента специфического ингибитора пептидной природы. Эти превращения зимогенов в активные ферменты связаны с конформационными изменениями молекулы фермента и формированием активного центра или его раскрытием (демаскирование). Синтез протеиназ в неактивной форме и ряда других неактивных белков-предшественников имеет, очевидно, определенный биологический смысл, предотвращая разрушение клеток органов, в которых образуются проферменты. Примерами подобного активирования белков является активиро-



**Рис. 4.23.** Ковалентная модификация фермента путем фосфорилирования-дефосфорилирования остатков серина.



**Рис. 4.24.** Нековалентная модификация фермента путем аденилирования-деаденилирования.

вание некоторых гормонов (проинсулин  $\rightarrow$  инсулин), белка соединительной ткани (растворимый проколлаген превращается в нерастворимый коллаген), белков свертывающей системы крови.

**Химическая модификация фермента.** Некоторые белки при формировании третичной структуры подвергаются постсинтетической химической модификации (см. главу 1). Оказалось, что активность ряда ключевых ферментов обмена углеводов, в частности фосфорилазы, гликогенсинтазы и др., также контролируется путем фосфорилирования и дефосфорилирования, осуществляемого специфическими ферментами — протеинкиназой и протеинфосфатазой, активность которых в свою очередь регулируется гормонами (см. главу 10). Уровень активности ключевых ферментов обмена углеводов и соответственно интенсивность и направленность самих процессов обмена определяются соотношением фосфорилированных и дефосфорилированных форм этих ферментов.

Обычно различают обратимую ковалентную и нековалентную химические модификации ферментов, осуществляемые через ОН-группы серина, реже — тирозина или за счет нековалентных взаимодействий с молекулой фермента. В первом случае активным ферментом оказывается или фосфорилированная, или дефосфорилированная форма, как в случае с молекулами мышечной фосфорилазы и гликогенсинтазы соответственно (см. главу 10). В качестве примеров можно в виде схемы представить оба типа модификации, в которой символом Р обозначается остаток фосфата,  $P_i$  — неорганический фосфат ( $H_3PO_4$ ),  $PP_i$  — неорганический пиррофосфат ( $H_4P_2O_7$ ), АМФ — остаток адениловой кислоты (рис. 4.23; 4.24).

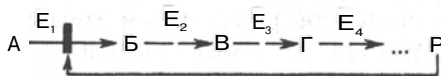
Химическая постсинтетическая модификация ферментов включает, кроме того, процессы ограниченного протеолиза (см. ранее), метилирования (см. главу 13), гликозилирования, уридилирования, аденилирования, АДФ-рибозилирования\* и др., обеспечивая тем самым микроскопический

\* Интересно, что дифтерийный и холерный токсины наделены энзиматической активностью, вызывая АДФ-рибозилирование (соответственно инактивацию) ключевых клеточных ферментов или белков. Дифтерийный токсин выключает синтез белкового фактора 2 стадии элонгации синтеза белка, а холерный — специфического G-белка и как следствие вызывает массивную потерю воды.

тип регуляции активности ферментов и соответственно физиологическую скорость процессов обмена веществ.

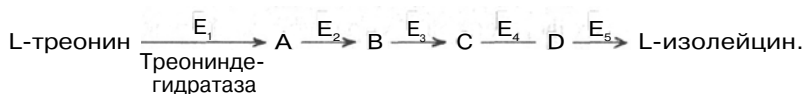
**Аллостерическая регуляция.** Во многих строго биосинтетических реакциях основным типом регуляции скорости многоступенчатого ферментативного процесса является ингибирование по принципу обратной связи. Это означает, что конечный продукт биосинтетической цепи подавляет активность фермента, катализирующего первую стадию синтеза, которая является ключевой для данной цепи реакции. Поскольку конечный продукт структурно отличается от субстрата, он связывается с аллостерическим (некаталитическим) центром молекулы фермента, вызывая ингибирование всей цепи синтетической реакции.

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 и соответственно на фермент  $E_1$ .

Впервые существование подобного механизма контроля активности ферментов метаболитами было обнаружено у *E. coli* при исследовании синтеза изолейцина и ЦТФ. Оказалось, что изолейцин, являющийся конечным продуктом синтеза, избирательно подавляет активность треониндегидратазы, катализирующей первую стадию последовательного процесса превращения треонина в изолейцин, насчитывающего пять ферментативных реакций:

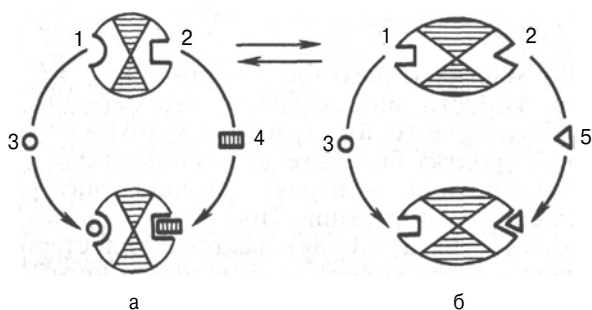


Аналогично ЦТФ как конечный продукт биосинтетического пути оказывает ингибирующий эффект на первый фермент (аспартаткарбамоилтрансферазу), регулируя тем самым свой собственный синтез (см. главу 13). Этот тип ингибирования получил название ингибирования по принципу обратной связи, или ретроингибирования. Существование его доказано во всех живых организмах. В настоящее время он рассматривается как один из ведущих типов регуляции активности ферментов и клеточного метаболизма в целом\*.

С другой стороны, в амфиболических процессах, выполняющих одновременно биосинтетические и биodeградативные функции\*\*, доказано су-

\* 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.).

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



**Рис. 4.25.** 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.

существование регуляции как по типу ретроингибирования, так и макроэнергическими 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.

Подобные типы ингибирования конечным продуктом и активирования первым продуктом свойственны аллостерическим (регуляторным) ферментам, когда эффектор, модулятор, структурно отличаясь от субстрата, связывается в особом (аллостерическом) центре молекулы фермента, пространственно удаленном от активного центра. Следует, однако, иметь в виду, что модуляторами аллостерических ферментов могут быть как активаторы, так и ингибиторы. Часто оказывается, что сам субстрат оказывает активирующий эффект. Ферменты, для которых и субстрат, и модулятор представлены идентичными структурами, носят название гомотропных в отличие от гетеротропных ферментов, для которых модулятор имеет отличную от субстрата структуру. Взаимопревращение активного и неактивного аллостерических ферментов в упрощенной форме, а также конформационные изменения, наблюдаемые при присоединении субстрата и эффекторов, представлены на рис. 4.25. 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). S-образный характер зависимости  $v$  от  $[S]$  в присутствии модулятора обусловлен эффектом кооперативности. 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 субстрата.

**Другие типы регуляции активности ферментов.** Абсолютное количество присутствующего в клетке фермента регулируется временем 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 concentra-

ций кофакторов и явление компартиментализации. Механизм компартиментализации метаболических процессов 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, облегчая независимую регуляцию, этот механизм позволяет разделить несовместимые в одном и том же месте (и, возможно, в одно и то же время) метаболические процессы. Примером последних могут быть пути синтеза высших жирных кислот, протекающие в основном в растворимой фракции цитоплазмы, и пути распада (окисления) жирных кислот, сосредоточенные в митохондриях. Необходимо указать, однако, что при компартиментализации возникает проблема транспорта как метаболитов, так и восстановительных эквивалентов через биомембраны субклеточных органелл. Эту задачу решает так называемый челночный механизм, позволяющий перевод метаболитов в формы, способные переходить через мембраны, и обеспечивающий внутриклеточный гомеостаз (см. главу 13).

## 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 в условных единицах Комиссией по ферментам Международного биохимического союза была рекомендована стандартная международная единица (Е или U); за единицу активности любого фермента принимается то количество его, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 микромоля субстрата или образование 1 микромоля продукта в минуту (мкмоль/мин) \*.

В связи с введением Международной системы единиц (СИ) предложено новое выражение активности фермента в каталах (кат, kat): 1 кат есть каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью, равной 1 молю в 1 с (1 моль/с). Отношение международной единицы (U) к каталу можно выразить следующим образом: 1 кат = 1 моль · с<sup>-1</sup> = 60 моль · мин<sup>-1</sup> = 60 · 10<sup>6</sup> мкмоль · мин<sup>-1</sup> = 6 · 10<sup>7</sup> U, или: 1 U = 1 мкмоль · мин<sup>-1</sup> = (1/60) мкмоль · с<sup>-1</sup> = (1/60) мкат = 16,67 нкат. Таким образом, 1 U фермента соответствует 16,67 нкат.

Рекомендовано, кроме того, измерять активность фермента при температуре 25°C, оптимуме 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.

\* Мкмоль, 10<sup>-6</sup> моль; единицы активности фермента выражают также в наномолях (10<sup>-9</sup> моль) и пикомолях (10<sup>-12</sup> моль).

Для выражения активности в практической работе с ферментами часто пользуются произвольными 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). Количество молекул субстрата, подвергающихся превращению одной молекулой фермента в продукт в процессе реакции в единицу времени при полном насыщении фермента субстратом, принято называть числом оборотов фермента, или молярной активностью (молярная каталитическая активность выражается в каталах на 1 г-моль фермента). Одна молекула каталазы эритроцитов способна, например, расщепить в 1 с 44000 молекул перекиси водорода\*.

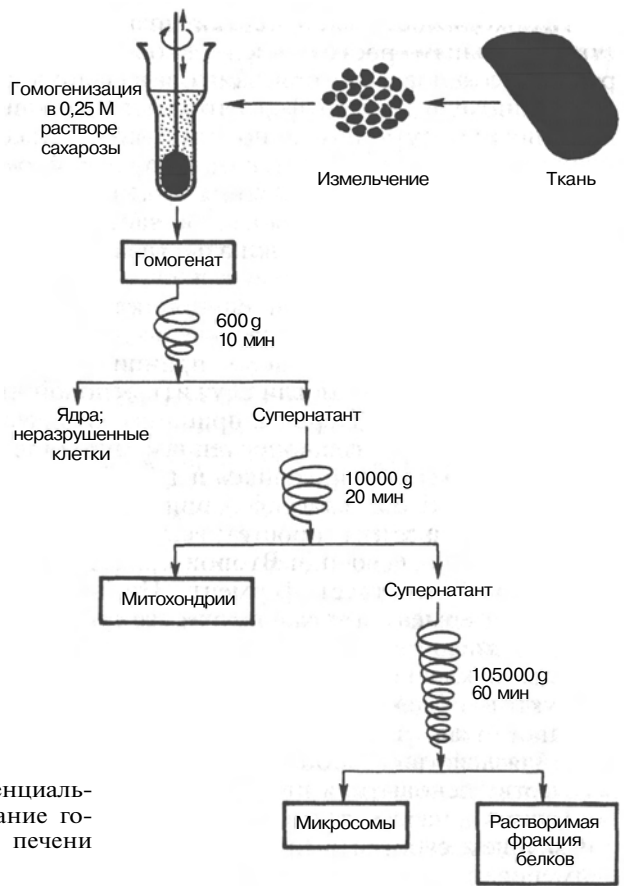
## ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

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 цитохимии. Для этого тонкие срезы органа инкубируют с соответствующими субстратами и после инкубации локализацию продукта реакции устанавливают добавлением подходящих реактивов до появления специфической окраски.

В препаративной энзимологии чаще пользуются методом дифференциального центрифугирования гомогенатов тканей (рис. 4.26). Для этого сначала разрушают клеточную структуру с помощью подходящего дезинтегратора и полученную квазиоднородную (гомогенизированную) массу подвергают дифференциальному центрифугированию при температуре 0–4°C. 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 удается изолировать частицы, известные как лизосомы, размер которых занимает промежуточное место между размерами митохондрий и микросом. В свою очередь микросомальная фракция также является гетерогенной, поскольку состоит в основном из элементов эндоплазматической сети неоднородного строения.

При помощи метода фракционирования гомогенатов органов и тканей в центрифугах было показано, что ядерная фракция печени и почек содержит незначительное число ферментов, хотя известно, что в ядрах осуществляется синтез некоторых белков. Основное место синтеза белка, как теперь установлено, — фракция рибосом цитоплазмы. Показано, кроме

\* 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. 4.26.** Дифференциальное центрифугирование гомогенатов ткани печени (схема),  
g - ускорение силы тяжести.

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 используют весь арсенал методов выделения белков в индивидуальном виде (см. главу 1).

## КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

Современные классификация и номенклатура ферментов были разработаны Комиссией по ферментам Международного биохимического союза и утверждены на V Международном биохимическом конгрессе в 1961 г. в Москве\*.

\* В работе Комиссии принимали участие крупнейшие энзимологи мира, от нашей страны – акад. А.Е. Браунштейн.

Необходимость систематики номенклатуры диктовалась прежде всего стремительным ростом числа вновь открываемых ферментов, которым разные исследователи присваивали названия по своему усмотрению. Более того, одному и тому же ферменту часто давали два или несколько названий, что вносило путаницу в номенклатуру. Некоторые названия ферментов вообще не отражали тип катализируемой реакции, а при наименовании фермента исходили из названия субстрата, на который действует фермент, с добавлением окончания -аза: в частности, амилазы (ферменты, гидролизующие углеводы), липазы (действующие на липиды), протеиназы (гидролизующие белки) и т.д.

До 1961 г. не было и единой классификации ферментов. Трудности заключались в том, что разные исследователи за основу классификации ферментов брали различные принципы. Комиссией были рассмотрены 3 принципа, которые могли служить основой для классификации ферментов и их обозначения. Первый принцип – химическая природа фермента, т.е. принадлежность к флавопротеинам, пиридоксальфосфатпротеинам, гемопротеинам, 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. Второй 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) служит основой для систематического наименования ферментов. Согласно Международной классификации, ферменты делят на шесть главных классов, в каждом из которых несколько подклассов: 1) оксидоредуктазы; 2) трансферазы; 3) гидролазы; 4) лиазы; 5) изомеразы; 6) лигазы (синтетазы) (табл. 4.5).

**Оксидоредуктазы.** К классу оксидоредуктаз относят ферменты, катализирующие с участием двух субстратов окислительно-восстановительные реакции, лежащие в основе биологического окисления. Систематические названия их составляют по форме «донор: акцептор оксидоредуктаза». Например, лактат: НАД<sup>+</sup> оксидоредуктаза для лактатдегидрогеназы (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 относят также гемсодержащие ферменты каталазу и пероксидазу, 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



Таблица 4.5. Международная классификация ферментов

№	Класс	Тип катализируемой реакции
1	Оксидоредуктазы	Перенос электронов и протонов
2	Трансферазы	Перенос групп атомов, отличных от атомов водорода
3	Гидролазы	Гидролиз различных связей (с участием молекулы воды)
4	Лиазы	Образование двойных связей за счет удаления групп или добавление групп за счет разрыва двойных связей
5	Изомеразы	Внутримолекулярный перенос групп с образованием изомерных форм
6	Лигазы (синтетазы)	Соединение двух молекул и образование связей C—C, C—O, C—S и C—N, сопряженных с разрывом пирофосфатной связи АТФ

остатков, азотистых групп, остатков фосфорной и серной кислот и др. Например: метил- и формилтрансферазы, ацетилтрансферазы, аминоксидотрансферазы, фосфотрансферазы и др.

**Гидролазы.** В класс гидролаз входит большая группа ферментов, катализирующих расщепление внутримолекулярных связей органических веществ при участии молекулы воды. Наименование их составляют 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 амидных связей, отличных от пептидных, и др.

**Лиазы.** К классу лиаз относят ферменты, катализирующие разрыв связей C—O, C—C, C—N и других, а также обратимые реакции отщепления различных групп от субстратов не гидролитическим путем. Эти реакции сопровождаются образованием двойной связи или присоединением групп к месту разрыва двойной связи. Ферменты обозначают термином «субстрат-лиаза». Например, фумарат-гидратаза (систематическое название «L-малат-гидролаза») катализирует обратимое отщепление молекулы воды от яблочной кислоты с образованием фумаровой кислоты. В эту же группу входят декарбоксилазы (карбокси-лиазы), амидин-лиазы и др.

**Изомеразы.** К классу изомераз относят ферменты, катализирующие взаимопревращения оптических и геометрических изомеров. Систематическое название их составляют с учетом типа реакции: «субстрат—*цис-транс*-изомераза». Если изомеризация включает внутримолекулярный перенос группы, фермент получает название «мутаза».

К этому же классу относят рацемазы и эпимеразы, действующие на аминокислоты и оксикислоты, 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 «Х : Y лигаза», где Х и Y обозначают исходные вещества. В качестве примера можно назвать L-глутамат: аммиак лигазу (рекомендуемое сокращенное название «глутаминсинтетаза»), 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, 1978) насчитывалось уже 2142 индивидуальных фермента, к декабрю 1995 г. их идентифицировано более 3500. В списке для каждого фермента, помимо кодового номера (шифра), приводятся систематическое (рациональное) название, рекомендуемое (рабочее) название, химическая реакция, которую катализирует данный фермент, а также примечания о специфичности действия. Номер каждому ферменту рекомендуется присваивать по четырехзначному коду.

Таким образом, код каждого фермента содержит четыре цифры, разделенные точками, и составляется по определенному 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 (подподклассы), отличающиеся природой химических соединений доноров или акцепторов, участвующих в данной подгруппе реакций. Номер (цифра) подподкласса ставят на 3-е место в шифре фермента. У гидролаз, например, эта цифра уточняет тип гидролизуемой связи, а у лиаз — тип отщепляемой группы и т.д. Первые 3 цифры кода точно определяют тип фермента. Наконец, все ферменты, относящиеся к данному подподклассу, получают порядковый номер в алфавитном порядке, который ставят на 4-е место в шифре.

Таблица 4.6. 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 <sup>+</sup> = пируват + НАДН <sub>2</sub>	L-лактат: НАД <sup>+</sup> -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

Каждый фермент, характеризующийся постоянной совокупностью 4 цифр, имеет соответствующий код, под которым он внесен в список ферментов. В качестве примера в табл. 4.6 приведены 2 фермента из списка.

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

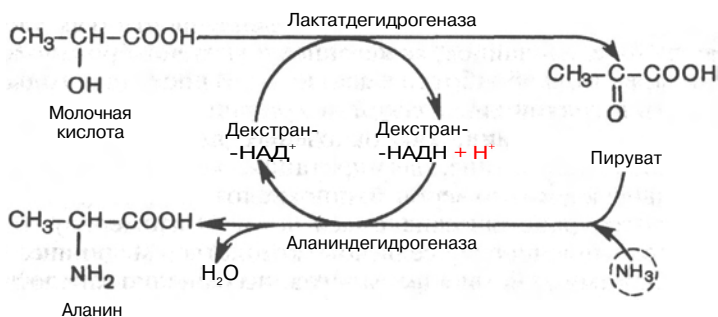
Обладая высокой степенью избирательности, ферменты используются живыми организмами для осуществления с высокой скоростью огромного разнообразия химических реакций; они сохраняют свою активность не только в микропространстве клетки, но и вне организма. Ферменты нашли широкое применение в таких отраслях промышленности, как хлебопечение, пивоварение, виноделие, чайное, кожевенное и меховое производства, сыроварение, кулинария (для обработки мяса) и т.д. В последние годы ферменты стали применять 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), которые используют в промышленности, сельском хозяйстве, медицине. 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% выходом.

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 действия ферментов и повышения их стабильности, простоту в обращении, возможность повторного использования, применение их в синтетических реакциях в потоке. Применение подобной техники в промышленности получило название инженерной энзимологии. Ряд примеров свидетельствует об огромных возможностях инженерной энзимологии в различных областях промышленности, медицины, сельского хозяйства. В частности, иммобилизованную  $\beta$ -галактозидазу, присоединенную к магнитному стержню-мешалке, используют для снижения содержания молочного сахара в молоке, т.е. продукта, который не расщепляется в организме больного ребенка с наследственной непереносимостью 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 синтезировать из него глюкозу и крахмал. Несомненно, имеет большое будущее

моделирование при помощи инженерной энзимологии процесса фотосинтеза, т.е. природного процесса фиксации  $\text{CO}_2$ ; помимо иммобилизации, этот жизненно важный для всего человечества процесс потребует разработки новых оригинальных подходов и применения ряда специфических иммобилизованных коферментов.

В качестве примера иммобилизации ферментов и использования их в промышленности приводим схему непрерывного процесса получения аминокислоты аланина и регенерации кофермента (в частности, НАД) в модельной системе. В этой системе исходный субстрат (молочная кислота) подается при помощи насоса в камеру-реактор, содержащий иммобилизованные на декстране  $\text{НАД}^+$  и две  $\text{НАД}$ -зависимые дегидрогеназы: лактат- и аланиндегидрогеназы; с противоположного конца реактора продукт реакции — аланин — удаляется с заданной скоростью методом ультрафильтрации.



Подобные реакторы нашли применение в фармацевтической промышленности, например при синтезе из гидрокортизона антиревматоидного препарата преднизолон. Кроме того, они могут служить моделью для применения с целью синтеза и получения незаменимых факторов, поскольку при помощи иммобилизованных ферментов и коферментов можно направленно осуществлять сопряженные химические реакции (включая биосинтез незаменимых метаболитов), устраняя тем самым недостаток в веществах при наследственных пороках обмена. Таким образом, при помощи нового методологического подхода наука делает свои первые шаги в области «синтетической биохимии».

Не менее важными направлениями исследований являются иммобилизация клеток и создание методами генотехники (генного инженерного 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 будучи высококалорийными. Одно из подобных перспективных веществ — аспартам, который представляет собой метиловый эфир дипептида — аспартилфенилаланина (см. ранее). 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, его используют для детского питания и добавляют вместо сахара в диетическую кока-колу). Для производства аспартама методами генотехники необходимо получить не только свободную аспарагиновую кислоту и фенилаланин (предшественники), но и бактериальный фермент, катализирующий биосинтез этого дипептида.

Значение инженерной энзимологии, как и вообще биотехнологии, возрастет в будущем. По подсчетам специалистов, продукция всех биотехнологических процессов в химической, фармацевтической, пищевой промышленности, в медицине и сельском хозяйстве, полученная в течение одного года в мире, будет исчисляться десятками миллиардов долларов к 2000 г. В нашей стране уже к 2000 г. будет налажено получение методами генной инженерии L-треонина и витамина B<sub>2</sub>. Уже к 1998 г. предполагается производство ряда ферментов, антибиотиков,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -интерферонов; проходят клинические испытания препараты инсулина и гормона роста. Гибридной техникой в стране налажен выпуск реактивов для иммуноферментных методов определения многих химических компонентов в биологических жидкостях.

## **ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ ЭНЗИМОЛОГИИ**

Достижения энзимологии находят все большее применение в медицине, в частности в профилактике, диагностике и лечении болезней. Успешно развивается новое направление энзимологии — медицинская энзимология, которая имеет свои цели и задачи, специфические методологические подходы и методы исследования. Медицинская энзимология развивается по трем главным направлениям, хотя возможности применения научных достижений энзимологии в медицине теоретически безграничны, в частности в области энзимопатологии, энзимодиагностики и энзимотерапии.

Область исследований энзимопатологии является теоретической, фундаментальной частью патологии. Она призвана изучать молекулярные основы развития патологического процесса, основанные на данных нарушения механизмов регуляции активности или синтеза индивидуального фермента или группы ферментов. Обладая высокой каталитической активностью и выраженной органотропностью, ферменты могут быть использованы в качестве самых тонких и избирательных инструментов для направленного воздействия на патологический процесс. Как известно, из более чем 5000 наследственных болезней человека молекулярный механизм развития выяснен только у 2-3 десятков. Считают, что развитие болезни чаще всего связано с наследственной недостаточностью или полным отсутствием синтеза одного-единственного фермента в организме больного. Иногда болезни называют также энзимопатиями. Так, галактоземия — наследственное заболевание, при котором наблюдается ненормально высокая концентрация галактозы в крови. Болезнь развивается в результате наследственного дефекта синтеза фермента гексозо-1-фосфат-уридилтрансферазы, катализирующего превращение галактозы в легкометаболизируемую глюкозу. Причиной другого наследственного заболевания — фенилкетонурии, сопровождающейся расстройством психической деятельности, является потеря клетками печени способности синтезировать фермент, катализирующий превращение фенилаланина в тирозин (см. главу 12).

Энзимопатология успешно решает и проблемы патогенеза соматических болезней. Созданы крупные научные центры и научно-исследовательские институты, в которых ведутся работы по выяснению молекулярных основ

атеросклероза, злокачественного роста, ревматоидных артритов и др. Нетрудно представить огромную роль ферментных систем или даже отдельных ферментов, нарушение регуляции активности и синтеза которых приводит к формированию или развитию патологического процесса.

Второе направление медицинской энзимологии—энзимодиагностика—развивается по двум путям. Один путь—использование ферментов в качестве избирательных реагентов для открытия и количественного определения нормальных или аномальных химических веществ в сыворотке крови, моче, желудочном соке и др. (например, выявление при помощи ферментов глюкозы, белка или других веществ в моче, в норме не обнаруживаемых). Другой путь—открытие и количественное определение 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. Известно около 20 тестов, основанных на количественном определении активности ферментов (и изоферментов), главным образом в крови (реже в моче), а также в биоптатах (кусочки тканей, полученные при биопсии). Следует отметить, что из огромного числа ферментов (более 3500), 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 почек, поджелудочной железы, печени и др.). Так, уровень липазы, амилазы, трипсина и химотрипсина в крови резко увеличен при сахарном диабете, злокачественных поражениях поджелудочной железы, болезнях печени и др. Резко повышается в сыворотке крови уровень двух 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, метастатических карциномах и т. д. Доказано, 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 (иногда функциональные расстройства) приводят к выделению ферментов во внеклеточное пространство, откуда они поступают в кровь. Механизм гиперферментации (повышенное содержание ферментов в крови) до конца не расшифрован. Повышение уровня внутриклеточных ферментов в плазме крови прямо зависит от природы повреждающего воздействия, времени действия и степени повреждения биомембран клеток и субклеточных структур органов. В оценке ферментных тестов для диагностических целей особое значение имеет знание периода полужизни (полураспада) в плазме крови каждого из диагностических ферментов, что делает важным выбор точного времени для ферментного анализа крови. Весьма существенным является также знание особенностей распределения (топографии) ферментов в индивидуальных органах и тканях, а также их внутриклеточной локализации.

В последнее время стали применять ферменты рестрикции—специфические эндонуклеазы (см. главу 13), катализирующие разрывы межнуклеотидных связей ДНК, для диагностики фенилкетонурии,  $\alpha$ - и  $\beta$ -талассемии и других наследственных болезней человека. Метод основан на полиморфизме рестрикционных фрагментов ДНК.

Из представленных данных следует, что диагностическая энзимология может служить основой не только для постановки правильного и своевременного диагноза болезни, но и для проверки эффективности применяемого метода лечения.

Дальнейшее развитие диагностической энзимологии преимущественно идет по двум перспективным направлениям медицинской энзимологии: по пути упрощения и рациональной модификации уже испытанных методов и по пути поиска новых органоспецифических (тканеспецифических) ферментов и изоферментов.

Третье направление медицинской энзимологии—энзимотерапия, т.е. использование ферментов и модуляторов (активаторов и ингибиторов) действия ферментов в качестве лекарственных средств, имеет пока небольшую историю. До сих пор работы в этом направлении почти не выходят за рамки эксперимента. Исключение составляют некоторые протеиназы: пепсин, трипсин, химотрипсин и их смеси (абомин, химопсин), которые применяют для лечения ряда болезней пищеварительного тракта. Помимо протеиназ, ряд других ферментов, в частности РНКаза, ДНКаза, гиалуронидаза, коллагеназы, эластазы, отдельно или в смеси с протеиназами используются при ожогах, для обработки ран, воспалительных очагов, устранения отеков, гематом, келоидных рубцов, кавернозных процессов при туберкулезе легких и др. Ферменты применяются также для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, растворения сгустков крови. В нашей стране разработан первый в мире препарат иммобилизованной стрептокиназы, рекомендованный для лечения инфаркта миокарда. Калликреины—ферменты кининовой системы используются для снижения кровяного давления.

Важной и многообещающей областью энзимотерапии является применение ингибиторов ферментов. Так, естественные ингибиторы протеиназ ( $\alpha_1$ -трипсин,  $\alpha_1$ -химотрипсин,  $\alpha$ -макроглобулин) нашли применение в терапии острых панкреатитов, артритов, аллергических заболеваний, при которых отмечается активация протеолиза и фибринолиза, сопровождающаяся образованием вазоактивных кининов.

В последнее время получило признание применение в онкологической клинике ферментов бактериальной природы в качестве лекарственных средств. Широко используется L-аспарагиназа (выпускается в промышленных количествах и L-глутамин(аспарагин)аза для лечения острых и хронических форм лейкозов и лимфогранулематозов. Более десятка описанных в литературе бактериальных ферментов испытаны в основном на животных с перевивными опухолями или на раковых клетках опухолей человека и животных, выращенных в культуре ткани. Основными постулатами применения ферментов в онкологии являются различия в метаболизме клеток опухолей по сравнению с обменом в нормальной, здоровой, клетке. В частности, современные стратегия и тактика энзимотерапии опухолевых поражений учитывают разную чувствительность нормальных и опухолевых клеток к недостатку (дефициту) незаменимых (так называемых эссенциальных) факторов роста. К таким ростстимулирующим факторам относятся не только пищевые факторы (витамины, незаменимые аминокислоты, макро- и микроэлементы), но и ряд так называемых заменимых веществ, включая заменимые аминокислоты, к недостатку которых опухолевая клетка ока-

зывается в силу особенностей ее обмена более чувствительной, чем нормальная. Лечебный эффект, например, L-аспарагиназы и L-глутамин(аспарагин)азы при лейкозах, вероятнее всего, объясняется необратимым распадом как глутамина, так и аспарагина. Оказалось, что опухолевые клетки для своего роста и размножения нуждаются в аминокислотах из организма, поскольку сами лишены способности синтезировать амиды аминокислот, в то время как нормальные клетки наделены этой способностью. Был сделан вывод о том, что амидный азот глутамина и аспарагина выполняет в клетках ряд уникальных функций, которые лучше выяснены для глутамина (см. главу 12). В частности, амидный азот глутамина оказался абсолютно необходимым и не заменимым другими аминокислотами источником атома азота минимум в 10 реакциях синтеза, например, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, соответственно ДНК и РНК, АТФ, гексозаминов, гистидина и др. Таким образом, не лишена основания гипотеза, что любой фермент или агент, катализирующий необратимое расщепление незаменимого для опухолевой клетки пищевого фактора (включая аминокислоты), может в принципе быть применен в энзимотерапии опухолей, если будут устранены ограничения, связанные с белковой природой фермента. В оценке эффективности ферментов в экспериментальной и клинической онкологии имеется немало противоречий и очень много пробелов. Положительные результаты, отмеченные в ряде случаев, вселяют надежду, что приготовление стандартных ферментных препаратов (включая создание иммобилизованных форм) в промышленных масштабах и их разумное применение в клинике, организованное на строгой научной основе, несомненно дадут в руки врачей еще одно ценное оружие в борьбе с опухолевыми заболеваниями человека.

Идея применения ферментов в качестве лекарственных средств (фармакологии ферментов) всегда казалась заманчивой. Однако их нестабильность, короткий период полураспада, нежелательные антигенные свойства, связанные с белковой природой ферментов и опасностью развития аллергических реакций, трудности доставки к пораженным органам и тканям (мишеням) существенно ограничивали возможности использования ферментных препаратов. В разработке методов иммобилизации ферментов (см. ранее) наметились конкретные пути преодоления указанных трудностей: применение водорастворимых, биосовместимых носителей, например полимолочной кислоты (легко разлагается в организме), использование методов химической модификации и микрокапсулирования, приготовление моно- и поликлональных антител и ферментсодержащих липосом и т.д.

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 почках для экстракорпоральной перфузии крови (типа искусственной почки). Такое лечение полностью исключает нежелательные воздействия на организм чужеродного белка и может проводиться длительное время.

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



# Глава 5

## 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. углевод + вода. Отсюда название «углеводы». Например, глюкоза и фруктоза имеют формулу  $C(H_2O)_6$ , тростниковый сахар (сахароза)  $C_{12}(H_2O)_{11}$ , крахмал  $[C_6(H_2O)_5]_n$  и т.д. В дальнейшем оказалось, что ряд соединений, по своим свойствам относящихся 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 старое название «углеводы» укоренилось и является общепризнанным.

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 в. в результате фундаментальных исследований Э. Фишера. Значительный вклад в изучение углеводов внесли отечественные ученые А.А. Колли, П.П. Шорыгин, 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 в. происходит стремительное развитие химии и биохимии углеводов, обусловленное их важным биологическим значением.

### БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ УГЛЕВОДОВ

Углеводы наряду с белками и липидами являются важнейшими химическими соединениями, входящими в состав живых организмов. У человека и животных углеводы выполняют важные функции: энергетическую (главный вид клеточного топлива), структурную (обязательный компонент большинства внутриклеточных структур) и защитную (участие углеводных компонентов иммуноглобулинов в поддержании иммунитета).

Углеводы (рибоза, дезоксирибоза) используются для синтеза нуклеиновых кислот, они являются составными компонентами нуклеотидных коферментов, играющих исключительно важную роль в метаболизме живых существ. В последнее время все большее внимание к себе привлекают смешанные биополимеры, содержащие углеводы: гликопептиды и гликопротеины, гликолипиды и липополисахариды, гликолипопротеины и т.д. Эти вещества выполняют в организме сложные и важные функции.

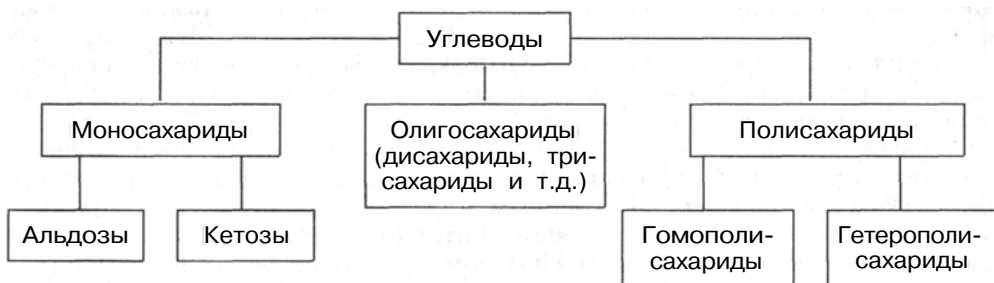
С нарушением обмена углеводов тесно связан ряд заболеваний: сахарный диабет, галактоземия, нарушение в системе депо гликогена, нетолерантность к молоку и т.д.

Следует отметить, что в организме человека и животного 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% от сухой массы, поэтому в целом в биосфере углеводов больше, чем всех других органических соединений вместе взятых.

## КЛАССИФИКАЦИЯ УГЛЕВОДОВ

Углеводы можно определить как альдегидные или кетонные производные полиатомных (содержащих более одной ОН-группы) спиртов или как соединения, при гидролизе которых образуются эти производные.

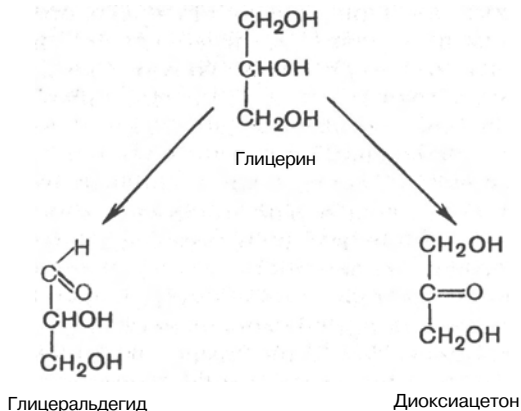
Согласно принятой в настоящее время классификации, углеводы подразделяются на три основные группы: моносахариды, олигосахариды и полисахариды.



## 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.

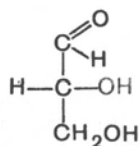
Простейшие представители моносахаридов—триозы: глицеральдегид и диоксиацетон. При окислении первичной спиртовой группы трехатомного спирта—глицерола—образуется глицеральдегид (альдоза), а окисление вторичной спиртовой группы приводит к образованию диоксиацетона (кетоза).



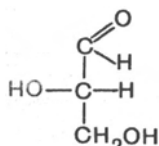
**Стереоизомерия моносахаридов.** Все моносахариды содержат асимметричные атомы углерода: альдотриозы—один центр асимметрии, альдотетрозы—2, альдопентозы—3, альдогексозы—4 и т.д. Кетозы содержат на один асимметричный атом меньше, чем альдозы с тем же числом углеродных атомов. Следовательно, кетотриоза диоксиацетон не содержит асимметричных атомов углерода. Все 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 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 OH-группа у асимметричного атома углерода расположена с правой стороны, принято считать D-глицеральдегидом, а зеркальное отражение — L-глицеральдегидом:



D-глицеральдегид



L-глицеральдегид

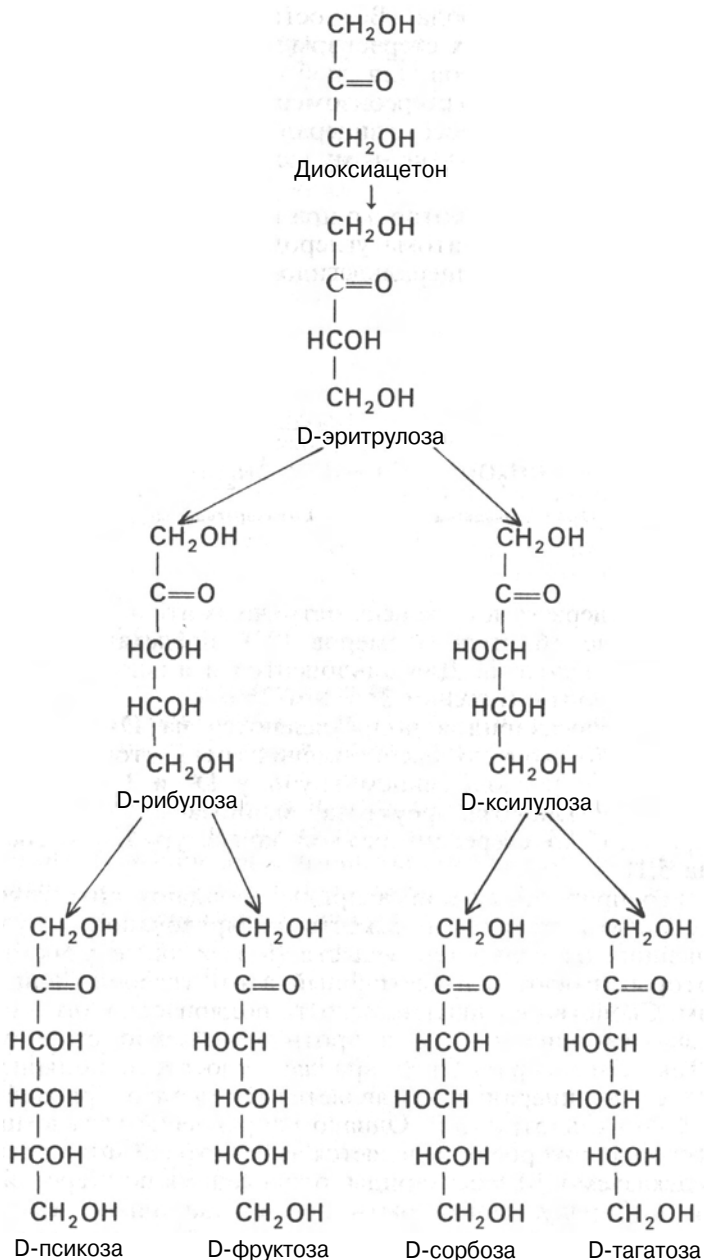
Альдогексозы содержат четыре асимметричных атома углерода и могут существовать в виде 16 стереоизомеров ( $2^4$ ), представителем которых является, например, глюкоза. Для альдопентоз и альдотетроз число стереоизомеров равно соответственно  $2^3 = 8$  и  $2^2 = 4$ .

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 (схема 5.1).

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 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 непредсказуемо. 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.

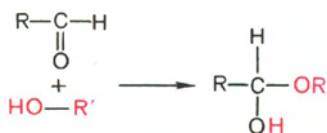
**Циклические (полуацетальные) формы моносахаридов.** Любой моносахарид с конкретными физическими свойствами (температура плавления, растворимость и т.д.) характеризуется специфической величиной удельного

Схема 5.1  
СЕМЕЙСТВО D-КЕТОЗ, СОДЕРЖАЩИХ 3-6 АТОМОВ УГЛЕРОДА



вращения  $[\alpha]_D^{20}$  \*. Установлено, что величина удельного вращения при растворении любого моносахарида постепенно меняется и лишь при длительном стоянии раствора достигает вполне определенного значения. Например, для свежеприготовленного раствора глюкозы  $[\alpha]_D^{20} = +112,2^\circ$ , после длительного стояния раствора эта величина достигает равновесного значения  $[\alpha]_D^{20} = +52,5^\circ$ . Изменение величины удельного вращения при стоянии (во времени) растворов моносахаридов называется мутаротацией. Очевидно, мутаротация должна вызываться изменением асимметрии молекулы, а следовательно, трансформацией ее структуры в растворе.

Явление мутаротации имеет объяснение. Известно, что альдегиды и кетоны легко и обратимо реагируют с эквимолярным количеством спирта с образованием полуацеталей:



Полуацеталь

Реакция образования полуацетала возможна 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 асимметрический центр (для D-глюкозы это C-1). Шестичленные кольца сахаров называют пиранозами, а пятичленные—фуранозами.  $\alpha$ -Форма—это форма, у которой расположение полуацетального гидроксила такое же, как у асимметричного углеродного атома, определяющего принадлежность к D- или L-ряду. Иными словами, в формулах с  $\alpha$ -модификацией моносахаридов D-ряда полуацетальный гидроксил пишут справа, а в формулах представителей L-ряда—слева. При написании  $\beta$ -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 значение удельного вращения, характерное для исходной циклической формы, постепенно меняется. Наконец, устанавливается постоянное удельное вращение, которое характерно для равновесной смеси таутомеров. Например, известно, что в водных растворах глюкоза находится главным образом в виде  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкопираноз, в меньшей степени—в виде  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкофураноз и совсем небольшое количество глюкозы—в виде альдегидной формы.

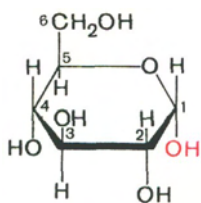
Следует подчеркнуть, что из различных таутомерных форм глюкозы в свободном состоянии известны лишь  $\alpha$ - и  $\beta$ -пиранозы. Существование малых количеств фураноз и альдегидной формы в растворах доказано, но

\* Удельное вращение  $[\alpha]_D^{20}$  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.

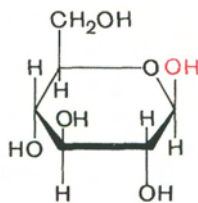
в свободном состоянии они не могут быть выделены вследствие своей неустойчивости.

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,— 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  $\text{CH}_2\text{OH}$  пишут над этим атомом углерода, а водородный атом при нем—внизу.

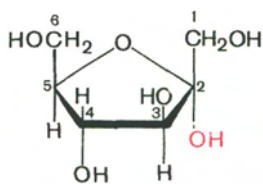
Наконец, следует помнить, что при написании структурных формул по Хеурсу гидроксильная группа при C-1 должна быть расположена ниже плоскости кольца в  $\alpha$ -форме и выше—в  $\beta$ -форме:



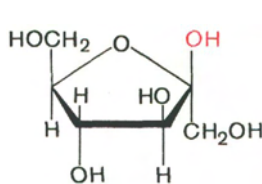
$\alpha$ -D-глюкопираноза



$\beta$ -D-глюкопираноза



$\alpha$ -D-фруктофураноза

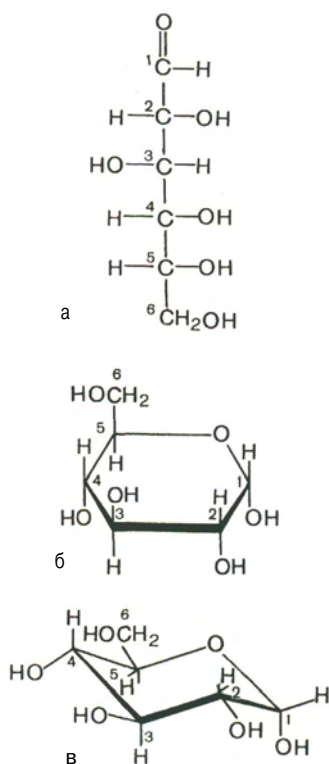


$\beta$ -D-фруктофураноза

Проекционные формулы Хеурса не отражают подлинной конформации моносахаридов. Подобно циклогексану, пиранозное кольцо может принимать две конфигурации—форму кресла и форму лодки (конформационные формулы). Форма кресла обычно более устойчива, и, по-видимому, именно она преобладает в большей части природных сахаров (рис. 5.1).

## Основные реакции моносахаридов, продукты реакций и их свойства

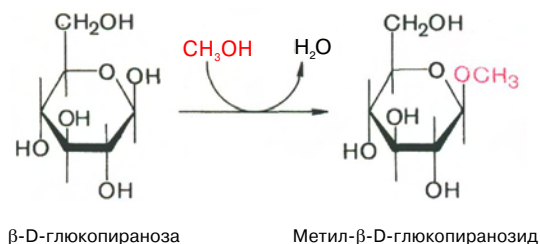
**Реакции полуацетального гидроксила.** Уже отмечалось, что моносахариды как в кристаллическом состоянии, так и в растворе в основном существуют в полуацетальных формах. Полуацетальный гидроксил отличается большей реакционной способностью и может замещаться другими группировками в реакциях со спиртами, карбоновыми кислотами, фенолами и т.д.



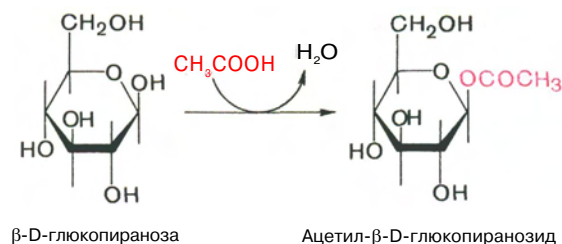
**Рис. 5.1.**  $\alpha$ -D-глюкоза.

а - линейная формула глюкозы (альдогексоза); б - структурная формула по Хеурсу; в - конформационная формула (форма кресла).

Продукт реакции называют гликозидом. Соответственно  $\alpha$ - и  $\beta$ -изомерам моносахаридов существуют  $\alpha$ - и  $\beta$ -гликозиды. Например, при реакции метилового спирта с глюкозой (допустим, в  $\beta$ -пиранозной форме) в присутствии неорганических кислот образуется продукт алкилирования метил- $\beta$ -D-глюкопиранозид:

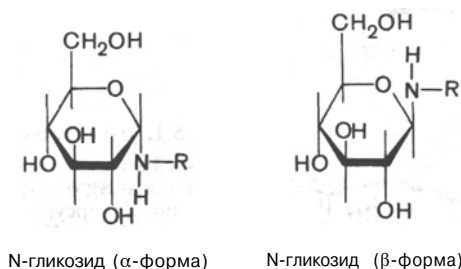


При действии на  $\beta$ -D-глюкопиранозу уксусной кислотой образуется продукт ацилирования ацетил- $\beta$ -D-глюкопиранозид:



Ацилированию и метилированию способны подвергаться и остальные группы моносахаридов, но при намного более жестких условиях. Если в реакцию вступают спирты, фенолы или карбоновые кислоты, продукты реакции называют O-гликозидами. Следовательно, метил-β-D-глюкопиранозид и ацетил-β-D-глюкопиранозид 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 кислород\*. N-гликозиды рассматривают как производные моносахаридов, у которых гликозидная 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).

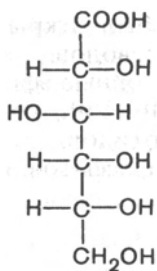
**Реакции с участием карбонильной группы.** Линейная форма в кристаллических препаратах моносахаридов и их растворах присутствует в незначительных количествах, но ее участие в таутомерном равновесии обеспечивает моносахаридам все свойства, присущие альдозам (в альдозах) или кетонам (в кетозах). Способность альдоз и кетоз присоединять спирты представлена ранее.

Рассмотрим некоторые другие их свойства.

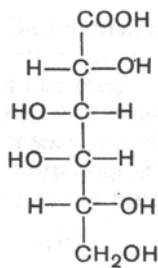
**Окисление моносахаридов.** Обработка альдоз слабыми окислителями приводит к превращению альдегидной группы в положении атома С-1 в карбоксильную группу с образованием так называемых альдоновых кислот. Альдоновой кислотой может быть D-глюконовая кислота, которая образуется при окислении альдегидной группы D-глюкозы. Фосфорилированная форма D-глюконовой кислоты играет важную роль в качестве промежуточного продукта углеводного обмена. Другой пример — D-галактоновая кислота — продукт окисления альдегидной группы D-галактозы.

\* Существуют еще S-гликозиды, которые представляют собой производные циклических форм тиосахаридов, в меркаптогруппе (—SH) при С-1 которых атом водорода замещен радикалом. S-гликозиды содержатся в ряде растений (горчица, черногорка, боярышник и др.).





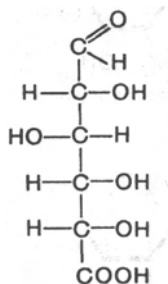
D-глюконовая кислота



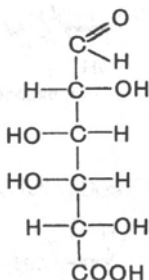
D-галактоновая кислота

В альдуруновых, или уроновых, кислотах окислена (с образованием карбоксильной группы) первичная спиртовая группа, а альдегидная группа остается неокисленной. Уроновая кислота, образующаяся из D-глюкозы, носит название D-глюкуроновой кислоты, а образующаяся из D-галактозы – D-галактоуроновой кислоты.

Уроновые кислоты весьма важны в биологическом отношении, многие из них являются компонентами полисахаридов.



D-глюкуроновая кислота



D-галактуруновая кислота

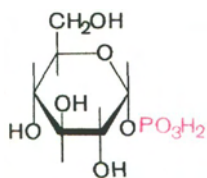
Восстановление моносахаридов. Моносахариды легко гидрируются по связи С—О и при этом превращаются в многоатомные спирты (сахароспирты). D-глюкоза, например, образует спирт сорбит, а D-манноза – маннит. Восстановление D-фруктозы приводит к эквимолекулярной смеси эпимеров – D-маннита и D-сорбита, так как 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.). В 1980 г. группой

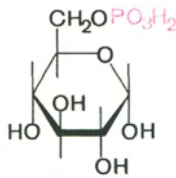
бельгийских исследователей (Г. Херс и др.) был открыт фруктозо-2,6-бис-фосфат—важный регулятор метаболизма углеводов.

Большой интерес представляют пирофосфорные эфиры моносахаридов, например 5-фосфорибозил-1-пирофосфат (ФРПФ), который участвует в синтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

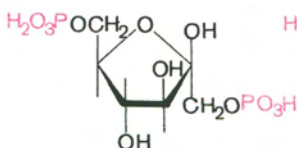
Ниже приводятся формулы некоторых фосфатов сахаров, играющих важную роль в обмене веществ:



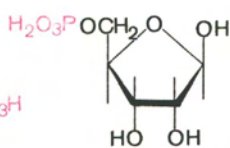
Глюкозо-1-фосфат



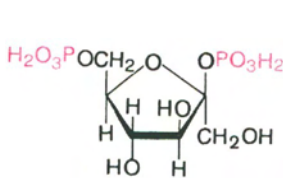
Глюкозо-6-фосфат



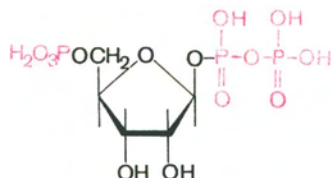
Фруктозо-1,6-бисфосфат



Рибозо-5-фосфат

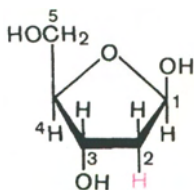


Фруктозо-2,6-бисфосфат



5-Фосфорибозил-1-пирофосфат

**Дезоксисахара.** У дезоксисахаров одна из гидроксильных групп, присоединенных к кольцевой структуре, замещена на атом водорода. Они образуются при гидролизе ряда соединений, играющих важную роль в биологических процессах. Примером может служить дезоксирибоза, входящая в состав нуклеиновых кислот (ДНК):



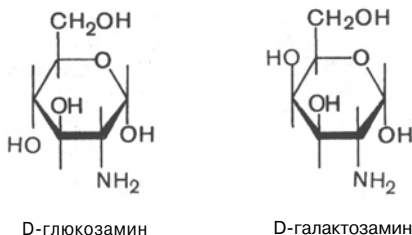
2-Дезокси-D-рибофураноза  
(β-форма)

**Аминосахара.** Это производные моносахаридов, гидроксильная группа которых  $-OH$  замещена аминогруппой  $-NH_2$ . В зависимости от положения аминогруппы (при атомах углерода) в молекуле аминсахара

различают 2-амино-, 3-амино- и 4-аминосахара и т.д. По числу аминогрупп выделяют моноаминосахара и диаминосахара.

Аминосахара обладают всеми свойствами аминов, обычных моносахаров, а также специфическими свойствами, обусловленными пространственной близостью гидроксильных и аминных групп.

В организме человека и животных наиболее важными аminosахарами являются D-глюкозамин и D-галактозамин:



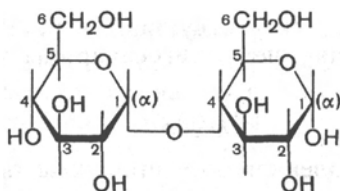
Аминосахара входят в состав мукополисахаридов животного, растительного и бактериального происхождения, являются углеводными компонентами различных гликопротеинов и гликолипидов. В составе этих высокомолекулярных соединений аминогруппа аminosахара чаще всего ацилирована, а иногда сульфирована (см. главу 21).

## ОЛИГОСАХАРИДЫ

**Олигосахариды** — углеводы, молекулы которых содержат от 2 до 10 остатков моносахаридов, соединенных гликозидными связями. В соответствии с этим различают дисахариды, трисахариды и т.д.

Дисахариды — сложные сахара, каждая молекула которых при гидролизе распадается на две молекулы моносахаридов. Дисахариды наряду с полисахаридами являются одними из основных источников углеводов в пище человека и животных. По строению дисахариды — это гликозиды, в которых 2 молекулы моносахаридов соединены гликозидной связью.

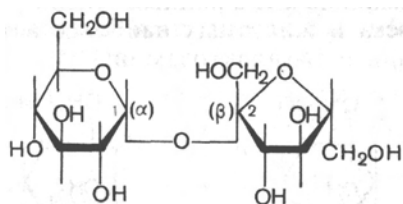
Среди дисахаридов наиболее широко известны мальтоза, лактоза и сахароза. Мальтоза, являющаяся  $\alpha$ -глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -глюкопиранозой, образуется как промежуточный продукт при действии амилаз на крахмал (или гликоген), содержит 2 остатка  $\alpha$ -D-глюкозы (название 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 дисахариды обладают восстанавливающими свойствами.

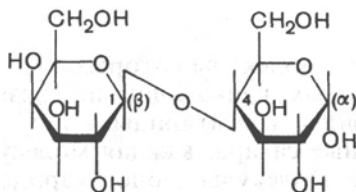
Одним из наиболее распространенных дисахаридов является сахароза — обычный пищевой сахар. Молекула сахарозы состоит из одного остатка D-глюкозы и одного остатка D-фруктозы. Следовательно, это  $\alpha$ -глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -фруктофуранозид:



Сахароза

В отличие от большинства дисахаридов сахароза не имеет свободного полуацетального гидроксила и не обладает восстанавливающими свойствами. Гидролиз сахарозы приводит к образованию смеси, которую называют инвертированным сахаром. В этой смеси преобладает сильно левовращающая фруктоза, которая инвертирует (меняет на обратный) знак вращения правовращающего раствора исходной сахарозы.

Дисахарид лактоза содержится только в молоке и состоит из D-галактозы и D-глюкозы. Это —  $\beta$ -галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-глюкопираноза:



Лактоза

Благодаря наличию в молекуле свободного полуацетального гидроксила (в остатке глюкозы) лактоза относится к числу редуцирующих дисахаридов.

Среди природных трисахаридов наиболее известна рафиноза, содержащая остатки фруктозы, глюкозы и галактозы. Рафиноза в больших количествах содержится в сахарной свекле и во многих других растениях. В целом олигосахариды, присутствующие в растительных тканях, разнообразнее по своему составу, чем олигосахариды животных тканей.

## ПОЛИСАХАРИДЫ

Полисахариды — высокомолекулярные продукты поликонденсации моносахаридов, связанных друг с другом гликозидными связями и образующих линейные или разветвленные цепи. Наиболее часто встречающимся моносахаридным звеном полисахаридов является D-глюкоза. В качестве компонентов полисахаридов могут быть также D-манноза, D- и L-галактоза, D-ксилоза и L-арабиноза, D-глюкуроновая, D-галактоуроновая и D-маннуриновая кислоты, D-глюкозамин, D-галактозамин, сиаловые и аминокислоты.

**Рис. 5.2.** Строение двумономерных гетерополисахаридов (схема).

а - неразветвленные; б - разветвленные.

Каждый моносахарид, входящий в состав полимерной молекулы, может находиться в пиранозной или фуранозной форме, а также может быть присоединен к любой из свободных гидроксильных групп следующего моносахаридного остатка  $\alpha$ - или  $\beta$ -гликозидной связи. Полисахариды различаются не только своим моносахаридным составом, но также молекулярной массой и структурными особенностями. Так, некоторые полисахариды — линейные полимеры, другие — сильно разветвлены. Молекулярная масса полисахаридов относительно высока и может быть измерена существующими методами лишь с известной степенью приближения. Это отличает полисахариды от олигосахаридов, степень полимеризации которых может быть полно определена классическими химическими методами. Иными словами, однотипно построенные молекулы химически однородных полисахаридов чаще всего различаются величиной. Поэтому выделяемые индивидуальные полисахариды, как правило, являются смесями полимергомологов.

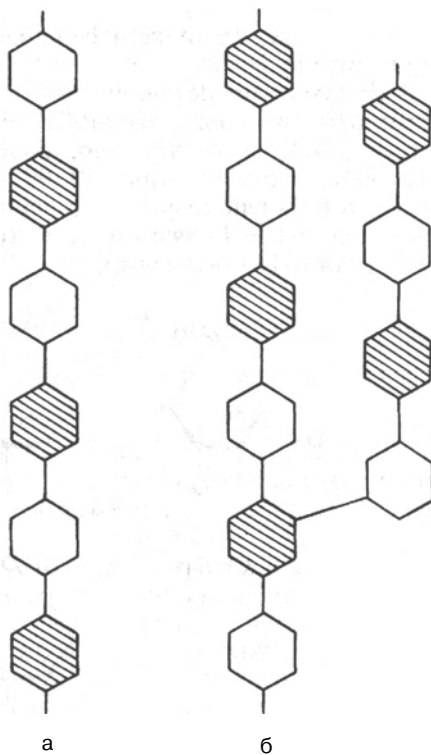
С точки зрения общих принципов строения, полисахариды можно разделить на 2 группы: гомополисахариды, состоящие из моносахаридных единиц только одного типа, и гетерополисахариды, для которых характерно наличие двух и более типов мономерных звеньев (рис. 5.2). В данной главе в основном речь будет идти о гомополисахаридах. Гетерополисахариды более подробно представлены в следующих главах (см. главы 21 и 22).

## Гомополисахариды

По своему функциональному назначению гомополисахариды могут быть разделены на две группы: структурные и резервные полисахариды. Важным структурным гомополисахаридом является целлюлоза, а главными резервными — гликоген и крахмал (у животных и растений соответственно).

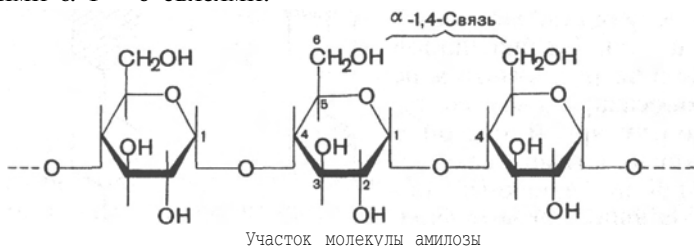
Строгая классификация по химическому строению или биологической роли вследствие отсутствия для многих полисахаридов исчерпывающих данных невозможна. Поэтому чаще всего полисахариды «именуются» по источникам выделения, несмотря на то что один и тот же полисахарид может быть получен из совершенно разных источников.

Крахмал, как отмечалось, является основным резервным материалом растительных организмов. В небольших количествах он содержится в листьях, но главным образом накапливается в семенах (зерна злаков, например пшеницы, риса, кукурузы, содержат до 70% крахмала), а также

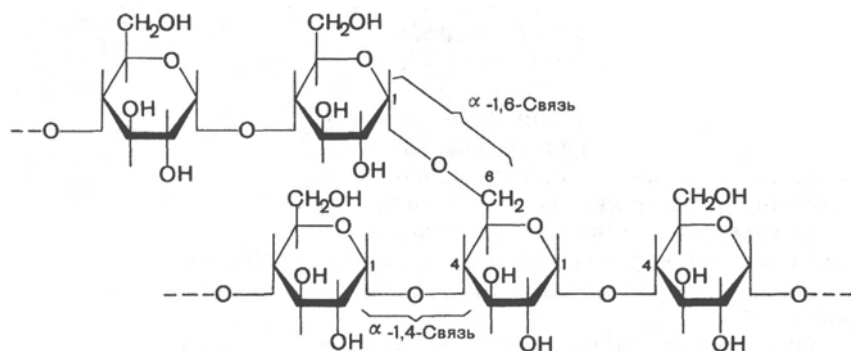


в луковицах, клубнях и сердцевине стебля растений, где содержание его доходит до 30%.

Крахмал представляет собой смесь 2 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 D-глюкозы, соединенных в амилозе и линейных цепях амилопектина  $\alpha$ -1→4-связями, а в точках ветвления амилопектина — межцепочечными  $\alpha$ -1→6-связями:



Участок молекулы амилозы



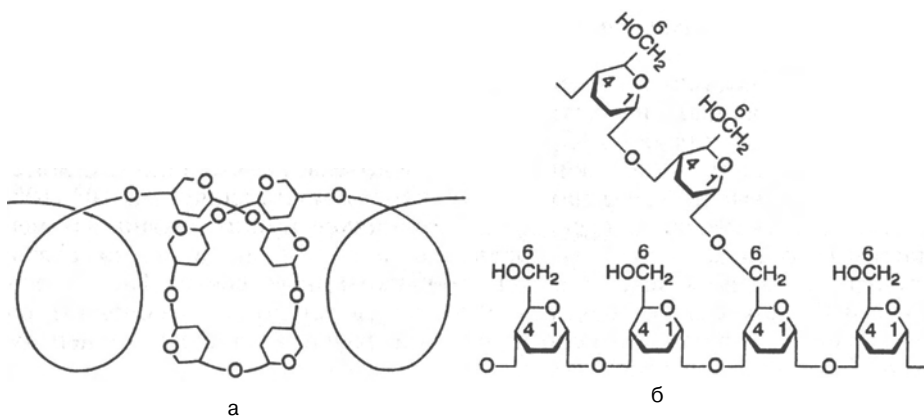
Участок молекулы амилопектина

Итак, единственным моносахаридом, входящим в состав крахмала, является D-глюкоза. В молекуле амилозы линейно связано в среднем около 1000 остатков глюкозы; отдельные участки молекулы амилопектина состоят из 20–30 таких единиц. В настоящее время общепринятой является «ветвистая» структура отдельных цепочек с  $\alpha$ -1→4-связями в молекуле амилопектина (рис. 5.3).

Известно, что 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 мицеллярный раствор, но форма мицелл несколько иная. Полисахарид амилопектин окрашивается йодом в красно-фиолетовый цвет.

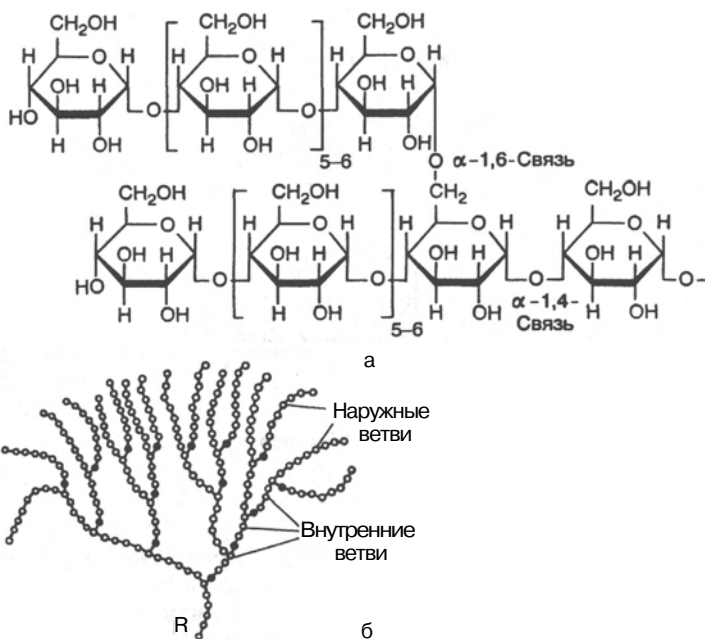
Крахмал имеет молекулярную массу  $10^5$ – $10^7$  Да. При частичном кислотном гидролизе крахмала образуются полисахариды меньшей степени полимеризации — декстрины\*, при полном гидролизе — глюкоза. Для чело-

\* 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. 5.3.** Структура крахмала.

а - амилоза с характерной для нее спиральной структурой; б - амилопектин, образующий в точках ветвления связи типа 1-6.



**Рис. 5.4.** Строение отдельного участка (а) и всей молекулы (б) гликогена (по Майеру).

Белые кружки - остатки глюкозы, соединенные  $\alpha$ -1,4-связью; черные кружки - остатки глюкозы, присоединенные  $\alpha$ -1,6-связью; R - редуцирующая концевая группа. Внутренние цепи, или ветви, - участки между точками ветвления. Наружные цепи, или ветви, начинаются от точки ветвления и кончатся нередуцирующим остатком глюкозы.

века крахмал является важным пищевым углеводом; содержание его в муке составляет 75–80%, в картофеле – 25%.

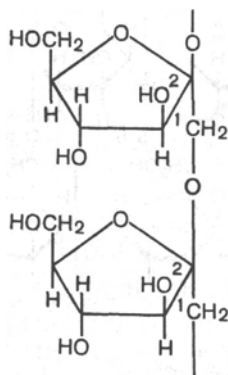
Гликоген—главный резервный полисахарид высших животных и человека, построенный из остатков D-глюкозы. Эмпирическая формула гликогена, как и крахмала,  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Гликоген содержится практически во всех органах и тканях животных и человека; наибольшее количество обнаружено в печени и мышцах. Молекулярная масса гликогена  $10^5$ – $10^8$  Да и более. Его молекула построена из ветвящихся полиглюкозидных цепей, в которых остатки глюкозы соединены  $\alpha$ -1->4-гликозидными связями. В точках ветвления имеются  $\alpha$ -1->6-гликозидные связи. По строению гликоген близок к амилопектину. В молекуле гликогена различают внутренние ветви—участки от периферической точки ветвления до нередуцирующего конца цепи (рис. 5.4).

Гликоген характеризуется более разветвленной структурой, чем амилопектин; линейные отрезки в молекуле гликогена включают 11–18 остатков  $\alpha$ -D-глюкопиранозы.

При гидролизе гликоген, подобно крахмалу, расщепляется с образованием сначала декстринов, затем мальтозы и, наконец, глюкозы.

Инулин—полисахарид, содержащийся в клубнях и корнях георгинов, артишоков и одуванчиков. При его гидролизе образуется фруктоза, следовательно, он представляет собой фруктазан.

Метилирование инулина свидетельствует, что остатки D-фруктозы связаны между собой 2->1-связями и находятся в фуранозной форме:



Участок молекулы инулина

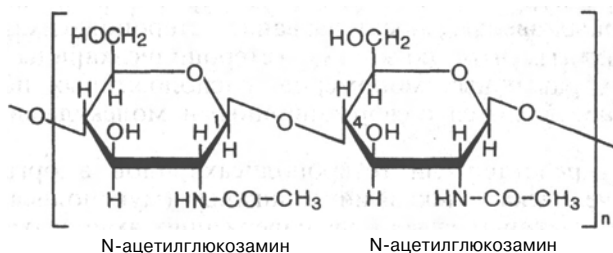
Степень полимеризации инулина равна примерно 35 моносахарным остаткам. Этот полисахарид в отличие от картофельного крахмала легко растворяется в теплой воде. Инулин используют в физиологических исследованиях для определения скорости клубочковой фильтрации в почках.

Хитин—важный структурный полисахарид беспозвоночных животных (главным образом членистоногих). Из него, в частности, построен наружный скелет ракообразных и насекомых.

Хитин также частично или полностью замещает целлюлозу в клеточных стенках сапрофитных растений, например грибов.

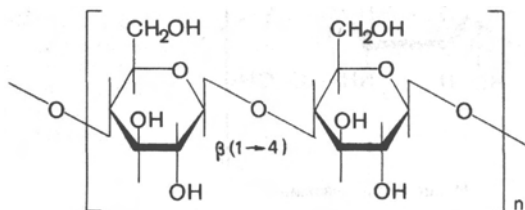


Структуру хитина составляют N-ацетил-D-глюкозаминовые звенья, соединенные  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями:



Повторяющиеся звенья в молекуле хитина

Целлюлоза (клетчатка) — наиболее широко распространенный структурный полисахарид растительного мира. Он состоит из  $\alpha$ -глюкозных остатков в их  $\beta$ -пиранозной форме, т.е. в молекуле целлюлозы  $\beta$ -глюкопиранозные мономерные единицы линейно соединены между собой  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-связями:



Участок молекулы целлюлозы

При частичном гидролизе целлюлозы образуется дисахарид целлобиоза, а при полном гидролизе — D-глюкоза. Молекулярная масса целлюлозы 1000–2000 кДа. Клетчатка не переваривается ферментами пищеварительного тракта, так как набор этих ферментов у человека не содержит гидролаз, расщепляющих  $\beta$ -связи. В связи с этим целлюлозу можно рассматривать как значительный неиспользуемый «пищевой» резерв. Вместе с тем известно, что присутствие оптимальных количеств клетчатки в пище способствует формированию кала. При полном исключении клетчатки из пищи нарушается формирование каловых масс.

В кишечнике жвачных и других травоядных животных имеются микроорганизмы, способные к ферментативному расщеплению  $\beta$ -связей ( $\beta$ -глюкозидных связей), и для этих животных целлюлоза является важным источником пищевых калорий.

Наконец, целлюлоза и ее производные имеют колоссальное практическое значение. Основная масса целлюлозы используется для изготовления хлопчатобумажных тканей и бумаги. Кроме того, на основе целлюлозы производятся искусственные волокна, пластмассы и т.д. Характерной особенностью целлюлозы, определяющей в значительной степени ее механические, физико-химические и химические свойства, является линейная конформация молекул, закрепленная внутримолекулярными водородными связями.

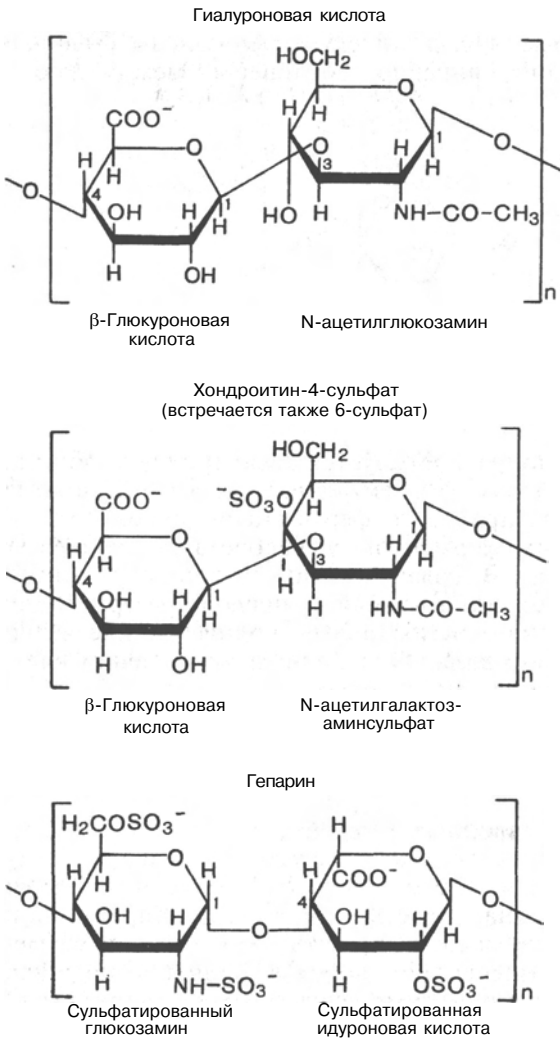
# Гетерополисахариды

Полисахариды, в структуре которых характерно наличие двух или более типов мономерных звеньев, носят название гетерополисахаридов.

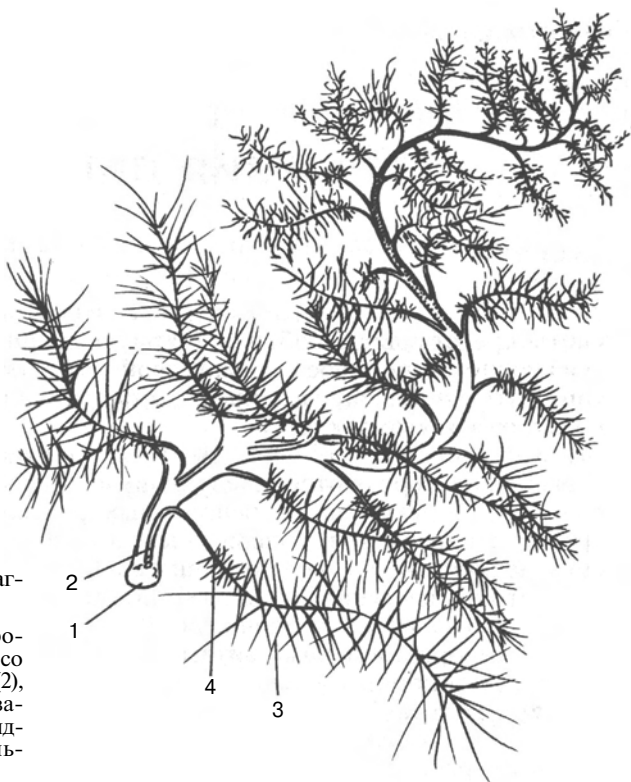
Принято считать, что, поскольку гетерополисахариды чаще состоят только из двух различных мономеров, расположенных повторяющимся образом, они не являются информационными молекулами [Бохински Р., 1987].

Важнейшие представители гетерополисахаридов в органах и тканях животных и человека — гликозаминогликаны (мукополисахариды). Они состоят из цепей сложных углеводов, содержащих аминсахара и уроновые кислоты.

Различают шесть основных классов гликозаминогликанов (см. главу 21). Каждый из гликозаминогликанов содержит характерную для него повторяющуюся дисахаридную единицу; во всех случаях (кроме кератансуль-



**Рис. 5.5.** Строение некоторых сложных полисахаридов (гликозаминогликанов).



**Рис. 5.6.** Протеогликановый агрегат (схема).

Единая длинная молекула гиалуроната (1) нековалентно связана со многими молекулами белка (2), каждая из которых содержит ковалентно связанные молекулы хондроитинсульфата (3) и кератансульфата (4).

фатов) эта единица содержит либо глюкуроновую, либо идуроновую кислоту. Все гликозаминогликаны, за исключением гиалуроновой кислоты, содержат остатки моносахаридов с O- или N-сульфатной группой.

Гликозаминогликаны значительно различаются по размерам, их молекулярные массы в пределах от  $10^4$  Да для гепарина до  $10^7$  Да для гиалуроновой кислоты.

Выделенные индивидуальные гликозаминогликаны могут содержать смесь цепей различной длины (рис. 5.5). Гликозаминогликаны как основное скрепляющее вещество связаны со структурными компонентами костей и соединительной ткани. Их функция состоит также в удержании большой массы воды и в заполнении межклеточного пространства. Иными словами, гликозаминогликаны — основной компонент внеклеточного вещества — желатинообразного вещества, заполняющего межклеточное пространство тканей. Они также содержатся в больших количествах в синовиальной жидкости — это вязкий материал, окружающий суставы, который служит смазкой и амортизатором.

Поскольку водные растворы гликозаминогликанов гелеобразны, их называют мукополисахаридами.

Наконец, если цепи гликозаминогликана присоединены к белковой молекуле, соответствующее соединение называют протеогликаном.

Протеогликаны образуют основное вещество внеклеточного матрикса. В отличие от простых гликопротеинов, которые содержат только несколько процентов углеводов (по массе), протеогликаны могут содержать до 95% (и более) углеводов (рис. 5.6).

## Глава 6

# ХИМИЯ ЛИПИДОВ

Липиды представляют собой обширную группу соединений, существенно различающихся по своей химической структуре и функциям. Поэтому трудно дать единое определение, которое подошло бы для всех соединений, относящихся к этому классу.

Можно сказать, что липиды представляют собой группу веществ, которые характеризуются следующими признаками: нерастворимостью в воде; растворимостью в неполярных растворителях, таких, как эфир, хлороформ или бензол; содержанием высших алкильных радикалов; распространенностью в живых организмах.

Под это определение попадает большое количество веществ, в том числе такие, которые обычно причисляют к другим классам соединений: например, жирорастворимые витамины и их производные, каротиноиды, высшие углеводороды и спирты. Включение всех этих веществ в число липидов в известной степени оправдано, потому что в живых организмах они находятся вместе с липидами и вместе с ними экстрагируются неполярными растворителями. С другой стороны, имеются представители липидов, которые довольно хорошо растворяются в воде (например, лизолецитины). Термин «липиды» является более общим, чем термин «липоиды», который объединяет группу жироподобных веществ, таких, как фосфолипиды, стерины, сфинголипиды и др.

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЛИПИДОВ

Липиды играют важнейшую роль в процессах жизнедеятельности. Будучи одним из основных компонентов биологических мембран, липиды влияют на их проницаемость, участвуют в передаче нервного импульса, создании межклеточных контактов. Жир служит в организме весьма эффективным источником энергии либо при непосредственном использовании, либо потенциально — в форме запасов жировой ткани. В натуральных пищевых жирах содержатся жирорастворимые витамины и «незаменимые» жирные кислоты. Важная функция липидов — создание термоизоляционных покровов у животных и растений, защита органов и тканей от механических воздействий.

## КЛАССИФИКАЦИЯ ЛИПИДОВ

Существует несколько классификаций липидов. Наибольшее распространение получила классификация, основанная на структурных особенностях липидов. По этой классификации различают следующие основные классы липидов.

- А. Простые липиды:** сложные эфиры жирных кислот с различными спиртами.
1. Глицериды (ацилглицерины, или ацилглицеролы—по международной номенклатуре) представляют собой сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот.
  2. Воска: сложные эфиры высших жирных кислот и одноатомных или двухатомных спиртов.
- Б. Сложные липиды:** сложные эфиры жирных кислот со спиртами, дополнительно содержащие и другие группы.
1. Фосфолипиды: липиды, содержащие, помимо жирных кислот и спирта, остаток фосфорной кислоты. В их состав часто входят азотистые основания и другие компоненты:
    - а) глицерофосфолипиды (в роли спирта выступает глицерол);
    - б) сфинголипиды (в роли спирта—сфингозин).
  2. Гликолипиды (гликосфинголипиды).
  3. Стероиды.
  4. Другие сложные липиды: сульфолипиды, аминлипиды. К этому классу можно отнести и липопротеины.
- В. Предшественники и производные липидов:** жирные кислоты, глицерол, стеролы и прочие спирты (помимо глицерола и стеролов), альдегиды жирных кислот, углеводороды, жирорастворимые витамины и гормоны.

## 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 липидов\*.

В природе обнаружено свыше 200 жирных кислот, однако в тканях человека и животных в составе простых и сложных липидов найдено около 70 жирных кислот, причем более половины из них в следовых количествах. Практически значительное распространение имеют немногим более 20 жирных кислот. Все они содержат четное число углеродных атомов, главным образом от 12 до 24. Среди них преобладают кислоты, имеющие  $C_{16}$  и  $C_{18}$  (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и линолевая). Нумерацию углеродных атомов в жирно-кислотной цепи начинают с атома углерода карбоксильной группы. Примерно  $\frac{3}{4}$  всех жирных кислот являются непредельными (ненасыщенными), т.е. содержат двойные связи. Ненасыщенные жирные кислоты человека и животных, участвующие в построении липидов, обычно содержат двойную связь между (9-м и 10-м атомами углеводородов); дополнительные двойные связи чаще бывают на участке между 11-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

\* В природе значительно чаще встречаются длинноцепочечные жирные кислоты с числом углеродных атомов больше двенадцати, часто их называют - «высшие жирные кислоты».

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».

Систематическое название жирной кислоты чаще всего образуется путем добавления к названию углеводорода окончания **-овая**. Насыщенные кислоты при этом имеют окончание **-ановая** (например, октановая кислота – систематическое название, каприловая кислота – тривиальное название), а ненасыщенные кислоты – **-еновая** (например, октадеценовая кислота – систематическое название, олеиновая кислота – тривиальное название) (табл. 6.1; 6.2).

Таблица 6.1. **Некоторые физиологически важные насыщенные жирные кислоты**

Число атомов С	Тривиальное название	Систематическое название	Химическая формула соединения
6	Капроновая	Гексановая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$
8	Каприловая	Октановая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$
10	Каприновая	Декановая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$
12	Лауриновая	Додекановая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$
14	Миристиновая	Тетрадекановая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$
16	Пальмитиновая	Гексадекановая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$
18	Стеариновая	Октадекановая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$
20	Арахидиновая	Эйкозановая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{18}-\text{COOH}$
22	Бегеновая	Докозановая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{20}-\text{COOH}$
24	Лигноцериновая	Тетракозановая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{22}-\text{COOH}$

В соответствии с систематической номенклатурой количество и положение двойных связей в ненасыщенных жирных кислотах часто обозначают с помощью цифровых символов: например, олеиновую кислоту как 18:1;9, линолевую кислоту как 18:2;9,12, где первая цифра – число углеродных атомов, вторая – число двойных связей, а следующие цифры – номера ближайших к карбоксилу углеродных атомов, вовлеченных в образование двойной связи.

В специальной литературе жирные кислоты часто изображают в виде зигзагообразной вытянутой линии, отражающей жесткость валентного угла атомов углерода в  $111^\circ$  для насыщенной и в  $123^\circ$  – для двойной связи. Однако такая конформация является условной и справедлива только для случая, когда жирная кислота находится в кристаллическом состоянии. В растворах жирно-кислотная цепь может образовывать бесчисленное количество конформаций вплоть до клубка, в котором имеются и линейные участки различной длины в зависимости от числа двойных связей. Клубки могут слипаться между собой, образуя так называемые 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.

Известно также, что при наличии двойной связи в жирнокислотной цепи вращение углеродных атомов относительно друг друга ограничено. Это обеспечивает существование ненасыщенных жирных кислот в виде геомет-

Таблица 6.2. **Некоторые физиологически важные ненасыщенные жирные кислоты**

Число атомов С	Тривиальное название	Систематическое название, включая местонахождение двойных связей	Химическая формула соединения
<b>Моноеновые кислоты</b>			
16	Пальмитиновая	9-гексадеценовая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
18	Олеиновая	9-октадеценовая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
22	Эруковая	13-докозеновая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{COOH}$
<b>Диеновые кислоты</b>			
18	Линолевая	9,12-октадекадиеновая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
<b>Триеновые кислоты</b>			
18	Линоленовая	9,12,15-октадекатриеновая	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
<b>Тетраеновые кислоты</b>			
20	Арахидоновая	5,8,11,14-эйкозатетраеновая	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$
<b>Пентаеновые кислоты</b>			
22	Клупанодоновая	7,10,13,16,19-докозапентаеновая	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$

рических изомеров (рис. 6.1), причем природные ненасыщенные жирные кислоты имеют *цис*-конфигурацию и крайне редко *транс*-конфигурации. Считают, что жирной кислоте с несколькими двойными связями *цис*-конфигурация придает углеводородной цепи изогнутый и укороченный вид. По этой причине молекулы этих кислот занимают больший объем, а при образовании кристаллов упаковываются не так плотно, как *транс*-изомеры. Вследствие этого *цис*-изомеры имеют более низкую температуру плавления (олеиновая кислота, например, при комнатной температуре находится в жидком состоянии, тогда как элаидиновая — в кристаллическом). *Цис*-конфигурация делает ненасыщенную кислоту менее стабильной и более подверженной катаболизму.

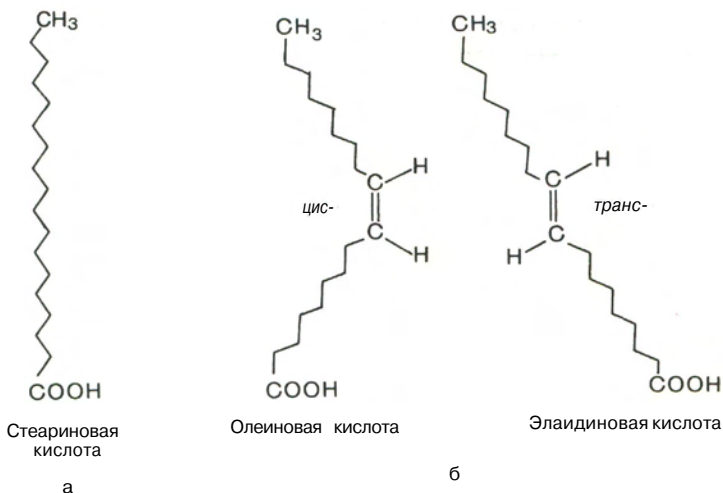
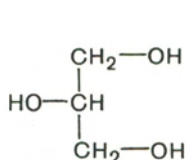


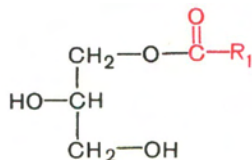
Рис. 6.1. Конфигурация 18-углеродных насыщенных (а) и мононенасыщенных (б) жирных кислот.

## ГЛИЦЕРИДЫ (АЦИЛГЛИЦЕРОЛЫ)

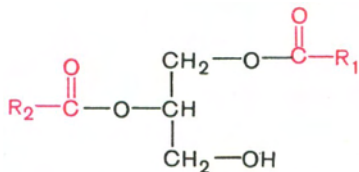
**Глицериды** (ацилглицерины, или ацилглицеролы\*) представляют собой сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот. Если жирными кислотами этерифицированы все три гидроксильные группы глицерина (ацильные радикалы  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$  могут быть одинаковы или различны), то такое соединение называют триглицеридом (триацилглицерол), если две — диглицеридом (диацилглицерол) и, наконец, если этерифицирована одна группа — моноглицеридом (моноацилглицерол):



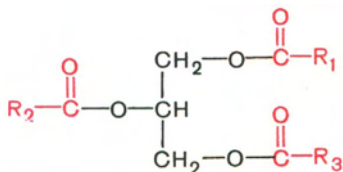
Глицерин (глицерол)



Моноглицерид (моноацилглицерол)



Диглицерид (диацилглицерол)



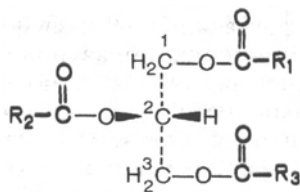
Триглицерид (триацилглицерол)

\* Согласно рекомендации Международной номенклатурной комиссии, глицериды следует называть ацилглицеролами.



Наиболее распространенными являются триглицериды, часто называемые нейтральными жирами или просто жирами. Нейтральные жиры находятся в организме либо в форме протоплазматического жира, являющегося структурным компонентом клеток, либо в форме запасного, резервного, 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.

Как отмечалось, основную массу природных нейтральных жиров составляют триглицериды. Жирные кислоты в триглицеридах могут быть насыщенными и ненасыщенными. Из жирных кислот чаще встречаются пальмитиновая, стеариновая и олеиновые 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 разным жирным кислотам, то смешанными. Названия смешанных триглицеридов образуются в зависимости 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). Необходимо отметить, что положение крайних атомов в молекуле глицерина на первый взгляд равнозначно, тем не менее их обозначают сверху вниз—1 и 3. Это объясняется прежде всего тем, что в структуре триглицерида при пространственном ее рассмотрении крайние «глицериновые» атомы углерода становятся уже не равнозначными, если гидроксилы 1 и 3 ацилированы разными жирными кислотами. При необходимости применяют также систему стереохимической нумерации (обозначают *sn*—stereochemical numbering): например, 1,2-дистеарил-3-пальмитил-*sn*-глицерол:



Триацил-*sn*-глицерол

По этой системе, если в проекции Фишера гидроксильная группа при 2-м углеродном атоме глицерина располагается слева, атому углерода, находящемуся над ним, присваивается номер 1, а расположенному под ним—номер 3.

Действительно, углероды 1 и 3 глицерола, учитывая их пространственное расположение, неидентичны. Особенно четко это видно на примере молекулы триглицерида. Ферменты это различают и всегда специфичны только к одному из трех углеродов глицерина. Так, глицеролкиназа фосфорилирует глицерин в положении *sn*-3, в результате чего образуется глицерол-3-фосфат, но не глицерол-1-фосфат.

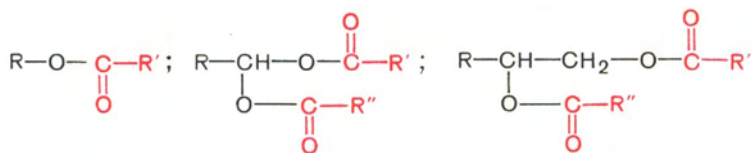
Жирные кислоты, входящие в состав триглицеридов, практически определяют их физико-химические свойства. Так, температура плавления триглицеридов повышается с увеличением числа и длины остатков насыщенных жирных кислот. Напротив, чем выше содержание ненасыщенных жирных кислот, или кислот с короткой цепью, тем ниже точка плавления.

Животные жиры (сало) обычно содержат значительное количество насыщенных жирных кислот (пальмитиновой, стеариновой и др.). Благодаря чему при комнатной температуре они твердые. Жиры, в состав которых входит много ненасыщенных 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. В жире человека, плавящемся при температуре 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 глицерол и жирные кислоты. Омыление жира \* 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:



В этих формулах 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 указанных сложных эфиров, некоторое количество свободных жирных кислот, спиртов и углеводов с числом углеродных атомов 21—35.

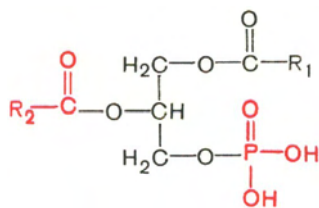
## ФОСФОЛИПИДЫ

**Фосфолипиды** представляют собой сложные эфиры многоатомных спиртов глицерина или сфингозина с высшими жирными кислотами и фосфорной кислотой. В состав фосфолипидов входят также азотсодержащие соединения: холин, этаноламин или серин. В зависимости от того, какой многоатомный спирт участвует в образовании фосфолипида (глицерин или сфингозин), последние делят на 2 группы: глицерофосфолипиды и сфингофосфолипиды. Необходимо отметить, что в глицерофосфолипидах либо холин, либо этаноламин или серин соединены эфирной связью с остатком фосфорной кислоты; в составе сфинголипидов обнаружен только холин. Наиболее распространенными в тканях животных являются глицерофосфолипиды.

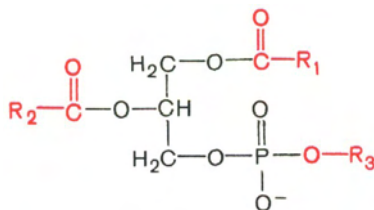
\* Жиры в качестве примесей содержат небольшое количество свободных жирных кислот и незначительное количество неомыляемых веществ.

## Глицерофосфолипиды

Глицерофосфолипиды являются производными фосфатидной кислоты. В их состав входят глицерин, жирные кислоты, фосфорная кислота и обычно азотсодержащие соединения. Общая формула глицерофосфолипидов выглядит так:



Фосфатидная кислота

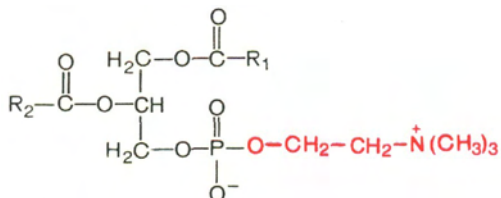


Глицерофосфолипид

В этих формулах  $\text{R}_1$  и  $\text{R}_2$  — радикалы высших жирных кислот, а  $\text{R}_3$  — чаще радикал азотистого соединения. Для всех глицерофосфолипидов характерно, что одна часть их молекул (радикалы  $\text{R}_1$  и  $\text{R}_2$ ) обнаруживает резко выраженную гидрофобность, тогда как другая часть гидрофильна благодаря отрицательному заряду фосфорной кислоты и положительному заряду радикала  $\text{R}_3$ .

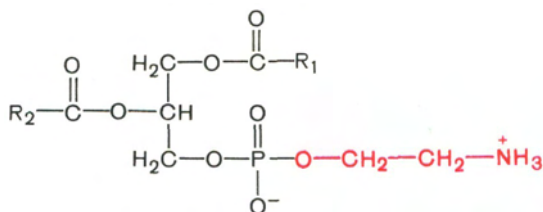
Из всех липидов глицерофосфолипиды обладают наиболее выраженными полярными свойствами. При помещении глицерофосфолипидов в воду в истинный раствор переходит лишь небольшая их часть, основная же масса липидов находится в виде мицелл. Существует несколько групп (подклассов) глицерофосфолипидов. В зависимости от характера азотистого основания, присоединенного к фосфорной кислоте, Глицерофосфолипиды подразделяют на фосфатидилхолины (лецитины), фосфатидилэтаноламины (кефалины) и фосфатидилсерины. В состав некоторых глицерофосфолипидов вместо азотсодержащих соединений входит не содержащий азота шестиуглеродный циклический спирт инозит, называемый также инозитолом. Эти липиды называются фосфатидилинозитолами.

**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  $[\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]$ . Таким образом, в молекуле фосфатидилхолина соединены глицерин, высшие жирные кислоты, фосфорная кислота и холин:



Фосфатидилхолин (лецитин)

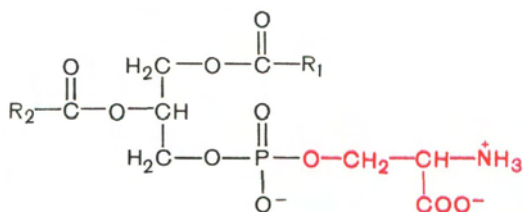
**Фосфатидилэтаноламины.** Основное различие между фосфатидилхолинами и фосфатидилэтаноламинами — наличие в составе последних азотистого основания этаноламина  $(\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}_3)$ :



Фосфатидилэтаноламин

Из глицерофосфолипидов в организме животных и высших растений в наибольшем количестве встречаются фосфатидилхолины и фосфатидилэтаноламины. Эти 2 группы глицерофосфолипидов метаболически связаны друг с другом и являются главными липидными компонентами мембран клеток.

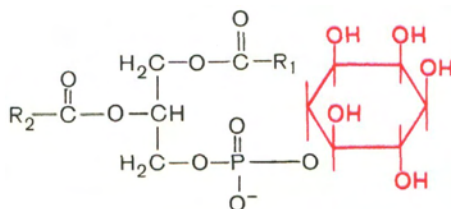
**Фосфатидилсерины.** В молекуле фосфатидилсерина азотистым соединением служит остаток аминокислоты серина ( $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$ ):



Фосфатидилсерин

Фосфатидилсерины распространены гораздо менее широко, чем фосфатидилхолины и фосфоэтаноламины, и их значение определяется в основном тем, что они участвуют в синтезе фосфатидилэтаноламинов.

**Фосфатидинозитолы.** Эти липиды относятся к группе производных фосфатидной кислоты, но не содержат азота. Радикалом ( $\text{R}_3$ ) в этом подклассе глицерофосфолипидов является шестиуглеродный циклический спирт инозитол:

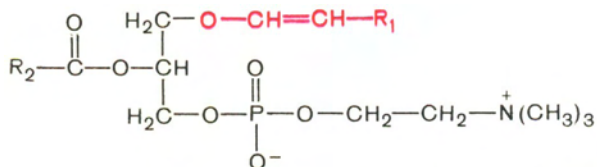


Фосфатидинозитол

Фосфатидинозитолы довольно широко распространены в природе. Они обнаружены у животных, растений и микроорганизмов. В животном организме найдены в мозге, печени и легких.

**Плазмалогены.** От рассмотренных глицеролипидов плазмалогены отличаются тем, что вместо одного остатка высшей жирной кислоты со-

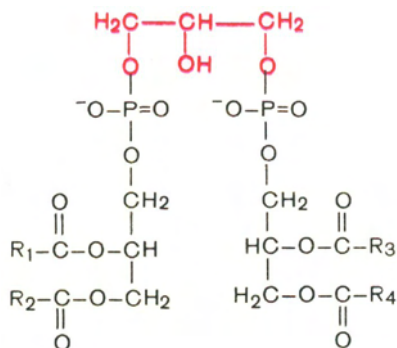
держат остаток  $\alpha,\beta$ -ненасыщенного спирта, который образует простую связь (в отличие от сложноэфирной связи, образуемой остатком жирной кислоты) с гидроксильной группой глицерина в положении С-1:



Фосфатидальхолин (плазмалоген)

Основными подклассами плазмалогенов являются фосфатидальхолины, фосфатидальэтанолламины и фосфатидальсерины. В разбавленных кислотах плазмалогены гидролизуются с образованием альдегида соответствующего  $\alpha,\beta$ -ненасыщенного спирта, т.е. при кислотном гидролизе плазмалогенов образуются «жирные» альдегиды, называемые плазмалями, что и легло в основу термина «плазмалоген».

**Кардиолипин.** Свообразным представителем глицерофосфолипидов является кардиолипин, впервые выделенный из сердечной мышцы. По своей химической структуре кардиолипин можно рассматривать как соединение, в котором 2 молекулы фосфатидной кислоты связаны с помощью одной молекулы глицерина. В отличие от остальных глицерофосфолипидов кардиолипин является как бы «двойным» глицерофосфолипидом. Кардиолипин локализован во внутренней мембране митохондрий. Функция его пока неясна, хотя известно, что в отличие от других фосфолипидов кардиолипин обладает иммунными свойствами.



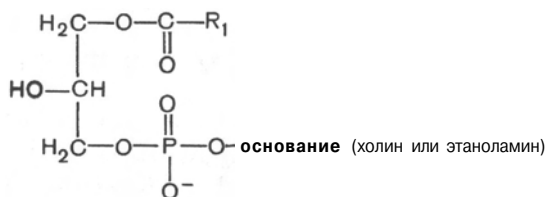
Кардиолипин

В этой формуле  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$ —радикалы высших жирных кислот.

Необходимо отметить, что в природе встречается свободная фосфатидная кислота, но в относительно небольших количествах по сравнению с глицерофосфолипидами. Среди жирных кислот, входящих в состав глицерофосфолипидов, обнаружены как насыщенные, так и ненасыщенные (чаще стеариновая, пальмитиновая, олеиновая и линолевая).

Установлено также, что большинство фосфатидилхолинов и фосфатидилэтанолламинов содержат одну насыщенную высшую жирную кислоту в положении С-1 и одну ненасыщенную высшую жирную кислоту в положении С-2. Гидролиз фосфатидилхолинов и фосфатидилэтанолламинов

при участии особых ферментов (эти ферменты относятся к фосфолипазам  $A_2$ ), содержащихся, например, в яде кобры, приводит к отщеплению ненасыщенной жирной кислоты и образованию лизофосфолипидов — лизофосфатидилхолинов, или лизофосфатидилэтаноламинов, оказывающих сильное гемолитическое действие:



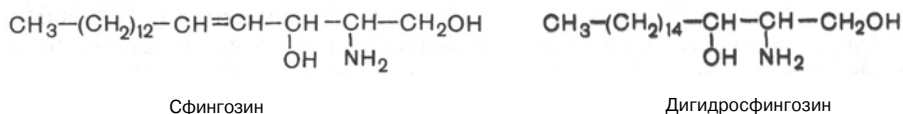
Лизофосфатидилхолин или лизофосфатидилэтанолламин

## Сфинголипиды (сфингофосфолипиды)

**Сфингомиелины.** Это наиболее распространенные сфинголипиды. В основном они 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 спирта сфингозина, одну молекулу азотистого основания (чаще это холин) и одну молекулу фосфорной кислоты. Общую формулу сфингомиелинов можно представить так:



Общий план построения молекулы сфингомиелина в определенном отношении напоминает строение глицерофосфолипидов. Молекула сфингомиелина содержит как бы полярную «головку», которая несет одновременно и положительный (остаток холина), и отрицательный (остаток фосфорной кислоты) заряды, и два неполярных «хвоста» (длинная алифатическая цепь сфингозина и ацильный радикал жирной кислоты). В некоторых сфингомиелинах, например выделенных из мозга и селезенки, вместо сфингозина найден спирт дигидросфингозин (восстановленный сфингозин):

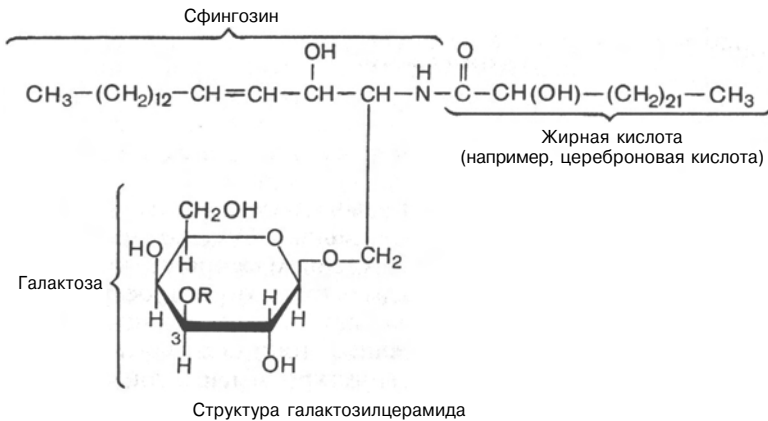


# ГЛИКОЛИПИДЫ (ГЛИКОСФИНГОЛИПИДЫ)

Гликолипиды широко представлены в тканях, особенно в нервной ткани, в частности в мозге. Главной формой гликолипидов в животных тканях являются гликофинголипиды. Последние содержат церамид, состоящий из спирта сфингозина и остатка жирной кислоты, и один или несколько остатков сахаров.

Простейшими гликофинголипидами являются галактозилцерамиды и глюкозилцерамиды.

Галактозилцерамиды\* — главные сфинголипиды мозга и других нервных тканей, но в небольших количествах встречаются и во многих других тканях. В состав галактозилцерамидов входит гексоза (обычно это D-галактоза), которая связана эфирной связью с гидроксильной группой аминок спирта сфингозина. Кроме того, в составе галактозилцерамида имеется жирная кислота. Чаще всего это лигноцереновая, нервоновая или цереброновая кислота, т.е. жирные кислоты, имеющие 24 углеродных атома.



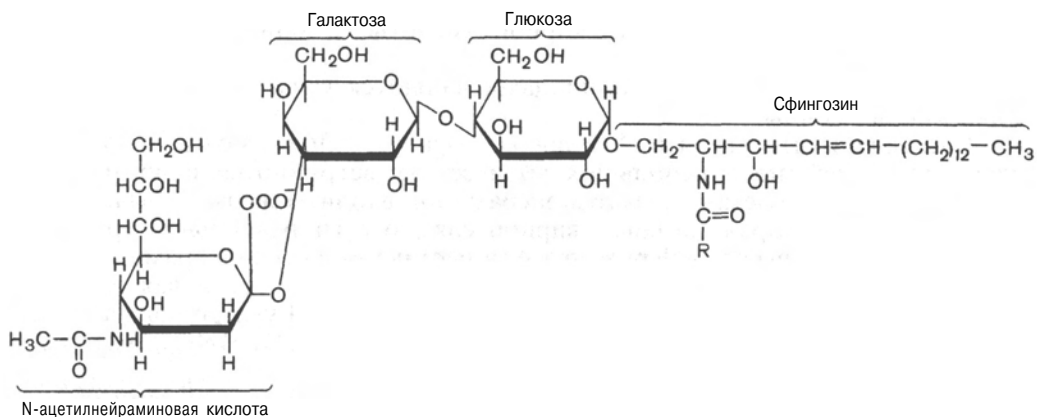
Существуют сульфогалактозилцерамиды, которые отличаются от галактозилцерамидов наличием остатка серной кислоты, присоединенного к третьему углеродному атому гексозы. В мозге млекопитающих сульфогалактозилцерамиды в основном находятся в белом веществе, при этом содержание их в мозге намного ниже, чем галактозилцерамидов.

Глюкозилцерамиды — простые гликофинголипиды, представлены в тканях, отличных от нервной, причем главным образом глюкозилцерамидами. В небольших количествах они имеются в ткани мозга. В отличие от галактозилцерамидов у них вместо остатка галактозы имеется остаток глюкозы.

Более сложными гликофинголипидами являются ганглиозиды, образующиеся из гликозилцерамидов. Ганглиозиды дополнительно содержат одну или несколько молекул сиаловой кислоты. В тканях человека доминирующей сиаловой кислотой является нейраминавая. Кроме того, вместо остатка глюкозы они чаще содержат сложный олигосахарид. Ганглиозиды в больших количествах находятся в нервной ткани. Они,

\* Производные галактозилцерамидов нередко называют цереброзидами.

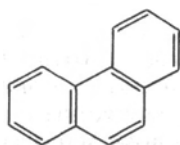
по-видимому, выполняют рецепторные и другие функции. Одним из простейших ганглиозидов является гематозид, выделенный из стромы эритроцитов. Он содержит керамид (ацилсфингозин), одну молекулу глюкозы, одну молекулу N-ацетилнейраминовой кислоты.



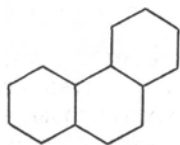
Гематозид (ганглиозид)

## СТЕРОИДЫ

Все рассмотренные липиды принято называть омыляемыми, поскольку при их щелочном гидролизе образуются мыла. Однако имеются липиды, которые не гидролизуются с освобождением жирных кислот. К таким липидам относятся стероиды. **Стероиды**—широко распространенные в природе соединения. Они часто обнаруживаются в ассоциации с жирами. Их можно отделить от жира путем омыления\* (они попадают в неомыляемую фракцию). Все стероиды в своей структуре имеют ядро, образованное гидрированным фенантреном (кольца А, В и С) и циклопентаном (кольцо D):



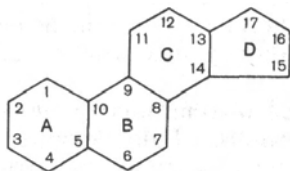
Фенантрен



Пергидрофенантрен



Циклопентан



Циклопентанпергидрофенантрен  
(общая структурная основа стероидов)

\* Омылением называется гидролиз жира щелочью. Продуктами омыления являются глицерин и щелочные соли жирных кислот, которые называют мылами.



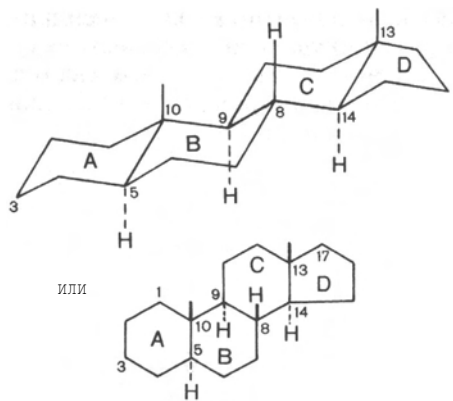


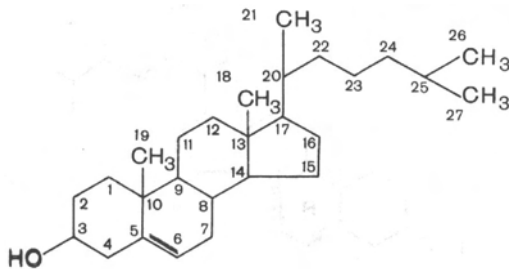
Рис. 6.2. Обобщенное стероидное ядро.

К стероидам относятся, например, гормоны коркового вещества надпочечников, желчные кислоты, витамины группы D, сердечные гликозиды и другие соединения. В организме человека важное место среди стероидов занимают стерины (стеролы), т.е. стероидные спирты. Главным представителем стеринов является холестерин (холестерол).

Ввиду сложного строения и асимметрии молекулы стероиды имеют много потенциальных стереоизомеров. Каждое из шестиглеродных колец (кольца А, В и С) стероидного ядра может принимать две различные пространственные конформации — конформацию «кресла» либо «лодки».

В природных стероидах, в том числе и в холестерине, все кольца в форме «кресла» (рис. 6.2), что является более устойчивой конформацией. В свою очередь по отношению друг к другу кольца могут находиться в *цис*- или *транс*-положениях.

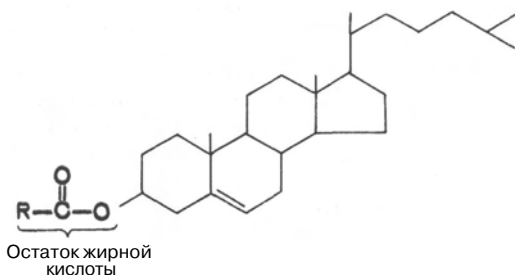
**Холестерин.** Как отмечалось, среди стероидов выделяется группа соединений, получивших название стеринов (стеролов). Для стеринов характерно наличие гидроксильной группы в положении 3, а также боковой цепи в положении 17. У важнейшего представителя стеринов — холестерина — все кольца находятся в *транс*-положении; кроме того, он имеет двойную связь между 5-м и 6-м углеродными атомами. Следовательно, холестерин является ненасыщенным спиртом:



Холестерин (холестерол)

Кольцевая структура холестерина отличается значительной жесткостью, тогда как боковая цепь — относительной подвижностью. Итак, холестерин

содержит спиртовую гидроксильную группу при С-3 и разветвленную алифатическую цепь из 8 атомов углерода при С-17. Химическое название холестерина 3-гидрокси-5,6-холестен. Гидроксильная группа при С-3 может быть этерифицирована высшей жирной кислотой, при этом образуются эфиры холестерина (холестериды).

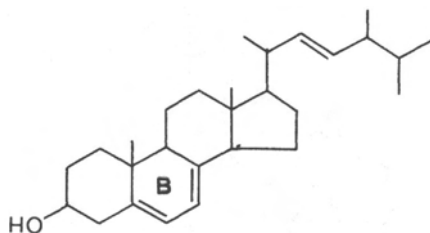


Эфир холестерина (холестерид)

Каждая клетка в организме млекопитающих содержит холестерин. Находясь в составе мембран клеток, неэтерифицированный холестерин вместе с фосфолипидами и белками обеспечивает избирательную проницаемость клеточной мембраны и оказывает регулирующее влияние на состояние мембраны и на активность связанных с ней ферментов. В цитоплазме холестерин находится преимущественно в виде эфиров с жирными кислотами, образующих мелкие капли—так называемые вакуоли. В плазме крови как неэтерифицированный, так и этерифицированный холестерин транспортируется в составе липопротеинов.

Холестерин—источник образования в организме млекопитающих желчных кислот, а также стероидных гормонов (половых и кортикоидных). Холестерин, а точнее продукт его окисления—7-дегидрохолестерин, под действием УФ-лучей в коже превращается в витамин D<sub>3</sub>. Таким образом, физиологическая функция холестерина многообразна.

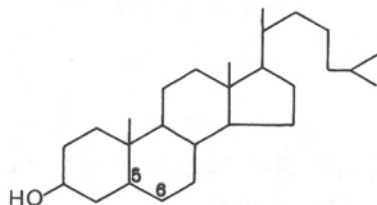
Холестерин находится в животных, но не в растительных жирах. В растениях и дрожжах содержатся близкие по структуре к холестерину соединения, в том числе эргостерин.



Эргостерин

Эргостерин—предшественник витамина D. После воздействия на эргостерин УФ-лучами он приобретает свойство оказывать противорахитное действие (при раскрытии кольца В).

Восстановление двойной связи в молекуле холестерина приводит к образованию копростерина (копростанаола). Копростерин находится в составе фекалий и образуется в результате восстановления бактериями кишечной микрофлоры двойной связи в холестерине между атомами  $C_5$  и  $C_6$ .



Копростерин (копростанол)

Указанные стеринны в отличие от холестерина очень плохо всасываются в кишечнике и потому обнаруживаются в тканях человека в следовых количествах.

## Глава 7

# 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. Практика и опыт показали, что для нормального роста и развития организма человека и животных одних этих веществ недостаточно. История путешествий и мореплавания, наблюдения врачей указывали на существование особых болезней, развитие которых непосредственно связано с неполноценным питанием, хотя оно как будто содержало все известные к тому времени питательные вещества. Некоторые болезни, вызванные недостатком в пище каких-либо веществ, носили даже эпидемический характер. Так, широкое распространение в XIX в. 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 (рисовые отруби) 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. Луинин писал: «Представляет большой интерес исследовать эти вещества и изучить их значение для питания». Это важное научное открытие позже (1912) было подтверждено работами Ф. Гопкинса. 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 аминогруппы и вообще азот, термин «витамины» прочно укоренился в биологии и медицине.

Таким образом, внимание исследователей первой трети нашего столетия в области физиологической химии было сосредоточено вокруг изолирования и идентификации витаминов—незаменимых для человека и животных пищевых факторов, которые не могли быть синтезированы в организме.

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 у крыс, кроликов и ряда других животных при отсутствии в пище витамина С, т.е. в последнем случае витамин С не является пищевым или незаменимым фактором. С другой стороны, некоторые аминокислоты (см. главу 2), 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 относятся 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**—это пищевые незаменимые факторы, которые, присутствуя в небольших количествах в пище, обеспечивают нормальное развитие организма животных и человека и адекватную скорость протекания биохимических и физиологических процессов. Нарушения регуляции процессов обмена и развитие патологии часто связаны с недостаточным поступлением витаминов в организм, полным отсутствием их в потребляемой пище либо нарушениями их всасывания, транспорта или, наконец, изменениями синтеза коферментов с участием витаминов. В результате развиваются *авитаминозы*—болезни, возникающие при полном отсутствии в пище или полном нарушении усвоения какого-либо витамина. Известны так называемые *гиповитаминозы*, обусловленные недостаточным поступлением витаминов с пищей или неполным их усвоением. Практически у человека встречаются именно эти последние формы заболевания, т.е. состояния относительной недостаточности витаминов. 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.

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 (см. главу 4). 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 также 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 из него соответствующее производное витаминов (кофермент), и вызывают конкурентное ингибирование ферментов (см. главу 4). К антивитаминам 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 неполноценное питание чаще всего является причиной развития экзогенных авитаминозов. Эндогенными причинами, которые, по-видимому, являются более существенными, служат: 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 пищеварительного 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, знания закономерностей развития гипо- и авитаминозов, клинической картины этих состояний, как и знания биологической роли витаминов в метаболизме, необходимы для каждого лечащего врача. Они же определяют его тактику при разработке способов предупреждения и лечения гиповитаминозов. Если авитаминоз (гиповитаминоз) развивается на экзогенной почве, то вводят недостающий витамин с пищей или чистый его препарат. Если причина эндогенная, то, помимо лечения основного заболевания, параллельно вводят соответствующий витамин парентерально, т.е. минуя пищеварительный 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 три десятилетия описано большое число ранее неизвестных врожденных заболеваний, клиническая картина которых напоминает типичные авитаминозы. Они развиваются в раннем детском возрасте независимо от обеспеченности организма всеми известными витаминами. Иногда болезни удается излечить мегавитаминной терапией, т.е. введением соответствующего витамина в количествах, в 50–100 раз превышающих физиологические потребности (так называемые *витаминозависимые состояния*). В других случаях болезнь не удается устранить даже путем применения высоких доз витаминов (*витаминорезистентные состояния*). За-

болевания 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 В<sub>12</sub>, 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.

Клиническая картина врожденных нарушений обмена и функций витаминов мало или почти совсем не отличается от истинной картины алиментарного авитаминоза и ряда наследственных дефектов обмена. Поэтому 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), а при врожденном нарушении его всасывания и 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 определить фотоколориметрически, например витамин В<sub>1</sub>—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 В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> и других применяют флуорометрические методы. Используют и титриметрические методы:

например, при определении витамина С применяют титрование раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола.

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, или IU).

## КЛАССИФИКАЦИЯ ВИТАМИНОВ

Современная классификация витаминов не является совершенной. Она основана на физико-химических свойствах (в частности, растворимости) или на химической природе, но до сих пор сохраняются и буквенные обозначения. В зависимости от растворимости в неполярных органических растворителях или в водной среде различают жирорастворимые и водорастворимые витамины. В приводимой классификации витаминов, помимо буквенного обозначения, в скобках указан основной биологический эффект, 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 (антиксерофтальмический); ретинол
2. Витамин D (антирахитический); кальциферолы
3. Витамин Е (антистерильный, витамин размножения); токоферолы
4. Витамин К (антигеморрагический); нафтохиноны

### Витамины, растворимые в воде

1. Витамин В<sub>1</sub> (антиневритный); тиамин
2. Витамин В<sub>2</sub> (витамин роста); рибофлавин
3. Витамин В<sub>6</sub> (антидерматитный, адермин); пиридоксин
4. Витамин В<sub>12</sub> (антианемический); цианкобаламин; кобаламин
5. Витамин РР (антипеллагрический, ниацин); никотинамид
6. Витамин В<sub>с</sub> (антианемический); фолиевая кислота
7. Витамин В<sub>3</sub> (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, выделяют группу разнообразных химических веществ, из которых часть синтезируется в организме, но обладает витаминными свойствами. Для человека и ряда животных эти вещества принято объединять в группу витаминоподобных. К ним относят холин, липоевую кислоту, витамин В<sub>15</sub> (пангамовая кислота),



Таблица 7.1. Природа биокаталитической функции витаминов

Витамин	Впервые описан	Рекомендуемая суточная доза для человека, мг	Активная (коферментная) форма	Биохимическая функция (тип катализируемой реакции)
<b>Жирорастворимые витамины</b>				
А (ретинол)	1913	2,7	Ретиналь	Зрительный процесс
D (кальциферолы)	1922	0,01–0,025	1,25-Диоксихолекальциферол	Обмен кальция и фосфора
E (токоферол)	1922	5,0	—	Транспорт электронов (защита мембранных липидов)
K (филлохинон)	1935	1,0	—	Перенос электронов (кофактор в реакциях карбоксилирования)
<b>Водорастворимые витамины</b>				
B <sub>1</sub> (тиамин)	1926	1,2	Тиаминпирофосфат (ТПФ, ТДФ)	Декарбоксилирование α-кетокислот; перенос активного альдегида (транскетолаза)
B <sub>2</sub> (рибофлавин)	1932	1,7	Флавинаденидинуклеотид (ФАД), флавиномононуклеотид (ФМН)	Дыхание, перенос водорода
PP (никотинамид, никотиновая кислота)	1937	18	НАД, НАДФ	Дыхание, перенос водорода
B <sub>6</sub> (пиридоксин)	1934	2	Пиридоксальфосфат (ПФ)	Обмен аминокислот, перенос аминогрупп
B <sub>12</sub> (кобаламин)	1948	0,003	Дезоксиаденозил(или метил)-кобаламин	Кофермент ряда метаболических реакций переноса алкильных групп; метилирование гомоцистеина
B <sub>c</sub> (фолиевая кислота)	1941	1–2,2	Тетрагидрофолиевая кислота	Транспорт одноуглеродных групп
B <sub>3</sub> (пантотеновая кислота)	1933	3–5	Коэнзим А (кофермент А)	Транспорт ацильных групп
H (биотин)	1935	0,25	Биоцитин (ε-N-биотиниллизин)	Кофермент реакций карбоксилирования (транспорт CO <sub>2</sub> )
C (аскорбиновая кислота)	1925	75	—	Восстанавливающий кофактор для ряда монооксигеназ; гидрокселирование пролина; катаболизм тирозина

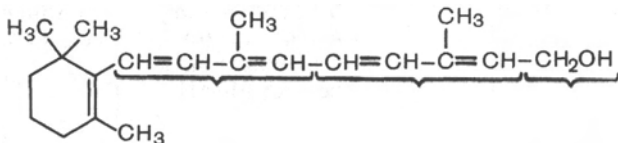
оротовую кислоту, инозит, убихинон, парааминобензойную кислоту, карнитин, линолевую и линоленовую кислоты, витамин U (противоязвенный фактор) и ряд факторов роста птиц, крыс, цыплят, тканевых культур. Недавно открыт еще один фактор, названный пирролохинолинохиноном. Известны его коферментные и кофакторные свойства, однако пока не раскрыты витаминные свойства (см. далее «Витаминоподобные вещества»). Поскольку типичные проявления 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. 7.1 суммированы известные к настоящему времени сведения о суточной потребности, природе активной формы и физиологической роли витаминов.

## ВИТАМИНЫ, РАСТВОРИМЫЕ В ЖИРАХ

### Витамины группы А

Витамин А (ретинол; антиксерофтальмический витамин) хорошо изучен. Известны три витамина группы А: А<sub>1</sub>, А<sub>2</sub> и *цис*-форма витамина А<sub>1</sub>, названная неовитамин А. С химической точки зрения ретинол представляет собой циклический непредельный одноатомный спирт, состоящий из шестичленного кольца (β-ионон), двух остатков изопрена и первичной спиртовой группы.



Витамин А, (ретинол)

Витамин А<sub>2</sub> отличается от витамина А<sub>1</sub> наличием дополнительной двойной связи в кольце β-ионона. Все 3 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 ретиненов (ретинали), т.е. альдегидов витамина А; могут откладываться в печени в форме более устойчивых сложных эфиров с уксусной или пальмитиновой кислотой.

Характерными симптомами недостаточности витамина А у человека и животных являются торможение роста, снижение массы тела, общее истощение организма, специфические поражения кожи, слизистых оболочек и глаз. Прежде всего поражается эпителий кожи, что проявляется 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 пищеварительного тракта, мочеполового и дыхательного аппаратов. Характерно поражение глазного яблока — *ксерофтальмия*, т.е. развитие сухости роговой оболочки глаза (от греч. хегос —

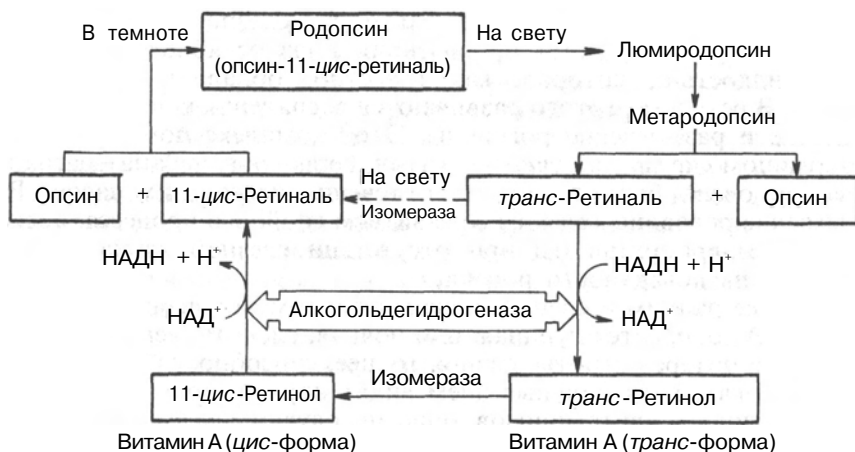
сухой, ophthalmos—глаз) вследствие закупорки слезного канала, эпителий которого также подвергается ороговению. Глазное яблоко не омывается слезной жидкостью, которая, как известно, обладает бактерицидным свойством. В результате этого развиваются воспаления конъюнктивы, отек, изъязвление и размягчение роговицы. Этот комплекс поражений обозначают термином «кератомалация» (от греч. keras—рог, malatia—распад); она развивается очень быстро, иногда в течение нескольких часов. Распад и размягчение роговицы 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. Характерны проявления гипервитаминоза А: воспаление глаз, гиперкератоз, выпадение волос, общее истощение организма. При этом, как правило, отмечаются потеря аппетита, головные боли, диспепсические явления (тошнота, рвота), бессонница. Гипервитаминоз может развиваться и у детей в результате приема больших количеств рыбьего жира и препаратов витамина А. Описан острый гипервитаминоз у детей после приема больших 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 светочувствования. В этом важном физиологическом процессе большую роль играет особый хромолиппротеин—сложный белок родопсин, или зрительный пурпур, являющийся основным светочувствительным пигментом сетчатки, в частности палочек, занимающих ее периферическую часть. Установлено, что родопсин состоит из липопротеина опсина и простетической группы, представленной альдегидом витамина А<sub>1</sub> (ретиноль); связь между ними осуществляется через альдегидную группу витамина и свободную ε-NH<sub>2</sub>-группу лизина молекулы белка с образованием шиффова основания. На свету родопсин расщепляется на белок опсин и ретиноль; последний подвергается серии конформационных изменений и превращению в *транс*-форму. С этими превращениями каким-то образом связана трансформация энергии световых лучей в зрительное возбуждение—процесс, молекулярный механизм которого до сих пор остается загадкой. В темноте происходит обратный процесс—синтез родопсина, требующий наличия активной формы альдегида—11-*цис*-ретиноля, который может синтезироваться из *цис*-ретинола, или *транс*-ретиноля, или *транс*-формы витамина А при участии двух специфических ферментов—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*-ретиналь, представляющий собой неактивную форму альдегида витамина А. Имеются сведения, что алло-*транс*-ретиналь может частично превращаться в активный 11-*цис*-ретиналь под влиянием света (на схеме – пунктирная стрелка). Однако главным путем образования 11-*цис*-ретинала является ферментативное превращение *транс*-формы витамина А в *цис*-форму (под действием изомеразы) и последующее окисление ее при участии алкогольдегидрогеназы \*.

Следует отметить, что подобные зрительные циклы имеют место как в палочках, так и в колбочках. Показано, что сетчатка содержит 3 типа клеток-колбочек, каждый из которых наделен одним из трех цветовосприимчивых пигментов, поглощающих синий, зеленый и красный свет соответственно при 430, 540 и 575 нм. Оказалось, что все 3 пигмента, получившие название иодопсинов, также содержат 11-*цис*-ретиналь, но различаются по природе опсина (колбочные типы опсина). Некоторые формы цветовой слепоты (*дальтонизм*) вызваны врожденным отсутствием синтеза одного из 3 типов опсина в колбочках или синтезом дефектного опсина (люди не различают красный или зеленый цвет).

**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, масло, 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 красномякотные овощи (морковь, томаты, перец и др.), в которых витамин А содержится в виде провитаминов – каротинов, выделенных впервые из моркови (от лат. *carota* – морковь). Известны 3 типа каротинов:  $\alpha$ -,  $\beta$ -

\* Поглосенный 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 полностью гидролизуеться на опсин и *транс*-ретиналь.

и  $\gamma$ -каротины, отличающиеся друг от друга химическим строением и биологической активностью. Наибольшей биологической активностью обладает  $\beta$ -каротин, поскольку он содержит два  $\beta$ -иононовых кольца и при распаде в организме из него образуются две молекулы витамина А.



При окислительном распаде  $\alpha$ - и  $\gamma$ -каротинов образуется только по одной молекуле витамина А, поскольку эти провитамины содержат по одному  $\beta$ -иононовому кольцу. Расщепление каротинов на молекулы витамина А происходит преимущественно в кишечнике под действием специфического фермента  $\beta$ -каротин-диоксигеназы (не исключена возможность аналогичного превращения и в печени) в присутствии молекулярного кислорода. При этом образуются 2 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 процесса всасывания продуктов распада жиров.

Суточная потребность для взрослого человека составляет в среднем 2,7 мг витамина А или от 2 до 5 мг  $\beta$ -каротина. У человека основным органом, в котором частично откладывается про запас витамин А, является печень. В норме в ней содержится около 20 мг этого витамина на 100 г ткани.

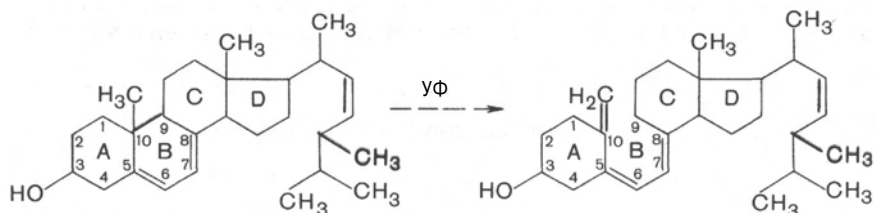
## Витамины группы D

Витамин D (кальциферол; антирахитический витамин) существует в виде нескольких соединений, различающихся как по химическому строению, так и по биологической активности. Для человека и животных активными препаратами считаются витамины  $D_2$  и  $D_3$ , хотя в литературе известен и витамин  $D_4$  (дигидроэргокальциферол). В природных продуктах содержатся преимущественно провитамины  $D_2$  и  $D_3$ —соответственно эргостерин и холестерин.

В 1924 г. А. Гесс, М. Вейншток и независимо от них Г. Стинбок из растительных масел и продуктов питания после воздействия на них УФ-лучами 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  $D_1$ . 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 назван витамином  $D_2$ , или кальциферолом. В 1956 г. Международная комиссия по химической номенклатуре предложила для витамина  $D_2$  новое название — «эргокальциферол».

С химической точки зрения эргостерин(ол) представляет собой одноатомный ненасыщенный циклический спирт, в основе структуры которого лежит конденсированная кольцевая система циклопентанпергидрофенан-

трена. Под действием УФ-лучей эргостерин через ряд промежуточных продуктов (люмистерин, тахистерин) превращается в витамин D<sub>2</sub>:

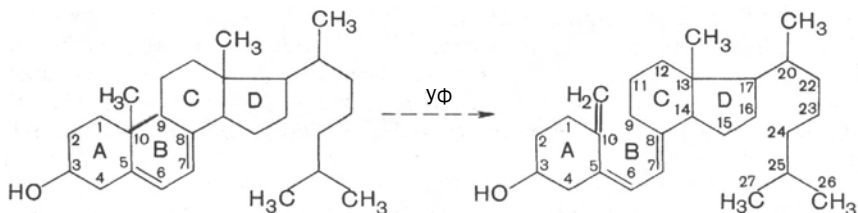


Эргостерин

Витамин D<sub>2</sub> (эргокальциферол)

Витамин D<sub>2</sub> образуется из эргостерина в результате разрыва связи между 9-м и 10-м углеродными атомами кольца В под действием УФ-лучей.

В 1936 г. в лаборатории А. Виндауса был выделен активный в отношении рахита препарат из рыбьего жира и назван витамином D<sub>3</sub>. Выяснилось, что предшественником витамина D<sub>3</sub> 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 D<sub>3</sub>:



7-Дегидрохолестерин

Витамин D<sub>3</sub> (холекальциферол)

Следует отметить, что благодаря наличию холестерина и 7-дегидрохолестерина в составе липидов кожи человека возможен синтез витамина D<sub>3</sub> при солнечном облучении или облучении лампой ультрафиолетового излучения поверхности тела. Этим приемом особенно широко пользуются при лечении рахита у детей.

Витамины D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> 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 обусловлены нарушением нормального процесса остеогенеза. Развивается *остеомалация* — размягчение костей. Кости становятся мягкими и под тяжестью тела принимают уродливые О- или Х-образные формы. На костно-хрящевой границе ребер отмечаются своеобразные утолщения — так называемые рахитические четки. У детей, больных рахитом, относительно большая голова и увеличенный живот. Развитие последнего симптома обусловлено гипотонией мышц. Нарушение процесса остеогенеза при ра-

хите сказывается также на развитии зубов; задерживаются появление первых зубов и формирование 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 соавт., витамин D выполняет свои биологические функции в организме в форме образующихся из него активных метаболитов, в частности 1,25-дигидроксиолекальциферола [сокращенно обозначается  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] и 24,25-дигидроксиолекальциферола [ $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ]\*, причем если гидроксילирование в 25-м положении осуществляется в печени, то этот процесс в 1-м положении протекает в почках. Ферменты, катализирующие эти реакции, называются гидроксилазами, или монооксигеназами. В реакциях гидроксילирования используется молекулярный кислород. Показано, что специфическая 1 $\alpha$ -гидроксилаза содержится, помимо почек, 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 минерализации костной ткани. 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 ядрах клеток органов-мишеней (почки, мозг, поджелудочная железа, гипофиз, молочная железа), где он способствует синтезу мРНК, Ca-связывающих белков и гормонов, регулирующих обмен кальция; в то же время он не обнаруживается в печени, селезенке, скелетной и сердечной мышцах. Подтвердилось предположение о существовании специфического внутриклеточного белка, являющегося рецептором кальциферолов. Показано, 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 витамина D осуществляются только через ядерный аппарат клетки. 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-гидроксильированной формы  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Более того, 24- и 26-гидроксильированные метаболиты  $\text{D}_3$ , в частности 1-оксипроизводные последних, по биологическому действию оказались в 10 раз более активными, чем нативный  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

**Распространение в природе и суточная потребность.** Наибольшее количество витамина  $\text{D}_3$  содержится в продуктах животного происхождения: сливочном масле, желтке яиц, печени и в жирах, а также в рыбьем жире, который широко используется для профилактики и лечения рахита. Из растительных продуктов наиболее богаты витамином  $\text{D}_2$  растительные масла (подсолнечное, оливковое и др.); много витамина  $\text{D}_2$  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

\* Предшественником этих метаболитов является 25-оксидолекальциферол, который считается основной циркулирующей (транспортной) формой всех кальциферолов.

ультрафиолетового облучения), а также продукты 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.

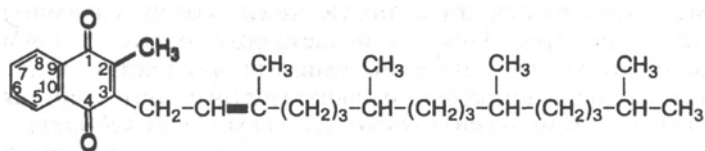
Случаи гипервитаминоза D у людей наблюдаются при «ударной» терапии рахита и некоторых дерматозов (волчанка). Гипервитаминоз был отмечен после приема более 1500000 МЕ витамина D в сутки. Прием очень больших доз витамина D может вызвать смертельный исход. У экспериментальных животных гипервитаминоз сопровождается увеличением отложения гидроксилатапта в костях и некоторых внутренних органах. У собак, например, отмечена кальцификация почек. Все эти симптомы исчезают после прекращения приема витамина.

## Витамины группы К

К витаминам группы К, согласно номенклатуре биологической химии, относятся 2 типа хинонов с боковыми цепями, представленными изопреноидными звеньями (цепями): витамины К<sub>1</sub> и К<sub>2</sub>\*. В основе циклической структуры обоих витаминов лежит кольцо 1,4-нафтохинона. Заметим, что животные ткани наделены способностью синтеза боковых изопреновых цепей, но не могут синтезировать нафтохиноновый компонент. У большинства бактерий витамин К является компонентом дыхательной цепи вместо убихинона.

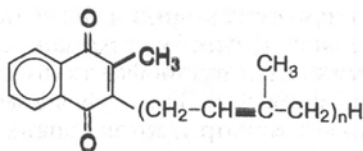
Для витамина К<sub>1</sub> сохранено название «филлохинон», а для витаминов группы К<sub>2</sub> введено название «менахинон» с указанием числа изопреновых звеньев\*\*. В частности, для витамина К<sub>2</sub> рекомендовано название «менахинон-6», где цифра 6 указывает число изопреновых звеньев в боковой цепи.

Витамин К<sub>1</sub> (филлохинон) впервые был изолирован из люцерны. Это производное 2-метил-1,4-нафтохинона, содержащего в 3-м положении фтильный радикал, имеющий 20 атомов углерода:



Витамин К<sub>1</sub> (филлохинон)

Витамин К<sub>2</sub> открыт в растениях и в организме животных и содержит в боковой цепи от 6 до 9 изопреновых единиц.



Витамин К<sub>2</sub> (менахинон; n = 6, 7 или 9)

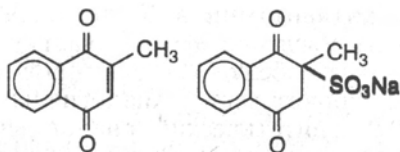
\* За открытие антигеморрагического действия витамина К Э. Дойзи и Х. Дам удостоены Нобелевской премии в 1943 г.

\*\* При обозначении длины боковой изопреновой цепи за основу берут число изопреновых звеньев, а не число углеродных атомов.



Витамин  $K_1$  представляет собой светло-желтую жидкость, неустойчивую при нагревании в щелочной среде и при облучении, а витамин  $K_2$  — желтые кристаллы; он также неустойчив. Оба препарата нерастворимы в воде, но хорошо растворимы в органических растворителях: бензоле, хлороформе, ацетоне, гексане и др.

Помимо витаминов  $K_1$  и  $K_2$ , некоторые производные нафтохинона обладают витаминными свойствами и высокой антигеморрагической активностью. Так, синтетический аналог витамина К, лишенный боковой цепи в положении 3, называют витамином  $K_3$  (менадион, или 2-метил-1,4-нафтохинон); фактически он является провитамином. Поскольку витамин  $K_3$  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  $K_3$  — викасол:



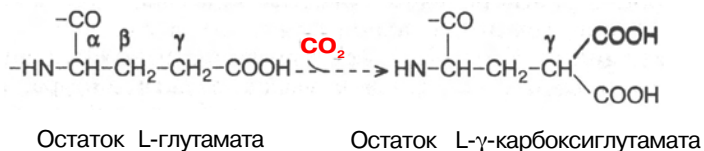
Витамин  $K_3$

Викасол

Витамин К является антигеморрагическим фактором, определенным образом связанным со свертыванием крови: он существенно удлиняет его период. 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 (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 детей грудного возраста часто возникают обильные подкожные кровотечения и кровоизлияния; они наблюдаются и при так называемом геморрагическом диатезе, являющемся следствием недостаточности свертывания крови у матери.

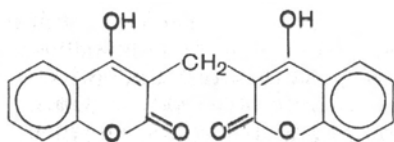
**Биологическая роль.** Витамин К принимает участие в синтезе протромбина в печени, вероятнее всего, через ферментную систему. Получены доказательства, что витамин К необходим как стимулятор биосинтеза в печени минимум 4 белков-ферментов, участвующих в сложном процессе свертывания крови: факторов II, 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. Протромбин, являясь протеолитическим ферментом, расщепляет специфические пептидные связи растворимого белка крови фибриногена с образованием нерастворимого фибрина (см. главу 17). Показано, что  $\gamma$ -карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты в молекуле белков, в частности протромбина, протекает посттрансляционно

при участии  $\gamma$ -глутамилкарбоксилазы, требующей наличия витамина К; источником  $\text{CO}_2$  является  $\text{HCO}_3^-$ . В этой реакции витамин К выполняет, по-видимому, кофакторную функцию.

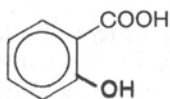


Реакция постсинтетического карбоксилирования  $\gamma$ -карбоксильной группы глутамата играет, кроме того, важную роль в связывании ионов  $\text{Ca}^{2+}$  молекулой белка, поскольку при этом образуются дополнительные отрицательно заряженные ионы карбоксильных групп. Следует указать, что биотин не участвует в этой реакции карбоксилирования.

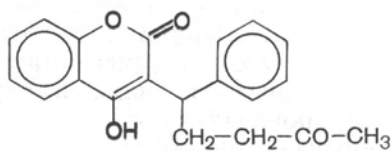
Одним из мощных антивитаминов К является природное вещество дикумарол (дикумарин). Введение его вызывает резкое снижение в крови протромбина и ряда других белковых факторов свертывания крови и соответственно вызывает кровотечения. Аналогичным свойством в качестве антикоагулянта обладает синтетический аналог витамина К варфарин, который действует как конкурентный ингибитор тромбообразования.



Дикумарол



Салициловая кислота



Варфарин

Способность дикумарола и варфарина снижать свертываемость крови в дальнейшем стали широко использовать для лечения болезней человека, характеризующихся повышенной свертываемостью крови. В частности, при коронарных тромбозах, тромбофлебитах оба эти препарата способствуют разжижению сгустка крови, оказывая эффективное лечебное действие. В случае возникновения кровотечения после введения дикумарола или варфарина большие назначают препараты витамина К.

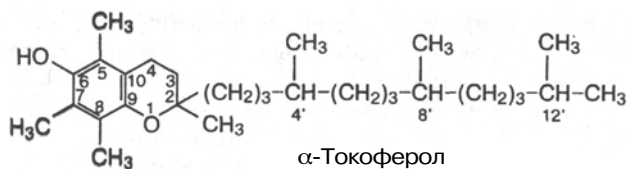
**Распространение в природе и суточная потребность.** Наиболее богаты витамином К растения, в частности зеленые листья каштана, крапивы, люцерны. К растительным продуктам, богатым витамином К, относятся капуста, шпинат, тыква, зеленые томаты, арахисовое масло, ягоды рябины и т.д. В животных продуктах, кроме печени свиньи, он почти нигде 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 E

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). Вкоре был осуществлен и химический синтез. В настоящее время известно пять природных соединений, обладающих биологической активностью витамина Е. Все они выделены в чистом виде из растительных масел или получены синтетическим путем и обозначаются соответственно  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -токоферолы и  $\delta$ -метилтокотриенол.

С химической точки зрения токоферолы представляют собой производные 2-метил-2(4', 8', 12'-триметилтридецил)-хроман-6-ола, или токола\*.



Различные токоферолы отличаются друг от друга числом и расположением метальных 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-излучений.

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) абортс у женщин. 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 яичники; процесс оплодотворения яйца не нарушен, 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.** Существуют прямая связь между витамином Е и тканевым дыханием и обратная связь между этим витамином и степенью окисления липидов.

\* Токотриенолы и токолы имеют почти одинаковую структуру; различаются тем, что первые содержат вместо полностью гидрированной ненасыщенную изопреноидную боковую цепь.

Известно, что токоферолы выполняют в организме две главные метаболические функции. Во-первых, они являются наиболее активными и, возможно, главными природными жирорастворимыми антиоксидантами: разрушают наиболее реактивные формы кислорода и соответственно предохраняют от окисления полиненасыщенные жирные кислоты. Во-вторых, токоферолы играют специфическую, пока еще не полностью раскрытую роль в обмене селена. Селен, как известно, является интегральной частью глутатионпероксидазы—фермента, обеспечивающего 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 транспорта электронов и протонов, как и в регуляции процесса транскрипции генов, и их роль в метаболизме убихинонов пока недостаточны выяснены.

**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. Витамин Е откладывается в организме во многих тканях (мышцы, поджелудочная железа, жировая ткань), поэтому 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.

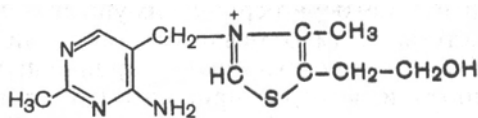
## **ВИТАМИНЫ, РАСТВОРИМЫЕ В ВОДЕ**

Условно можно считать, что отличительной особенностью витаминов, растворимых в воде, является участие большинства из них в построении молекул коферментов (см. табл. 7.1), 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: В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, РР, биотина, фолиевой, парааминобензойной, пантотеновой и липоевой кислот, а также жирорастворимых коэнзима Q и пирролохинолинохинона (PQQ). Почти все они в организме человека и животных не синтезируются, поэтому недостаточное содержание или полное отсутствие этих витаминов в пище приводит к существенным нарушениям процессов обмена веществ и развитию соответствующего клинического синдрома, характерного для данного гипо- или авитаминоза.

### **Витамин В<sub>1</sub>**

Витамин В<sub>1</sub> (тиамин; антиневритный), как отмечалось, был первым кристаллическим витамином, выделенным К. Функом в 1912 г. Позже был осуществлен его химический синтез. Наряду с аминогруппой витамин В<sub>1</sub> содержит атомы серы, поэтому он был назван тиамином. В химической

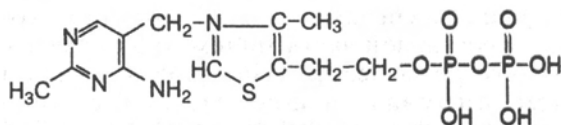
структуре его содержатся два кольца—пиримидиновое и тиазоловое, соединенных метиленовой связью. Обе кольцевые системы синтезируются отдельно в виде фосфорилированных форм, затем объединяются через четвертичный атом азота.



Витамин В<sub>1</sub>

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 В<sub>1</sub>, 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 образуется тиохром, дающий синюю флюоресценцию при УФ-облучении. На этом свойстве тиамин основано его количественное определение.

Витамин В<sub>1</sub> легко всасывается в кишечнике, но не накапливается в тканях и не обладает токсическими свойствами. Избыток пищевого тиамин быстро выводится с мочой. В превращении витамин В<sub>1</sub> в его активную форму—тиаминпирофосфат (ТПФ), называемый также тиаминдифосфатом (ТДФ), участвует специфический АТФ-зависимый фермент тиаминпирофосфокиназа, содержащаяся главным образом в печени и ткани мозга. Опытами с меченым <sup>32</sup>P АТФ доказан перенос на тиамин целиком пирофосфатной группы в присутствии фермента. ТПФ имеет следующее строение:



Тиаминпирофосфат (тиаминдифосфат)

Если витамин В<sub>1</sub> поступает с пищей в виде ТПФ, то пирофосфатная группа отщепляется от него под действием кишечных пирофосфатаз.

При отсутствии или недостаточности тиамин развивается тяжелое заболевание—*бери-бери*, широко распространенное в ряде стран Азии и Индокитая, где основным продуктом питания является рис. Следует отметить, что недостаточность витамин В<sub>1</sub> 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 и сердечно-сосудистой, и нервной систем, а также пищеварительного тракта. В настоящее время пересматривается точка зрения, что бери-бери у человека является следствием недостаточности только витамин В<sub>1</sub>. Более вероятно, что это заболевание представляет собой комбинированный авитаминоз или полиавитаминоз, при котором организм испытывает недостаток также в рибофлавине, пиридоксине, витаминах РР, С и др. На животных и добровольцах получен

экспериментальный авитаминоз  $V_1$ . В зависимости от преобладания тех или иных симптомов различают ряд клинических типов недостаточности, в частности полиневритную (сухую) форму бери-бери, при которой на первый план выступают нарушения в периферической нервной системе. При так называемой отечной форме бери-бери преимущественно поражается сердечно-сосудистая система, хотя отмечаются также явления полиневрита. Наконец, выделяют 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 тиамин летальность резко сократилась и наметились рациональные пути лечения и профилактики этого заболевания.

К наиболее ранним симптомам авитаминоза  $V_1$  относятся нарушения моторной и секреторной функций пищеварительного тракта: потеря аппетита, замедление перистальтики (атония) кишечника, а также изменения 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  $V_1$  проявляются развитием отрицательного азотистого баланса, выделением в повышенных количествах с мочой аминокислот и креатина, накоплением в крови и тканях  $\alpha$ -кетокислот, а также пентозосахаров. Содержание тиамин и ТПФ в сердечной мышце и печени у больных бери-бери в 5-6 раз ниже нормы.

**Биологическая роль.** Экспериментально доказано, что витамин  $V_1$  в форме ТПФ является составной частью минимум 5 ферментов, участвующих в промежуточном обмене веществ. ТПФ входит в состав двух сложных ферментных систем — пируват- и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназных комплексов, катализирующих окислительное декарбоксилирование пировиноградной и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот. В составе транскетолазы ТПФ участвует в переносе гликоальдегидного радикала от кетосахаров на альдосахара (см. главу 10). ТПФ является коферментом пируватдекарбоксилазы клеток дрожжей (при алкогольной ферментации) и дегидрогеназы  $\gamma$ -оксикетоглутаровой кислоты.

Приведенными примерами, вероятнее всего, не ограничиваются биологические функции тиамин. В частности, ТПФ участвует в окислительном декарбоксилировании глиоксиловой кислоты и  $\alpha$ -кетокислот, образующихся при распаде аминокислот с разветвленной боковой цепью; в растениях ТПФ является эссенциальным кофактором при синтезе валина и лейцина в составе фермента ацетоллактатсинтетазы.

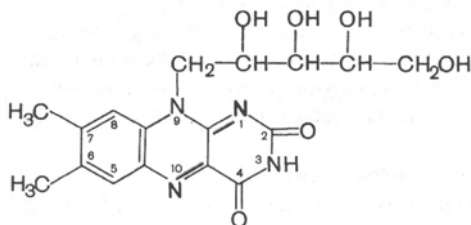
**Распространение в природе и суточная потребность.** Витамин  $V_1$  широко распространен в природе. Основное количество его человек получает с растительной пищей. Много тиамин  $V_1$  содержится в дрожжах, пшеничном хлебе из муки грубого помола, оболочке и зародышах семян хлебных злаков, сое, фасоли, горохе, меньше — в картофеле, моркови, капусте. Из продуктов животного происхождения наиболее богаты витамином  $V_1$  печень, почки, мозг. Некоторые бактерии, населяющие ки-

шечник животных, способны синтезировать достаточное количество тиамин: например, количества витамина В<sub>1</sub>, синтезированного микрофлорой кишечника коров, оказывается вполне достаточно для покрытия потребности организма. Рекомендуемые Институтом питания РАМН нормы суточного потребления тиамин для отдельных групп населения составляют от 1,2 до 2,2 мг.

## Витамин В<sub>2</sub>

Витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин) впервые был выделен из молока и ряда других пищевых продуктов. В зависимости от источника получения витамин В<sub>2</sub> 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 В<sub>2</sub> был осуществлен в 1935 г. Р. Куном. Растворы витамина В<sub>2</sub> 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 препарата \*, рациональное название его 6,7-диметил-9-D-рибителизоаллоксазин.



Рибофлавин

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.

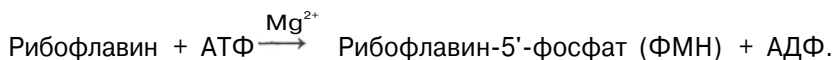
Клинические проявления недостаточности рибофлавина лучше всего изучены на экспериментальных животных. Помимо остановки роста, выпадения волос (алопеция), характерных для большинства авитаминозов, специфичными для авитаминоза В<sub>2</sub> являются воспалительные процессы слизистой оболочки языка (глоссит), губ, особенно у углов рта, эпителия кожи и др. Наиболее характерны кератиты, воспалительные процессы и усиленная васкуляризация роговой оболочки, катаракта (помутнение хрусталика). При авитаминозе В<sub>2</sub> у людей развиваются общая мышечная слабость и слабость сердечной мышцы.

\* Желтый цвет присущ только окисленной форме препарата, рибофлавин в восстановленной форме — бесцветное соединение.

Согласно данным К. Яги, существует прямая связь между степенью недостаточности рибофлавина у животных и накоплением в крови продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), развитием атеросклероза и катаракты. Эти нарушения, по мнению автора, указывают на важную роль флавопротеинов в молекулярных механизмах синтеза и распада продуктов ПОЛ.

**Биологическая роль.** Рибофлавин входит в состав флавиновых коферментов, в частности ФМН и ФАД\*, являющихся в свою очередь простетическими группами ферментов ряда других сложных белков—флавопротеинов. Некоторые флавопротеины в дополнение к ФМН или ФАД содержат еще прочно связанные неорганические ионы, в частности железо или молибден, наделенные способностью катализировать транспорт электронов. Различают 2 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 изоаллоксазиновый остаток ФАД или ФМН подвергается обратимому восстановлению с присоединением электронов и атомов водорода к N<sup>1</sup> и N<sup>10</sup>. ФМН и ФАД прочно связываются с белковым компонентом, иногда даже ковалентно, как, например, в молекуле сукцинатдегидрогеназы.

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.

\* Структурные формулы ФМН и ФАД и молекулярные механизмы их действия в составе специфических ферментов представлены в главе 9.

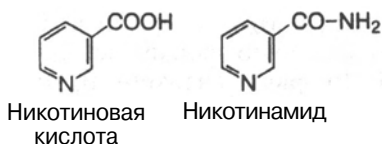


## Витамин РР

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) либо препаратов печени предохраняет от развития или излечивает от пеллагры. В 1904 г. А. Гарден и У. Юнг установили, что для превращения глюкозы в этанол в бесклеточном экстракте дрожжей необходимо присутствие легкодиализируемого кофактора, названного козимазой. Химический состав аналогичного кофактора из эритроцитов млекопитающих был расшифрован в 1934 г. О. Варбугом 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 (примерно 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), пищеварительного 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, тошнотой, болями в области живота, поносами. Диарея приводит к обезвоживанию организма. Слизистая оболочка толстой кишки сначала воспаляется, затем изъязвляется. Специфичными для пеллагры являются стоматиты, гингивиты, поражения языка со вздутием и трещинами. Поражения мозга проявляются головными болями, головокружением, повышенной раздражимостью, депрессией и другими симптомами, 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 12).

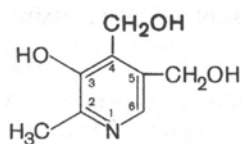
**Биологическая роль.** Витамин РР входит в состав НАД или НАДФ, являющихся коферментами большого числа обратимо действующих в окислительно-восстановительных реакциях дегидрогеназ (формулы коферментов приведены в главе 9).

Показано, что ряд дегидрогеназ использует только НАД и НАДФ (соответственно малатдегидрогеназа и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), другие могут катализировать окислительно-восстановительные реакции в присутствии любого из них (например, глутаматдегидрогеназа; см. главу 12). 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 9).

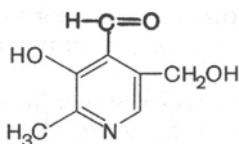
**Распространение в природе и суточная потребность.** Никотиновая кислота также относится к витаминам, широко распространенным в растительных и животных организмах. Для человека основными источниками никотиновой кислоты и ее амида являются рис, хлеб, картофель, мясо, печень, почки, морковь и другие продукты. Суточная потребность для взрослого человека составляет 18 мг.

## Витамин В<sub>6</sub>

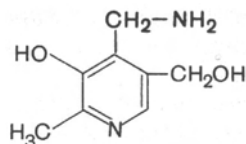
Витамин В<sub>6</sub> (пиридоксин, антидерматитный) как самостоятельный независимый пищевой фактор был открыт П. Дьерди в 1934 г. в результате того, что в отличие от известных к тому времени водорастворимых витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> и РР он устранял особую форму дерматита конечностей у крыс, названного акродинией. Впервые витамин В<sub>6</sub> был выделен в 1938 г. из дрожжей и печени, а вскоре был синтезирован химически. Он оказался производным 3-оксипиридина, в частности 2-метил-3-окси-4,5-диоксиметилпиридином. Термином «витамин В<sub>6</sub>», по рекомендациям Международной комиссии по номенклатуре биологической химии, обозначают все три производных 3-оксипиридина, обладающих одинаковой витаминной активностью: пиридоксин (пиридоксол), пиридоксаль и пиридоксамин:



Пиридоксин  
(пиридоксол)



Пиридоксаль



Пиридоксамин

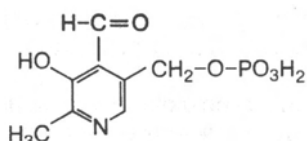
Как видно, производные 3-оксипиридина отличаются друг от друга природой замещающей группы в положении 4 пиридинового ядра. Витамин В<sub>6</sub> хорошо растворим в воде и этаноле. Водные растворы весьма устойчивы по отношению к кислотам и щелочам, однако они чувствительны к влиянию света в нейтральной зоне рН среды.

Недостаточность витамина В<sub>6</sub> наиболее подробно изучена на крысах, у которых самым характерным признаком является акродиния, или специфический дерматит с преимущественным поражением кожи лапок, хвоста, носа и ушей. Отмечаются повышенное шелушение кожи, выпадение шерсти, изъязвление кожи конечностей, заканчивающееся гангреной пальцев. Эти явления не поддаются лечению витамином РР, но быстро проходят при введении пиридоксина. При более глубоком авитаминозе В<sub>6</sub> у собак, свиней, крыс и кур отмечаются эпилептиформные припадки с дегенеративными изменениями в ЦНС.

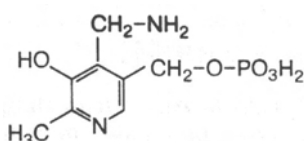
У человека недостаточность витамина В<sub>6</sub> встречается реже, хотя некоторые пеллагроподобные дерматиты, не поддающиеся лечению никотиновой кислотой, легко проходят при введении пиридоксина. У детей грудного возраста описаны дерматиты, поражающие нервной системы (включая эпилептиформные припадки), обусловленные недостаточным содержанием пиридоксина в искусственной пище. Недостаточность пиридоксина часто наблюдается у больных туберкулезом, которым с лечебной целью вводят изоникотинилгидразид (изониазид), оказавшийся, как и дезокси-пиридоксин, антагонистом витамина В<sub>6</sub>.

Из биохимических нарушений при недостаточности витамина В<sub>6</sub> следует отметить *гомоцистинурию* и *цистатионинурию*, а также нарушения обмена триптофана, выражающиеся в повышении экскреции с мочой ксантуреновой кислоты и снижении количества экскретируемой кинуреновой кислоты (см. главу 12).

**Биологическая роль.** Оказалось, что, хотя все три производных 3-окси-пиридина наделены витаминными свойствами, коферментные функции выполняют только фосфорилированные производные пиридоксаля и пиридоксамина.



Пиридоксальфосфат



Пиридоксаминфосфат

Фосфорилирование пиридоксаля 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:



Доказано, что в животных тканях происходят взаимопревращения пиридоксальфосфата и пиридоксаминфосфата, в частности в реакциях трансаминирования и декарбоксилирования аминокислот (см. главу 12).

Следует отметить, что в выяснение биологической роли витамина В<sub>6</sub> и пиридоксальфосфата в азотистом обмене существенный вклад внесли А.Е. Браунштейн, С.Р. Мардашев, Э. Снелл, Д. Меллер, А. Майстер и др. Известно более 20 пиридоксальных ферментов, катализирующих ключевые реакции азотистого метаболизма во всех живых организмах. Так доказано, что пиридоксальфосфат является простетической группой аминотрансфераз, катализирующих обратимый перенос аминогруппы (NH<sub>2</sub>-группы) от аминокислот на α-кетокислоту, и декарбоксилаз аминокислот, осуществляющих необратимое отщепление СО<sub>2</sub> от карбоксильной группы аминокислот с образованием биогенных аминов. Установлена коферментная роль пиридоксальфосфата в ферментативных реакциях неокислительного дезаминирования серина и треонина, окисления триптофана, кинуренина, превращения серосодержащих аминокислот, взаимопревращения серина и глицина (см. главу 12), а также в синтезе δ-аминолевулиновой кислоты, являющейся предшественником молекулы гема гемоглобина, и др.

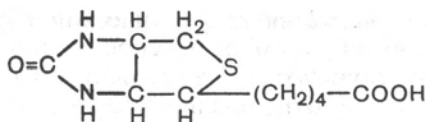
Пиридоксин относится к витаминам, коферментная роль которых изучена наиболее подробно. В последние годы число вновь открытых пиридоксальных ферментов быстро увеличивалось. Так, для действия гликогенфосфоорилазы существенной оказалась фосфорильная, а не альдегидная группа пиридоксальфосфата. Вследствие широкого участия пиридоксальфосфата в процессах обмена при недостаточности витамина В<sub>6</sub> отмечаются разнообразные нарушения метаболизма аминокислот.

**Распространение в природе и суточная потребность.** Витамин В<sub>6</sub> широко распространен в продуктах растительного и животного происхождения. Основными источниками витамина В<sub>6</sub> для человека служат хлеб, горох, фасоль, картофель, мясо, почки, печень и др. Во многих продуктах животного происхождения пиридоксин химически связан с белком, но в пищеварительном 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 В<sub>6</sub>.

## 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. Выделенное из сырого яичного белка вещество оказалось гликопротеином—белком основного характера, названным авидином; этот белок обладает высоким сродством связывания с биотином с образованием нерастворимого в воде комплекса. Комплекс не подвергается расщеплению в пищеварительном тракте, поэтому биотин не всасывается, 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.



Биотин

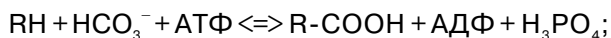
Карбонильная группа биотина связывается амидной связью с ε-аминогруппой лизина, образуя ε-N-биотинилизин (биоцитин), обладающий биологической активностью. Природные сложные белки, содержащие

биотин, при попадании в организм подвергаются протеолизу с освобождением свободного биоцитина; последний подвергается гидролизу под действием биоцитиназы печени и сыворотки крови с образованием биотина и лизина.

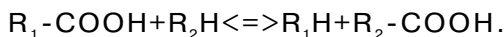
Клинические проявления недостаточности биотина у человека изучены недостаточно. Это объясняется тем, что бактерии кишечника обладают способностью синтезировать биотин в необходимых количествах. Недостаточность его проявляется в случае употребления большого количества сырого яичного белка или приема сульфаниламидных препаратов и антибиотиков, подавляющих рост бактерий в кишечнике. У человека при недостаточности биотина отмечаются 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. 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 к настоящему времени биотиновые ферменты (т.е. ферменты, содержащие в качестве кофермента биотин) катализируют два типа реакций:

1) реакции карбоксилирования (с участием  $\text{CO}_2$  или  $\text{HCO}_3^-$ ), сопряженные с распадом АТФ

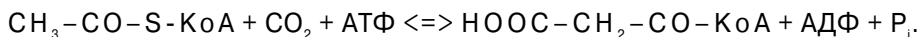


2) реакции транскарбоксилирования (протекающие без участия АТФ), при которых субстраты обмениваются карбоксильной группой

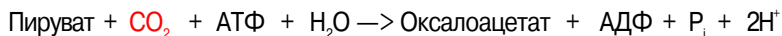


Получены доказательства двустадийного механизма этих реакций с образованием промежуточного комплекса (карбоксибиотинилфермент).

К реакциям первого типа относятся, например, ацетил-КоА- и пируват-карбоксилазные реакции:



Пируваткарбоксилаза является высокоспецифичным ферментом, катализирующим уникальную реакцию усвоения  $\text{CO}_2$  в организме животных. Сущность реакции сводится к пополнению запасов оксалоацетата (щавелевоуксусная кислота) в лимоннокислом цикле (так называемые «анаплеротические», «пополняющие» реакции), т.е. его синтезу из  $\text{CO}_2$  и пирувата:



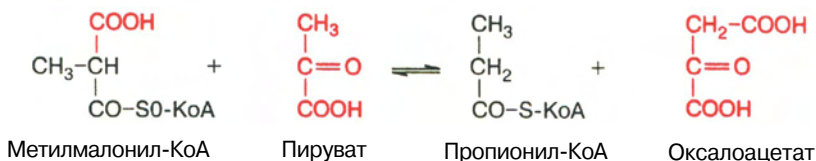
Реакция протекает в две стадии: на первой стадии, связанной с затратой энергии,  $\text{CO}_2$  подвергается активированию, т.е. ковалентному связыванию с биотином в активном центре фермента (Е-биотин):



На второй стадии  $\text{CO}_2$  из комплекса переносится на пируват с образованием оксалоацетата и освобождением фермента:



Примером второго типа реакций является метилмалонил-оксалоацетат-транскарбоксилазная реакция, катализирующая обратимое превращение пирувиноградной и шавелевоуксусной кислот:



Реакции карбоксилирования и транскарбоксилирования имеют важное значение в организме при синтезе высших жирных кислот, белков, пуриновых нуклеотидов (соответственно нуклеиновых кислот) и др.

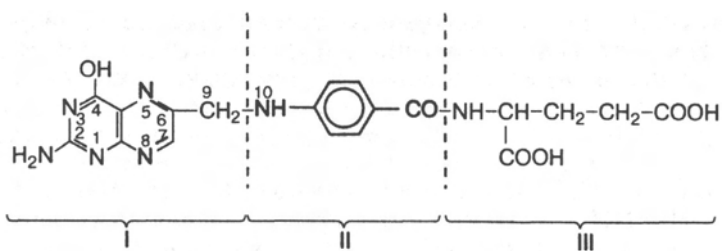
**Распространение в природе и суточная потребность.** Биотин содержится почти во всех продуктах животного и растительного происхождения, главным образом в связанной форме. Богаты этим витамином печень, почки, молоко, желток яйца. В растительных продуктах (картофель, лук, томат, шпинат) биотин находится 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 приблизительно 0,25 мг.

## Фолиевая кислота

Фолиевая (птероилглутаминовая) кислота (фолацин) в зависимости от вида животных или штамма бактерий, нуждающихся для нормального роста в присутствии этого пищевого фактора, называлась по-разному: фактор роста *L. casei*; витамин M, необходимый для нормального кроветворения у обезьян; витамин  $\text{B}_{12}$ , 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 более сложно построенной молекулы фолиевой кислоты.

Фолиевая кислота состоит из трех структурных единиц: остатка 2-амино-4-окси-6-метилптеридина (I), парааминобензойной (II) и L-глутаминовой\* (III) кислот и имеет следующую структуру:

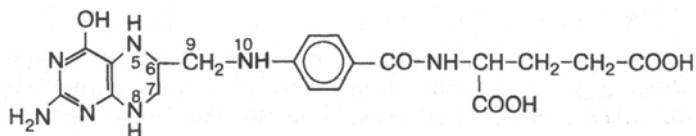
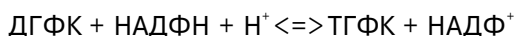
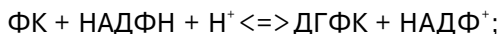
\* У бактерий количество глутаминовой кислоты в молекуле витамина достигает 3-6 остатков, соединенных между собой  $\gamma$ -глутамильными связями.



Фолиевая (птероилглутаминовая) кислота

Фолиевая кислота ограниченно растворима в воде, но хорошо растворима в разбавленных растворах спирта; имеет характерные спектры поглощения в УФ-области спектра. Недостаточность фолиевой кислоты трудно вызвать даже у животных без предварительного подавления в кишечнике роста микроорганизмов, которые синтезируют ее в необходимых количествах; авитаминоз обычно вызывают введением антибиотиков и скормливанием животным пищи, лишенной фолиевой кислоты. У обзьян фолиевая недостаточность сопровождается развитием специфической анемии; у крыс сначала развивается лейкопения, а затем анемия. У человека наблюдается клиническая картина макроцитарной анемии, очень похожая на проявления пернициозной анемии — следствия недостаточности витамина  $B_{12}$ , хотя нарушения 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 относительно меньшим содержанием ДНК.

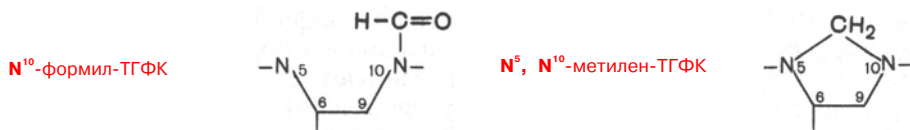
**Биологическая роль.** Коферментные функции фолиевой кислоты связаны не со свободной формой витамина, а с восстановленным его птеридиновым производным. Восстановление сводится к разрыву двух двойных связей и присоединению четырех водородных атомов в положениях 5, 6, 7 и 8 с образованием тетрагидрофолиевой кислоты (ТГФК). Оно протекает в 2 стадии в животных тканях при участии специфических ферментов, содержащих восстановленный НАДФ. Сначала при действии фолатредуктазы образуется дигидрофолиевая кислота (ДФК), которая при участии второго фермента — дигидрофолатредуктазы — восстанавливается в ТГФК:



5,6,7,8-Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК)

Доказано, что коферментные функции ТГФК непосредственно связаны с переносом одноуглеродных групп, первичными источниками которых в организме являются  $\beta$ -углеродный атом серина,  $\alpha$ -углеродный атом

глицина, углерод металльных 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 формиминная ( $-\text{CH}=\text{NH}$ ). 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 приводим 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 12 и 13). Перечисленные вещества играют исключительно важную, ключевую, роль в биосинтезе белков и нуклеиновых кислот, поэтому 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 рекомендуется в качестве лечебного препарата при опухолевых поражениях, в частности при острых и хронических формах лейкозов у детей и взрослых.

**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.

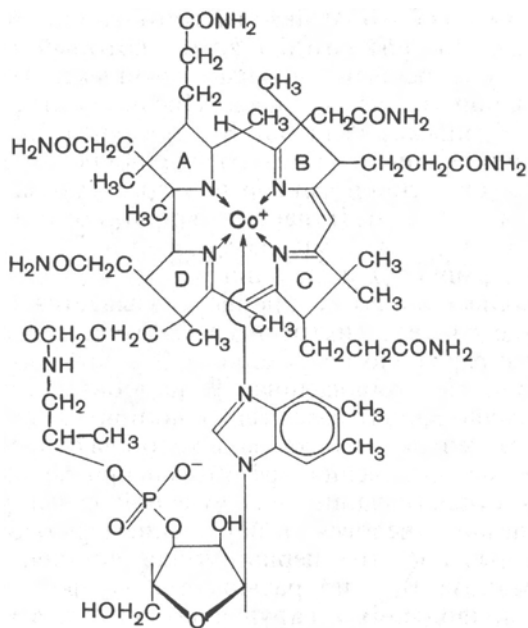
## Витамин $\text{B}_{12}$

Витамин  $\text{B}_{12}$  (кобаламин; антианемический витамин) 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. Однако только в 1955 г. Д. Ходжкин\*

\* Дороти Ходжкин была присуждена Нобелевская премия (1964) за расшифровку структуры витамина  $\text{B}_{12}$  методом рентгеноструктурного анализа. Она избрана иностранным членом АН СССР.



расшифровала его структуру, включая трехмерную пространственную конфигурацию, главным образом при помощи физических методов исследования (рентгенографическая кристаллография). На основании этих данных, а также результатов изучения химического состава для витамина В<sub>12</sub> было предложено следующее строение:



Витамин В<sub>12</sub> (кобаламин)

В молекуле витамина В<sub>12</sub> центральный атом кобальта соединен с атомами азота четырех восстановленных пиррольных колец, образующих порфириноподобное корриновое ядро, и с атомом азота 5,6-диметилбензимидазола\*. 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 В<sub>12</sub>, содержащие ОН-группу (оксикобаламин), хлор (хлоркобаламин), Н<sub>2</sub>О (аквакобаламин) и азотистую кислоту (нитриткобаламин). Из природных источников были выделены, кроме того, аналоги В<sub>12</sub>, 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 В<sub>12</sub> выделяют из микробной массы или животных тканей, используя растворы, содержащие ионы цианида, которые выполняют роль 6-го лиганда кобальта. Однако цианокобаламин метаболически неактивен. В состав В<sub>12</sub>-коферментов вместо CN входит остаток 5-дезоксаденозина или метильная группа.

\* Это единственный витамин, содержащий в своей молекуле металл.

У человека и животных недостаток витамина  $B_{12}$  приводит к развитию злокачественной макроцитарной, мегалобластической *анемии*. Помимо изменений кроветворной функции, для авитаминоза  $B_{12}$  специфичны также нарушения деятельности нервной системы и резкое снижение кислотности желудочного сока. Оказалось, что для активного процесса всасывания витамина  $B_{12}$  в тонкой кишке обязательным условием является наличие в желудочном соке особого белка—гастромукопротеина, получившего название внутреннего фактора Касла, который специфически связывает витамин  $B_{12}$  в особый сложный комплекс. Точная роль этого фактора во всасывании  $B_{12}$  не выяснена. Предполагают, что в связанном с этим фактором комплексе витамин  $B_{12}$  поступает в клетки слизистой оболочки подвздошной кишки, затем медленно переходит в кровь портальной системы, а внутренний фактор подвергается гидролизу (распаду). Следует указать, что  $B_{12}$  поступает в кровь портальной системы не в свободном состоянии, а в комплексе с двумя белками, получившими название транскобаламинов I и II, один из которых выполняет функцию депо  $B_{12}$  (I), поскольку он более прочно связывается с витамином  $B_{12}$ . Поэтому нарушение синтеза внутреннего фактора в слизистой оболочке желудка приводит к развитию авитаминоза  $B_{12}$  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 функций желудка. Можно, вероятно, утверждать, что пернициозная анемия, хотя и является следствием авитаминоза  $B_{12}$ , но развивается на фоне органических поражений желудка, приводящих к нарушению синтеза в клетках слизистой оболочки желудка внутреннего фактора Касла, или после тотального удаления желудка хирургическим путем.

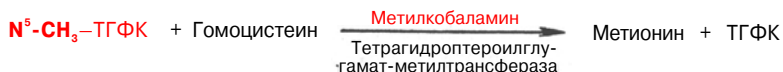
Витамин  $B_{12}$  используется в клинике для лечения не только пернициозной анемии, но и других ее форм—мегалобластических анемий с неврологическими нарушениями, которые обычно не поддаются лечению другими витаминами, в частности фолиевой кислотой.

**Биологическая роль.** Выявлены ферментные системы, в составе которых в качестве простетической группы участвуют не свободный витамин  $B_{12}$ , а так называемые  $B_{12}$ -коферменты, или кобамидные коферменты. Последние отличаются тем, что содержат 2 типа лигандов: метильную группу и 5'-дезоксаденозин. Соответственно различают метилкобаламин  $CH_3-B_{12}$  и дезоксиаденозилкобаламин. Превращение свободного витамина  $B_{12}$  в  $B_{12}$ -коферменты, протекающее в несколько этапов, осуществляется в организме при участии специфических ферментов в присутствии в качестве кофакторов ФАД, восстановленного НАД, АТФ и глутатиона. В частности, при образовании 5-дезоксикобаламинового кофермента АТФ подвергается необычному распаду с отщеплением трифосфатного остатка по аналогии еще с одной единственной реакцией синтеза 5-аденозилметионина из метионина и АТФ (см. главу 12). Первые  $B_{12}$ -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  $B_{12}$  принимает участие как кофермент, условно делят на 2 группы в соответствии с его химической природой. К первой группе относятся реакции трансметилирования, в

которых метилкобаламин выполняет роль промежуточного переносчика метильной группы (реакции синтеза метионина и ацетата).

Синтез метионина требует, помимо гомоцистеина, наличия  $N^5$ -метил-ТГФК и восстановленного ФАД и протекает согласно уравнению:

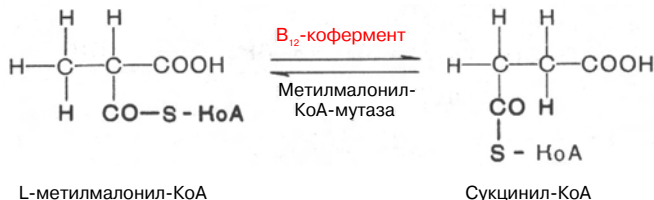


Фермент, катализирующий эту реакцию, был открыт в печени человека и ряда животных, а также у микроорганизмов. Получены доказательства, что механизм реакции включает перенос метильной группы  $N^5\text{-CH}_3\text{-ТГФК}$  на активный центр фермента с образованием метил- $B_{12}$ -фермента и последующий перенос этой группы на гомоцистеин. Блокирование этой реакции, наблюдаемое при авитаминозе  $B_{12}$ , приводит к накоплению  $N^5\text{-CH}_3\text{-ТГФК}$  и соответственно выключению из сферы химических реакций еще одного важного кофермента.

Вторая группа реакций при участии  $B_{12}$ -коферментов заключается во внутримолекулярном переносе водорода в реакциях изомеризации. Механизм этих реакций соответствует схеме:



Видно, что протон водорода движется (перемещается) между двумя соседними атомами углерода и не обменивается с протонами воды. Предполагают, что сначала водород от субстрата переносится на 5-дезоксикобаламин, а затем обратно на субстрат, меняя местоположение. Например, глутаматмутазная реакция (взаимопревращения глутаминовой и  $\beta$ -метиласпарагиновой кислот), метилмалонилмутазная реакция (обратимое превращение метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА), 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'-дезоксаденозилкобаламина в качестве кофермента, в то время как реакция метилирования (см. ранее) нуждается в метилкобаламине. Этими обстоятельствами могут быть объяснены некоторые био-

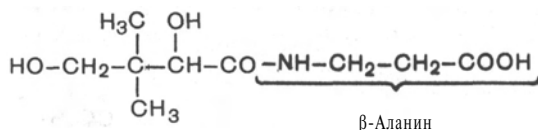
химические симптомы недостаточности витамина В<sub>12</sub>, в частности метилмалонилацидурия и гомоцистинурия. Кроме того, описаны болезни, обусловленные наследственными дефектами синтеза только дезоксиаденозилкобаламина или обоих В<sub>12</sub>-коферментов; в этих случаях даже 1000-кратная доза витамина В<sub>12</sub> не оказывала лечебного эффекта. В настоящее время высказывается предположение о более широком участии В<sub>12</sub>-коферментов в ферментативных реакциях трансметилирования, дезаминирования (например, этаноламиддезаминазная реакция) и др. Предстоит, однако, приложить немало усилий, чтобы выяснить молекулярные механизмы действия витамина В<sub>12</sub> на процесс кроветворения. Положительный эффект при лечении пернициозной анемии полусырой печенью обусловлен, как стало известно, наличием витамина В<sub>12</sub>, хотя следует указать, что большего лечебного эффекта можно добиться при одновременном введении внутреннего фактора слизистой оболочки желудка.

**Распространение в природе и суточная потребность.** Витамин В<sub>12</sub> является единственным витамином, синтез которого осуществляется исключительно микроорганизмами; ни растения, ни ткани животных этой способностью не наделены. Основные источники витамина В<sub>12</sub> для человека — мясо, говяжья печень, почки, рыба, молоко, яйца. Главным местом накопления витамина В<sub>12</sub> в организме человека является печень, в которой содержится до нескольких миллиграммов витамина. В печень он поступает с животной пищей, в частности с мясом, или синтезируется микрофлорой кишечника при условии доставки с пищей кобальта. Суточная потребность в витамине В<sub>12</sub> для взрослого человека составляет около 3 мкг (0,003 мг).

## Пантотеновая кислота (витамин В<sub>3</sub>)

Пантотеновая кислота в качестве витамина была открыта 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 пчени в высокоочищенном состоянии в форме кристаллической кальциевой соли, а в 1940 г. была расшифрована ее структура, подтвержденная химическим синтезом.

Пантотеновая кислота является комплексным соединением β-аланина и 2,4-диокси-3,3-диметилмасляной кислоты.



Пантотеновая кислота

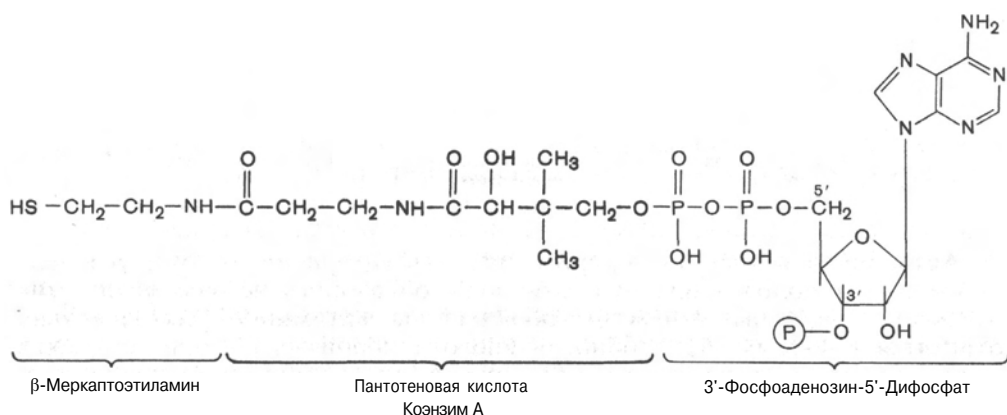
Пантотеновая кислота представляет собой вязкую светло-желтую жидкость, хорошо растворимую в воде; она малоустойчива и легко гидролизуется по месту пептидной связи под действием слабых кислот и щелочей.

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 А, 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  $\text{CH}_3\text{CO}$ ; 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 структуры лежит остаток 3'-фосфоаденозин-5'-дифосфата (отличается от АТФ наличием у 3'-гидроксила фосфатной группы), соединенный с остатком пантотеновой кислоты, карбонильная группа которой в свою очередь связана с остатком  $\beta$ -меркаптоэтиламина (тиоэтиламина).



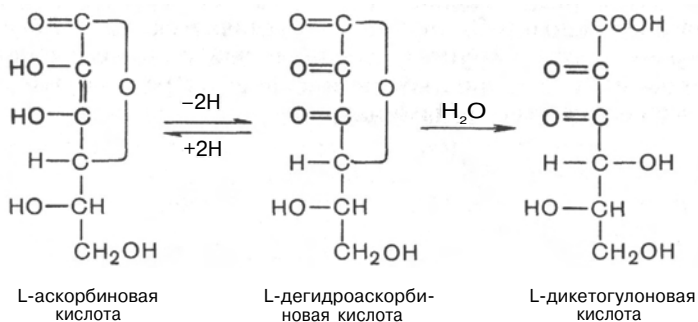
Реакционноспособным участком молекулы КоА в биохимических реакциях является SH-группа, поэтому принято сокращенное обозначение КоА в виде SH-КоА. О важнейшем значении КоА в обмене веществ (как будет показано далее—см. главы 9—11) свидетельствуют обязательное непосредственное участие его в основных биохимических процессах, окисление и биосинтез высших жирных кислот, окислительное декарбоксилирование  $\alpha$ -кетокислот (пируват,  $\alpha$ -кетоглутарат), биосинтез нейтральных жиров, фосфолипидов, стероидных гормонов, гема гемоглобина, ацетилхолина, гиппуровой кислоты и др.

**Распространение в природе и суточная потребность.** Уже отмечалось 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 неоспоримые 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 относится к сильным кислотам; кислый характер ее обусловлен наличием двух обратимо диссоциирующих енольных гидроксильных групп у 2-го и 3-го углеродных атомов.



Аскорбиновая кислота содержит два асимметричных атома углерода в 4-м и 5-м положениях, что позволяет образовать четыре оптических изомера. 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 легко восстанавливается цистеином, глутатионом, сероводородом. В слабощелочной (и даже в нейтральной) среде происходит гидролиз лактонового кольца, и эта кислота превращается 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, морских свинок и некоторых птиц и рыб. Все другие животные не нуждаются в пищевом витамине С, поскольку он легко синтезируется в печени из глюкозы. Как оказалось, ткани витамин-С-чувствительных животных и человека лишены одного-единственного фер-

мента, катализирующего последнюю (6-ю) стадию образования аскорбиновой кислоты из глюкозы, а именно гулонолактонооксидазы, превращающего L-гулонолактон в L-аскорбиновую кислоту.

Наиболее характерным признаком недостаточности витамина С является потеря организмом способности депонировать межклеточные «цементирующие» вещества, что вызывает поражение 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 отмечаются снижение массы тела, общая слабость, одышка, боли в сердце, сердцебиение. При цинге в первую очередь поражается кровеносная система: сосуды становятся хрупкими и проницаемыми, что служит причиной мелких точечных кровоизлияний под кожу—так называемых петехий; часто отмечаются кровоизлияния и кровотечения во внутренних органах и слизистых оболочках. Для цинги характерна также кровоточивость десен; дегенеративные изменения со стороны одонтобластов и остеобластов приводят к развитию кариеса, расшатыванию, разламыванию, а затем и выпадению зубов. У больных цингой наблюдаются, кроме того, отек нижних конечностей и боли при ходьбе.

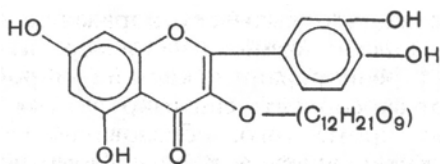
**Биологическая роль.** Витамин С, вероятнее всего, участвует в окислительно-восстановительных процессах, хотя до сих пор не выделены ферментные системы, в состав простетических групп которых он входит. Предполагают, что витамин С участвует в реакциях гидроксилирования пролина и лизина при синтезе коллагена, синтезе гормонов коры надпочечников (кортикостероидов), аминокислоты триптофана и, возможно, в других реакциях гидроксилирования. Имеются доказательства необходимости участия витамина С в окислительном распаде тирозина и гемоглобина в тканях.

**Распространение в природе и суточная потребность.** Витамин С относится к широко распространенным в природе витаминам. Наиболее важными источниками его для человека служат продукты растительного происхождения (овощи и фрукты). Много витамина С в перце, салате, капусте, хрене, укропе, ягодах рябины, черной смородины и особенно в цитрусовых (лимон). Картофель также относится к основным повседневным источникам витамина С, хотя содержит его значительно меньше. Из непищевых источников богаты витамином С шиповник, хвоя, листья черной смородины, экстракты из которых могут полностью удовлетворить потребности организма. Суточная потребность в витамине С для человека составляет 75 мг. Рекомендованные рядом ученых (в том числе Л. Полингом) более высокие суточные дозы аскорбиновой кислоты (1 г) для человека, вероятнее всего, недостаточно обоснованны.

## Витамин Р

Витамин Р (рутин, цитрин; витамин проницаемости) выделен в 1936 г. А. Сент-Дьердьи из кожуры лимона. Под термином «витамин Р», повышающим резистентность капилляров (от лат. permeability—проницаемость), объединяется группа веществ со сходной биологической активностью: катехины, халконы, дигидрохалконы, флавины, флавононы, изо-

флавоны, флавонолы и др. Все они обладают Р-витаминной активностью, и в основе их структуры лежит дифенилпропановый углеродный «скелет» хромона или флавона. Этим объясняется их общее название «биофлавоноиды». Приводим структуру рутина, выделенного из листьев гречихи:



Рутин

При недостаточности биофлавоноидов или отсутствии их в пище у людей и морских свинок повышается проницаемость кровеносных сосудов, сопровождающаяся кровоизлияниями и кровотечениями; у людей отмечаются кроме того, общая слабость, быстрая утомляемость и боли в конечностях.

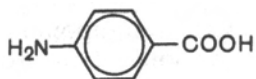
**Биологическая роль.** Биофлавоноиды стабилизируют основное вещество соединительной ткани путем ингибирования гиалуронидазы, что подтверждается данными о положительном влиянии Р-витаминных препаратов, как и аскорбиновой кислоты, в профилактике и лечении цинги, ревматизма, ожогов и др. Эти данные указывают 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, названный аскорутинном.

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, нарингил 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



Как отмечалось, 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.

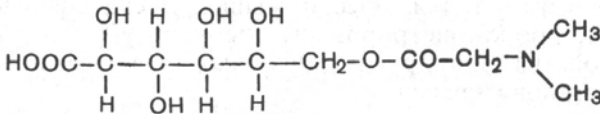
В медицине широко используются структурные аналоги парааминобензойной кислоты, в частности сульфаниламиды, обладающие антибактериальными свойствами. Предполагают, что сульфаниламидные препараты вследствие структурного сходства\* могут конкурентно замещать парааминобензойную кислоту в ферментных системах 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.

Источниками парааминобензойной кислоты для человека являются печень, почки, мясо, дрожжи; меньше ее содержится в молоке, куриных яйцах, картофеле, хлебе, шпинате, моркови.

## Витамин В<sub>15</sub>

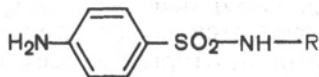
Витамин В<sub>15</sub> (пангамовая кислота) впервые был обнаружен в 1950 г. в экстрактах печени быка, а позже выделен из многих семян растений; отсюда его название (от греч. pan — всюду, gami — семя). Ни авитаминоз, ни гипервитаминоз В<sub>15</sub> у человека не описаны, хотя препараты его применяются 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

\* Общий тип строения сульфаниламидных препаратов можно представить в следующем виде:



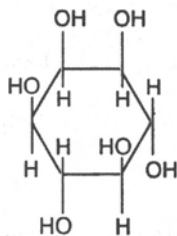
Биологическая роль витамина В<sub>15</sub> изучена недостаточно. Имеются отдельные указания и предположения о возможном участии его в биосинтезе холина, метионина и креатина в качестве источника метильных групп.

Пищевыми источниками витамина В<sub>15</sub> для человека являются печень, семена растений, дрожжи и др. Суточная потребность в нем для человека не установлена.

## Инозит (инозитол)

В опытах на мышах было показано, что при отсутствии в пище этого водорастворимого фактора, помимо остановки роста, отмечаются своеобразная потеря шерстяного 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.

Инозитол представляет собой циклический шестиатомный спирт циклогексана:



Инозит

Инозитол обнаружен в составе фосфолипидов (производные фосфатидной кислоты), он является компонентом фосфатидилинозитола (см. главу 11). Биологическая роль инозитола, вероятно всего, связана с обменом фосфолипидов и образованием инозитол-1,4,5-трифосфата—одного из наиболее активных вторичных посредников (мессенджеров) внутриклеточных сигналов (см. главу 11). Инозитол оказывает мощный липотропный эффект, тормозит 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 и его специфическое липотропное действие продемонстрированы довольно убедительно, однако его витаминные свойства для других животных и человека нельзя считать окончательно установленными.

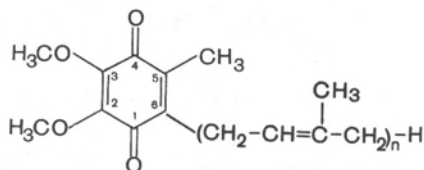
Инозит довольно широко распространен в природе. Много его в печени, мясе, молоке, хлебе из муки грубого помола, овощах и фруктах.

## Коэнзим Q (убихинон)

Коэнзим Q (кофермент Q, КоQ) относится к чрезвычайно широко распространенным коферментам, отсюда его второе название «убихинон» («вездесущий хинон»). Убихинон 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

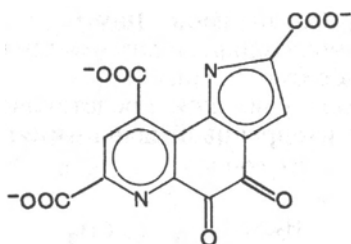
Число остатков изопрена в боковой цепи убихинона из разных источников варьирует от 6 до 10, что обозначают как  $\text{CoQ}_6$ ,  $\text{CoQ}_7$  и т.д. В митохондриях клеток человека и животных встречается убихинон только с 10 изопреновыми звеньями. Как и близкие к нему по структуре витамины К и Е, убихинон нерастворим в воде. В хлоропластах растений открыто близкое к убихинону соединение пластохинон, который отличается строением бензольного кольца: вместо двух метоксильных остатков содержатся две металлические группы и отсутствует  $\text{CH}_3$ -группа у 5-го углеродного атома.

К настоящему времени выяснена основная коферментная роль  $\text{CoQ}_{10}$ . Он оказался обязательным компонентом дыхательной цепи (см. главу 9): осуществляет в митохондриях перенос электронов от мембранных дегидрогеназ (в частности, НАДН-дегидрогеназы дыхательной цепи, СДГ и т.д.) на цитохромы. Таким образом, если никотинамидные коферменты участвуют в транспорте электронов и водорода между водорастворимыми ферментами, то  $\text{CoQ}_{10}$  благодаря своей растворимости в жирах осуществляет такой перенос в гидрофобной митохондриальной мембране. Пластохиноны выполняют аналогичную функцию переносчиков при транспорте электронов в процессе фотосинтеза.

В организме человека  $\text{CoQ}$  может синтезироваться из мевалоновой кислоты и продуктов обмена фенилаланина и тирозина. По этой причине  $\text{CoQ}$  нельзя отнести к классическим витаминам, однако при некоторых патологических состояниях, развивающихся как следствие неполноценности питания,  $\text{CoQ}$  становится незаменимым фактором. Так, у детей, получающих с пищей недостаточное количество белка, развивается анемия, не поддающаяся лечению известными средствами (витамин  $\text{B}_{12}$ , фолиевая кислота и др.). В этих случаях препараты  $\text{CoQ}$  более эффективны.  $\text{CoQ}$  оказался также эффективным средством при лечении мышечной дистрофии (в том числе генетической ее формы) и сердечной недостаточности.

## Пирролохинолинохинон (PQQ)

Недавно открыт новый класс белков—хинопротеины, или PQQ-ферменты, содержащие в качестве кофермента неизвестный до сих пор новый витаминоподобный фактор пирролохинолинохинон (PQQ). Он имеет следующую структуру:



PQQ - Пирролохинолинохинон

PQQ оказался производным хинона, довольно широко распространенным у микроорганизмов, в животных тканях и растениях. Среди бактериальных ферментов, в состав которых PQQ входит в качестве кофермента, следует указать на метанолдегидрогеназу и алкогольдегидрогеназу. Из тканей животных, растений, грибов и дрожжей выделен медь-содержащий фермент метиламинооксидаза, в котором также есть ковалентно связанный PQQ в качестве кофермента.

Животные и растительные хинопротеины входят в состав оксидаз и декарбоксилаз (аминоксидаз, диаминоксидаз, монооксигеназ, диоксигеназ). Имеются данные о возможности наличия 2 коферментов: пиридоксальфосфата и PQQ—в составе ряда декарбоксилаз аминокислот (глутаматдекарбоксилазы и ДОФА-декарбоксилазы).

Интересно отметить, что PQQ-дегидрогеназы и оксидазы по механизму действия аналогичны флавопротеинам, катализирующим перенос 2 электронов и протонов, возможно, непосредственно на убихинон. PQQ-декарбоксилазы, напротив, аналогичны по механизму действия пиридоксальевым ферментам, поскольку обе системы содержат карбонильную группу. На примере трехмерной структуры одного из хинопротеинов—метиламинооксидазы—получены данные, свидетельствующие о том, что коферментом ее является не свободный PQQ, а его предшественник Pro-PQQ (содержит остатки PQQ, индола и глутаминовой кислоты), ковалентно связанный с белковой молекулой.

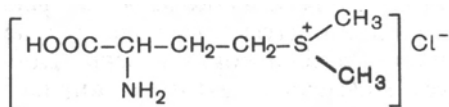
Как видно на примере PQQ, в природе может встречаться и ряд других незаменимых пищевых факторов, принимающих участие в ключевых реакциях метаболизма, хотя истинные витаминные свойства их, включая PQQ, пока не раскрыты.

## Витамин U

Витамин U (S-метилметионин; противоязвенный фактор) 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)

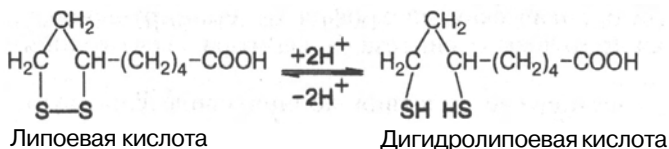
Витамин U хорошо растворим в воде; при температуре 100°C легко разрушается, особенно в нейтральной и щелочной средах; устойчив в кислой среде.

**Биологическая роль.** Витамин U у крыс полностью заменяет потребности в метионине как незаменимой аминокислоте. Установлено его участие в синтезе метионина, холина и креатина; бактерии используют его также в качестве донатора 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 молочнокислых 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-дителиан-3-валериановой) кислотой.



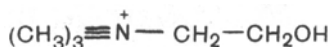
Как видно из формул, липоевая кислота может существовать в окисленной (—S—S—) и восстановленной (SH—) формах, благодаря чему реализовываются ее коферментные функции. В частности, липоевая кислота играет незаменимую роль в окислении и переносе ацильных групп в составе многокомпонентных ферментных систем. Основная функция ее—прямое участие в окислительном декарбоксилировании в тканях α-кетокислот (пировиноградной и α-кетоглутаровой; см. главу 10). Липоевая кислота служит простетической группой наряду с тиаминпирофосфатом и КоА сложной мультиферментной пируват- и кетоглутарат-дегидрогеназной систем. Однако до сих пор нет сведений 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. 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 11), открытого в яичном желтке и ткани мозга. 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 позволили установить, 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.

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 B<sub>12</sub> и фолиевой кислотой.

## Антивитамины

В настоящее время антивитамины принято делить на две группы: 1) антивитамины, имеющие структуру, сходную со структурой нативного витамина, и оказывающие действие, основанное на конкурентных взаимоотношениях с ним; 2) антивитамины, вызывающие модификацию химической структуры витаминов или затрудняющие их всасывание, транспорт, что сопровождается снижением или потерей биологического эффекта витаминов. Таким образом, термином «антивитамины» обозначают любые вещества, вызывающие независимо от механизма их действия снижение или полную потерю биологической активности витаминов.

Структуроподобные авитамины (о некоторых из них уже упоминалось ранее) по существу представляют собой антиметаболиты и при взаимодействии с апоферментом образуют неактивный ферментный комплекс, выключая энзиматическую реакцию со всеми вытекающими отсюда последствиями.

Помимо структуроподобных аналогов витаминов, введение которых обуславливает развитие истинных авитаминозов, различают авитамины 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 B<sub>1</sub>, аскорбатоксидаза, катализирующая разрушение витамина C, белок авидин, связывающий биотин в биологически неактивный комплекс. Большинство этих авитаминов применяют как лечебные средства со строго направленным действием на некоторые биохимические и физиологические процессы. В частности, из авитаминов жирорастворимых витаминов используются дикумарол, варфарин и тромексан (антагонисты витамина K) в качестве антисвертывающих препаратов. Хорошо изученными авитаминами тиамин являются окситиамин, пири- и неопиритиамин, рибофлавина – атербин, акрихин, галактофлавин, изорибофлавин (все они конкурируют с витамином B<sub>2</sub> при биосинтезе коферментов ФАД и ФМН), пиридоксина – дезоксипиридоксин, циклосерин, изоникотиноилгидразид (изониазид), оказывающий антибактериальное действие на микобактерии туберкулеза. Авитаминами фолиевой кислоты являются амино- и аметоптерины, витамина B<sub>12</sub> – производные 2-аминометилпропанол-B<sub>12</sub>, 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 8

# 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, молекулярные механизмы действия, а также физиологию и патологию эндокринной системы \*. Учреждены специализированные научно-исследовательские институты, лаборатории, издаются научные журналы; созываются международные конференции, симпозиумы и конгрессы, посвященные проблемам эндокринологии. В наши дни эндокринология 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 Эндокринологический научный центр РАМН.

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, вырабатываемые 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, инсулин 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 внутренней среды — гомеостаз — при помощи механизмов саморегуляции, в 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 сигналы об изменениях в окружающей и внутренней средах и тонко регулирует интенсивность

\* Исследования последних лет убеждают, что эндокринная система включает не только истинные железы внутренней секреции, но и много других гормональных систем в органах и тканях организма, которые вырабатывают биологически активные вещества с гормоноподобным эффектом; они регулируются нейроэндокринной системой или действуют автономно.



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. В настоящее время получены доказательства, что гормоны вызывают либо быструю (срочную) ответную реакцию, повышая активность преобразованных, имеющих в тканях ферментов (это свойственно гормонам пептидной и белковой природы), либо, что более характерно, например, для стероидных гормонов, медленную реакцию, связанную с синтезом ферментов *de novo*. Как будет показано далее, стероидные гормоны оказывают влияние на генетический аппарат клетки, вызывая синтез соответствующей мРНК, которая, поступив в рибосому, служит матрицей для синтеза молекулы белка—фермента. Предполагают, 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 (состояние гипо- или гиперфункции) или изменения структуры и функций рецепторов и внутриклеточных посредников, 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 секрет непосредственно в кровь. Позже Ш. Броун-Секар показал, что недостаточность функции желез внутренней секреции вызывает развитие болезней, а экстракты, полученные из этих желез, оказывают хороший лечебный эффект. В настоящее время имеются бесспорные доказательства, что почти все болезни желез внутренней секреции (тиреотоксикоз, сахарный диабет и др.) развиваются в результате нарушения молекулярных механизмов регуляции процессов обмена, вызванных недостаточным или, наоборот, избыточным синтезом соответствующих гормонов в организме человека.

Термин «гормон» (от греч. *hormao*—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. Установлены специфические особенности биологического действия гормонов: а) гормоны проявляют 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 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 связей.

Под влиянием разнообразных внешних и внутренних раздражителей

возникают импульсы в специализированных, весьма чувствительных рецепторах. Импульсы затем поступают в ЦНС, оттуда в гипоталамус, где синтезируются первые биологически активные гормональные вещества, оказывающие «дистантное» действие,— так называемые рилизинг-факторы. Особенностью рилизинг-факторов является то, что они не поступают в общий ток крови, а через портальную систему сосудов достигают специфических клеток гипофиза, при этом стимулируют (или тормозят) биосинтез и выделение тропных гормонов гипофиза, которые с током крови достигают соответствующей эндокринной железы и способствуют выработке необходимого гормона. Этот гормон затем оказывает действие на специализированные органы и ткани (органы-мишени), 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 понимают химические структуры соответствующих тканей-мишеней, содержащие высокоспецифические участки (углеводные 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), а рецепторы гормонов стероидной природы—в ядре. Общим признаком всех рецепторов независимо от локализации является наличие строго пространственного и структурного соответствия между рецептором и соответствующим гормоном.

Молекулярные механизмы передачи гормонального сигнала и роль вторичных мессенджеров (посредников) в реализации гормонального эффекта подробно изложены в конце данной главы.

## **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. Химические наименования многих гормонов точно отражают их химическую структуру и очень громоздки. Поэтому чаще применяются 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 (например, лютеинизирующего и фолликулостимулирующего), а также для всех гипоталамических гормонов разработаны новые рабочие названия.

Аналогичное положение существует и в отношении классификации гормонов. 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, вазо-

прессин и окситоцин синтезируются в гипоталамусе, откуда переносятся в заднюю долю гипофиза), или синтезируются и в других железах (например, частичный синтез половых гормонов осуществляется 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 современной классификации гормонов, основанной на их химической природе. В соответствии с этой классификацией различают три группы истинных гормонов: 1) пептидные и белковые гормоны, 2) гормоны—производные аминокислот и 3) гормоны стероидной природы. Четвертую группу составляют эйкозаноиды—гормоноподобные вещества, оказывающие местное действие.

Пептидные и белковые гормоны включают от 3 до 250 и более аминокислотных остатков. Это гормоны гипоталамуса и гипофиза (тиролиберин, соматолиберин, соматостатин, гормон роста, кортикотропин, тиротропин и др. — см. далее), а также гормоны поджелудочной железы (инсулин, глюкагон). Гормоны—производные аминокислот в основном представлены производными аминокислоты тирозина. Это низкомолекулярные соединения адреналин и норадреналин, синтезирующиеся в мозговом веществе надпочечников, и гормоны щитовидной железы (тироксин и его производные). Гормоны 1-й и 2-й групп хорошо растворимы в воде.

Гормоны стероидной природы представлены жирорастворимыми гормонами коркового вещества надпочечников (кортикостероиды), половыми гормонами (эстрогены и андрогены), а также гормональной формой витамина D.

Эйкозаноиды, являющиеся производными полиненасыщенной жирной кислоты (арахидоновой), представлены тремя подклассами соединений: простагландины, тромбоксаны и лейкотриены. Эти нерастворимые в воде и нестабильные соединения оказывают свое действие на клетки, находящиеся вблизи их места синтеза.

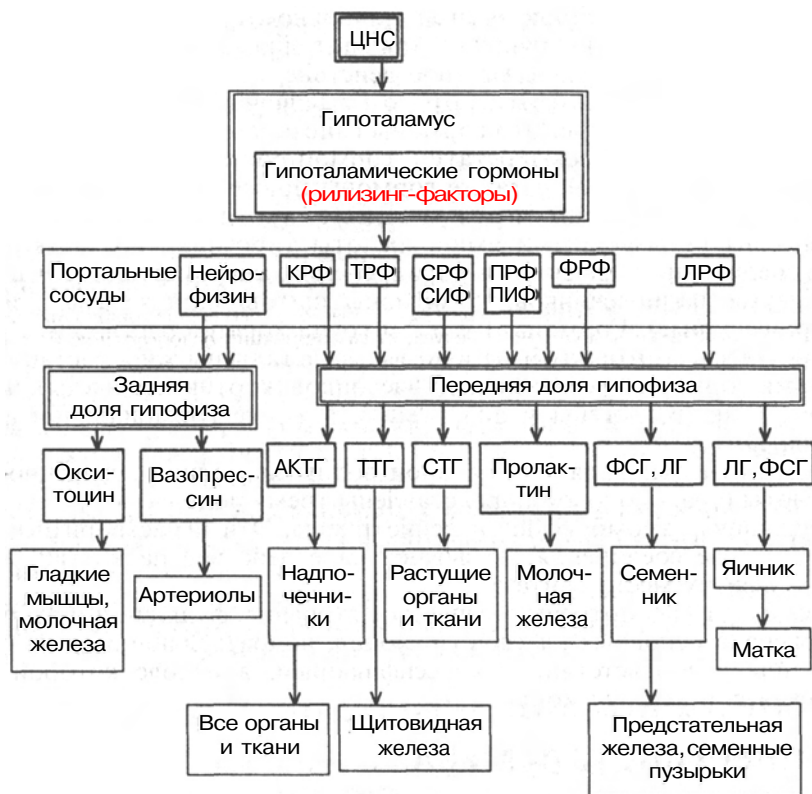
Далее будут рассмотрены химическое строение, функции и пути биосинтеза и распада основных классов гормонов, подразделяющихся на отдельные группы в соответствии с классификацией, в основе которой лежит химическая природа гормонов.

## **ГОРМОНЫ ГИПОТАЛАМУСА**

Гипоталамус служит местом непосредственного взаимодействия высших отделов ЦНС и эндокринной системы. Природа связей, существующих между ЦНС и эндокринной системой, стала проясняться 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, чтобы доказать, что эти вещества\* образуются в нервных клетках гипоталамуса, откуда по системе порталных капилляров достигают гипофиза и регулируют секрецию гипофизарных гормонов, точнее их освобождение (возможно, и биосинтез). Эти вещества получили сначала наименование нейрогормонов, а затем рилизинг-факторов (от англ.

\* 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.

release — освобождать), или либеринов. Вещества с противоположным действием, т.е. угнетающие освобождение (и, возможно, биосинтез) гипофизарных гормонов, стали называть ингибирующими факторами, или статинами. 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 7 стимуляторов (либерины) и 3 ингибитора (статины) секреции гормонов гипофиза, а именно: кортиколиберин, тиролиберин, люлиберин, фоллилиберин, соматолиберин, пролактолиберин, меланолиберин, соматостатин, пролактостатин и меланостатин (табл. 8.1). В чистом виде выделено 5 гормонов, для которых установлена первичная 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 тиролиберина 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 тиролиберина показана способность освобождать, помимо тиротропина, также пролактин, а для люлиберина, помимо лютеинизирующего гормона, — также фолликулостимулирующий гормон.

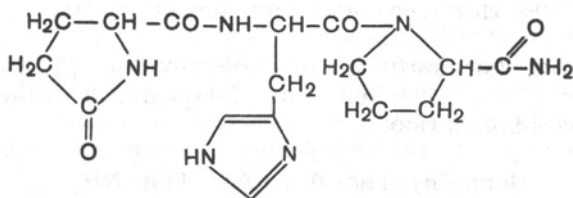
Таблица 8.1. Гипоталамические гормоны, контролирующие освобождение гормонов гипофиза

Старое название	Принятые сокращения	Рекомендуемое название
Кортикотропин-рилизинг-фактор	КРФ	Кортиколиберин
Тиротропин-рилизинг-фактор	ТРФ	Тиролиберин
Гонадотропин-рилизинг-фактор	ГРФ	Гонадолиберин
Рилизинг-фактор фолликулостимулирующего гормона	ФРФ ФСГ-РФ	Фоллилиберин
Соматотропин-рилизинг-фактор	СРФ	Соматолиберин
Соматотропинингибирующий фактор	СИФ	Соматостатин
Пролактин-рилизинг-фактор	ПРФ	Пролактилиберин
Пролактинингибирующий фактор	ПИФ	Пролактостатин
Меланотропин-рилизинг-фактор	МРФ	Меланолиберин
Меланотропинингибирующий фактор	МИФ	Меланостатин

<sup>1</sup> Гипоталамические гормоны не имеют твердо установленных наименований. Рекомендуется в первой части названия гормона гипофиза добавлять окончание «либерин»; например, «тиролиберин» означает гормон гипоталамуса, стимулирующий освобождение (и, возможно, синтез) тиротропина - соответствующего гормона гипофиза. Аналогичным образом образуют названия факторов гипоталамуса, ингибирующих освобождение (и, возможно, синтез) тропных гормонов гипофиза, - добавляют окончание «статин». Например, «соматостатин» означает гипоталамический пептид, ингибирующий освобождение (или синтез) гормона роста гипофиза - соматотропина.

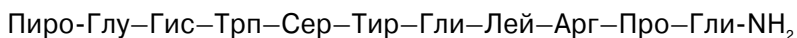
Установлено, что по химическому строению все гормоны гипоталамуса являются низкомолекулярными пептидами, так называемыми олигопептидами необычного строения, хотя точный аминокислотный состав и первичная структура выяснены не для всех. Приводим полученные к настоящему времени данные о химической природе шести из известных 10 гормонов гипоталамуса.

### 1. Тиролиберин (Пиро-Глу-Гис-Про-NH<sub>2</sub>):



Тиролиберин представлен трипептидом, состоящим из пироглутаминовой (циклической) кислоты, гистидина и пролинамида, соединенных пептидными связями. В отличие от классических пептидов он не содержит свободных NH<sub>2</sub>- и COOH-групп у N- и C-концевых аминокислот.

2. **Гонадолиберин** является декапептидом, состоящим из 10 аминокислот в последовательности:



Концевая С-аминокислота представлена глицинамидом.



из 41 аминокислоты с выясненной последовательностью кортиколиберин из гипоталамуса овцы.

Местом синтеза гипоталамических гормонов, вероятнее всего, являются нервные окончания—синапсосомы 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 тиролиберина, 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 гонадолиберина и соматолиберина.

Пути инактивации гормонов гипоталамуса изучены недостаточно. Период полураспада тиролиберина 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 специфический фермент пироглутамилпептидаза, которая катализирует отщепление от тиролиберина или гонадолиберина 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  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ освобождаются ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и цАМФ; последний действует как на освобождение, так и на синтез соответствующего гормона гипофиза путем активирования протеинкиназы (см. далее).

Для выяснения механизма действия рилизинг-факторов, включая их взаимодействие с соответствующими рецепторами, большую роль сыграли структурные аналоги тиролиберина и гонадолиберина. Некоторые из этих аналогов обладают даже более высокой гормональной активностью и пролонгированным действием, чем природные гормоны гипоталамуса. Однако предстоит еще большая работа по выяснению химического строения уже открытых рилизинг-факторов и расшифровке молекулярных механизмов их действия.

## ГОРМОНЫ ГИПОФИЗА

В гипофизе синтезируется ряд биологически активных гормонов белковой и пептидной природы, оказывающих стимулирующий эффект на различные физиологические и биохимические процессы в тканях-мишенях (табл. 8.2). 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 «тиротропин».

**Таблица 8.2. Гормоны гипофиза и основные клинические синдромы, развивающиеся при нарушении их секреции**

Гормон	Молекулярная масса	Основные клинические синдромы	
		при избытке гормона	при недостаточности гормона
<b>Гормоны передней доли гипофиза</b>			
Гормон роста	21500	Акромегалия (чрезмерный рост)	Карликовость (низкорослость)
Кортикотропин (АКТГ)	4500	Синдром Иценко-Кушинга	Вторичная гиподисфункция коры надпочечников
Тиротропин	28000	Гипертиреоз	Вторичный гипотиреоз
Пролактин	23500	Аменорея, бесплодие, галакторея	Отсутствие лактации
Фолликулостимулирующий гормон (фоллиотропин)	34000	Преждевременное половое созревание	Вторичная гиподисфункция половых желез; бесплодие
Лютеинизирующий гормон (лютропин)	28500	То же	То же
Липотропин	11800	Истощение	Ожирение
<b>Гормоны задней доли гипофиза</b>			
Вазопрессин	1070	—	Несахарный диабет
Окситоцин	1070	—	—

В последние годы из ткани мозга животных было выделено более 50 пептидов, получивших название нейропептидов и определяющих поведенческие реакции. Показано, что эти вещества влияют на некоторые формы поведения, процессы обучения и запоминания, регулируют сон и снимают, подобно морфину, боль. Так, выделенный  $\beta$ -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 темноты, был назван скотофобинном. Выделен полипептид амелетин, который, наоборот, отучает крыс бояться резкого звука электрического звонка. Работы в этом направлении интенсивно ведутся во многих лабораториях. Вполне возможно, что скоро будут выделены и соответственно синтезированы искусственно для каждой формы поведения соответствующие нейропептиды, включая пептиды памяти.

Далее приводятся данные о структуре и функциях важнейших гормонов гипофиза и других желез внутренней секреции, имеющих белковую и пептидную природу.

## **Вазопрессин и окситоцин**

Гормоны вазопрессин и окситоцин синтезируются рибосомальным путем, причем одновременно в гипоталамусе синтезируются 3 белка: нейрофизин I, II и III, функция которых заключается в нековалентном связы-



вании окситоцина и вазопрессина и транспорте этих гормонов в нейросекреторные гранулы гипоталамуса. Далее в виде комплексов нейрофизин—гормон они мигрируют вдоль аксона и достигают задней доли гипофиза, где откладываются про запас; после диссоциации комплекса свободный гормон секретируется в кровь. Нейрофизины также выделены в чистом виде, и выяснена первичная структура двух из них (92 из 97 аминокислотных остатков соответственно); это богатые цистеином белки, содержащие по семь дисульфидных связей.

Химическое строение обоих гормонов было расшифровано классическими работами В. дю Виньо и сотр., 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 9 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, отсюда название «лизин-вазопрессин». 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. Высказано 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.

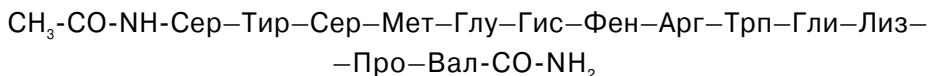
Основной биологический эффект окситоцина у млекопитающих связан со стимуляцией сокращения гладких мышц матки при родах и мышечных волокон вокруг альвеол молочных желез, что вызывает секрецию молока. Вазопрессин стимулирует сокращение гладких мышечных волокон сосудов, оказывая сильное вазопрессорное действие, однако основная роль его в организме сводится к регуляции водного обмена, откуда его второе название антидиуретического гормона. В небольших концентрациях (0,2 нг на 1 кг массы тела) вазопрессин оказывает 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 аденилатциклазную систему (см. далее). Однако конкретный механизм действия вазопрессина на транспорт воды в почках пока остается неясным.

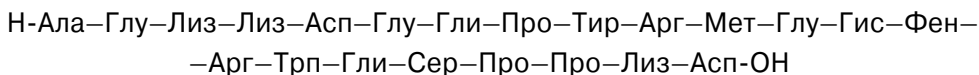
## **Меланоцитстимулирующие гормоны (МСГ, меланотропины)**

Меланотропины синтезируются и секретируются в кровь промежуточной долей гипофиза. Выделены и расшифрованы первичные структуры двух типов гормонов —  $\alpha$ - и  $\beta$ -меланоцитстимулирующие гормоны ( $\alpha$ -МСГ и  $\beta$ -МСГ). Оказалось, что у всех обследованных животных  $\alpha$ -МСГ состоит из 13 остатков аминокислот, расположенных в одинаковой последовательности:



В  $\alpha$ -МСГ N-концевой серин ацетилирован, а C-концевая аминокислота представлена валинамидом.

Состав и структура  $\beta$ -МСГ оказались более сложными. У большинства животных молекула  $\beta$ -МСГ состоит из 18 остатков аминокислот; кроме того, имеются видовые различия, касающиеся природы аминокислоты в положениях 2, 6 и 16 полипептидной цепи гормона.  $\beta$ -МСГ, выделенный из промежуточной доли гипофиза человека, оказался 22-членным пептидом, удлинненным на 4 аминокислотных остатка с N-конца:

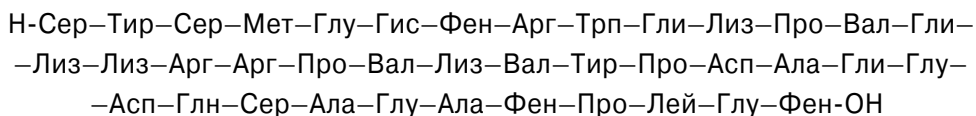


Физиологическая роль меланотропинов заключается в стимулировании меланиногенеза у млекопитающих и увеличении количества пигментных клеток (меланоцитов) в кожных покровах земноводных. Возможно также влияние МСГ на окраску меха и секреторную функцию сальных желез у животных.

## **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 у всех видов животных содержит 39 аминокислотных остатков. Первичная структура АКТГ свиньи и овцы была расшифрована еще в 1954–1955 гг. Приводим уточненное строение АКТГ человека:



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.

Данные о механизме действия АКТГ на синтез стероидных гормонов свидетельствуют о существенной роли аденилатциклазной системы. Предполагают, 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 (СТГ, гормон роста, соматотропин)**

Гормон роста был открыт в экстрактах передней доли гипофиза еще в 1921 г., однако в химически чистом виде получен только в 1956—1957 гг. СТГ синтезируется в ацидофильных клетках передней доли гипофиза; концентрация его в гипофизе составляет 5—15 мг на 1 г ткани, что в 1000 раз превышает концентрацию других гормонов 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. Он влияет на все клетки организма, определяя интенсивность обмена углеводов, белков, липидов и минеральных веществ. 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, ростом скелета, СТГ координирует и регулирует скорость протекания обменных процессов. Кроме того, СТГ человека и приматов (но не других животных) обладает измеримой лактогенной активностью. Предполагают, что многие биологические эффекты этого гормона осуществляются через особый белковый фактор, образующийся в печени под влиянием гормона. Этот фактор был назван сульфатурирующим или тимидиловым, 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 мол. массой 8000. Учитывая его биологическую роль, ему дали наименование «соматомедин», т.е. медиатор действия СТГ в организме.

СТГ регулирует процессы роста и развития всего организма, что подтверждается клиническими наблюдениями. Так, при гипофизарной карликовости (патология, известная в литературе как пангипопитуитаризм;

связана 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. Известно заболевание *акромегалия* (от греч. akros — конечность, megas — большой), характеризующееся непропорционально интенсивным ростом отдельных частей тела, например рук, ног, подбородка, надбровных дуг, носа, языка, и разрастанием внутренних органов. Болезнь вызвана, по-видимому, опухолевым поражением передней доли гипофиза.

## **Лактотропный гормон (пролактин, лютеотропный гормон)**

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 (отсюда его второе название «лютеотропный гормон»), оказывает ренотропное, эритропоэтическое и гипергликемическое действие и др. Избыток пролактина, образующийся обычно при наличии опухолей из секретирующих пролактин клеток, приводит к прекращению менструаций (аменорея) и увеличению молочных желез у женщин и к импотенции — у мужчин.

Расшифрована структура пролактина из гипофиза овцы, быка и человека. Это крупный белок, представленный одной полипептидной цепью с тремя дисульфидными связями, состоящий из 199 аминокислотных остатков. Видовые отличия в последовательности аминокислот касаются по существу 2—3 аминокислотных остатков. Раньше оспаривалось мнение о секретирующей функции пролактина в гипофизе человека, поскольку предполагали, что его функцию якобы выполняет соматотропин. В настоящее время получены убедительные доказательства существования пролактина человека, хотя в гипофизе его содержится значительно меньше, чем гормона роста. В крови женщин уровень пролактина резко повышается перед родами: до 0,2 нг/л против 0,01 нг/л в норме.

## **Тиреотропный гормон (ТТГ, тиротропин)**

В отличие от рассмотренных пептидных гормонов гипофиза, представленных в основном одной полипептидной цепью, тиротропин является сложным гликопротеином и содержит, кроме того, по две  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы, которые в отдельности биологической активностью не обладают: мол. масса его около 30000.

Тиротропин контролирует развитие и функцию щитовидной железы и регулирует биосинтез и секрецию в кровь тиреоидных гормонов. Полностью расшифрована первичная структура  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц тиротропина быка, овцы и человека:  $\alpha$ -субъединица, содержащая 96 аминокислотных остатков, имеет одинаковую аминокислотную последовательность во всех изученных ТТГ и во всех лютеинизирующих гормонах гипофиза;  $\beta$ -субъединица тиротропина человека, содержащая 112 аминокислотных остатков,

отличается от аналогичного полипептида в ТТГ крупного рогатого скота аминокислотными остатками и отсутствием С-концевого метионина. Поэтому многие авторы специфические биологические и иммунологические свойства гормона объясняют наличием  $\beta$ -субъединицы ТТГ в комплексе с  $\alpha$ -субъединицей. Предполагают, что действие тиротропина осуществляется, подобно действию других гормонов белковой природы, посредством связывания со специфическими рецепторами плазматических мембран и активирования аденилатциклазной системы (см. далее).

## **Гонадотропные гормоны (гонадотропины)**

К гонадотропинам относятся фолликулостимулирующий гормон (ФСГ, фоллитропин) и лютеинизирующий гормон (ЛГ, лютропин), или гормон, стимулирующий интерстициальные клетки\*. Оба гормона синтезируются в передней доле гипофиза и являются, как и тиротропин, сложными белками—гликопротеинами с мол. массой 25000. Они регулируют стероидо- и гаметогенез в половых железах. 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. Биосинтез гонадотропинов, как было отмечено, регулируется гипоталамическим гормоном гонадолиберином.

Химическая структура молекулы лютропина расшифрована полностью. Лютропин состоит из двух  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц. Структура  $\alpha$ -субъединиц гормона у большинства животных совпадает. Так, у овцы она содержит 96 аминокислотных остатков и 2 углеводных радикала. У человека  $\alpha$ -субъединица гормона укорочена на 7 аминокислотных остатков с N-конца и отличается природой 22 аминокислот. Расшифрована также последовательность аминокислот в  $\beta$ -субъединицах лютропина свиньи и человека.  $\alpha$ - и  $\beta$ -Субъединицы в отдельности лишены биологической активности (по аналогии с большинством субъединиц ферментов). Только их комплекс, образование которого, вероятнее всего, предопределено первичной структурой их, приводит к формированию биологически активной макромолекулярной структуры за счет гидрофобных взаимодействий.

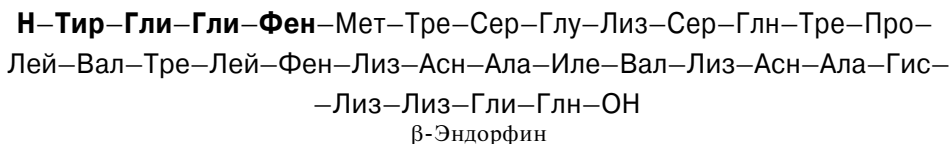
## **Липотропные гормоны (ЛТГ, липотропины)**

Среди гормонов передней доли гипофиза, структура и функция которых выяснены в последнее десятилетие, следует отметить липотропины, в частности  $\beta$ - и  $\gamma$ -ЛТГ. Наиболее подробно изучена первичная структура  $\beta$ -липотропина овцы и свиньи, молекулы которого состоят из 91 аминокислотного остатка и имеют существенные видовые различия в последовательности аминокислот. К биологическим свойствам  $\beta$ -липотропина относятся жиромобилизирующее действие, кортикотропная, меланоцитстимулирующая и гипокальциемическая активность и, кроме того, инсулиноподобный эффект, выражающийся в повышении скорости утилизации глюкозы в тканях. Предполагают, что липотропный эффект осуществляется через систему

\* К группе гонадотропинов относят также хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), синтезируемый клетками плаценты и представленный гликопротеином.

аденилатциклаза—цАМФ—протеинкиназа, завершающей стадией действия которой является фосфорилирование неактивной триацилглицерол-липазы. Этот фермент после активирования расщепляет нейтральные жиры на диацилглицерол и высшую жирную кислоту (см. главу 11).

Перечисленные биологические свойства обусловлены не  $\beta$ -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. Приводим структуры некоторых из них:



Общим типом структуры для всех трех соединений является тетрапептидная последовательность на N-конце. Доказано, что  $\beta$ -эндорфин (31 АМК) образуется путем протеолиза из более крупного гипофизарного гормона  $\beta$ -липотропина (91 АМК); последний вместе с АКТГ образуется из общего предшественника—прогормона, названного проопиокортином (является, таким образом, препрогормоном), имеющим молекулярную массу 29 кДа и насчитывающим 134 аминокислотных остатка. Биосинтез и освобождение проопиокортина в передней доле гипофиза регулируется кортиколиберином гипоталамуса. В свою очередь из АКТГ и  $\beta$ -липотропина путем дальнейшего процессинга, в частности ограниченного протеолиза, образуются соответственно  $\alpha$ - и  $\beta$ -меланоцитстимулирующие гормоны ( $\alpha$ - и  $\beta$ -МСГ). С помощью техники клонирования ДНК, а также метода определения первичной структуры нуклеиновых кислот Сенджера в ряде лабораторий была раскрыта 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  $\beta$ -липотропина путем специфического протеолиза.

<i>Участок <math>\beta</math>-липотропина</i>	<i>Пептидный гормон</i>
1-58	$\gamma$ -Липотропин
41-58	$\beta$ -МСГ
61-65	Мет-энкефалин
61-76	$\alpha$ -Эндорфин
61-77	$\gamma$ -Эндорфин
61-79	$\delta$ -Эндорфин
61-91	$\beta$ -Эндорфин

Учитывая исключительную роль  $\beta$ -липотропина как предшественника перечисленных гормонов, приводим первичную структуру  $\beta$ -липотропина свиньи (91 аминокислотный остаток):

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–  
–Глн–Тре–Про–Лей–Вал–Тре–Лей–Фен–Лиз–Асн–Ала–Иле–Вал–Лиз–  
–Асн–Ала–Гис–Лиз–Лиз–Гли–Глн–ОН

Повышенный интерес к указанным пептидам, в частности энкефалинам и эндорфинам, диктуется их необычайной способностью, подобно морфину, снимать болевые ощущения. Эта область исследования – поиск новых природных пептидных гормонов и(или) их направленный биосинтез – является интересной и многообещающей для развития физиологии, нейробиологии, неврологии и клиники.

## **ГОРМОНЫ ПАРАЩИТОВИДНЫХ ЖЕЛЕЗ (ПАРАТГОРМОНЫ)**

К гормонам белковой природы относится также паратиреоидный гормон (паратгормон), точнее, группа паратгормонов, различающихся последовательностью аминокислот. Они синтезируются паращитовидными железами. Еще в 1909 г. было показано, что удаление паращитовидных 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 паращитовидных желез был выделен активный экстракт, вызывающий гормональный эффект – повышение содержания кальция в крови. Чистый гормон был получен в 1970 г. из паращитовидных желез крупного рогатого скота; тогда же была определена его первичная структура. Выяснено, что паратгормон синтезируется в виде предшественника (115 аминокислотных остатков) пропаратгормона, однако первичным продуктом гена оказался препропаратгормон, содержащий дополнительно сигнальную последовательность из 25 аминокислотных остатков. Молекула паратгормона быка содержит 84 аминокислотных остатка и состоит из одной полипептидной цепи.

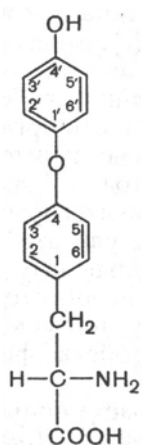
Выяснено, что паратгормон участвует в регуляции концентрации катионов кальция и связанных с ними анионов фосфорной кислоты в крови. Как известно, концентрация кальция в сыворотке крови относится к химическим константам, суточные колебания ее не превышают 3–5% (в норме 2,2–2,6 ммоль/л). Биологически активной формой считается ионизированный кальций, концентрация его колеблется в пределах 1,1–1,3 ммоль/л. Ионы кальция оказались эссенциальными факторами, не заменимыми другими катионами для ряда жизненно важных физиологических процессов: мышечное сокращение, нервно-мышечное возбуждение, свертывание крови, проницаемость клеточных мембран, активность ряда ферментов и т.д. Поэтому любые изменения этих процессов, обусловленные длительным недостатком кальция в пище или нарушением его всасывания в кишечнике, приводят к усилению синтеза паратгормона, который способствует вымыванию солей кальция (в виде цитратов и фосфатов) из костной ткани и соответственно к деструкции минеральных и органических компонентов костей.



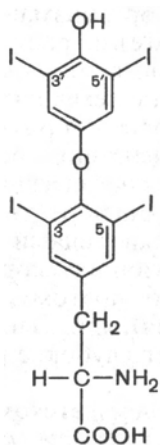


Кальцитонин человека содержит дисульфидный мостик (между 1-м и 7-м аминокислотными остатками) и характеризуется N-концевым цистеином и C-концевым пролинамидом. Кальцитонины быка, овцы, свиньи и лососевых рыб мало отличаются друг от друга как по структуре и концевым аминокислотам, так и по гипокальциемической 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, кальцитриолом и кальцитонином, т.е. гормонами как щитовидной и паращитовидных желез, так и гормоном — производным витамина D<sub>3</sub>. Это следует учитывать при хирургических лечебных манипуляциях на данных железах.

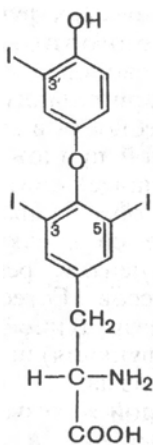
Химическая природа гормонов фолликулярной части щитовидной железы выяснена в деталях сравнительно давно. Считается установленным, что все йодсодержащие гормоны, отличающиеся друг от друга содержанием йода, являются производными L-тироина, который синтезируется в организме из аминокислоты L-тирозина.



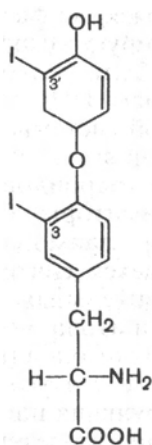
L-тиронин



L-тироксин (3,5,3',5'-тетрайодтиронин)



L-3,5,3'-трийодтиронин



L-3,3'-дйодтиронин

Из L-тироина легко синтезируется гормон щитовидной железы тироксин, содержащий в 4 положениях кольцевой структуры йод. Следует отметить, что гормональной активностью наделены 3,5,3'-трийодтиронин и 3,3'-дйодтиронин, также открытые в щитовидной железе. Биосинтез гормонов щитовидной железы регулируется тиротропином — гормоном гипоталамуса (см. ранее).

В настоящее время еще полностью не изучены ферментные системы, катализирующие промежуточные стадии синтеза этих гормонов, и природа фермента, участвующего в превращении йодидов в свободный йод ( $2\text{I}^- \rightarrow \text{I}_2$ ), необходимый для йодирования 115 остатков тирозина в молекуле тиреоглобулина. Последовательность реакций, связанных с синтезом гормонов щитовидной железы, была расшифрована при помощи радиоактивного йода [ $^{131}\text{I}$ ]. Было показано, что введенный меченый йод прежде всего обнаруживается в молекуле монойодтироина, затем — дйодтироина и только потом — тирокина. Эти данные позволяли предположить, что моно-

йод- и дийодтирозины являются предшественниками тироксина. Однако известно также, что включение йода осуществляется не на уровне свободного тироксина, а на уровне полипептидной цепи тиреоглобулина в процессе его постсинтетической модификации в фолликулярных клетках. Дальнейший гидролиз тиреоглобулина под действием протеиназ и пептидаз приводит к образованию как свободных аминокислот, так и к освобождению йодтиронинов, в частности тироксина, последующее депонирование которого способствует образованию трийодтиронина. Эта точка зрения кажется более правдоподобной с учетом универсальности постсинтетической химической модификации при биосинтезе биологически активных веществ в организме.

Катаболизм гормонов щитовидной железы протекает по двум направлениям: распад гормонов с освобождением йода (в виде йодидов) и дезаминирование (отщепление аминокруппы) боковой цепи гормонов. Продукты обмена или неизменные гормоны экскретируются почками или кишечником. Возможно, что некоторая часть неизмененного тироксина, поступающая 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, гормоны регулируют скорость основного обмена, рост и дифференцировку тканей, обмен белков, углеводов и липидов, водно-электролитный обмен, деятельность ЦНС, пищеварительного тракта, гемопоэз, функцию сердечно-сосудистой системы, потребность в витаминах, сопротивляемость организма инфекциям и др. Точкой приложения действия тиреоидных гормонов, как и всех стероидов (см. далее), считается генетический аппарат. Специфические рецепторы—белки—обеспечивают транспорт тиреоидных гормонов в ядро и взаимодействие со структурными генами, в результате чего 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 *кретинизм*. Помимо остановки роста, специфических изменений кожи, волос, мышц, резкого снижения скорости процессов обмена, при кретинизме отмечаются глубокие нарушения психики; специфическое гормональное лечение в этом случае не дает положительных результатов.

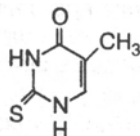
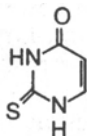
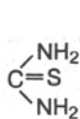
Недостаточная функция щитовидной железы в зрелом возрасте сопровождается развитием *гипотиреоидного отека*, или *микседемы* (от греч. *муха* — слизь, *оедемо*—отек). Это заболевание чаще встречается у женщин и характеризуется нарушением водно-солевого, основного и жирового обмена. У больных отмечаются слизистый отек, патологическое ожирение, резкое снижение основного обмена, выпадение волос и зубов, общие мозговые нарушения и психические расстройства. Кожа становится сухой, температура тела снижается; в крови повышено содержание глюкозы. Гипотиреоидизм сравнительно легко поддается лечению препаратами щитовидной железы.

Следует отметить еще одно поражение щитовидной железы—*эндемический зоб*. Болезнь обычно развивается у лиц, проживающих в горных местностях, где содержание йода в воде и растениях недостаточно. 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 функций организма, хотя увеличенная в размерах щитовидная железа создает определенные неудобства. Лечение сводится к обогащению продуктов питания, в частности поваренной соли, неорганическим йодом.

Повышенная функция щитовидной железы (гиперфункция) вызывает развитие *гипертиреоза*, 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 отмечаются общее истощение организма, а также психические расстройства.

При гиперфункции щитовидной железы и, в частности, токсическом зобе показано оперативное удаление всей железы или введение  $^{131}\text{I}$  ( $\beta$ - и  $\gamma$ -излучение частично разрушает ткань железы) и антагонистов тироксина, тормозящих синтез тиреоидных гормонов. К подобным веществам относятся, например, тиомочевина, тиоурацил (или метилтиоурацил).



Тиомочевина    Тиоурацил    Метилтиоурацил

Снижают функцию щитовидной железы тиоцианат и вещества, содержащие аминокбензольную группу, а также микродозы йода. Механизм действия антигипертиреозных веществ 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. Внешнесекреторная функция ее заключается в синтезе ряда ключевых ферментов пищеварения, в частности амилазы, липазы, трипсина, химотрипсина, карбоксипептидазы и др., поступающих в кишечник с соком поджелудочной железы. Внутрисекреторную функцию выполняют, как было установлено в 1902 г. Л.В. Соболевым, панкреатические островки (островки Лангерганса), состоящие из клеток разного типа и вырабатывающие гормоны, как правило, противоположного действия. Так,  $\alpha$ - (или А-) клетки продуцируют глюкагон,  $\beta$ - (или В-) клетки синтезируют инсулин,  $\delta$ - (или D-) клетки вырабатывают соматостатин и F-клетки – малоизученный панкреатический полипептид. Далее будут рассмотрены инсулин и глюкагон как гормоны, имеющие исключительно важное значение для жизнедеятельности организма\*.

\* Имеющиеся данные о соматостатине как о гормоне гипоталамуса (см. ранее) свидетельствуют, что в поджелудочной железе и в ряде клеток кишечника секретируется свой соматостатин, оказывающий ингибирующий эффект на секрецию инсулина и глюкагона  $\alpha$ - и  $\beta$ -клетками островков Лангерганса.

## Инсулин

Инсулин, получивший свое название от наименования панкреатических островков (лат. *insula*—островок), был первым белком, первичная структура которого была раскрыта в 1954 г. Ф. Сэнджером (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 аминокислотный остаток, состоит из двух полипептидных цепей, соединенных между собой в двух точках дисульфидными мостиками. Строение инсулина и его предшественника проинсулина приведено 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 от разных животных нет. Инсулины различаются аминокислотным составом цепи А в положениях 8–10.

Согласно современным представлениям, биосинтез инсулина осуществляется в  $\beta$ -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  $\beta$ -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). Длина и первичная структура С-пептида подвержена большим изменениям у разных видов животных, чем последовательность цепей А и В инсулина. Установлено, что исходным предшественником инсулина является препроинсулин, 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. Далее молекула проинсулина также подвергается частичному протеолизу, и под действием трипсиноподобной протеиназы отщепляются по две основные аминокислоты с N- и С-конца пептида С—соответственно дипептиды Арг—Арг и Лиз—Арг (см. рис. 1.14). Однако природа ферментов и тонкие механизмы этого важного биологического процесса—образование активной молекулы инсулина окончательно не выяснены.

Синтезированный из проинсулина инсулин может существовать в нескольких формах, различающихся 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 локали-

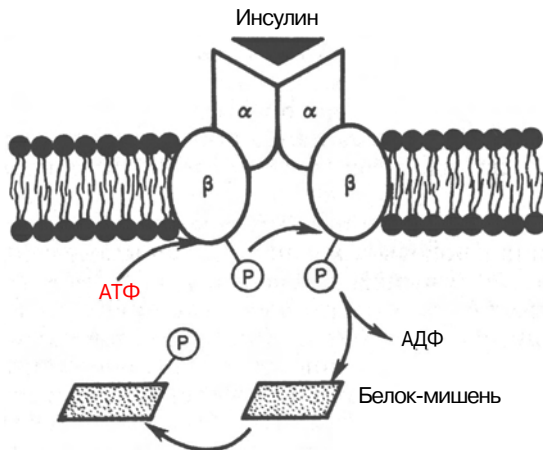
зация ее в белковых фракциях сыворотки крови, в частности в области трансферринов и  $\alpha$ -глобулинов. Молекулярная масса связанного инсулина от 60000 до 100000. Различают, кроме того, так называемую форму А инсулина, отличающуюся от двух предыдущих рядом физико-химических и биологических свойств, 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, а снижение ее содержания, наоборот,— 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. Предполагают, 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— *сахарный диабет* (см. главу 10). Помимо клинически выявляемых симптомов (полиурия, полидипсия и полифагия), сахарный диабет характеризуется рядом специфических нарушений процессов обмена. Так, у больных развиваются гипергликемия (увеличение уровня глюкозы в крови) и гликозурия (выделение глюкозы с мочой, в которой в норме она отсутствует). К расстройству 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 второй форме сахарного диабета, так называемой инсулинрезистентной, имеют место и молекулярные дефекты: в частности, нарушение структуры инсулина или нарушение ферментативного превращения проинсулина в инсулин. В основе развития этой формы диабета часто лежит потеря рецепторами клеток-мишеней способности соединяться с молекулой инсулина, синтез которого нарушен, или синтез мутантного рецептора (см. далее).

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 существовании тесной и прямой 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



**Рис. 8.1.** Инсулиновый рецептор (схема).

Две  $\alpha$ -цепи на наружной поверхности мембраны клетки и две трансмембранные  $\beta$ -цепи. Связывание инсулина с  $\alpha$ -цепями запускает аутофосфорилирование остатков тирозина в  $\beta$ -цепях; активный тирозинкиназный домен затем участвует в фосфорилировании неактивных белков-мишеней в цитозоле.

гексокиназу. Новые экспериментальные данные свидетельствуют, что усиление и стимуляция инсулином таких процессов, как транспорт ионов и аминокислот, трансляция и синтез белка, экспрессия генов и др., 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 почти всех клеток организма, а также образования инсулинрецепторного комплекса. Рецептор синтезируется в виде предшественника – полипептида (1382 аминокислотных остатка, мол. масса 190000), который далее расщепляется на  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы, т.е. на гетеродимер (в формуле  $\alpha_2-\beta_2$ ), связанные дисульфидными связями. Оказалось, что если  $\alpha$ -субъединицы (мол. масса 135000) почти целиком располагаются на внешней стороне биомембраны, выполняя функцию связывания инсулина клетки, то  $\beta$ -субъединицы (мол. масса 95000) представляют собой трансмембранный белок, выполняющий функцию преобразования сигнала (рис. 8.1). Концентрация рецепторов инсулина на поверхности достигает 20000 на клетку, и период их полужизни составляет 7–12 ч.

Самым интересным свойством рецептора инсулина, отличным от всех других рецепторов гормонов белковой и пептидной природы, является его способность аутофосфорилирования, т.е. когда рецептор наделен сам протеинкиназной (тирозинкиназой) активностью. При связывании инсулина с  $\alpha$ -цепями рецептора происходит активирование тирозинкиназной активности  $\beta$ -цепей путем фосфорилирования их тирозиновых остатков. В свою очередь активная тирозинкиназа  $\beta$ -цепей запускает каскад фосфорилирования–дефосфорилирования протеинкиназ, в частности мембранных или цитозольных серин- или треонинкиназ, т.е. протеинкиназ и белков-мишеней, фосфорилирование в которых осуществляется за счет ОН-групп серина и треонина. Соответственно имеют место изменения клеточной

активности, в частности активация и ингибирование ферментов, транспорт глюкозы, синтез полимерных молекул нуклеиновых кислот и белков и т.д.\*.

Следует подчеркнуть, однако, что тонкие молекулярные механизмы путей передачи сигнала от инсулинрецепторного комплекса на множество внутриклеточных процессов пока не раскрыты. Вполне возможно участие в подобных процессах ряда внутриклеточных вторичных мессенджеров, в частности циклических нуклеотидов, производных фосфатидилинозитолов и др. Нельзя исключить, кроме того, возможности существования внутриклеточного посредника или медиатора действия инсулина (особого внутриклеточного рецептора), контролирующего транскрипцию генов и соответственно синтез мРНК. Предполагают, что действием инсулина и участием в регуляции экспрессии генов или в транскрипции специфических мРНК может быть объяснена его роль в таких фундаментальных процессах жизнедеятельности, как эмбриогенез и дифференцировка клеток высших организмов.

## 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 основном в  $\alpha$ -клетках панкреатических островков поджелудочной железы, а также в ряде клеток кишечника (см. далее). Он представлен одной линейно расположенной полипептидной цепью, в состав которой входит 29 аминокислотных остатков в следующей последовательности:

Н–Гис–Сер–Глн–Гли–Тре–Фен–Тре–Сер–Асп–Тир–Сер–Лиз–Тир–Лей–  
–Асп–Сер–Арг–Арг–Ала–Глн–Асп–Фен–Вал–Глн–Трп–Лей–Мет–Асн–  
–Тре–ОН

Первичная структура глюкагонов человека и животных оказалась идентичной; исключение составляет только глюкагон индюка, у которого вместо аспарагина в положении 28 содержится серин. Особенностью структуры глюкагона является отсутствие дисульфидных связей и цистеина. 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 (мол. масса 9000), структура которого пока не расшифрована.

По биологическому действию глюкагон, как и адреналин, относятся 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

\* Следует указать, что у инсулинрезистентных больных сахарным диабетом синтез инсулина не нарушен, однако организм больных не реагирует ни на свой, ни на инъецированный инсулин. Оказалось, что у части этих больных имеет место мутация в тирозинкиназном домене рецептора и, хотя инсулин связывается нормально с этим мутантным рецептором, дальнейшей передачи сигнала не происходит, так как тирозинкиназа инактивирована. Поэтому лечение больных этой формой диабета инсулином оказывается неэффективным.

ткань, но не скелетные мышцы. Биосинтез и секреция глюкагона контролируются главным образом концентрацией глюкозы по принципу обратной связи. Таким же свойством обладают аминокислоты и свободные жирные кислоты. На секрецию глюкагона оказывают влияние также инсулин и инсулиноподобные факторы роста.

В механизме действия глюкагона первичным является связывание со специфическими рецепторами мембраны клеток\*, образовавшийся глюкагонрецепторный 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 10), в то время как фосфорилирование гликогенсинтазы сопровождается переходом ее в неактивную форму и соответственно блокированием синтеза гликогена. Общим итогом действия глюкагона являются ускорение распада гликогена и торможение его синтеза в печени, что приводит к увеличению концентрации глюкозы в крови.

Гипергликемический эффект глюкагона обусловлен, однако, не только распадом гликогена. Имеются бесспорные доказательства существования глюконеогенетического механизма гипергликемии, вызванной глюкагоном. Установлено, 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, в частности фосфоенолпируваткарбоксикиназы—ключевого фермента этого процесса. Глюкагон в отличие от адреналина тормозит гликолитический распад глюкозы до молочной кислоты, способствуя тем самым гипергликемии. Он активирует опосредованно через цАМФ липазу тканей, оказывая мощный липолитический эффект. Существуют и 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 хромаффинной, или адреналовой, системе и выра-

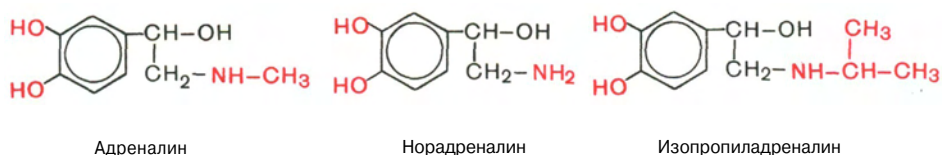
\* Это так называемые глюкагонсвязывающие белки, которые избирательно взаимодействуют только с глюкагоном.



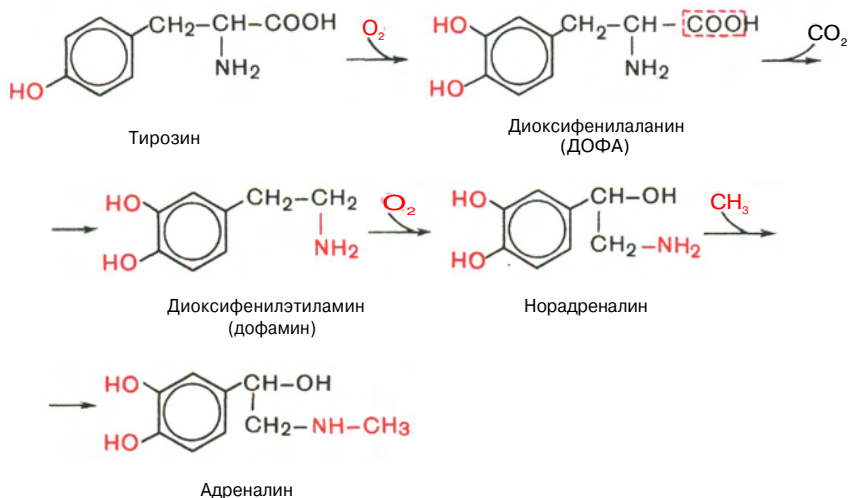
батывает гормоны, которые по приведенной ранее классификации считаются производными аминокислот. Коровое вещество состоит из эпителиальной ткани и секретирует гормоны стероидной природы.

## Гормоны мозгового вещества надпочечников

О способности экстрактов из надпочечников повышать кровяное давление было известно еще в XIX в., однако только в 1901 г. Дж. Такаmine и сотр. выделили из мозгового слоя надпочечников активное начало, идентифицированное с адреналином. Это был первый гормон, полученный в чистом кристаллическом виде. Спустя более 40 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 – изопрропиладреналин. Все указанные гормоны имеют сходное строение.



Эти гормоны по строению напоминают аминокислоту тирозин, от которого они отличаются наличием дополнительных ОН-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 гидроксирования, декарбоксилирования и метилирования с участием соответствующих ферментов (см. главу 12). Биосинтез катехоламинов (адреналин и норадреналин) может быть представлен в виде следующей упрощенной схемы:

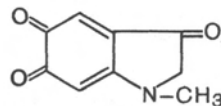


В мозговом веществе надпочечников человека массой 10 г содержится около 5 мг адреналина и 0,5 мг норадреналина. Содержание их в крови составляет соответственно 1,9 и 5,2 нмоль/л. В плазме крови оба гормона присутствуют как в свободном, так и в связанном, в частности, с альбуминами состоянии. Небольшие количества обоих гормонов откладываются в виде соли с АТФ в нервных окончаниях, освобождаясь в ответ на их раздражение. Адреналин и норадреналин, как и дофамин (см. структуру), относятся к катехоламинам, т.е. к классу органических веществ, оказывающих сильное биологическое действие. Кроме того, все они оказывают мощное сосудосуживающее действие, вызывая повышение артериального давления, и в этом отношении действие их сходно с действием симпатической нервной системы. Известно мощное регулирующее влияние этих гормонов на обмен углеводов в организме. Так, в частности, адреналин вызывает резкое повышение уровня глюкозы в крови, что обусловлено ускорением распада гликогена в печени под действием фермента фосфорилазы (см. главу 10). Адреналин, как и глюкагон, активирует фосфорилазу не прямо, а через систему аденилатциклаза-цАМФ-протеинкиназа (см. далее). Гипергликемический эффект норадреналина значительно ниже — примерно 5% от действия адреналина. Параллельно отмечаются накопление гексозофосфатов в тканях, в частности в мышцах, уменьшение концентрации неорганического фосфата и повышение уровня ненасыщенных жирных кислот в плазме крови. Имеются данные о торможении окисления глюкозы в тканях под влиянием адреналина. Это действие некоторые авторы связывают с уменьшением скорости проникновения (транспорта) глюкозы внутрь клетки. Механизм действия катехоламинов, включающий  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренергические рецепторы, аденилатциклазную систему и другие факторы, рассмотрен в конце данной главы.

Известно, что и адреналин, и норадреналин быстро разрушаются в организме; 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 изучены, в частности моноаминоксидаза (МАО), определяющая скорость биосинтеза и распада катехоламинов, и катехолметилтрансфераза, катализирующая главный путь превращения адреналина, т.е. *o*-метилирование за счет S-аденозилметионина. Приводим структуру двух конечных продуктов распада катехоламинов:



3-Метокси-4-оксиминдальная кислота



Оксоадренохром

## Гормоны коркового вещества надпочечников

Со второй половины XIX в. известно заболевание, названное бронзовой болезнью, или болезнью Аддисона, по имени автора, впервые описавшего его. Заболевание характеризуется усиленной пигментацией кожи, мышечной

слабостью, расстройством функции пищеварительного тракта, резким нарушением водно-солевого обмена и обмена белков и углеводов. Как установлено, в основе заболевания лежит туберкулезное поражение надпочечников, которое приводит к недостаточности или отсутствию синтеза гормонов в корковом веществе.

При болезни Аддисона расстройства обмена выражаются резким снижением концентрации ионов натрия и хлора и повышением уровня ионов калия в крови и мышцах, потерей воды организмом и снижением уровня глюкозы в крови. Нарушения белкового обмена проявляются снижением синтеза белков из аминокислот и увеличением уровня остаточного азота в крови.

Раньше заболевание считалось неизлечимым и больные, как правило, умирали. После установления этиологии болезни и внедрения в медицинскую практику антибиотиков и специфических средств терапии туберкулеза 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.

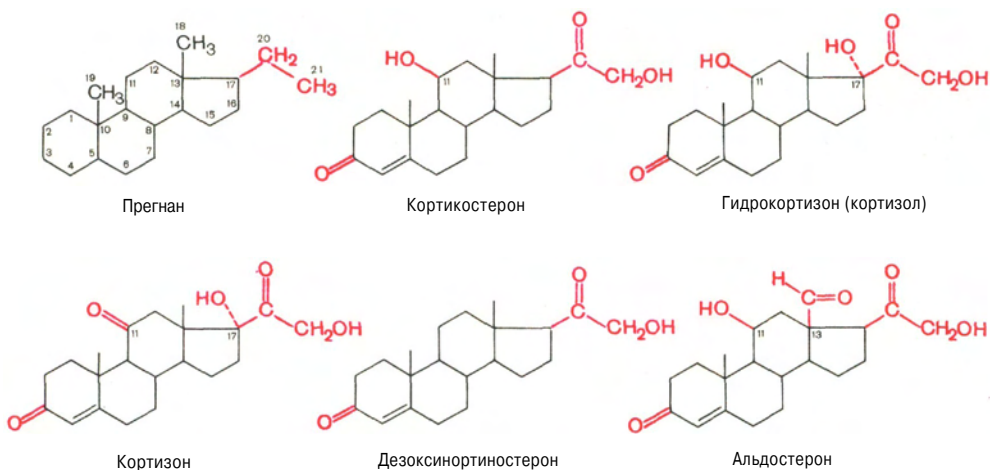
В зависимости от характера биологического эффекта гормоны коркового вещества надпочечников условно делят на глюкокортикоиды (кортикостероиды, оказывающие влияние на обмен углеводов, белков, жиров и нуклеиновых кислот) и минералокортикоиды (кортикостероиды, оказывающие преимущественное влияние на обмен солей и воды)\*. 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 (см. главу 7).

Для гормонов коркового вещества надпочечников, наделенных биологической активностью, общим в строении оказалось наличие 21 углеродного атома; вследствие этого все они являются производными прегнана. Кроме того, для всех биоактивных гормонов коркового вещества надпочечников характерны следующие структурные признаки: наличие двойной связи между 4-м и 5-м углеродными атомами, кетонной группы (C=O) у 3-го углеродного атома, боковая цепь (—CO—CH<sub>2</sub>—ОН) у 17-го углеродного атома.

У человека и большинства животных наиболее распространены 5 гормонов коркового вещества надпочечников.

\* В надпочечниках открыты, кроме того, неспецифические (не свойственные данной ткани) половые гормоны: андро- и эстрокортикостероиды.



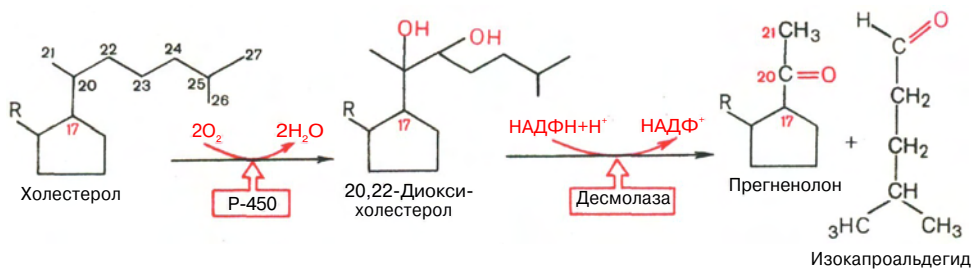
Установлено, что предшественником кортикостероидов является холестерин(ол) и процесс стероидогенеза, как и нормальное гистологическое строение и масса надпочечников, регулируется АКТГ гипофиза. В свою очередь синтез АКТГ в гипофизе, а значит, и кортикостероидов в корковом веществе надпочечников регулируется 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 ткань 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.

Предполагают, что механизмы такого действия стероидов включают проникновение гормона вследствие легкой растворимости в жирах через липидный бислой клеточной мембраны, образование стероидрецепторного комплекса в цитоплазме клетки, последующее преобразование этого комплекса в цитоплазме, быстрый транспорт в ядро и связывание его с хроматином. Считают, 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(ола) в прегненолон, который является предшественником всех стероидных гормонов (рис. 8.2).



**Рис. 8.2.** Биосинтез прегненолона—предшественника стероидных гормонов. R обозначает кольцевые структуры (A, B, C) холестерина.

Ферменты катализируют минимум две последовательные реакции гидроксирования и реакцию отщепления боковой цепи холестерина (в виде альдегида изокапроновой кислоты). В качестве переносчика электронов участвует цитохром P-450 в сложной оксигеназной системе, в которой принимают участие также электронтранспортирующие белки, в частности аденодоксин и аденодоксинредуктаза.

Дальнейшие стадии стероидогенеза также катализируются сложной системой гидроксирования, которая открыта в митохондриях клеток коры надпочечников; последовательность всех этих реакций синтеза стероидных гормонов обобщена в общую схему по Н.А. Юдаеву и С.А. Афиногеновой\*.

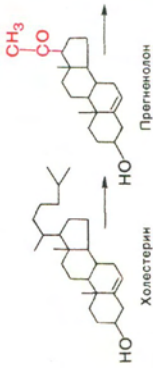
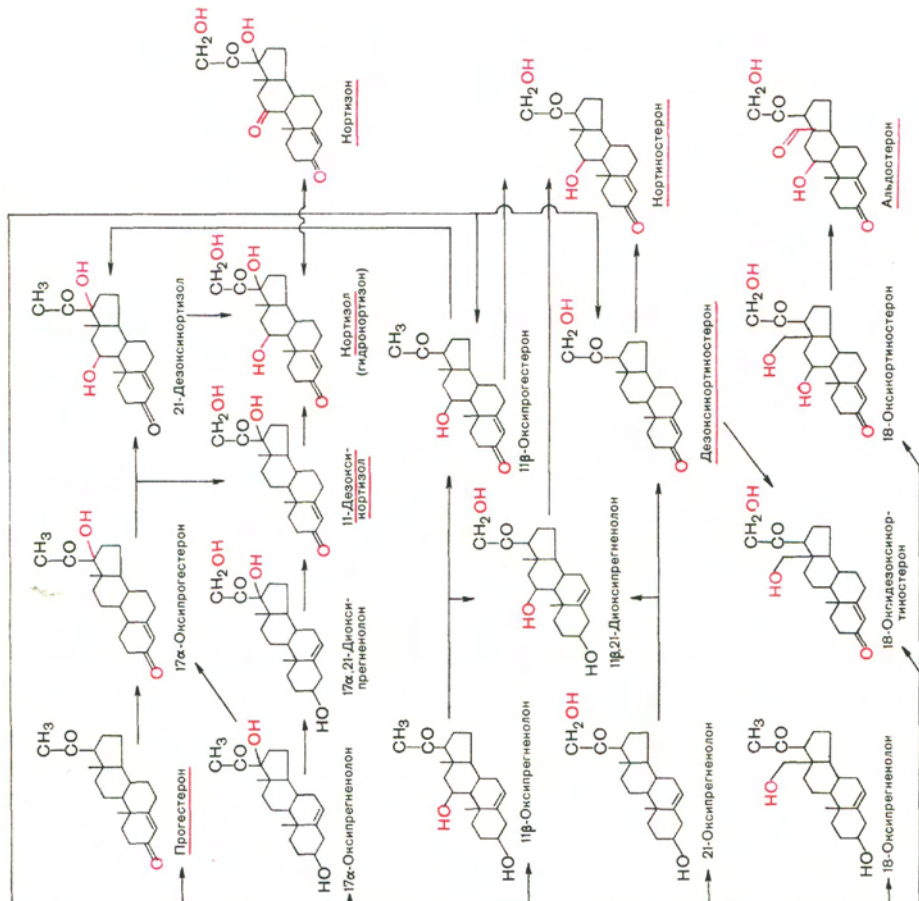
**Глюкокортикоиды** оказывают разностороннее влияние на обмен веществ в разных тканях. В мышечной, лимфатической, соединительной и жировой тканях глюкокортикоиды, проявляя катаболическое действие, вызывают снижение проницаемости клеточных мембран и соответственно торможение поглощения глюкозы и аминокислот; в то же время в печени они оказывают противоположное действие. Конечным итогом воздействия глюкокортикоидов является развитие гипергликемии, обусловленной главным образом глюконеогенезом.

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).

Доказано индуцирующее действие кортизона и гидрокортизона на синтез в ткани печени некоторых белков-ферментов: триптофанпирролазы, тирозинтрансаминазы, серин- и треониндегидратаз и др., 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,

\* При изображении структуры стероидов связь  $\alpha$ -ориентированных заместителей принято изображать штриховой линией, а  $\beta$ -ориентированных заместителей—сплошной, что отражено на схеме.



в частности мочевины. Альдостерон получил свое название на основании наличия в его молекуле альдегидной группы у 13-го углеродного атома вместо метильной группы, как у всех остальных кортикостероидов. Альдостерон — наиболее активный минералокортикоид среди других кортикостероидов; в частности, он в 50—100 раз активнее дезоксикортикостерона по влиянию на минеральный обмен.

Известно, что период полураспада кортикостероидов составляет всего 70—90 мин. Кортикостероиды подвергаются или восстановлению за счет разрыва двойных связей (и присоединения атомов водорода), или окислению, которое сопровождается отщеплением боковой цепи у 17-го углеродного атома, причем в обоих случаях снижается биологическая активность гормонов. Образовавшиеся продукты окисления гормонов коркового вещества надпочечников называются 17-кетостероидами; они выводятся с мочой в качестве конечных продуктов обмена, а у мужчин являются также конечными продуктами обмена мужских половых гормонов. Определение уровня 17-кетостероидов в моче имеет большое клиническое значение. В норме в суточной моче содержится от 10 до 25 мг 17-кетостероидов у мужчин и от 5 до 15 мг — у женщин. Повышенная экскреция их наблюдается, например, при опухолях интерстициальной ткани семенников, тогда как при других тестикулярных опухолях она нормальная. При опухолях коркового вещества надпочечников резко увеличивается экскреция 17-кетостероидов с мочой — 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 отдельным определением  $\alpha$ - и  $\beta$ -17-кетостероидов. Пониженное выделение 17-кетостероидов с мочой отмечается при евнухоидизме, гипофункции передней доли гипофиза. При аддисоновой болезни у мужчин экскреция 17-кетостероидов резко снижена (от 1 до 4 мг/сут), а у женщин при этом заболевании она практически не наблюдается. Этот факт подтверждает отмеченное ранее 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 незначительное 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 происходят 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, в частности кортизона, 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.

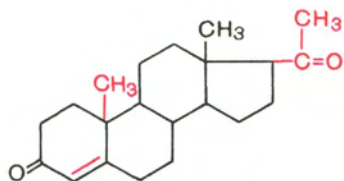
## ПОЛОВЫЕ ГОРМОНЫ

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.

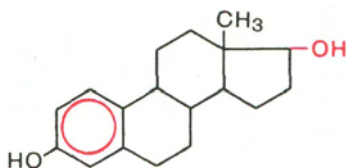
### Женские половые гормоны

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, а в 1929 г. А. Бутенандт и одновременно Э. Дойзи выделили из мочи эстрон, который оказался первым стероидным гормоном, полученным в кристаллическом виде.

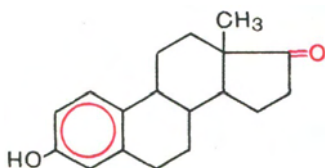
В настоящее время открыты 2 группы женских половых гормонов, различающихся своей химической структурой и биологической функцией: эстрогены (главный представитель — эстрадиол) и прогестины (главный представитель — прогестерон). Приводим химическое строение основных женских половых гормонов:



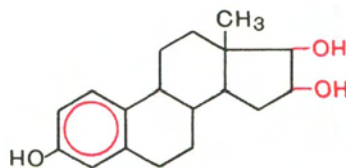
Прогестерон



Эстрадиол



Эстрон



Эстриол



Наиболее активный эстроген — эстрадиол, синтезируется преимущественно в фолликулах; два остальных эстрогена являются производными эстрадиола и синтезируются также в надпочечниках и плаценте. Все эстрогены состоят из 18 атомов углерода. Секрция эстрогенов и прогестерона яичником носит циклический характер, зависящий от фазы полового цикла: в первой фазе цикла синтезируются в основном эстрогены, а во второй — преимущественно прогестерон.

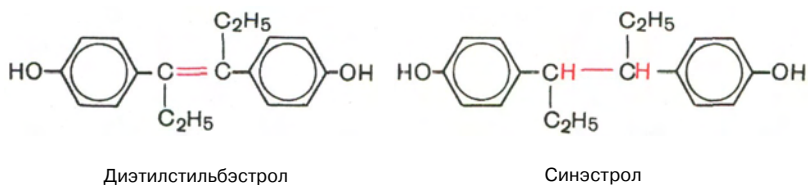
Предшественником этих гормонов, как и кортикостероидов, в организме является холестерин, который подвергается последовательным реакциям гидроксирования, окисления и отщепления боковой цепи с образованием прегненолона. Завершается синтез эстрогенов уникальной реакцией ароматизации первого кольца, катализируемой ферментным комплексом микросом ароматазой. Предполагают, что процесс ароматизации включает минимум три окислительные реакции и все они зависят от цитохрома Р-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 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 осуществляется только в тканях плода.

Ведущую роль в регуляции синтеза эстрогенов и прогестерона играют гонадотропные гормоны гипофиза (фоллитропин и лютропин), которые опосредованно, через рецепторы клеток яичника и систему аденилатциклаза — цАМФ и, вероятнее всего, 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, а при наступлении беременности основная роль — сохранение беременности; 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 выделяется преимущественно 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.

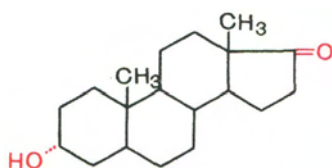
В медицинской практике широкое применение получили природные гормоны и синтетические препараты, обладающие эстрогенной активностью, которые в отличие от первых не разрушаются в пищеварительном тракте. К синтетическим эстрогенам относятся диэтилстильбэстрол и синэстрол, являющиеся производными углеводорода стилибена.



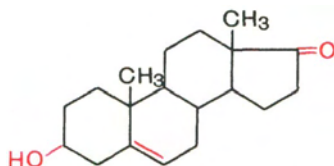
Оба этих препарата и ряд других производных стильбена нашли также применение в онкологической практике: они тормозят рост опухоли предстательной железы.

## Мужские половые гормоны

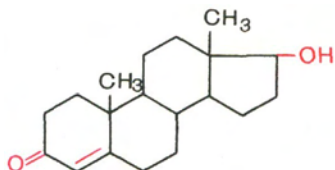
Внутрисекреторная функция мужских половых желез была установлена в 1849 г., однако только в 1931 г. А. Бутенандтом из мочи мужчин был выделен гормон в кристаллическом виде, который оказывал стимулирующее действие на рост петушиного гребня каплунов. Этот гормон был назван андростероном (от греч. andros—мужчина, а предложенная его химическая структура 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 (состоят 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:



Андростерон



Дегидроэпиандростерон



Тестостерон

Андрогены в отличие от эстрогенов имеют две ангулярные метильные группы (у  $C_{10}$ - и  $C_{13}$ -атомов); в противоположность ароматическому характеру кольца А эстрогенов тестостерон, кроме того, содержит кетонную группу (как и кортикостероиды).

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 от стадии холестерина включает несколько последовательных ферментативных реакций через прегненолон и 17- $\alpha$ -оксипрегненолон (см. ранее). 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 других тканей, определяя характер секреции гонадотропных гормонов у взрослых. Во взрослом организме андрогены регулируют развитие мужских вторичных половых признаков, сперматогенез в семенниках и т.д. Следует отметить, что андрогены оказывают значительное анаболическое действие, выражающееся в стимуляции синтеза белка во всех тканях\*, но в большей степени в мышцах. Для реализации анаболического эффекта андрогенов необходимым условием является присутствие соматотропина. Имеются данные, свидетельствующие об участии андрогенов 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. ранее). 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 увеличивается экскреция с мочой гидроксильированных форм андрогенов при эквивалентном снижении выделения классических форм 17-кетостероидов. Следует указать также на возможность образования 17-кетостероидов из тестостерона у женщин. Отмечен высокий уровень частоты рака молочных 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

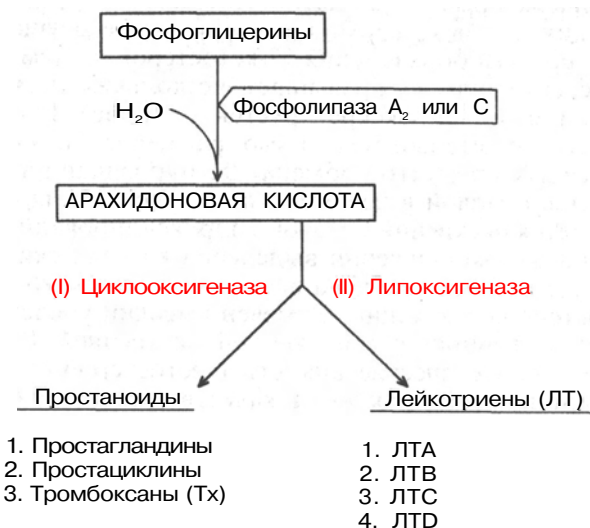
Термин «простагландины» был введен У. Эйлером, впервые показавшим, что в сперме человека и экстрактах из семенных пузырьков барана содержатся вещества, оказывающие выраженное вазопрессорное действие и вызывающие сокращение гладкой мускулатуры матки. Предположение У. Эйлера, что эти вещества являются специфическим секретом предстательной

\* Исключение составляет только вилочковая железа, на которую андрогены оказывают катаболическое действие.

железы (prostata), не подтвердилось, поскольку, как теперь установлено, они содержатся во всех органах и тканях\*. Тем не менее этот термин в литературе сохранился (синонимы: простатогландины, простагландины).

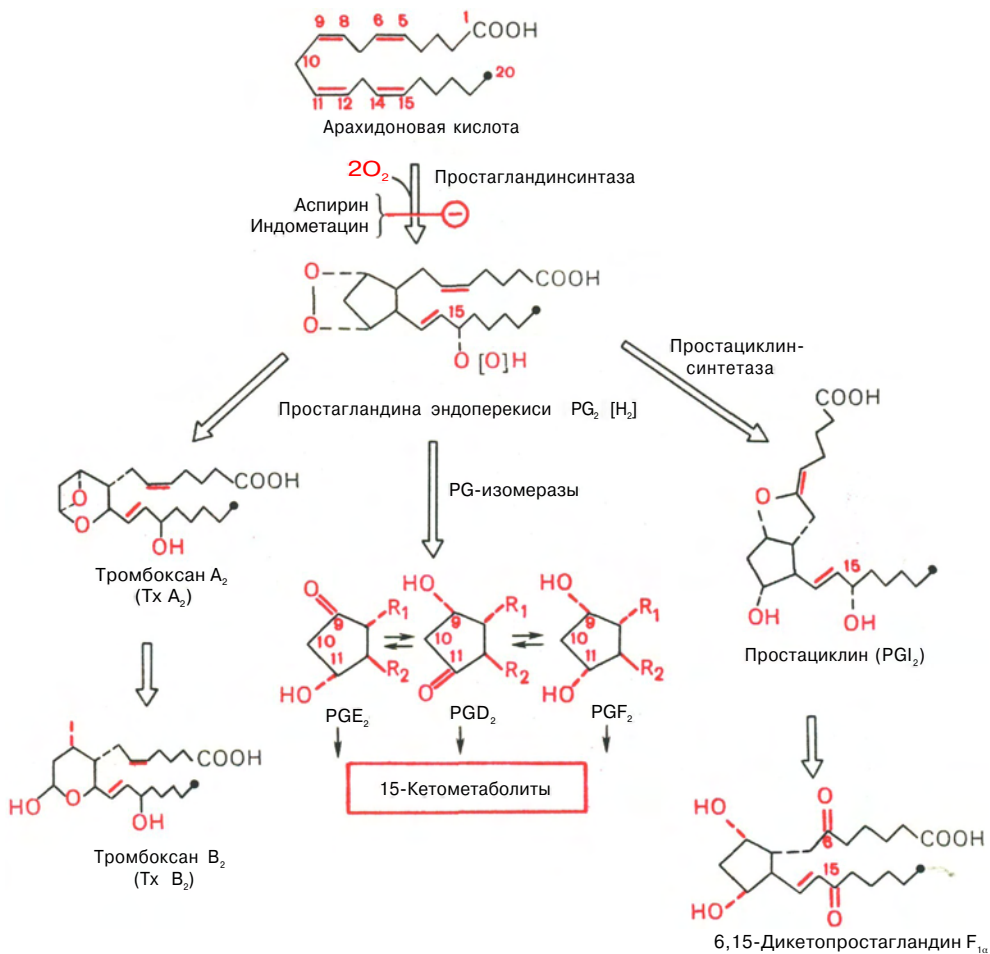
В последнее десятилетие простагландины и родственные им биологически активные соединения (лейкотриены, простацклины, тромбосаны) были предметом пристального внимания исследователей. Объясняется это тем, что, помимо широкого распространения в тканях, они оказывают сильное фармакологическое действие на множество физиологических функций организма, регулируя гемодинамику почек, сократительную функцию гладкой мускулатуры, секреторную функцию желудка, жировой, водно-солевой обмен и др. Имеются данные о том, что простагландины, вероятно, не являются «истинными» гормонами, хотя некоторые авторы считают их «локальными, местными гормонами», однако было показано, что они модулируют действие гормонов. Биологические эффекты простагландинов, по-видимому, опосредованы через циклические нуклеотиды (см. далее).

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- $\gamma$ -линоленовая и пентановая кислоты, в свою очередь образующиеся в организме из линолевой и линоленовой кислот) (см. главу 11). Арахидоновая кислота после освобождения из фосфоглицеринов (фосфолипидов) биомембран под действием специфических фосфолипаз А (или С) в зависимости от ферментативного пути превращения дает начало простагландинам и лейкотриенам по схеме:



Первый путь получил наименование циклооксигеназного пути превращения арахидоновой кислоты, поскольку первые стадии синтеза простагландинов катализируются циклооксигеназой, точнее простагландин-синтазой (КФ 1.14.99.1). В настоящее время известны данные о биосин-

\* 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. 8.3.** Циклооксигеназный путь превращения арахидоновой кислоты.

R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> – боковые цепи, идентичные для всех трех простагландинов. Знаком ⊖ обозначено блокирующее действие указанных веществ.

тезе основных простааноидов (рис. 8.3). Центральным химическим процессом биосинтеза является включение молекулярного кислорода (двух молекул) в структуру арахидоновой кислоты, осуществляемое специфическими оксигеназами, которые, помимо окисления, катализируют циклизацию с образованием промежуточных продуктов – простагландинэндоперекисей PG<sub>2</sub>[H<sub>2</sub>], обозначаемых PGG<sub>2</sub> и PGH<sub>2</sub>; последние под действием простагландин-изомераз превращаются в первичные простагландины. Различают 2 класса первичных простагландинов: растворимые в эфире простагландины PGE и растворимые в фосфатном буфере простагландины PGF. Каждый из классов делится на подклассы: PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>1</sub>, PGF<sub>2</sub> и т.д. Простациклины и тромбоксаны синтезируются из указанных промежуточных продуктов при участии отличных от изомераз ферментов. Детали механизма биосинтеза простааноидов пока до конца не выяснены, как и пути их окисления до конечных продуктов обмена.

Первичные простагландины синтезируются во всех клетках (за исключением эритроцитов), действуют на гладкие мышцы пищеварительного тракта, репродуктивные и респираторные ткани, на тонус сосудов, модулируют активность других гормонов, автономно регулируют нервное возбуждение, процессы воспаления (медиаторы), скорость почечного кровотока; биологическое действие их опосредовано путем регуляции синтеза цАМФ (см. далее).

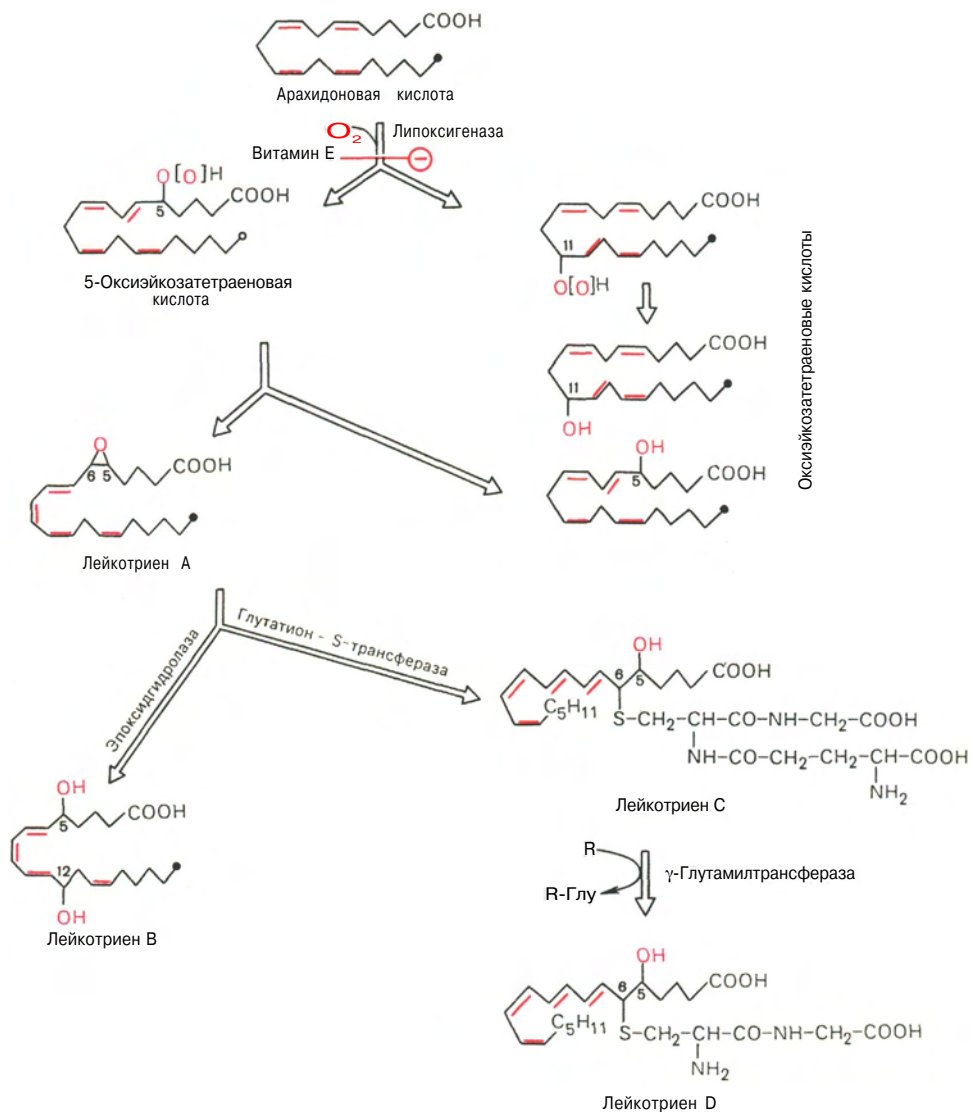
Тромбоксан А<sub>2</sub>, в частности тромбоксан А<sub>2</sub> (ТхА<sub>2</sub>), синтезируется преимущественно в ткани мозга, селезенки, легких, почек, а также в тромбоцитах и воспалительной грануле из РGH<sub>2</sub> под действием тромбоксансинтазы (см. рис. 8.3); из ТхА<sub>2</sub> образуются остальные тромбоксаны. Они вызывают агрегацию тромбоцитов, способствуя тем самым тромбообразованию, и, кроме того, оказывают самое мощное сосудосуживающее действие из всех простагландинов.

Простациклин (PGI<sub>2</sub>) синтезируется преимущественно в эндотелии сосудов, сердечной мышце, ткани матки и слизистой оболочке желудка. Он ослабляет в противоположность тромбоксану гладкие мышечные волокна сосудов и вызывает дезагрегацию тромбоцитов, способствуя фибринолизу.

Следует указать также на особое значение соотношения в крови тромбоксана/простациклины, в частности ТхА<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> 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 баланса ТхА<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> для регуляции функции тромбоцитов *in vivo*, сердечно-сосудистого гомеостаза, тромбоцитарной болезни и т.д.

На рис. 8.3 представлены также пути катаболизма простааноидов. 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 В<sub>2</sub>, или путем окисления дегидрогеназой либо редуктазой. Аналогично PGI<sub>2</sub> (простациклин) быстро распадается до 6-кето-PGF<sub>1α</sub> *in vitro*, а *in vivo* инактивируется окислением 15-оксипростагландиндегидрогеназой с образованием 6,15-ди-кето-PGF<sub>1α</sub>.

Второй путь превращения арахидоновой кислоты — липоксигеназный путь (рис. 8.4) — отличается тем, что дает начало синтезу еще одного класса биологически активных веществ — лейкотриенов. Характерная особенность структуры лейкотриенов заключается в том, что она не содержит циклической структуры, хотя лейкотриены, как и простааноиды, построены из 20 углеродных атомов. В структуре лейкотриенов содержатся четыре двойные связи, 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, пищеварительного тракта, регулируют тонус сосудов (оказывают сосудосуживающее действие) и стимулируют сокращение коронарных артерий. Катаболические пути лейкотриенов окончательно не установлены.



**Рис. 8.4.** Липоксигеназный путь превращения арахидоновой кислоты.  
 R - акцептор остатка глутаминовой кислоты. Знаком  $\ominus$  обозначено блокирующее действие витамина E.

Таким образом, благодаря своему широкому распространению в тканях и высокой и разносторонней биологической активности простагландины (и вообще простаноиды) и лейкотриены находят все более широкое применение в медицинской практике в качестве лекарственных препаратов. Эти обстоятельства стимулируют проведение дальнейших исследований как по пути поиска новых простаноидов, так и по пути химического синтеза их аналогов с защищенными функциональными группами, более стабильными при введении в организм.

## ГОРМОНЫ ВИЛОЧКОВОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ТИМУСА)

Роль тимуса как эндокринной железы известна давно. Известно также, что тимус вскоре после рождения ребенка поставляет лимфоидные клетки в лимфатические узлы и селезенку и осуществляет образование и секрецию специфических гормонов, оказывающих влияние на развитие и созревание определенных клеток лимфоидной ткани. Незвестной, однако, оставалась химическая природа 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 иммунитетов.

К настоящему времени из экстрактов вилочковой железы выделено и охарактеризовано несколько гормонов, в основном представленных низкомолекулярными полипептидами. Они оказывают влияние на различные типы лимфоидных клеток, выполняющих специфические функции. Приводим первичную структуру тимопоэтина II, выделенного из тимуса теленка, который является, по-видимому, основным гормоном, стимулирующим образование Т-лимфоцитов.

Н–Сер–Глн–Фен–Лей–Глу–Асп–Про–Сер–Вал–Лей–Тре–Лиз–Гли–Лиз–Лей–Лиз–  
–Сер–Глу–Лей–Вал–Ала–Асп–Асп–Вал–Тре–Лей–Про–Ала–Гли–Глу–Глн–**Арг–Лиз–**  
**–Асп–Вал–Тир**–Вал–Глн–Лей–Тир–Лей–Глу–Тре–Лей–Тре–Ала–Вал–Лиз–Арг–ОН

Тимопоэтин II состоит из 49 аминокислотных остатков\*. Предполагают, 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 и получил название «тимопентин-5»; при введении в организм он усиливает неспецифические факторы защиты.

Еще одним гормоном, выделенным А. Гольдштейном с сотр. из вилочковой железы теленка, является тимозин  $\alpha_1$  (28 аминокислотных остатков) следующего строения:

Н–Сер–Асп–Ала–Ала–Вал–Асп–Тре–Сер–Сер–Глу–Иле–Тре–Тре–Лиз–  
–Асп–Лей–Лиз–Глу–Лиз–Лиз–Глу–Вал–Вал–Глу–Глу–Ала–Глу–Асп–**ОН**

Предполагают, что тимозин  $\alpha_1$  в организме выполняет регуляторную функцию на поздних стадиях дифференцировки Т-клеток. Показано также, что он оказывает выраженное фармакологическое действие при лечении лейкозов и иммунной недостаточности.

Недавно получен новый гормон тимуса (нонапептид), индуцирующий дифференцировку Т-клеток. Для проявления его биологической активности требуется наличие двухвалентных ионов цинка. Цинксодержащий гормон имеет своеобразную конфигурацию.

Помимо гормонов пептидной природы, из тимуса выделена активная неполярная фракция, сходная по биологическим свойствам со стероидными гормонами, названная тимостерином; природа ее пока не расшифрована.

\* Аналогичный 49-членный гормон недавно выделен из селезенки быка. Он назван спленином (синоним тимопоэтин III) и отличается тем, что в положении 34 вместо Асп содержит Глу.



В данной главе описаны не все известные к настоящему времени гормональные вещества. Так, в шишковидной железе (эпифизе) из аминокислоты триптофана синтезируется интересный, но мало изученный гормон мелатонин. Более 20 биологически активных гормонов выделены из пищеварительного 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 веществом, идентифицированным в качестве гормона). В слизистой оболочке кишечника синтезируется, кроме того, соматостатин. Высказано предположение, что интерстициальные 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 12, 17 или в специальной литературе.

## **МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕДАЧИ ГОРМОНАЛЬНОГО СИГНАЛА**

В этой главе были рассмотрены химическое строение большинства известных гормонов и других биологически активных гормоноподобных веществ, а также клиническая картина недостаточности или гиперпродукции. В ряде случаев приведены биологические эффекты гормонов без детального рассмотрения механизмов регуляции метаболизма. Несмотря на огромное разнообразие гормонов и гормоноподобных веществ, в основе биологического действия большинства гормонов лежат удивительно сходные, почти одинаковые фундаментальные механизмы, передающие информацию от одних клеток к другим. Далее будут представлены примеры механизмов действия гормонов пептидной (включая производные аминокислот) и стероидной природы. В современных представлениях о тонких молекулярных механизмах биологического действия большинства гормонов огромную роль сыграли исследования Э. Сазерленда и открытие циклического аденозинмонофосфата (см. далее).

Известно, что направленность и тонкая регуляция процесса передачи информации обеспечиваются прежде всего наличием на поверхности клеток рецепторных молекул (чаще всего белков), узнающих гормональный сигнал (см. Рецепторы инсулина). Этот сигнал рецепторы трансформируют в изменение концентраций внутриклеточных посредников, получивших название вторичных мессенджеров, уровень которых определяется активностью ферментов, катализирующих их биосинтез и распад.

По своей химической природе рецепторы почти всех биологически активных веществ оказались гликопротеинами, причем «узнающий» домен (участок) рецептора направлен в сторону межклеточного пространства, в то время как участок, ответственный за сопряжение рецептора с эффекторной системой (с ферментом, в частности), находится внутри (в толще) плазматической мембраны. Общим свойством всех рецепторов является их высокая специфичность по отношению к одному определенному гормону (с константой сродства от 0,1 до 10 нМ). Известно также, что сопряжение рецептора с эффекторными системами осуществляется через так называемый G-белок, функция которого заключается в обеспечении многократного проведения гормонального сигнала на уровне плазматической мемб-

раны. G-белок в активированной форме стимулирует через аденилатциклазу синтез циклического АМФ, который запускает каскадный механизм активирования внутриклеточных белков.

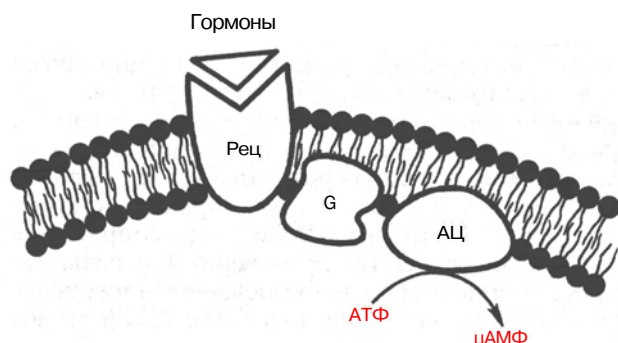
Общим фундаментальным механизмом, посредством которого реализуются биологические эффекты «вторичных» мессенджеров внутри клетки, является процесс фосфорилирования — дефосфорилирования белков при участии широкого разнообразия протеинкиназ, катализирующих транспорт концевой группы от АТФ на ОН-группы серина и треонина, а в ряде случаев — тирозина белков-мишеней. Процесс фосфорилирования представляет собой важнейшую посттрансляционную химическую модификацию белковых молекул, коренным образом изменяющую как их структуру, так и функции. В частности, он вызывает изменение структурных свойств (ассоциацию или диссоциацию составляющих субъединиц), активирование или ингибирование их каталитических свойств, в конечном итоге определяя скорость химических реакций и в целом функциональную активность клеток.

## Аденилатциклазная мессенджерная система

Наиболее изученным является аденилатциклазный путь передачи гормонального сигнала. В нем задействовано минимум пять хорошо изученных белков: 1) рецептор гормона; 2) фермент аденилатциклаза, выполняющая функцию синтеза циклического АМФ (цАМФ); 3) G-белок, осуществляющий связь между аденилатциклазой и рецептором; 4) цАМФ-зависимая протеинкиназа, катализирующая фосфорилирование внутриклеточных ферментов или белков-мишеней, соответственно изменяя их активность; 5) фосфодиэстераза, которая вызывает распад цАМФ и тем самым прекращает (обрывает) действие сигнала (рис. 8.5).

Получены в чистом виде  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренергические рецепторы из плазматических мембран клеток печени, мышц и жировой ткани. Показано, что связывание гормона с  $\beta$ -адренергическим рецептором приводит к структурным изменениям внутриклеточного домена рецептора, что в свою очередь обеспечивает взаимодействие рецептора со вторым белком сигнального пути — ГТФ-связывающим.

ГТФ-связывающий белок — G-белок — представляет собой смесь 2 типов белков: активного  $G_s$  (от англ. stimulatory G) и ингибиторного  $G_i$  с мол. массой 80000–90000. В составе каждого из них имеется три разные субъединицы ( $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -), т.е. это гетеротримеры. Показано, что  $\beta$ -субъединицы  $G_s$  и  $G_i$  идентичны (мол. масса 35000); в то же время  $\alpha$ -субъединицы, являющиеся продуктами разных генов (мол. масса 45000 и 41000), оказались ответственными за проявление G-белком активаторной и ингибитор-

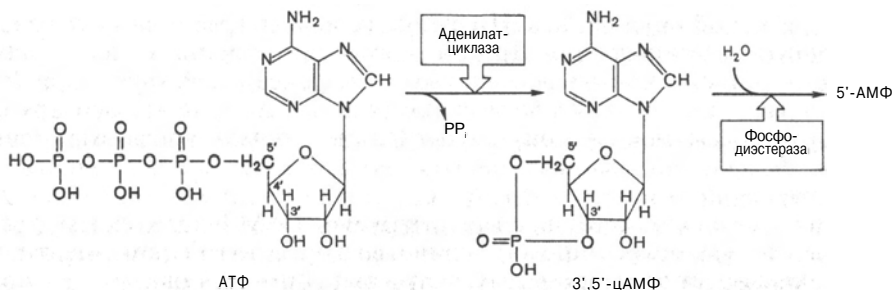


**Рис. 8.5.** Аденилатциклазный путь передачи гормонального сигнала.

Рец - рецептор; G - G-белок; АЦ - аденилатциклаза.

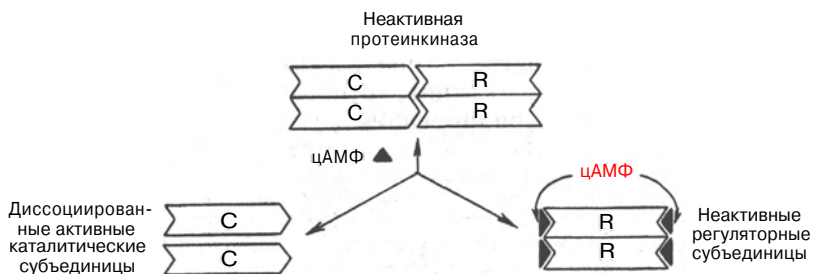
ной активности соответственно. Гормонрецепторный комплекс сообщает G-белку способность не только легко обменивать эндогенный связанный ГДФ на ГТФ, но и переводить  $G_s$ -белок в активированное состояние, при этом активный G-белок диссоциирует в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  на  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицы и комплекс  $\alpha$ -субъединицы  $G_s$  в ГТФ-форме; этот активный комплекс затем перемещается к молекуле аденилатциклазы и активирует ее. Сам комплекс затем подвергается самоинактивации за счет энергии распада ГТФ и реассоциации  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц с образованием первоначальной ГДФ-формы  $G_s$ .

Аденилатциклаза представляет собой интегральный белок плазматических мембран, его активный центр ориентирован в сторону цитоплазмы и катализирует реакцию синтеза цАМФ из АТФ:



Каталитический компонент аденилатциклазы, выделенный из разных тканей животных, представлен одним полипептидом с мол. массой 120000–150000; в отсутствие G-белков он практически неактивен; содержит две SH-группы, одна из которых вовлечена в сопряжение с  $G_s$ -белком, а вторая необходима для проявления каталитической активности. В молекуле фермента имеется несколько аллостерических центров, через которые осуществляется регуляция активности низкомолекулярными соединениями: ионами  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ , аденозином и форсколином. Под действием фосфодиэстеразы цАМФ гидролизуется с образованием неактивного 5'-АМФ.

Протеинкиназа—это внутриклеточный фермент, через который цАМФ реализует свой эффект. Протеинкиназа может существовать в 2 формах. В отсутствие цАМФ Протеинкиназа представлена в виде тетрамерного комплекса, состоящего из двух каталитических ( $C_2$ ) и двух регуляторных ( $R_2$ ) субъединиц с мол. массами 49000 и 38000 соответственно; в этой форме фермент неактивен. В присутствии цАМФ протеинкиназный комплекс обратимо диссоциирует на одну  $R_2$ -субъединицу и две свободные каталитические субъединицы C; последние обладают ферментативной активностью, катализируя фосфорилирование белков и ферментов, соответственно изменяя клеточную активность.



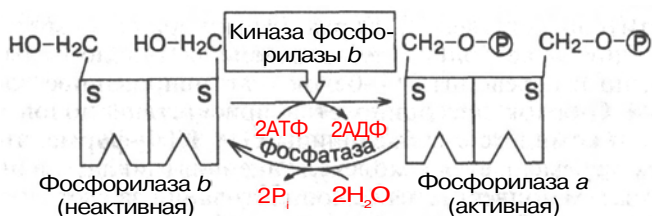


Рис. 8.6. Ковалентная регуляция гликогенфосфорилазы.

Следует отметить, что в клетках открыт большой класс цАМФ-зависимых протеинкиназ\*, названных протеинкиназами А; они катализируют перенос фосфатной группы на ОН-группы серина и треонина (так называемые серин-треонин-киназы). Другой класс протеинкиназ, в частности активируемый инсулиновым рецептором (см. ранее), действует только на ОН-группу тирозина. Однако во всех случаях добавление высокозарядной и объемной фосфатной группы вызывает не только конформационные изменения фосфорилированных белков, но изменяет их активность или кинетические свойства.

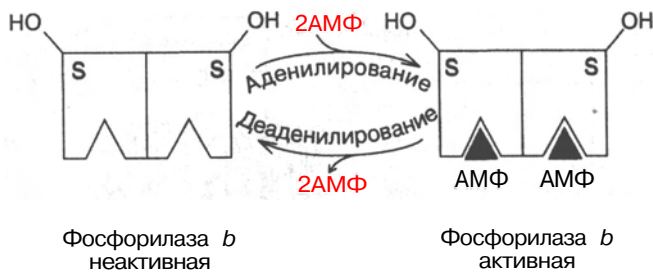
Активность многих ферментов регулируется цАМФ-зависимым фосфорилированием, соответственно большинство гормонов белково-пептидной природы активирует этот процесс. Однако ряд гормонов оказывает тормозящий эффект на аденилатциклазу, соответственно снижая уровень цАМФ и фосфорилирование белков. В частности, гормон соматостатин, соединяясь со своим специфическим рецептором—ингибиторным G-белком ( $G_i$ , являющимся структурным гомологом  $G_s$ -белка (см. ранее), ингибирует аденилатциклазу и синтез цАМФ, т.е. вызывает эффект, прямо противоположный вызываемому адреналином и глюкоагоном. В ряде органов простагландины (в частности,  $PGE_1$ ) также оказывают ингибиторный эффект на аденилатциклазу, хотя в том же органе (в зависимости от типа клеток) и тот же  $PGE_1$  может активировать синтез цАМФ.

Более подробно изучен механизм активирования и регуляции мышечной гликогенфосфорилазы, активирующей распад гликогена. Выделяют 2 формы: каталитически активную—фосфорилаза *a* и неактивную—фосфорилаза *b*. Обе фосфорилазы построены из двух идентичных субъединиц (мол. массой 94500), в каждой остаток серина в положении 14 подвергается процессу фосфорилирования—дефосфорилирования, соответственно активированию и инактивированию (рис. 8.6).

Под действием киназы фосфорилазы *b*, активность которой регулируется цАМФ-зависимой протеинкиназой, обе субъединицы молекулы неактивной формы фосфорилазы *b* подвергаются ковалентному фосфорилированию и превращаются в активную фосфорилазу *a*. Дефосфорилирование последней под действием специфической фосфатазы фосфорилазы *a* приводит к инактивации фермента и возврату в исходное состояние.

В мышечной ткани открыты 3 типа регуляции гликогенфосфорилазы. Первый тип—ковалентная регуляция, основанная на гормонзависимом фосфорилировании—дефосфорилировании субъединиц фосфорилазы (см. рис. 8.6).

\* За открытие класса протеинкиназ и фосфатаз Э. Кребс (Edwin Krebs) и Э. Фишер (Edmund Fischer) в 1992 г. были удостоены Нобелевской премии.



**Рис. 8.7.** Аллостерическая регуляция гликогенфосфорилазы.

Второй тип—аллостерическая регуляция. Она основана на реакциях аденилирования—деаденилирования субъединиц гликогенфосфорилазы *b* (соответственно активирование—инактивирование). Направление реакций определяется отношением концентраций АМФ и АТФ, присоединяющихся не к активному центру, а к аллостерическому центру каждой субъединицы (рис. 8.7).

В работающей мышце накопление АМФ, обусловленное тратой АТФ, вызывает аденилирование и активирование фосфорилазы *b*. В покое, наоборот, высокие концентрации АТФ, вытесняя АМФ, приводят к аллостерическому ингибированию этого фермента путем деаденилирования.

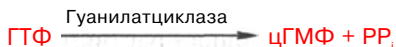
цАМФ и протеинкиназа играют центральную роль в гормональной регуляции синтеза и распада гликогена в печени (рис. 8.8). Подробно о химических превращениях гликогена см. в главе 10\*.

Третий тип—кальциевая регуляция, основанная на аллостерическом активировании киназы фосфорилазы *b* ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , концентрация которых повышается при мышечном сокращении, способствуя тем самым образованию активной фосфорилазы *a*.

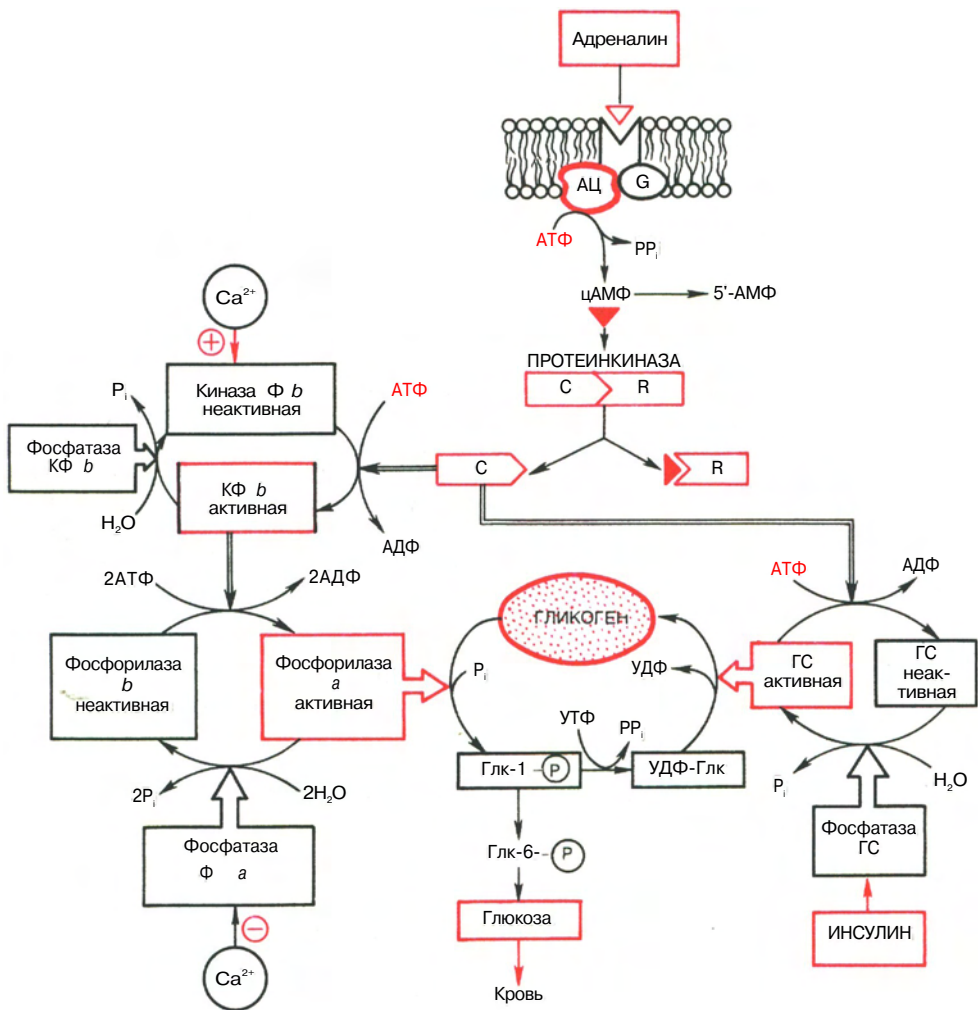
## Гуанилатциклязная мессенджерная система

Довольно долгое время циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) рассматривался как антипод цАМФ. Ему приписывали функции, противоположные цАМФ. К настоящему времени получено много данных, что цГМФ принадлежит самостоятельная роль в регуляции функции клеток. В частности, в почках и кишечнике он контролирует ионный транспорт и обмен воды, в сердечной мышце служит сигналом релаксации и т.д.

Биосинтез цГМФ из ГТФ осуществляется под действием специфической гуанилатциклазы по аналогии с синтезом цАМФ:



\* Гликогенфосфорилаза печени также регулируется гормонами (адреналин и глюкагон) и, кроме того, концентрацией в крови глюкозы, которая оказалась, как и глюкозо-6-фосфат, аллостерическим ингибитором фосфорилазы *a*; связывание глюкозы (когда уровень глюкозы повышается в крови) с аллостерическим участком активной фосфорилазы *a* вызывает ряд конформационных изменений структуры, способствуя активированию фосфатазы фосфорилазы *a* (см. рис. 10.1), соответственно дефосфорилированию фосфорилазы *a* и превращению ее в неактивную фосфорилазу *b*.



**Рис. 8.8.** Схематическое выражение центральной роли цАМФ и протеинкиназы в гормональной регуляции синтеза и распада гликогена.

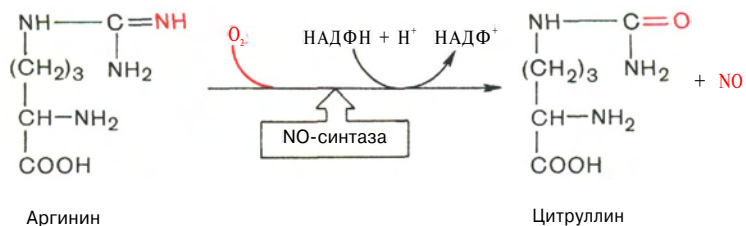
Адреналинрецепторный комплекс: АЦ - аденилатциклаза, G - G-белок; C и R - соответственно каталитические и регуляторные субъединицы протеинкиназы; КФ - киназа фосфорилазы *b* Ф - фосфорилаза; Глк-1-Р - глюкозо-1-фосфат; Глк-6-Р - глюкозо-6-фосфат; УДФ-Глк - уридиндифосфатглюкоза; ГС - гликогенсинтаза.

Известны четыре разные формы гуанилатциклазы, три из которых являются мембраносвязанными и одна – растворимая открыта в цитозоле. Показано, что мембраносвязанные формы (мол. массой ~ 180000) состоят из 3 участков: рецепторного, локализованного на внешней поверхности плазматической мембраны; внутримембранного домена и каталитического компонента, одинакового у разных форм фермента. Гуанилатциклаза открыта во многих органах (сердце, легкие, почки, надпочечники, эндотелий кишечника, сетчатка и др.), что свидетельствует о широком ее участии в регуляции внутриклеточного метаболизма, опосредованном через цГМФ. Мембраносвязанный фермент активируется через соответствующие рецеп-

торы короткими внеклеточными пептидами (18–20 аминокислотных остатков), в частности гормоном предсердным натрийуретическим пептидом (АНФ), термостабильным токсинном грамотрицательных бактерий и др. АНФ, как известно, синтезируется в предсердии в ответ на увеличение объема крови, поступает с кровью в почки, активирует гуанилатциклазу (соответственно повышает уровень цГМФ), способствуя экскреции Na и воды. Гладкие мышечные клетки сосудов также содержат аналогичную рецептор-гуанилатциклазную систему, посредством которой связанный с рецептором АНФ оказывает сосудорасширяющее действие, способствуя снижению кровяного давления. В эпителиальных клетках кишечника активатором рецептор-гуанилатциклазной системы может служить бактериальный эндотоксин, который приводит к замедлению всасывания воды в кишечнике и развитию диареи.

Растворимая форма гуанилатциклазы (мол. масса 152000) является гемсодержащим ферментом, состоящим из 2 субъединиц. В регуляции этой формы гуанилатциклазы принимают участие нитровазодилаторы, свободные радикалы – продукты перекисного окисления липидов. Одним из хорошо известных активаторов является эндотелиальный фактор (EDRF), вызывающий релаксацию сосудов. Действующим компонентом, естественным лигандом, этого фактора служит оксид азота NO. Эта форма фермента активируется также некоторыми нитровазодилаторами (нитроглицерин, нитропруссид и др.), используемыми при болезнях сердца; при распаде этих препаратов также освобождается NO.

Оксид азота образуется из аминокислоты аргинина при участии сложной  $Ca^{2+}$ -зависимой ферментной системы со смешанной функцией, названной NO-синтазой:



Оксид азота при взаимодействии с гемом гуанилатциклазы способствует быстрому образованию цГМФ, который снижает силу сердечных сокращений путем стимулирования ионных насосов, функционирующих при низких концентрациях  $Ca^{2+}$ . Однако действие NO кратковременное, несколько секунд, локализованное – вблизи места его синтеза. Подобный эффект, но более длительный оказывает нитроглицерин, который медленнее освобождает NO.

Получены доказательства, что большинство эффектов цГМФ опосредовано через цГМФ-зависимую протеинкиназу, названную протеинкиназой G. Этот широко распространенный в эукариотических клетках фермент получен в чистом виде (мол. масса 80000). Он состоит из 2 субъединиц – каталитического домена с последовательностью, аналогичной последовательности С-субъединицы протеинкиназы А (цАМФ-зависимой), и регуляторного домена, сходного с R-субъединицей протеинкиназы А (см. ранее). Однако протеинкиназы А и G узнают разные последовательности белков, регулируя соответственно фосфорилирование ОН-группы серина и треони-

на разных внутриклеточных белков и оказывая тем самым разные биологические эффекты.

Уровень циклических нуклеотидов цАМФ и цГМФ в клетке контролируется соответствующими фосфодиэстеразами, катализирующими их гидролиз до 5'-нуклеотидмонофосфатов и различающимися по сродству к цАМФ и цГМФ. Выделены и охарактеризованы растворимая кальмодулинзависимая фосфодиэстераза и мембраносвязанная изоформа, не регулируемая  $\text{Ca}^{2+}$  и кальмодулином.

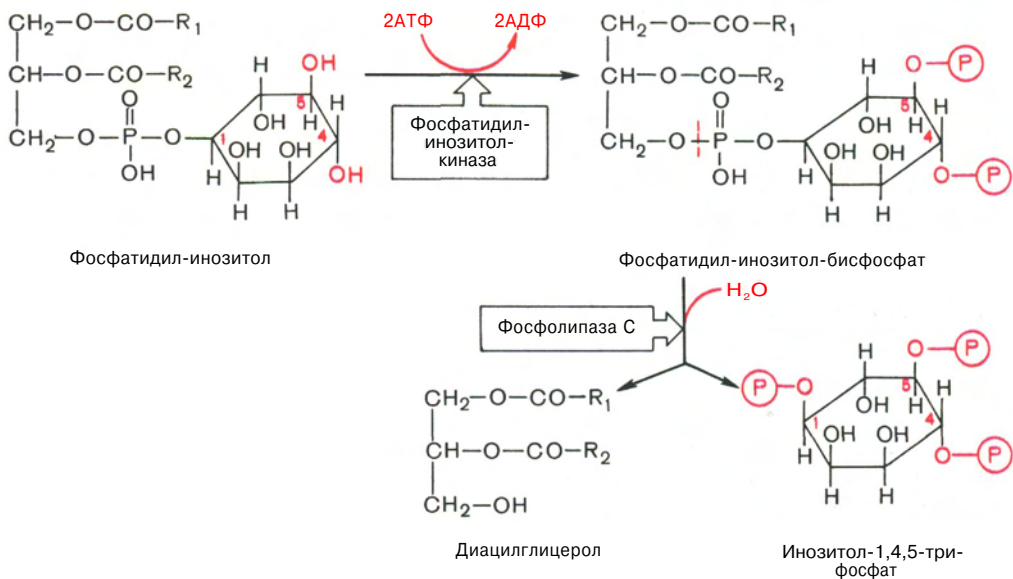
## $\text{Ca}^{2+}$ -мессенджерная система

Ионам  $\text{Ca}^{2+}$  принадлежит центральная роль в регуляции многих клеточных функций. Изменение концентрации внутриклеточного свободного  $\text{Ca}^{2+}$  является сигналом для активации или ингибирования ферментов, которые в свою очередь регулируют метаболизм, сократительную и секреторную активность, адгезию и клеточный рост. Источники  $\text{Ca}^{2+}$  могут быть внутри- и внеклеточными. В норме концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле не превышает  $10^{-7}$  М, и основными источниками его являются эндоплазматический ретикулум и митохондрии. Нейрогормональные сигналы приводят к резкому повышению концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (до  $10^{-6}$  М), поступающего как извне через плазматическую мембрану (точнее, через потенциалзависимые и рецепторзависимые кальциевые каналы), так и из внутриклеточных источников. Одним из важнейших механизмов проведения гормонального сигнала в кальций-мессенджерной системе является запуск клеточных реакций (ответов) путем активирования специфической  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулинзависимой протеинкиназы. Регуляторной субъединицей этого фермента оказался  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий белок кальмодулин (мол. масса 17000). При повышении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке в ответ на поступающие сигналы специфическая протеинкиназа катализирует фосфорилирование множества внутриклеточных ферментов-мишеней, регулируя тем самым их активность. Показано, что в состав киназы фосфорилазы *b*, активируемой ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , как и NO-синтазы, входит кальмодулин в качестве субъединицы. Кальмодулин является частью множества других  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков. При повышении концентрации кальция связывание  $\text{Ca}^{2+}$  с кальмодулином сопровождается конформационными его изменениями, и в этой  $\text{Ca}^{2+}$ -связанной форме кальмодулин модулирует активность множества внутриклеточных белков (отсюда его название).

К внутриклеточной системе мессенджеров относят также производные фосфолипидов мембран эукариотических клеток, в частности фосфорилированные производные фосфатидилинозитола. Эти производные освобождаются в ответ на гормональный сигнал (например, от вазопрессина или тиротропина) под действием специфической мембраносвязанной фосфолипазы С. В результате последовательных реакций образуются два потенциальных вторичных мессенджера—диацилглицерол и инозитол-1,4,5-трифосфат.

Биологические эффекты этих вторичных мессенджеров реализуются по-разному. Действие диацилглицерола, как и свободных ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , опосредовано через мембраносвязанный Са-зависимый фермент протеинкиназу С, которая катализирует фосфорилирование внутриклеточных ферментов, изменяя их активность. Инозитол-1,4,5-трифосфат связывается со специфическим рецептором на эндоплазматическом ретикулуме, способствуя выходу из него ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль.





Таким образом, представленные данные о вторичных мессенджерах свидетельствуют о том, что каждой из этих систем посредников гормонального эффекта соответствует определенный класс протеинкиназ, хотя нельзя исключить возможности существования тесной связи между этими системами. Активность протеинкиназ типа А регулируется цАМФ, протеинкиназы G – цГМФ; Ca<sup>2+</sup>-кальмодулинзависимые протеинкиназы находятся под контролем внутриклеточной [Ca<sup>2+</sup>], а протеинкиназа типа С регулируется диацилглицеролом в синергизме со свободным Ca<sup>2+</sup> и кислыми фосфолипидами. Повышение уровня какого-либо вторичного мессенджера приводит к активации соответствующего класса протеинкиназ и последующему фосфорилированию их белковых субстратов. В результате меняется не только активность, но и регуляторные и каталитические свойства многих ферментных систем клетки: ионных каналов, внутриклеточных структурных элементов и генетического аппарата.

Известно, что эффект стероидных гормонов реализуется через генетический аппарат путем изменения экспрессии генов. Гормон после доставки с белками крови в клетку проникает (путем диффузии) через плазматическую мембрану и далее через ядерную мембрану и связывается с внутриядерным рецептором – белком. Комплекс стероид – белок затем связывается с регуляторной областью ДНК, с так называемыми гормончувствительными элементами, способствуя транскрипции соответствующих структурных генов, индукции синтеза белка de novo (см. главу 14) и изменению метаболизма клетки в ответ на гормональный сигнал.

Следует подчеркнуть, что главной и отличительной особенностью молекулярных механизмов действия двух основных классов гормонов является то, что действие пептидных гормонов реализуется в основном путем посттрансляционных (постсинтетических) модификаций белков в клетках, в то время как стероидные гормоны (а также тиреоидные гормоны, ретиноиды, витамин D<sub>3</sub>-гормоны) выступают в качестве регуляторов экспрессии генов. Это обобщение, однако, не является абсолютным, и здесь возможны модификации, рассмотренные при описании отдельных гормонов.

## Глава 9

# БИОМЕМБРАНЫ И БИОЭНЕРГЕТИКА

### ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ БИОМЕМБРАН

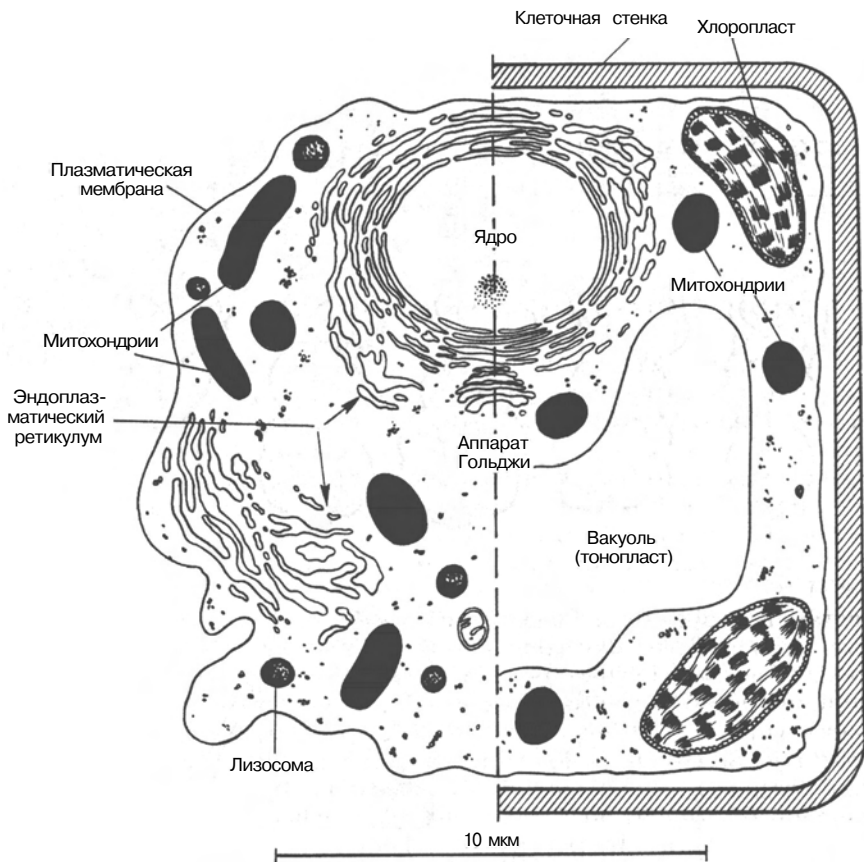
Все клетки отграничены друг от друга и от окружающей среды с помощью специальной оболочки—клеточной мембраны. Со времен К. Негели, описавшего в 1855 г. структуру мембран, окружающих живые клетки, представления об устройстве и функциях мембран существенно обогатились. Клеточная мембрана во многом определяет свойства, поведение и даже форму клетки. Мембраны прокариот и эукариот различаются между собой по составу и свойствам. Растительные и животные клетки также отличаются друг от друга как по набору органелл, так и по свойствам мембран (рис. 9.1).

**Состав и строение биологических мембран.** Биологические мембраны состоят из белков и липидов. Углеводы присутствуют лишь в качестве составных частей сложных белков (гликопротеинов) и сложных липидов (гликолипидов). Нуклеиновые кислоты в небольшом количестве бывают ассоциированы с мембранами, но в состав мембранных структур не включаются. Вода составляет 20% от мембранного материала, а отношение белок/липид в зависимости от вида мембран колеблется от 0,25 (клетки миелоновой оболочки) до 3,0 (митохондриальные мембраны).

**Липиды** мембран представлены четырьмя основными группами: фосфолипидами (основная доля), сфинголипидами, гликолипидами и стероидами. Фосфолипиды—это сложные эфиры фосфатидной кислоты. Основными фосфолипидами являются фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит и фосфатидилхолин. В состав фосфолипидов входят также дифосфатидилглицерины (кардиолипин), плазмалогены (1-О-алкенил-2-О ацилфосфолипиды) и диольные фосфолипиды. Сфинголипиды, которые являются производными церамида и монофосфорных эфиров различных спиртов, представлены в основном сфингомиелином. Гликолипиды—гликозильные производные церамида—представлены как нейтральными цереброзидами, так и их кислыми сульфозифирами—сульфатидами. Производные церамида и нейраминовой кислоты—ганглиозиды—часто выделяют в отдельную группу липидов—гликосфинголипиды. Стероиды представлены холестерином (в мембранах животных клеток), ситостерином (в растительных клетках) и тетрахименином (обнаружен у тетрахимены).

Несмотря на различия в составе, все мембранные липиды построены по единому плану и легко смешиваются друг с другом, образуя монослойные или бислойные структуры (рис. 9.2). В этих структурах реализуется 2 типа взаимодействий: ионные взаимодействия полярных «голов» и гидрофобные взаимодействия жирнокислотных цепей. Благодаря этому мицеллы и липосомы, создаваемые протяженными бислойными структурами, достаточно стабильны в водном окружении.

В наружных (плазматических) мембранах животных клеток обнаруживается большое количество холестерина (около 21 моль%), меньше—фос-

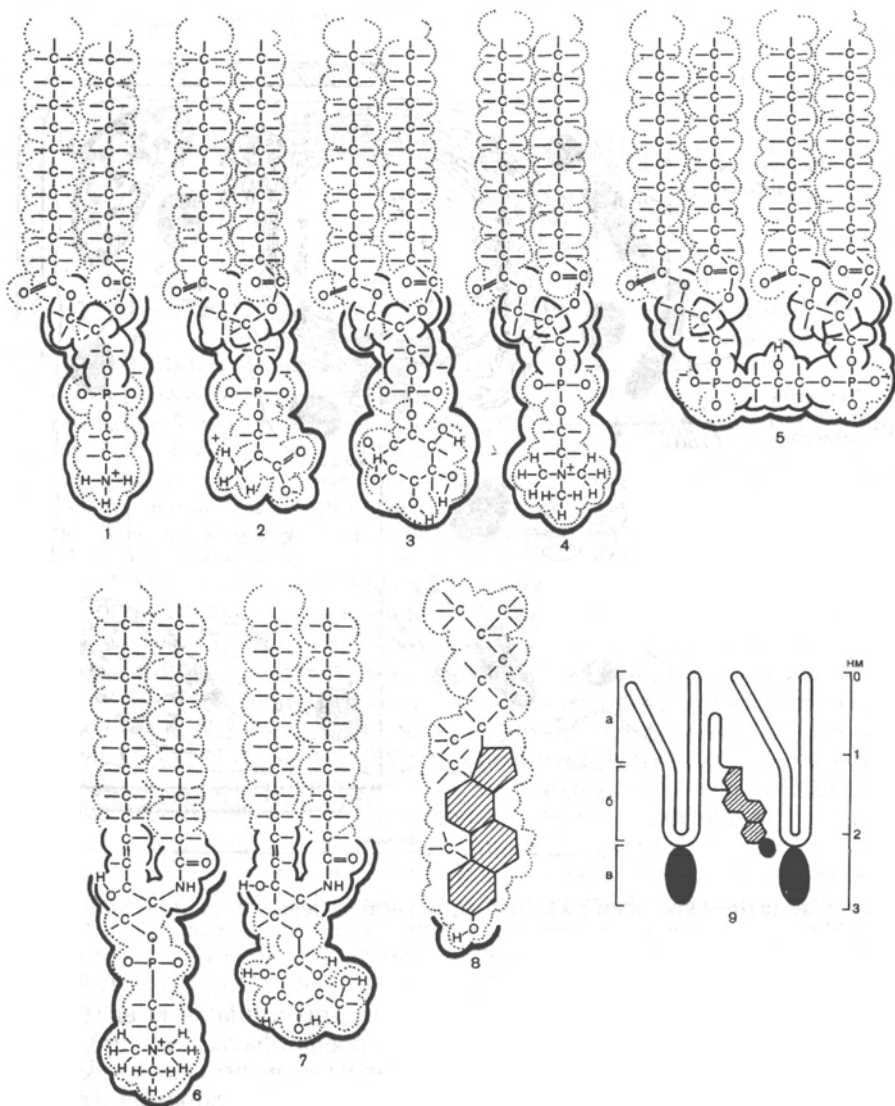


**Рис. 9.1.** Схематическое изображение животной (слева) и растительной (справа) клетки.

фатидилэтаноламина и еще меньше фосфатидилхолина. Для внутриклеточных мембран основным компонентом является фосфатидилхолин, и соотношение фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин в них всегда больше 1.

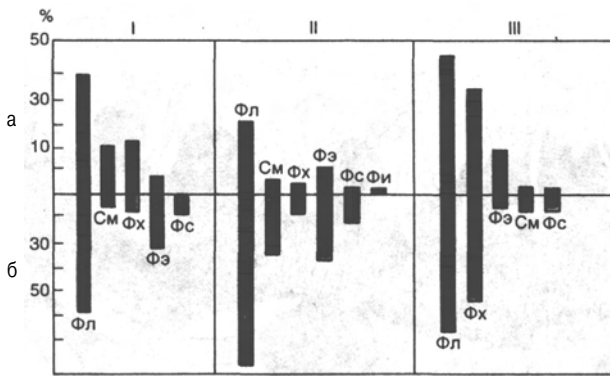
Соотношение основных классов липидов мембран нейронов у различных животных почти не подвержено изменениям. По-видимому, это соотношение сформировалось на самых ранних стадиях эволюции и обеспечивает как стабильность липидного бислоя, так и возможность включения в него белковых молекул. В то же время жирнокислотные компоненты мембранных липидов сильно подвержены эволюционной и сезонной изменчивости.

Жирные кислоты, составляющие «хвост» липидных молекул, представлены насыщенными [от лауриновой ( $C_{12}$ ) до лигноцериновой ( $C_{24}$ )] и ненасыщенными (мононенасыщенные пальмитолеиновая и олеиновая; полиненасыщенные линолевая, линоленовая, арахидоновая) кислотами. У высших растений преобладают пальмитиновая, олеиновая и линолевая кислоты, а стеариновая почти не обнаруживается; в ряде случаев выявляются оксикислоты. В мембранах животных клеток, кроме пальмитиновой и олеиновой, много стеариновой кислоты и больше высокомолекулярных жирных кислот (содержат 20–24 углеродных фрагмента). Жирные кислоты, как



**Рис. 9.2.** Химические формулы распространенных липидов биологических мембран. 1 - фосфатидилэтаноламин; 2 - фосфатидилсерин; 3 - фосфатидилинозит; 4 - фосфатидилхолин; 5 - кардиолипин; 6 - сфингомиелин; 7 - цереброзид; 8 - холестерин; 9 - расположение молекулы холестерина между двумя молекулами фосфолипидов: а - наименее упорядоченная область бислоя, б - область, упорядочиваемая холестерином, в - область полярных «голов». Красным отмечены полярные области молекул.

правило, имеют четное число атомов углерода, но у цереброзидов и ганглиозидов встречаются и нечетные углеводородные остоны. У бактерий полиненасыщенные жирные кислоты практически отсутствуют, но часто имеются разветвленные окси- и циклопропансодержащие кислоты. Для мембран термоацидофильных, галофильных и метанообразующих **архебактерий** характерно наличие нетипичных липидов, содержащих изопреноид-



**Рис. 9.3.** Распределение липидов между наружной (а) и внутренней (б) сторонами бислоя в мембранах эритроцитов (I), вируса гриппа (II) и саркоплазматического ретикулума кролика (III).

Фл - общие фосфолипиды; Фх - фосфатидилхолин; Фэ - фосфатидилэтаноламин; Фс - фосфатидилсерин; См - сфингомиелин; Фи - фосфатидилинозит.

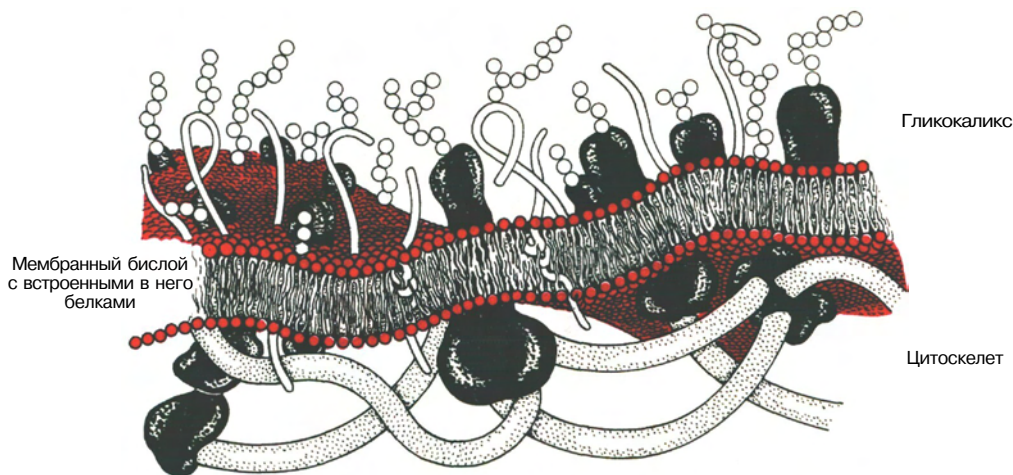
ные цепи, металлические концы которых соединены друг с другом ковалентными связями. Такие «шпильки» обеспечивают повышенную прочность липидного бислоя. (Подробнее о жирных кислотах см. главу 11.)

Липиды в составе бислоя распределяются асимметрично. Это свойство диктуется особенностями строения их молекул: фосфатидилхолину, фосфатидилсерину, сфингомиелину присуща цилиндрическая форма, фосфатидилэтаноламину — форма конуса, а лизофосфолипидам (получаются в результате отщепления от молекулы одной жирнокислотной цепи) — форма перевернутого конуса. Природные мембраны также обладают исходной асимметрией (рис. 9.3).

**Белки** взаимодействуют с мембранным бислоем, в результате чего они либо ассоциируются с поверхностью мембраны — **периферические белки**, либо пересекают бислой один или несколько раз, прочно интегрируясь в него, — это **интегральные белки**. Интеграция оказывается возможной, если в первичной структуре белка имеются достаточно протяженные участки, содержащие гидрофобные аминокислотные последовательности. В таком случае белковые молекулы способны самопроизвольно встраиваться в бислой. При ассоциации рибосом с мембранными структурами встраивание гидрофобных белков в мембрану осуществляется синхронно с их синтезом при участии специальных механизмов, потребляющих энергию АТФ.

Участки белка, которые обращены во внеклеточную среду, могут подвергаться гликозилированию. В мембранах растений и бактерий полисахара играют самостоятельную роль, образуя наружную оболочку. В клетках животных, в которых наружный слой включает углеводы, имеется внутренний **цитоскелет**, состоящий из актина и других легко полимеризующихся белков; он имеет регулярную связь с мембранными белками и выполняет формообразующую и опорную функцию (рис. 9.4).

**Фазовое состояние мембранных липидов.** Мембранные липиды могут находиться в нескольких фазовых состояниях, т. е. они обладают **мезоморфизмом**. Два основных ламеллярных состояния, характерных для мембранных липидов в клеточных системах: кристаллическое и жидкокристаллическое — различаются плотностью упаковки и подвижностью находящихся в бислое белковых молекул. При более плотной упаковке ацильные цепи



**Рис. 9.4.** Схематическое изображение клеточной мембраны.

липидов расположены под углом, близким к  $90^\circ$ , и все С—С-связи находятся в *транс*-конформации (максимально вытянуты). **Фазовый переход** приводит к увеличению подвижности ацильных цепей в бислое, увеличению угла их наклона и уменьшению плотности упаковки. Латеральная подвижность мембранных белков после фазового перехода возрастает, увеличивается вероятность образования их ассоциатов.

В липидном бислое могут также образовываться **гексагональные структуры** (вывернутые мицеллы). При их образовании в мембране возникают дефекты регулярной упаковки, что позволяет проникать через мембрану крупным молекулам, а также обеспечивает обмен компонентами монослоев в бислоидной мембране.

Фазовые переходы мембранных липидов могут быть вызваны изменением температуры среды. Значение температуры, при котором наблюдается фазовый переход, называется **критической температурой фазового перехода**, или **разделения фаз**, если различные участки мембраны вследствие гетерогенности липидного состава по-разному отвечают на изменения температуры. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , изменение числа ненасыщенных жирнокислотных цепей мембранных фосфолипидов и некоторые другие факторы также могут индуцировать фазовые переходы в бислое. Обычно критическая температура фазовых переходов приближена к температуре тела гомойотермных животных (или к температуре среды обитания пойкилотермных животных). Таким образом, достаточно незначительного изменения условий, чтобы изменить упаковку мембраны.

**Специфические свойства биологических мембран.** Благодаря указанным особенностям биологические мембраны имеют присущие им характерные черты. Они образуют протяженные бислоидные структуры малой толщины (6–10 нм), объединяющие белковые и липидные компоненты с различными свойствами.

Целостная структура мембраны создается за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий, а не за счет ковалентных связей между составляющими ее молекулами белков и липидов. Гидрофобный липидный бислой представляет естественную преграду для проникновения полярных молекул. Мембраны асимметричны по своему исходному строению, что

обеспечивает градиент кривизны и спонтанное образование замкнутых структур.

Мембранный бислой обладает относительно малой микровязкостью. Другими словами, мембраны рыхло упакованы, что позволяет отдельным компонентам проявлять высокую подвижность в латеральном направлении.

Наружные мембраны клеток отличаются от внутренних по липидному составу (последние почти не содержат стерина, имеют соотношение ФХ/ФЭ > 1) и обладают специфическим набором ферментов и рецепторов. Как правило, белки плазматических мембран со стороны внеклеточной среды обильно гликозилированы. Внутриклеточные мембраны содержат мало гликопротеинов и гликолипидов и характеризуются меньшей микровязкостью. Благодаря этому они могут образовывать органеллы малого размера. Мембранные белки выполняют различные специфические функции: рецепторные, транспортные, ферментативные, энергопреобразующие и т.д. (см. далее).

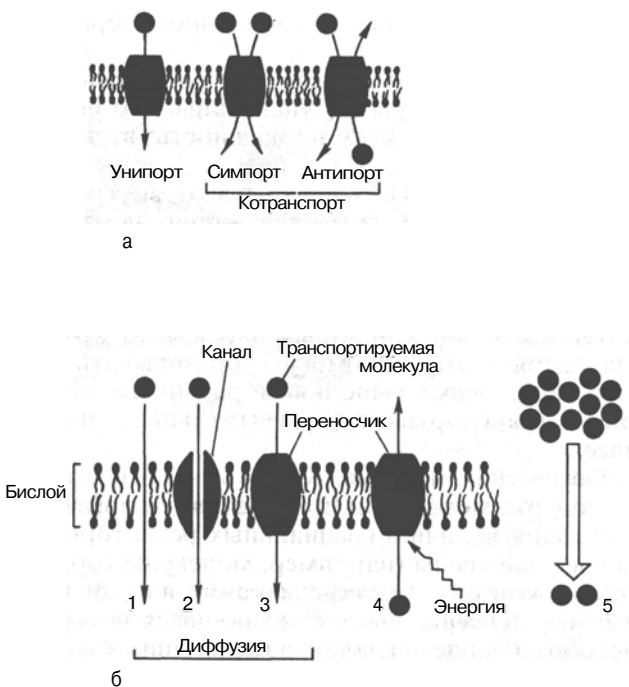
**Функции биологических мембран.** Как отмечалось, клеточные мембраны ограничивают содержимое клетки (или клеточной органеллы) от окружающей среды. Благодаря наличию специальных рецепторов они воспринимают сигналы из внешней среды (например, молекулы гормонов, называемые **первичными мессенджерами**, или **посредниками**), в ответ на которые образуются **вторичные мессенджеры**, высвобождающиеся внутрь клетки. Так осуществляется преобразование сигналов, изменяющих клеточный метаболизм в соответствии с изменяющимися условиями среды (см. главу 8).

**Мембранные рецепторы** выполняют функции узнавания (иммунокомпетентная система), адгезии (обеспечение межклеточных контактов, формирование тканей), регуляции активности ионных каналов (электрическая возбудимость, создание мембранного потенциала). **Мембранные ферменты** в составе бислоя приобретают большую стабильность и способность к осуществлению реакций, которые в гидрофильном окружении протекали бы с весьма малой скоростью. Липидное окружение предоставляет таким белкам «привилегированные» условия функционирования, но и накладывает ограничения на поведение белковых ассоциатов: последнее сильно зависит от плотности упаковки (микровязкости) мембран. Поэтому факторы, влияющие на липидный состав и свойства клеточной мембраны, оказывают регулирующее влияние на функции мембранных белков.

Мембранные белки часто образуют **олигомерные ансамбли**, взаимодействия между которыми (или длительность их существования в бислое) оказываются под контролем их мембранного окружения. Изменения микровязкости мембран в таком случае позволяют контролировать активность этих надмолекулярных структур.

**Транспортная функция** является одной из важных функций клеточных мембран (рис. 9.5). Мембрана создает существенные ограничения для проникновения различных веществ, однако она не является полностью непроницаемой: небольшие нейтральные молекулы могут проникать через бислой в области структурных дефектов. Этот процесс осуществляется по градиенту концентрации переносимого вещества - из области, где его содержание высоко, в область с более низким содержанием. Такой процесс называется **простой диффузией**, он осуществляется неизбирательно и с низкой скоростью.

При **облегченной диффузии** вещества также переносятся в направлении их концентрационного градиента, но с использованием специальных структур - переносчиков или каналов, увеличивающих скорость и специфичность переноса. Извест-



**Рис. 9.5.** Перенос веществ через мембрану.

а - виды переноса; б - пассивный и активный транспорт: 1 - пассивная диффузия; 2 - диффузия с помощью канала; 3 - диффузия с помощью переносчика; 4 - активный транспорт; 5 - вторично-активный транспорт.

ны высокоспецифические **транслоказы** - белковые молекулы, переносящие адениловые нуклеотиды через внутреннюю мембрану митохондрий:  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник - белок, входящий в состав плазматических мембран многих клеток; низкомолекулярный пептид бактериального происхождения валиномицин - специфический переносчик для ионов  $\text{K}^+$ .

Облегченная диффузия, осуществляемая с помощью каналов, не обладает высокой специфичностью (специфичность определяется лишь размерами канала), но протекает с большей скоростью, а процесс переноса не достигает насыщения в широком диапазоне концентраций переносимого вещества. Функционирование каналов в меньшей степени зависит от фазового состояния мембраны, чем функционирование переносчиков. Все эти примеры относятся к **пассивному транспорту** через мембрану.

**Активный транспорт** веществ осуществляется такими же механизмами, но протекает против концентрационного градиента и для своего осуществления должен быть сопряжен с энергодающим процессом. Основным источником энергии для активного транспорта является АТФ. Поэтому, как правило, эти системы представляют собой АТФазы. Примером систем активного транспорта ионов является  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза плазматических мембран животных клеток, которая «выкачивает» из клетки ионы натрия в обмен на ионы калия, затрачивая на выполнение этой работы АТФ в стехиометрии  $3\text{Na}^+/2\text{K}^+/1\text{АТФ}$ .  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза осуществляет активный транспорт кальция через мембрану со стехиометрией  $2\text{Ca}^{2+}/1\text{АТФ}$ .

В так называемых сопрягающих мембранах имеются протонные насосы, работающие как  $\text{H}^+$ -АТФазы. В результате их функционирования на мембране



возникает разность концентраций протонов ( $\Delta pH$ ) и разность электрических потенциалов, в совокупности образующие протонный электрохимический потенциал, обозначаемый  $\Delta\mu H^+$  (см. далее). За счет работы  $H^+$ -АТФазы создается кислая среда в некоторых органеллах клетки (например, лизосомах, хромаффинных клетках надпочечников). В митохондриальной мембране  $H^+$ -АТФаза работает в обратном направлении, используя  $\Delta\mu H^+$ , создаваемый в дыхательной цепи, для образования АТФ.

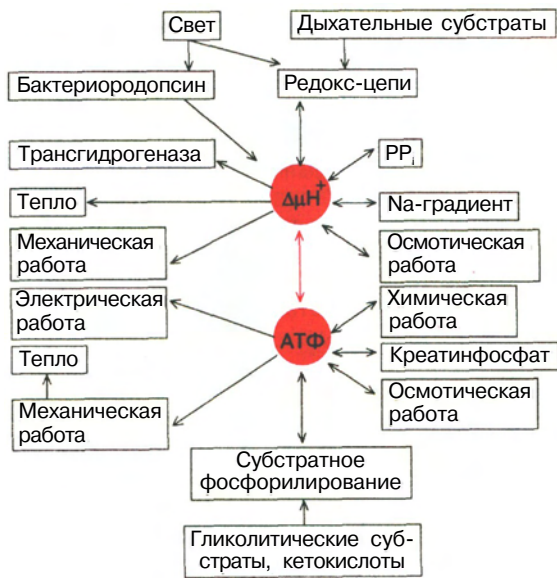
Наконец, в клетках широко представлен **вторично-активный транспорт**, в процессе которого градиент одного вещества используется для транспорта другого. С помощью вторично-активного транспорта клетки аккумулируют сахара, аминокислоты и выводят некоторые продукты метаболизма, используя градиент  $Na^+$ , создаваемый в ходе работы  $Na^+/K^+$ -АТФазы (см. рис. 9.5).

## БИОЭНЕРГЕТИКА

С позиций термодинамики (см. главу 4) метаболизм представляет собой совокупность процессов, в которой реакции, потребляющие энергию из внешней среды (эндэргонические), сопрягаются с энергодающими (экзэргоническими) реакциями, что позволяет живым существам оказывать постоянное сопротивление нарастанию энтропии. Выяснение биохимических механизмов, приводящих к генерации различных форм биологической энергии, является предметом биоэнергетики. Источником энергии служат реакции, в ходе которых соединения, содержащие атомы углерода в высоковосстановленном состоянии, подвергаются окислению, а специальные дыхательные переносчики присоединяют протоны и электроны (восстанавливаясь) и в таком виде транспортируют атомы водорода к дыхательной цепи.

**Биологические виды энергии.** Энергетические превращения в живой клетке подразделяют на две группы: локализованные в мембранах и протекающие в цитоплазме. В каждом случае для «оплаты» энергетических затрат используется своя «валюта»: в мембране это  $\Delta\mu H^+$  или  $\Delta\mu Na^+$ , а в цитоплазме — АТФ, креатинфосфат и другие макроэргические соединения. Непосредственным источником АТФ являются процессы субстратного и окислительного фосфорилирования. Процессы субстратного фосфорилирования наблюдаются при гликолизе и на одной из стадий цикла трикарбоновых кислот (реакция сукцинил-КоА  $\rightarrow$  сукцинат; см. главу 10). Генерация  $\Delta\mu H^+$  и  $\Delta\mu Na^+$ , используемых для окислительного фосфорилирования, осуществляется в процессе транспорта электронов в **дыхательной цепи энергосопрягающих мембран**.

Энергия разности потенциалов на сопрягающих мембранах может обратимо превращаться в энергию АТФ. Эти процессы катализируются  $H^+$ -АТФ-синтазой в мембранах, генерирующих протонный потенциал, или  $Na^+$ -АТФ-синтазой ( $Na^+$ -АТФазой) в «натриевых мембранах» алкалофильных бактерий, поддерживающих  $\Delta\mu Na^+$  [Скулачев В.П., 1989]. На рис. 9.6 представлена схема энергетики живых клеток, использующих  $\Delta\mu H^+$  в качестве мембранной формы конвертируемой энергии. На схеме видно, что свет или энергия субстратов дыхания утилизируется ферментами фотосинтетической или дыхательной редокс-цепи (у галобактерий — бактериородопсином). Генерируемый потенциал используется для совершения полезной работы, в частности для образования АТФ. Будучи макроэргическим соединением, АТФ выполняет функцию аккумуляции биологической энергии и ее последующего использования для выполнения клеточных функций. «Макроэргичность» АТФ объясняется рядом особенностей его

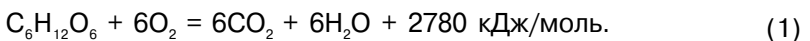


**Рис. 9.6.** Взаимозаменяемость различных видов биологической энергии при выполнении клеточной работы [Скулачев В.П., 1989].

Красной стрелкой показана взаимозаменяемость в клетке двух клеточных видов энергии - АТФ и  $\Delta\mu H^+$ , для которых имеются также специальные буферные системы: креатинфосфат для АТФ (клетки животных) и градиент ионов Na (алкалофильные бактерии).

молекулы. Это прежде всего высокая плотность зарядов, сконцентрированная в «хвосте» молекулы, обеспечивающая легкость диссоциации терминального фосфата при водном гидролизе. Продукты этого гидролиза представляют собой АДФ и неорганический фосфат и далее – АМФ и неорганический фосфат. Это обеспечивает высокую величину свободной энергии гидролиза терминального фосфата АТФ в водной среде.

**Тканевое дыхание и биологическое окисление.** Распад органических соединений в живых тканях, сопровождающийся потреблением молекулярного кислорода и приводящий к выделению углекислого газа и воды и образованию биологических видов энергии, называется **тканевым дыханием**. Тканевое дыхание представляют как конечный этап пути превращений моносахаров (в основном глюкозы) до указанных конечных продуктов, в который на разных стадиях включаются другие сахара и их производные, а также промежуточные продукты распада липидов (жирные кислоты), белков (аминокислоты) и нуклеиновых оснований. Итоговая реакция тканевого дыхания будет выглядеть следующим образом:



Впервые сущность дыхания объяснил А.-Л. Лавуазье (1743-1794), обративший внимание на сходство между горением органических веществ вне организма и дыханием животных. Постепенно становились ясными принципиальные различия между этими двумя процессами: в организме окисление протекает при относительно низкой температуре в присутствии воды, и его скорость регулируется обменом веществ. В настоящее время **биологическое окисление** определяется как совокупность реакций окисления субстратов в живых клетках, основная функция которых - энерги-

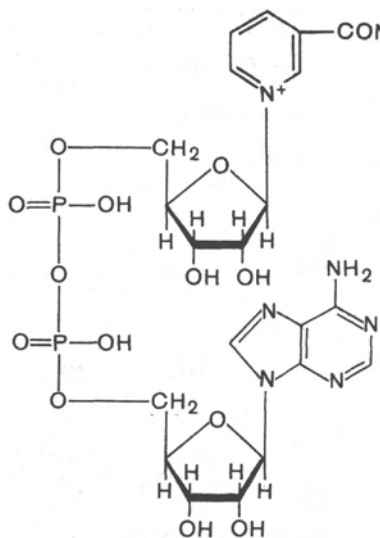
тическое обеспечение метаболизма. В развитие концепций биологического окисления в XX в. важнейший вклад внесли А.Н. Бах, О. Варбург, Г. Крепс, В.А. Энгельгардт, В.И. Палладин, В.А. Белицер, С.Е. Северин, В.П. Скулачев.

Потребление кислорода тканями зависит от интенсивности реакций тканевого дыхания. Наибольшей скоростью тканевого дыхания характеризуются почки, мозг, печень, наименьшей — кожа, мышечная ткань (в покое). Уравнение (2) описывает суммарный результат многоступенчатого процесса, приводящего к образованию молочной кислоты (см. главу 10) и протекающего без участия кислорода:

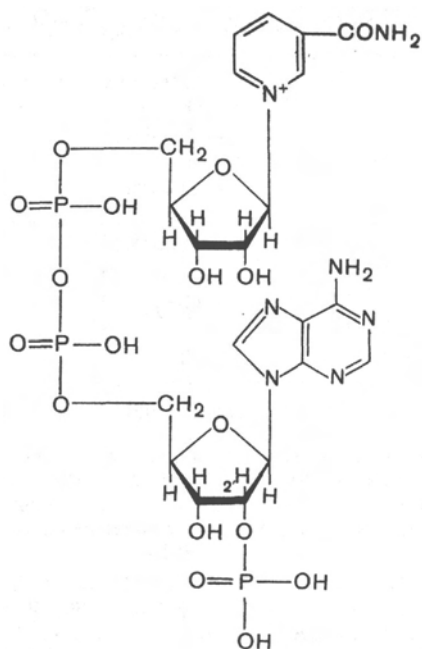


Этот путь отражает, по-видимому, энергетическое обеспечение простейших форм жизни, функционировавших в бескислородных условиях. Современные анаэробные микроорганизмы (осуществляющие молочнокислое, спиртовое и уксуснокислое брожение) получают для жизнедеятельности энергию, производимую в процессе гликолиза или его модификаций.

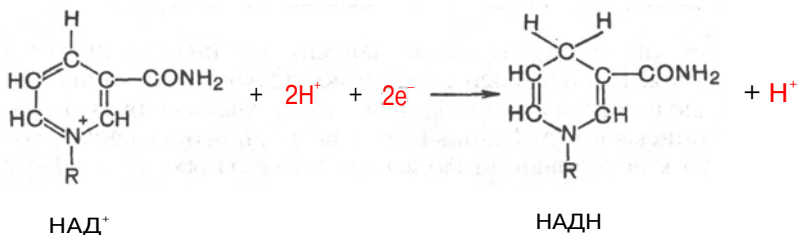
Использование клетками кислорода открывает возможности для более полного окисления субстратов. В аэробных условиях продукты бескислородного окисления становятся субстратами цикла трикарбоновых кислот (см. главу 10), в ходе которого образуются восстановленные **дыхательные переносчики** НАДФН, НАДН и флавиновые коферменты. Способность  $НАД^+$  и  $НАДФ^+$  играть роль промежуточного переносчика водорода связана с наличием в их структуре амида никотиновой кислоты. При взаимодействии этих кофакторов с атомами водорода имеет место обратимое гидрирование (присоединение атомов водорода):



Никотинамидадениндинуклеотид  
(НАД<sup>+</sup>)

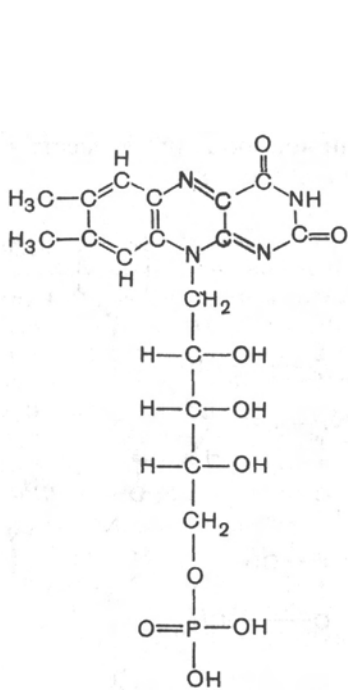


Никотинамидадениндинуклеотид-  
фосфат (НАДФ<sup>+</sup>)

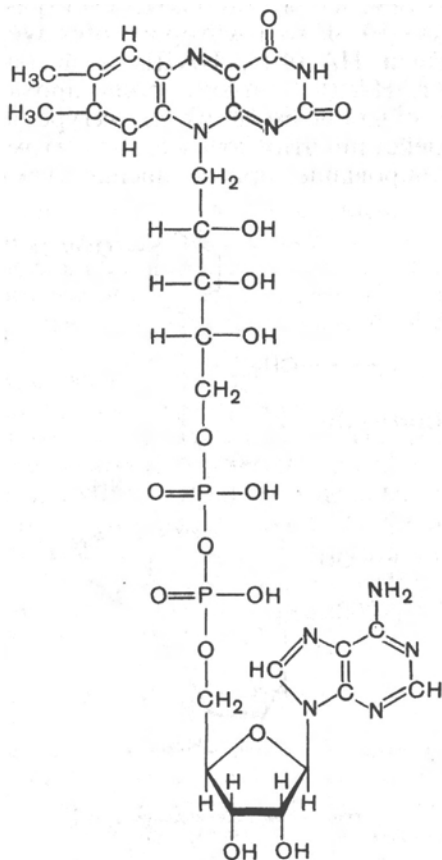


При этом в молекулу НАД<sup>+</sup> (НАДФ<sup>+</sup>) включаются 2 электрона и один протон, а второй протон остается в среде.

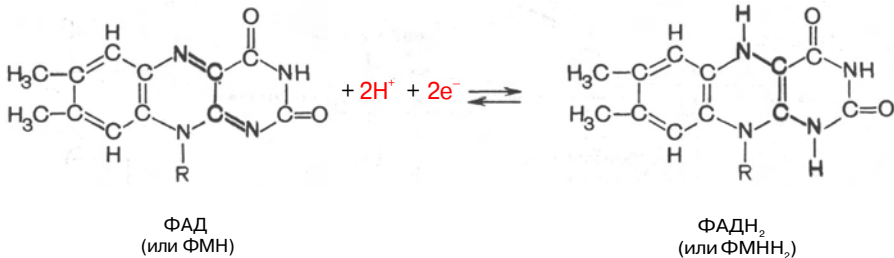
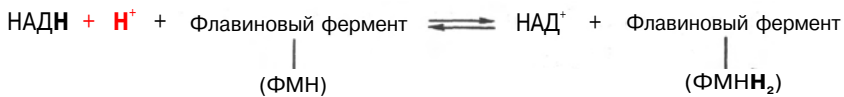
Во флавиновых коферментах (ФАД или ФМН), активной частью молекул которых является изоаллоксазиновое кольцо, в результате восстановления чаще всего наблюдается присоединение 2 протонов и 2 электронов одновременно:



Флавиномононуклеотид  
(ФМН)



Флавинадениндинуклеотид  
(ФАД)



Восстановленные формы этих кофакторов способны транспортировать водород и электроны к дыхательной цепи митохондрий или иных энерго-сопрягающих мембран (см. далее).

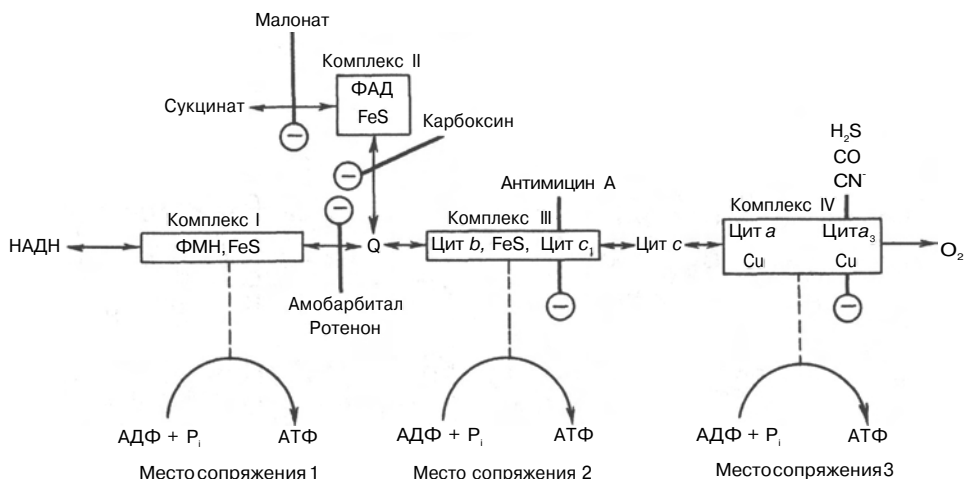
**Организация и функционирование дыхательной цепи.** В клетках эукариот дыхательная цепь расположена во внутренней мембране митохондрий, у дышащих бактерий — в цитоплазматической мембране и специализированных структурах — мезосомах, или тилакоидах. Компоненты дыхательной цепи митохондрий в порядке убывания окислительно-восстановительного потенциала можно расположить, как показано в табл. 9.1.

Таблица 9.1. Окислительно-восстановительный потенциал компонентов дыхательной цепи в стандартных условиях (концентрация компонентов 1М, pH 7,25 °С)

Восстановленная форма	Окисленная форма	E°, В
НАДН + H <sup>+</sup>	НАД <sup>+</sup>	-0,32
ФАДН <sub>2</sub>	ФАД <sup>+</sup>	-0,05
Убихинол (КоQ-H <sub>2</sub> )	Убихинон	+ 0,04
Цитохром <i>b</i> (Fe <sup>2+</sup> )	Цитохром <i>b</i> (Fe <sup>3+</sup> )	+ 0,07
» <i>c</i> <sub>1</sub> (Fe <sup>2+</sup> )	» <i>c</i> <sub>1</sub> (Fe <sup>3+</sup> )	+ 0,23
» <i>c</i> (Fe <sup>2+</sup> )	» <i>c</i> (Fe <sup>3+</sup> )	+ 0,25
» <i>a</i> (Fe <sup>2+</sup> )	» <i>a</i> (Fe <sup>3+</sup> )	+ 0,29
» <i>a</i> <sub>3</sub> (Fe <sup>2+</sup> )	» <i>a</i> <sub>3</sub> (Fe <sup>3+</sup> )	+0,55
H <sub>2</sub> O	<sup>1</sup> / <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+ 0,82

Молярные соотношения компонентов дыхательной цепи являются постоянными, ее компоненты встроены в митохондриальную мембрану в виде 4 белково-липидных комплексов: НАДН-КоQН<sub>2</sub>-редуктаза (комплекс I), сукцинат-КоQ-редуктаза (комплекс II), КоQН<sub>2</sub>-цитохром *c*-редуктаза (комплекс III) и цитохром *a*-цитохромоксидаза (комплекс IV) (рис. 9.7).

Если субстратом окисления служат α-кетокислоты, в переносе электронов на НАД<sup>+</sup> участвуют липоатсодержащие дегидрогеназы. В случае окисления пролина, глутамата, изоцитрата и других субстратов перенос электронов происходит непосредственно на НАД<sup>+</sup>. Восстановленный НАД в дыхательной цепи окисляется НАДН-дегидрогеназой, содержащей железосерный белок (FeS) и ФМН и прочно связанной с дыхательной цепью.



**Рис. 9.7.** Взаимное расположение компонентов дыхательной цепи с указанием мест фосфорилирования и специфических ингибиторов.

КоQ (убихинон), необходимый компонент дыхательной цепи, является производным бензохинона с боковой цепью, которая у млекопитающих чаще всего представлена 10 изопреноидными единицами (см. главу 7). Как любой хинон, КоQ способен находиться и в восстановленном, и окисленном состоянии. Это свойство определяет его роль в дыхательной цепи - служить коллектором восстановительных эквивалентов, поставляемых в дыхательную цепь через флавиновые дегидрогеназы. Содержание его значительно превосходит содержание других компонентов дыхательной цепи.

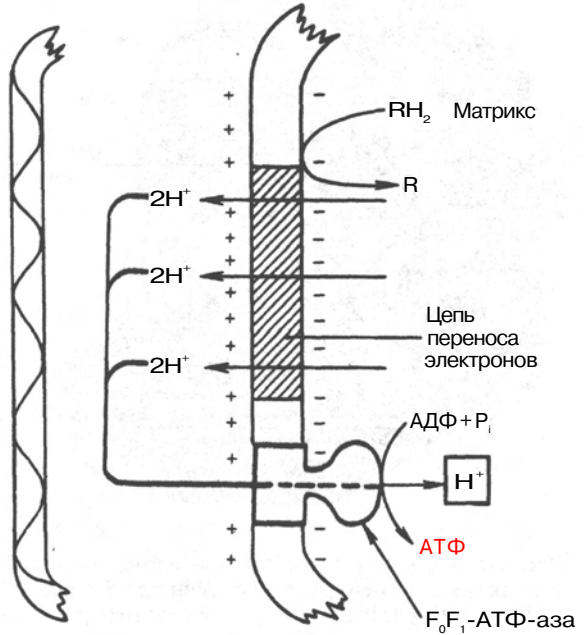
Дополнительным участником дыхательной цепи является железосерный белок FeS (*негемовое железо*). Он участвует в окислительно-восстановительном процессе, протекающем по одноэлектронному типу. Первый участок локализации FeS находится между ФМН и КоQ, второй - между цитохромами *b* и *c*<sub>1</sub>. Это соответствует тому факту, что со стадии ФМН путь протонов и электронов разделяется: первые накапливаются в митохондриальном матриксе, а вторые идут на гидрофобные переносчики - КоQ и цитохромы.

**Цитохромы** в дыхательной цепи выстроены в порядке возрастания окислительно-восстановительного потенциала. Они представляют собой гемопротеины, в которых протестическая геминная группа близка к гему гемоглобина (у цитохрома *b* идентична). Ионы железа в составе гема при получении и отдаче электронов обратимо изменяют свою валентность.

В процессах тканевого дыхания наиболее важную роль играют цитохромы *b*, *c*<sub>1</sub>, *c*, *a* и *a*<sub>3</sub>. Цитохром *a*<sub>3</sub> представляет собой терминальный участок дыхательной цепи - **цитохромоксидазу**, которая осуществляет окисление цитохрома *c* и образование воды. Элементарный акт представляет собой двухэлектронное восстановление одного атома кислорода, т.е. каждая молекула кислорода одновременно взаимодействует с двумя электрон-транспортными цепями. При транспорте каждой пары электронов во внутримитохондриальном пространстве может накапливаться до 6 протонов (рис. 9.8).

Строение дыхательной цепи интенсивно исследуется. В числе последних достижений молекулярной биохимии - установление тонкой структу-

Наружная мембрана      Межмембранное пространство      Внутренняя мембрана

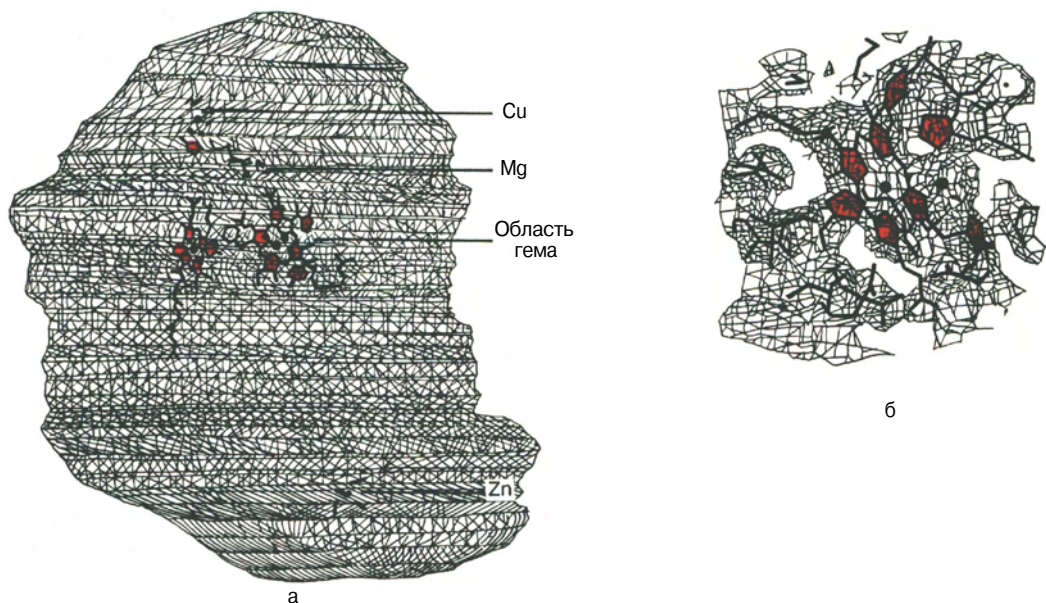


**Рис. 9.8.** Механизм образования АТФ согласно хемиосмотической гипотезе. R - субстраты - доноры водорода.

ры дыхательных ферментов с помощью рентгеноструктурного анализа. С помощью электронного микроскопа с наивысшим доступным в настоящее время разрешением можно «увидеть» структуру цитохромоксидазы (рис. 9.9).

**Окислительное фосфорилирование и дыхательный контроль.** Функция дыхательной цепи—утилизация восстановленных дыхательных переносчиков, образующихся в реакциях метаболического окисления субстратов (главным образом в цикле трикарбоновых кислот). Каждая окислительная реакция в соответствии с величиной высвобождаемой энергии «обслуживается» соответствующим дыхательным переносчиком: НАДФ, НАД или ФАД. Соответственно своим окислительно-восстановительным потенциалам эти соединения в восстановленной форме подключаются к дыхательной цепи (см. рис. 9.7). В дыхательной цепи происходит дискриминация протонов и электронов: в то время как протоны переносятся через мембрану, создавая  $\Delta pH$ , электроны движутся по цепи переносчиков от убихинола к цитохромоксидазе, генерируя разность электрических потенциалов, необходимую для образования АТФ протонной АТФ-синтазой. Таким образом, тканевое дыхание «заряжает» митохондриальную мембрану, а окислительное фосфорилирование «разряжает» ее.

Разность электрических потенциалов на митохондриальной мембране, создаваемая дыхательной цепью, которая выступает в качестве молекулярного проводника электронов, является движущей силой для образования АТФ и других видов полезной биологической энергии (см. рис. 9.6). Механизмы этих превращений описывает хемиосмотическая концепция превращения энергии в живых клетках. Она была выдвинута П. Митчеллом в 1960 г. для объяснения молекулярного механизма



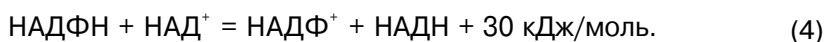
**Рис. 9.9.** Схематическое изображение цитохромоксидазы с разрешением 0,5 нм (а) и ее активного центра с разрешением 2,8 нм (б) [Tsukihara et al., Science.- 1996.- Vol. 269.- P. 1069] (Печатается с любезного разрешения редакции журнала).

сопряжения транспорта электронов и образования АТФ в дыхательной цепи и быстро получила международное признание. За развитие исследований в области биоэнергетики П. Митчеллу в 1978 г. была присуждена Нобелевская премия. В 1997 г. П. Бойеру и Дж. Уокеру была присуждена Нобелевская премия за выяснение молекулярных механизмов действия главного фермента биоэнергетики - протонной АТФ-синтазы.

Согласно хемиосмотической концепции, движение электронов по дыхательной цепи является источником энергии для транслокации протонов через митохондриальную мембрану. Возникающая при этом разность электрохимических потенциалов ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) приводит в действие АТФ-синтазу, катализирующую реакцию



В дыхательной цепи есть только 3 участка, где перенос электронов сопряжен с накоплением энергии, достаточным для образования АТФ (см. рис. 9.7), на других этапах возникающая разность потенциалов для этого процесса недостаточна. Максимальная величина коэффициента фосфорилирования, таким образом, составляет 3, если реакция окисления идет с участием НАД, и 2, если окисление субстрата протекает через флавиновые дегидрогеназы. Теоретически еще одну молекулу АТФ можно получить в трансгидрогеназной реакции (если процесс начинается с восстановленного НАДФ):





Обычно в тканях восстановленный НАДФ используется в пластическом обмене, обеспечивая разнообразные синтетические процессы, так что равновесие трансгидрогеназной реакции сильно сдвинуто влево.

Эффективность окислительного фосфорилирования в митохондриях определяется как отношение величины образовавшегося АТФ к поглощенному кислороду: АТФ/О или Р/О (*коэффициент фосфорилирования*). Экспериментально определяемые значения Р/О, как правило, оказываются меньше 3. Это свидетельствует о том, что процесс дыхания не полностью сопряжен с фосфорилированием. Действительно, окислительное фосфорилирование в отличие от субстратного не является процессом, в котором окисление жестко сопряжено с образованием макроэргов. Степень сопряжения зависит главным образом от целостности митохондриальной мембраны, сберегающей разность потенциалов, создаваемую транспортом электронов. По этой причине соединения, обеспечивающие протонную проводимость (как 2,4-динитрофенол), являются **разобщителями**.

Несопряженное дыхание (**свободное окисление**) выполняет важные биологические функции. Оно обеспечивает поддержание температуры тела на более высоком уровне, чем температура окружающей среды. В процессе эволюции у гомойотермных животных и человека сформировались специальные ткани (бурый жир), функцией которых является поддержание постоянной высокой температуры тела за счет регулируемого разобщения окисления и фосфорилирования в митохондриальной дыхательной цепи. Процесс разобщения контролируется гормонами.

В норме скорость митохондриального транспорта электронов регулируется содержанием АДФ. Выполнение клеткой функций с затратой АТФ приводит к накоплению АДФ, который в свою очередь активирует тканевое дыхание. Таким образом, клеткам свойственно реагировать на интенсивность клеточного метаболизма и поддерживать запасы АТФ на необходимом уровне. Это свойство называется **дыхательным контролем**.

За сутки человек потребляет около 550 л (24,75 моля) кислорода. Если считать, что в тканевом дыхании за этот период восстанавливается 40 г атомов кислорода (20 молей), а величину Р/О принять за 2,5, то в митохондриях должно синтезироваться 100 молей, или около 50 кг АТФ! При этом часть энергии окисления субстратов расходуется на совершение полезной работы, не превращаясь в АТФ (см. рис. 9.6).

Приведенные данные показывают, как важно организму поддержание процессов жизнедеятельности.

**Свободное окисление.** Одна из задач свободного (несопряженного) окисления — превращения природных или неприродных субстратов, называемых в этом случае ксенобиотиками (ксено — несовместимый, биос — жизнь). Они осуществляются ферментами **диоксигеназами** и **монооксигеназами**. Окисление протекает при участии специализированных цитохромов, локализованных чаще всего в эндоплазматическом ретикулуме, поэтому иногда этот процесс называют **микросомальным окислением** [Арчаков А.И., 1975].

В реакции свободного окисления участвуют также кислород и восстановленные дыхательные переносчики (чаще всего НАДФН). Акцептором электронов является цитохром Р-450 (иногда цитохром  $b_5$ ). Окисление субстрата протекает по следующей схеме:



Механизм действия оксигеназ включает изменение валентности входящих в их состав ионов двухвалентных металлов (железа или меди). Диоксигеназы присоединяют к субстрату молекулярный кислород, активируя его за счет электрона атома

железа в активном центре (железо при этом становится трехвалентным). Оксигенация протекает как атака субстрата образующимся супероксид-анионом кислорода. Одной из биологически важных реакций такого типа является превращение  $\beta$ -каротина в витамин А. Моноксигеназы требуют участия в реакции НАДФН, атомы водорода которого взаимодействуют с одним из атомов кислорода, поскольку только один электрон связывается с субстратом. К широко распространенным моноксигеназам относятся разнообразные гидроксилазы. Они принимают участие в окислении аминокислот, оксикислот, полиизопrenoидов.

В процессе свободного окисления вследствие особенностей используемых цепей передачи электронов не происходит образования АТФ; биологическая роль этих процессов заключается в метаболизме ряда природных и ксенобиотических субстратов. В последнем случае свободное окисление выполняет важную функцию модификации чужеродных соединений. К последним относятся лекарственные средства, гербициды, продукты загрязнения окружающей среды, в возрастающем количестве попадающие в организм с водой, пищей и атмосферным воздухом. Как правило, они имеют гидрофобные свойства. Многие из них являются канцерогенными. Их гидроксильное окисление в ходе свободного окисления облегчает последующую деструкцию и выведение из организма (см. главу 12 и 13).

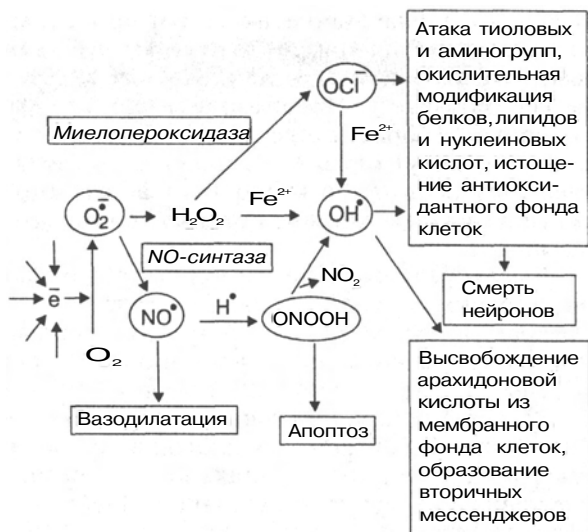
## ГЕНЕРАЦИЯ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В КЛЕТКЕ

Свободное окисление протекает при участии свободнорадикальных форм кислорода, которые образуются в процессе одноэлектронного восстановления кислорода и прежде всего **супероксид-аниона кислорода**.

Обычно эти реакции своднорадикального окисления протекают в активном центре соответствующих ферментов, а промежуточные продукты не появляются во внешней среде. При изменении условий функционирования дыхательной цепи (например, при гипоксии) в ней также возможно одноэлектронное восстановление кислорода, объясняющееся тем, что его сродство к убихинону выше, чем к цитохромоксидазе. Эти процессы приводят к образованию супероксид-аниона кислорода. Этот радикал может образовываться и под влиянием ультрафиолетовых лучей, а также путем взаимодействия кислорода с ионами металлов переменной валентности (чаще всего с железом) или в ходе спонтанного окисления некоторых соединений, например дофамина. Наконец, он может продуцироваться в клетках и такими ферментами, как ксантинооксидаза или НАДФН-оксидаза.

Образование супероксид-аниона кислорода имеет важное биологическое значение. Он является высокорекреационным соединением, которое вследствие высокой гидрофильности не может покидать клетку и накапливается в цитоплазме. Его превращения приводят к образованию ряда активных окислителей (рис. 9.10). Он способен активировать NO-синтазу, которая образует в тканях NO-радикал, обладающий свойствами вторичного посредника (активирует растворимую гуанилатциклазу, продукт которой — цГМФ — проявляет вазодилаторные свойства). С другой стороны, супероксид-анион способен снижать содержание NO-радикала, превращая его в пероксинитрит  $\text{ONOOH}$  (см. рис. 9.10).

Живые клетки имеют системы защиты от повышенной продукции свободных радикалов. Фермент **супероксиддисмутаза** превращает супероксид-анион кислорода в менее реакционноспособный и более гидрофобный пероксид водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Пероксид водорода является субстратом каталазы и глутатионзависимых пероксидаз, которые катализируют его превра-



**Рис. 9.10.** Взаимопревращения свободных радикалов и их основные функции в тканях [Болдырев А.А., 1996].

щение в молекулу воды. Однако пероксид водорода может генерировать гидроксил-радикал в присутствии двухвалентного железа или превращаться в гипохлорит-анион  $OCl^-$  ферментом миелопероксидазой.

Как гипохлорит-анион, так и гидроксил-радикал являются сильными окислителями. Они способны модифицировать белки, нуклеиновые кислоты, индуцировать перекисное окисление липидов (от которого наиболее сильно «страдают» полиненасыщенные мембранные липиды) и в результате цепных реакций приводить к множественным нарушениям мембран и к гибели клеток. Важным дополнением этих реакций является способность  $NO$ -радикала при взаимодействии с супероксид-анионом образовывать пероксинитрит, который может индуцировать так называемый *апоптоз* (запрограммированная гибель клеток), а в ходе своего спонтанного распада превращаться в гидроксил-радикал. Последний может образовываться также из гипохлорит-аниона в присутствии ионов железа.

Процессы, протекающие до момента образования гипохлорит-аниона или гидроксил-радикала, локализованы в цитоплазме и контролируются цитоплазматическими ферментами или природными водорастворимыми антиоксидантами. Например, **таурин** способен связывать гипохлорит-анион в форме хлораминового комплекса, дипептид **карнозин** и его производные нейтрализуют гидроксил-радикал, а такие соединения, как белок **ферритин**, связывают железо. Перекисное окисление липидов, инициируемое в гидрофобном пространстве клеточных мембран, способен прерывать широко известный гидрофобный антиоксидант  **$\alpha$ -токоферол** (витамин Е). Его высокая концентрация в биологических мембранах препятствует их повреждению свободными радикалами.

Полное подавление перекисных процессов в тканях, по-видимому, нецелесообразно, свободные радикалы обладают полезными свойствами. Они индуцируют апоптоз, участвуют в формировании клеточного иммунитета. Образование гидроперекисей жирнокислотных цепей полиненасыщенных фосфолипидов повреждает бислой и, стимулируя работу фосфолипаз, способствует высвобождению жирных кислот из состава мембранных липидов. Полиненасыщенная арахидоновая кислота является обычной мишенью для

свободнорадикальной атаки. Этот процесс может стимулировать ферментативные превращения ее по одному из двух путей — **липоксигеназному** или **циклооксигеназному**. В результате в клетке образуются важные биологические регуляторы: простагландины, лейкотриены, тромбоксаны. Лизофосфолипиды, образующиеся при отщеплении модифицированной жирной кислоты, могут быть восстановлены до исходного состояния с использованием другой жирной кислоты (в форме ацил-КоА). Таким образом может регулироваться жирнокислотный состав липидных молекул в клеточной мембране.

Высокореакционные свободные радикалы кислорода, характеризующиеся высоким окислительным потенциалом и способностью к быстрым превращениям, могут индуцировать цепные реакции. В настоящее время признается важная роль свободнорадикальных процессов в развитии возрастных и патологических состояний в тканях [Владимиров Ю.А. и др., 1983]. Свободнорадикальные превращения вовлекаются в механизмы, повышающие выживаемость клеток в неблагоприятных условиях, а снижение генерации свободных радикалов в организме способствует ослаблению клеточного иммунитета. Однако усиленная генерация свободных радикалов сопровождается патологическими состояниями (болезнь Паркинсона, Альцгеймера) и сам процесс биологического старения.

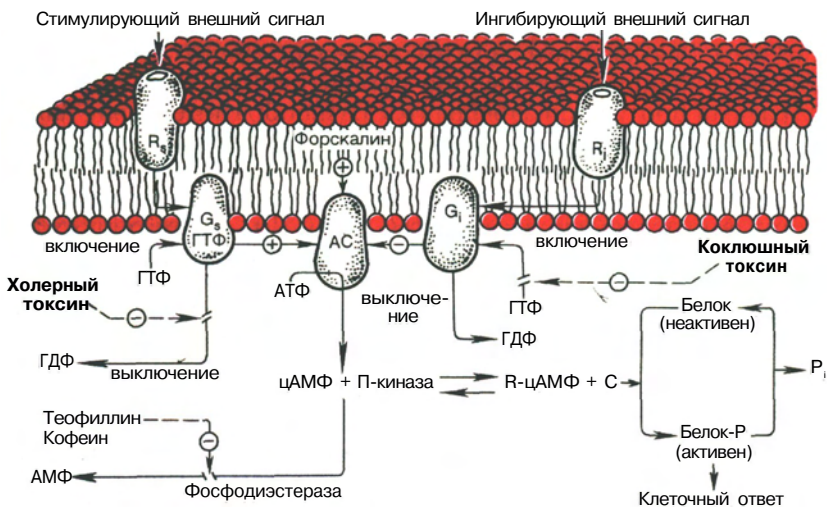
## **МЕМБРАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА**

Биологические мембраны представляют собой динамическую структуру, компоненты которой подвержены быстрому метаболизму. Благодаря этому липидное окружение мембранных белков обладает способностью в соответствии с изменением условий функционирования изменять свои физико-химические свойства: упаковку, микровязкость, латеральную подвижность компонентов в бислое и т.д. Подавляющее большинство мембранных белков функционирует в составе олигомерных ансамблей, например в дыхательной цепи митохондрий. Транспортные белки также организуют ассоциаты в бислое: димеры ( $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза), тетрамеры ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза) или даже более высокоорганизованные надмолекулярные комплексы.

Примером таких комплексов являются сложные мембранные структуры, включающие рецепторы и преобразователи сигналов, действие которых начинается с восприятия внешнего импульса (первичного посредника) на внешней стороне клеточной мембраны и завершается образованием второго посредника на внутренней стороне мембраны. Рассмотрим передачу и трансформацию сигнала от первичного посредника, роль которого, как правило, выполняют разнообразные гормоны, не проникающие через клеточную мембрану (см. главу 8).

**Первичный посредник** взаимодействует с соответствующим рецептором, что приводит к изменению конформации последнего и, как следствие, к увеличению латеральной подвижности в мембране. Это повышает вероятность взаимодействия активированного рецептора с преобразователем (роль преобразователей выполняют специфические мембраносвязанные белки, содержащие ГТФ в связанном состоянии, — G-белки, или ГТФ-связывающие белки) [Авдонин П.В., Ткачук В.А., 1994].

G-белки — центральная часть регуляторного мембранного ансамбля, представлены сложным олигомерным комплексом. Они относятся к гетеротримерным протеолипидам, состоящим из  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц.  $\beta$ -субъеди-



**Рис. 9.11.** Трансмембранная передача информации с участием аденилатциклазы (АС) и ГТФ-связывающих белков.

$G_s$  - стимулирующий и  $G_i$  - ингибирующий ГТФ-связывающие белки;  $R_s$  и  $R_i$  - соответствующие рецепторы для  $G_s$  и  $G_i$ . Показаны участки активации сигнала форскалином, теофиллином и кофеином, а также ингибирования холерным и коклюшным токсинами.

ница комплекса тесно ассоциирована с  $\alpha$ - и  $\gamma$ -субъединицами. Последние модифицированы жирнокислотными радикалами—миристоильным радикалом в случае  $\alpha$ -субъединицы (присоединен через остаток глутаминовой кислоты) и геранильным радикалом в случае  $\gamma$ -субъединицы (присоединен к радикалу цистеина). Такая модификация прочно ассоциирует G-белки с мембранным бислоем. Следовательно, регуляторные белки функционируют в тесной связи с мембраной, и их свойства зависят от физико-химических характеристик мембраны.

Установлено, что нарушение взаимодействия между белковыми молекулами в олигомерном ансамбле  $Na^+/K^+$ -АТФазы, происходящее, например, при ее свободнорадикальной модификации в ишемическом мозге, устраняет способность АТФ регулировать активность этого фермента.

Приведенные примеры указывают на важное биологическое значение олигомерных ассоциатов мембранных белков, состоящее в том, что при изменении физико-химических свойств мембраны соответственно изменяется и характер взаимодействия мембранных структур. Таким образом формируются обратные связи для приспособления обмена веществ к потребностям организма.

G-белки делятся на несколько типов, причем один из них выполняет стимулирующую, а остальные—ингибирующую функции. Взаимодействие соответствующего G-белка с ферментом—усилителем сигнала приводит к изменению свойств фермента и соответственно к изменению его активности. В случае циклического АМФ (рис. 9.11) возможна как активация аденилатциклазы, так и ее ингибирование (в зависимости от типа G-белков, участвующих в трансформации сигнала). Итогом будет изменение скорости синтеза цитоплазматического цАМФ—активатора протеинкиназ, регулирующих функцию клеточных белков в результате их фосфорилирования. В неактивном состоянии протеинкиназа представляет собой димер из

каталитической и регуляторной субъединиц. Активация протеинкиназы обеспечивается связыванием цАМФ с регуляторной субъединицей, что вызывает диссоциацию и активацию каталитической субъединицы.

Субстратами протеинкиназ являются разнообразные белки, фосфорилирование которых изменяет их активность. Например, активация протеинкиназы А со стороны цАМФ приводит к фосфорилированию гликогенсинтазы и гликогенфосфорилазы. При этом активность первого фермента подавляется, а второго усиливается (см. главу 10). Таким образом, появление в кровяном русле адреналина, активирующего аденилатциклазу миоцитов, улучшает энергетическое обеспечение сокращений сердечной мышцы.

Известно несколько типов протеинкиназ, активируемых различными эффекторами. Субстраты протеинкиназ—огромное количество белков, фосфорилирование которых приводит к изменению их активности. Более того, обнаружены протеинфосфатазы, которые, осуществляя гидролиз фосфатной группы, возвращают белковую молекулу в исходное состояние. Во многих случаях мишенью действия киназ являются другие киназы, которые фосфорилируют фосфатазы, в свою очередь регулируя их функцию. Таким образом, регуляция метаболизма имеет каскадный характер.

# Глава 10

## МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ

Метаболизм (обмен) углеводов в организме человека состоит в основном из следующих процессов:

1. Расщепление в пищеварительном 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. Гликолиз. Понятие «гликолиз» означает расщепление глюкозы. Первоначально этим термином обозначали только анаэробное брожение, завершающееся образованием молочной кислоты (лактата) или этанола и  $\text{CO}_2$ . В настоящее время понятие «гликолиз» используется более широко 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 термин «аэробный гликолиз» в отличие от «анаэробного гликолиза», завершающегося образованием молочной кислоты (лактата).

4. Аэробный путь прямого окисления глюкозы или, как его называют, пентозофосфатный путь (пентозный цикл).

5. Взаимопревращение гексоз.

6. Аэробный метаболизм пирувата. Этот процесс выходит за рамки углеводного обмена, однако может рассматриваться как завершающая его стадия: окисление продукта гликолиза—пирувата.

7. Наконец, 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 полости рта под действием амилазы слюны.

Известны три вида амилаз, которые различаются главным образом по конечным продуктам их ферментативного действия:  $\alpha$ -амилаза,  $\beta$ -амилаза и  $\gamma$ -амилаза.  $\alpha$ -Амилаза расщепляет в полисахаридах внутренние  $\alpha$ -1,4-связи, поэтому ее иногда называют эндоамилазой. Молекула  $\alpha$ -амилазы содержит в своих активных центрах ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , необходимые для ферментативной активности. Кроме того, характерной особенностью  $\alpha$ -амилазы животного происхождения является способность активироваться одновалентными анионами, прежде всего ионами хлора.

Под действием  $\beta$ -амилазы от крахмала отщепляется дисахарид мальтоза, т.е.  $\beta$ -амилаза является экзоамилазой. Она обнаружена у высших растений, где выполняет важную роль в мобилизации резервного (запасного) крахмала.

$\gamma$ -Амилаза отщепляет один за другим глюкозные остатки от конца полигликозидной цепочки. Различают кислые и нейтральные  $\gamma$ -амилазы в зависимости от того, в какой области рН они проявляют максимальную активность. В органах и тканях человека и млекопитающих кислая  $\gamma$ -амилаза локализована в лизосомах, а нейтральная — в микросомах и гиалоплазме. Амилаза слюны является  $\alpha$ -амилазой. Под влиянием этого фермента происходят первые фазы распада крахмала (или гликогена) с образованием декстринов (в небольшом количестве образуется и мальтоза). Затем пища, смешанная со слюной, попадает в желудок.

Желудочный сок не содержит ферментов, расщепляющих сложные углеводы. В желудке действие  $\alpha$ -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  $\alpha$ -амилазы поджелудочного сока. Здесь рН возрастает приблизительно до нейтральных значений, при этих условиях  $\alpha$ -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 в точках ветвления существуют также  $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидные связи. Эти связи в кишечнике гидролизуются особыми ферментами: амило-1,6-глюкозидазой и олиго-1,6-глюкозидазой (терминальная декстриназа).

Таким образом, расщепление крахмала и гликогена до мальтозы происходит в кишечнике под действием трех ферментов: панкреатической  $\alpha$ -амилазы, амило-1,6-глюкозидазы и олиго-1,6-глюкозидазы.

Образующаяся мальтоза оказывается только временным продуктом, так как она быстро гидролизуется под влиянием фермента мальтазы ( $\alpha$ -глюкозидазы) на 2 молекулы глюкозы. Кишечный сок содержит также активную сахаразу, под влиянием которой из сахарозы образуются глюкоза и фруктоза\*.

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.

Следует заметить, что активность свободных дисахаридаз в просвете кишечника невелика. Большая часть их ассоциирована с небольшими «выпуклостями» на щеточной каемке эпителиальных клеток кишечника.

Напомним, что на внутренней поверхности тонкой кишки располагаются ворсинки. В тощей кишке человека на 1 мм<sup>2</sup> 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 мм<sup>2</sup> поверхности тонкой кишки у человека 80–140 млн микроворсинок.

При соответствующей обработке препаратов над микроворсинками обнаруживается волокнистая сеть, представляющая собой гликопротеино-

\* Гидролиз сахарозы сопровождается изменением знака оптического вращения: правовращающая сахароза превращается в левовращающую смесь глюкозы и фруктозы. Эту смесь называли раньше инвертированным сахаром.



вый 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.

Щеточная каемка энтероцитов содержит системы переносчиков. Установлено существование переносчика, способного связывать различными своими участками глюкозу и  $\text{Na}^+$  и переносить их через плазматическую мембрану кишечной клетки. Считают, что глюкоза и  $\text{Na}^+$  высвобождаются затем в цитозоль, позволяя переносчику захватить новую порцию «груза».  $\text{Na}^+$  транспортируется по градиенту концентрации, стимулируя переносчик к транспорту глюкозы против указанного градиента. Свободная энергия, необходимая для этого активного транспорта, образуется благодаря гидролизу АТФ связанному с натриевым насосом, который «откачивает» из клетки  $\text{Na}^+$  в обмен на  $\text{K}^+$ . Динамика происходящих при этом процессов пока остается недостаточно ясной и в настоящее время обстоятельно изучается.

**Судьба всосавшихся моносахаридов.** Более 90% всосавшихся моносахаридов (главным образом глюкозу) 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 И РАСПАД ГЛИКОГЕНА

**Гликоген**—главная форма запасания углеводов у животных и человека. Накапливается гликоген главным образом в печени (до 6% от массы печени) и в скелетных мышцах, где его содержание редко превышает 1%. Запасы гликогена в скелетных мышцах ввиду значительно большей массы последних превышают его запасы в печени. Гликоген присутствует в цитозоле в форме гранул диаметром от 10 до 40 нм. На электронных микрофотографиях гликогеновые гранулы выглядят плотными. Установлено, что эти гранулы, кроме гликогена, содержат ферменты, катализирующие синтез и распад гликогена. Однако гликогеновые гранулы отличаются от мультиферментных комплексов (например, от пируватдегидрогеназного комплекса). Степень структурной организации гликогеновых гранул ниже, чем в мультиферментных комплексах. Следует подчеркнуть, что синтез и распад гликогена в клетке осуществляются разными метаболическими путями.

В частности, считалось, что гликогенфосфорилаза (фосфорилаза *a*) катализирует как распад гликогена, так и его синтез, потому что в опытах *in vitro* было показано, что гликогенфосфорилазная реакция обратима. Однако в дальнейшем было установлено, что в клетке (*in vivo*) фосфорилаза *a* катализирует только распад гликогена, синтез гликогена осуществляется при участии совершенно другого фермента. Оба эти процесса (синтез и распад гликогена) регулируют содержание глюкозы в крови и создают резерв глюкозы для интенсивной мышечной работы.

## Синтез гликогена (гликогенез)

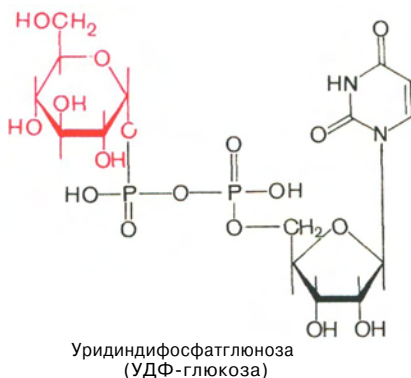
Прежде всего глюкоза подвергается фосфорилированию при участии фермента гексокиназы, а в печени — и глюкокиназы. Далее глюкозо-6-фосфат под влиянием фермента фосфоглюкомутазы переходит в глюкозо-1-фосфат\*:



Образовавшийся глюкозо-1-фосфат уже непосредственно вовлекается в синтез гликогена. На первой стадии синтеза глюкозо-1-фосфат вступает во взаимодействие с УТФ (уридинтрифосфат), образуя уридиндифосфатглюкозу (УДФ-глюкоза) и пирогосфат. Данная реакция катализируется ферментом глюкозо-1-фосфат-уридилтрансферазой (УДФГ-пирогосфорилаза):

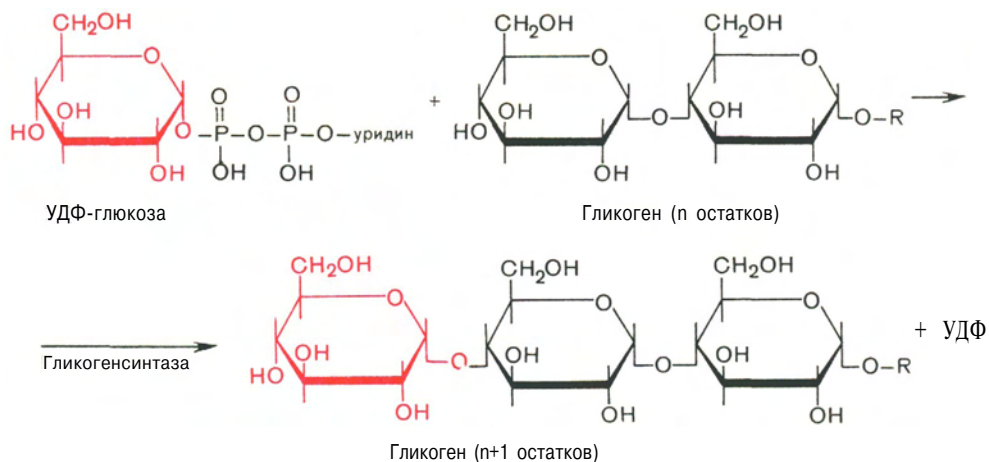


Приводим структурную формулу УДФ-глюкозы:



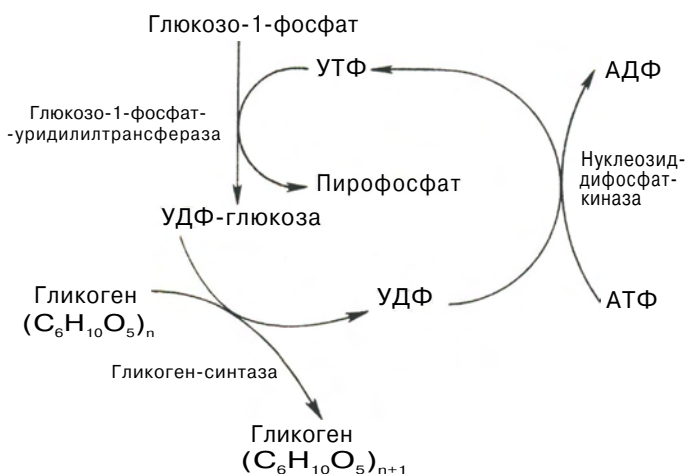
\* Роль кофакторов в данной реакции выполняет глюкозо-1,6-бисфосфат, образующийся в реакции, катализируемой фосфоглюкокиназой: глюкозо-1-фосфат + АТФ  $\rightleftharpoons$  глюкозо-1,6-бисфосфат + АДФ.

На второй стадии – стадии образования гликогена – происходит перенос глюкозного остатка, входящего в состав УДФ-глюкозы, на глюкозидную цепь гликогена («затравочное» количество). При этом образуется  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-связь между первым атомом углерода добавляемого остатка глюкозы и 4-гидроксильной группой остатка глюкозы цепи. Эта реакция катализируется ферментом гликогенсинтазой. Необходимо еще раз подчеркнуть, что реакция, катализируемая гликогенсинтазой, возможна только при условии, что полисахаридная цепь уже содержит более 4 остатков D-глюкозы.



Образующийся УДФ затем вновь фосфорилируется в УТФ за счет АТФ, и таким образом весь цикл превращений глюкозо-1-фосфата начинается сначала.

В целом образование  $\alpha$ -1,4-глюкозидной ветви («амилозной» ветви) гликогена можно представить в виде следующей схемы:



Установлено, что гликогенсинтаза неспособна катализировать образование  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-связи, имеющейся в точках ветвления гликогена. Этот процесс катализирует специальный фермент, получивший название гликогенветвящего фермента, или амило-(1 $\rightarrow$ 4) $\rightarrow$ (1 $\rightarrow$ 6)-трансглюкозидазы. Последний катализирует перенос концевое 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.

Ветвление повышает растворимость гликогена. Кроме того, благодаря ветвлению создается большое количество невосстанавливающих концевых остатков, которые являются местами действия гликогенфосфорилазы и гликогенсинтазы.

Таким образом, ветвление увеличивает скорость синтеза и расщепления гликогена.

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 энергозатрат в организме в результате возбуждения ЦНС обычно происходят усиление распада гликогена и образование глюкозы.

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 8).

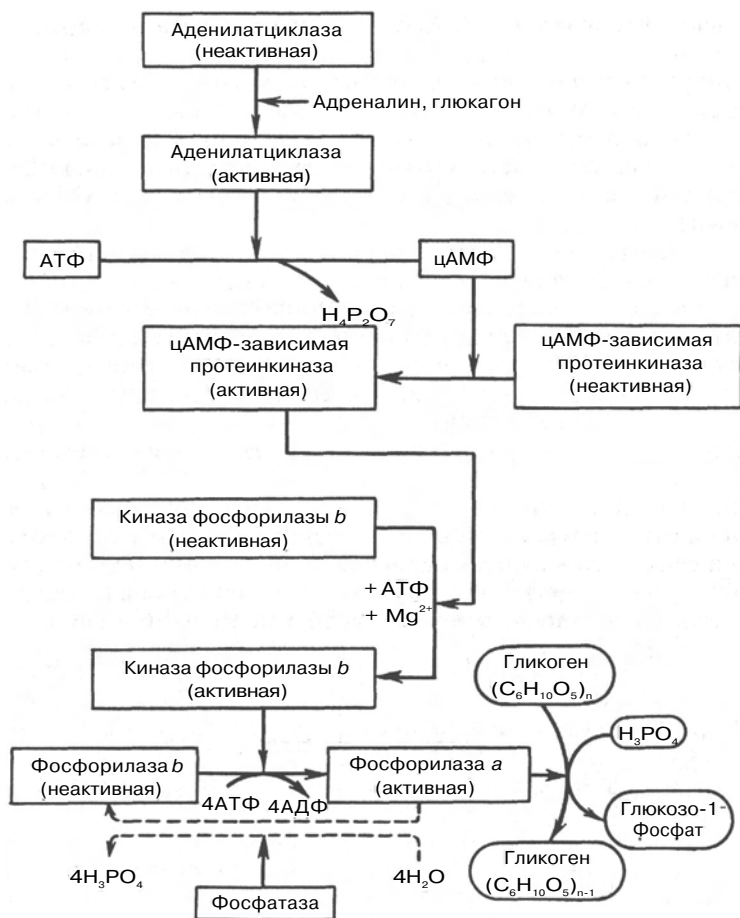
Как отмечалось, эффект катехоламинов в значительной мере опосредован действием цАМФ, который активирует протеинкиназы тканей. При участии последних происходит фосфорилирование ряда белков, в том числе гликогенсинтазы и фосфорилазы *b* – ферментов, участвующих в обмене углеводов. Фосфорилированный фермент 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 очень 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 (гликогенолиз)

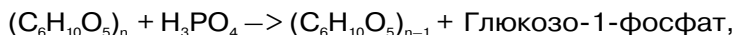
Известно, что фосфоролитический распад играет ключевую роль в мобилизации полисахаридов\*.

\* В тканях человека и животных отечественными биохимиками Е.Л. Розенфельд и И.А. Поповой обнаружен также фермент  $\alpha$ -амилаза, катализирующий отщепление остатков глюкозы от молекулы гликогена по  $\alpha$ -1,4-связи. Однако ведущая роль в расщеплении гликогена в клетках принадлежит фосфорилазам.



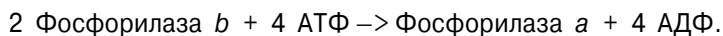
**Рис. 10.1.** Гормональная регуляция фосфоролитического отщепления остатка глюкозы от гликогена.

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. 10.1 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:



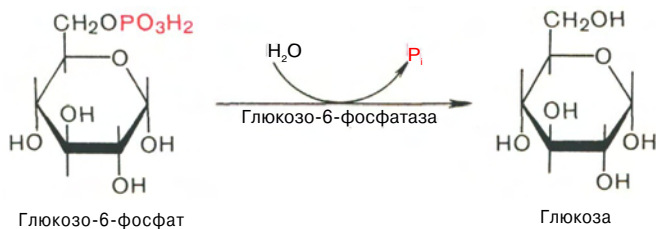
Катализируется эта реакция ферментом, который называется киназой фосфорилазы *b*. Установлено, что эта киназа может существовать как в активной, так и в неактивной форме. Неактивная киназа фосфорилазы превращается в активную под влиянием фермента протеинкиназы (киназа киназы фосфорилазы), и не просто протеинкиназы, а цАМФ-зависимой протеинкиназы.

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 приводит в 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).

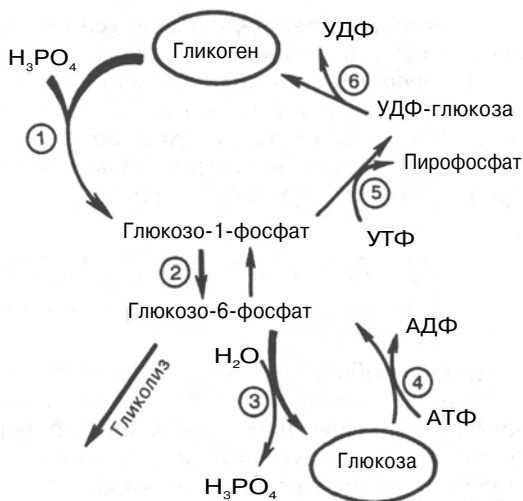
Образовавшийся в результате фосфоролитического распада гликогена глюкозо-1-фосфат превращается под действием фосфоглюкомутазы в глюкозо-6-фосфат. Для осуществления данной реакции необходима фосфорилированная форма фосфоглюкомутазы, т.е. ее активная форма, которая образуется, как отмечалось, в присутствии глюкозо-1,6-бисфосфата\*.



Образование свободной глюкозы из глюкозо-6-фосфата в печени происходит под влиянием глюкозо-6-фосфатазы. Данный фермент катализирует гидролитическое отщепление фосфата:



\* В настоящее время установлено, что в каталитическом центре активной формы молекулы фосфоглюкомутазы присутствует фосфорилированный остаток серина. Во время катализа эта фосфорильная группа, вероятно, переносится на гидроксильную группу при С-6 глюкозо-1-фосфата с образованием глюкозо-1-бисфосфата. Далее фосфорильная группа указанного промежуточного продукта переносится на остаток серина в активном центре. В результате происходит образование глюкозо-6-фосфата и регенерирование фосфорилированного фермента.



**Рис. 10.2.** Распад и синтез гликогена (схема).

Жирными стрелками указан путь распада, тонкими - путь синтеза. Цифрами обозначены ферменты: 1 - фосфорилаза; 2 - фосфофруктомутаза; 3 - глюкозо-6-фосфатаза; 4 - гексокиназа (глюкокиназа); 5 - глюкозо-1-фосфат-уридилтрансфераза; 6 - гликогенсинтаза.

Заметим, что фосфорилированная глюкоза в противоположность неэтерифицированной глюкозе не может легко диффундировать из клеток. Печень содержит гидролитический фермент глюкозо-6-фосфатазу, который и обеспечивает возможность быстрого выхода глюкозы из этого органа. В мышечной ткани глюкозо-6-фосфатаза практически отсутствует.

На рис. 10.2 отражены представления о путях распада и синтеза гликогена в печени\*.

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 в печени) распад глюкозы происходит двумя основными путями: анаэробным (при отсутствии кислорода) и аэробным, для осуществления которого необходим кислород.

## ГЛИКОЛИЗ

**Гликолиз** (от греч. *glycys*—сладкий и *lysis*—растворение, распад)—это последовательность ферментативных реакций, приводящих к превращению глюкозы в пируват с одновременным образованием АТФ.

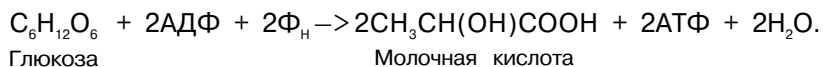
При аэробных условиях пируват проникает в митохондрии, где полностью окисляется до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Если содержание кислорода недостаточно, как это может иметь место в активно сокращающейся мышце, пируват превращается в лактат.

Итак, гликолиз—не только главный путь утилизации глюкозы в клетках, но и уникальный путь, поскольку он может использовать кислород, если

\* Как отмечалось, 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.

последний доступен (аэробные условия), но может протекать и в отсутствие кислорода (анаэробные условия).

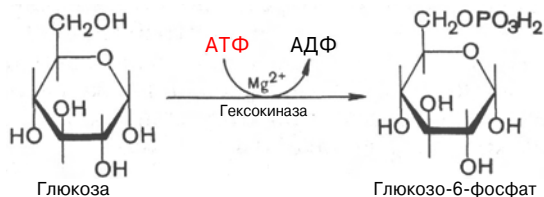
*Анаэробный гликолиз*—сложный ферментативный процесс распада глюкозы, протекающий в тканях человека и животных без потребления кислорода. Конечным продуктом гликолиза является молочная кислота. В процессе гликолиза образуется АТФ. Суммарное уравнение гликолиза можно представить следующим образом:



В анаэробных условиях гликолиз—единственный процесс в животном организме, поставляющий энергию. Именно благодаря гликолизу организм человека и животных определенный период может осуществлять ряд физиологических функций в условиях недостаточности кислорода. В тех случаях, когда гликолиз протекает в присутствии кислорода, говорят об *аэробном гликолизе* \*.

Последовательность реакций анаэробного гликолиза, так же как и их промежуточные продукты, хорошо изучена. 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:



Образование глюкозо-6-фосфата в гексокиназной реакции сопровождается освобождением значительного количества свободной энергии системы и может считаться практически необратимым процессом.

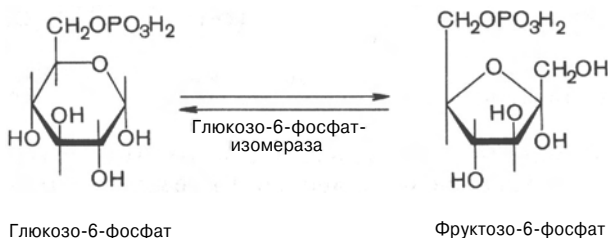
Наиболее важным свойством гексокиназы является ее ингибирование глюкозо-6-фосфатом, т.е. последний служит одновременно и продуктом реакции, и аллостерическим ингибитором.

Фермент гексокиназа способен катализировать фосфорилирование не только D-глюкозы, но и других гексоз, в частности D-фруктозы, D-маннозы и т.д. В печени, кроме гексокиназы, существует фермент глюкокиназа, который катализирует фосфорилирование только D-глюкозы. В мышечной ткани этот фермент отсутствует (подробнее см. главу 16).

\* В аэробных условиях гликолитический распад глюкозы до пировиноградной кислоты можно рассматривать как первую стадию окисления глюкозы до конечных продуктов этого процесса -  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

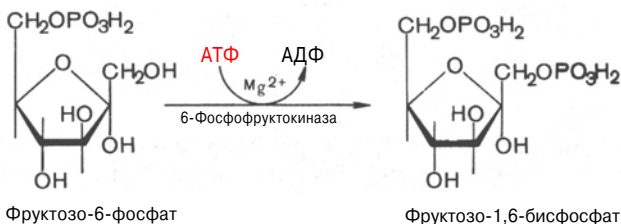


Второй реакцией гликолиза является превращение глюкозо-6-фосфата под действием фермента глюкозо-6-фосфат-изомеразы во фруктозо-6-фосфат:



Эта реакция протекает легко в обоих направлениях, и для нее не требуется каких-либо кофакторов.

Третья реакция катализируется ферментом фосфофруктокиназой; образовавшийся фруктозо-6-фосфат вновь фосфорилируется за счет второй молекулы АТФ:

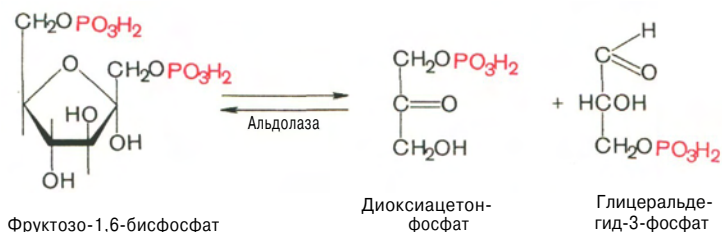


Данная реакция аналогично гексокиназной практически необратима, протекает в присутствии ионов магния и является наиболее медленно текущей реакцией гликолиза. Фактически эта реакция определяет скорость гликолиза в целом.

Фосфофруктокиназа относится к числу аллостерических ферментов. Она ингибируется АТФ и стимулируется АМФ\*. 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:

\* 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.



Эта реакция обратима. В зависимости от температуры равновесие устанавливается на различном уровне. При повышении температуры реакция сдвигается в сторону большего образования триозофосфатов (дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата)\*.

Пятая реакция—это реакция изомеризации триозофосфатов. Катализируется ферментом триозофосфатизомеразой:



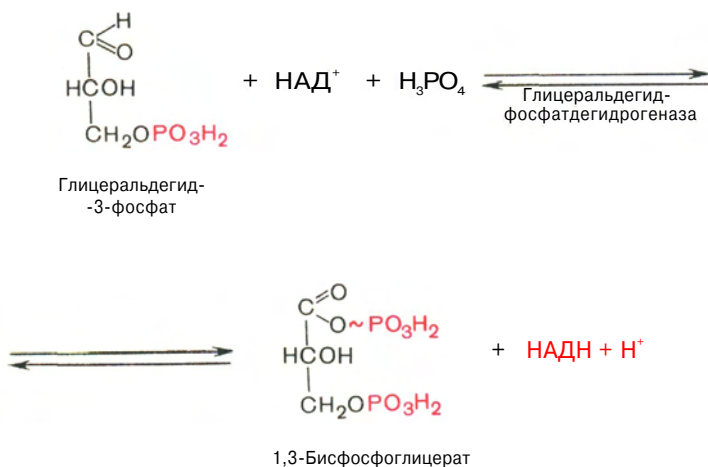
Равновесие данной изомеразной реакции сдвинуто в сторону дигидроксиацетонфосфата: 95% дигидроксиацетонфосфата и около 5% глицеральдегид-3-фосфата. В последующие реакции гликолиза может непосредственно включаться только один из двух образующихся триозофосфатов, а именно глицеральдегид-3-фосфат. Вследствие этого по мере потребления в ходе дальнейших превращений альдегидной формы фосфотриозы дигидроксиацетонфосфат 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 (реакция 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 кислоты\*\* и восстановленной формы НАД (НАДН). Эта реакция блокируется йод- или бромацетатом, протекает в несколько этапов:

\* Животные ткани содержат по меньшей мере три различные альдолазы, характерные для мышцы, печени и мозга соответственно. Все альдолазы расщепляют фруктозо-1,6-бисфосфат до диоксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата и могут катализировать обратную конденсацию диоксиацетонфосфата с различными оксиальдегидами, хотя и с неодинаковой скоростью.

\*\* 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.



1,3-Бисфосфоглицерат представляет собой высокоэнергетическое соединение (макроэнергетическая связь условно обозначена знаком «тильда» ~). Механизм действия глицеральдегидфосфатдегидрогеназы сводится к следующему: в присутствии неорганического фосфата НАД<sup>+</sup> выступает как акцептор водорода, отщепляющегося от глицеральдегид-3-фосфата. В процессе образования НАДН глицеральдегид-3-фосфат связывается с молекулой фермента за счет SH-групп последнего. Образовавшаяся связь богата энергией, но она непрочная и расщепляется под влиянием неорганического фосфата, при этом образуется 1,3-бисфосфоглицериновая кислота.

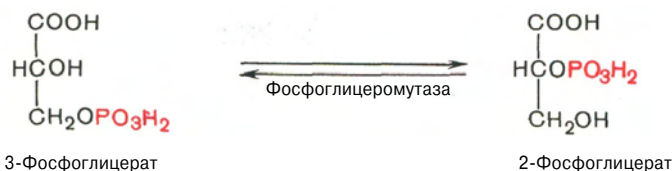
Седьмая реакция катализируется фосфоглицераткиназой, при этом происходит передача богатого энергией фосфатного остатка (фосфатной группы в положении 1) на АДФ с образованием АТФ и 3-фосфоглицериновой кислоты (3-фосфоглицерат):



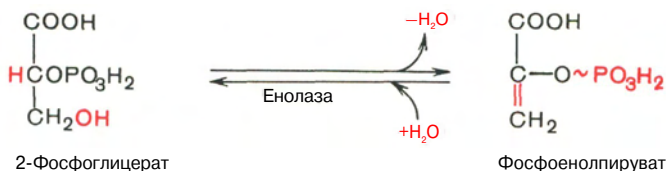
Таким образом, благодаря действию двух ферментов (глицеральдегидфосфатдегидрогеназы и фосфоглицераткиназы) энергия, высвобождающаяся при окислении альдегидной группы глицеральдегид-3-фосфата до карбоксильной группы, запасается в форме энергии АТФ. В отличие от окислительного фосфорилирования образование 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 легкообратима, протекает в присутствии ионов Mg<sup>2+</sup>. Кофактором фермента является также 2,3-бисфосфоглицериновая кислота аналогично тому, как в фосфоглюкомутазной реакции роль кофактора выполняет глюкозо-1,6-бисфосфат:



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  $\text{Mg}^{2+}$  или  $\text{Mn}^{2+}$  и ингибируется фторидом.

Десятая реакция характеризуется разрывом высокоэнергетической связи и переносом фосфатного остатка от фосфоенолпирувата на АДФ (субстратное фосфорилирование). Катализируется ферментом пируваткиназой:

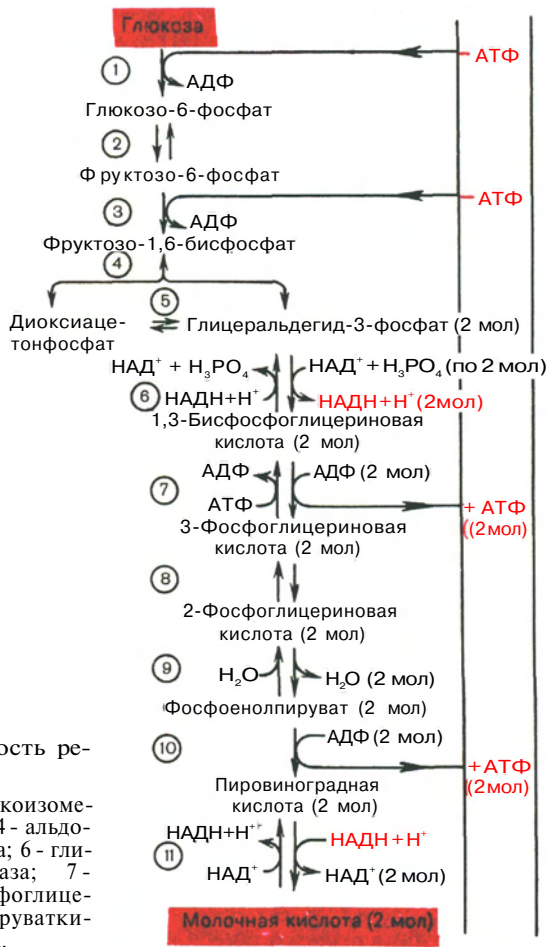


Для действия пируваткиназы необходимы ионы  $\text{Mg}^{2+}$ , а также одновалентные катионы щелочных металлов ( $\text{K}^+$  или др.). Внутри клетки реакция является практически необратимой.

В результате одиннадцатой реакции происходит восстановление пировиноградной кислоты и образуется молочная кислота. Реакция протекает при участии фермента лактатдегидрогеназы и кофермента НАДН, образовавшегося в шестой реакции:



Последовательность протекающих при гликолизе реакций представлена на рис. 10.3.



**Рис. 10.3.** Последовательность реакций гликолиза.

1 - гексокиназа; 2 - фосфоглюкоизомераза; 3 - фосфофруктокиназа; 4 - альдолаза; 5 - триозофосфатизомераза; 6 - глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; 7 - фосфоглицераткиназа; 8 - фосфоглицеромутаза; 9 - енолаза; 10 - пируваткиназа; 11 - лактатдегидрогеназа.

Реакция восстановления пирувата завершает внутренний окислительно-восстановительный цикл гликолиза.  $\text{НАД}^+$  при этом играет роль промежуточного переносчика водорода от глицеральдегид-3-фосфата (6-я реакция) на пировиноградную кислоту (11-я реакция), при этом сам он регенерируется и вновь может участвовать в циклическом процессе, получившем название гликолитический оксидоредукции.

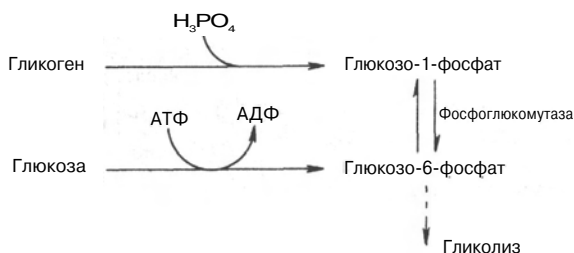
Биологическое значение процесса гликолиза заключается прежде всего в образовании богатых энергией фосфорных соединений. На первых стадиях гликолиза затрачиваются 2 молекулы АТФ (гексокиназная и фосфофруктокиназная реакции). На последующих образуются 4 молекулы АТФ (фосфоглицераткиназная и пируваткиназная реакции). Таким образом, энергетическая эффективность гликолиза в анаэробных условиях составляет 2 молекулы АТФ на одну молекулу глюкозы.

Как отмечалось, основной реакцией, лимитирующей скорость гликолиза, является фосфофруктокиназная. Вторая реакция, лимитирующая скорость и регулирующая гликолиз—гексокиназная реакция. Кроме того, контроль гликолиза осуществляется также ЛДГ и ее изоферментами.

В тканях с аэробным метаболизмом (ткани сердца, почек и др.) преобладают изоферменты ЛДГ<sub>1</sub> и ЛДГ<sub>2</sub> (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 ЛДГ<sub>3</sub> и ЛДГ<sub>4</sub>. Активность ЛДГ<sub>3</sub> максимальна при тех концентрациях пирувата, которые ингибируют ЛДГ<sub>1</sub>. Преобладание изоферментов ЛДГ<sub>4</sub> и ЛДГ<sub>5</sub> обуславливает интенсивный анаэробный гликолиз с быстрым превращением пирувата в молочную кислоту.

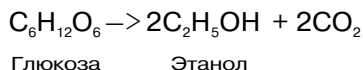
Как отмечалось, процесс анаэробного распада гликогена получил название гликогенолиза. Вовлечение D-глюкозных единиц гликогена в процесс гликолиза происходит при участии 2 ферментов— фосфорилазы *a* и фосфоглюкомутазы. Образовавшийся в результате фосфоглюкомутазной реакции глюкозо-6-фосфат может включаться 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 (АТФ не тратится на образование глюкозо-6-фосфата). Кажется, что 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. 10.2).

## Спиртовое брожение

Спиртовое брожение осуществляется так называемыми дрожжеподобными организмами, а также некоторыми плесневыми грибами. Суммарную реакцию спиртового брожения можно изобразить следующим образом:

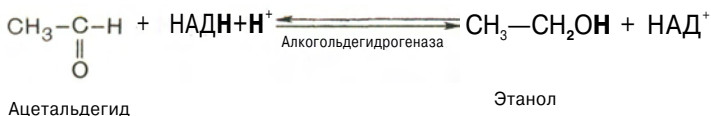


Механизм реакции спиртового брожения чрезвычайно близок к гликолизу. Расхождение начинается лишь после этапа образования пирувата. При гликолизе пируват при участии фермента ЛДГ и кофермента НАДН восстанавливается в лактат. При спиртовом брожении этот конечный этап заменен двумя другими ферментативными 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 Mg и кофермента (ТПФ):



Образовавшийся ацетальдегид присоединяет к себе водород, отщепляемый от НАДН, восстанавливаясь при этом в этанол. Реакция катализируется ферментом алкогольдегидрогеназой:



Таким образом, конечными продуктами спиртового брожения являются этанол и CO<sub>2</sub>, а не молочная кислота, как при гликолизе.

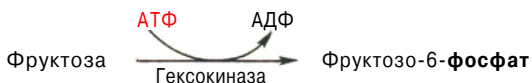
Процесс молочнокислого брожения имеет большое сходство со спиртовым брожением. Отличие заключается лишь в том, что при молочнокислом брожении пировиноградная кислота не декарбоксилируется, а, как и при гликолизе в животных тканях, восстанавливается при участии ЛДГ за счет водорода НАДН.

Известны 2 группы молочно-кислых бактерий. Бактерии одной группы в процессе брожения углеводов образуют только молочную кислоту, а бактерии другой из каждой молекулы глюкозы «производят» по одной молекуле молочной кислоты, этанола и CO<sub>2</sub>.

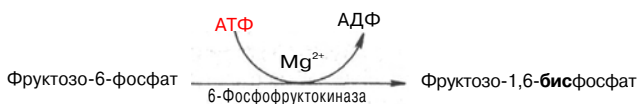
Существуют и другие виды брожения, конечными продуктами которых могут являться пропионовая, масляная и янтарная кислоты, а также другие соединения.

## Включение других углеводов в процесс гликолиза

**Фруктоза.** Установлено, что фруктоза, присутствующая в свободном виде во многих фруктах и образующаяся в тонкой кишке из сахарозы, всасываясь в тканях, может подвергаться фосфорилированию во фруктозо-6-фосфат при участии фермента гексокиназы и АТФ:

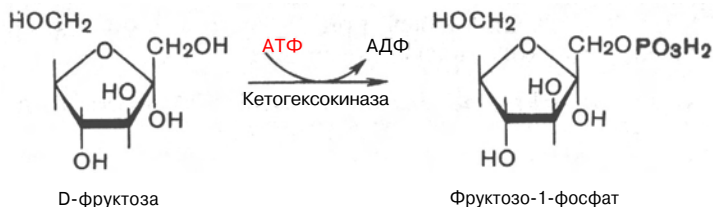


Эта реакция ингибируется глюкозой. Образовавшийся фруктозо-6-фосфат либо превращается в глюкозу через стадии образования глюкозо-6-фосфата и последующего отщепления фосфорной кислоты (рис. 10.4), либо подвергается дальнейшим превращениям. Из фруктозо-6-фосфата под влиянием 6-фосфофруктокиназы и АТФ образуется фруктозо-1,6-бисфосфат:



Далее фруктозо-1,6-бисфосфат может подвергаться дальнейшим превращением по пути гликолиза. Таков главный путь включения фруктозы в метаболизм мышечной ткани, почек, жировой ткани.

В печени, однако, для этого существует другой путь. В ней имеется фермент фруктокиназа, который катализирует фосфорилирование фруктозы не по 6-му, а по 1-му атому углерода:

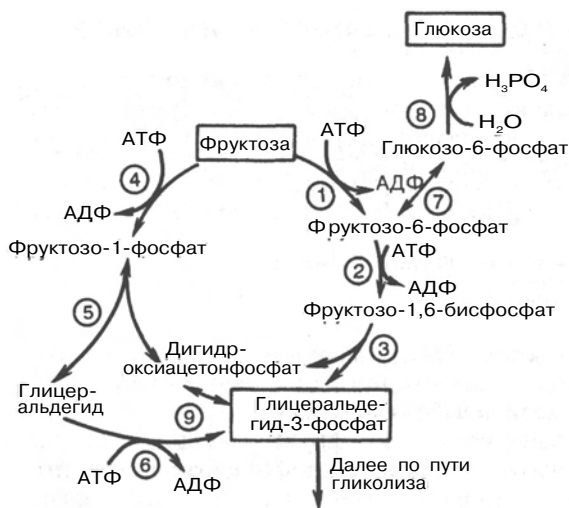


Эта реакция не блокируется глюкозой. Образовавшийся фруктозо-1-фосфат расщепляется затем под действием кетозо-1-фосфатальдолазы на диоксиацетонфосфат и D-глицеральдегид:



Образовавшийся D-глицеральдегид под влиянием соответствующей киназы (триокиназы) подвергается фосфорилированию до глицеральдегид-3-фосфата. В этот же промежуточный продукт гликолиза переходит и дигидроксиацетонфосфат.

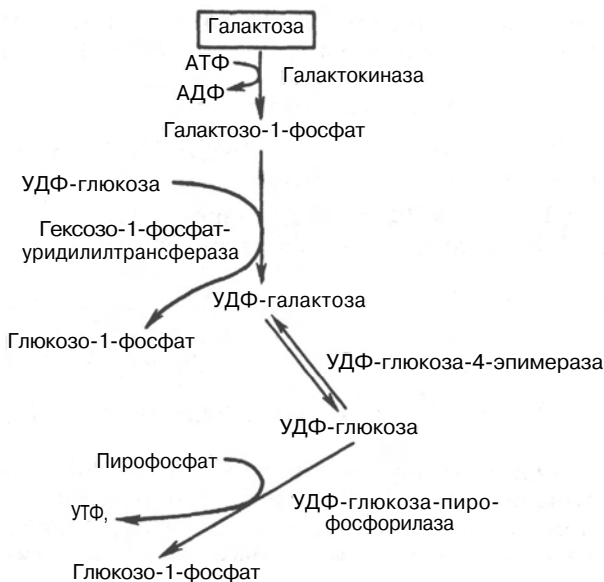
Существует врожденная аномалия обмена фруктозы, или эссенциальная фруктозурия, которая связана с врожденным недостатком фермента фруктокиназы, т.е. в организме не образуется фруктозо-1-фосфат. В резуль-



**Рис. 10.4.** Метаболизм фруктозы.

1 - гексокиназа; 2 - 6-фосфофруктокиназа; 3 - фруктозобисфосфатальдолаза; 4 - кетогексокиназа; 5 - кетозо-1-фосфатальдолаза; 6 - триокиназа; 7 - глюкозофосфатизомераза; 8 - глюкозо-6-фосфатаза; 9 - триозофосфатизомераза.



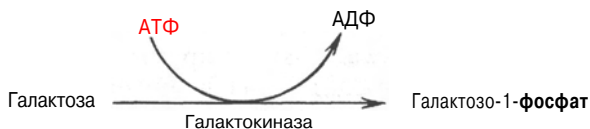


**Рис. 10.5.** Метаболизм галактозы.

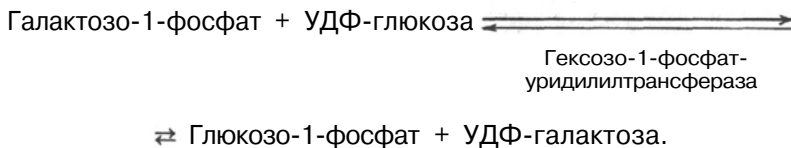
тате обмен фруктозы возможен только путем фосфорилирования до фруктозо-6-фосфата, но эта реакция тормозится глюкозой, вследствие чего фруктоза накапливается в крови. «Почечный порог» для фруктозы очень низок, поэтому фруктозурия обнаруживается уже при концентрации фруктозы в крови 0,73 ммоль/л.

**Галактоза.** Основным источником галактозы является лактоза пищи, которая в пищеварительном тракте расщепляется до галактозы и глюкозы (рис. 10.5).

Обмен галактозы начинается с превращения ее в галактозо-1-фосфат. Эта реакция катализируется галактокиназой с участием АТФ:

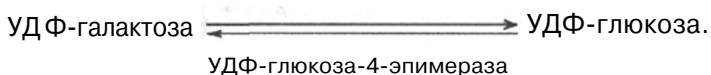


В следующей реакции в присутствии УДФ-глюкозы фермент гексо-1-фосфатуридилтрансфераза катализирует превращение галактозо-1-фосфата в глюкозо-1-фосфат, одновременно образуется уридиндифосфат-галактоза (УДФ-галактоза):

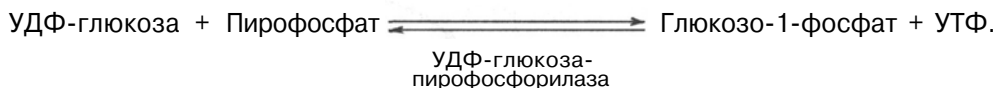


Образовавшийся глюкозо-1-фосфат в дальнейшем либо переходит в глюкозо-6-фосфат и далее подвергается уже известным превращениям,

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 дальнейших превращениях глюкозо-1-фосфата см. ранее.

Одно из патологических состояний, возникающих в результате нарушения обмена углеводов,— это рецессивно наследуемое заболевание галактоземия. При этом заболевании общее содержание моносахаридов в крови повышается главным образом за счет уровня галактозы, достигая 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 данной болезни у новорожденных связано с недостатком фермента гексозо-1-фосфатуридилтрансферазы. 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 пирувиноградная кислоты, так называемые гликогенные аминокислоты, глицерол и ряд других соединений. Иными словами, предшественниками глюкозы в глюконеогенезе может быть пируват или любое соединение, превращающееся в процессе катаболизма в пируват или один из промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот\*.

У позвоночных наиболее интенсивно глюконеогенез протекает в клетках печени и почек (в корковом веществе).

Большинство стадий глюконеогенеза представляет собой обращение реакции гликолиза. Только 3 реакции гликолиза (гексокиназная, фосфофруктокиназная и пируваткиназная) необратимы, поэтому в процесс глюконеогенеза на 3 этапах используются другие ферменты. Рассмотрим путь синтеза глюкозы из пирувата.

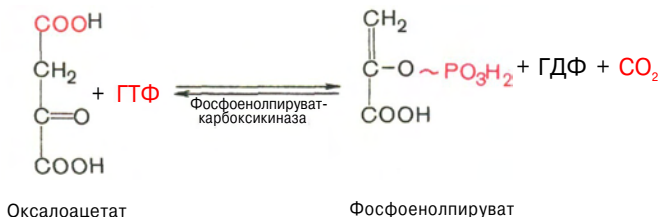
**Образование фосфоенолпирувата из пирувата.** Синтез фосфоенолпирувата осуществляется в несколько этапов. Первоначально пируват под влиянием

\* 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: изоцитратлиаза и малат-синтаза, поэтому у них этот цикл осуществляться не может.

пируваткарбоксилазы и при участии  $\text{CO}_2$  и АТФ карбоксилируется\* с образованием оксалоацетата:



Затем оксалоацетат в результате декарбоксилирования и фосфорилирования под влиянием фермента фосфоенолпируваткарбоксилазы превращается в фосфоенолпируват. Донором фосфатного остатка в реакции служит гуанозинтрифосфат (ГТФ):



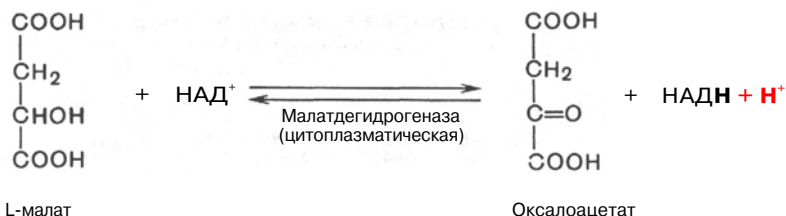
Установлено, что в процессе образования фосфоенолпирувата участвуют ферменты цитозоля и митохондрий.

Первый этап синтеза протекает в митохондриях (рис. 10.6). Пируваткарбоксилаза, которая катализирует эту реакцию, является аллостерическим митохондриальным ферментом. В качестве аллостерического активатора данного фермента необходим ацетил-КоА. Мембрана митохондрий непроницаема для образовавшегося оксалоацетата. Последний здесь же, в митохондриях, восстанавливается в малат:



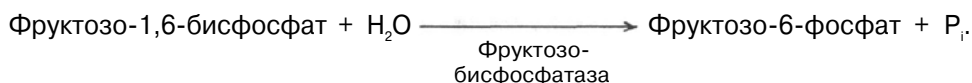
Реакция протекает при участии митохондриальной НАД-зависимой малатдегидрогеназы. В митохондриях отношение  $\text{НАДН}/\text{НАД}^+$  относительно велико, в связи с чем внутримитохондриальный оксалоацетат легко восстанавливается в малат, который легко выходит из митохондрии через митохондриальную мембрану. В цитозоле отношение  $\text{НАДН}/\text{НАД}^+$  очень мало, и малат вновь окисляется при участии цитоплазматической НАД-зависимой малатдегидрогеназы:

\* В реакцию вступает так называемая активная форма  $\text{CO}_2$ , в образовании которой, помимо АТФ, участвует биотин (см. главу 7).

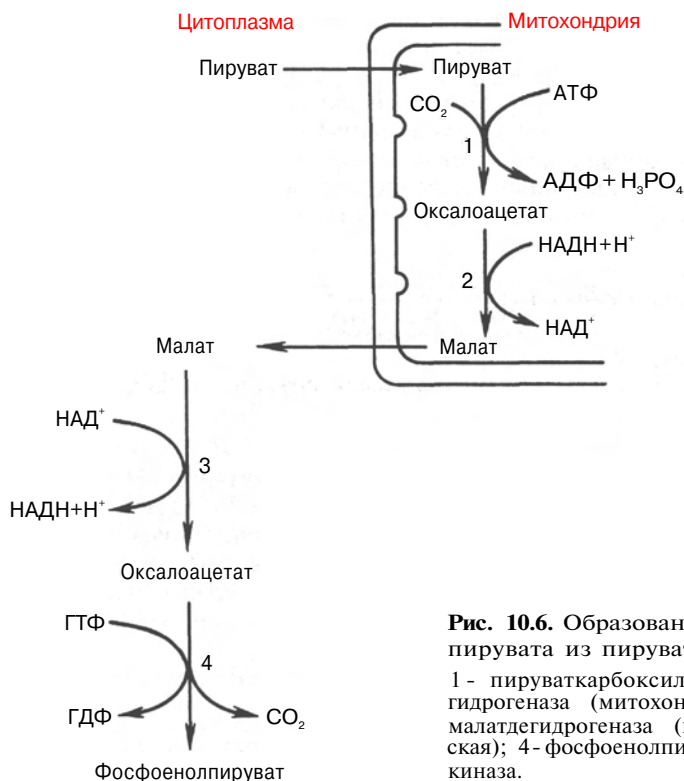


Дальнейшее превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват происходит в цитозоле клетки.

**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:

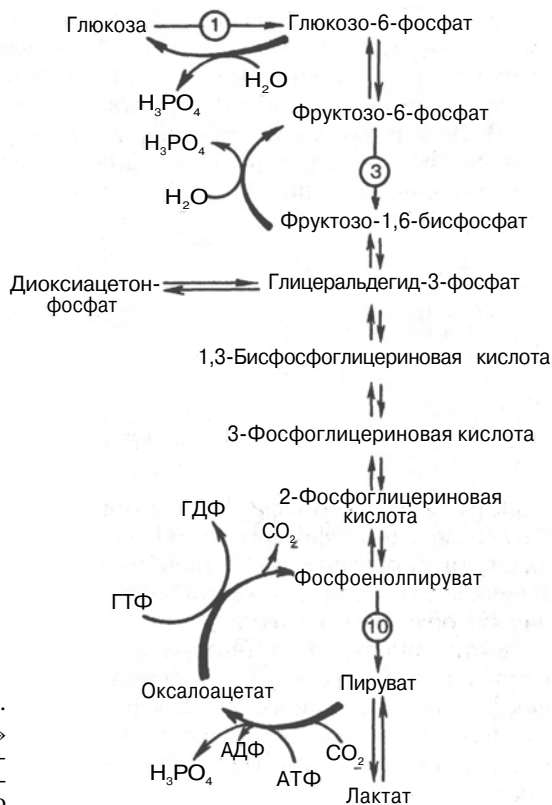


**Образование глюкозы из глюкозо-6-фосфата.** В последующей обратимой стадии биосинтеза глюкозы фруктозо-6-фосфат превращается в глюко-



**Рис. 10.6.** Образование фосфоенолпирувата из пирувата.

1 - пируваткарбоксилаза; 2 - малатдегидрогеназа (митохондриальная); 3 - малатдегидрогеназа (цитоплазматическая); 4 - фосфоенолпируват-карбоксикиназа.



**Рис. 10.7.** Гликолиз и глюконеогенез. Красными стрелками указаны «обходные» пути глюконеогенеза при биосинтезе глюкозы из пирувата и лактата; цифры в кружках обозначают соответствующую стадию гликолиза.

зо-6-фосфат. Последний может дефосфорилироваться (т.е. реакция идет в обход гексокиназной реакции) под влиянием фермента глюкозо-6-фосфатазы:



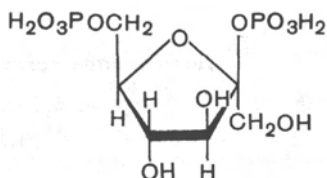
На рис. 10.7 представлены «обходные» реакции глюконеогенеза при биосинтезе глюкозы из пирувата и лактата.

**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 в клетке накапливается митохондриальный ацетил-КоА, биосинтез глюкозы из пирувата усиливается. Известно, что ацетил-КоА одновременно является отрицательным модулятором пируватдегидрогеназного комплекса (см. далее). Следовательно, накопление ацетил-КоА замедляет окислительное декарбоксилирование пирувата, что также способствует превращению последнего в глюкозу.

Другой важный момент в регуляции глюконеогенеза — реакция, катализируемая фруктозо-1,6-бисфосфатазой — ферментом, который ингибируется АМФ. Противоположное действие АМФ оказывает на фосфофрукто-

киназу, 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 мала, в клетке наблюдается расщепление глюкозы.

В 1980 г. группой бельгийских исследователей (Г. Херс и др.) в ткани печени был открыт фруктозо-2,6-бисфосфат, который является мощным регулятором активности двух перечисленных 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 активностью:



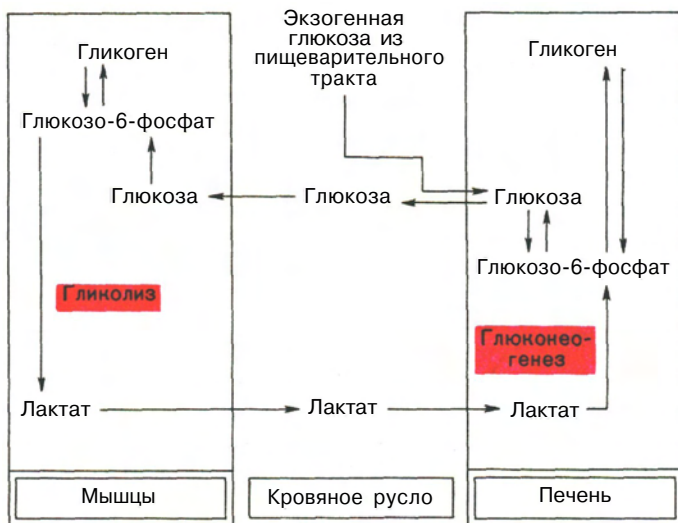
Показано также, что бифункциональный фермент в свою очередь регулируется путем цАМФ-зависимого фосфорилирования. Фосфорилирование приводит к увеличению фосфатазной активности и снижению фосфокиназной активности бифункционального фермента. Этот механизм объясняет быстрое воздействие гормонов, в частности глюкагона, на уровень фруктозо-2,6-бисфосфата в клетке (см. главу 16).

Активность бифункционального фермента регулируется также 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 2 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 происходит ингибирование L-формы пируваткиназы. Как следствие ингибирования замедляется гликолиз 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, в печени значительная ее часть превращается в глюкозу (глюконеогенез). Такая глюкоза затем может быть использована как энергетический субстрат, необходимый для деятельности мышечной ткани. Взаимосвязь между процессами гликолиза в мышечной ткани и глюконеогенезом в печени может быть представлена в виде схемы:



## АЭРОБНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ПИРУВАТА

Клетки, недостаточно снабжаемые кислородом, могут частично или полностью существовать за счет энергии гликолиза. Однако большинство животных и растительных клеток в норме находится в аэробных условиях и свое органическое «топливо» окисляет полностью до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . В этих условиях пируват, образовавшийся при расщеплении глюкозы, не восста-

навливается до лактата, а постепенно окисляется до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  в аэробной стадии катаболизма, при этом первоначально происходит окислительное декарбоксилирование пирувата с образованием ацетил-КоА.

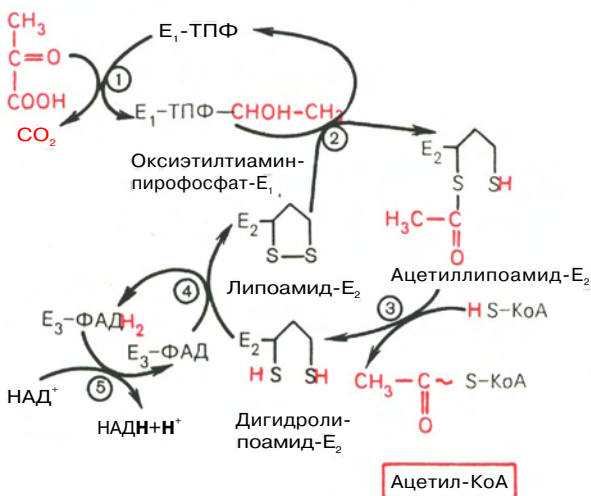
## Окислительное декарбоксилирование пирувиноградной кислоты

Окисление пирувата до ацетил-КоА происходит при участии ряда ферментов и коферментов, объединенных структурно в мультиферментную систему, получившую название «пируватдегидрогеназный комплекс».

На I стадии этого процесса пируват (рис. 10.8) теряет свою карбоксильную группу в результате взаимодействия с тиаминпирофосфатом (ТПФ) в составе активного центра фермента пируватдегидрогеназы ( $E_1$ ). На II стадии оксиэтильная группа комплекса  $E_1$ -ТПФ- $\text{CHON-CH}_2$  окисляется с образованием ацетильной группы, которая одновременно переносится на амид липоевой кислоты (кофермент), связанной с ферментом дигидролипоилацетилтрансферазой ( $E_2$ ). Этот фермент катализирует III стадию — перенос ацетильной группы на коэнзим КоА ( $\text{HS-CoA}$ ) с образованием конечного продукта ацетил-КоА, который является высокоэнергетическим (макроэргическим) соединением.

На IV 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 V стадии восстановленный ФАДН<sub>2</sub> дигидролипоилдегидрогеназы передает водород на кофермент НАД с образованием НАДН +  $\text{H}^+$ .

Процесс окислительного декарбоксилирования пирувата происходит в матриксе митохондрий. В нем принимают участие (в составе сложного мультиферментного комплекса) 3 фермента (пируватдегидрогеназа, дигидролипоилацетилтрансфераза, дигидролипоилдегидрогеназа) и 5 коферментов (ТПФ, амид липоевой кислоты, коэнзим А, ФАД и НАД), из



**Рис. 10.8.** Механизм действия пируватдегидрогеназного комплекса.

$E_1$  - пируватдегидрогеназа;  $E_2$  - дигидролипоилацетилтрансфераза;  $E_3$  - дигидролипоилдегидрогеназа; цифры в кружках обозначают стадии процесса.



которых три относительно прочно связаны с ферментами (ТПФ-Е<sub>1</sub>, липоамид-Е<sub>2</sub> и ФАД-Е<sub>3</sub>), а два—легко диссоциируют (НС-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 дигидролипоил-ацетилтрансферазы составляют как бы ядро комплекса, вокруг которого расположены пируватдегидрогеназа и дигидролипоилдегидрогеназа. Принято считать, что нативный ферментный комплекс образуется путем самосборки.

Суммарную реакцию, катализируемую пируватдегидрогеназным комплексом, можно представить следующим образом:



Реакция сопровождается значительным уменьшением стандартной свободной энергии и практически необратима.

Образовавшийся в процессе окислительного декарбоксилирования ацетил-КоА подвергается дальнейшему окислению с образованием  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Полное окисление ацетил-КоА происходит в цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса). Этот процесс, так же как окислительное декарбоксилирование пирувата, происходит в митохондриях клеток.

## ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ (ЦИКЛ КРЕБСА)

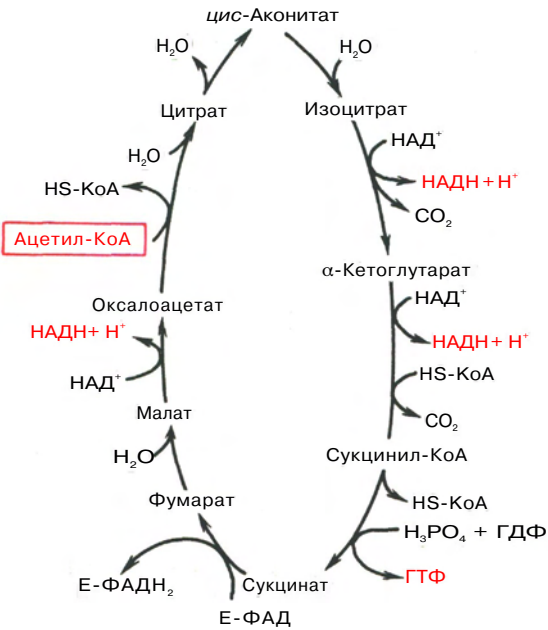
Цикл трикарбоновых кислот впервые был открыт английским биохимиком Г. Кребсом\*.

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-КоА), в которые превращается в процессе катаболизма большая часть органических молекул, играющих роль «клеточного топлива»: углеводов, жирных кислот и аминокислот.

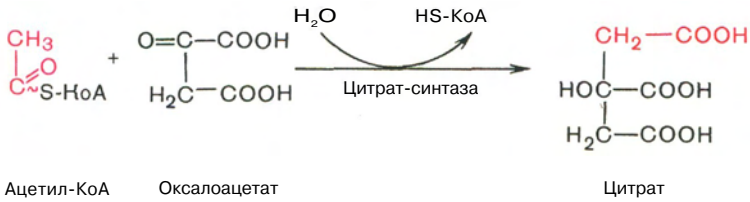
Образовавшийся в результате окислительного декарбоксилирования пирувата в митохондриях ацетил-КоА вступает в цикл Кребса. Данный цикл происходит в матриксе митохондрий и состоит из восьми последовательных реакций (рис. 10.9). Начинается цикл с присоединения ацетил-КоА к оксалоацетату и образования лимонной кислоты (цитрата). Затем лимонная кислота (шестиуглеродное соединение) путем ряда дегидрирований (отнятие водорода) и двух декарбоксилирований (отщепление  $\text{CO}_2$ ) теряет два углеродных атома и снова в цикле Кребса превращается в оксалоацетат (четыреуглеродное соединение), т.е. в результате полного оборота цикла одна молекула ацетил-КоА сгорает до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , а молекула оксалоацетата регенерируется. Рассмотрим все восемь последовательных реакций (этапов) цикла Кребса.

\* 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 (цикл лимонной кислоты Кребса).

**Рис. 10.9.** Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса).

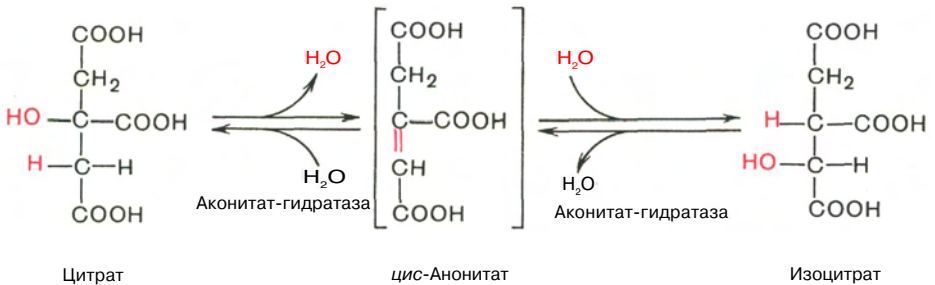


Первая реакция катализируется ферментом цитрат-синтазой, при этом ацетильная группа ацетил-КоА конденсируется с оксалоацетатом, в результате чего образуется лимонная кислота:



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-CoA.

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:

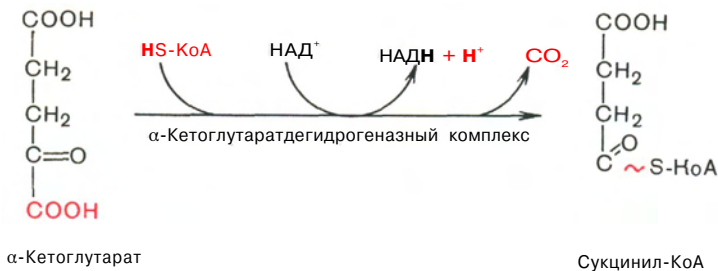


Третья реакция, по-видимому, лимитирует скорость цикла Кребса. Исолимонная кислота дегидрируется в присутствии НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы \*.



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 таковым реакции окислительного декарбоксилирования пирувата до ацетил-КоА, α-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс напоминает по своей структуре пируватдегидрогеназный комплекс. Как в одном, так и в другом случае в реакции принимают участие 5 коферментов: ТПФ, амид липоевой кислоты, HS-КоА, ФАД и НАД<sup>+</sup>.



Пятая реакция катализируется ферментом сукцинил-КоА-синтетазой. В ходе этой реакции сукцинил-КоА при участии ГТФ и неорганического фосфата превращается в янтарную кислоту (сукцинат). Одновременно происходит образование высокоэнергетической фосфатной связи ГТФ \*\* за счет высокоэнергетической тиоэфирной связи сукцинил-КоА:

\* В митохондриях существует 2 типа изоцитратдегидрогеназ: НАД- и НАДФ-зависимый; первый тип встречается только в митохондриях, второй - как в митохондриях, так и в цитозоле.

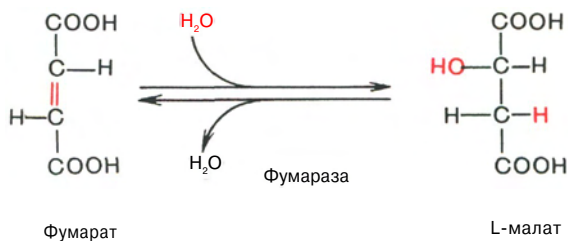
\*\* Образовавшийся ГТФ отдает затем свою концевую фосфатную группу на АДФ, вследствие чего образуется АТФ. Образование высокоэнергетического нуклеозидтрифосфата в ходе сукцинил-КоА-синтетазной реакции - еще один пример фосфорилирования на уровне субстрата (субстратное фосфорилирование).



В результате шестой реакции сукцинат дегидрируется в фумаровую 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). Образовавшаяся при этом фумаровая 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:



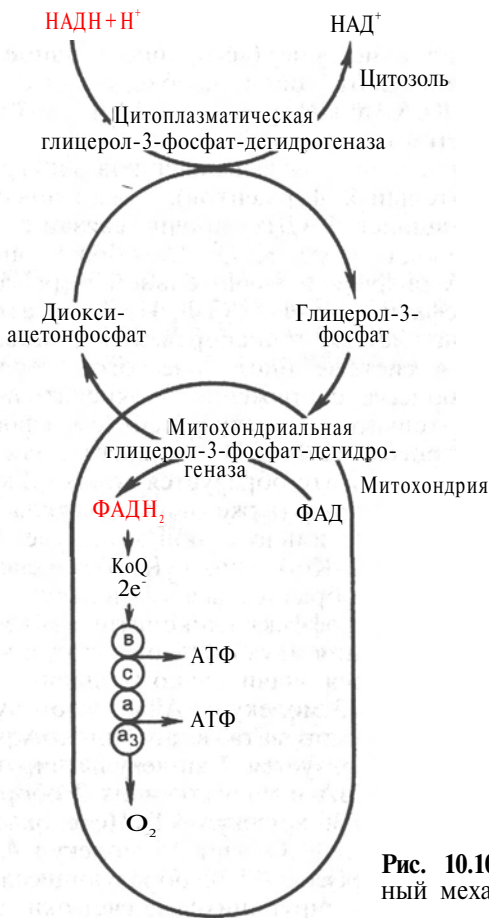
Как видно, за один оборот цикла, состоящего из восьми ферментативных реакций, происходит полное окисление («сгорание») одной молекулы ацетил-КоА. Для непрерывной работы цикла необходимо постоянное поступление в систему ацетил-КоА, а коферменты (НАД<sup>+</sup> и ФАД), перешедшие в восстановленное состояние, должны снова и снова окисляться. Это окисление осуществляется в системе переносчиков электронов в дыхательной цепи (в цепи дыхательных ферментов), локализованной в мембране митохондрий. Образовавшийся ФАДН<sub>2</sub> прочно связан с СДГ, поэтому он передает атомы водорода через КоQ. Освобождающаяся в результате окисления ацетил-КоА энергия в значительной мере сосредоточивается в макроэргических фосфатных связях АТФ. Из 4 пар атомов водорода 3 пары переносят НАДН на систему транспорта электронов; при этом в расчете на каждую пару в системе биологического окисления образуется 3 молекулы АТФ (в процессе сопряженного окислительного фосфорилирования), а всего, следовательно, 9 молекул АТФ (см. главу 9). Одна пара атомов от сукцинатдегидрогеназы-ФАДН<sub>2</sub> попадает в систему транспорта электронов через КоQ, в результате образуется только 2 молекулы АТФ. В ходе цикла Кребса синтезируется также одна молекула ГТФ (субстратное фосфорилирование), что равносильно одной молекуле АТФ. Итак, при окислении одной молекулы ацетил-КоА в цикле Кребса и системе окислительного фосфорилирования может образоваться 12 молекул АТФ.

Если подсчитать полный энергетический эффект гликолитического расщепления глюкозы и последующего окисления двух образовавшихся молекул пирувата до СО<sub>2</sub> и Н<sub>2</sub>О, то он окажется значительно большим.

Как отмечалось, одна молекула НАДН (3 молекулы АТФ) \* образуется при окислительном декарбоксилировании пирувата в ацетил-КоА. При расщеплении одной молекулы глюкозы образуется 2 молекулы пирувата, а при окислении их до 2 молекул ацетил-КоА и последующих 2 оборотов цикла трикарбоновых кислот синтезируется 30 молекул АТФ (следовательно, окисление молекулы пирувата до СО<sub>2</sub> и Н<sub>2</sub>О дает 15 молекул АТФ). К этому количеству надо добавить 2 молекулы АТФ, образующиеся при аэробном гликолизе, и 6 молекул АТФ, синтезирующихся за счет окисления 2 молекул внемитохондриального НАДН, которые образуются при окислении 2 молекул глицеральдегид-3-фосфата в дегидрогеназной реакции гликолиза. Следовательно, при расщеплении в тканях одной молекулы глюкозы по уравнению  $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$  синтезируется 38 молекул АТФ. Несомненно, что в энергетическом отношении полное расщепление глюкозы является более эффективным процессом, чем анаэробный гликолиз.

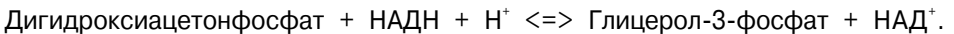
Необходимо отметить, что образовавшиеся в процессе превращения глицеральдегид-3-фосфата 2 молекулы НАДН в дальнейшем при окислении могут давать не 6 молекул АТФ, а только 4. Дело в том, что сами молекулы внемитохондриального НАДН не способны проникать через мембрану внутрь митохондрий. Однако отдаваемые ими электроны могут включаться в митохондриальную цепь биологического окисления с помощью так называемого глицеролфосфатного челночного механизма (рис. 10.10). Цитоплазматический НАДН сначала реагирует с цитоплазматическим дигидроксиацетонфосфатом, образуя глицерол-3-фосфат. Реакция катализи-

\* Напомним, что при прохождении по цепи дыхательных ферментов восстановительные эквиваленты НАДН генерируют три высокоэнергетические фосфатные связи посредством образования АТФ из АДФ в процессе окислительного фосфорилирования (см. главу 9).

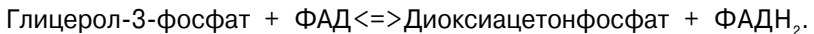


**Рис. 10.10.** Глицеролфосфатный челночный механизм. Объяснение в тексте.

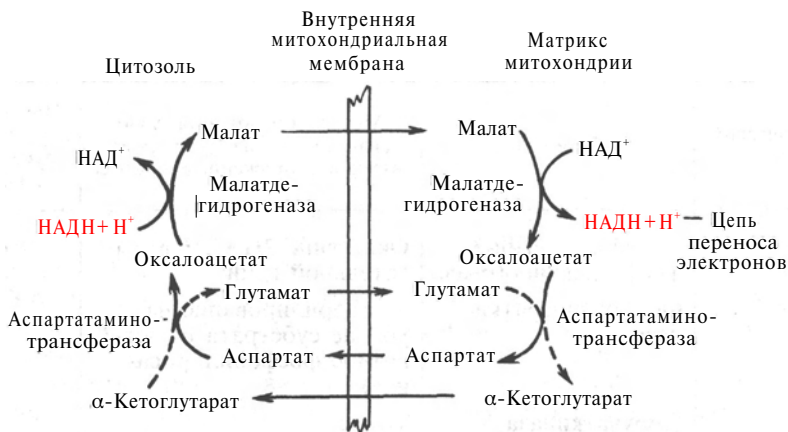
руется  $\text{НАД}$ -зависимой цитоплазматической глицерол-3-фосфат-дегидрогеназой:



Образовавшийся глицерол-3-фосфат легко проникает через митохондриальную мембрану. Внутри митохондрии другая (митохондриальная) глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа (флавиновый фермент) снова окисляет глицерол-3-фосфат до диоксиацетонфосфата:



Восстановленный флавопротеин (фермент- $\text{ФАДН}_2$ ) вводит на уровне  $\text{КоQ}$  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  $\text{НАДН} + \text{Н}^+$ . Таким образом, пара электронов (из одной молекулы цитоплазматического  $\text{НАДН} + \text{Н}^+$ ), вводимая в дыхательную цепь с помощью глицеролфосфатного челночного механизма, дает не 3, а 2  $\text{АТФ}$ .



**Рис. 10.11.** Малат-аспаратная челночная система для переноса восстанавливающих эквивалентов от цитозольного НАДН в митохондриальный матрикс. Объяснение в тексте.

В дальнейшем было показано, что с помощью данного челночного механизма лишь в скелетных мышцах и мозге осуществляется перенос восстановленных эквивалентов от цитозольного  $\text{НАДН} + \text{H}^+$  в митохондрии.

В клетках печени, почек и сердца действует более сложная малат-аспаратная челночная система. Действие такого челночного механизма становится возможным благодаря присутствию малатдегидрогеназы и аспартаминотрансферазы как в цитозоле, так и в митохондриях.

Установлено, что от цитозольного  $\text{НАДН} + \text{H}^+$  восстановленные эквиваленты сначала при участии фермента малатдегидрогеназы (рис. 10.11) переносятся на цитозольный оксалоацетат. В результате образуется малат, который с помощью системы, транспортирующей дикарбоновые кислоты, проходит через внутреннюю мембрану митохондрии в матрикс. Здесь малат окисляется в оксалоацетат, а матриксный  $\text{НАД}^+$  восстанавливается в  $\text{НАДН} + \text{H}^+$ , который может теперь передавать свои электроны в цепь дыхательных ферментов, локализованную на внутренней мембране митохондрии. В свою очередь образовавшийся оксалоацетат\* в присутствии глутамата и фермента АсАТ вступает в реакцию трансминирования. Образующиеся аспарат и  $\alpha$ -кетоглутарат с помощью специальных транспортных систем способны проходить через мембрану митохондрий.

Транспортирование в цитозоле регенерирует оксалоацетат, что вызывает к действию следующий цикл. В целом процесс включает легкообратимые реакции, происходит без потребления энергии, «движущей силой» его является постоянное восстановление  $\text{НАД}^+$  в цитозоле глицеральдегид-3-фосфатом, образующимся при катаболизме глюкозы.

Итак, если функционирует малат-аспаратный механизм, то в результате полного окисления одной молекулы глюкозы может образоваться не 36, а 38 молекул АТФ (табл. 10.1).

\* Образовавшийся оксалоацетат непосредственно не может возвратиться в цитозоль через мембрану.

Таблица 10.1. Образование высокоэнергетических фосфатных связей в ходе катаболизма глюкозы

Метаболический путь	Фермент	Место образования АТФ (точнее, высокоэнергетической связи) и сопряженный процесс	Число АТФ, образовавшихся на 1 моль глюкозы
Гликолиз	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Окисление 2НАДН в дыхательной цепи	6*
	Фосфолицераткиназа	Фосфорилирование на уровне субстрата (субстратное фосфорилирование)	2
	Пируваткиназа	То же	2
		Итого...	10
С учетом расходования АТФ в реакциях, катализируемых гексокиназой и фосфофруктокиназой			-2
		Итого...	8
Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты	Пируватдегидрогеназа (пируватдегидрогеназный комплекс)	Окисление 2НАДН в дыхательной цепи	6
		Итого...	6
Цикл лимонной кислоты (цикл Кребса)	Изоцитратдегидрогеназа	Окисление 2НАДН в дыхательной цепи	6
	$\alpha$ -Кетоглутаратдегидрогеназа	То же	6
	Сукцинил-КоА-синтетаза (сукцинаттотиназа)	Фосфорилирование на уровне субстрата (субстратное фосфорилирование)	2
	Сукцинатдегидрогеназа	Окисление 2 ФАДН <sub>2</sub> в дыхательной цепи	4
	Малатдегидрогеназа	Окисление 2НАДН в дыхательной цепи	6
		Итого...	24
<b>Всего</b> на 1 моль глюкозы в аэробных условиях...			<b>38 АТФ</b>

\* Считают, что НАДН, образовавшийся в ходе гликолиза, поступает в митохондрию с помощью малатного челночного механизма (см. с. 351). Если используется глицерофосфатный челночный механизм, то образуется только 2 АТФ на 1 моль НАДН и количество образовавшихся всего высокоэнергетических фосфатных связей будет не 38, а 36.



В табл. 10.1 приведены реакции, в которых происходит образование высокоэнергетических фосфатных связей в ходе катаболизма глюкозы, с указанием эффективности процесса в аэробных и анаэробных условиях.

## 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 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 наиболее эффективный и экономичный 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  $P_i$  и АДФ, генерация АТФ, а также регенерирование  $НАД^+$ , окисленного из восстановленного НАДН. Иными словами, уменьшение в присутствии кислорода количества  $P_i$  и АДФ и соответствующее увеличение количества АТФ ведут к подавлению анаэробного гликолиза.

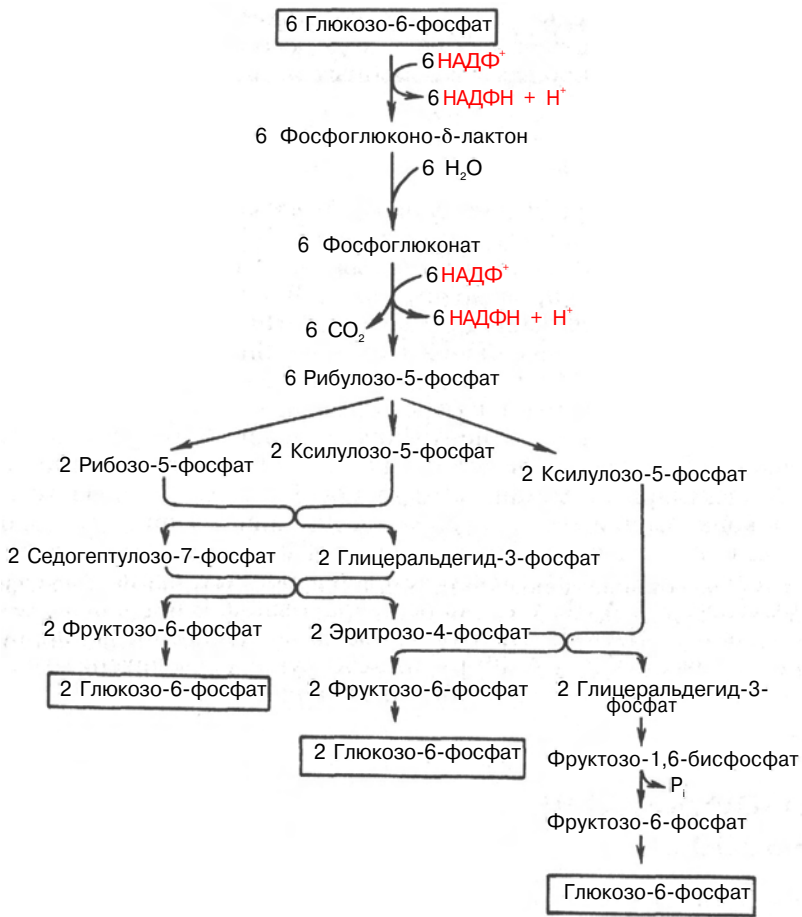
## ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ ОКИСЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ

Открытие пути прямого окисления углеводов, или, как его называют, пентозофосфатного цикла, принадлежит О. Варбургу, Ф. Липману, Ф. Дикенсу и В.А. Энгельгарду. Расхождение путей окисления углеводов—классического (цикл трикарбоновых кислот, или цикл 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 обычному гликолитическому пути с образованием пировиноградной кислоты, которая, окисляясь до ацетил-КоА, затем «сгорает» в цикле Кребса.

Если 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 НАДФН, необходимый для биосинтеза жирных кислот, холестерина и т.д. За счет пентозофосфатного цикла примерно на 50% покрывается потребность организма в НАДФН.

Другая функция пентозофосфатного цикла заключается в том, что он

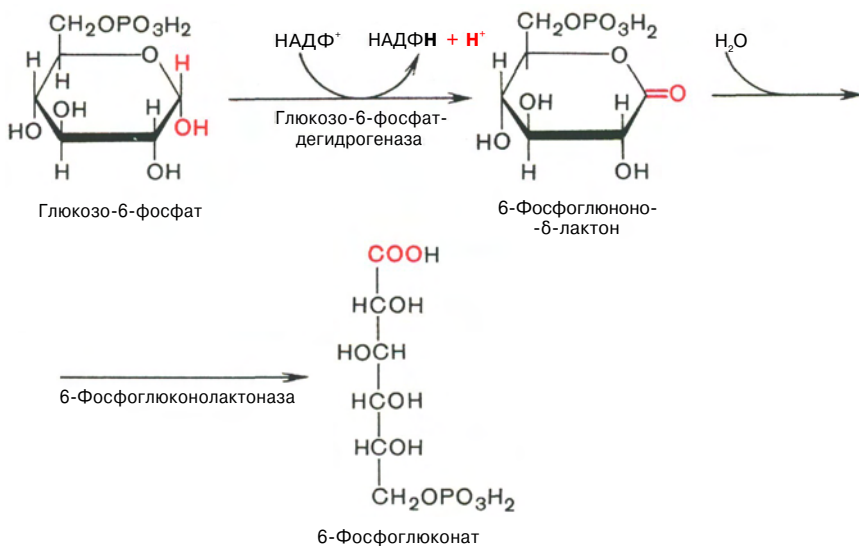


**Рис. 10.12.** Пентозофосфатный путь окисления углеводов.

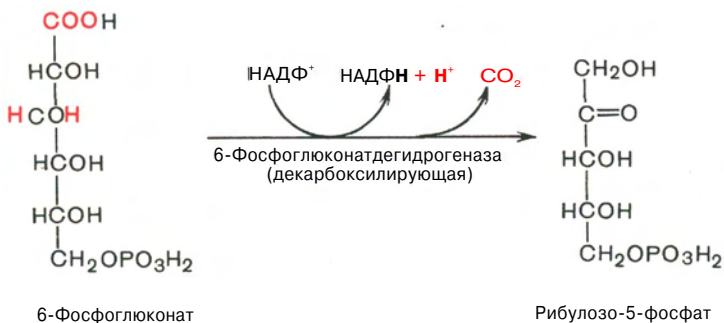
поставляет пентозофосфаты для синтеза нуклеиновых кислот и многих коферментов. При ряде патологических состояний удельный вес пентозофосфатного пути окисления глюкозы возрастает. Механизм реакций пентозофосфатного цикла достаточно расшифрован.

Пентозофосфатный цикл начинается с окисления глюкозо-6-фосфата и последующего окислительного декарбосилирования продукта (в результате от гексозофосфата отщепляется первый атом углерода). Это первая, так называемая окислительная, стадия пентозофосфатного цикла. Вторая стадия включает неокислительные превращения пентозофосфатов с образованием исходного глюкозо-6-фосфата (рис. 10.12). Реакции пентозофосфатного цикла протекают в цитозоле клетки.

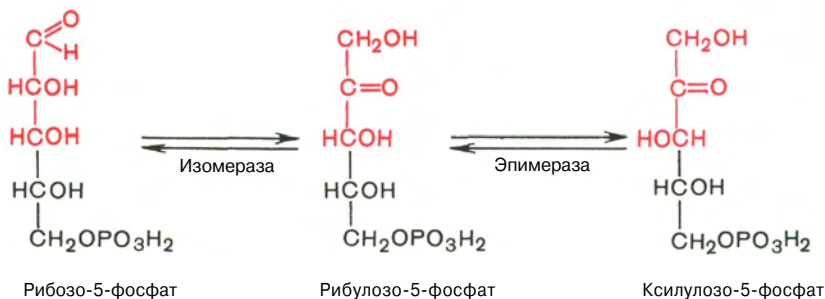
Первая реакция — дегидрирование глюкозо-6-фосфата при участии фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и кофермента NADP<sup>+</sup>. Образовавшийся в ходе реакции 6-фосфоглюконо-δ-лактон — соединение нестабильное и с большой скоростью гидролизуется либо спонтанно, либо с помощью фермента 6-фосфоглюконолактоназы с образованием 6-фосфоглюконовой кислоты (6-фосфоглюконат):



Во второй – окислительной – реакции, катализируемой 6-фосфоглюконатдегидрогеназой (декарбоксилирующей), 6-фосфоглюконат дегидрируется и декарбоксилируется. В результате образуется фосфорилированная кетопентоза – D-рибулозо-5-фосфат и еще 1 молекула НАДФН:

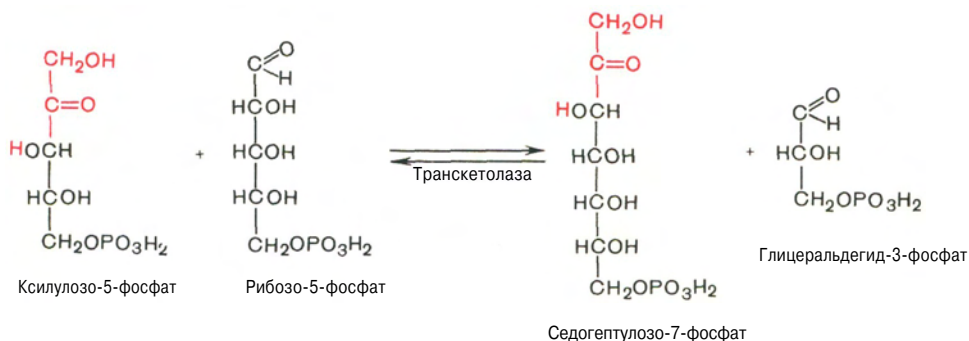


Под действием соответствующей эписимеразы из рибулозо-5-фосфата может образоваться другая фосфопентоза – ксилулозо-5-фосфат. Кроме того, рибулозо-5-фосфат под влиянием особой изомеразы легко превращается в рибозо-5-фосфат. Между этими формами пентозофосфатов устанавливается состояние подвижного равновесия:



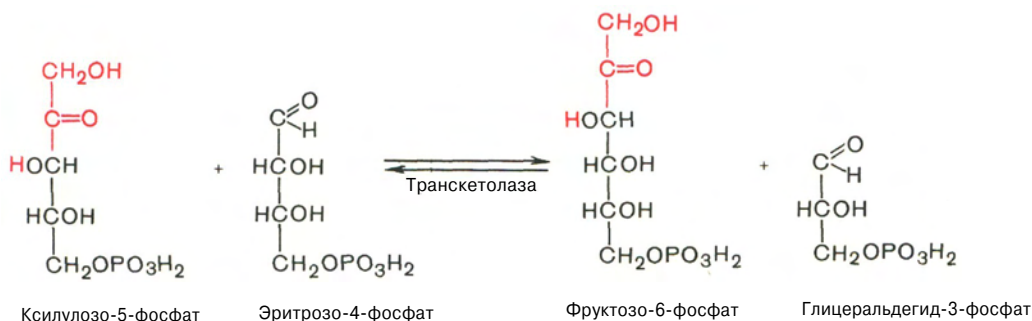
При определенных условиях пентозофосфатный путь на этом этапе может быть завершен. Однако при других условиях наступает так называемый неокислительный этап (стадия) пентозофосфатного цикла. Реакции этого этапа не связаны с использованием кислорода и протекают в анаэробных условиях. При этом образуются вещества, характерные для первой стадии гликолиза (фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-бисфосфат, фосфотриозы), а другие — специфические для пентозофосфатного пути (седогептулозо-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:

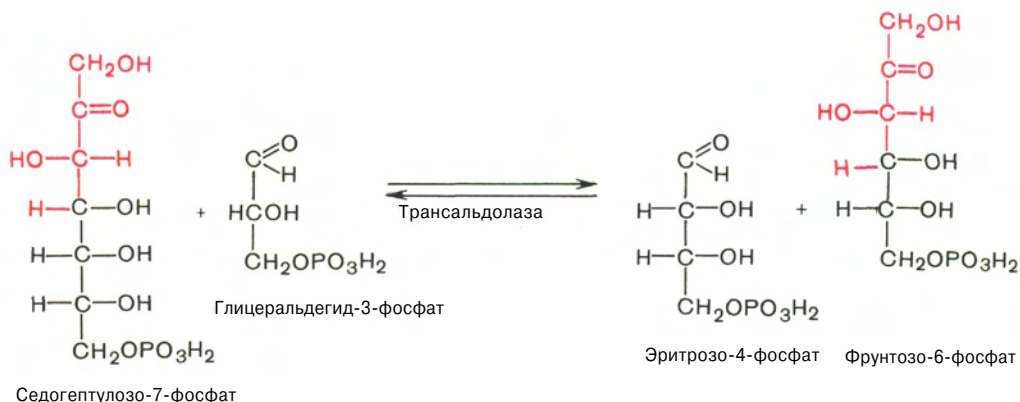


Коферментом в транскетолазной реакции служит ТПФ, играющий роль промежуточного переносчика гликольальдегидной группы от ксилулозо-5-фосфата к рибозо-5-фосфату. В результате образуется семиуглеродный моносахарид седогептулозо-7-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат.

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:

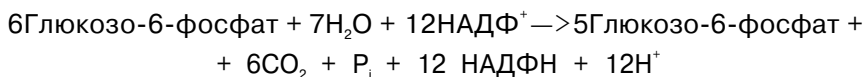


Фермент трансальдолаза катализирует перенос остатка диоксиацетона (но не свободного диоксиацетона) от седогептулозо-7-фосфата на глицеральдегид-3-фосфат:

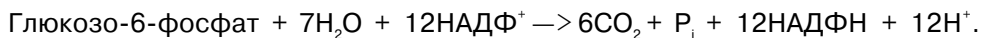


Шесть молекул глюкозо-6-фосфата, вступая в пентозофосфатный цикл, образуют 6 молекул рибулозо-5-фосфата и 6 молекул  $\text{CO}_2$ , после чего из 6 молекул рибулозо-5-фосфата снова регенерируется 5 молекул глюкозо-6-фосфата (см. рис. 10.12). Однако это не означает, что молекула глюкозо-6-фосфата, вступающая в цикл, полностью окисляется. Все 6 молекул  $\text{CO}_2$  образуются из С-1-атомов 6 молекул глюкозо-6-фосфата.

Валовое уравнение окислительной и неокислительной стадий пентозофосфатного цикла можно представить в следующем виде:



или



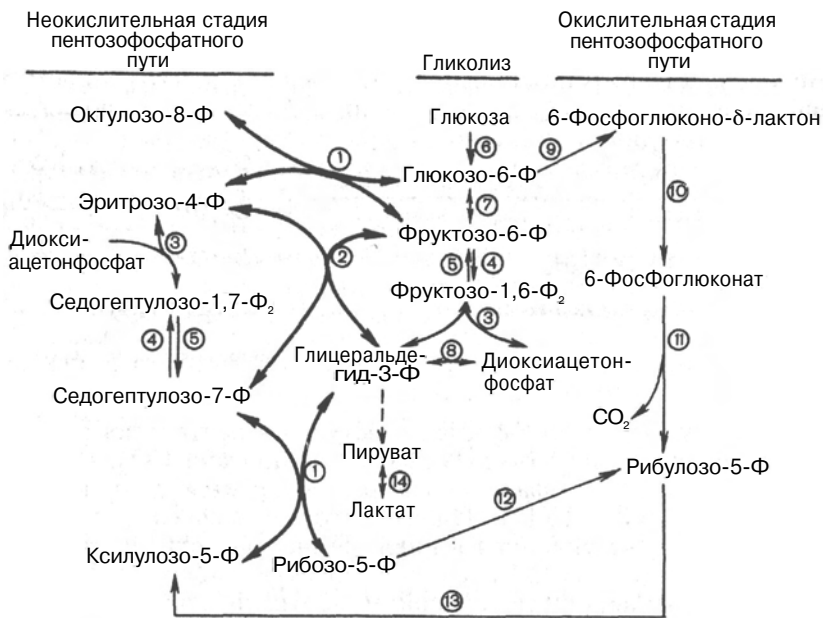
Образовавшийся НАДФН используется в цитозоле на восстановительные синтезы и, как правило, не участвует в окислительном фосфорилировании, протекающем в митохондриях.

В последние годы появились работы, которые дают основание предполагать, что в некоторых тканях схема пентозофосфатного превращения углеводов сложнее, чем это представлено на рис. 10.12. Согласно этой более полной схеме пентозофосфатного пути, первые этапы превращения совпадают с прежней схемой, однако после первой транскетолазной реакции начинаются некоторые отклонения (рис. 10.13).

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. 10.13).

## РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА УГЛЕВОДОВ

Пути регуляции метаболизма 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



**Рис. 10.13.** Современная схема пентозофосфатного пути окисления углеводов, отражающая его связь с гликолизом (по Херсу).

1 - транскетолаза; 2 - трансальдолаза; 3 - альдозаза; 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.

режим, температура, проницаемость биологических мембран, концентрация коферментов, необходимых для отдельных реакций, и т.д. (см. главу 4). В данной главе было показано влияние перечисленных факторов на активность ферментных систем углеводного обмена. И тем не менее некоторые аспекты регуляции метаболизма углеводов напомним.

Гликолиз—это совокупность реакций превращения глюкозы в пируват. У аэробных организмов гликолиз служит как бы прелюдией к циклу трикарбонных кислот (циклу Кребса). Десять реакций гликолиза протекают в цитозоле. Гликолитический путь играет двойную роль: приводит к генерированию АТФ в результате распада глюкозы, и он же поставляет строительные блоки для синтеза клеточных компонентов. Реакции гликолитического пути в физиологических условиях легкообратимы, кроме реакций, катализируемых гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой. Фосфофруктокиназа—наиболее важный регуляторный элемент (фермент) в процессе гликолиза, ингибируется высокими концентрациями АТФ и цитрата и активируется АМФ.

Цикл трикарбонных кислот (цикл Кребса) представляет собой конечный общий путь для окисления «топливных» молекул. Большинство «топливных» молекул вступает в цикл в виде ацетил-КоА. Окислительное декарбоксилирование пирувата, приводящее к образованию ацетил-КоА, является связующим звеном между гликолизом и циклом трикарбонных кислот. Заметим, что последний служит также источником строительных

блоков для процессов биосинтеза. Все реакции цикла протекают в митохондриях.

Скорость цикла трикарбонных кислот зависит от потребности в АТФ. Высокий энергетический заряд клетки понижает активность цитратсинтазы, изоцитратдегидрогеназы и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы. Еще один важный регуляторный момент — необратимое образование ацетил-КоА из пирувата. В результате пентозофосфатного пути происходит генерирование НАДФН и рибозо-5-фосфата в цитозоле. НАДФН участвует в восстановительных биосинтезах, а рибозо-5-фосфат используется в синтезах РНК, ДНК и нуклеотидных коферментов.

Взаимодействие гликолитического и пентозофосфатного путей обеспечивает возможность постоянного приспособления концентраций НАДФН, АТФ и строительных блоков, например рибозо-5-фосфата и пирувата, для удовлетворения потребностей клеток.

Наконец, глюконеогенез и гликолиз регулируются реципрокно, так что, если активность одного из путей относительно понижается, то активность другого пути повышается.

У человека и животных на всех стадиях синтеза и распада углеводов регуляция углеводного обмена осуществляется при участии ЦНС и гормонов.

Например, установлено, что концентрация 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 оказывают гормональные факторы, т.е. регуляции уровня глюкозы в крови осуществляется ЦНС через ряд эндокринных желез (см. главу 8).

## **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 различных заболеваний, прежде всего связанных с поражением эндокринной системы.

**Сахарный диабет.** В регуляции гликолиза и глюконеогенеза большую роль играет инсулин. При недостаточности содержания инсулина возникает заболевание, которое носит название «сахарный диабет»: повышается концентрация глюкозы в крови (гипергликемия), появляется глюкоза в моче (глюкозурия) и уменьшается содержание гликогена в печени. Мышечная ткань при этом 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. Следует отметить, 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. Роль системы фруктозо-2,6-бисфосфата в регуляции метаболизма углеводов, а также нарушения ее функционирования при сахарном диабете см. главу 16.

Гипергликемия может возникнуть не только при заболевании поджелудочной железы, но и в результате расстройства функции других эндокринных желез, участвующих в регуляции углеводного обмена. Так, гипергликемия может наблюдаться при гипофизарных заболеваниях, опухолях коркового вещества надпочечников, гиперфункции щитовидной железы. Иногда гипергликемия появляется во время беременности. Наконец, гипергликемия возможна при органических поражениях ЦНС, расстройствах мозгового кровообращения, болезнях печени воспалительного или дегенеративного характера. Поддержание постоянства уровня глюкозы в крови, как отмечалось,— важнейшая функция печени, резервные возможности которой в этом отношении весьма велики. Поэтому гипергликемия, обусловленная 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 исследуют изменения во времени уровня глюкозы в крови, обычно после приема  $\text{per os}$  50 г 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:

$$\frac{B - A}{A} \times 100\% ,$$

где А—уровень глюкозы в крови натощак; В—максимальное содержание глюкозы в крови после нагрузки глюкозой. В норме этот коэффициент составляет около 50%. Значения, превышающие 80%, свидетельствуют о серьезном нарушении обмена углеводов.

**Гипогликемия.** Нередко гипогликемия связана с понижением функций тех эндокринных желез, повышение функций которых приводит, как отмечалось, к гипергликемии. В частности, гипогликемию можно наблюдать при гипофизарной кахексии, аддисоновой болезни, гипотиреозе. Резкое снижение уровня глюкозы в крови отмечается при аденомах поджелудочной железы вследствие повышенной продукции инсулина  $\beta$ -клетками панкреатических островков. Кроме того, гипогликемия может быть вызвана голоданием, продолжительной физической работой, приемом  $\beta$ -ганглиоблокаторов. Низкий уровень глюкозы в крови иногда отмечается при беременности, лактации.



Гипогликемия может возникнуть при введении больным сахарным диабетом больших доз инсулина. Как правило, она сопровождается почечную глюкозурию, возникающую вследствие снижения «почечного порога» для глюкозы.

**Глюкозурия.** Обычно присутствие глюкозы в моче (глюкозурия) является результатом нарушения углеводного обмена вследствие 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

Таблица 10.2. **Типы гликогенозов и их характеристика**

Тип гликогеноза, 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 $\alpha$ -1,4-глюкозидазы	»	Печень, селезенка, почки, мышцы, нервная ткань, эритроциты
III тип, болезнь Форбса, или болезнь Кори	Полное или частичное отсутствие активности амило-(1 $\rightarrow$ 6)-глюкозидазы и(или) гликогенветвящего фермента	Короткие многочисленные внешние ветви (лимит-декстрин)	Печень, мышцы, лейкоциты, эритроциты
IV тип, болезнь Андерсена	Отсутствие 1,4-глюкан-6- $\alpha$ -глюкозилтрансферазы	Длинные внешние и внутренние ветви с малым числом точек ветвления (амилопектин)	Печень, мышцы, лейкоциты
V тип, болезнь Мак-Арлда	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

глюкозурии при нервных стрессовых состояниях (эмоциональная глюкозурия).

**Изменение углеводного обмена при гипоксических состояниях.** Отставание скорости окисления пирувата от интенсивности гликолиза наблюдается чаще всего при гипоксических 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 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 (табл. 10.2).

Гликогеноз I типа (болезнь Гирке) встречается наиболее часто, обусловлен 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, нередко увеличены почки. В результате гипогликемии появляются судороги, задержка роста, возможен ацидоз. В крови — 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.

# Глава 11

## МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ

### РОЛЬ ЛИПИДОВ В ПИТАНИИ

Липиды являются обязательной составной частью сбалансированного пищевого рациона человека. В среднем в организм взрослого человека с пищей ежедневно поступает 60–80 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. Жиры в питании человека прежде всего имеют важное энергетическое значение. Энергетическая ценность жиров выше, чем белков и углеводов. Известно, что при окислении 1 г жиров организм получает 38,9 кДж (9,3 ккал), тогда как при окислении 1 г белков или углеводов—17,2 кДж (4,1 ккал). Кроме того, жиры являются растворителями витаминов А, D, Е и К, в связи с чем обеспеченность организма этими витаминами в значительной степени зависит от поступления жиров в составе пищи. С жирами в организм вводятся и некоторые полиненасыщенные жирные 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 «витамины F».

Известно также, что жир обеспечивает вкусовые качества пищи; кроме того, он необходим для ее приготовления и хранения. Все это привело к тому, что потребление жира в высокоразвитых странах столь велико, что за его счет покрывается более 35%, а во многих странах более 40% энергозатрат организма. Это в свою очередь очень часто ведет к тому, что прием обогащенной жирами пищи перекрывает физиологические потребности организма в энергии. Отсюда такие неблагоприятные явления, как ожирение значительной части населения. Поэтому знание метаболизма липидов нормального организма необходимо и для понимания причин многих болезней. Известно, что нарушения метаболизма липидов возникают, например, как при избыточном, так и при недостаточном приеме жиров, дефиците тех или иных ферментов, при дисбалансе гормонов и т.д.

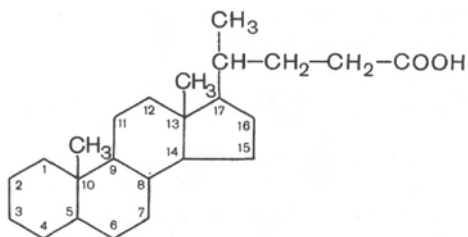
### ПЕРЕВАРИВАНИЕ И ВСАСЫВАНИЕ ЛИПИДОВ

**Расщепление триглицеридов в пищеварительном 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. В желудочном соке содержится липаза, получившая название желудочной, однако роль ее в гидролизе

пищевых триглицеридов у взрослых людей невелика. Во-первых, в желудочном соке взрослого человека и других млекопитающих содержание липазы крайне низкое. Во-вторых, pH желудочного сока далек от оптимума действия этого фермента (оптимальное значение pH для желудочной липазы 5,5–7,5). Напомним, что значение pH желудочного сока около 1,5. В-третьих, в желудке отсутствуют условия для эмульгирования триглицеридов, а липаза может активно действовать только на триглицериды, находящиеся в форме эмульсии. Поэтому у взрослых неэмульгированные триглицериды, составляющие основную массу пищевого жира, проходят через желудок без особых изменений. Вместе с тем расщепление триглицеридов в желудке играет важную роль в пищеварении у детей, особенно грудного возраста. Слизистая оболочка корня языка и примыкающей к нему области глотки ребенка грудного возраста секретирует собственную липазу в ответ на сосательные и глотательные движения (при кормлении грудью). Эта липаза получила название лингвальной. Активность лингвальной липазы не успевает «проявиться» в полости рта, и основным местом ее воздействия является желудок. Оптимум pH лингвальной липазы в пределах 4,0–4,5; он близок к величине pH желудочного сока у таких детей. Лингвальная липаза наиболее активно действует на триглицериды, содержащие жирные кислоты с короткой и средней длиной цепи, что характерно для триглицеридов молока. Иными словами, жир молока – самый подходящий субстрат для этого энзима. У взрослых активность лингвальной липазы крайне низкая.

Расщепление триглицеридов в желудке взрослого человека невелико, но оно в определенной степени облегчает последующее переваривание их в кишечнике. Даже незначительное по объему расщепление триглицеридов в желудке приводит к появлению свободных жирных кислот, которые, не подвергаясь всасыванию в желудке, поступают в кишечник и способствуют там эмульгированию жиров, облегчая таким образом воздействие на них липазы панкреатического сока.

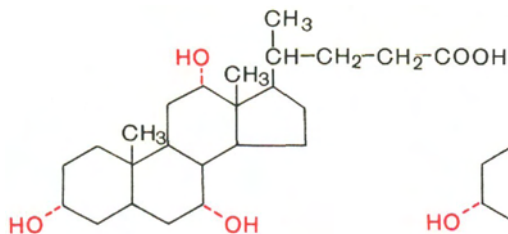
После того как химус попадает в двенадцатиперстную кишку, прежде всего происходит нейтрализация попавшей в кишечник с пищей соляной кислоты желудочного сока бикарбонатами, содержащимися в панкреатическом и кишечном соках. Выделяющиеся при разложении бикарбонатов пузырьки углекислого газа способствуют 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:



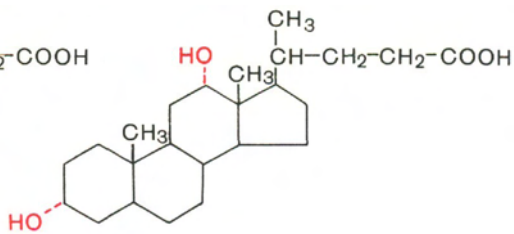
Холановая кислота

Желчные кислоты представляют собой основной конечный продукт метаболизма холестерина.

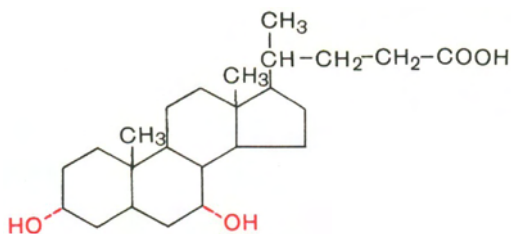
В желчи человека в основном содержатся холевая (3,7,12-триоксихолановая), дезоксихолевая (3,12-диоксихолановая) и хенодезоксихолевая (3,7-диоксихолановая) кислоты (все гидроксильные группы имеют  $\alpha$ -конфигурацию и поэтому обозначены пунктирной линией):



Холевая кислота



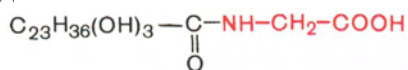
Дезоксихолевая кислота



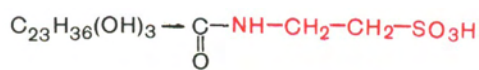
Хенодезоксихолевая кислота

Кроме того, в желчи человека в малых количествах содержатся литохолевая (3 $\alpha$ -оксихолановая) кислота, а также аллохолевая и уредезоксихолевая кислоты—стереоизомеры холевой и хенодезоксихолевой кислот.

Как 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 таурохенодезоксихолевой (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—желчной кислоты и глицина или таурина. 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:



Гликохолевая кислота



Таурохолевая кислота

Считают, что только комбинация соль желчной кислоты + ненасыщенная жирная кислота + моноглицерид придает 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.

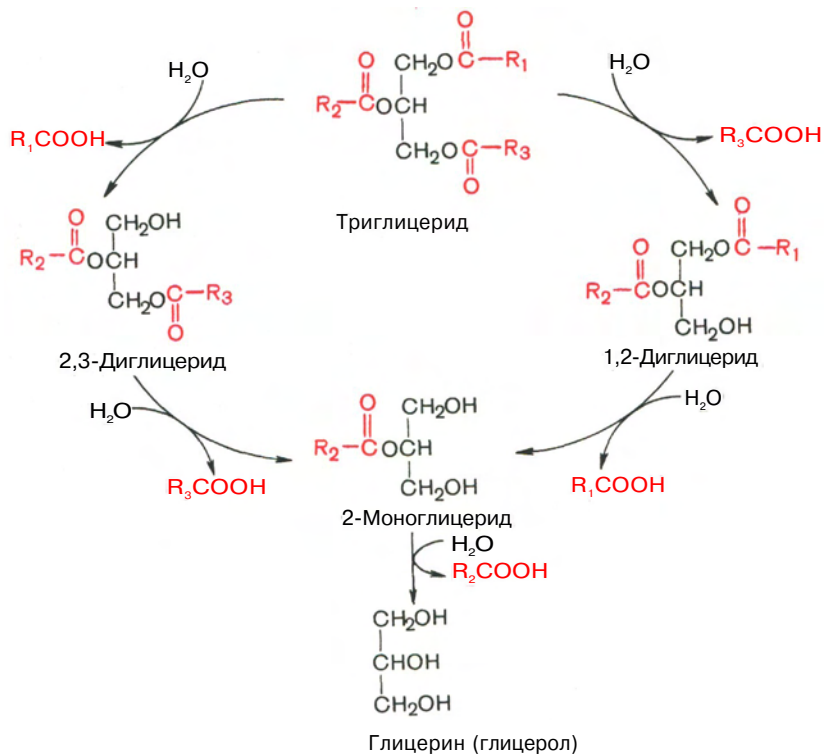
Известно, что основная масса пищевых глицеридов подвергается расщеплению в верхних отделах тонкой кишки при действии липазы панкреатического сока. Этот фермент был впервые обнаружен известным французским физиологом С. Bernard в середине прошлого века.

Панкреатическая липаза (КФ 3.1.1.3) является гликопротеидом, имеющим мол. массу 48000 (у человека) и оптимум pH 8–9. Данный фермент расщепляет триглицериды, находящиеся в эмульгированном состоянии (действие фермента на растворенные субстраты значительно слабее). Как и другие пищеварительные ферменты (пепсин, трипсин, химотрипсин), панкреатическая липаза поступает в верхний отдел тонкой кишки в виде неактивной пролипазы.

Превращение пролипазы в активную липазу происходит при участии желчных кислот и еще одного белка панкреатического сока – колипазы (мол. масса 10000). Последняя присоединяется к пролипазе в молекулярном соотношении 2:1. Это приводит к тому, что липаза становится активной и устойчивой к действию трипсина.

Установлено, что основными продуктами расщепления триглицеридов при действии панкреатической липазы являются  $\beta(2)$ -моноглицерид и жирные кислоты. Фермент катализирует гидролиз эфирных связей в  $\alpha(1)$ ,  $\alpha'(3)$ -положениях, в результате чего и образуются  $\beta(2)$ -моноглицерид и две частицы (молекулы) жирной кислоты. На скорость катализируемого липазой гидролиза триглицеридов не оказывает существенного влияния ни степень ненасыщенности жирных кислот, ни длина ее цепи (от  $C_{12}$  до  $C_{18}$ ).

Гидролиз триглицеридов при участии панкреатической липазы можно изобразить в виде следующей схемы:



В панкреатическом соке наряду с липазой содержится моноглицеридная изомераза—фермент, катализирующий внутримолекулярный перенос ацила из  $\beta(2)$ -положения моноглицерида в  $\alpha(1)$ -положение. В процессе переваривания пищевых жиров при участии этого фермента примерно треть  $\beta$ -моноглицерида превращается в  $\alpha$ -моноглицерид. Поскольку эфирная связь в  $\alpha$ -положении чувствительна к действию панкреатической липазы, последняя расщепляет большую часть  $\alpha$ -моноглицеридов до конечных продуктов—глицерина и жирной кислоты. Меньшая часть  $\alpha$ -моноглицеридов успевает всосаться в стенку тонкой кишки, минуя воздействие липазы.

**Всасывание триглицеридов и продуктов их расщепления.** Всасывание происходит в проксимальной части тонкой кишки. Тонкоэмульгированные жиры (величина жировых капель эмульсии не должна превышать 0,5 мкм) частично могут всасываться через стенки кишечника без предварительного гидролиза. 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 мицелл такова, что их гидрофобное ядро (жирные кислоты, моноглицериды и др.) оказывается окруженным снаружи гидрофильной оболочкой из желчных кислот и фосфолипидов. Мицеллы примерно в 100 раз меньше самых мелких эмульгированных жировых капель. 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 поступают в ток крови и через систему воротной вены попадают сначала в печень, а оттуда вновь в желчь. Другие исследователи допускают возможность перехода в клетки ворсинок только липидного компонента жировых мицелл. Соли желчных кислот, выполнив свою физиологическую роль, остаются в просвете кишечника; позже основная масса их всасывается в кровь (в подвздошной кишке), попадает в печень и затем выделяется с желчью. Таким образом, все исследователи признают, что происходит постоянная циркуляция желчных кислот между печенью и кишечником. Этот процесс получил название печеночно-кишечной (гепатозентральной) 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. Таким образом, основная масса желчных кислот (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 6–8 оборотов в сутки.

**Расщепление и всасывание фосфолипидов и холестерина.** Подавляющая часть фосфолипидов содержимого тонкой кишки приходится на фосфатидилхолин (лецитин), основная масса которого поступает в кишечник с желчью (11–12 г/сут) и меньшая часть (1–2 г/сут)—с пищей.

Существует две точки зрения относительно судьбы поступивших в тонкую кишку экзогенных и эндогенных фосфолипидов. Согласно одной из них, и те, и другие фосфолипиды подвергаются в кишечнике атаке со стороны фосфолипазы  $A_2$ , катализирующей гидролиз сложноэфирной связи в  $\beta$ -положении. В результате катализируемой фосфолипазой  $A_2$  реакции глицерофосфолипиды расщепляются с образованием лизофосфолипида и жирной кислоты. Лизофосфолипид может подвергаться расщеплению при действии другого фермента панкреатического сока—лизофосфолипазы. В результате из лизолецитина освобождается последняя частица жирной кислоты и образуется глицерофосфохолин, который хорошо растворяется в водной среде и всасывается из кишечника в кровь.

Сторонники другой точки зрения считают, что фосфолипиды «желчного» (более точно печеночного) происхождения в отличие от пищевых фосфолипидов не подвергаются воздействию фосфолипазы  $A_2$ . Следовательно, функция «желчных» фосфолипидов исключительно связана с гепатоэнтеральной циркуляцией желчи: с желчью они поступают в кишечник, с желчными кислотами участвуют в мицеллярной солюбилизации липидов и вместе с ними возвращаются в печень. Таким образом, существует как бы два пула фосфолипидов в кишечнике: «желчный», защищенный от действия фосфолипазы  $A_2$ , и «пищевой», подверженный ее действию. Пока трудно объяснить причину существования двух пулов фосфолипидов и их различное отношение к действию фосфолипазы  $A_2$ .

В зависимости от пищи организм взрослого человека получает ежедневно 300–500 мг холестерина, содержащегося в пищевых продуктах частично в свободном (неэстерифицированном) виде, частично в виде эфиров с жирными кислотами. Эфиры холестерина расщепляются на холестерин и жирные кислоты особым ферментом панкреатического и кишечного соков—гидролазой эфиров холестерина, или холестеролэстеразой (КФ 3.1.1.13). В тонкой кишке происходит всасывание холестерина, источником которого являются:

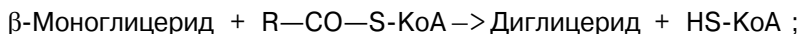
- холестерин пищи (0,3–0,5 г/сут; у вегетарианцев значительно меньше);
- холестерин желчи (ежедневно с желчью выделяется 1–2 г эндогенного неэстерифицированного холестерина);
- холестерин, содержащийся в слущенном эпителии пищеварительного тракта и в кишечных соках (до 0,5 г/сут).

В общей сложности в кишечник поступает 1,8–2,5 г эндогенного и экзогенного холестерина. Из этого количества около 0,5 г холестерина выделяется с фекалиями в виде восстановленного продукта—копростерина и очень небольшая часть в виде окисленных продуктов—холестенона и др. И восстановление, и окисление холестерина происходят в толстой кишке под воздействием ферментов микробной флоры. Основная часть холестерина в неэстерифицированной форме подвергается всасыванию в тонкой кишке в составе смешанных жировых мицелл, состоящих из желчных кислот, жирных кислот, моноглицеридов, фосфолипидов и лизофосфолипидов.

**Ресинтез липидов в кишечной стенке. Триглицериды.** По современным представлениям, ресинтез триглицеридов происходит в эпителиальных



клетках (энтероцитах слизистой оболочки ворсинок тонкой кишки) двумя путями. Первый путь –  $\beta$ -моноглицеридный. Долгое время этот путь считался единственным. Суть его состоит в том, что  $\beta$ -моноглицериды и жирные кислоты, проникающие в процессе всасывания в эпителиальные клетки кишечной стенки, задерживаются в гладком эндоплазматическом ретикулуле клеток. Здесь из жирных кислот образуется их активная форма – ацил-КоА и затем происходит ацилирование  $\beta$ -моноглицеридов с образованием сначала диглицеридов, а затем триглицеридов:



Все реакции катализируются ферментным комплексом – триглицеридсинтетазой, включающим в себя ацил-КоА-синтетазу, моноглицеридацилтрансферазу и диглицеридацилтрансферазу.

Второй путь ресинтеза триглицеридов протекает в шероховатом эндоплазматическом ретикулуле эпителиальных клеток и включает следующие реакции:

1) образование активной формы жирной кислоты – ацил-КоА при участии ацил-КоА-синтетазы;

2) образование  $\alpha$ -глицерофосфата при участии глицеролкиназы;

3) превращение  $\alpha$ -глицерофосфата в фосфатидную кислоту при участии глицерофосфат-ацилтрансферазы;

4) превращение фосфатидной кислоты в диглицерид при участии фосфатидат-фосфогидролазы;

5) ацилирование диглицерида с образованием триглицерида при участии диглицеридацилтрансферазы.

Как видно, первая и последняя реакции повторяют аналогичные реакции  $\beta$ -моноглицеридного пути. Установлено, что  $\alpha$ -глицерофосфатный путь ресинтеза жиров (триглицеридов) приобретает значение, если в эпителиальные клетки слизистой оболочки тонкой кишки поступили преимущественно жирные кислоты. В случае, если в стенку кишки поступили жирные кислоты вместе с  $\beta$ -моноглицеридами, запускается  $\beta$ -моноглицеридный путь. Как правило, наличие в эпителиальных клетках избытка  $\beta$ -моноглицеридов тормозит протекание  $\alpha$ -глицерофосфатного пути.

**Ресинтез фосфолипидов в кишечной стенке.** В энтероцитах наряду с ресинтезом триглицеридов происходит также и ресинтез фосфолипидов. В образовании фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов участвует ресинтезированный диглицерид, а в образовании фосфатидилинозитолов – ресинтезированная фосфатидная кислота. Участие этих субстратов в образовании фосфолипидов в стенке кишечника происходит по тем же закономерностям, что и в других тканях (см. с. 396, 397).

Необходимо подчеркнуть, что 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. Показано, что при скармливании животному (например, собаке), особенно предварительно голодававшему, больших количеств чужеродного

жира (например, льняного масла или верблюжьего жира) часть его обнаруживается в жировых тканях животного в неизменном виде. Жировая ткань скорее всего является 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.

**Образование хиломикронов 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 эстерифицироваться) 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 более 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 лимфатический 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 жиры, наблюдается алиментарная гиперлипемия. Это физиологическое явление, характеризующееся в первую очередь повышением концентрации триглицеридов в крови и появлением в ней ХМ. Пик алиментарной гиперлипемии наблюдается через 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 поверхности. ХМ не способны (из-за своих размеров) проникать в клетки жировой ткани. В связи с этим триглицериды ХМ подвергаются гидролизу на поверхности эндотелия капилляров жировой ткани при участии фермента липопротеидлипазы.

## **ЖИРОВАЯ ТКАНЬ И ЕЕ УЧАСТИЕ В ОБМЕНЕ ЛИПИДОВ**

Общее количество жировой ткани у взрослого мужчины со средней массой тела равно примерно 20 кг, а у тучных людей—на десятки килограммов больше. Жировая ткань, состоящая в основном из жировых клеток, или адипоцитов, распространена по всему организму: под кожей, в брюшной полости, образует жировые прослойки вокруг отдельных органов. Около 65% от массы жировой ткани приходится на долю отложенных в ней триглицеридов, что составляет приблизительно 95% от всех триглицеридов организма.

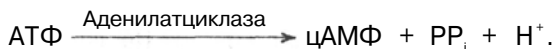
Известно, что главным источником жирных кислот, используемых в качестве «топлива», служит резервный жир, содержащийся в жировой ткани. Принято считать, что триглицериды жировых депо выполняют в обмене липидов такую же роль, как гликоген в печени в обмене углеводов, а высшие жирные кислоты по своей энергетической роли напоминают глюкозу, которая образуется в процессе фосфорилиза гликогена. При

физической работе и других состояниях организма, требующих повышенных энергозатрат, потребление триглицеридов жировой ткани как энергетического резерва увеличивается.

**Липолиз триглицеридов в жировой ткани** \*. В качестве источника энергии могут использоваться только свободные, т.е. неэстерифицированные, жирные кислоты. Поэтому 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 не чувствительны к их действию. Триглицеридлипаза является регуляторным ферментом.

Установлено, что гормоночувствительная липаза (триглицеридлипаза) находится в жировой ткани в неактивной форме, и активация ее гормонами протекает сложным каскадным путем, включающим участие по крайней мере двух ферментативных систем. Процесс начинается со взаимодействия гормона с клеточным рецептором, в результате чего модифицируется структура рецептора (сам гормон в клетку не поступает) и такой рецептор активирует аденилатциклазу (КФ 4.6.1.1). Последняя, как известно, катализирует образование циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) из аденозинтрифосфата (АТФ):

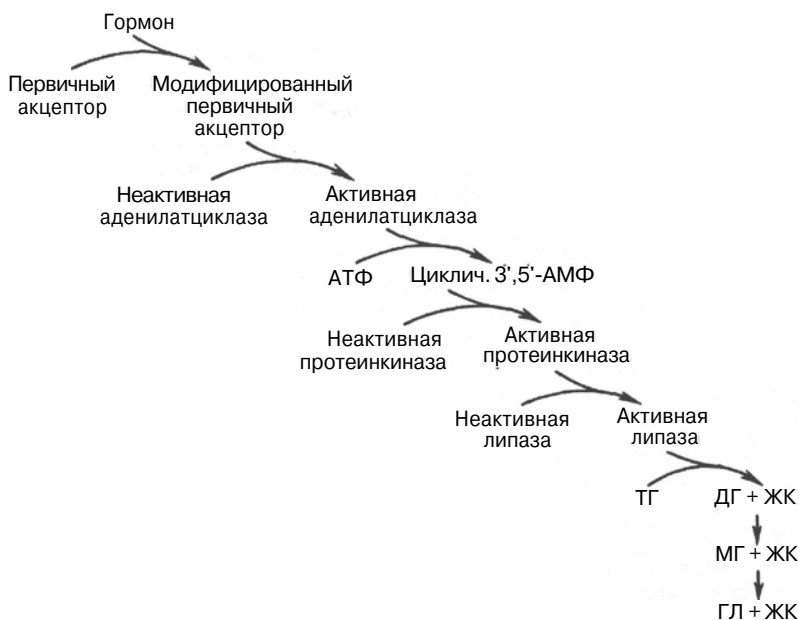


Образовавшийся цАМФ активирует фермент протеинкиназу (КФ 2.7.1.37), который путем фосфорилирования неактивной триглицеридлипазы превращает ее в активную форму (рис. 11.1). Активная триглицеридлипаза расщепляет триглицерид на диглицерид и жирную кислоту. Затем при действии ди- и моноглицеридлипаз образуются конечные продукты липолиза—глицерин и свободные жирные кислоты, которые поступают в кровяное русло.

Скорость липолиза триглицеридов не является постоянной, она подвержена регулируемому влиянию различных факторов, среди которых особое значение имеют нейрогормональные (табл. 11.1).

Связанные с альбуминами плазмы крови в виде комплекса свободные жирные кислоты с током крови попадают в органы и ткани, где комплекс распадается, а жирные кислоты подвергаются либо  $\beta$ -окислению, либо частично используются для синтеза триглицеридов, глицерофосфолипидов, сфингофосфолипидов и других соединений, а также на эстерификацию холестерина.

\* В жировых клетках (адипоцитах), помимо активного липолиза триглицеридов, протекают и такие метаболические процессы, как гликолиз, окисление глюкозы через пентозофосфатный путь, цикл трикарбоновых кислот,  $\beta$ -окисление жирных кислот, синтез жирных кислот, реэстерификация последних (образование триглицеридов) и мобилизация (высвобождение) жирных кислот.



**Рис. 11.1.** Липолитический каскад (по Стайнбергу).

ТГ - триглицериды; ДГ - диглицериды; МГ - моноглицериды; ГЛ - глицерин; ЖК - жирные кислоты.

**Таблица 11.1. Влияние некоторых факторов на липолиз триглицеридов в жировой ткани [Климов А.Н., Никульчева Н.Г., 1995]**

Фактор	Характер действия	Предполагаемый механизм действия
Катехоламины	Усиление	Активация аденилатциклазы
Глюкагон	»	» »
Тироксин	»	» »
Глюкокортикоиды	»	Активация синтеза протеинкиназы
Гормон роста	»	Активация синтеза аденилатциклазы
АКТГ	»	» » »
Стресс	»	Повышение секреции катехоламинов и снижение секреции инсулина
Физическая нагрузка	»	То же
Голодание	»	» »
Охлаждение	»	» »
Инсулин	Угнетение	Активация фосфодиэстеразы (усиление гидролиза цАМФ), снижение активности аденилатциклазы
Простагландины	»	Снижение активности аденилатциклазы
Никотиновая кислота	»	То же

## ОКИСЛЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Установлено, что окисление жирных кислот протекает в печени, почках, скелетных и сердечной мышцах, в жировой ткани. В мозговой ткани скорость окисления жирных кислот весьма незначительна; основным источником энергии в мозговой ткани служит глюкоза.

В 1904 г. Ф. Кнооп (F. Кноор) выдвинул гипотезу  $\beta$ -окисления жирных кислот на основании опытов по скармливанию собакам различных жирных кислот, в которых один атом водорода в концевой метильной группе ( $\omega$ -углеродного атома) был замещен радикалом ( $C_6H_5-$ ).

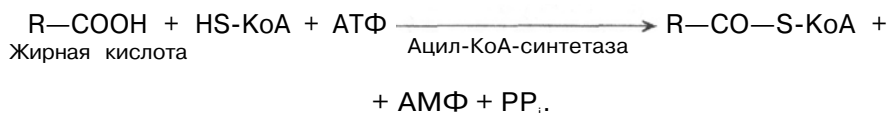
Ф. Кнооп высказал предположение, что окисление молекулы жирной кислоты в тканях организма происходит в  $\beta$ -положении. В результате от молекулы жирной кислоты последовательно отщепляются двууглеродные фрагменты со стороны карбоксильной группы.

Жирные кислоты, входящие в состав естественных жиров животных и растений, имеют четное число углеродных атомов. Любая такая кислота, от которой отщепляется по паре углеродных атомов, в конце концов проходит через стадию масляной кислоты. После очередного  $\beta$ -окисления масляная кислота становится ацетоуксусной. Последняя затем гидролизуется до двух молекул уксусной кислоты. Теория  $\beta$ -окисления жирных кислот, предложенная Ф. Кноопом, в значительной мере послужила основой современных представлений о механизме окисления жирных кислот.

Доставка жирных кислот к месту их окисления—к митохондриям—происходит сложным путем: при участии альбумина осуществляется транспорт жирной кислоты в клетку; при участии специальных белков (fatty acid binding proteins, FABP)—транспорт в пределах цитозоля; при участии карнитина—транспорт жирной кислоты из цитозоля в митохондрии.

Процесс окисления жирных кислот складывается из следующих основных этапов.

*Активация жирных кислот.* Свободная жирная кислота независимо от длины углеводородной цепи является метаболически инертной и не может подвергаться никаким биохимическим превращениям, в том числе окислению, пока не будет активирована. Активация жирной кислоты протекает на наружной поверхности мембраны митохондрий при участии АТФ, коэнзима А (HS-КоА) и ионов  $Mg^{2+}$ . Реакция катализируется ферментом ацил-КоА-синтетазой:



В результате реакции образуется ацил-КоА, являющийся активной формой жирной кислоты.

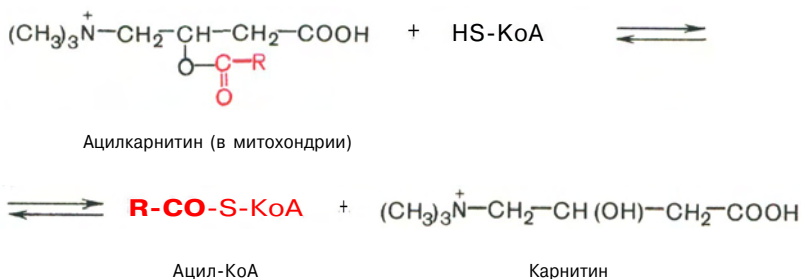
Считают, что активация жирной кислоты протекает в 2 этапа. Сначала жирная кислота реагирует с АТФ с образованием ациладенилата, представляющим собой эфир жирной кислоты и АМФ. Далее сульфгидрильная группа КоА действует на прочно связанный с ферментом ациладенилат с образованием ацил-КоА и АМФ.

*Транспорт жирных кислот внутрь митохондрий.* Коэнзимная форма жирной кислоты, в равной мере как и свободные жирные кислоты, не обладает способностью проникать внутрь митохондрий, где, собственно, и протекает их окисление. Переносчиком активированных жирных кислот

с длинной цепью через внутреннюю митохондриальную мембрану служит карнитин. Ацильная группа переносится с атома серы КоА на гидроксильную группу карнитина с образованием ацилкарнитина, который диффундирует через внутреннюю митохондриальную мембрану:

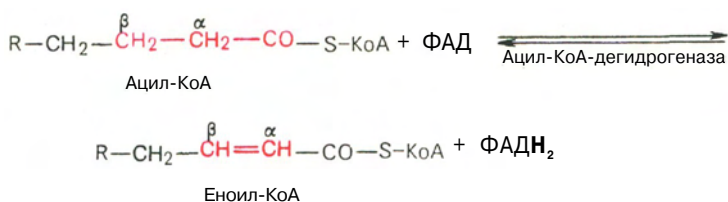


Реакция протекает при участии специфического цитоплазматического фермента карнитин-ацилтрансферазы. Уже на той стороне мембраны, которая обращена к матриксу, ацильная группа переносится обратно на КоА, что термодинамически выгодно, поскольку О-ацильная связь в карнитине обладает высоким потенциалом переноса группы. Иными словами, после прохождения ацилкарнитина через мембрану митохондрий происходит обратная реакция – расщепление ацилкарнитина при участии HS-КоА и митохондриальной карнитин-ацилтрансферазы:



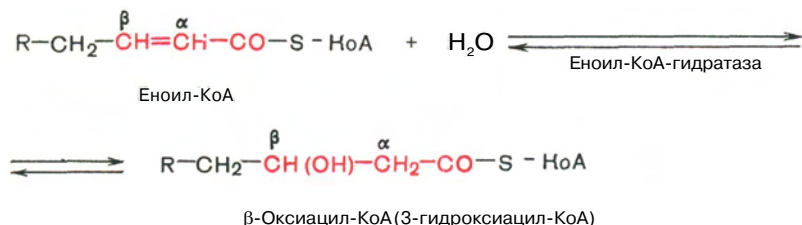
*Внутримитохондриальное окисление жирных кислот.* Процесс окисления жирной кислоты в митохондриях клетки включает несколько последовательных энзиматических реакций.

Первая стадия дегидрирования. Ацил-КоА в митохондриях прежде всего подвергается ферментативному дегидрированию, при этом ацил-КоА теряет 2 атома водорода в  $\alpha$ - и  $\beta$ -положениях, превращаясь в КоА-эфир ненасыщенной кислоты. Таким образом, первой реакцией в каждом цикле распада ацил-КоА является его окисление ацил-КоА-дегидрогеназой, приводящее к образованию еноил-КоА с двойной связью между С-2 и С-3:



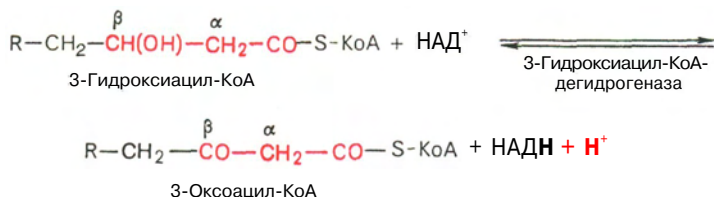
Существует несколько ФАД-содержащих ацил-КоА-дегидрогеназ, каждая из которых обладает специфичностью по отношению к ацил-КоА с определенной длиной углеродной цепи.

Стадия гидратации. Ненасыщенный ацил-КоА (еноил-КоА) при участии фермента еноил-КоА-гидратазы присоединяет молекулу воды. В результате образуется β-оксиацил-КоА (или 3-гидроксиацил-КоА):

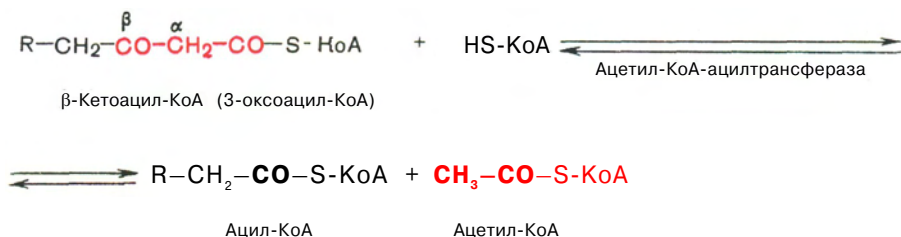


Заметим, что гидратация еноил-КоА стереоспецифична, подобно гидратации fumarата и аконитата (см. с. 348). В результате гидратации *транс*-Δ<sup>2</sup>-двойной связи образуется только L-изомер 3-гидроксиацил-КоА.

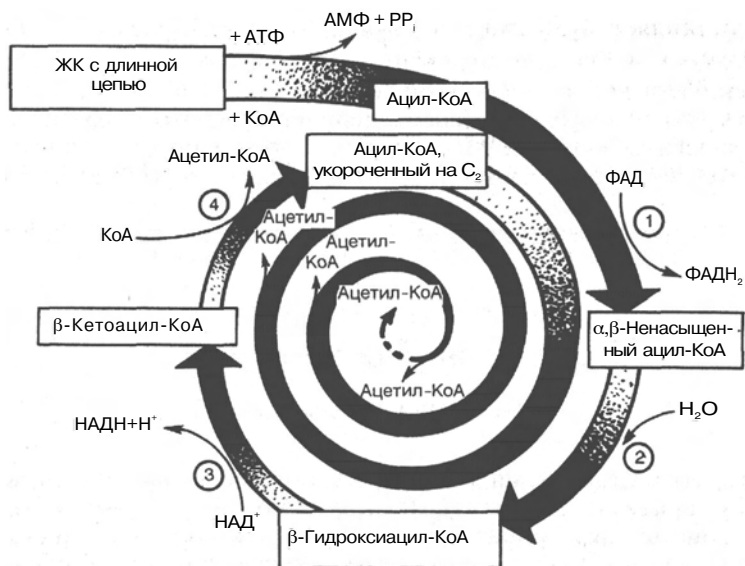
Вторая стадия дегидрирования. Образовавшийся β-оксиацил-КоА (3-гидроксиацил-КоА) затем дегидрируется. Эту реакцию катализируют НАД<sup>+</sup>-зависимые дегидрогеназы:



Тиолазная реакция. В ходе предыдущих реакций происходило окисление метиленовой группы при С-3 в оксогруппу. Тиолазная реакция представляет собой расщепление 3-оксоацил-КоА с помощью тиоловой группы второй молекулы КоА. В результате образуется укороченный на два углеродных атома ацил-КоА и двууглеродный фрагмент в виде ацетил-КоА. Данная реакция катализируется ацетил-КоА-ацилтрансферазой (β-кетотиолазой):



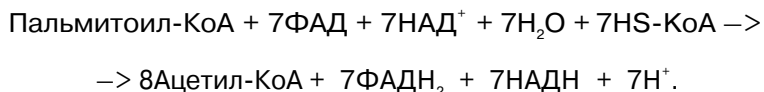
Образовавшийся ацетил-КоА подвергается окислению в цикле трикарбоновых кислот, а ацил-КоА, укоротившийся на два углеродных атома, снова многократно проходит весь путь β-окисления вплоть до образования бутирил-КоА (4-углеродное соединение), который в свою очередь окисляется до 2 молекул ацетил-КоА (рис. 11.2). Например, при окислении пальмитиновой кислоты (С<sub>16</sub>) повторяется 7 циклов β-окисления. Напомним, что при окислении жирной кислоты, содержащей *n* углеродных



**Рис. 11.2.** Окисление жирной кислоты («спираль Липена»). Подробно представлен первый цикл окисления - укорочение цепи жирной кислоты на два углеродных атома. Остальные циклы аналогичны первому (по А.Н. Климову и Н.Г. Никульчевой).

1 - ацил-КоА-дегидрогеназа (КФ 1.3.99.3); 2 - еноил-КоА-гидратаза (КФ 4.2.1.17.); 3-  $\beta$ -гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа (КФ 1.1.1.35); 4- тиолаза (КФ 2.3.1.9).

атомов, происходит  $n/2 - 1$  цикл  $\beta$ -окисления (т.е. на один цикл меньше, чем  $n/2$ , так как при окислении бутирил-КоА сразу происходит образование 2 молекул ацетил-КоА) и всего получится  $n/2$  молекул ацетил-КоА. Следовательно, суммарное уравнение  $\beta$ -окисления активированной кислоты можно записать так:



**Баланс энергии.** При каждом цикле  $\beta$ -окисления образуются одна молекула  $\text{ФАДН}_2$  и одна молекула  $\text{НАДН}$ . Последние в процессе окисления в дыхательной цепи и сопряженного с ним фосфорилирования дают:  $\text{ФАДН}_2 - 2$  молекулы  $\text{АТФ}$  и  $\text{НАДН} - 3$  молекулы  $\text{АТФ}$ , т.е. в сумме за один цикл образуется 5 молекул  $\text{АТФ}$ . При окислении пальмитиновой кислоты образуется  $5 \times 7 = 35$  молекул  $\text{АТФ}$ . В процессе  $\beta$ -окисления пальмитиновой кислоты образуется 8 молекул ацетил-КоА, каждая из которых, «сгорая» в цикле трикарбоновых кислот, дает 12 молекул  $\text{АТФ}$ , а 8 молекул ацетил-КоА дадут  $12 \times 8 = 96$  молекул  $\text{АТФ}$ .

Таким образом, всего при полном  $\beta$ -окислении пальмитиновой кислоты образуется  $35 + 96 = 131$  молекула  $\text{АТФ}$ . С учетом одной молекулы  $\text{АТФ}$ , 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  $\text{АТФ}$ . Изменение свободной энергии  $\Delta F$  при полном сгорании 1 моля пальмитиновой

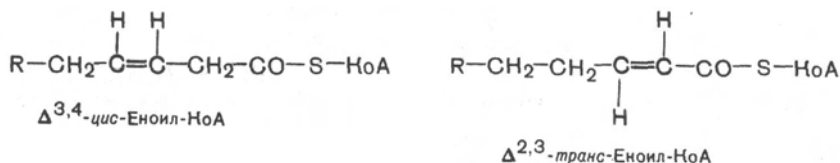


кислоты составляет 2338 ккал, а богатая энергией фосфатная связь АТФ характеризуется величиной 7,6 ккал/моль. Нетрудно подсчитать, что примерно 990 ккал ( $7,6 \times 130$ ), или 42% от всей потенциальной энергии пальмитиновой кислоты при ее окислении в организме, используется для синтеза АТФ, а оставшаяся часть, очевидно, теряется в виде тепла.

Следовательно, эффективность накопления энергии в результате окисления жирных кислот при стандартных условиях составляет ~ 40%, что близко к соответствующей величине для гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования.

## Окисление ненасыщенных жирных кислот

Окисление ненасыщенных жирных кислот в принципе происходит так же, как и окисление насыщенных жирных кислот, но с некоторыми особенностями. Двойные связи природных ненасыщенных жирных кислот (олеиновой, линолевой и т.д.) имеют *цис*-конфигурацию, а в КоА-эфирах ненасыщенных кислот, являющихся промежуточными продуктами при  $\beta$ -окислении насыщенных жирных кислот, двойные связи имеют *транс*-конфигурацию. Кроме того, последовательное удаление двууглеродных фрагментов при окислении ненасыщенных жирных кислот до первой двойной связи дает  $\Delta^{3,4}$ -ацил-КоА, а не  $\Delta^{2,3}$ -ацил-КоА, который является промежуточным продуктом при  $\beta$ -окислении ненасыщенных жирных кислот:

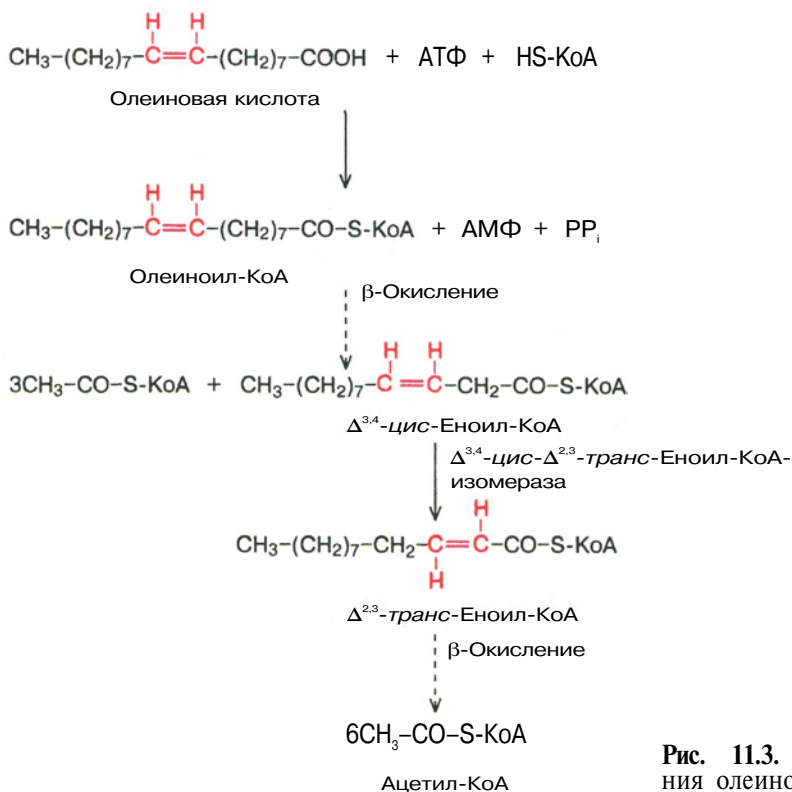


В тканях существует фермент, который осуществляет перемещение двойной связи из положения 3—4 в положение 2—3, а также изменяет конфигурацию двойной связи из *цис*- в *транс*-положение. Этот фермент получил название  $\Delta^{3,4}\text{-цис} \rightarrow \Delta^{2,3}\text{-транс-еноил-КоА-изомеразы}$ . На рис. 11.3 представлен путь  $\beta$ -окисления олеиновой кислоты, иллюстрирующий назначение данного фермента\*.

## Окисление жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов

Как 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. Установлено, что жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов окисляются

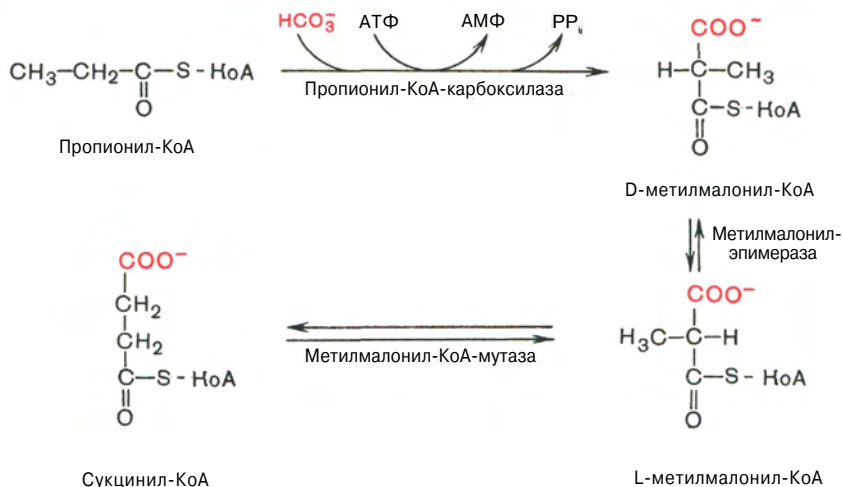
\* При  $\beta$ -окислении жирных кислот, имеющих две и более ненасыщенные связи, требуется еще один дополнительный фермент - 3-гидроксиацил-КоА-эпимераза.



**Рис. 11.3.** Этапы  $\beta$ -окисления олеиновой кислоты.

таким же образом, как и жирные кислоты с четным числом углеродных атомов, с той лишь разницей, что на последнем этапе расщепления ( $\beta$ -окисления) образуется одна молекула пропионил-KoA и одна молекула ацетил-KoA, а не 2 молекулы ацетил-KoA.

Активированный трехуглеродный фрагмент – пропионил-KoA – включается в цикл трикарбоновых кислот после превращения в сукцинил-KoA.



# МЕТАБОЛИЗМ КЕТОНОВЫХ ТЕЛ

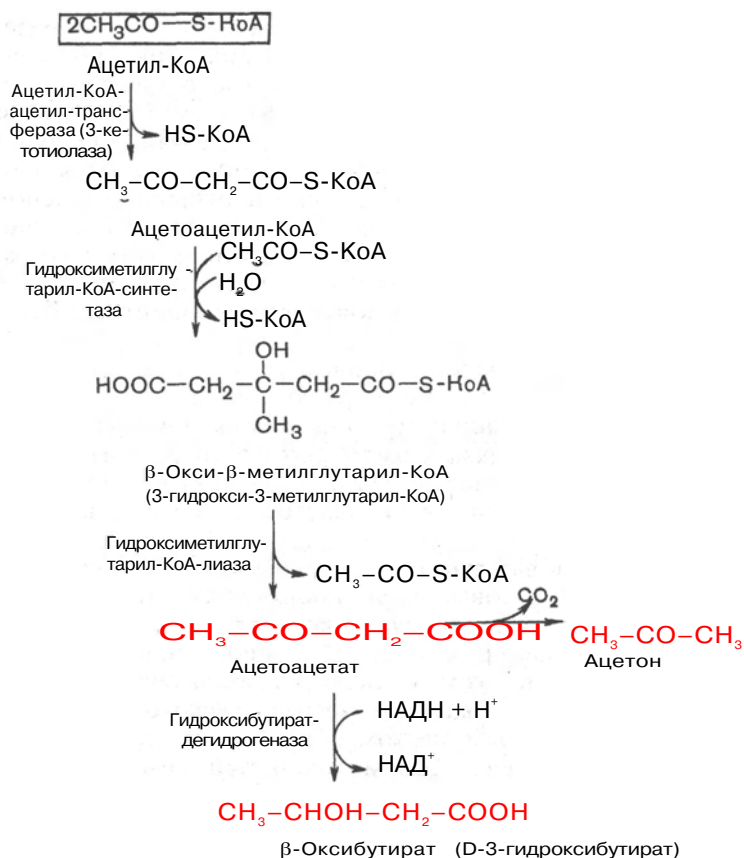
Под термином «кетонные (ацетоновые) тела» подразумевают ацетоуксусную кислоту (ацетоацетат)  $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COOH}$ ,  $\beta$ -оксимасляную кислоту ( $\beta$ -оксибутират, или D-3-гидроксибутират)  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{COOH}$  и ацетон  $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ .

В здоровом организме ацетон в крови присутствует в крайне низких концентрациях, образуется в результате спонтанного декарбоксилирования ацетоацетата и, по-видимому, не имеет определенного физиологического значения.

Кетонные тела образуются в печени. Прежние представления о том, что кетонные тела являются промежуточными продуктами  $\beta$ -окисления жирных кислот, оказались ошибочными.

Во-первых, в обычных условиях промежуточными продуктами  $\beta$ -окисления жирных кислот являются КоА-эфиры этих кислот, например  $\beta$ -оксибутирил-КоА, ацетоацетил-КоА.

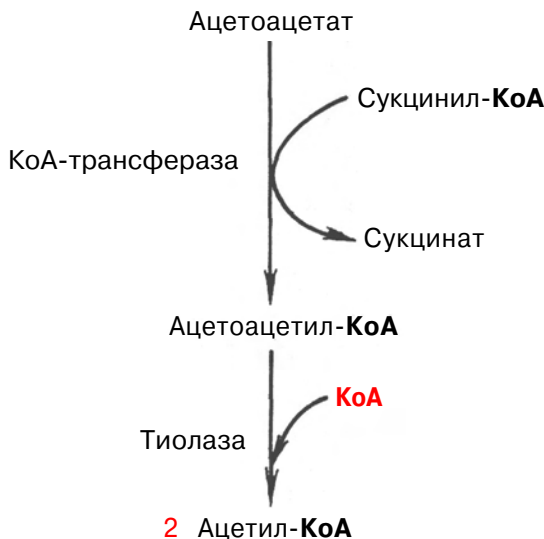
Во-вторых,  $\beta$ -оксибутирил-КоА, образующийся в печени при  $\beta$ -окислении жирных кислот, имеет L-конфигурацию, в то время как  $\beta$ -оксибутират, обнаруживаемый в крови, представляет собой D-изомер. Именно  $\beta$ -оксибутират D-конфигурации образуется в ходе метаболического пути синтеза  $\beta$ -окси- $\beta$ -метилглутарил-КоА (3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА):



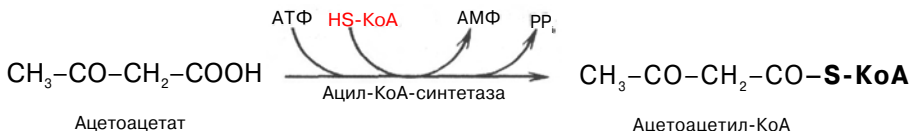


В противоположность этому глюкоза является главным «топливом» для мозга у лиц, получающих сбалансированную пищу. При голодании и диабете мозг адаптируется к использованию ацетоацетата. Установлено, что в условиях длительного голодания 75% потребности мозга в «топливе» удовлетворяется за счет ацетоацетата.

Известно, что в периферических тканях 3-гидроксibuтират ( $\beta$ -оксимасляная кислота) способен окисляться до ацетоацетата, а последний активируется с образованием соответствующего КоА-эфира (ацетоацетил-КоА). Ацетоацетат может быть активирован путем переноса КоА с сукцинил-КоА в реакции, катализируемой специфической КоА-трансферазой. Образовавшийся ацетоацетил-КоА далее расщепляется тиолазой с образованием 2 молекул ацетил-КоА, которые затем включаются в цикл Кребса:



Не исключено, что существует и второй путь активации ацетоацетата—это использование АТФ и HS-КоА аналогично тому, как при активации жирных кислот:



## БИОСИНТЕЗ НАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

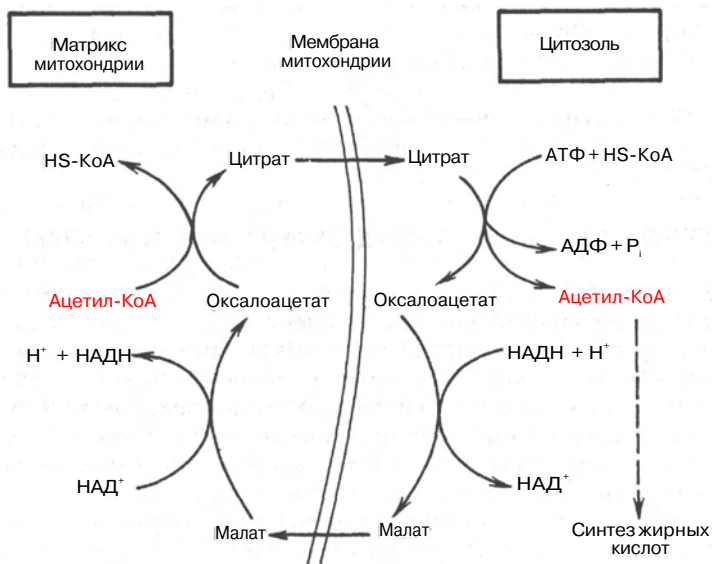
В настоящее время в достаточной степени изучен механизм биосинтеза жирных кислот в организме животных и человека, а также катализирующие этот процесс ферментные системы. Синтез жирных кислот протекает в цитоплазме клетки. В митохондриях в основном происходит удлинение существующих цепей жирных кислот. Установлено, что в цитоплазме печеночных клеток синтезируется пальмитиновая кислота (16 углеродных атомов), а в митохондриях этих клеток из уже синтезированной в цитоплазме клетки пальмитиновой кислоты или из жирных кислот экзогенного происхождения, т.е. поступающих из кишечника, образуются жирные кислоты, содержащие 18, 20 и 22 углеродных атома.

Иными словами, митохондриальная система биосинтеза жирных кислот, включающая несколько модифицированную последовательность реакций  $\beta$ -окисления, осуществляет только удлинение существующих в организме среднецепочечных жирных кислот, в то время как полный биосинтез пальмитиновой кислоты из ацетил-КоА активно протекает в цитозоле, т.е. вне митохондрий, по совершенно другому пути.

**Внемитохондриальная система биосинтеза de novo жирных кислот (липогенез).** Эта система находится в растворимой (цитозольной) фракции клеток многих органов, в частности печени, почек, мозга, легких, молочной железы, а также в жировой ткани. Биосинтез жирных кислот протекает с участием НАДФН, АТФ,  $Mn^{2+}$  и  $HCO_3^-$  (в качестве источника  $CO_2$ ); субстратом является ацетил-КоА, конечным продуктом — пальмитиновая кислота. Потребности в кофакторах процессов биосинтеза и  $\beta$ -окисления жирных кислот значительно различаются.

Как отмечалось, строительным блоком для синтеза жирных кислот в цитозоле клетки служит ацетил-КоА, который в основном поступает из митохондрий. Было выявлено, что цитрат стимулирует синтез жирных кислот в цитозоле клетки. Известно также, что образующийся в митохондриях в процессе окислительного декарбоксилирования пирувата и окисления жирных кислот ацетил-КоА не может диффундировать в цитозоль клетки, так как митохондриальная мембрана непроницаема для данного субстрата. Поэтому вначале внутримитохондриальный ацетил-КоА взаимодействует с оксалоацетатом, в результате чего образуется цитрат. Реакция катализируется ферментом цитрат-синтазой. Образовавшийся цитрат переносится через мембрану митохондрий в цитозоль при помощи специальной трикарбоксилаттранспортирующей 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 дикарбоксилаттранспортирующей системы возвращается в митохондриальный матрикс, где окисляется до оксалоацетата, завершая тем самым так называемый челночный цикл:

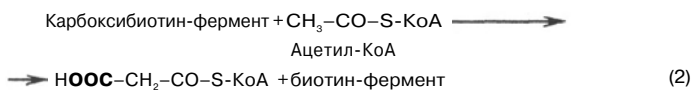


Существует еще один путь переноса внутримитохондриального ацетил-КоА в цитозоль клетки—с участием карнитина. Как отмечалось, карнитин играет роль переносчика ацильных групп из цитозоля в митохондрии при окислении жирных кислот. По-видимому, он может выполнять эту роль и в обратном процессе, т.е. в переносе ацильных радикалов, в том числе ацетильного радикала, из митохондрий в цитозоль клетки. Однако, когда речь идет о синтезе жирных кислот, данный путь переноса ацетил-КоА не является главным.

**Образование малонил-КоА.** Первой реакцией биосинтеза жирных кислот является карбоксилирование ацетил-КоА, для чего требуются бикарбонат, АТФ, ионы марганца. Катализирует эту реакцию фермент ацетил-КоА-карбоксилаза. Фермент содержит в качестве простетической группы биотин. Авидин—ингибитор биотина угнетает эту реакцию, как и синтез жирных кислот в целом.

Установлено, что ацетил-КоА-карбоксилаза состоит из переменного числа одинаковых субъединиц, каждая из которых содержит биотин, биотинкарбоксилазу, карбоксибиотинпереносящий белок, транскарбоксилазу, а также регуляторный аллостерический центр, т.е. представляет собой полиферментный комплекс.

Реакция протекает в два этапа: I—карбоксилирование биотина с участием АТФ и II—перенос карбоксильной группы на ацетил-КоА, в результате чего образуется малонил-КоА:



Малонил-КоА

Малонил-КоА представляет собой первый специфический продукт биосинтеза жирных кислот. В присутствии соответствующей ферментной системы малонил-КоА быстро превращается в жирные кислоты.

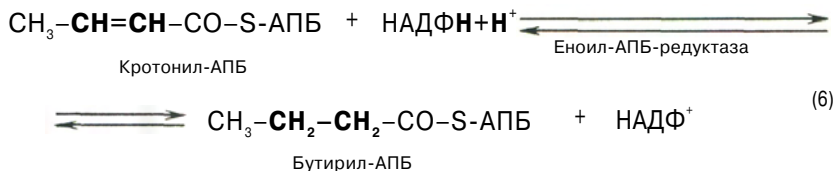
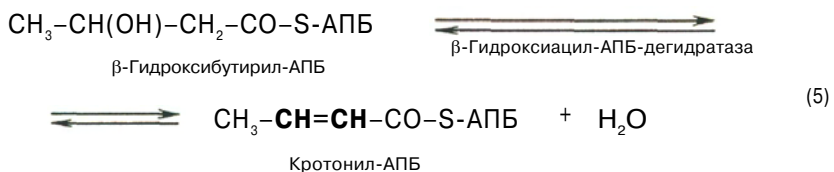
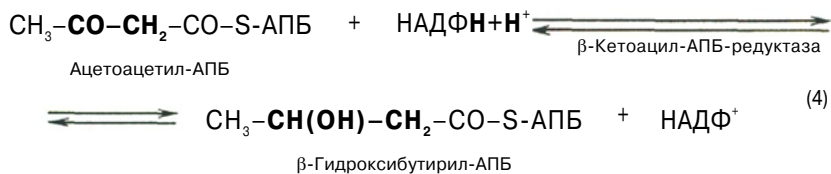
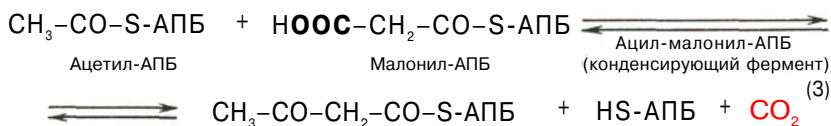
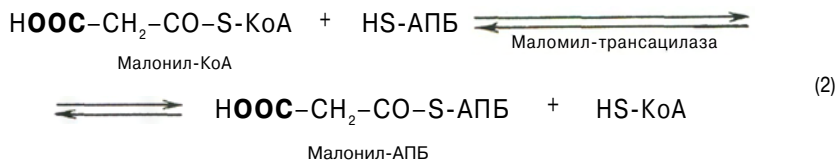
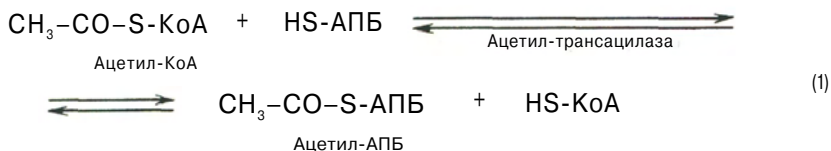
Энзиматические системы, осуществляющие синтез жирных кислот, называются жирно-кислотными синтетазами. Они широко встречаются в природе и могут быть изолированы из различных одноклеточных организмов, растений и животных тканей.

Жирно-кислотные синтетазы делятся на 2 группы. К первой группе относятся полиэнзимные, не поддающиеся фракционированию комплексы с мол. м. порядка 500000, в которых все индивидуальные ферменты собраны в компактную структуру. В частности, в эту группу входят жирно-кислотные синтетазы животных тканей и дрожжей.

Вторая группа включает жирно-кислотные синтетазы, из которых отдельные ферменты могут быть выделены методами белкового фракционирования. Такие синтетазы встречаются у ряда микроорганизмов (в частности, у *E.coli*) и растений. Иными словами, в этих случаях все индивидуальные ферменты синтетазной системы находятся в виде автономных полипептидов.

Мультиферментный комплекс, называемый синтетазой (синтазой) жирных кислот, состоит из 6 ферментов, связанных с так называемым ацилпе-

реносящим белком (АПБ). Этот белок относительно термостабилен, имеет две 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. Мол. масса АПБ составляет около 10000. Данный белок в синтетазной системе выполняет роль КоА. Заметим, что в животных тканях не удалось обнаружить свободного АПБ, подобного микробному. Из печени выделен полиэнзимный комплекс, содержащий все энзимы, необходимые для синтеза жирных кислот. Энзимы комплекса настолько прочно связаны друг с другом, что все попытки изолировать их в индивидуальном виде не увенчались успехом. Приводим последовательность реакций, происходящих при синтезе жирных кислот:

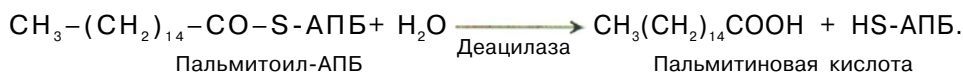




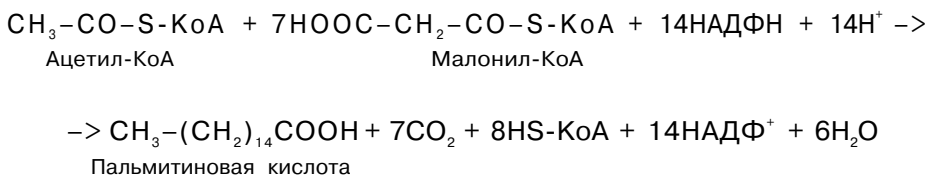
Далее цикл реакций повторяется. Допустим, что идет синтез пальмитиновой кислоты ( $C_{16}$ ). В этом случае образованием бутирил-АПБ завершается лишь первый из 7 циклов, в каждом из которых началом является присоединение молекулы малонил-АПБ к карбоксильному концу растущей цепи жирной кислоты. При этом отщепляется дистальная карбоксильная группа малонил-АПБ в виде  $CO_2$ . Например, образовавшийся в первом цикле бутирил-АПБ взаимодействует с малонил-АПБ:



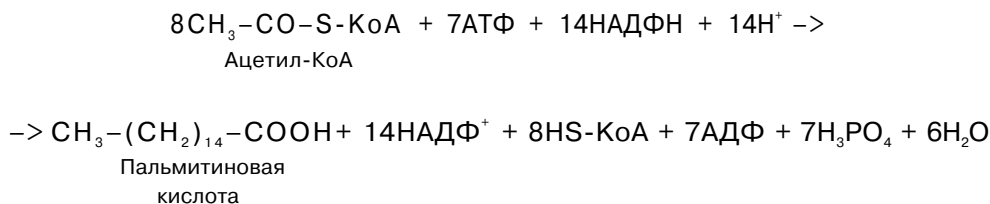
Завершается синтез жирной кислоты отщеплением  $HS-АПБ$  от ацил-АПБ под влиянием фермента деацилазы. Например:



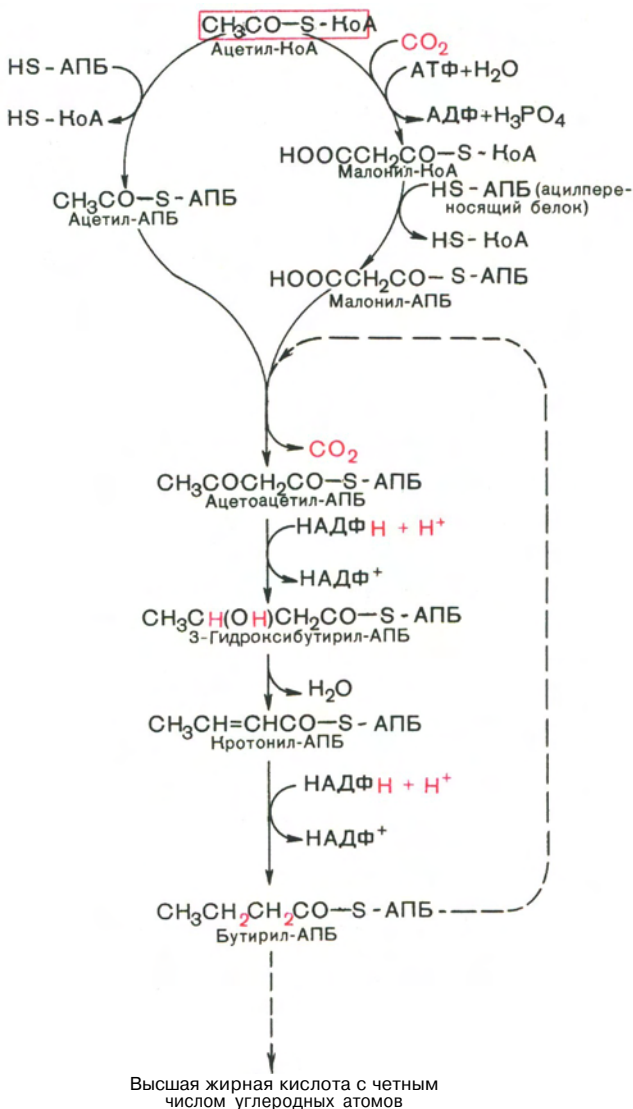
Суммарное уравнение синтеза пальмитиновой кислоты можно записать так:



Или, учитывая, что на образование одной молекулы малонил-КоА из ацетил-КоА расходуются одна молекула АТФ и одна молекула  $CO_2$ , которая затем отщепляется, суммарное уравнение можно представить в следующем виде:

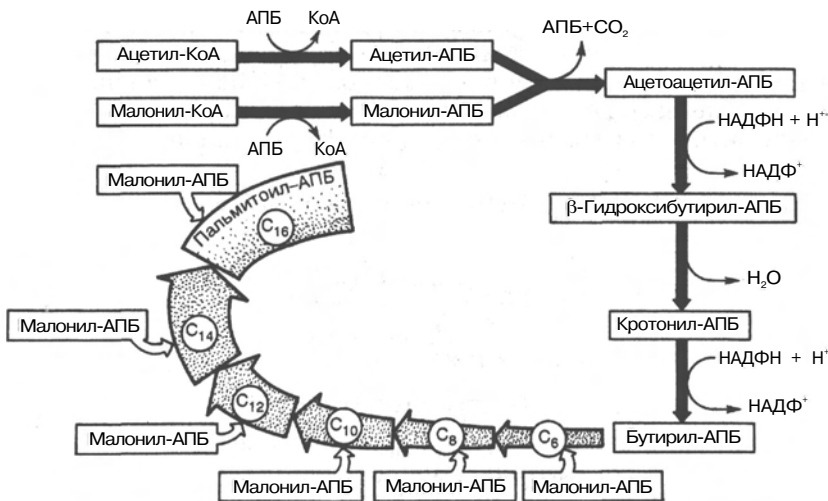


Основные этапы биосинтеза жирных кислот можно представить в виде схемы:



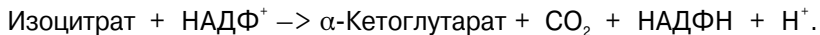
В общем виде синтез жирных кислот у кишечной палочки представлен на рис. 11.4. Последовательность и характер реакций в синтезе жирных кислот, начиная с образования  $\beta$ -кетоацил-АпБ (на рис. 11.4—ацетоацетил-АпБ) и кончая завершением одного цикла удлинения цепи на два углеродных атома, являются как бы обратными реакциями окисления жирных кислот. На самом деле пути синтеза и окисления жирных кислот не пересекаются даже частично. Это становится очевидным, если принять во внимание некоторые особенности синтеза и окисления жирных кислот.

По сравнению с  $\beta$ -окислением биосинтез жирных кислот имеет ряд характерных особенностей: синтез жирных кислот в основном осуществляется в цитозоле клетки, а окисление—в митохондриях; участие в процессе биосинтеза жирных кислот малонил-КоА, который образуется путем свя-



**Рис. 11.4.** Синтез пальмитиновой кислоты у кишечной палочки при участии одной молекулы ацетил-КоА и 7 молекул малонил-КоА. Подробно представлен первый цикл синтеза - образование бутирил-АПБ. Остальные 6 циклов аналогичны первому.

звания  $\text{CO}_2$  (в присутствии биотин-фермента и АТФ) с ацетил-КоА; на всех этапах синтеза жирных кислот принимает участие ацилпереносящий белок (HS-АПБ); при биосинтезе образуется D(-)-изомер 3-гидроксикислоты, а не L(+)-изомер, как это имеет место при  $\beta$ -окислении жирных кислот; необходимость для синтеза жирных кислот кофермента НАДФН. Последний в организме частично (на 50%) образуется в реакциях пентозофосфатного цикла, частично — в других реакциях, в частности в реакциях:



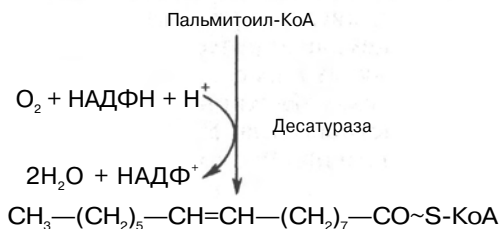
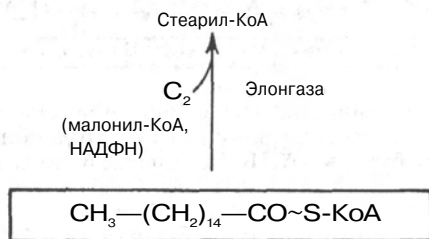
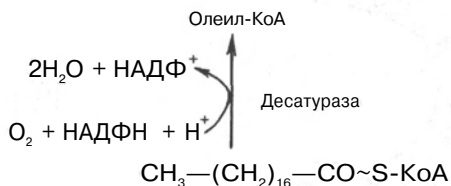
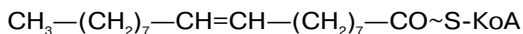
**Образование ненасыщенных жирных кислот. Элонгация жирных кислот.** В отличие от растительных тканей ткани животных обладают весьма ограниченной способностью превращать насыщенные жирные кислоты в ненасыщенные.

Установлено, что две наиболее распространенные мононенасыщенные жирные кислоты — пальмитоолеиновая и олеиновая — синтезируются из пальмитиновой и стеариновой кислот.

Эти превращения протекают в микросомах клеток печени и жировой ткани при участии молекулярного кислорода, восстановленной системы пиридиновых нуклеотидов и цитохрома  $b_5$ . Превращения подвергаются только активированные формы пальмитиновой и стеариновой кислот. Ферменты, участвующие в этих превращениях, получили название десатураз.

Наряду с десатурацией жирных кислот (образование двойных связей) в микросомах происходит и их удлинение (элонгация), причем оба эти процесса могут сочетаться и повторяться. Удлинение цепи жирной кислоты

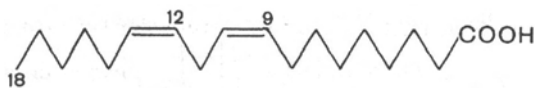
происходит путем последовательного присоединения к соответствующему ацил-КоА двууглеродных фрагментов при участии малонил-КоА и НАДФН. Энзиматическая система, катализирующая удлинение жирных кислот, получила название элонгазы. На схеме представлены пути превращения пальмитиновой кислоты в реакциях десатурации и элонгации.



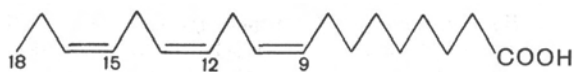
Пальмитоолеил-КоА

## НЕЗАМЕНИМЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

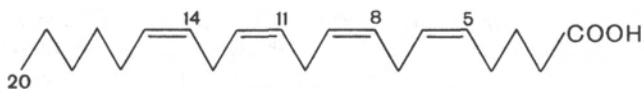
В настоящее время показано, что в микросомах клеток млекопитающих образование двойных связей может происходить только на участке цепи жирной кислоты от 9-го до 1-го углеродных атомов, ибо в микросомах отсутствуют десатуразы, которые могли бы катализировать образование двойных связей в цепи далее 9-го углеродного атома. У животных двойные связи могут образовываться в  $\Delta^4$ -,  $\Delta^5$ -,  $\Delta^6$ - и  $\Delta^9$ -положении, но не далее  $\Delta^9$ -положения, в то время как у растений — в  $\Delta^6$ -,  $\Delta^9$ -,  $\Delta^{12}$  и  $\Delta^{15}$ -положении. Поэтому в организме млекопитающих, в том числе и человека, не могут образовываться, например, из стеариновой кислоты (18:0) линолевая (18:2; 9,12) и линоленовая (18:3; 9,12,15) кислоты. Эти кислоты относятся к категории незаменимых жирных кислот. К незаменимым жирным кислотам обычно относят также арахидоновую кислоту (20:4; 5,8,11,14). У большинства млекопитающих арахидоновая кислота может образовываться из линолевой кислоты. Приводим структуры незаменимых жирных кислот:



Линолевая кислота (18:2,  $\Delta^{9,12}$ )



$\alpha$ -Линолевая кислота (18:3,  $\Delta^{9,12,15}$ )



Арахидоновая кислота (20:4,  $\Delta^{5,8,11,14}$ )

Незаменимые жирные кислоты должны поступать в организм с пищей. При длительном их отсутствии в пище у животных наблюдается отставание в росте, развиваются характерные поражения кожи и волосяного покрова. Описаны случаи недостаточности незаменимых жирных кислот и у человека. Так, у детей грудного возраста, получающих искусственное питание с незначительным содержанием жиров, может развиваться чешуйчатый дерматит, который поддается лечению препаратом линолевой кислоты.

Нарушения, обусловленные недостатком незаменимых жирных кислот, наблюдаются также у больных, жизнедеятельность которых в течение длительного времени поддерживается только за счет внутривенного питания, почти лишенного жирных кислот. Принято считать, что во избежание этих нарушений необходимо, чтобы на долю незаменимых жирных кислот приходилось не менее 1–2% от общей потребности в калориях. Следует отметить, что незаменимые жирные кислоты содержатся в достаточно больших количествах в растительных маслах.

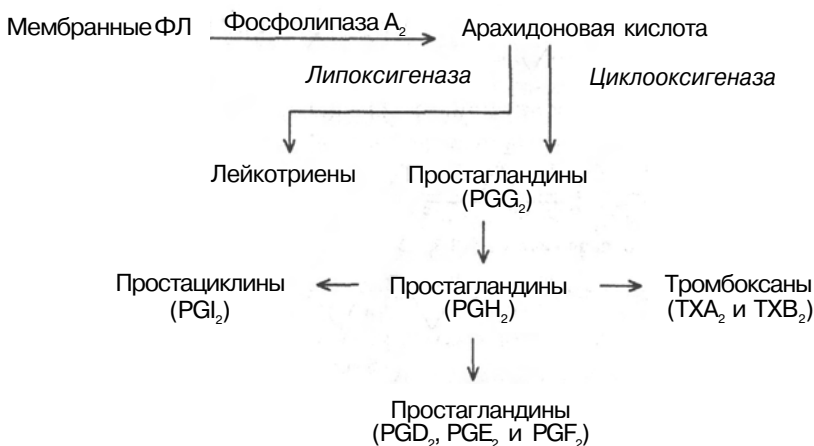
Исследования, проведенные с применением изотопов, показали, что арахидоновая кислота и некоторые другие 20-углеродные (эйкозановые) кислоты, содержащие двойные связи, участвуют в образовании эйкозаноидов.

## ЭЙКОЗАНОИДЫ

Эйкозаноиды – обширная группа физиологически и фармакологически активных соединений. К ним относятся простаноиды (простагландины, простациклины, тромбоксаны) и лейкотриены.

Наиболее активным предшественником эйкозаноидов является входящая в состав фосфолипидов плазматических мембран арахидоновая кислота. Последняя освобождается из фосфолипидного бислоя мембраны при действии фосфолипазы  $A_2$ . В образовании эйкозаноидов принимают участие также и другие незаменимые жирные кислоты (линолевая и  $\alpha$ -линоленовая), но только после элонгации на два углеродных атома и десатурации, т.е. после превращения в 20-углеродные тетраеновые кислоты. Поэтому эйкозаноиды можно разделить на 3 группы (в каждую входят простагландины, тромбоксаны и лейкотриены) в зависимости от предшественников: линолеата, арахидоната и линолената.

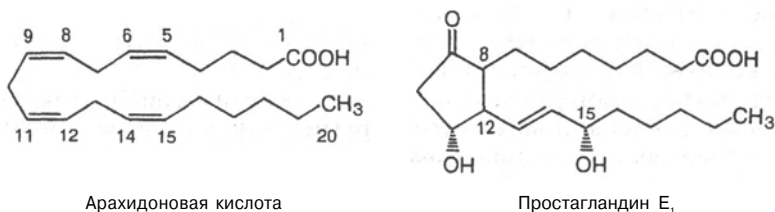
Пути метаболизма арахидоната (субстрата) различны, причем синтез простаноидов конкурирует за субстрат с синтезом лейкотриенов. Эти два



**Рис. 11.5.** Участие арахидоновой кислоты в образовании эйкозаноидов (по А.Н. Климову и Н.Г. Никульчевой).

пути называют соответственно циклооксигеназным и липоксигеназным (рис. 11.5).

**Простагландины (ПГ, Pg).** По существу ПГ представляют собой 20-углеродные жирные кислоты, содержащие 5-углеродное кольцо и гидрокси- и/или кетогруппы:



Арахидоновая кислота

Простагландин E<sub>5</sub>

Обнаружено шесть первичных природных ПГ, три из них серии E (ether-soluble) и три – серии F (phosphate-soluble). ПГ серии E содержат в положении 9 кетогруппу, а ПГ серии F – гидроксигруппу. Имеется также несколько вторичных ПГ, представляющих собой продукты ферментативического превращения первичных.

ПГ проявляют свое действие в чрезвычайно низких концентрациях (1–10 нг/мл). Будучи введенными в организм, они вызывают сокращение гладкой мускулатуры, регулируют приток крови к определенному органу, оказывают переменчивое влияние на кровяное давление, контролируют транспорт ионов через мембраны и т.д.

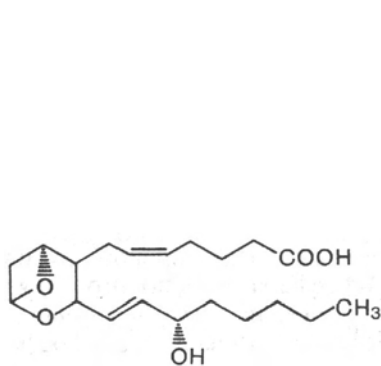
В целом ПГ, не являясь гормонами, модулируют действие последних. Они преимущественно влияют на физиологические функции тех клеток, в которых синтезируются. Характер воздействия ПГ зависит от типа клетки, и этим ПГ отличаются от гормонов с их однозначным эффектом.

ПГ могут использоваться как терапевтическое средство для предотвращения оплодотворения, стимулирования нормальных родов, прерывания беременности, предупреждения развития или обезболивания язвы желудка,

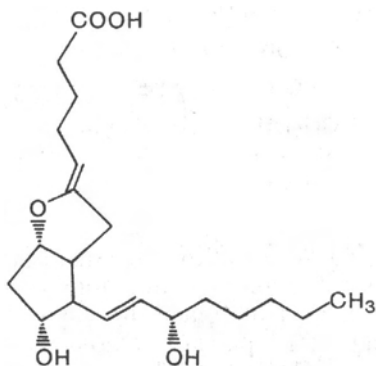
лечения воспалительных процессов и регуляции кровяного давления, а также для снятия приступов астмы и др.

Среди продуктов эндопероксидации вторичных ПГ необходимо отметить тромбоксаны и простаглицлины. **Тромбоксаны** образуются в тромбоцитах и после выхода в кровяное русло вызывают сужение кровеносных сосудов и агрегацию тромбоцитов.

**Простаглицлины** образуются в стенках кровеносных сосудов и являются сильными ингибиторами агрегации тромбоцитов. Таким образом, тромбоксаны и простаглицлины выступают как антагонисты. Поэтому соотношение тромбоксана и простаглицлина во многом определяет условия тромбообразования на поверхности эндотелия сосудов. Приводим формулы двух важнейших представителей этих соединений:

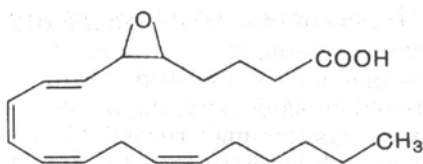


Тромбоксан  $A_2$



Простаглицлин ( $PGI_2$ )

**Лейкотриены.** Это производные 20-углеродных полиненасыщенных (эйкозановых) кислот. Название «лейкотриены» происходит от двух слов: «лейкоциты» (впервые эти соединения были обнаружены в лейкоцитах) и «триены» (у всех представителей этого класса соединений из четырех ненасыщенных связей три являются конъюгированными). Лейкотриены синтезируются из эйкозановых кислот в лейкоцитах, клетках мастоцитомы, тромбоцитах и макрофагах по липоксигеназному пути в ответ на иммунологические и неиммунологические стимулы. Приводим структуру одного из лейкотриенов:



Лейкотриен  $A_4$

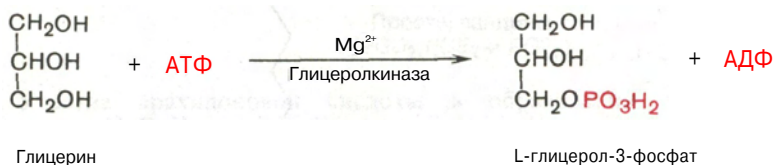
Лейкотриены прежде всего рассматриваются как медиаторы воспалительных реакций; они вызывают сокращение мышечной ткани бронхов в концентрациях, в 100–1000 раз меньших, чем гистамин; способствуют сокращению коронарных сосудов. В целом функция лейкотриенов в норме и при патологии во многом еще неясна.

## БИОСИНТЕЗ ТРИГЛИЦЕРИДОВ \*

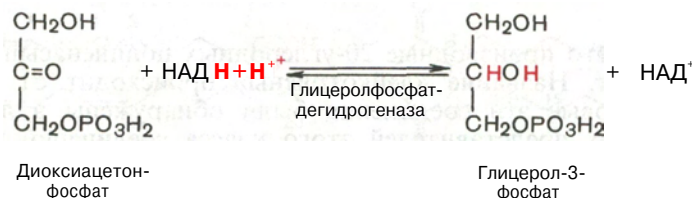
Известно, что скорость биосинтеза жирных кислот во многом определяется скоростью образования триглицеридов и фосфолипидов, так как свободные жирные кислоты присутствуют в тканях и плазме крови в небольших количествах и в норме не накапливаются.

Синтез триглицеридов происходит из глицерина и жирных кислот (главным образом стеариновой, пальмитиновой и олеиновой). Путь биосинтеза триглицеридов в тканях протекает через образование  $\alpha$ -глицерофосфата (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 процессами гликолиза и гликогенолиза. Известно, что в процессе гликолитического распада глюкозы образуется дигидроксиацетонфосфат (см. главу 10). Последний в присутствии цитоплазматической глицерол-3-фосфатдегидрогеназы способен превращаться в глицерол-3-фосфат:

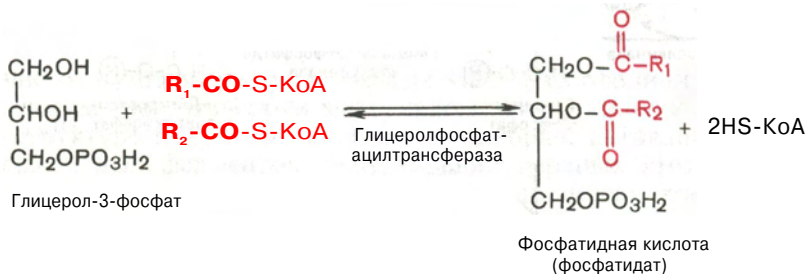


Отмечено, что если содержание глюкозы в жировой ткани понижено (например, при голодании), то образуется лишь незначительное количество глицерол-3-фосфата и освободившиеся в ходе липолиза свободные жирные кислоты не могут быть использованы для ресинтеза триглицеридов, поэтому жирные кислоты покидают жировую ткань. Напротив, активация гликолиза в жировой ткани способствует накоплению в ней триглицеридов, а также входящих в их состав жирных кислот. В печени наблюдаются оба пути образования глицерол-3-фосфата.

Образовавшийся тем или иным путем глицерол-3-фосфат последовательно ацилируется двумя молекулами КоА-производного жирной кислоты (т.е. «активными» формами жирной кислоты—ацил-КоА). В результате образуется фосфатидная кислота (фосфатидат):

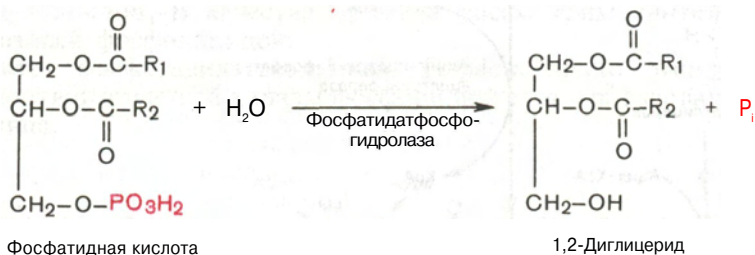
\* Триглицериды - это триацилглицеролы по международной номенклатуре.



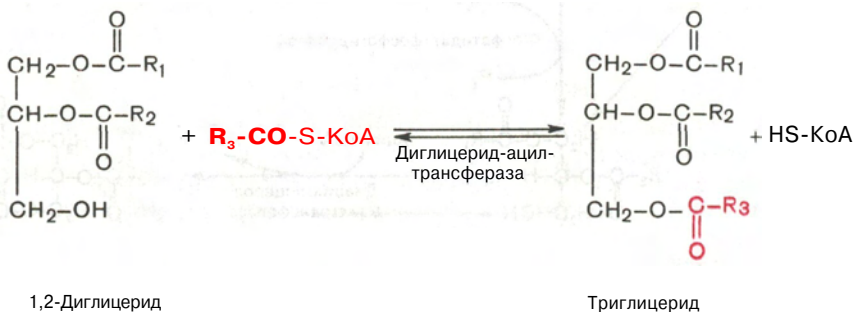


Как отмечалось, ацилирование глицерол-3-фосфата протекает последовательно, т.е. в 2 этапа. Сначала глицерол-3-фосфат-ацилтрансфераза катализирует образование лизофосфатидата (1-ацилглицерол-3-фосфата), а затем 1-ацилглицерол-3-фосфат-ацилтрансфераза катализирует образование фосфатидата (1,2-диацилглицерол-3-фосфата) \*.

Далее фосфатидная кислота гидролизуется фосфатидат-фосфогидролазой до 1,2-диглицерида (1,2-диацилглицерола):

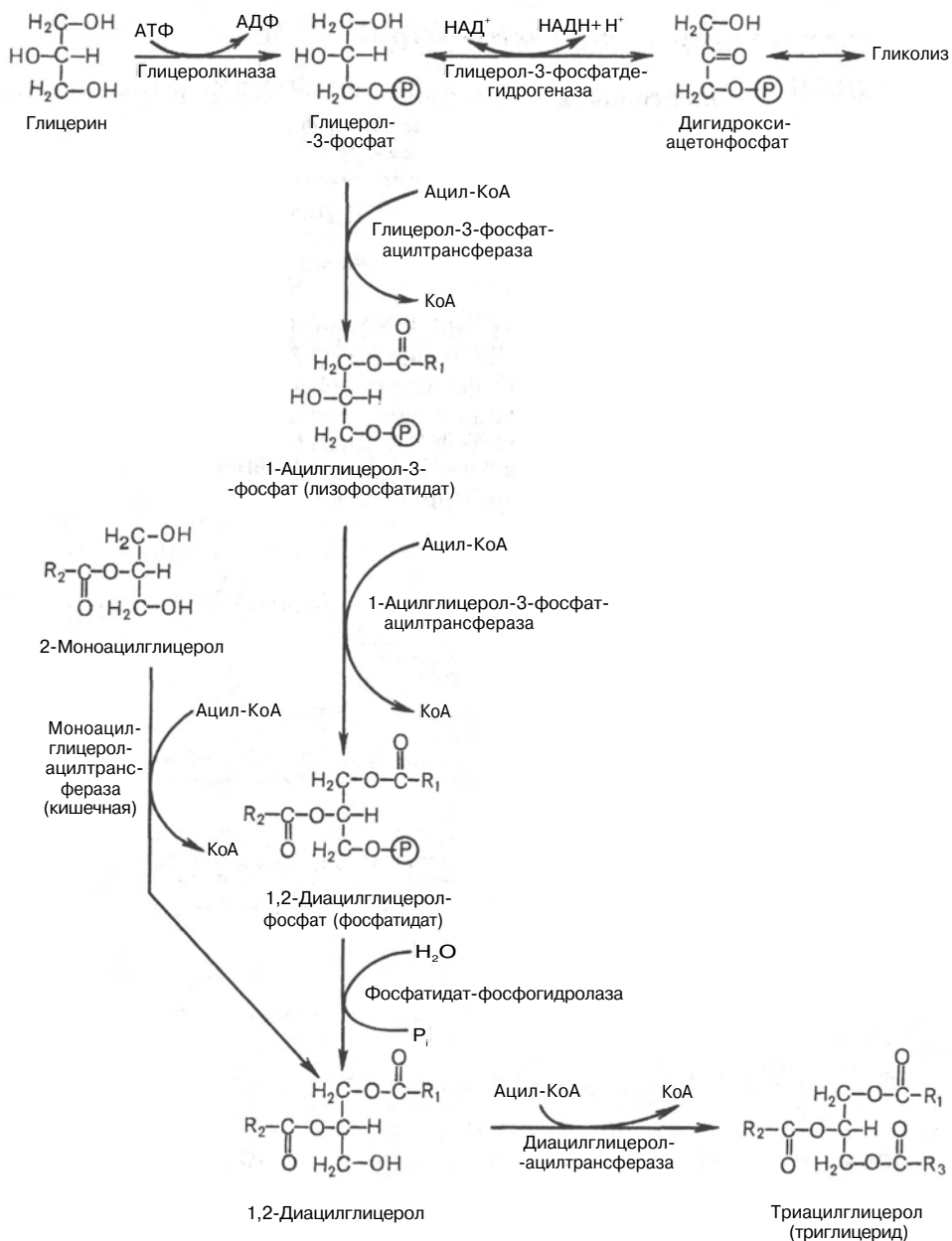


Затем 1,2-диглицерид ацилируется третьей молекулой ацил-КоА и превращается в триглицерид (триацилглицерол). Эта реакция катализируется диацилглицерол-ацилтрансферазой:



Синтез триглицеридов (триацилглицеролов) в тканях происходит с учетом двух путей образования глицерол-3-фосфата и возможности синтеза триглицеридов в стенке тонкой кишки из  $\beta$ -моноглицеридов, поступающих из полости кишечника в больших количествах после расщепления пищевых

\* Фосфатидная кислота (фосфатидат) обнаружена во многих тканях, правда, в следовых количествах. Только в печени на ее долю приходится 1% от всех фосфолипидов.



**Рис. 11.6.** Биосинтез триглицеридов (триацилглицеролов).

жиров. На рис. 11.6 представлены глицерофосфатный, дигидроксиацетонфосфатный и β-моноглицеридный (моноацилглицероловый) пути синтеза триглицеридов.

Установлено, что большинство ферментов, участвующих в биосинтезе триглицеридов, находятся в эндоплазматическом ретикулуме, и только некоторые, например глицерол-3-фосфат-ацилтрансфераза,— в митохондриях.

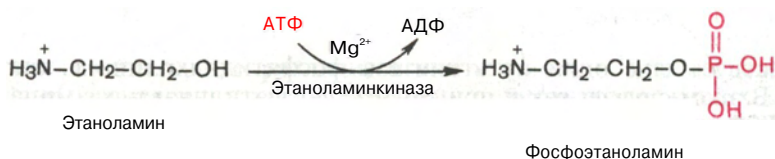
## МЕТАБОЛИЗМ ФОСФОЛИПИДОВ

В отличие от триглицеридов и жирных кислот фосфолипиды не являются существенным энергетическим материалом. Фосфолипиды играют важную роль в структуре и функции клеточных мембран, активации мембранных и лизосомальных ферментов, в проведении нервных импульсов, свертывании крови, иммунологических реакциях, процессах клеточной пролиферации и регенерации тканей, в переносе электронов в цепи «дыхательных» ферментов. Особая роль фосфолипидам отводится в формировании липопротеидных комплексов.

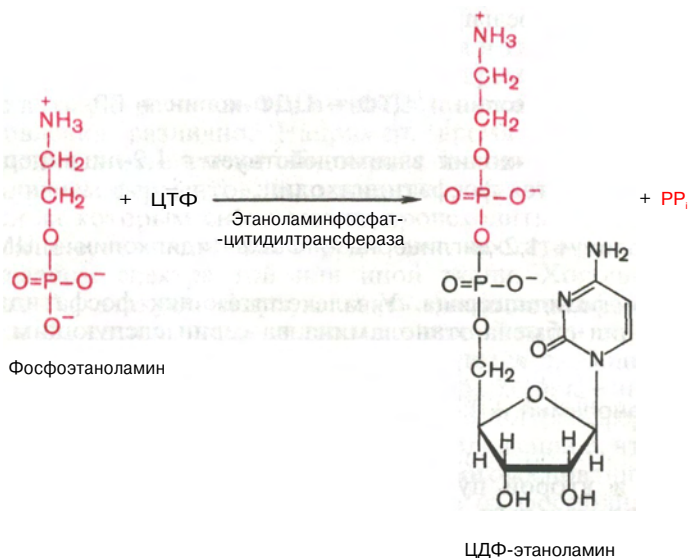
Биосинтез фосфолипидов интенсивно происходит в печени, стенке кишечника, семенниках, яичниках, молочной железе и других тканях. Наиболее важные фосфолипиды синтезируются главным образом в эндоплазматической сети клетки.

Центральную роль в биосинтезе фосфолипидов играют 1,2-диглицериды (в синтезе фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов), фосфатидная кислота (в синтезе фосфатидинозитов) и сфингозин (в синтезе сфингомиелинов). Цитидинтрифосфат (ЦТФ) участвует в синтезе практически всех фосфолипидов. В качестве примера рассмотрим синтез отдельных представителей фосфолипидов.

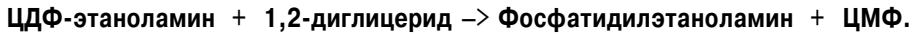
**Биосинтез фосфатидилэтаноламина.** Первоначально этаноламин при участии соответствующей киназы фосфорилируется с образованием фосфоэтаноламина:



Затем фосфоэтаноламин взаимодействует с ЦТФ, в результате чего образуются цитидиндифосфатэтаноламин (ЦДФ-этаноламин) и пиррофосфат (PP<sub>i</sub>):



В следующей реакции ЦДФ-этаноламин, взаимодействуя с 1,2-диглицеридом, образуемым при дефосфорилировании фосфатидной кислоты, превращается в фосфатидилэтаноламин. Реакция катализируется ферментом этаноламинфосфотрансферазой:



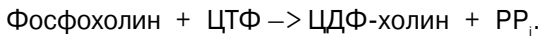
**Биосинтез фосфатидилхолина (лецитина).** Фосфатидилэтаноламин является предшественником фосфатидилхолина. В результате последовательного переноса трех метальных групп от трех молекул S-аденозилметионина (донор метальных групп, см. главу 6) к аминогруппе остатка этаноламина образуется фосфатидилхолин:



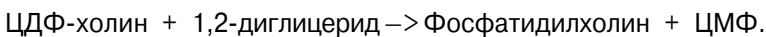
Существует еще один путь синтеза фосфатидилхолина в клетках животных. В этом случае, как и при синтезе фосфатидилэтанолamina, используется ЦТФ в качестве переносчика, но уже не фосфоэтанолamina, а фосфохолина. На первом этапе синтеза свободный холин активируется под действием холинкиназы с образованием фосфохолина:



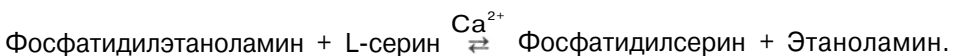
Затем фосфохолин реагирует с ЦТФ, образуя цитидиндифосфатхолин (ЦДФ-холин):



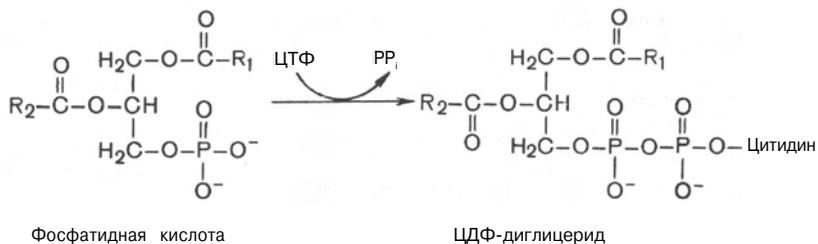
В дальнейшем ЦДФ-холин взаимодействует с 1,2-диглицеридом, в результате чего образуется фосфатидилхолин:



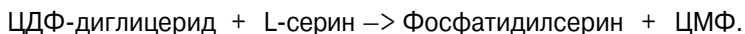
**Биосинтез фосфатидилсерина.** У млекопитающих фосфатидилсерин образуется в реакции обмена этаноламина на серин следующим путем:



Существует и второй путь образования фосфатидилсерина, который связан с предварительным вовлечением фосфатидной кислоты в синтез фосфоглицеридов:

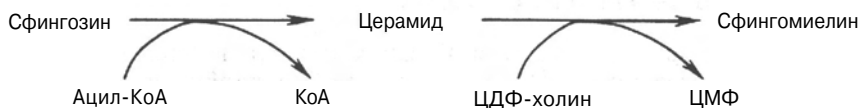


Затем происходит перенос серина на фосфатидильный остаток с образованием фосфатидилсерина:



Таким же путем образуется фосфатидилинозитол.

**Биосинтез сфингомиелина.** Интермедиатом в биосинтезе сфингомиелина является церамид (N-ацилсфингозин), который образуется при взаимодействии сфингозина с ацил-КоА. Сфингомиелин синтезируется в результате взаимодействия (реакции) церамида с ЦДФ-холином:



Следует отметить, что различие в синтезе холин- и этаноламинсодержащих фосфолипидов, с одной стороны, и инозитсодержащих фосфолипидов—с другой, заключается в том, что в первом случае при участии ЦТФ образуется ЦДФ-холин или ЦДФ-этанолламин—реакционноспособные азотистые основания, а во втором случае при участии ЦТФ образуется ЦДФ-диглицерид—реакционноспособная форма диглицерида.

## Распад и обновление фосфолипидов

Известно, что молекулы белков расщепляются в тканях полностью. Поэтому для молекулы белков можно определить время обновления. Фосфолипиды также активно распадаются в тканях, но для каждой части молекулы время обновления различно. Например, время обновления фосфатной группы отличается от времени обновления 1-ацильной группы, и обусловлено это наличием ферментов, вызывающих частичный гидролиз фосфолипидов, вслед за которым снова может происходить их синтез (рис. 11.7).

К сожалению, в настоящее время нет достаточно полных данных о фосфолипазном спектре той или иной ткани. Хорошо известно, что фосфолипаза  $A_1$  атакует эфирную связь фосфолипидов в положении 1. Фосфолипаза  $A_2$  катализирует гидролиз эфирной связи в положении 2 глицерофосфолипидов, в результате чего образуются свободная жирная кислота и лизофосфолипид (в случае фосфатидилхолина—лизолецитин), который реацилируется ацил-КоА при участии ацилтрансферазы.

Фосфолипаза С атакует эфирную связь в положении 3, что заканчивается образованием 1,2-диглицерида и фосфорильного основания.

Фосфолипаза D катализирует отщепление от фосфолипида азотистого основания. Долгое время считалось, что фосфолипаза D содержится только

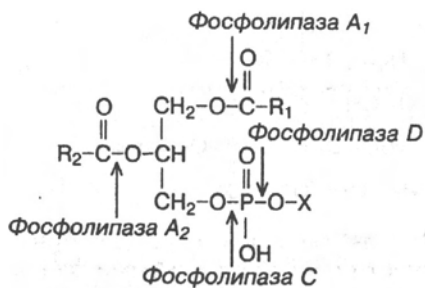


Рис. 11.7. Гидролитическое расщепление фосфолипазами строго определенных связей фосфолипидов.

в растительных тканях. В последнее время ее удалось обнаружить в растворимой фракции мозга крысы, а затем в микросомах мозга и других органов, а в самое последнее время—в митохондриях печени крысы.

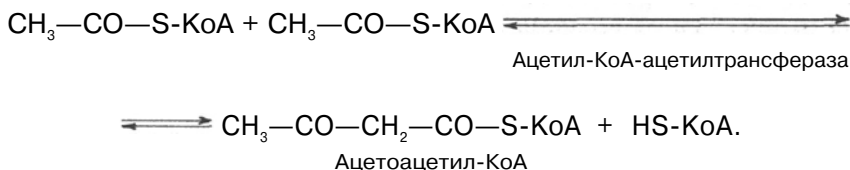
Нет ясности в отношении фосфолипазы В. Возможно, что это—смесь ферментов, обладающих свойствами фосфолипаз A<sub>1</sub> и A<sub>2</sub>. Не исключено, что фосфолипаза В—фермент, действующий только на лизофосфолипид (например, лизолецитин), т.е. это лизофосфолипаза.

## БИОСИНТЕЗ ХОЛЕСТЕРИНА

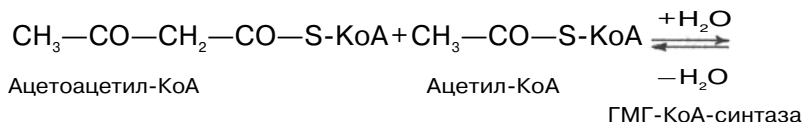
В 40-60-х годах нашего столетия К. Блох и сотр. в опытах с использованием ацетата, меченного <sup>14</sup>С по метильной и карбоксильной группам, показали, что оба атома углерода уксусной кислоты включаются в холестерин печени приблизительно в одинаковых количествах. Кроме того, было доказано, что все атомы углерода холестерина происходят из ацетата.

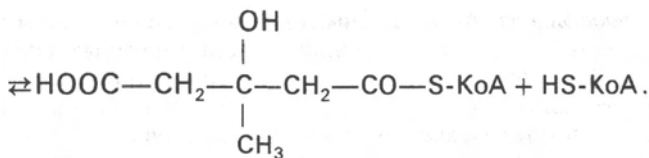
В дальнейшем благодаря работам Ф. Линена, Г. Попьяка, Дж. Корнфорта, А.Н. Климова и других исследователей были выяснены основные детали ферментативного синтеза холестерина, насчитывающего более 35 энзиматических реакций. В синтезе холестерина можно выделить три основные стадии: I—превращение активного ацетата в мевалоновую кислоту, II—образование сквалена из мевалоновой кислоты, III—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:



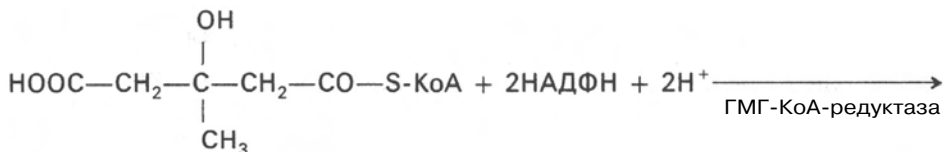
Затем при последующей конденсации ацетоацетил-КоА с 3-й молекулой ацетил-КоА при участии гидроксиметилглутарил-КоА-синтазы (ГМГ-КоА-синтаза) образуется β-гидрокси-β-метилглутарил-КоА:



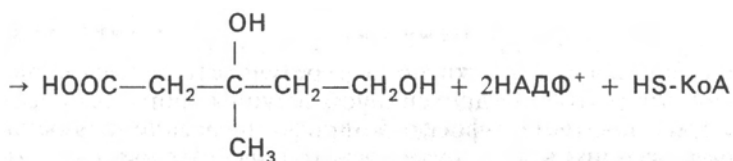


β-Гидрокси-β-метилглутарил-КоА

Далее β-гидрокси-β-метилглутарил-КоА под действием регуляторного фермента НАДФ-зависимой гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазы (ГМГ-КоА-редуктаза) в результате восстановления одной из карбоксильных групп и отщепления HS-CoA превращается в мевалоновую кислоту:



β-Гидрокси-β-метилглутарил-КоА



Мевалоновая кислота

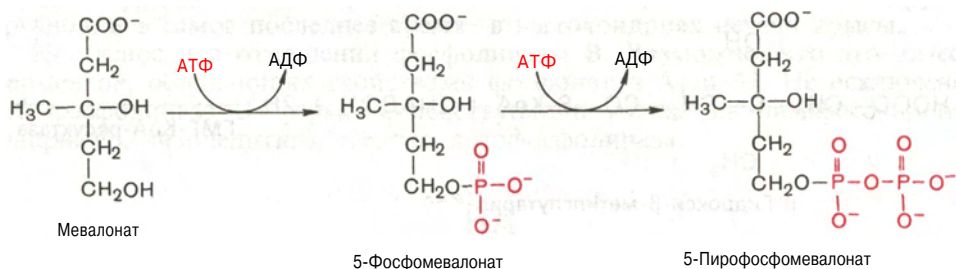
ГМГ-КоА-редуктазная реакция — первая практически необратимая реакция в цепи биосинтеза холестерина. Она протекает со значительной потерей свободной энергии (около 33,6 кДж). Установлено, что данная реакция лимитирует скорость биосинтеза холестерина.

Наряду с классическим путем биосинтеза мевалоновой кислоты имеется второй путь, в котором в качестве промежуточного субстрата, по-видимому, образуется не β-гидрокси-β-метилглутарил-КоА, а β-гидрокси-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.

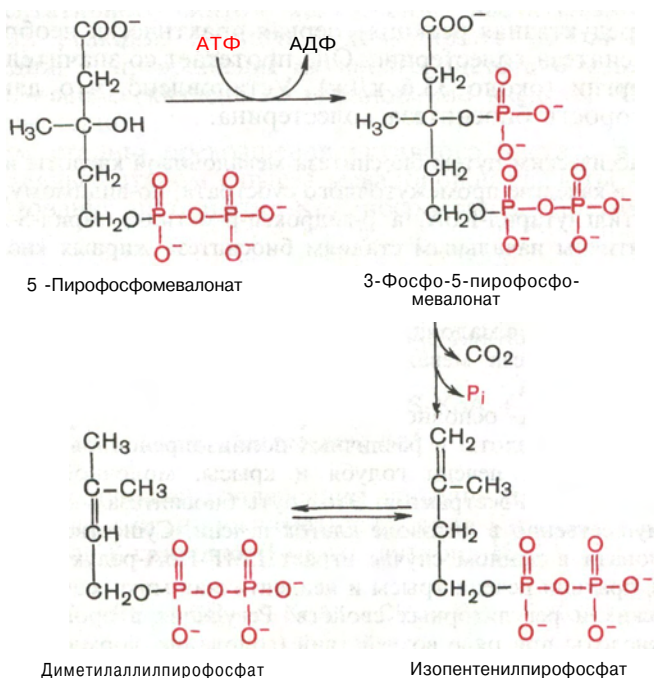
Участие малонил-КоА — основного субстрата биосинтеза жирных кислот в образовании мевалоновой кислоты и различных полиизопреноидов показано для ряда биологических объектов: печени голубя и крысы, молочной железы кролика, бесклеточных дрожжевых экстрактов. Этот путь биосинтеза мевалоновой кислоты отмечен преимущественно в цитозоле клеток печени. Существенную роль в образовании мевалоната в данном случае играет ГМГ-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 ре-

гуляции 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  $N^6$ -( $\Delta^2$ -изопентил)-аденозина некоторых тРНК, но и для биосинтеза стероидов (А.Н. Климов, Э.Д. Полякова).

На II стадии синтеза холестерина мевалоновая кислота превращается в сквален. Реакции II стадии начинаются с фосфорилирования мевалоновой кислоты с помощью АТФ. В результате образуется 5-фосфорный эфир, а затем 5-пирофосфорный эфир мевалоновой кислоты:

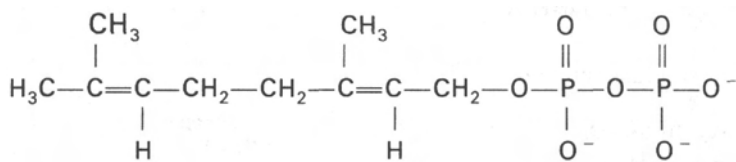


5-пирофосфомевалоновая кислота в результате последующего фосфорилирования третичной гидроксильной группы образует нестабильный промежуточный продукт — 3-фосфо-5-пирофосфомевалоновую кислоту, которая, декарбоксилируясь и теряя остаток фосфорной кислоты, превращается в изопентенилпирофосфат. Последний изомеризуется в диметилаллилпирофосфат:



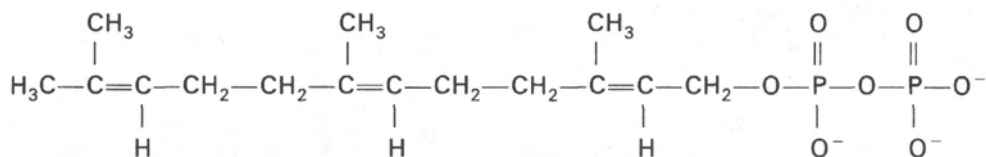


Затем оба изомерных изопентенилпирофосфата (диметилаллилпирофосфат и изопентенилпирофосфат) конденсируются с высвобождением пирофосфата и образованием геранилпирофосфата:



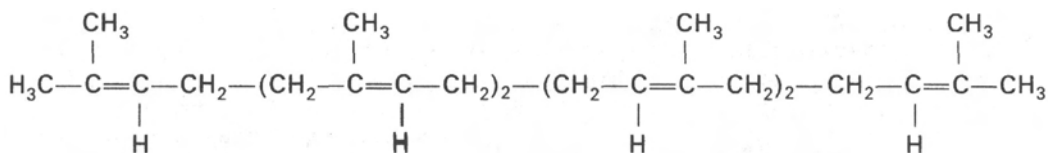
Геранилпирофосфат

К геранилпирофосфату вновь присоединяется изопентенилпирофосфат. В результате этой реакции образуется фарнезилпирофосфат:



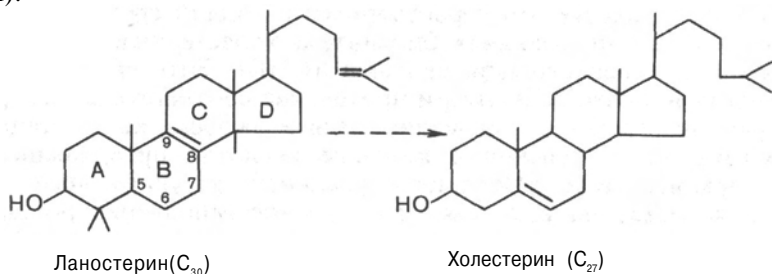
Фарнезилпирофосфат (C<sub>15</sub>)

В заключительной реакции данной стадии в результате НАДФН-зависимой восстановительной конденсации 2 молекул фарнезилпирофосфата образуется сквален:

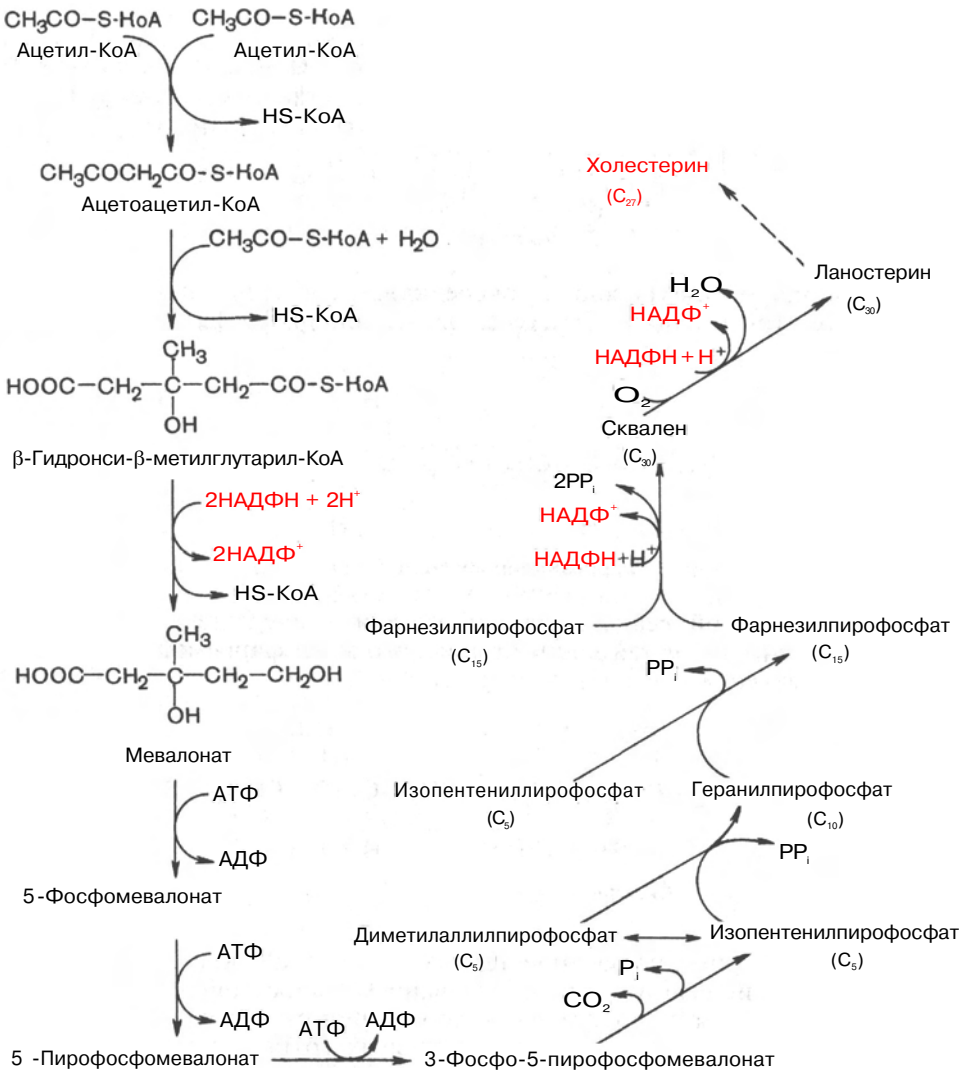


Сквален (C<sub>30</sub>)

На III стадии биосинтеза холестерина сквален под влиянием сквален-оксидоциклазы 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 кольцо В из положения 8, 9 в положение 5, 6 (детально эти последние реакции еще не изучены):



Приводим общую схему синтеза холестерина:



Начиная со сквалена, все промежуточные продукты биосинтеза холестерина (включая и холестерин) нерастворимы в водной среде. Поэтому они участвуют в конечных реакциях биосинтеза холестерина, будучи связанными со стеринпереносящими белками (СПБ). Это обеспечивает их растворимость в цитозоле клетки и протекание соответствующих реакций. Данный факт имеет важное значение и для вхождения холестерина в клеточные мембраны, окисления в желчные кислоты, превращения в стероидные гормоны. Как отмечалось, реакцией, регулирующей скорость биосинтеза холестерина в целом, является восстановление  $\beta$ -гидрокси- $\beta$ -метилглутарил-КоА в мевалоновую кислоту, катализируемое ГМГ-КоА-редуктазой. Данный фермент испытывает регуляторное воздействие ряда

факторов. В частности, скорость синтеза редуктазы в печени подвержена четким суточным колебаниям: максимум ее приходится на полночь, а минимум — на утренние часы.

Активность ГМГ-редуктазы возрастает при введении инсулина и тиреоидных гормонов. Это приводит к усилению синтеза холестерина и повышению его уровня в крови.

При голодании, тиреоидэктомии, введение глюкагона и глюкокортикоидов, напротив, отмечается угнетение синтеза холестерина, что прежде всего связано со снижением активности ГМГ-КоА-редуктазы.

## РЕГУЛЯЦИЯ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

Обмен липидов регулируется ЦНС. Кора большого мозга оказывает трофическое влияние на жировую ткань либо через нижележащие отделы ЦНС — симпатическую и парасимпатическую системы, либо через эндокринные железы. В настоящее время установлен 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 вызвать заметное похудение. Уместно напомнить, что жировая ткань обильно иннервируется волокнами симпатической нервной системы, 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 повышается содержание неэстерифицированных жирных кислот в плазме крови. Как отмечалось, тканевые липазы (триглицеридлипаза) существуют в двух взаимопревращающихся формах, одна из которых фосфорилирована и каталитически активна, а другая — нефосфорилирована и неактивна. Адреналин стимулирует через аденилатциклазу синтез цАМФ. В свою очередь цАМФ активирует соответствующую протеинкиназу, которая способствует фосфорилированию липазы, т.е. образованию ее активной формы. Следует заметить, что действие глюкагона на липолитическую систему сходно с действием катехоламинов.

Не подлежит сомнению, что секрет передней доли гипофиза, в частности соматотропный гормон, оказывает влияние на липидный обмен. Гипофункция железы приводит к отложению жира в организме, наступает гипопитарное 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 1 ч, 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 избирательно увеличивает синтез аденилатциклазы, пока неизвестен.

Инсулин оказывает противоположное адреналину и глюкагону действие на липолиз и мобилизацию жирных кислот. Недавно было показано, что инсулин стимулирует фосфодиэстеразную активность в жировой ткани. Фосфодиэстераза играет важную роль в поддержании постоянного уровня цАМФ в тканях, поэтому увеличение содержания инсулина должно повы-

шать активность фосфодиэстеразы, что в свою очередь приводит к уменьшению концентрации цАМФ в клетке, а следовательно, и к образованию активной формы липазы.

Несомненно, 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. 11.2 приведены сводные данные о влиянии ряда факторов на мобилизацию жирных кислот из жировых депо.

Таблица 11.2. 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 Усиление синтеза аденилатциклазы и гормоночувствительной липазы
Простагландины	Угнетение	Ослабление действия катехоламинов на аденилатциклазу, угнетение аденилатциклазы
Инсулин	»	Торможение освобождения жирных кислот в результате активации гликолиза в жировой ткани; активация фосфодиэстеразы цАМФ
Стресс, физическая нагрузка, голодание, охлаждение	Усиление	Стимуляция секреции катехоламинов и угнетение секреции инсулина

## НАРУШЕНИЯ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

**Нарушение процессов всасывания жиров.** Нарушения липидного обмена возможны уже в процессе переваривания и всасывания жиров. Одна группа расстройств связана с недостаточным поступлением панкреатической липазы в кишечник, вторая обусловлена нарушением поступления в кишечник желчи. Кроме того, нарушения процессов переваривания и всасывания липидов могут быть связаны с заболеваниями пищеварительного тракта (при энтеритах, гиповитаминозах и некоторых других патологических состояниях). Образовавшиеся в полости кишечника моноглицериды и жирные кислоты не могут нормально всасываться вследствие 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 ткань.** При недостаточной активности липопротеинлипазы крови нарушается переход жирных кислот из хиломикрон (ХМ) плазмы крови в жировые депо (не расщепляются триглицериды). Чаще это наследственное заболевание, обусловленное полным отсутствием активности липопротеинлипазы. Плазма крови при этом

имеет молочный цвет в результате чрезвычайно высокого содержания ХМ. Наиболее эффективным лечением этого заболевания является замена природных жиров, содержащих жирные кислоты с 16–18 углеродными атомами, синтетическими, 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 в очень небольших концентрациях. Однако при голодании, а также у лиц с тяжелой формой сахарного диабета 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  $\beta$ -гидроксималяновая кислоты) с током крови транспортируются из печени к периферическим тканям. 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» с учетом современных знаний можно выразить иначе: «без атерогенных липопротеинов не может быть атеросклероза».

Напомним, что плазменные липопротеины\* — это 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 2,0–2,5 нм, что соответствует половине толщины фосфолипидного бислоя клеточной мембраны.

Различают несколько классов липопротеинов:  $\alpha$ -липопротеины, или липопротеины высокой плотности (ЛПВП);  $\beta$ -липопротеины, или липо-

\* Помимо плазменных липопротеинов, в организме существуют мембранные липопротеины, которые имеют несколько иное строение.

протеины низкой плотности (ЛПНП); пре- $\beta$ -липопротеины, или липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП); хиломикроны (ХМ).

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 (подробнее см. главу 17).

Исследования последних 5 лет показали, что сами по себе нативные ЛПНП и ЛПОНП аллергенностью не обладают. Атерогенность у этих классов липопротеинов появляется только тогда, когда их частицы подвергнутся химическому изменению и прежде всего перекисному окислению. При этом сначала в их составе образуются такие продукты перекисного окисления липидов, как диеновые и триеновые конъюгаты, гидроперекиси, малоновый диальдегид и др., а затем уже происходит взаимодействие с белковыми компонентами—аполипопротеинами. Образуются химически измененные липопротеины, которые стали называть перекисно модифицированными.

Перекисная модификация липопротеинов может в определенной степени протекать в кровяном русле, но главным местом их образования является артериальная стенка.

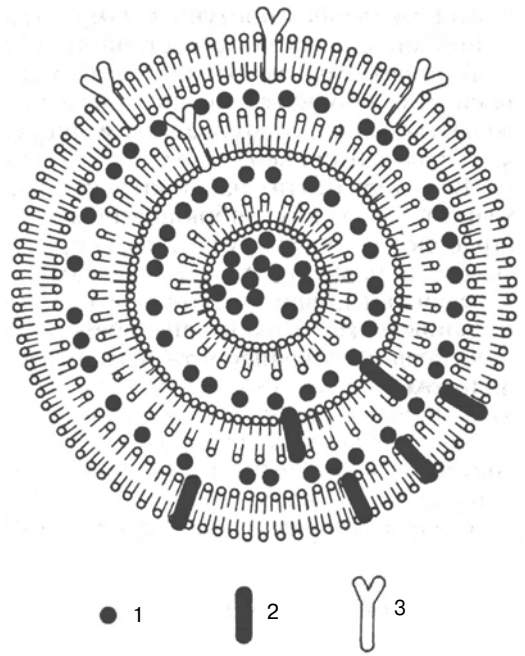
Перекисно модифицированные ЛПНП, образовавшись в артериальной стенке, быстро и бесконтрольно захватываются здесь макрофагами. Иногда модифицированные изменения липопротеинов заходят настолько глубоко, что липопротеины приобретают аутоантигенные свойства, к ним вырабатываются антитела и в конечном счете образуются аутоиммунные комплексы липопротеины—антитела. Последние также обладают высокой атерогенностью и бесконтрольно захватываются артериальными макрофагами. Макрофаги, захватившие модифицированные липопротеины или иммунные комплексы (липопротеин—антитело), накапливают в цитоплазме чрезвычайно высокие концентрации эстерифицированного и свободного холестерина (в них нет энзимов, которые расщепляли бы холестерин) и трансформируются в так называемые пенистые клетки. Последние в результате цитотоксического действия высоких концентраций холестерина погибают, при их разрушении во внутреннюю оболочку артерий изливается ими же накопленный холестерин. Поэтому пенистая клетка рассматривается как главная «виновница» атеросклеротического процесса на морфологическом уровне.

Последующие события: пролиферация гладких мышечных клеток, синтез ими коллагена и эластина—направлены на изоляцию холестериновых отложений путем образования соединительнотканной (фиброзной) капсулы. Так в упрощенном виде можно представить образование фиброзной бляшки—основного элемента атеросклеротического поражения артерий.

В отличие от липопротеинов низкой и очень низкой плотности ЛПВП рассматриваются как антиатерогенные. Они осуществляют «обратный» транспорт холестерина—от периферических тканей в печень, где холестерин окисляется в желчные кислоты. Кроме того, ЛПВП обладают еще одним важным свойством: они задерживают перекисную модификацию липопротеинов низкой и очень низкой плотности (А.Н. Климов). Поэтому чем выше уровень ЛПВП в крови, тем меньше вероятность развития атеросклероза.

## **ЛИПОСОМЫ**

Липосомы—искусственно создаваемые липидные везикулы (пузырьки), состоящие из одного или нескольких фосфолипидных бислоев, разделенных водной фазой. Диаметр липосом может колебаться от 25 до 10000 нм.



**Рис. 11.8.** 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.

Обычно липосомы получают путем встряхивания или обработки ультразвуком водных суспензий фосфолипидов. Липосомы могут быть сформированы из индивидуальных фосфолипидов, как природных, так и синтетических, а также из смеси фосфолипидов.

Вначале липосомы использовали 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. 11.8 представлена модель многослойной липосомы, а также показано распределение водо- и жирорастворимых препаратов, инкапсулированных в липосоме.

Использование комплексов липосома—препарат имеет 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 большой терапевтический эффект (время действия увеличивается, при этом доза его может быть значительно снижена); липосомы могут эффективно использоваться как адъюванты, т.е. вещества, стимулирующие иммунологические реакции. Предполагают, что существует по крайней мере 2 пути проникновения липосом в клетку. Первый заключается в том, что вследствие эндоцитоза липосома захватывается клеткой и образуется вакуоль, которая сливается с лизосомами. Фосфолипазы лизосом гидролизуют фосфолипиды мембраны лизосом, обеспечивая выход препарата в цитоплазму клетки. Если липосома состоит из нескольких липидных мембран, то постепенный гидролиз их обеспе-

чивает медленное поступление препарата в клетку. Второй путь—это когда 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, так как захватываются 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.



## Глава 12

# ОБМЕН ПРОСТЫХ БЕЛКОВ

Обмен белков 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 организации 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 белков 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. Эти процессы обеспечивают катаболические реакции и создание 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. Для осуществления этого используются энергия обмена углеводов и липидов, строительный материал в виде углеродных остатков аминокислот, промежуточных продуктов метаболизма углеводов и др.

Белки способны также выполнять энергетическую функцию, особенно 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 (сахарный диабет). 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 последних из пищи у животных не наблюдается существенных патологических отклонений, тогда как исключение белков из пищи даже на короткий срок приводит к выраженным нарушениям, а иногда и к необратимым патологическим явлениям. Если животные находятся на мало-белковой диете, то у них очень быстро развивается **белковая недостаточность**—патологическое состояние, характеризующееся нарушением ряда важных физиологических функций организма. Аналогичные изменения наблюдаются у людей при недостаточном потреблении белка. Следовательно, белки являются незаменимыми для организма веществами, выполняющими прежде всего пластическую функцию. Специфическая роль белков, однако, этим не ограничивается. В опытах на крысах было показано, что белковая недостаточность у животных проявляется не столько в уменьшении массы органов и тканей, сколько в снижении активности ферментов, обусловленном замедлением процессов биосинтеза белка.

Таким образом, помимо пластической роли, белки выполняют уни-

кальную каталитическую функцию, хотя, как было отмечено, некоторые РНК также наделены энзиматической активностью. Следует указать также, что белки (соответственно и продукты их гидролиза аминокислоты) принимают непосредственное участие в биосинтезе ряда гормонов и других биологически активных соединений, регулирующих процессы обмена веществ в организме. Следовательно, именно белковый обмен координирует, регулирует и интегрирует многообразие химических превращений в целостном живом организме, подчиняя его задачам сохранения вида и обеспечивая тем самым непрерывность жизни.

Характерной особенностью белкового обмена является его чрезвычайная разветвленность. Достаточно указать, что в обмене 20 аминокислот, входящих в состав белковых молекул, в организме животных участвуют сотни промежуточных метаболитов, тесно связанных с обменом углеводов и липидов. Число ферментов, катализирующих химические реакции азотистого обмена, также исчисляется сотнями. Следует добавить, что блокирование одного какого-либо специфического пути обмена даже одной аминокислоты, обычно наблюдаемое при врожденных пороках обмена, может привести к образованию совершенно неизвестных продуктов обмена, так как возникают условия для неспецифических превращений всех предшествующих компонентов в данной цепи реакций. Отсюда становятся понятными трудности интерпретации данных о регуляции процессов азотистого обмена в норме и особенно при патологии. Этими обстоятельствами можно объяснить исключительную перспективность изучения обмена белков с целью выяснения особенностей их катаболизма и синтеза, овладение тонкими молекулярными механизмами которых, несомненно, даст в руки исследователя ключ к пониманию развития и течения патологических процессов и соответственно к целенаправленному воздействию на многие процессы жизни.

## **ДИНАМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВ ОРГАНИЗМА**

Кажущаяся стабильность химического состава целостного организма является результатом существования определенного равновесия между скоростями синтеза и распада его составляющих. Внедрение в биохимическую и клиническую практику метода меченых атомов позволило доказать, что белки нужны не только растущему, но и сформировавшемуся организму, когда его рост прекратился, 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 скорость синтеза многих компонентов органов и тканей преобладает над скоростью их 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 постепенному распаду и синтезу. 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 белков в других тканях. Индуцированные активной или пассивной иммунизацией белки антител— $\gamma$ -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, доказанная при помощи 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. С помощью изотопных методов установлено, что примерно  $\frac{2}{3}$  общего пула аминокислот 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 тесно интегрирован также с обменом углеводов, липидов и нуклеиновых кислот через аминокислоты или  $\alpha$ -кетокислоты ( $\alpha$ -кетоглутарат, оксалоацетат и пируват). Так, 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  $\alpha$ -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, нейрогормональными факторами. Более интенсивно обмен белков протекает в детском возрасте, при активной мышечной работе, беременности и лактации, т.е. в 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 собственных 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 белка не откладывается про запас, а в виде конечных продуктов азотистого обмена выводится с мочой. Более существенное значение имеет, однако, качественный белковый состав пищи, так как 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 может испытывать состояние белковой недостаточности, если всасывание какой-либо одной 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 и организм будет компенсировать недостаток аминокислоты 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 В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, 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 АКТГ и гормонов щитовидной железы наблюдается интенсивный распад тканевых белков. Другие гормоны, 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 отрицательному азотистому балансу, что некоторые авторы связывают со стимулированием глюконеогенеза из углеродных скелетов аминокислот (после дезаминирования последних—см. далее).

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.

## **НОРМЫ БЕЛКА В ПИТАНИИ**

Изучение проблемы нормы белка в питании человека имеет, кроме 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 отечественных 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 или подвергающийся средней физической нагрузке (полностью механизированный труд), должен получать 100–120 г белка в сутки при трате общего количества энергии 12000 кДж. При изменении условий труда (недостаточно механизированный труд) и больших тратах энергии норма белка увеличивается на 10 г на каждые 2100 кДж. Рабочие, выполняющие тяжелую физическую работу, должны получать 130–150 г белка в сутки.

Потребности в белках детей определяются в первую очередь возрастом и массой тела. Дети даже раннего детского возраста нуждаются в 55–72 г белка в сутки. С возрастом (от 12 до 15 лет) эта норма 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 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 состава его. В опытах на животных было показано, что получение одинакового количества разных пищевых белков сопровождается в ряде случаев развитием отрицательного азотистого баланса. Так, скармливание равного количества казеина и желатина крысам приводило к положительному азотистому балансу в первом случае и к отрицательному—во втором\*. Имел значение различный аминокислотный состав белков, что послужило основанием для предположения о существовании в природе якобы «неполноценных» белков. Оказалось, что 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 тот факт, что замена в питании крыс казеина на желатин приводит к развитию отрицательного азотистого баланса. Приведенные 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, белки шерсти, волос, перьев 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 amino-

\* Вопросы азотистого равновесия, положительного и отрицательного азотистого баланса подробно рассматриваются в курсе физиологии.

кислоты или другие азотсодержащие соединения, которые они могут использовать для биосинтеза аминокислот. Высшие растения, например, могут синтезировать все необходимые 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 молочно-кислые 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 – 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. 12.1).

Таблица 12.1. **Заменимые и незаменимые аминокислоты**

Заменимые	Незаменимые	Заменимые	Незаменимые
Аланин	Аргинин <sup>1</sup>	Глутаминовая кислота	Лизин
Аспарагин	Валин	Пролин	Метионин
Аспарагиновая кислота	Гистидин <sup>1</sup>	Серин	Треонин
Глицин	Изолейцин	Тирозин	Триптофан
Глутамин	Лейцин	Цистеин (цистин)	Фенилаланин

<sup>1</sup> Частично заменимые аминокислоты.

Незаменимость аминокислот для роста и развития организма животных и человека объясняется отсутствием способности клеток синтезировать углеродные скелеты незаменимых аминокислот, поскольку процесс аминирования соответствующих кетопроизводных осуществляется сравнительно легко посредством реакций трансаминирования (см. далее). Следовательно, для обеспечения нормальной жизнедеятельности человека и животных все эти 10 аминокислот должны поступать с пищей.

Следует отметить, что для взрослого человека аргинин и гистидин оказались частично заменимыми. Г. Роуз наблюдал людей, получавших искусственную пищу, в которой белок был полностью заменен смесью 20 аминокислот. Он установил, что для сохранения нормальной массы тела и работоспособности имеют значение не только определенное количество каждой аминокислоты и соотношение незаменимых аминокислот в подобной диете, но и содержание в последней общего азота (табл. 12.2).

Исключение какой-либо незаменимой аминокислоты из пищевой смеси сопровождается развитием отрицательного азотистого баланса, истощением, остановкой роста, нарушениями функции нервной системы и др. В опытах на крысах были установлены следующие 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;

Таблица 12.2. Минимальная суточная потребность организма человека в незаменимых аминокислотах (рекомендации ФАО и ВОЗ)

Аминокислота	Потребность индивидуума, г/сут	Потребность в расчете на массу тела, мг/кг	Аминокислота	Потребность индивидуума, г/сут	Потребность в расчете на массу тела, мг/кг
Арг	1,8	Взрослый организм не нуждается	Мет (Цис) <sup>1</sup>	1,1	13
Гис	0,9		Фен (Тир) <sup>2</sup>	1,1	14
Иле	0,7	10	Тре	0,5	7
Лей	1,1	14	Трп	0,25	3,5
Лиз	0,8	12	Вал	0,80	10

<sup>1</sup> Цистеин снижает потребность в метионине на 80%.

<sup>2</sup> Тирозин снижает потребность в фенилаланине на 70%.

аргинина 1. Имеются доказательства, что примерно 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, например, валина и лизина 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, потребности в метионине – 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 выделенного из кукурузы белка зеина, который не содержит лизина и практически триптофана, показало, что при получении с пищей казеина рост животных не нарушался. Замена казеина зеином приводила 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.

Человек и животные питаются не искусственно выделенными, а натуральными белками, входящими в состав смешанной пищи, в которой обычно содержится весь набор незаменимых аминокислот. Так, цельное кукурузное зерно содержит 2,5% лизина, 0,7% триптофана, в то время как

зеин не содержит лизина вообще, а триптофана в нем 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. 12.3).

Таблица 12.3. Содержание незаменимых аминокислот в белках различного происхождения

Аминокислота	Содержание аминокислоты в продуктах, в процентах от сухой массы					
	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

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 организма. Такой пищевой 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. Однако это не исключает приема растительных белков, в которых содержится необходимый набор аминокислот, но в другом соотношении. Поэтому для обеспечения биосинтеза необходимого количества эндогенных белков 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 групп населения с учетом не только возраста и пола, но и различных климатических условий, характера труда, сезона года и т.д.

## РЕЗЕРВНЫЕ БЕЛКИ

Под термином «резервные белки» понимают не особые отложения белков, а легко мобилизуемые при необходимости тканевые белки, которые после гидролиза под действием специфических протеиназ служат поставщиками аминокислот, необходимых для синтеза ферментов, гормонов и др. Опыты на животных показали, что при голодании наблюдается неравномерное изменение массы отдельных органов и тканей; в значительно большей



степени снижается масса печени. Многочисленные наблюдения больных в клиниках также свидетельствуют, что при голодании и тяжелых инфекционных заболеваниях, когда наблюдается интенсивный распад органов, в первую очередь снижается масса печени и мышц и существенно не изменяется масса 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 триацилглицеролов 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**

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 пищеварительном тракте до свободных аминокислот. Введение белков парентерально, т.е. минуя кишечный тракт, приводит к развитию сенсibilизации (повышенная чувствительность организма к чужеродному белку), а повторное введение белков может вызвать анафилаксию—шоковое состояние. Между тем такой метод введения белка иногда вынуждены использовать, в частности, в хирургической практике при непроходимости пищевода в результате ожогов и отравлений, при тяжелых раковых поражениях пищевода и желудка, после операций 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 аминокислотной смеси не вызывает аллергических реакций, поскольку свободные аминокислоты не обладают в отличие от белков ни видовой, ни тканевой специфичностью. Длительные наблюдения больных в клинических условиях свидетельствуют, что потребности организма в белках могут быть полностью компенсированы введением смеси аминокислот. Нельзя не отметить, однако, ряд побочных отрицательных реакций организма в ответ на введение гидролизатов белков, в частности возможность нарушения нормальной психической деятельности.

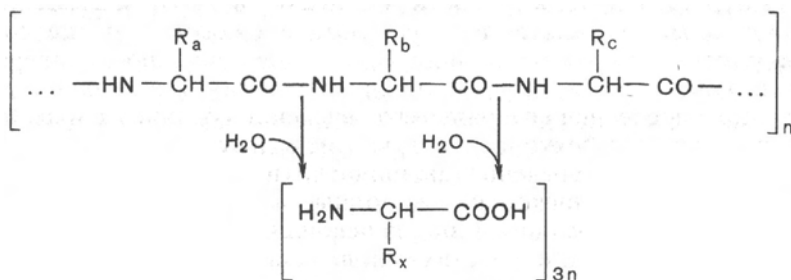
## **ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКОВ**

Главными источниками белков для человека являются пищевые продукты животного и растительного происхождения. В табл. 12.4 представлены средние данные о содержании белка в основных пищевых продуктах. 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 его.

Таблица 12.4. Содержание белка в некоторых пищевых продуктах

Продукт	Содержание белка, %	Продукт	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 пищеварительном 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. Примерно 95–97% белков пищи всасывается в виде свободных аминокислот. Следовательно, ферментный аппарат пищеварительного 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 действия, определяемой как размером полипептида, так и структурой радикалов аминокислот, участвующих в образовании пептидной связи. Основные ферменты, катализирующие гидролитический распад пищевых белков и пептидов, приведены в табл. 12.5.

Следует подчеркнуть, что с пищей человек получает огромное разнообразие белков, однако 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. Эндопептидазы обладают разной субстратной специфич-

Таблица 12.5. Протеолитические ферменты пищеварительного 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	»

ностью действия, всецело определяемой природой радикалов аминокислот по соседству с разрываемой пептидной связью, поэтому 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 установлено еще в 1783 г. Л. Спалланцани, хотя в кристаллическом виде он был получен только в 1930 г. (см. главу 1). Пепсин вырабатывается в главных клетках слизистой оболочки желудка в неактивной форме — в виде пепсиногена. Превращение пепсиногена в активный пепсин происходит в желудочном содержимом, однако молекулярный механизм этого превращения 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. Молекулярная масса пепсиногена составляет приблизительно 40400, а пепсина—32700, поэтому 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 сильнокислой среде и характеризуется низким значением изоэлектрической точки ( $pI < 1$ ). Такие условия обычно создаются в желудочном содержимом, куда поступает секретлируемая париетальными 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 только активный пепсин, а несколько близких по строению пепсинов, включая пепсиноподобный фермент гастриксин, который имеет отличный от пепсина оптимум рН действия, равный 3,0.

**Реннин.** Фермент реннин выделен из сока четвертого отдела желудка телят в кристаллическом виде. Он есть также в желудочном соке детей грудного возраста. По механизму и специфичности действия реннин сильно отличается от пепсина, тогда как по структуре близок к нему: так же состоит из одной полипептидной цепи с мол. массой 40000. Изоэлектрическая точка реннина равна 4,5.

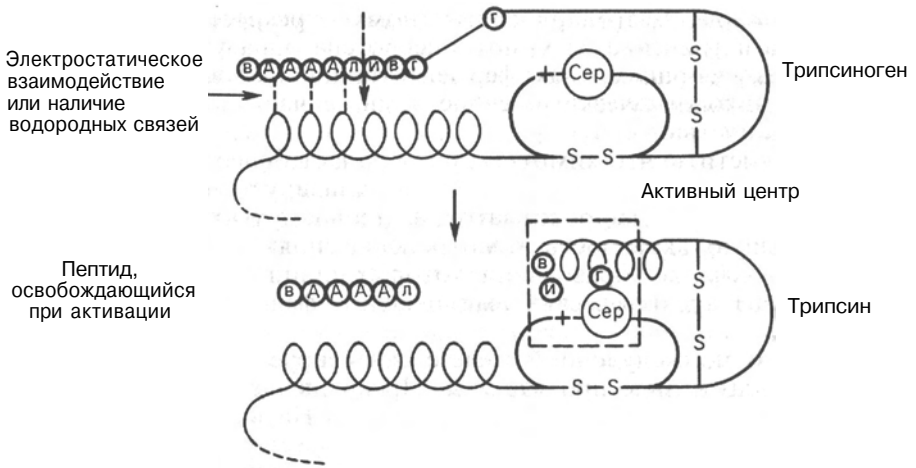
Три другие важные эндопептидазы: трипсин, химотрипсин и эластаза, а также одна экзопептидаза—карбоксипептидаза, участвующие в дальнейшем после действия пепсина в переваривании белков, синтезируются в поджелудочной железе. Все они вырабатываются в неактивной форме, в виде проферментов, и их превращение в активные ферменты происходит в тонкой кишке, куда они поступают с панкреатическим соком.

**Трипсин.** Трипсиноген и трипсин получены в кристаллическом виде, полностью расшифрована их первичная структура и известен молекулярный механизм превращения профермента в активный фермент. В опытах *in vitro* превращение трипсиногена в трипсин катализируют не только энтеропептидаза и сам трипсин, но и другие протеиназы и ионы  $Ca^{2+}$ .

Активирование трипсиногена химически выражается в отщеплении с N-конца полипептидной цепи 6 аминокислотных остатков (Вал—Асп—Асп—Асп—Асп—Лиз) и соответственно в укорочении полипептидной цепи (рис. 12.1).

Следует подчеркнуть, что в этом небольшом, казалось бы, химическом процессе—отщепление гексапептида от предшественника—заключено важное биологическое значение, поскольку при этом происходят формирование активного центра и образование трехмерной структуры трипсина, а известно (см. главы 1 и 4), что и белки биологически активны только в 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 действие не только на клетки самой железы, но и на другие ферменты, синтезируемые в ней (амилаза, липаза и др.). В то же время поджелудочная железа защищает себя еще одним механизмом—синтезом специфического белка ингибитора панкреатического трипсина. Этот ингибитор оказался

\* Поступление пищевого белка в желудок стимулирует секрецию гормона гастрина, который в свою очередь стимулирует секрецию HCl и пепсиногена в клетках слизистой оболочки.



**Рис. 12.1.** Механизм активации трипсиногена быка (схема).

низкомолекулярным пептидом (мол. масса 6000), который прочно связывается с активными центрами трипсина и химотрипсина, вызывая обратимое их ингибирование. В поджелудочной железе синтезируется также  $\alpha_1$ -антипротеиназа (мол. масса 50000), которая преимущественно ингибирует эластазу.

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. Следует отметить, 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 ( $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\pi$ -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 25000. 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  $\pi$ -химотрипсина, обладающего наибольшей ферментативной активностью. Последующее отщепление дипептида Сер—Арг приводит к образованию  $\delta$ -химотрипсина. Аутокаталитический процесс активирования, вызванный химотрипсином, сначала способствует формированию неактивного промежуточного неохимотрипсина, который под действием активного трипсина превращается в  $\alpha$ -химотрипсин; этот же продукт образуется из  $\delta$ -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 отметить, 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 триптофана\*.

**Эластаза.** В поджелудочной железе синтезируется еще одна эндопептидаза—эластаза—в виде проэластазы. Превращение профермента в эластазу в тонкой кишке 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 предпочтительнее 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.

**Экзопептидазы.** В переваривании белков в тонкой кишке активное участие принимает семейство экзопептидаз. Одни из них—карбоксипептидазы—синтезируются в поджелудочной железе в виде прокарибоксипептидазы и активируются трипсином в кишечнике; другие—аминопептидазы—секретируются 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 и аргинин. Очищенный препарат карбоксипептидазы А обладает бифункциональной активностью—пептидазной и эстеразной и содержит ион  $Zn^{2+}$  (один атом на 1 моль фермента). При замене ионов  $Zn^{2+}$  на ионы  $Ca^{2+}$  полностью утрачивается пептидазная активность, но усиливается исходная эстеразная активность, хотя

\* Химотрипсин является одним из наиболее изученных ферментов, для которого в деталях расшифрован механизм ферментативного катализа, включающий образование промежуточного продукта ацилфермента. Доказана существенность для катализа гидроксильной группы серина и непротонированного остатка гистидина в активном центре фермента.

при этом существенных изменений в третичной структуре фермента не отмечается.

**Аминопептидазы.** В кишечном соке открыты два фермента—аланин-аминопептидаза, катализирующая преимущественно гидролиз пептидной связи, в образовании которой участвует N-концевой аланин, и лейцин-аминопептидаза, 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 тонкой кишке завершают дипептидазы. Среди дипептидаз кишечного сока хорошо изучена глицилглицин-дипептидаза, гидролизующая соответствующий дипептид до двух молекул глицина. Известны также две другие дипептидазы: пролил-дипептидаза (пролиназа), катализирующая гидролиз пептидной связи, в образовании которой участвует СООН-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. В настоящее время появляется все больше данных о более широкой биологической роли протеолитических ферментов органов и тканей в регуляции ряда вне- и внутриклеточных процессов. Некоторые протеиназы выполняют защитную функцию (свертывание крови, система комплемента, лизис клеток), другие генерируют гормоны, токсины, вазоактивные агенты (ангиотензин, кинины). Ряд протеиназ регулирует образование пищеварительных ферментов, взаимодействие между клетками и клеточными поверхностями, процессы 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 называют **ограниченным протеолизом**. Значение его очень важно для понимания сущности биологического синтеза в клетках неактивных пре- и пробелков. Кроме того, этот процесс нашел широкое практическое применение 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 соков 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, стимулирует секрецию секретина (см. главу 8); последний, стимулируя секрецию и отделение щелочного панкреатического сока, способствует оттоку желчи. Показано, что секретин быстро исчезает из кровотока, а новые порции его не вырабатываются, поскольку соляная кислота нейтрализуется щелочным панкреатическим соком. Таким образом, благодаря существованию такого механизма, действующего по типу обратной связи, осуществляется регуляция секреции и отделения поджелудочного сока. Поджелудочный 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 поджелудочного сока, является холецистокинин (панкреозимин); он стимулирует отделение сока, богатого ферментами и бедного 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, частичная денатурация и, возможно, гидролиз сложных белков. Кроме того, соляная кислота стимулирует выработку секретина в двенадцатиперстной кишке, ускоряет всасывание железа и оказывает бактерицидное действие.

Ввиду исключительной роли соляной кислоты в переваривании белков были предприняты попытки объяснить механизм ее секреции в желудке. 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 —  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CO}_2$ . Образовавшаяся соляная кислота затем экскретируется обкладочными клетками в полость желудка. Равновесие ионов  $\text{Cl}^-$  между кровью и обкладочными клетками достигается поступлением отрицательно заряженных ионов  $\text{HCO}_3^-$  из клеток в кровь взамен ионов  $\text{Cl}^-$ , поступающих из крови в клетки. Предполагается участие АТФ, поскольку синтез соляной кислоты требует энергии.

Следует отметить, что при некоторых поражениях желудка (обычно при воспалительных процессах) могут нарушаться секреция соляной кислоты и соответственно переваривание белков.

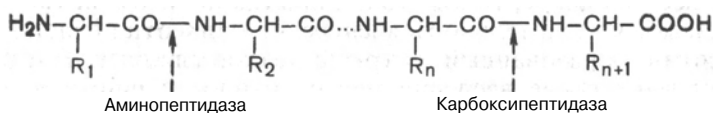
Пепсин, катализирующий гидролиз пептидных связей, образованных остатками ароматических аминокислот, расщепляет практически все природные белки. Исключение составляют некоторые кератины, протамины, гистоны и мукопротеины. При их гидролизе образуются различного размера пептиды и, возможно, небольшое число свободных аминокислот. В желудочном соке детей грудного возраста, а также в секрете четвертого желудочка телят и других молодых жвачных животных содержится отличный от пепсина весьма активный фермент реннин. Он катализирует свертывание молока (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. Предполагают, что реннин превращает растворимый казеиноген молока в параказеин, кальциевая соль которого нерастворима, и он выпадает в осадок. Интересно отметить, что после удаления ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из молока образования осадка не происходит. Наличие активного реннина в желудочном соке детей грудного возраста имеет, по-видимому, важное физиологическое значение, поскольку при свертывании молока, являюще-



гося 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 тонкой кишке, где на белки действуют ферменты панкреатического и кишечного соков. Трипсин и химотрипсин действуют на белки аналогично пепсину, 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 (пепсин, трипсин, химотрипсин) 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.

В итоге остаются дипептиды, на которые действуют специфические дипептидазы, при этом образуются свободные аминокислоты, которые затем всасываются.

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 пищеварительном тракте в основном в виде свободных аминокислот. Кинетика всасывания аминокислот в опытах *in vivo* и *in vitro* свидетельствует, что аминокислоты, подобно глюкозе, всасываются свободно с ионами  $\text{Na}^+$ . 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 свидетельствует 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. Существует два представления, по-видимому, дополняющих друг друга о том, что требуемая для активного транспорта энергия образуется за счет биохимических реакций (это так называемый направляемый метаболизмом транспорт) или за счет энергии переноса другого транспортируемого вещества, в частности энергии движения ионов  $\text{Na}^+$  (или других ионов) в клетку.

Данные о специфичности транспорта аминокислот через биомембраны клеток были получены 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. Это повышение обусловлено наследственным нарушением механизма почечной реабсорбции. Цистин относительно нерастворим в воде, поэтому он легко выпадает в осадок в мочеточнике или мочевом пузыре, в результате чего образуются цистиновые камни и нежелательные последствия (закупорка мочевыводящего тракта, развитие инфекции и др.). Аналогичное нарушение всасывания аминокислот, в частности триптофана, наблюдается при болезни Хартнупа. Доказано всасывание небольших пептидов. Так, в опытах *in vitro* и *in vivo* свободный глицин всасывался значительно медленнее, чем дипептид глицилглицин или даже трипептид, образованный из трех остатков глицина. Тем не менее во всех этих случаях после введения олигопептидов с пищей в портальной крови обнаруживали свободные аминокислоты; это свидетельствует о том, что олигопептиды подвергаются гидролизу после всасывания. В отдельных случаях отмечают 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 (мол. масса 63000), наиболее изученный из токсинов, состоит из двух функциональных полипептидов: связывающегося со специфическим рецептором на поверхности чувствительной клетки и другого — проникающего внутрь клетки и оказывающего эффект, который чаще всего сводится к торможению внутриклеточного синтеза белка. 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. Это, в частности, вопросы о количестве всасывающихся небольших пептидов и месте их гидролиза (на клеточной поверхности или внутриклеточно), а также основная проблема: выяснение молекулярных механизмов работы транспортных систем.

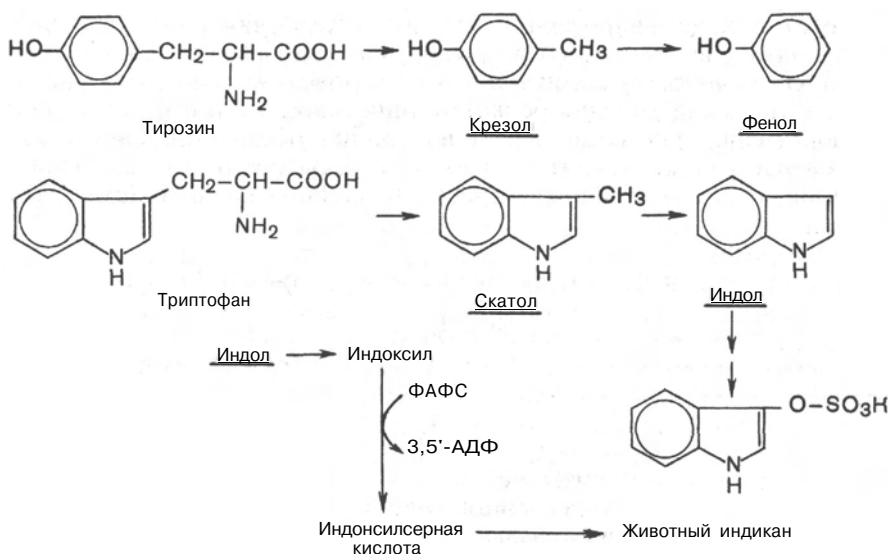
## **Превращения аминокислот под действием микрофлоры кишечника**

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 кишечнике создаются оптимальные условия для образования ядовитых продуктов распада

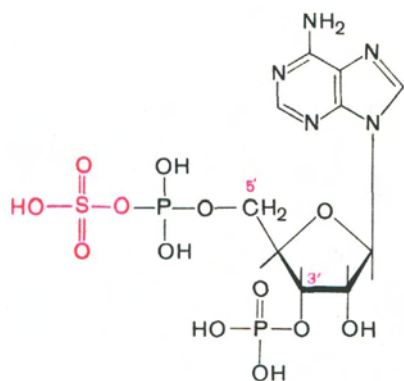
аминокислот: фенола, индола, крезола, скатола, сероводорода, метилмеркаптана, а также нетоксичных для организма соединений: спиртов, аминов, жирных кислот, кетокислот, оксикислот и др.

Все эти превращения аминокислот, вызванные деятельностью микроорганизмов кишечника, получили общее название «гниение белков в кишечнике». Так, в процессе распада серосодержащих аминокислот (цистин, цистеин, метионин) в кишечнике образуются сероводород  $H_2S$  и метилмеркаптан  $CH_3SH$ . Диаминокислоты—орнитин и лизин—подвергаются процессу декарбоксилирования с образованием аминов—путресцина и кадаверина.

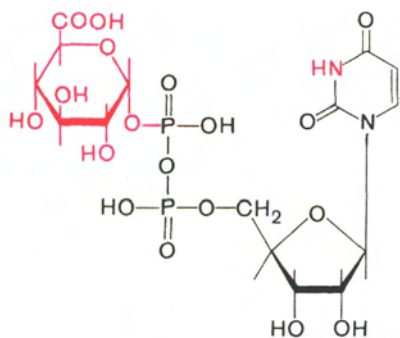
Из ароматических аминокислот: фенилаланин, тирозин и триптофан—при аналогичном бактериальном декарбоксилировании образуются соответствующие амины: фенилэтиламин, параоксифенилэтиламин (или тирамин) и индолилэтиламин (триптамин). Кроме того, микробные ферменты кишечника вызывают постепенное разрушение 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 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-глюкоронилтрансфераза, 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 продуктов.

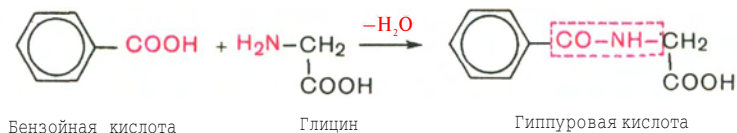


3'-фосфоаденозин-  
5'-фосфосульфат (ФАФС)



Уридиндифосфоглюкуроновая  
кислота (УДФГК)

Индол (как и скатол) предварительно подвергается окислению в индоксил (соответственно скатоксил), который взаимодействует непосредственно в ферментативной реакции с ФАФС или с УДФГК. Так, индол связывается в виде эфирсерной кислоты. Калиевая соль этой кислоты получила название животного индикана, который выводится с мочой (см. главу 18). По количеству индикана в моче человека можно судить не только о скорости процесса гниения белков в кишечнике, но и о функциональном состоянии печени. О функции печени и ее роли в обезвреживании токсичных продуктов часто также судят по скорости образования и выделения гиппуровой кислоты с мочой после приема бензойной кислоты (см. главу 16).



Бензойная кислота

Глицин

Гиппуровая кислота

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 в результате 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, хотя значительная часть аминокислот разносится кровью по всему организму и используется для физиологических целей. В печени аминокислоты участвуют не только в синтезе собственных белков и белков плазмы крови, но также в синтезе специфических азотсодержащих соединений: пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, креатина, мочевиной кислоты, НАД и др.

Печень, кроме того, обеспечивает сбалансированный пул свободных аминокислот организма путем синтеза заменимых аминокислот и перераспределения азота в результате реакций трансминирования.

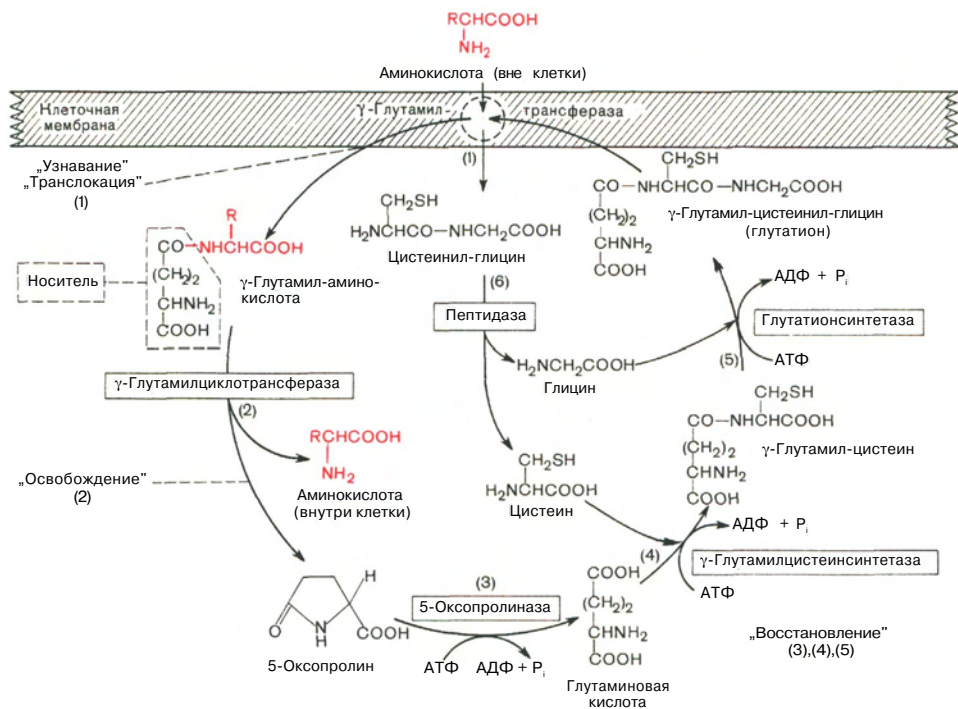


Как видно из схемы, всосавшиеся аминокислоты в первую очередь используются в качестве строительного материала для синтеза специфических тканевых белков, ферментов, гормонов и других биологически активных соединений. Некоторое количество аминокислот подвергается распаду с образованием конечных продуктов белкового обмена ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{NH}_3$ ) и освобождением энергии. Подсчитано, что в организме взрослого человека, находящегося на полноценной диете, образуется 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% от 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 подробно рассмотрено в главе 14.

## 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 плазматическую 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, таких систем существует несколько. В частности, А. Майстером предложена оригинальная схема транспорта нейтральных аминокислот через плазматическую мембрану, которая, по-видимому, активна в почечных канальцах, слизистой оболочке кишечника и ряде других тканей. Сущность этой гипотезы можно представить в виде схемы:



Предполагают, что главную роль в этом процессе играет мембранно-связанный гликопротеин—фермент  $\gamma$ -глутамилтрансфераза, которая катализирует перенос  $\gamma$ -глутамильной группы от глутатиона или другого  $\gamma$ -глутамильного пептида на транспортируемую аминокислоту. Комплекс  $\gamma$ -глутамил—аминокислота после переноса через биомембрану распадается внутри клетки (или внутри субклеточного образования) под действием  $\gamma$ -глутамилциклотрансферазы на свободную аминокислоту и 5-оксипролин (пироглутаминовая кислота), образование которого почти целиком сдви-

гает 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 (рис. 12.2).

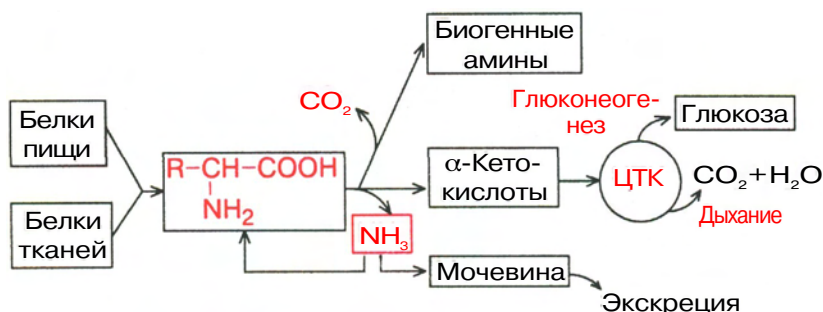


Рис. 12.2. Катаболизм аминокислот.

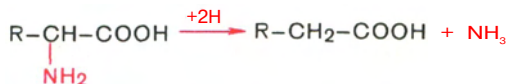
## Общие пути обмена аминокислот

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  $\alpha, \epsilon$ -диаминопимелиновой кислоты. Физиологическая роль рацемаз микроорганизмов сводится, вероятно, к синтезу D-изомеров аминокислот для построения клеточной оболочки.

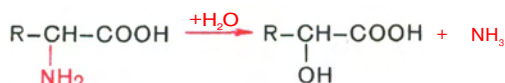
### Дезаминирование аминокислот

Доказано существование 4 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.

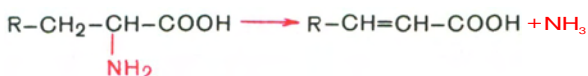
I. Восстановительное дезаминирование



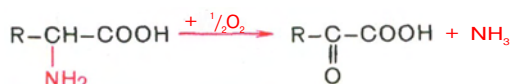
II. Гидролитическое дезаминирование



III. Внутримолекулярное дезаминирование

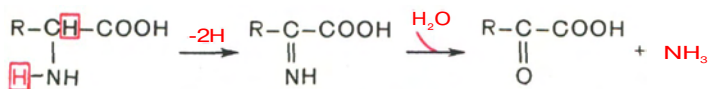


IV. Окислительное дезаминирование

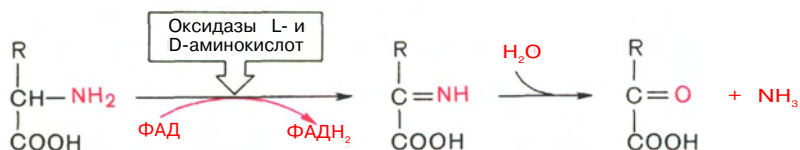


Помимо аммиака, продуктами дезаминирования являются жирные кислоты, оксикислоты и кетокислоты. Для животных тканей, растений и большинства аэробных микроорганизмов преобладающим типом реакций является окислительное дезаминирование аминокислот, за исключением гистидина, подвергающегося внутримолекулярному дезаминированию.

Рассмотрим более подробно механизм окислительного дезаминирования аминокислот, протекающего в две стадии.

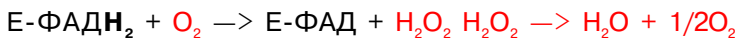


Первая стадия является ферментативной и завершается образованием неустойчивого промежуточного продукта (иминокислота), который на второй стадии спонтанно без участия фермента, но в присутствии воды распадается на аммиак и  $\alpha$ -кетокислоту. Следует указать, что оксидазы аминокислот (L- и D-изомеров) 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 протетической группы. Схематически реакции окислительного дезаминирования аминокислот с участием коферментов могут быть представлены в следующем виде:



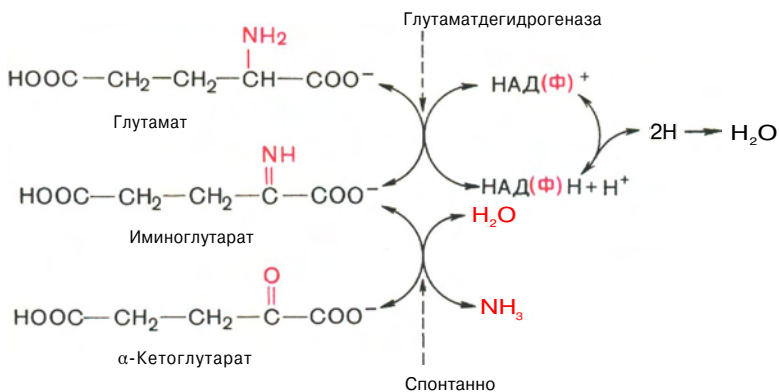
Восстановленные флавиннуклеотиды оксидаз L- и D-аминокислот могут непосредственно окисляться молекулярным кислородом. При этом образуется перекись водорода, которая подвергается расщеплению под действием каталазы на воду и кислород.





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 действия в щелочной среде (рН 10,0) и при физиологических значениях рН его активность на порядок ниже, чем при рН 10,0. В тканях животных и человека отсутствует подобная среда, поэтому оксидазе L-аминокислот принадлежит, вероятно всего, 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 рН среды. Не до конца ясным остается вопрос о том, каково значение 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 рН 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  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоту в соответствии со следующей схемой:

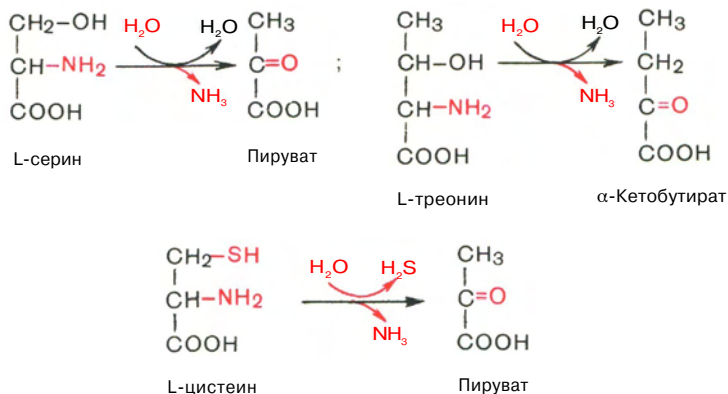


Первая стадия окисления глутаминовой кислоты аналогична реакции окислительного дезаминирования. Восстановленный НАДН далее окисляется при участии флавиновых ферментов и цитохромной системы (см. главу 9) с образованием конечного продукта воды. Образовавшийся аммиак благодаря обратимости ферментативной реакции, но обязательно в присутствии восстановленного НАДФН может участвовать в синтезе глутамата из  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты. Различают три разных типа глу-

тамагидрогеназ: один из них использует 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.

Глутаматгидрогеназа животных тканей является одним из наиболее изученных ферментов азотистого обмена. Это олигомерный фермент (мол. масса 312000), состоящий из 6 субъединиц (мол. масса каждой около 52000) и проявляющий свою основную активность только в мультимерной форме. При диссоциации этой молекулы на субъединицы, наступающей легко в присутствии НАДН, ГТФ и некоторых стероидных гормонов, фермент теряет свою главную глутаматгидрогеназную функцию, но приобретает способность дезаминировать ряд других аминокислот. Это свидетельствует об аллостерической природе глутаматгидрогеназы, действующей как регуляторный фермент в аминокислотном обмене.

Помимо перечисленных 4 типов дезаминирования аминокислот и ферментов, катализирующих эти превращения, в животных тканях и печени человека открыты также три специфических фермента (серин- и треонин-дегидратазы и цистатионин- $\gamma$ -лиаза), катализирующих неокислительное дезаминирование соответственно серина, треонина и цистеина.

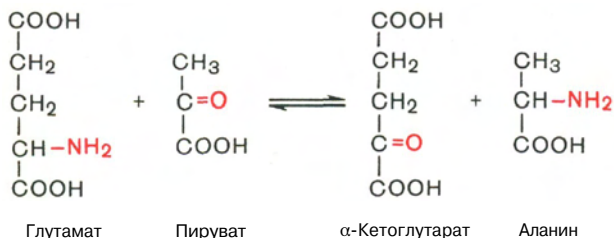


Конечными продуктами реакции являются пируват и  $\alpha$ -кетобутират, аммиак и сероводород. Поскольку указанные ферменты требуют присутствия пиридоксальфосфата в качестве кофермента, реакция неокислительного дезаминирования, вероятнее всего, протекает с образованием шиффовых оснований как промежуточных метаболитов.

Наиболее изучен фермент треониндегидратаза, которая оказалась не только аллостерическим ферментом, но наряду с триптофан-2,3-диоксигеназой и тирозинаминотрансферазой 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  $\alpha$ -кетобутират легко превращается в пируват и соответственно в глюкозу.

## Трансаминирование аминокислот

Под трансаминированием подразумевают реакции межмолекулярного переноса аминогруппы ( $\text{NH}_2$ -) от аминокислоты на  $\alpha$ -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  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота и аланин без промежуточного свободного аммиака; добавление аланина и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты приводило к образованию соответственно пировиноградной и глутаминовой кислот.

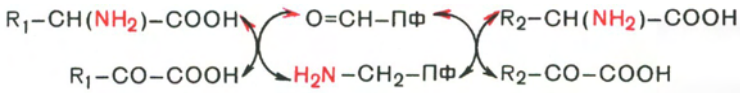


Реакции трансаминирования являются обратимыми и, как выяснилось позже, универсальными для всех живых организмов. Эти реакции протекают при участии специфических ферментов, названных А.Е. Браунштейном аминотрансферазами (по современной классификации, аминотрансферазы, или трансаминазы). Теоретически реакции трансаминирования возможны между любой аминокислотой и кетокислотой, 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  $\text{NH}_2$ -группы могут также служить не только  $\alpha$ -, но и  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\omega$ -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  $\text{B}_6$ ; 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. Шемякин. Одновременно подобный механизм был предложен американскими биохимиками Э. Снеллом и Д. Метцлером. Все трансаминазы (как и декарбоксилазы аминокислот) содержат один и тот же кофермент — пиридоксальфосфат. Для реакций трансаминирования характерен общий механизм. Специфичность трансаминаз обеспечивается белковым компонентом. Ферменты трансаминирования катализируют перенос  $\text{NH}_2$ -группы не на  $\alpha$ -кетокислоту, а сначала на кофермент пиридоксальфосфат. Образовавшееся промежуточное соединение (шиффово основание) подвергается внутримолекулярным превращениям (лабилизация  $\alpha$ -водородного атома, перераспределение энергии связи), приводящим к освобождению  $\alpha$ -кетокислоты и пиридоксаминфосфата; последний на второй

стадии реакции реагирует с любой другой  $\alpha$ -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 трансаминирования можно представить в виде общей схемы:



Более подробно механизм действия трансаминаз представлен на рис. 12.3.

В связи с тем что во всех пиридоксальных ферментах (включая трансаминазы) карбонильная группа кофермента ( $-CHO$ ) оказалась связанной с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина белковой части, в классический механизм реакции трансаминирования А.Е. Браунштейн и Э. Снелл внесли следующее дополнение. Оказалось, что взаимодействие между субстратом, т.е. L-аминокислотой (на рисунке — аспартат), и пиридоксальфосфатом происходит не путем конденсации с выделением молекулы воды, а путем реакции замещения, при которой  $NH_2$ -группа субстрата вытесняет  $\epsilon-NH_2$ -группу

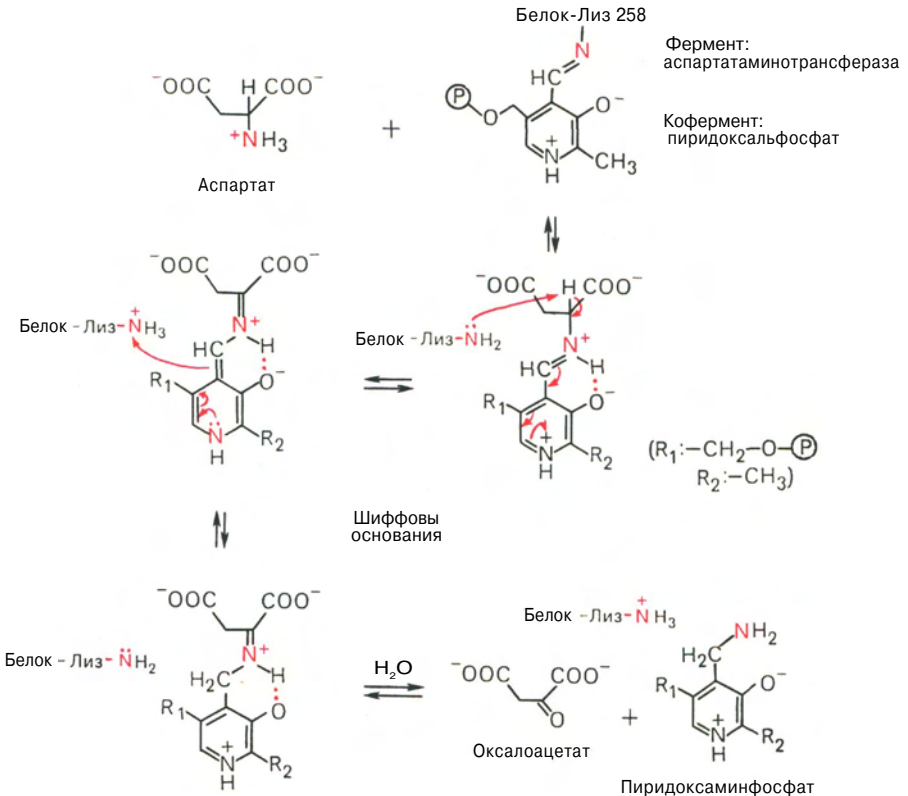


Рис. 12.3. Механизм действия пиридоксальфосфата в аспаратаминотрансферазе.

лизина в молекуле ферментного белка, что приводит к формированию пиридоксальфосфатного комплекса.

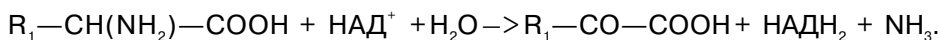
Существование представленного механизма реакции трансминирования доказано разнообразными методами, включая методы спектрального анализа по идентификации промежуточных альдиминных и кетиминных производных пиридоксальфосфата.

**Роль трансаминаз и реакций трансминирования 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 трансминирования послужили предметом детального исследования роли этих ферментов в обмене аминокислот. Ранее было указано, что при физиологических значениях pH среды активность оксидазы L-аминокислот резко снижена. Учитывая это обстоятельство, а также высокую скорость протекания реакции трансминирования, А.Е. Браунштейн выдвинул гипотезу о возможности существования в животных тканях непрямого пути дезаминирования аминокислот через реакции трансминирования, названного им **трансдезаминированием**. 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 гипотезе, получившей экспериментальное подтверждение, все или почти все природные аминокислоты (исключение составляет метионин) сначала реагируют с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой в реакции трансминирования 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:

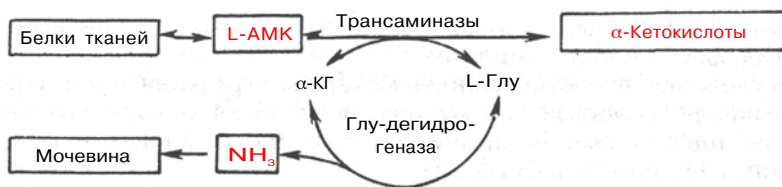


Суммарная реакция при этом следующая:



Поскольку обе реакции (трансминирование и дезаминирование глутаминовой кислоты) являются обратимыми, создаются условия для синтеза по существу любой аминокислоты, если в организме имеются соответствующие  $\alpha$ -кетокислоты. Известно, что организм животных и человека не наделен способностью синтеза углеродных скелетов ( $\alpha$ -кетокислот), так называемых незаменимых аминокислот; этой способностью обладают только растения и многие микроорганизмы.

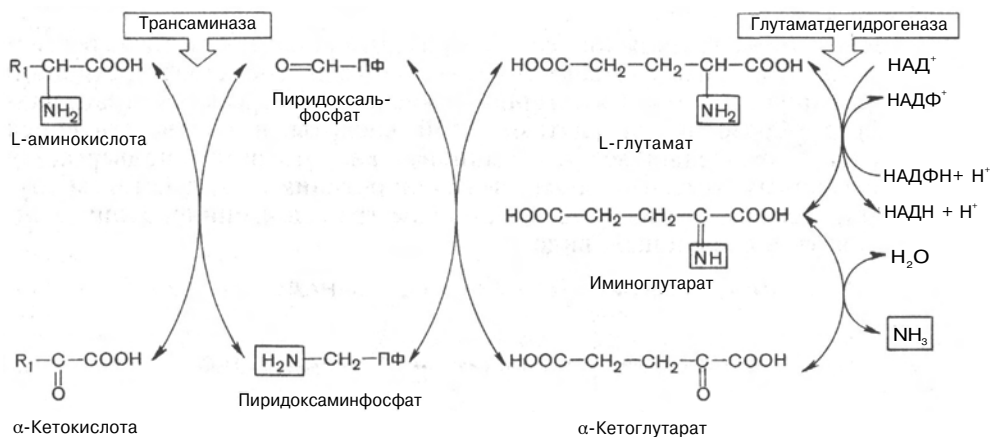
Механизм, при помощи которого в живых организмах осуществляется синтез природных аминокислот из  $\alpha$ -кетокислот и аммиака, был назван



**Рис. 12.4.** Центральная роль трансминаз L-аминокислот и глутаматдегидрогеназы в биосинтезе и распаде аминокислот в тканях животных.

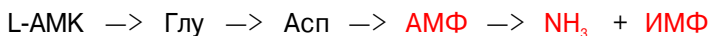
АМК - аминокислоты; α-КГ - α-кетоглутарат.

А.Е. Браунштейном **трансреаминированием**. 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-кетокислотой. В результате образуется L-аминокислота, соответствующая исходной кетокислоте, и вновь освобождается α-кетоглутаровая кислота, которая может акцептировать новую молекулу аммиака. Роль реакций трансаминирования как в дезаминировании, так и в биосинтезе аминокислот может быть представлена в виде схемы:



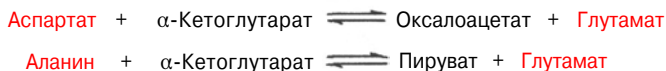
Таким образом, трансминазы катализируют опосредованное через глутаматдегидрогеназу дезаминирование природных аминокислот (черные стрелки) и биосинтез аминокислот (красные стрелки). В более упрощенной форме роль этих ключевых ферментов азотистого обмена представлена на рис. 12.4.

Получены доказательства существования в организме теплокровных животных еще одного механизма непрямого (опосредованного) дезаминирования L-аминокислот, при котором Глу, Асп и АМФ выполняют роль системы переноса NH<sub>2</sub>-группы; гидролитическое дезаминирование АМФ приводит к образованию инозинмонофосфата (ИМФ) и аммиака:



Возможно, что в аналогичной системе в качестве промежуточного переносчика  $\text{NH}_2$ -группы вместо АМФ участвует НАД.

**Клиническое значение определения активности трансаминаз.** Широкое распространение и высокая активность трансаминаз в органах и тканях человека, а также сравнительно низкие величины активности этих ферментов в крови послужили основанием для определения уровня ряда трансаминаз в сыворотке крови человека при органических и функциональных поражениях разных органов. Для клинических целей наибольшее значение имеют две трансаминазы—аспартат-аминотрансфераза (АсАТ) и аланин-аминотрансфераза (АлАТ), катализирующие соответственно следующие обратимые реакции:

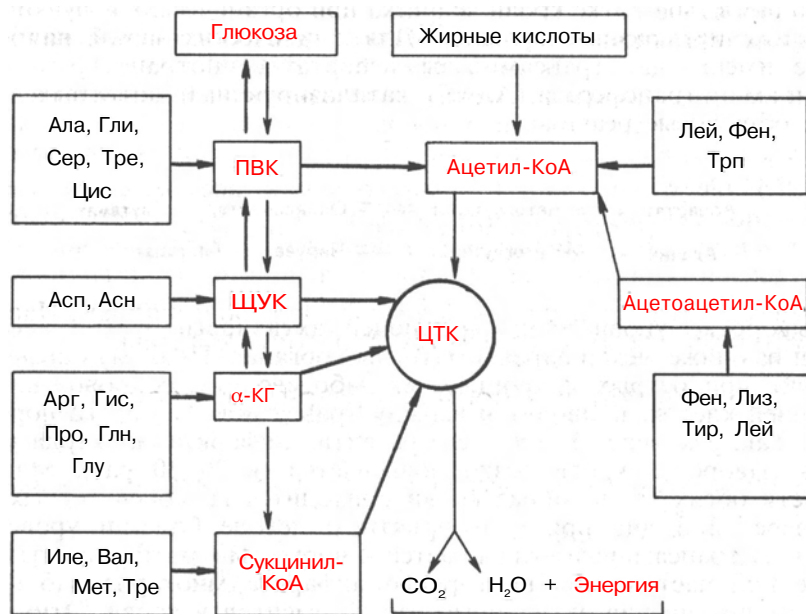


В сыворотке крови здоровых людей активность этих трансаминаз в тысячи раз ниже, чем в паренхиматозных органах. Поэтому органические поражения при острых и хронических заболеваниях, сопровождающиеся деструкцией клеток, приводят к выходу трансаминаз из очага поражения в кровь. Так, уже через 3–5 ч после развития инфаркта миокарда уровень АсАТ в сыворотке крови резко повышается (в 20–30 раз). Максимум активности обеих трансаминаз 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, но и для прогноза и проверки эффективности лечения\*. При поражении клеток печени, например при гепатитах, также наблюдается гипертрансаминаземия (за счет преимущественного повышения уровня АлАТ), но она имеет более умеренный и затяжной характер, а повышение активности трансаминазы 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 в сыворотке крови при заболеваниях сердца следует отнести к дифференциально-диагностическим лабораторным тестам. Повышение уровня трансаминаз в сыворотке крови отмечено, кроме того, при некоторых заболеваниях мышц, в частности при обширных травмах, гангрене конечностей и прогрессивной мышечной дистрофии.

**Превращения  $\alpha$ -кетокислот.** Образовавшиеся в процессе дезаминирования и трансдезаминирования  $\alpha$ -кетокислоты подвергаются в тканях животных различным превращениям и могут вновь трансаминироваться с образованием соответствующей аминокислоты. Это так называемый синтетический путь превращения. Опыты с перфузией растворов  $\alpha$ -кетокислот и аммиака через изолированную печень показали, что в оттекающей из печени жидкости действительно имеются соответствующие исходным

\* В настоящее время с диагностической целью в клинике внутренних болезней широко используют наборы химических реактивов для быстрого (экспрессного) определения активности трансаминаз в сыворотке крови.

кетокислотам L-аминокислоты. Открыты, кроме того, гликогенные, кетогенные и окислительные пути, ведущие к образованию соответственно глюкозы, жирных кислот, кетоновых тел и компонентов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). Эти процессы можно представить в виде общей сводной схемы:



Углеродные скелеты аминокислот могут включаться в ЦТК через ацетил-КоА, пируват, оксалоацетат,  $\alpha$ -кетоглутарат и сукцинил-КоА. Пять аминокислот (Фен, Лиз, Лей, Трп, 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* усиливается при некоторых патологических состояниях, например при сахарном диабете, а также при гиперфункции коркового вещества надпочечников и введении глюкокортикоидов (см. главу 8). Разделение аминокислот на «кетогенные» и «гликогенные» носит, однако, условный характер, поскольку отдельные участки углеродных атомов Лиз, Трп, Фен и Тир могут включаться и в молекулы предшественников глюкозы, например Фен и Тир — в фумарат. Истинно «кетогенной» аминокислотой является только лейцин.

## Декарбоксилирование аминокислот

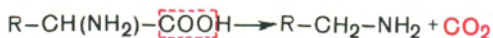
Процесс отщепления карбоксильной группы аминокислот в виде  $\text{CO}_2$  получил название декарбоксилирования. Несмотря на ограниченный круг аминокислот и их производных, подвергающихся декарбоксилированию в животных тканях, образующиеся продукты реакции — биогенные амины — оказывают сильное фармакологическое действие на множество



физиологических функций человека и животных. В животных тканях установлено декарбоксилирование следующих аминокислот и их производных: тирозина, триптофана, 5-окситриптофана, валина, серина, гистидина, глутаминовой и  $\gamma$ -оксиглутаминовой кислот, 3,4-диоксифенилаланина, цистеина, аргинина, орнитина, S-аденозилметионина и  $\alpha$ -аминомалоновой кислоты. Помимо этого, у микроорганизмов и растений открыто декарбоксилирование ряда других аминокислот.

В живых организмах открыты 4 типа декарбоксилирования аминокислот:

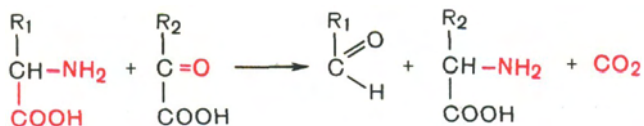
1.  $\alpha$ -Декарбоксилирование, характерное для тканей животных, при котором от аминокислот отщепляется карбоксильная группа, стоящая по соседству с  $\alpha$ -углеродным атомом. Продуктами реакции являются  $\text{CO}_2$  и биогенные амины:



2.  $\omega$ -Декарбоксилирование, свойственное микроорганизмам. Например, из аспарагиновой кислоты этим путем образуется  $\alpha$ -аланин:

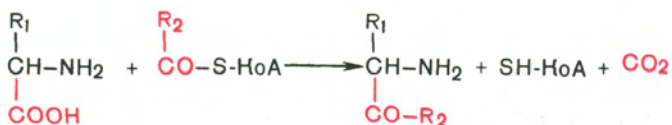


3. Декарбоксилирование, связанное с реакцией трансминирования:



В этой реакции образуются альдегид и новая аминокислота, соответствующая исходной кетокислоте.

4. Декарбоксилирование, связанное с реакцией конденсации двух молекул:



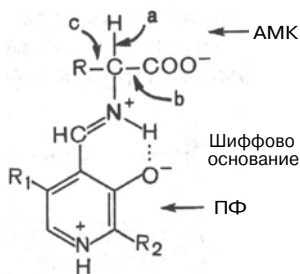
Эта реакция в тканях животных осуществляется при синтезе  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты из глицина и сукцинил-КоА (см. главу 13) и при синтезе сфинголипидов, а также у растений при синтезе биотина.

Реакции декарбоксилирования в отличие от других процессов промежуточного обмена аминокислот являются необратимыми. Они катализируются специфическими ферментами — декарбоксилазами аминокислот, отличающимися от декарбоксилаз  $\alpha$ -кетокислот (см. главу 10) 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 трансминаз.

Таким образом, в двух совершенно различных процессах обмена

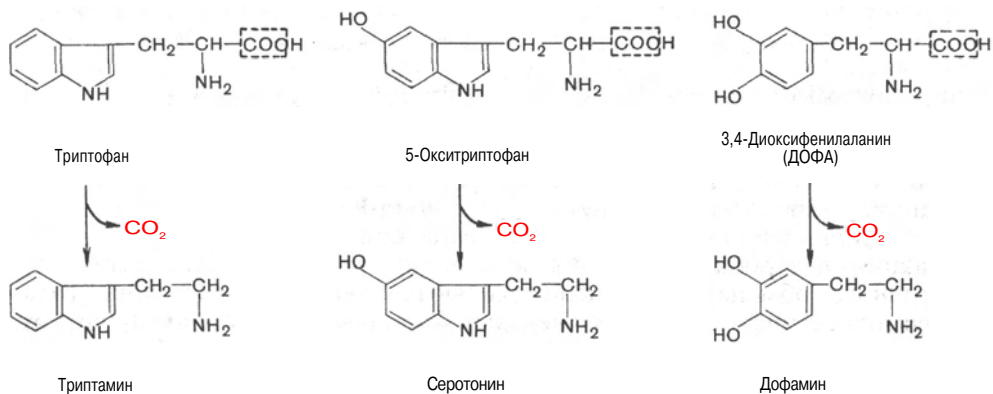
аминокислот участвует один и тот же кофермент. Исключение составляют две декарбоксилазы: гистидиндекарбоксилаза *Micrococcus* и *Lactobacillus* и аденозилметионин-декарбоксилаза *E. coli*, содержащие вместо ПФ остаток пировиноградной кислоты\*.

Механизм реакции декарбоксилирования аминокислот в соответствии с общей теорией пиридоксалевого катализа (см. рис. 12.3) сводится к образованию ПФ-субстратного комплекса, представленного, как и в реакциях трансминирования, шиффовым основанием ПФ и аминокислоты:



Образование подобного комплекса в сочетании с некоторым оттягиванием электронов белковой частью молекулы фермента сопровождается лабильностью одной из трех связей при  $\alpha$ -углеродном атоме, благодаря чему аминокислота способна вступать в реакции трансминирования (а), декарбоксилирования (b) и альдольного расщепления (с).

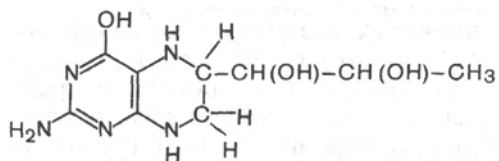
Далее представлены отдельные примеры декарбоксилирования аминокислот, в частности тех, продукты реакции которых оказывают сильное фармакологическое действие. Одним из хорошо изученных ферментов является декарбоксилаза ароматических аминокислот. Она не обладает строгой субстратной специфичностью и катализирует декарбоксилирование L-изомеров триптофана, 5-окситриптофана и 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА); продуктами реакций, помимо  $\text{CO}_2$ , являются соответственно триптамин, серотонин и диоксифенилэтиламин (дофамин).



\* Предполагают, что некоторые декарбоксилазы животных тканей, декарбоксилирующие, например, S-аденозилметионин, фосфатидилсерин и аспартат, также содержат пируват.

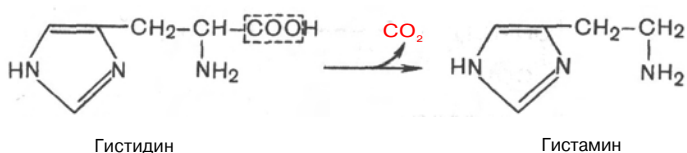
Декарбоксилаза ароматических аминокислот получена в чистом виде (мол. масса 112000), кофермент—ПФ. В больших количествах она содержится в надпочечниках и ЦНС, играет важную роль в регуляции содержания биогенных аминов. Образующийся из 5-окситриптофана серотонин оказался высокоактивным биогенным амином сосудосуживающего действия. Серотонин регулирует артериальное давление, температуру тела, дыхание, почечную фильтрацию и является медиатором нервных процессов в ЦНС. Некоторые авторы считают серотонин причастным к развитию аллергии, демпинг-синдрома, токсикоза беременных, карциноидного синдрома и геморрагических диатезов.

Продукт декарбоксилазной реакции дофамин является предшественником катехоламинов (норадреналина и адреналина). Источником ДОФА в организме является тирозин, который под действием специфической гидроксилазы превращается в 3,4-диоксифенилаланин (см. главу 8). 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 тетрагидриобиптерин, имеющий следующее строение:



Физиологическая роль тирозин-3-монооксигеназы чрезвычайно велика, 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  $\alpha$ -метилдофа (альдомет), вызывающий снижение артериального давления.

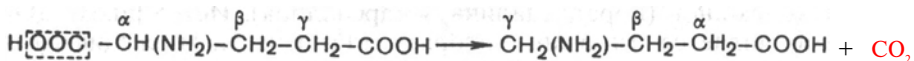
В животных тканях с высокой скоростью протекает декарбоксилирование гистидина под действием специфической декарбоксилазы.



Гистамин оказывает широкий спектр биологического действия. По механизму действия на кровеносные сосуды он резко отличается от других биогенных аминов, так как обладает сосудорасширяющим свойством. 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. Кроме того, гистамин участвует в секреции соляной кислоты в желудке, что широко используется в клинике при изучении секреторной деятельности желудка (гистаминовая проба). Он

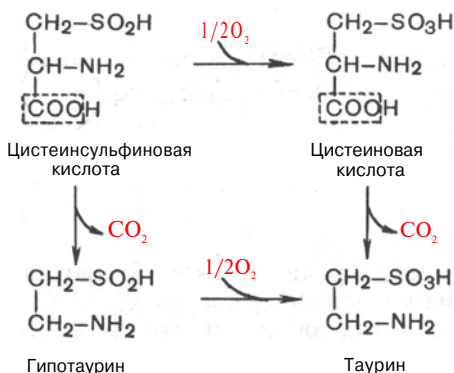
имеет прямое отношение к явлениям сенсibilизации и десенсibilизации. При повышенной чувствительности к гистамину в клинике используют антигистаминные препараты (санорин, димедрол и др.), оказывающие влияние на рецепторы сосудов. Гистамину приписывают также роль медиатора боли. Болевой синдром – сложный процесс, детали которого пока не выяснены, но участие в нем гистамина не подлежит сомнению.

В клинической практике широко используется, кроме того, продукт  $\alpha$ -декарбоксилирования глутаминовой кислоты –  $\gamma$ -аминомасляная кислота (ГАМК). Фермент, катализирующий эту реакцию (глутаматдекарбоксилаза), является высокоспецифичным.

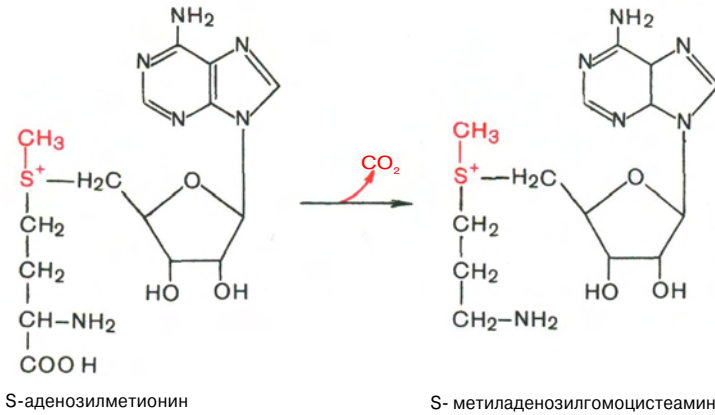
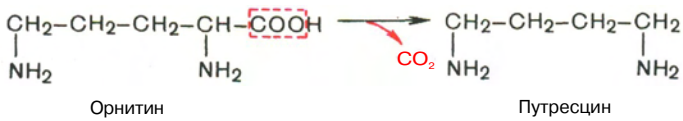


Интерес к ГАМК объясняется ее тормозящим действием на деятельность ЦНС. Больше всего ГАМК и глутаматдекарбоксилазы обнаружено в сером веществе коры большого мозга, в то время как белое вещество мозга и периферическая нервная система их почти не содержат. Введение ГАМК в организм вызывает разлитой тормозной процесс в коре (центральное торможение) и у животных приводит к утрате условных рефлексов. ГАМК используется в клинике как лекарственное средство при некоторых заболеваниях ЦНС, связанных с резким возбуждением коры большого мозга. Так, при 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.

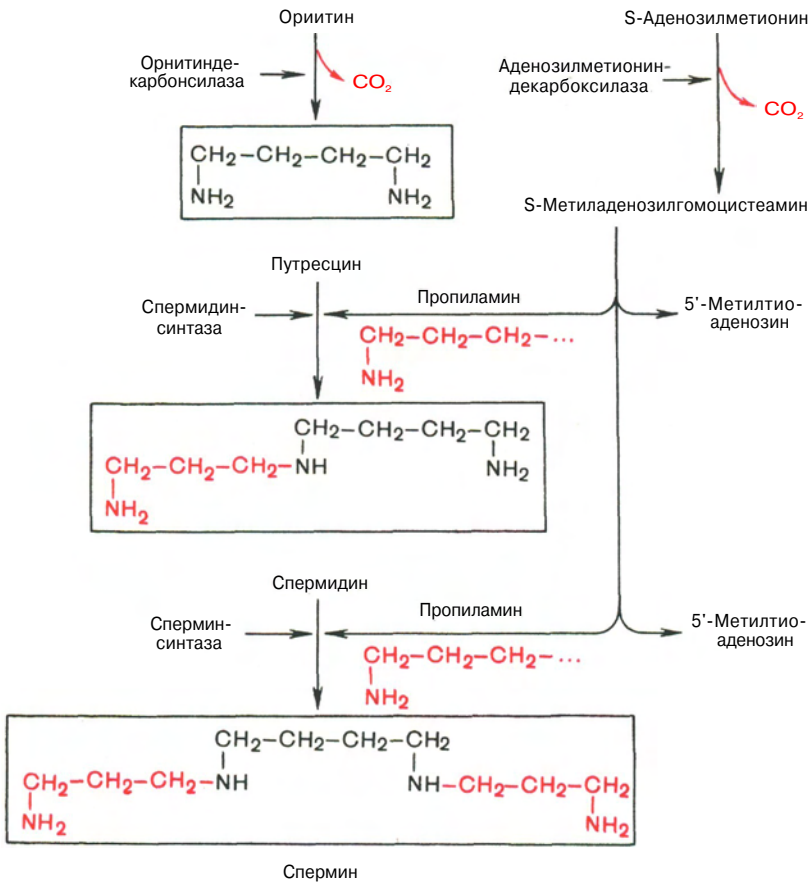
В животных тканях с высокой скоростью декарбоксилируются также два производных цистеина – цистеиновая и цистеинсульфиновая кислоты. В процессе этих специфических ферментативных реакций образуется таурин, который используется в организме для синтеза парных желчных кислот (см. главу 11).



Следует указать еще на два недавно открытых в тканях животных фермента, катализирующих декарбоксилирование орнитина и S-аденозил-метионина: орнитиндекарбоксилазу и аденозилметиониндекарбоксилазу.



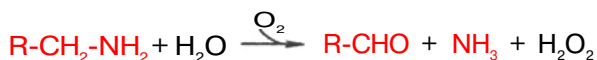
Значение этих реакций для тканей животных огромно, поскольку продукты реакций используются для синтеза полиаминов – спермидина и спермина.



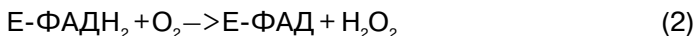
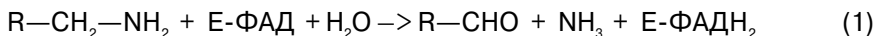
Полиамины, к которым относят также диамин путресцин, играют важную роль в процессах клеточного роста и дифференцировки, в регуляции синтеза ДНК, РНК и белка, стимулируя транскрипцию и трансляцию (см. далее), хотя конкретный механизм участия их в указанных процессах не всегда ясен.

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 сказываться на физиологическом статусе и вызывать ряд существенных нарушений функций в организме. Однако органы и ткани, как и целостный организм, располагают специальными механизмами обезвреживания биогенных аминов, которые в общем виде сводятся к окислительному дезаминированию этих аминов с образованием соответствующих альдегидов и освобождением аммиака:



Ферменты, катализирующие эти реакции, получили название моноамин- и диаминооксидаз. Более подробно изучен механизм окислительного дезаминирования моноаминов. Этот ферментативный процесс является необратимым и протекает в две стадии:

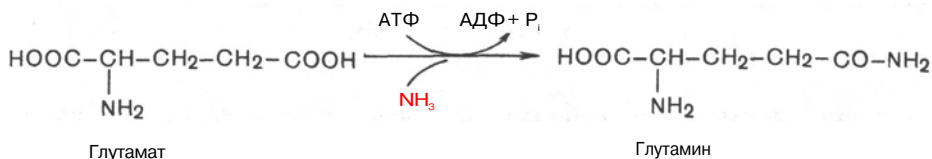


Первая (1), анаэробная, стадия характеризуется образованием альдегида, аммиака и восстановленного фермента. Последний в аэробной фазе окисляется молекулярным кислородом. Образовавшаяся перекись водорода далее распадается на воду и кислород. Моноаминоксидаза (МАО), ФАД-содержащий фермент, преимущественно локализуется в митохондриях, играет исключительно важную роль в организме, регулируя скорость биосинтеза и распада биогенных аминов. Некоторые ингибиторы моноаминоксидазы (ипраниазид, гармин, паргилин) используются при лечении гипертонической болезни, депрессивных состояний, шизофрении и др.

## Обезвреживание аммиака в организме

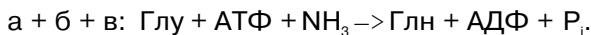
В организме человека подвергается распаду около 70 г аминокислот в сутки, при этом в результате реакций дезаминирования и окисления биогенных аминов освобождается большое количество аммиака, являющегося высокотоксичным соединением. Поэтому концентрация аммиака в организме должна сохраняться на низком уровне. Действительно, уровень аммиака в крови в норме 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 выделяющихся с мочой.

Один из путей связывания и обезвреживания аммиака в организме, в частности в мозге, сетчатке, почках, печени и мышцах, — это биосинтез глутамина (и, возможно, аспарагина). Глутамин и аспарагин выделяются с мочой в небольшом количестве. Было высказано предположение, что они выполняют скорее транспортную функцию переноса аммиака в нетоксичной форме. Ниже приводится химическая реакция синтеза глутамина, катализируемого глутаминсинтетазой\*.



Механизм этой синтетазной реакции, подробно изученный А. Майстером, включает ряд стадий. Синтез глутамина в присутствии глутаминсинтетазы может быть представлен в следующем виде:

- а) Глу + E + АТФ → E-АДФ-Глу + P<sub>i</sub>
- б) E-АДФ-Глу + NH<sub>3</sub> → Глн + E-АДФ
- в) E-АДФ → E + АДФ



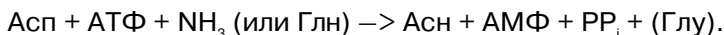
Биосинтез аспарагина протекает несколько отлично и зависит от природы ферментов и донора аммиака. Так, у микроорганизмов и в животных тканях открыта специфическая аммиакзависимая аспарагинсинтетаза, которая катализирует синтез аспарагина в две стадии:

- а) Асп + E + АТФ → E-аспартил~АМФ + PP<sub>i</sub>;
- б) E-аспартил~АМФ + NH<sub>3</sub> → Асн + E + АМФ.

В животных тканях содержится, кроме того, глутаминзависимая аспарагинсинтетаза, которая для синтеза во второй стадии использует амидную группу глутамина:

- б) E-аспартил~АМФ + Глн → Асн + E + АМФ + Глу.

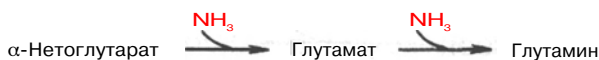
Суммарная ферментативная реакция синтеза аспарагина может быть представлена в следующем виде:



\* Конечные продукты обмена глутамина (гистидин, глюкозо-6-фосфат, АМФ, цАМФ и др.), как и Гли, и Ала, оказались аллостерическими ингибиторами глутаминсинтетазы. Фермент подвергается также ковалентной модификации путем аденилирования-деаденилирования (остаток Тир), и тогда он оказывается более чувствительным к аллостерическим ингибиторам. Суммарный тормозящий эффект превышает действие одного какого-либо ингибитора. Этот тип регуляции известен как **согласованное ингибирование**.

Видно, что энергетически синтез аспарагина обходится организму дороже, поскольку образовавшийся  $PP_i$  далее распадается на ортофосфат.

Часть аммиака легко связывается с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой благодаря обратимости глутаматдегидрогеназной реакции. Если учесть связывание одной молекулы аммиака при синтезе глутамина, то нетрудно видеть, что в организме имеется хорошо функционирующая система, связывающая две молекулы аммиака:

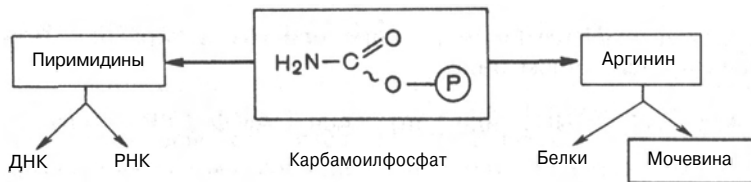


Глутамин, кроме того, используется почками в качестве резервного источника аммиака (образуется из глутамина под действием глутаминазы), необходимого для нейтрализации кислых продуктов обмена при ацидозе и защищающего тем самым организм от потери с мочой используемых для этих целей ионов  $\text{Na}^+$ .

### Орнитинный цикл мочевинообразования

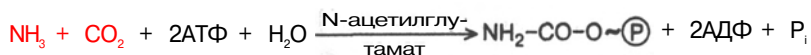
Основным механизмом обезвреживания аммиака в организме является биосинтез мочевины. Последняя выводится с мочой в качестве главного конечного продукта белкового, соответственно аминокислотного, обмена. На долю мочевины приходится до 80–85% от всего азота мочи. Основным и, возможно, единственным местом синтеза мочевины является печень. Впервые Г. Кребс и К. Гензеляйт в 1932 г. вывели уравнения реакций синтеза мочевины, которые представлены в виде цикла, получившего в литературе название **орнитинового цикла мочевинообразования Кребса**. Следует указать, что в биохимии это была первая циклическая система метаболизма, описание которой почти на 5 лет опередило открытие Г. Кребсом другого метаболического процесса—цикла трикарбоновых кислот (см. ранее). Дальнейшие исследования в основном подтвердили циклический характер биосинтеза мочевины в печени. Благодаря исследованиям Г. Коена, С. Ратнер и сотр. 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—метаболически активная форма аммиака, используемая в качестве исходного продукта для синтеза пиримидиновых нуклеотидов (соответственно ДНК и РНК) и аргинина (соответственно белка и мочевины):



К настоящему времени открыты три разных пути синтеза карбамоилфосфата de novo, катализируемые тремя разными ферментами. Первую необратимую реакцию катализирует регуляторный фермент—аммиакзависимая карбамоилфосфатсинтетаза (КФ 6.3.4.16):





Реакция требует затраты двух молекул АТФ, открыта в митохондриях клеток печени и используется преимущественно для синтеза аргинина и мочевины. В этой реакции в качестве активного стимулирующего аллостерического эффектора действует N-ацетилглутамат.

Вторую, также необратимую, реакцию катализирует глутаминзависимая карбамоилфосфатсинтетаза (КФ 6.3.5.5):



Данная реакция открыта в цитозоле клеток животных и требует наличия ионов  $\text{Mg}^{2+}$ . Следует указать, что благодаря включению гидролитической стадии она используется преимущественно для синтеза пиримидиновых нуклеотидов (см. далее). Фермент широко распространен в клетках животных.

Третью обратимую реакцию катализирует карбаматкиназа (КФ 2.7.2.2):



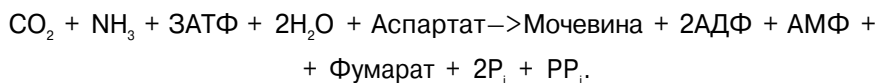
Реакция открыта у разных микроорганизмов и, возможно, используется скорее для ресинтеза АТФ, чем для синтеза карбамоилфосфата.

На втором этапе цикла мочевинообразования происходит конденсация карбамоилфосфата и орнитина с образованием цитруллина; реакцию катализирует орнитин-карбамоилтрансфераза (КФ 2.1.3.3).

На следующей стадии цитруллин превращается в аргинин в результате двух последовательно протекающих реакций. Первая из них, энергезависимая,— это конденсация цитруллина и аспарагиновой кислоты с образованием аргининосукцината (эту реакцию катализирует аргининосукцинатсинтетаза). Аргининосукцинат распадается в следующей реакции на аргинин и фумарат при участии другого фермента— аргининосукцинатлиазы. 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 вместо мочевины выделяют мочевую кислоту. Орнитиновый цикл мочевинообразования с учетом новых данных представлен на рис. 12.5.

Суммарная реакция синтеза мочевины без учета всех промежуточных продуктов может быть представлена в следующем виде:



Данная реакция сопровождается снижением свободной энергии ( $\Delta G^0 = -40$  кДж), поэтому процесс всегда протекает в направлении синтеза мочевины. Следует указать, что синтез мочевины энергетически дорого обходится организму. На синтез одной молекулы мочевины требуется

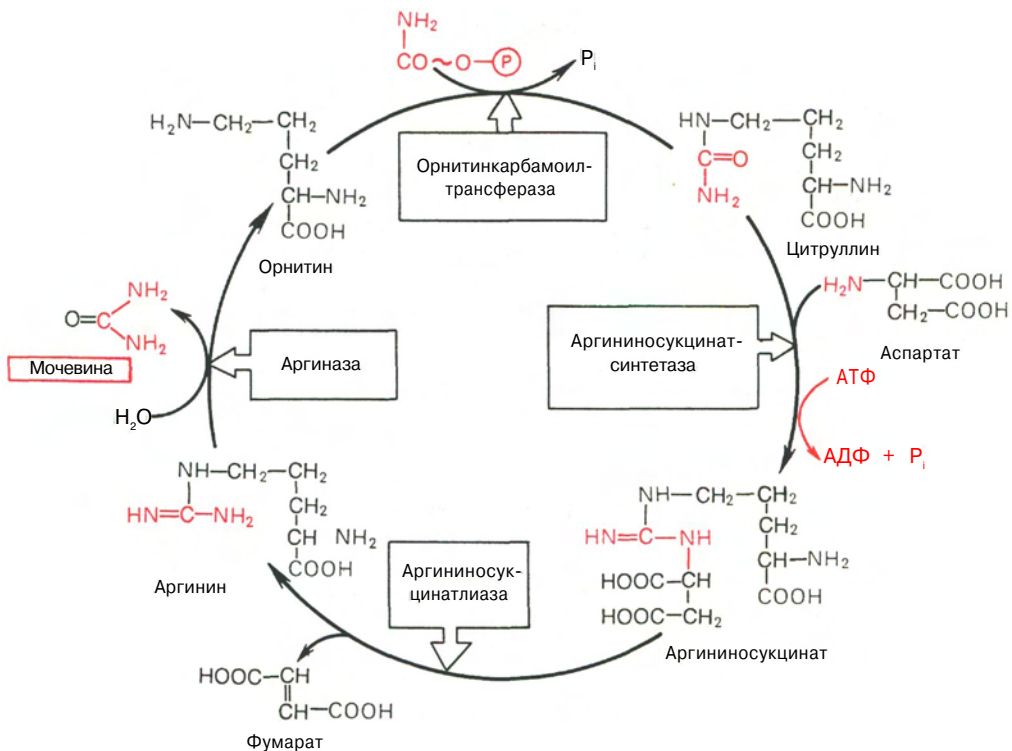


Рис. 12.5. Орнитиновый цикл синтеза мочевины в печени.

затрата четырех высокоэнергетических фосфатных групп: две молекулы АТФ расходуются на синтез карбамоилфосфата и одна — на образование аргининоянтарной кислоты, при этом АТФ расщепляется на АМФ и  $\text{PP}_i$ , который при гидролизе также образует две молекулы  $\text{P}_i$ .

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. В процессе пополнения запасов аспартата участвуют три сопряженные реакции: сначала фумарат под действием фумараты присоединяет воду и превращается в малат, который окисляется при участии малатдегидрогеназы с образованием оксалоацетата; последний в реакции трансаминирования с глутаматом вновь образует аспартат.

Учитывая известные фактические данные о механизмах обезвреживания аммиака в организме, можно сделать следующее заключение. Часть аммиака используется на биосинтез аминокислот путем восстановительного аминирования  $\alpha$ -кетокислот по механизму реакции трансаминирования. Аммиак связывается при 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. 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%.

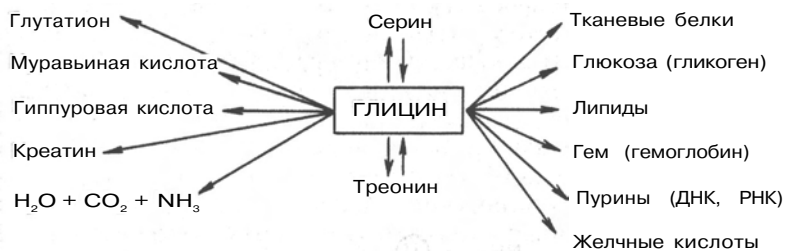
В процессе эволюции живые организмы выработали различные типы азотистого обмена. Это **аммонотелический тип**, при котором главным конечным продуктом азотистого обмена является аммиак; он свойствен преимущественно рыбам. При **уреотелическом типе** обмена основным конечным продуктом обмена белков является мочевина; такой тип характерен для человека и животных. Урикотелический тип характерен для птиц и рептилий; главным конечным продуктом данного типа обмена является мочевая кислота.

## Специфические пути обмена некоторых аминокислот

Помимо общих путей обмена, характерных для большинства аминокислот, в настоящее время в животных тканях довольно подробно выяснены индивидуальные пути превращения почти всех аминокислот, входящих в состав белковых молекул. Некоторые из этих превращений в количественном отношении имеют второстепенное значение, но образующиеся из них продукты реакции могут играть важную, а иногда и решающую роль в процессах обмена веществ. Далее рассматривается выборочно обмен тех аминокислот, специфические (так называемые частные) пути превращения которых в организме человека и животных определяют во многих отношениях его физиологическое состояние.

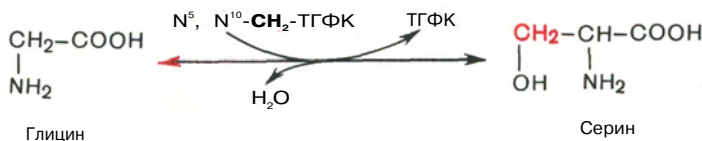
### Обмен глицина и серина

Глицин является единственной из всех входящих в состав белков аминокислот, в молекуле которой отсутствует асимметричный атом углерода. Тем не менее метаболически он связан с химическими компонентами организма в большей степени, чем любая другая аминокислота.

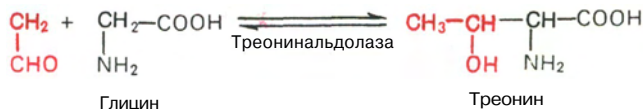


На схеме видно, что глицин в некоторых синтезах играет незаменимую роль, в частности в образовании белков, пуриновых нуклеотидов, гема гемоглобина, парных желчных кислот, креатина, глутатиона и др. Большинство этих реакций представлено в соответствующих разделах учебника. Здесь укажем на реакции, при помощи которых осуществляются взаимопревращения глицина, серина и треонина, а также на реакции катаболизма

глицина. Показано, что в реакции взаимопревращения глицина и серина участвует тетрагидрофолиевая кислота; эту реакцию катализирует пиридоксальный фермент серин-оксиметилтрансфераза:



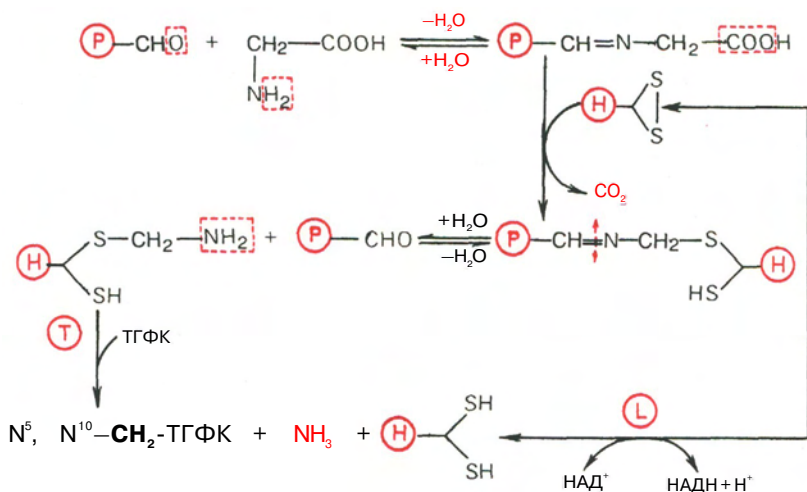
Имеются также доказательства взаимопревращения треонина и глицина в треонинальдолозной реакции:



Основным путем катаболизма глицина в животных тканях, однако, считается распад его на  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  и  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -метилентетрагидрофолиевую кислоту по уравнению:



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 липамиддегидрогеназой:



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

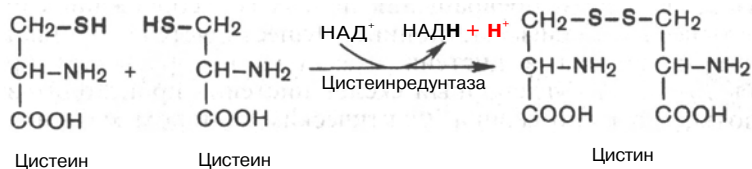
доказательства, что наследственная некетогенная глицинемия (повышение уровня глицина в крови) обусловлена недостаточностью Р- или Т-белка глицинрасщепляющей ферментной системы печени или мозга и что каждый из этих белков контролируется отдельным геном.

Серин легко превращается в пируват под действием сериндегидратазы. В связи с этим в тканях имеются условия для превращения глицина (через серин) в пируват. Этим путем осуществляется участие глицина в обмене углеводов. Важную роль играет серин в биосинтезе сложных белков – фосфопротеинов, а также фосфоглицеридов. Помимо фосфатидилсерина, углеродный скелет и азот серина используются в биосинтезе фосфатидилэтанолamina и фосфатидилхолина (см. главу 11).

Ряд других эссенциальных функций глицина, в частности участие в образовании δ-аминолевулиновой кислоты при синтезе порфиринов (гема) и пуриновых нуклеотидов, рассматривается далее (см. главу 13).

### Обмен серосодержащих аминокислот

В молекулах белка обнаружены три серосодержащие аминокислоты (метионин, цистеин и цистин), метаболически тесно связанные друг с другом. Благодаря наличию в составе цистеина высокореактивной SH-группы в тканях легко осуществляется ферментативная окислительно-восстановительная реакция между цистеином и цистином\*.

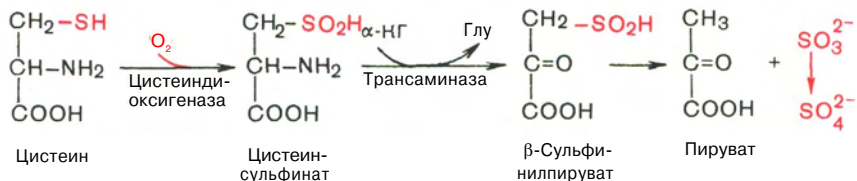


Дисульфидная связь часто образуется между двумя остатками цистеина внутри одной полипептидной цепи или между двумя полипептидными цепями, способствуя тем самым стабилизации молекулы белка. Цистеин является составной частью трипептида глутатиона, сокращенно обозначаемого Г-SH, что подчеркивает функциональную значимость его тио-группы 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. Предполагают, что одной из главных функций глутатиона является сохранение этих ферментов в активной восстановленной форме. Окисленный глутатион может восстанавливаться под действием глутатионредуктазы, используя НАДФН. Кроме того, глутатион может оказывать ингибирующее действие на некоторые белки. В частности, известная реакция инактивации инсулина под действием глутатионинсулинтрансгидрогеназы, в которой SH-глутатион является донором водородных атомов, разрывающих дисульфидные связи между двумя полипептидными цепями молекулы инсулина. Установлена также коферментная функция глутатиона, в частности для глиоксилазы I. Ранее обсуждалось участие глутатиона в транспорте аминокислот через клеточную мембрану.

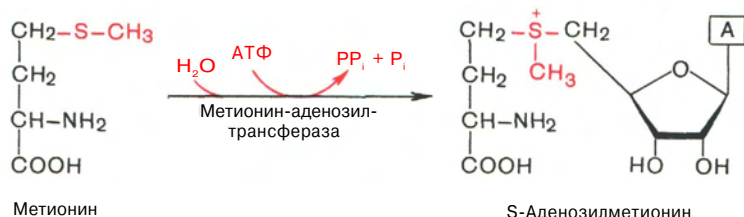
\* Окисление цистеина в цистин возможно и неферментативным путем.

В процессе катаболизма сера метионина в тканях в основном переходит в серу цистеина, а взаимопревращение цистина в цистеин осуществляется легко. Поэтому проблема окисления серы всех аминокислот практически сводится к окислению цистеина. Главным путем оказался окислительный, включающий окисление цистеина в цистеинсульфиновую кислоту, трансаминирование последней с  $\alpha$ -кетоглутаратом и образование пирувата и сульфита по схеме:

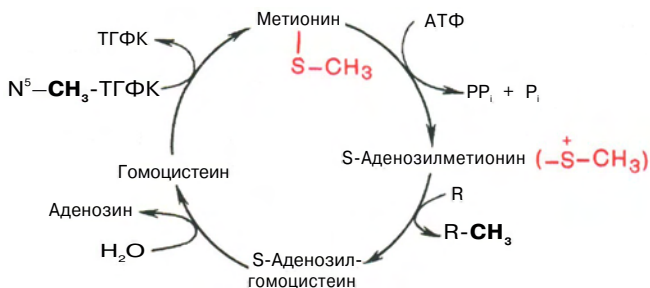


Сульфит затем быстро окисляется в тканях и выводится с мочой в виде нетоксичных сульфатов и эфирсерных кислот. Использование цистеина и продуктов его окисления—цистеинсульфиновой и цистеиновой кислот—в образовании таурина рассмотрено ранее.

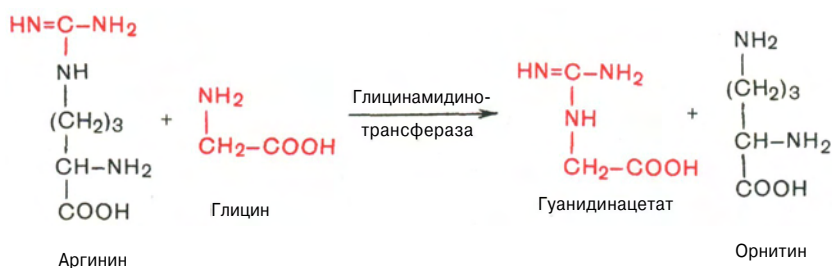
Метаболические пути превращения метионина в тканях значительно разнообразнее, чем пути превращения других серосодержащих аминокислот; тем не менее катаболизм метионина осуществляется через цистеин. Это превращение метионина в цистеин оказалось необратимым процессом. Выяснилось также, что углеродный скелет цистеина происходит из другой аминокислоты, а именно серина. Фактическим донором метильных групп в реакциях трансметилирования является не свободный метионин, а так называемый активный метионин—S-аденозилметионин, который образуется в процессе АТФ-зависимой реакции, катализируемой метионин-аденозилтрансферазой.



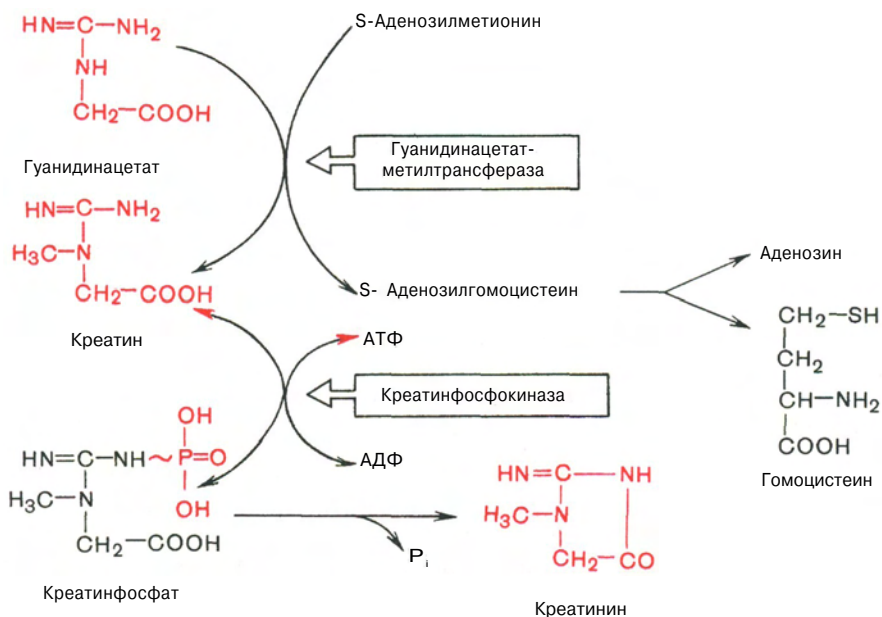
Своеобразие данной реакции заключается в том, что  $\text{CH}_3$ -группа метионина активируется под действием положительного заряда соседнего атома серы. S-аденозилметионин участвует во всех реакциях, где метильная группа используется в биосинтетических реакциях: например, в синтезе адреналина, креатинина, тимина, фосфатидилхолина, бетаина и др. Образовавшийся после отщепления метильной группы S-аденозилгомоцистеин подвергается гидролизу на аденозин и гомоцистеин; последний 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 приводим схему 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 (КФ 2.1.4.1):



Вторая стадия синтеза креатина протекает в печени при участии гуанидинацетатметилтрансферазы (КФ 2.1.1.2):



Креатин подвергается фосфорилированию с образованием креатин-фосфата, 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.

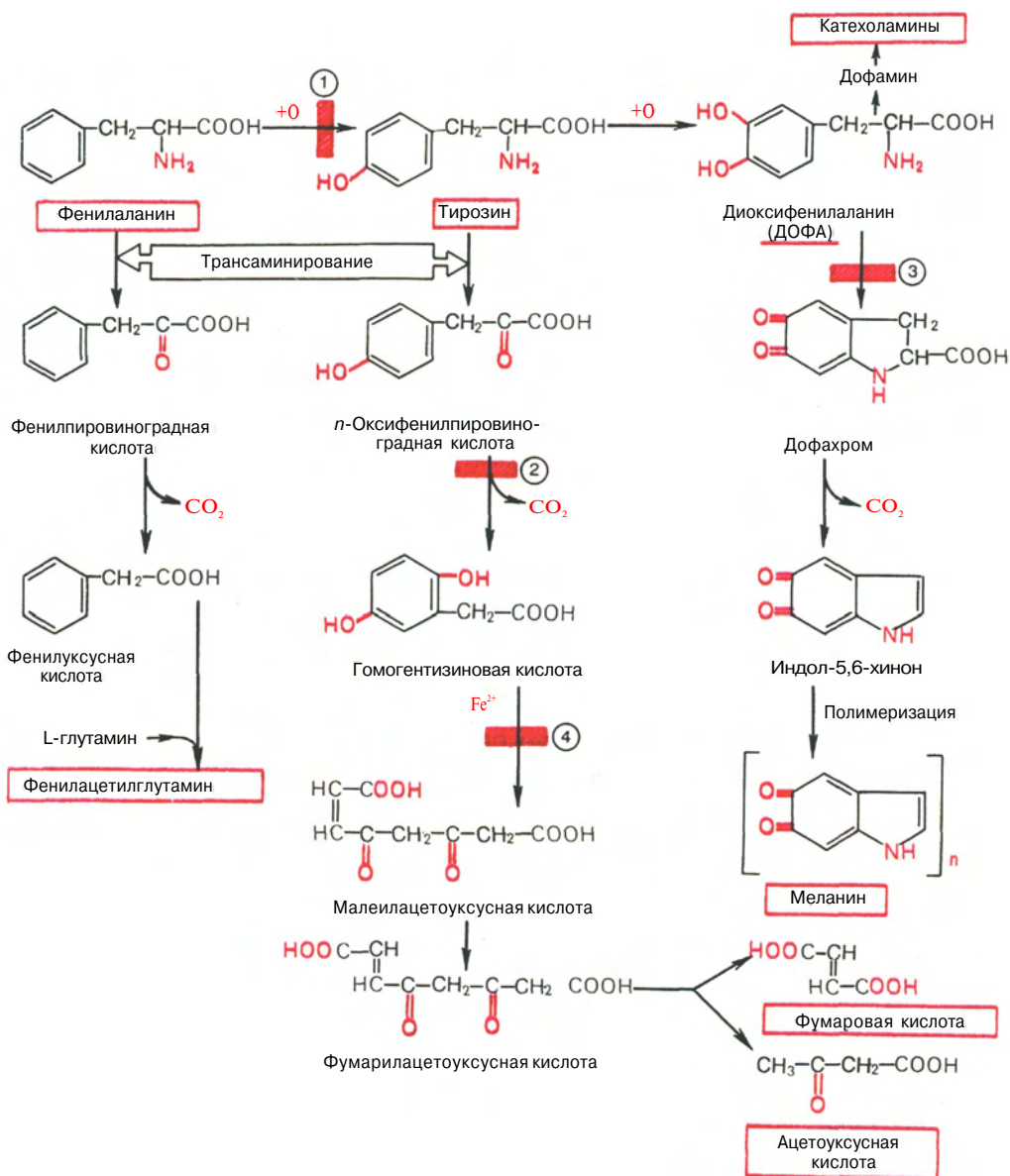


Ферменты, катализирующие синтез и распад цистатионина (цистатионин-β-синтаза и цистатионаза), содержат ПФ. Цистеин далее подвергается окислению по описанному ранее пути, а гомосерин после трансаминирования с α-кетоглутаратом превращается в α-кетомасляную кислоту; последняя может также образоваться из цистатионина непосредственно, минуя стадию гомосерина.

## Обмен фенилаланина и тирозина

Фенилаланин относится к незаменимым аминокислотам, поскольку ткани животных не обладают способностью синтезировать его бензольное кольцо. В то же время тирозин полностью заменим при достаточном поступлении фенилаланина с пищей. Объясняется это тем, что основной путь превращения фенилаланина начинается с его окисления (точнее, гидроксирования) в тирозин (рис. 12.6). 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, гидроксированию 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 в присутствии глутатиона превращается в фумарилацетоуксусную кислоту, подвергающуюся гидролизу с образованием фумаровой и ацетоуксусной кислот, дальнейшие превращения которых уже известны.





**Рис. 12.6.** Основные метаболические превращения фенилаланина и тирозина. Цифры в кружках - участки блокирования реакций при фенилкетонурии (1), тирозинозе (2), альбилизме (3) и алкаптонурии (4).

Участие молекулы тирозина в биосинтезе гормонов щитовидной железы и катехоламинов подробно представлено в главе 8. 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 относится к незаменимым для человека и животных аминокислотам, поскольку является предшественником ряда важных биологически активных веществ, в частности серотонина и рибонуклеотида никотиновой кислоты. Кроме того, 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. 12.7). Серотонин в организме подвергается окислительному дезаминированию с образованием индолилуксусной кислоты, которая выделяется с мочой. Содержание этой кислоты в моче повышено при поражениях кишечника злокачественными карциноидами, когда около 60% триптофана окисляется по серотониновому пути. Основной путь обмена триптофана приводит к синтезу НАД, уменьшая потребность организма в витамине РР. Триптофан под действием гемсодержащего фермента триптофан-2,3-диоксигеназы в присутствии

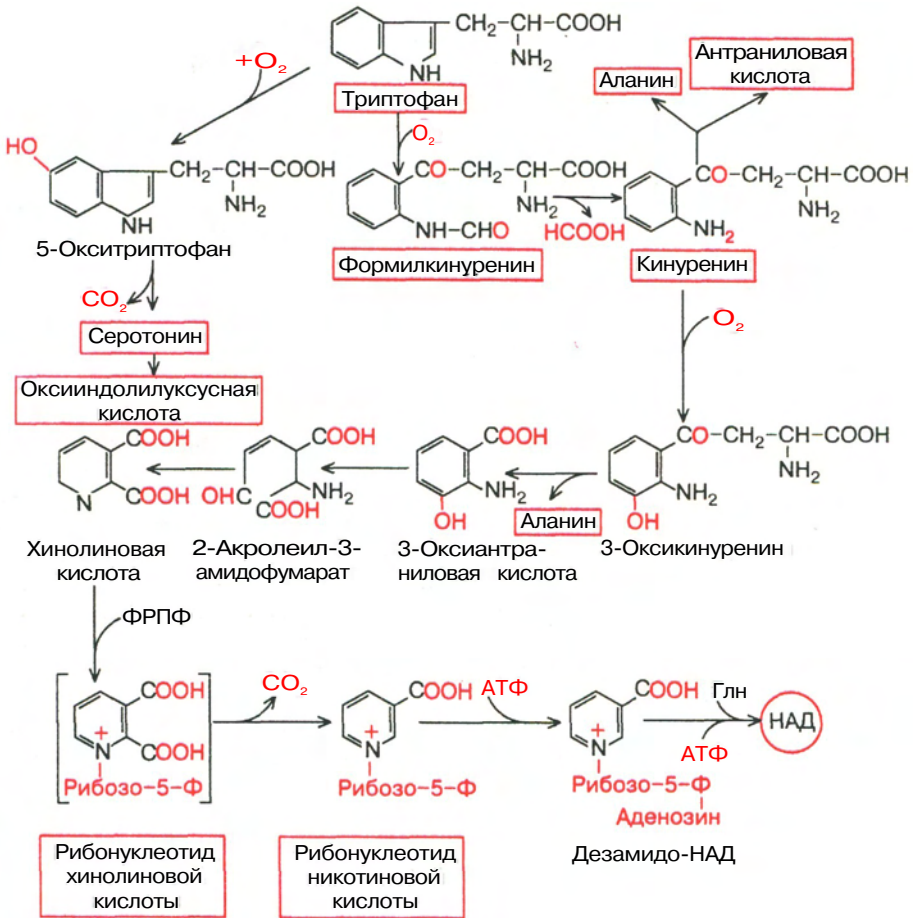
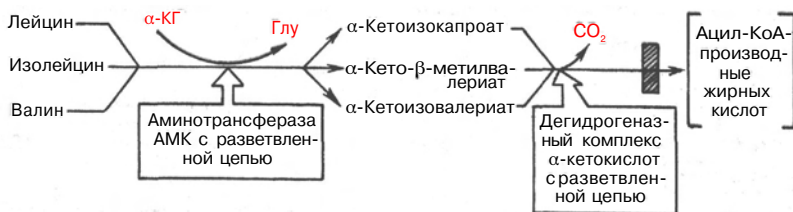


Рис. 12.7. Метаболические превращения триптофана.

молекулярного кислорода превращается в формилкинуренин, который распадается при участии формамидазы (формилкинурениназы) 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-оксиантраниловую кислоту, которая через ряд промежуточных продуктов (механизм образования их до конца не раскрыт) превращается в хинолиновую кислоту, т.е. в непосредственный предшественник рибонуклеотида никотиновой кислоты.

## Обмен аминокислот с разветвленной цепью

Катаболизм аминокислот с разветвленной цепью: лейцина, изолейцина и валина — преимущественно осуществляется не в печени (место распада большинства остальных аминокислот), а в мышечной и жировой тканях, в почках и ткани мозга. Сначала все три аминокислоты подвергаются трансаминированию с  $\alpha$ -кетоглутаратом под действием одного общего и специфического фермента — аминотрансферазы аминокислот с разветвленной цепью (КФ 2.6.1.42) (не содержится в печени) с образованием соответствующих  $\alpha$ -кетокислот. Последующее окислительное декарбоксилирование  $\alpha$ -кетокислот приводит к образованию ацил-КоА-производных.



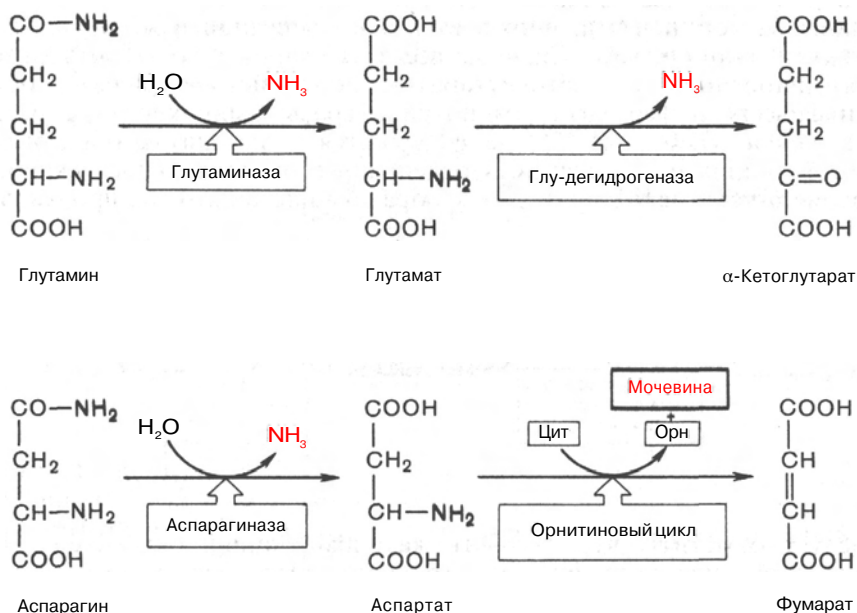
Следует отметить, что фермент, катализирующий окислительное декарбоксилирование указанных  $\alpha$ -кетокислот, высокоспецифичен (по аналогии с пируватдегидрогеназным и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназным комплексами) и также нуждается в присутствии всех пяти кофакторов (см. главу 10). Известно наследственное заболевание «болезнь кленового сиропа», при которой нарушено декарбоксилирование указанных  $\alpha$ -кетокислот (вследствие синтеза дефектного дегидрогеназного комплекса), что приводит не только к накоплению в крови аминокислот и  $\alpha$ -кетокислот, но и к их экскреции с мочой, издающей запах кленового сиропа. Болезнь встречается редко, проявляется обычно в раннем детском возрасте и приводит к нарушению функции мозга и летальному исходу, если не ограничить или полностью не исключить поступление с пищей лейцина, изолейцина и валина.

## Обмен дикарбоновых аминокислот

Классическими работами советских ученых А.Е. Браунштейна и С.Р. Мардашева и американского биохимика А. Майстера доказана роль дикарбоновых аминокислот (глутаминовой и аспарагиновой кислот и их амидов —

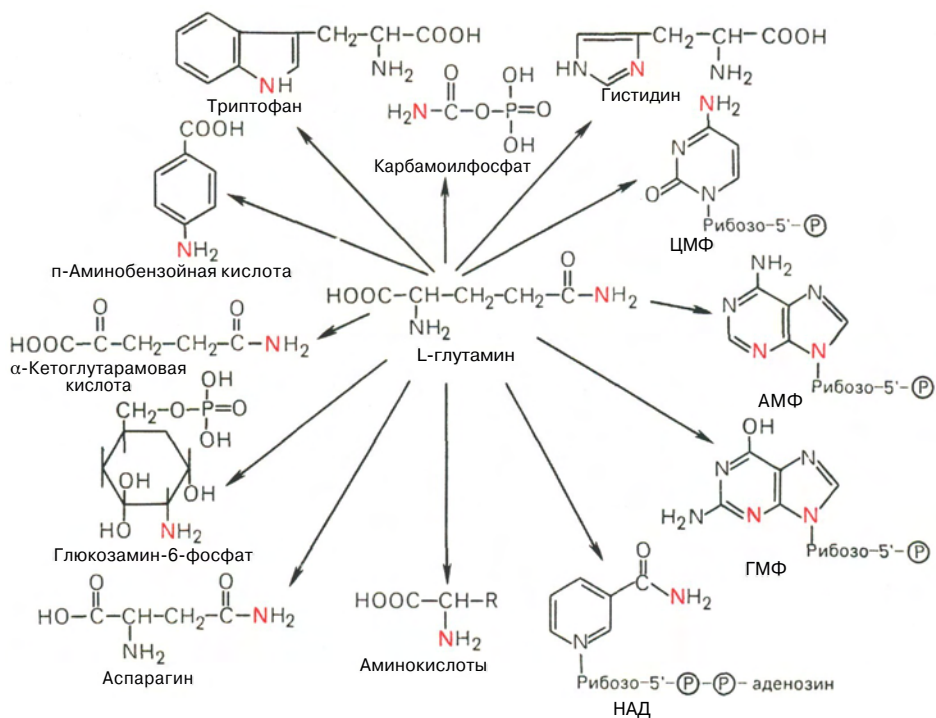
глутамин и аспарагина) в интеграции азотистого обмена в организме. Система дикарбоновых аминокислот, к которой относят также соответствующие  $\alpha$ -кетокислоты, теснейшим образом связана не только с азотистым метаболизмом в целом, но и с обменом липидов и углеводов. Ранее отмечалась особая роль дикарбоновых аминокислот и ферментов, катализирующих их превращения, в перераспределении азота в организме, дезаминировании и синтезе природных аминокислот (реакции трансдезаминирования и трансреаминирования), в образовании конечных продуктов белкового обмена—синтезе мочевины.

Основные катаболические пути превращения дикарбоновых аминокислот и их амидов могут быть представлены в виде следующих реакций:



Аспарагиновая кислота принимает непосредственное участие в орнитиновом цикле мочевинообразования, в реакциях трансаминирования и биосинтезе углеводов (гликогенная аминокислота), карнозина и ансерина, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов (см. главу 14), 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 глутамината. Помимо участия в транспорте аммиака и регуляции кислотно-щелочного равновесия, глутамин—это незаменимый источник азота в ряде синтезов, в частности в биосинтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, аминокислот, в обезвреживании фенилуксусной кислоты (синтез фенилацетилглутамината) у человека и человекообразных обезьян, а также в синтезе



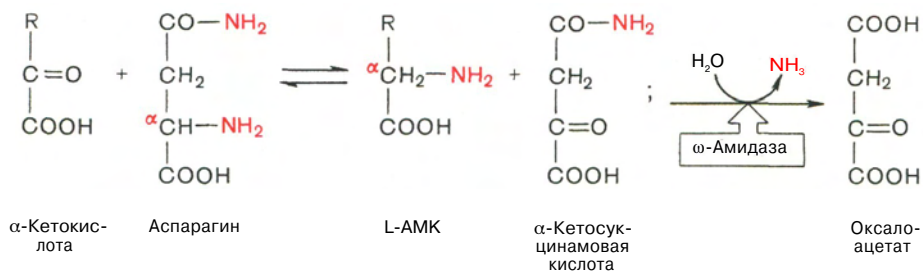
**Рис. 12.8.** Использование амидного азота глутамина для синтеза различных соединений в живых организмах.

витамина фолиевой кислоты (птероилглутаминовая кислота). На рис. 12.8 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; они не могут быть заменены ни друг другом, ни соответствующими дикарбоновыми аминокислотами. Это свидетельствует о том, что в условиях выращивания клеток в культуре ткани некоторые клетки теряют способность синтезировать эти амиды синтетазным или трансминазным путем.

В лаборатории Майстера получены доказательства, что глутамин и аспарагин в животных тканях подвергаются **сочетанному трансминированию и дезамидированию** под влиянием специфических трансминаз амидов (глутаминтрансминазы и аспарагинтрансминазы) и неспецифической  $\omega$ -амидазы:

\* В указанных синтетазных реакциях участвует специфический класс ферментов - глутаминамидотрансферазы. Они содержат глутаминсвязывающий домен, содержащий консервативную АМК-последовательность и акцепторный домен с варибельной областью для связывания второго субстрата. По своему механизму действия эти ферменты близки к глутаминазе (см. далее), однако последняя не нуждается во втором субстрате.

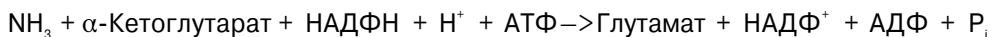
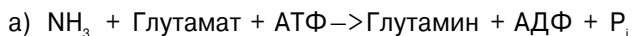


Таким образом, в реакции переноса участвует α-аминогруппа аспарагина, а не амидная группа, как предполагали раньше; в то же время амидная группа промежуточного соединения α-кетосукцинамовой кислоты в дальнейшем освобождается в процессе гидролиза в виде аммиака. Трансаминирование – обратимый процесс, поэтому лимитирующими факторами в синтезе аспарагина (и глутамина) являются ω-амиды оксалоацетата и α-кетоглутаровой кислоты, синтез которых в животных тканях пока не доказан.

Глутаминовая кислота является одним из немногих соединений, помимо глюкозы, которые служат энергетическим материалом для ткани мозга. Ранее была отмечена высокая активность в ткани мозга глутаматдекарбоксилазы, катализирующей превращение глутамата в γ-аминомасляную кислоту (ГАМК). Дальнейшее последовательное окисление ГАМК включает трансаминирование с образованием полуальдегида янтарной кислоты, окисление в янтарную кислоту и, наконец, окисление через ЦТК.

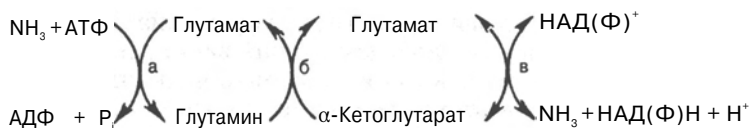
В обеих реакциях (декарбоксилирование глутамата и трансаминирование ГАМК) участвует пиридоксальфосфат, который оказался более прочно связанным с ГАМК-трансаминазой. ГАМК оказывает тормозящий эффект на синаптическую передачу в ЦНС, поэтому судорожные явления, наблюдаемые при недостаточности витамина B<sub>6</sub>, могут быть связаны со снижением образования ГАМК в глутаматдекарбоксилазной реакции. У животных судороги могут быть вызваны также введением изоиазида, который связывает альдегидную группу кофермента или антивитаминов B<sub>6</sub>, в частности метоксипиридоксина. ГАМК – естественно встречающийся «транквилизатор», поэтому одним из путей повышения ее концентрации в ЦНС является введение веществ, оказывающих тормозящее действие на ГАМК-трансаминазу, которая эффективно устраняет 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:



Первую стадию (а) катализирует глутаминсинтетаза, которая имеется в клетках животных, вторую (б) – глутаматсинтаза, открытая только у растений, грибов и микроорганизмов. Обе стадии могут быть представлены

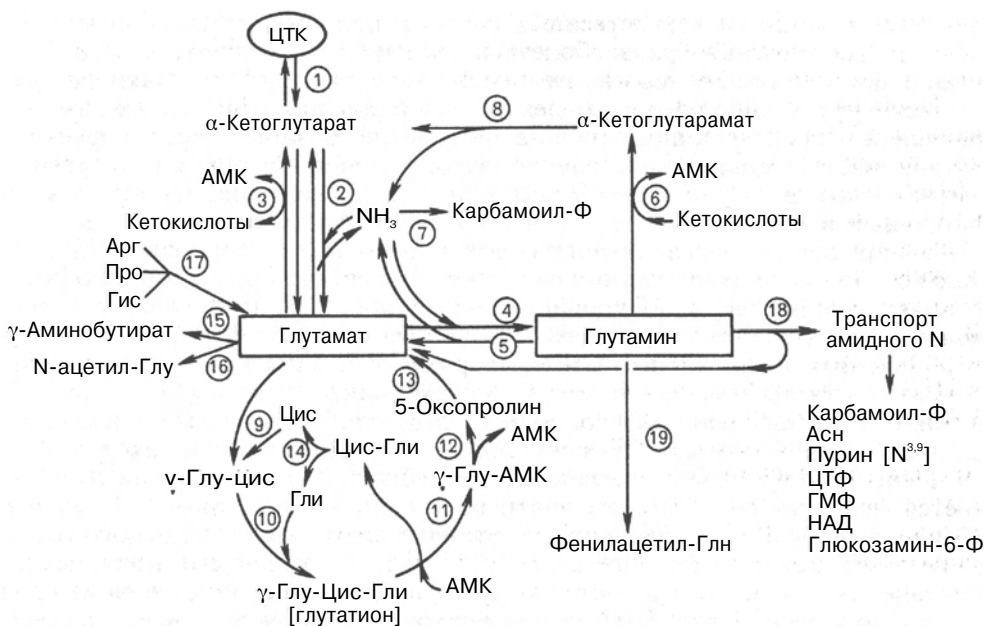
вместе с обратимо действующей глутаматдегидрогеназной реакцией (в) в виде следующей схемы:



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.

В сводной схеме обобщены главные интегративные пути превращения глутамина и глутаминовой кислоты и приведены названия ферментов, катализирующих эти реакции в тканях (рис. 12.9).

С метаболизмом глутаминовой кислоты связаны также пути обмена пролина и аргинина (см. рис. 12.9), хотя следует напомнить, что аргинин относится к частично незаменимым аминокислотам организма, особенно в молодом возрасте, когда его синтез из глутамата не может обеспечить потребности быстрого роста организма. Основным путем метаболизма



**Рис. 12.9.** Метаболические превращения глутамата и глутамина в тканях животных (схема по Майстеру).

1 - реакции цикла лимонной кислоты; 2 - глутаматдегидрогеназа; 3 - глутаматтрансаминаза; 4 - глутаминсинтетаза; 5 - глутаминаза; 6 - глутаминтрансаминаза; 7 - карбамоилфосфатсинтетаза (печень); 8 - ω-амидаза; 9 - γ-глутамилцистеинсинтетаза; 10 - глутатионсинтетаза; 11 - γ-глутамилтрансфераза; 12 - γ-глутамилциклоотрансфераза; 13 - 5-оксопролиназа; 14 - цистеинилглициназа; 15 - глутаматдекарбоксилаза; 16 - глутамат-N-ацетилаза; 17 - ферменты, катализирующие распад этих аминокислот; 18 - амидотрансферазы глутамина; 19 - глутамин-фенилацетилтрансфераза.

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 формиминоглутамат превращается в глутаминовую кислоту. Другие пути обмена гистидина (образование гистамина и окисление его под действием диаминоксидазы) были рассмотрены ранее.

## **ПАТОЛОГИЯ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА**

Азотистый обмен связан преимущественно с обменом белков, структурными единицами которых являются аминокислоты. Поэтому далее 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 в качестве лекарственных средств: например, метионин используется для лечения ряда болезней печени, глутаминовая кислота — некоторых поражений мозга, глутамин—кетонурии и т.д. Наконец, ряд аминокислот и продукты их декарбоксилирования (биогенные амины) оказывают регулирующее влияние на многие физиологические функции организма. Следовательно, знание закономерностей обмена отдельных аминокислот в норме и особенно при патологии представляет исключительный научно-теоретический и практический интерес.

О нарушении обмена аминокислот в целостном 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 приходится до 25% от общего количества аминокислот. Цереброспинальная 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 изменяется 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. Так, у больных с карциноидной



опухолью более 60% триптофана окисляется по серотониновому пути (в норме 1%); это, естественно, приводит к относительной недостаточности указанной аминокислоты. У больных со злокачественной меланомой тирозин и, возможно, фенилаланин расходуются преимущественно на биосинтез меланина. 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 гипопроотеинемии. У крыс отмечаются выпадение зубов, шерсти, помутнение роговицы и развитие катаракты, а у цыплят—увеличение потребности в витамине РР. 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. Исключение из пищи метионина ведет к жировому перерождению печени и почек, обусловленному 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 *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. 12.2). 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.

Одно из характерных нарушений азотистого обмена—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, гипопроотеинемии (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 *квашиоркоре*—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 нарушений 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, катализи-

рующих 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-оксиантраниловой и ксантуруеновой кислот. Последняя, по некоторым данным, оказывает токсическое действие на  $\beta$ -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. 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 некоторые болезни человека возникают вследствие 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 наличие аминокислот 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. 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, обусловленную увеличением концентрации всех или отдельных аминокислот в крови (см. главу 18).

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  $\beta$ -аминоасляной кислоты, и эта гипераминоацидурия считается неблагоприятным прогностическим признаком.

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 отличие от другого врожденного нарушения обмена—цистинурии, при которой всегда образуются цистиновые камни. Сущность дефекта реабсорбции аминокислот при цистинозе не выяснена.

*Цистинурия*—довольно распространенное наследственное заболевание. Метаболический дефект выражается в выделении с мочой в 50 раз больше нормы количества 4 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 обусловлена 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* (болезнь Вильсона), помимо генерализованной (общей) гипераминоацидурии, отмечаются снижение концентрации медьсодержащего белка церулоплазмينا в сыворотке крови и отложение меди в мозге, печени, почках. Генетический дефект связан с нарушением синтеза церулоплазмينا. Возможно образование комплексов меди с аминокислотами, которые не всасываются в канальцах. 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 таких заболеваниях обусловлено полным или частичным отсутствием активности определенных ферментов: организм либо теряет способность синтезировать данный фермент, либо образуется недостаточное количество его, либо синтезируется аномальный фермент, отличающийся по структуре от нативного. Следствием такого врожденного дефекта обмена является накопление в тканях 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 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. Приводим примеры подобных нарушений.

*Фенилкетонурия* (фенилпировиноградная олигофрения) развивается как результат потери способности организма синтезировать фенилаланин-4-монооксигеназу, катализирующую превращение фенилаланина в тирозин. Характерные особенности болезни—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 600 мг/л (в норме 15 мг/л), в цереброспинальной жидкости—80 мг/л (в норме 1,5 мг/л). Развитие болезни можно предотвратить, если значительно снизить 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, наблюдаются 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*—врожденное отсутствие 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 нормальное количество 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 аминокислот с разветвленной цепью—*болезни 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 о природе болезни (карциноидная опухоль, фенилкетонурия и др.) и о механизме нарушения обмена триптофана, что важно для постановки правильного диагноза и проведения адекватного лечения.

В ряде случаев вследствие блокирования действия какого-либо фермента имеет место резкое отставание умственного развития. 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 либо вторичными нарушениями энергетического и других видов обмена—окончательно не решен. Таким образом, 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 в ряде случаев играет решающую роль в диагностике и терапии этих болезней. Всегда следует учитывать, что при блокировании нормального пути обмена какой-либо аминокислоты промежуточные метаболиты, следующие за местом блокирования, становятся незаменимыми при данном заболевании.

# Глава 13

## 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 12. О нуклеиновых кислотах, их структуре и функциях в живых организмах в последнее время накоплен огромный фактический материал, подробно рассмотренный в ряде специальных руководств и монографий. Помимо уникальной 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. Далее детально рассматриваются (помимо краткого изложения вопросов переваривания) проблемы метаболизма нуклеиновых кислот и их производных, в частности пути биосинтеза и распада пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, современные представления о биогенезе ДНК и РНК и их роли в синтезе белка.

Переваривание нуклеопротеинов и всасывание продуктов их распада осуществляются в пищеварительном 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 происходит в тонкой кишке в основном гидролитическим путем под действием ДНК- и РНКазы панкреатического сока. Продуктами реакции при действии РНКазы являются пуриновые и пиримидиновые мононуклеотиды, смесь ди- и тринуклеотидов и резистентные к действию РНКазы олигонуклеотиды. В результате действия 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. Считают, что мононуклеотиды в кишечнике под действием неспецифических фосфатаз (кислой и щелочной), которые гидролизуют фосфоэфирную связь мононуклеотида («нуклеотидазное» действие), расщепляются с образованием нуклеозидов и фосфорной кислоты и в таком виде всасываются. Согласно второму предположению, мононуклеотиды всасываются, а распад их происходит 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 фосфолитическим, а не гидролитическим путем\*.

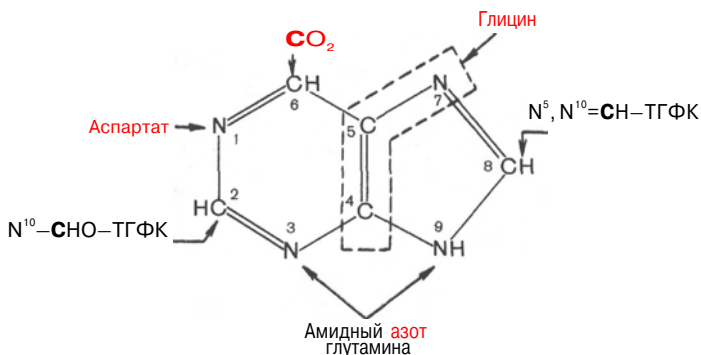
Всасываются преимущественно нуклеозиды, и в таком виде часть азотистых оснований может быть использована для синтеза нуклеиновых кислот организма. Если происходит дальнейший распад нуклеозидов до свободных пуриновых и пиримидиновых оснований, то гуанин не используется для синтетических целей. Другие основания, как показывают опыты с мечеными по азоту аденином и урацилом, в тканях 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 из трех компонентов. Источником рибозы и дезоксирибозы служат продукты превращения глюкозы в пентозофосфатном цикле. Пока не получены доказательства существенной роли 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  $^{15}\text{N}$ - и  $^{14}\text{C}$ -глицина,  $^{15}\text{N}$ -аспартата,  $^{15}\text{N}$ -глутамина и др., в пуриновое кольцо мочевой кислоты. Скармливая птицам эти и другие меченые соединения, Дж. Бьюкенен анализировал места включения метки в пуриновое кольцо; полученные данные были в дальнейшем уточнены и подтверждены рядом других исследователей. Результаты этих исследований можно представить в виде схемы:

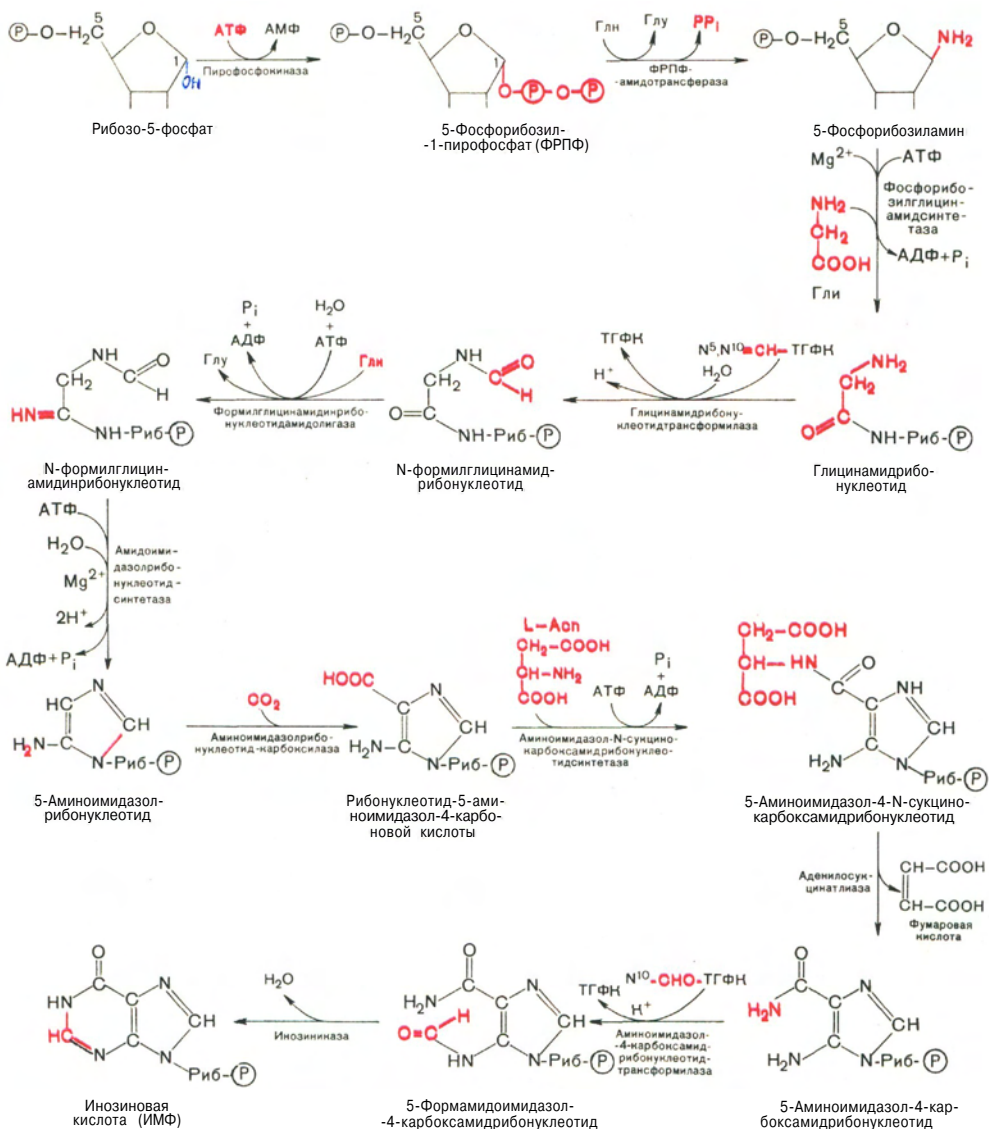
\* В животных тканях открыты специфические нуклеозидфосфорилазы, действующие на нуклеозиды.



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 глутамин, один атом азота (N-1) — из азота аспарагиновой кислоты; углеродный атом (C-2) происходит из углерода N<sup>10</sup>-формил-ТГФК, атом углерода в 8-м положении — из N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-метенил-ТГФК и, наконец, углерод C-6 имеет своим источником CO<sub>2</sub>.

В настоящее время благодаря исследованиям Дж. Бьюкенена, Дж. Гринберга, А. Корнберга и сотр. полностью расшифрована последовательность включения перечисленных веществ в пуриновое кольцо, установлена природа всех промежуточных соединений и ферментных систем, катализирующих химические реакции синтеза. 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, коферментов, источников энергии и других известных к настоящему времени кофакторов (см. с. 472).

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 пирофосфатная группа АТФ. Образовавшийся 5-фосфорибозил-1-пирофосфат (ФРПФ) взаимодействует с глутамином, являющимся донором NH<sub>2</sub>-группы, в результате чего образуется β-5-фосфорибозил-амин, причем в процессе реакции наряду с освобождением пирофосфата и свободной глутаминовой кислоты происходит изменение его 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<sub>2</sub>-группе β-5-фосфорибозил-амин (реакция нуждается в доставке энергии АТФ) с образованием глицинамидрибонуклеотида. Затем, на следующей стадии, цепь удлиняется за счет присоединения формильной группы из N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-метенил-ТГФК с образованием формилглицинамидрибонуклеотида. На формильную группу последнего переносится далее амидная группа глутамин и синтезируется формилглицинамидрибонуклеотид (реакция также идет с потреблением энергии АТФ). На следующей стадии замыкается пятичленное имидазольное кольцо и образуется 5-аминоимидазолрибонуклеотид, который способен акцептировать CO<sub>2</sub> с образованием рибонуклеотида 5-аминоимидазол-4-карбоновой кислоты.

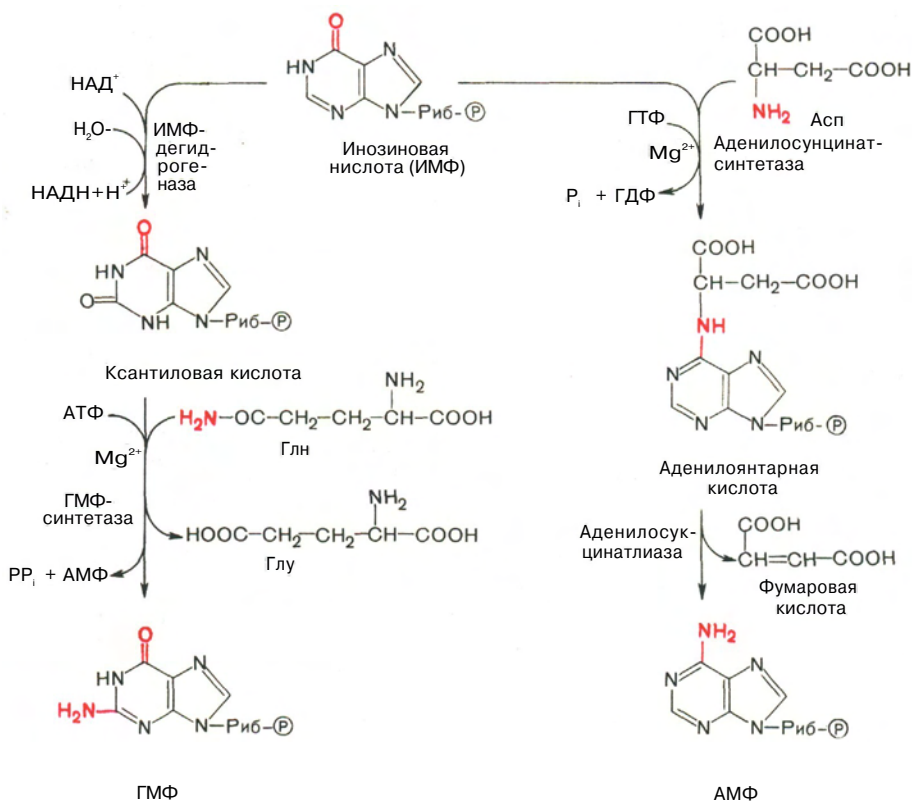


В последующем двухступенчатом процессе, в котором участвуют аспарагиновая кислота и АТФ, образуется 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотид и освобождается фумаровая кислота. В этих реакциях азот аспарагиновой кислоты включается в 1-е положение будущего пуринового ядра. Последний углеродный атом пиримидинового остатка кольца пурина вводится в виде формильного остатка (источник N<sup>10</sup>-формил-ТГФК), который присоединяется к 5-NH<sub>2</sub>-группе. После этого отщепляется молекула воды и второе кольцо замыкается. В результате образуется первый пуриновый нуклеотид—инозиновая кислота (ИМФ), которая является предшественником пуриновых нуклеотидов в составе нуклеиновых кислот.

АМФ и ГМФ образуются из ИМФ, причем в синтезе обоих мононуклеотидов участвуют по два фермента, различных по своему механизму

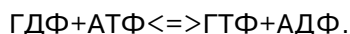
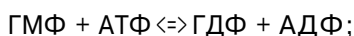


действия. Образование ГМФ из ИМФ катализируют ИМФ-дегидрогеназа и ГМФ-синтаза, а образование АМФ из того же предшественника катализируется последовательным действием аденилосукцинатсинтетазы и аденилосукцинат-лиазы. Механизм двухэтапного синтеза АМФ и ГМФ можно представить в виде химических реакций.



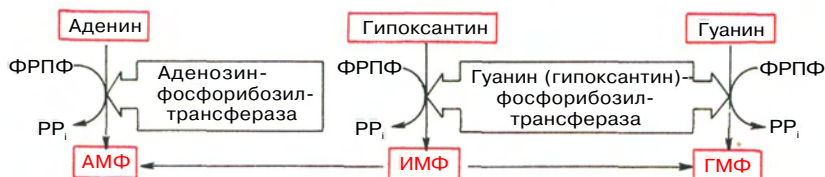
В ферментативном синтезе АМФ из ИМФ специфическое участие принимает аспарагиновая кислота, являющаяся донором  $\text{NH}_2$ -группы, и ГТФ в качестве источника энергии; промежуточным продуктом реакции является аденилоянтарная кислота. Биосинтез ГМФ, напротив, начинается с дегидрогеназной реакции ИМФ с образованием ксантиловой кислоты; в аминировании последней используется только амидный азот глутамина.

Превращение АМФ и ГМФ в соответствующие нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфаты также протекает в 2 стадии при участии специфических нуклеозидмонофосфат- и нуклеозиддифосфаткиназ\*:



\* Следует напомнить, что основным механизмом синтеза самого АТФ из АДФ и неорганического фосфата в живых организмах является окислительное фосфорилирование (см. главу 9).

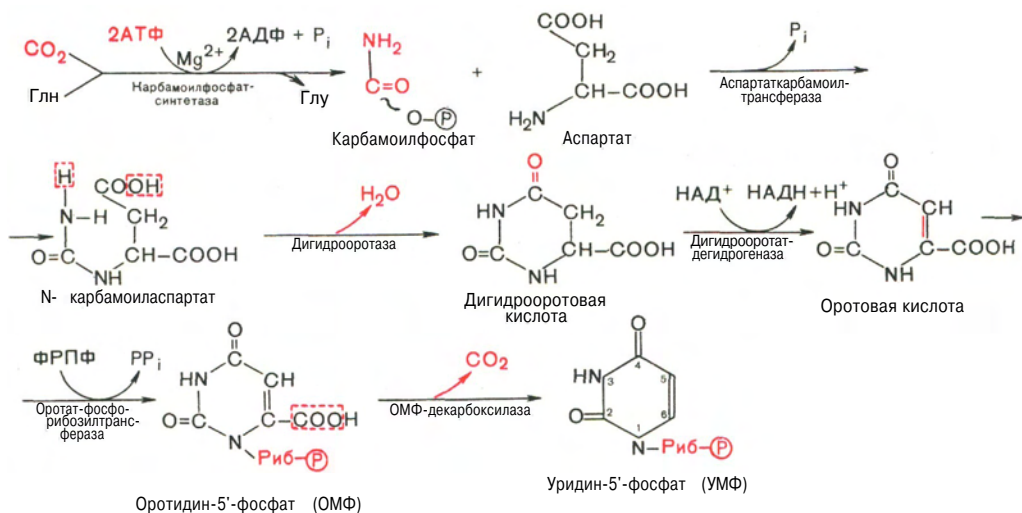
Следует указать на существование в клетках весьма тонкого механизма регуляции синтеза пуриновых нуклеотидов. Синтез их тормозится конечными продуктами по принципу обратной связи, т.е. ингибированием первой стадии переноса аминогруппы глутамина на ФРПФ. Фермент, катализирующий эту стадию, оказался аллостерическим регуляторным ферментом. Вторая особенность механизма регуляции заключается в том, что избыток ГМФ в клетках оказывает аллостерическое торможение только на свой собственный синтез, не влияя на синтез АМФ, и, наоборот, накопление АМФ подавляет свой синтез, не ингибируя синтеза ГМФ.



## Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов

Механизм синтеза пиримидиновых нуклеотидов почти полностью расшифрован благодаря исследованиям П. Рейхарда. Показано, что в клетках животных и в микроорганизмах конечными продуктами синтеза также не являются свободные пиримидиновые основания и остаток рибозы присоединяется к уже сформированному пиримидиновому кольцу. Синтез начинается с элементарных уровней ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , аспартат), и специфическую ключевую роль выполняет оротовая кислота.

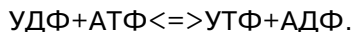
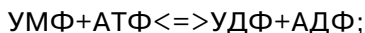
Последовательность химических реакций синтеза пиримидиновых нуклеотидов, в частности УМФ, можно представить в следующем виде:



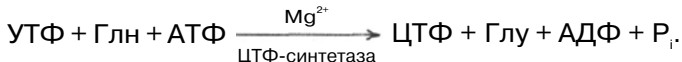
Как видно, I стадия синтеза УМФ включает катализируемое цитоплазматической карбамоилфосфатсинтетазой образование карбамоилфосфата из глутамин (см. главу 12).

На II стадии карбамоилфосфат реагирует с аспаратом, в результате чего образуется N-карбамоиласпарагиновая кислота. 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 дигидрооротатдегидрогеназа. Оротовая кислота обратно реагирует с ФРПФ, являющимся донатором рибозо-фосфата, с образованием оротидин-5'-фосфата (ОМФ). Декарбоксилирование последнего приводит к образованию первого пиримидинового нуклеотида—уридин-5-фосфата (УМФ).

Превращение УМФ в УДФ и УТФ осуществляется, как и пуриновых нуклеотидов, путем фосфотрансферных реакций:



**Биосинтез цитидиловых нуклеотидов.** Предшественником цитидиловых нуклеотидов является УТФ, который превращается в ЦТФ:

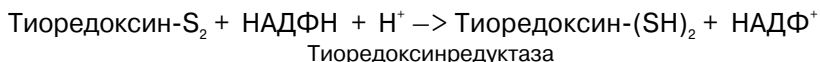
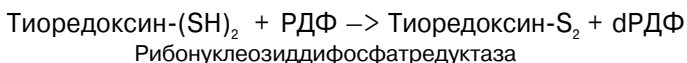


У прокариот в этой реакции используется преимущественно свободный аммиак, в то время как в клетках животных ЦТФ-синтетаза катализирует включение амидной группы глутамина в 4-е положение пиримидинового кольца УТФ. Следует отметить, что образующийся ЦТФ служит отрицательным эффектором регуляторного аллостерического фермента аспартаткарбамоилтрансферазы, ингибируя по типу обратной связи начальную стадию биосинтеза пиридиновых нуклеотидов. АТФ предотвращает это ингибирование.

**Биосинтез тимидиловых нуклеотидов.** Тимидиловые нуклеотиды входят в состав ДНК, содержащей дезоксирибозу. Поэтому сначала рассмотрим 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 4 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, требующему наличия двух атомов водорода. Непосредственным источником последних оказался восстановленный термостабильный белок тиоредоксин, 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 (мол. масса 68000), требующая наличия восстановленного НАДФН. Обозначив

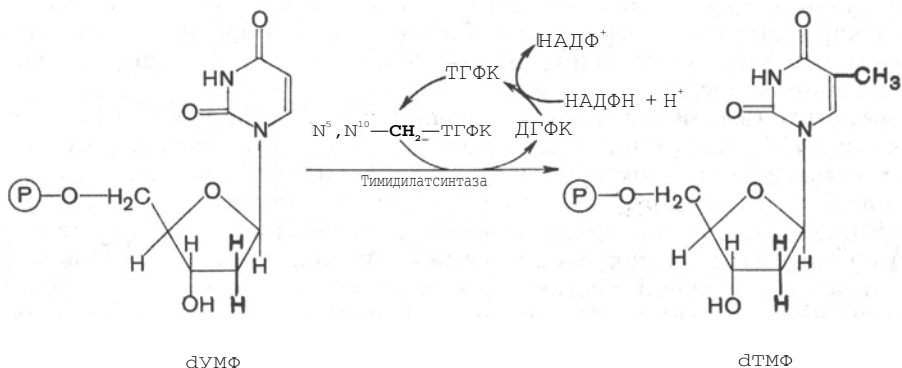
условно рибонуклеозиддифосфат РДФ, образование дезоксирибонуклеотидов можно представить следующим образом:



Обе стадии могут быть представлены в виде схемы:



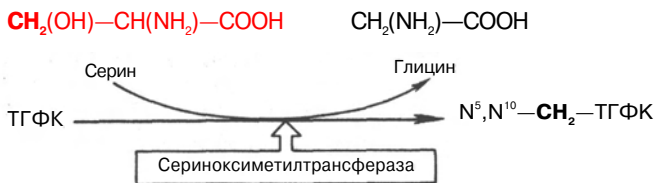
Для синтеза тимидиловых нуклеотидов, помимо дезоксирибозы, требуется также метилированное производное урацила — тимин. Оказалось, что в клетках имеется особый фермент тимидилатсинтаза, катализирующая метилирование не свободного урацила, а dУМФ; реакция протекает по уравнению:



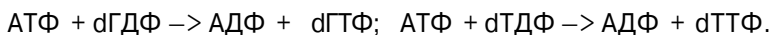
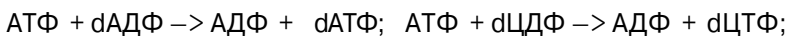
Донором метильной группы в тимидилатсинтазной реакции является  $N^5, N^{10}$ -метилен-ТГФК, которая одновременно отдает и водородный протон, поэтому одним из конечных продуктов реакции является не тетрагидро-, а дигидрофолиевая кислота (ДГФК). Последняя вновь восстанавливается до ТГФК под действием НАДФН-зависимой дигидрофолатредуктазы. Из образовавшегося ТМФ путем фосфотрансферазных реакций образуются dТДФ и dТГФ.

Регенерация  $N^5, N^{10}$ - $\text{CH}_2$ -ТГФК, собственно ее биосинтез, представляет определенный интерес. Оказалось, что этот синтез требует участия

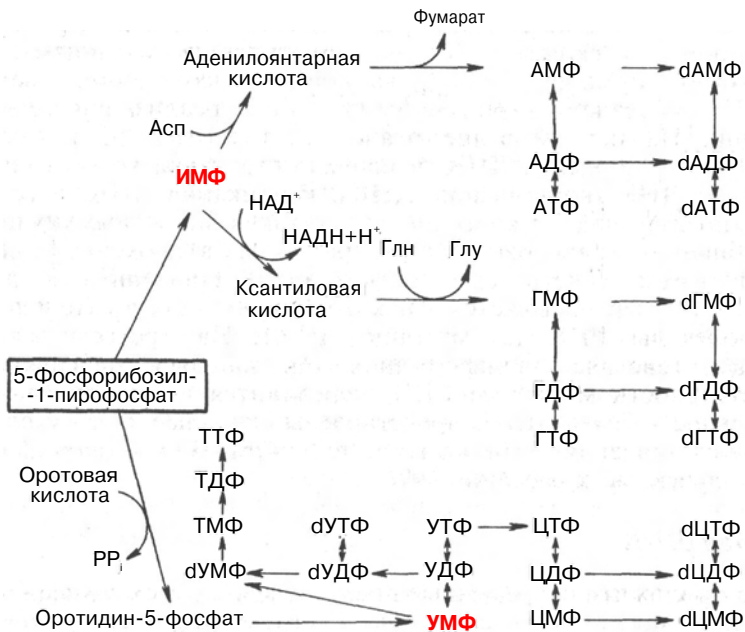
аминокислоты серина (донатор метильной группы) и пиридоксальфосфат-содержащего фермента сериноксиметилтрансферазы в соответствии с уравнением:

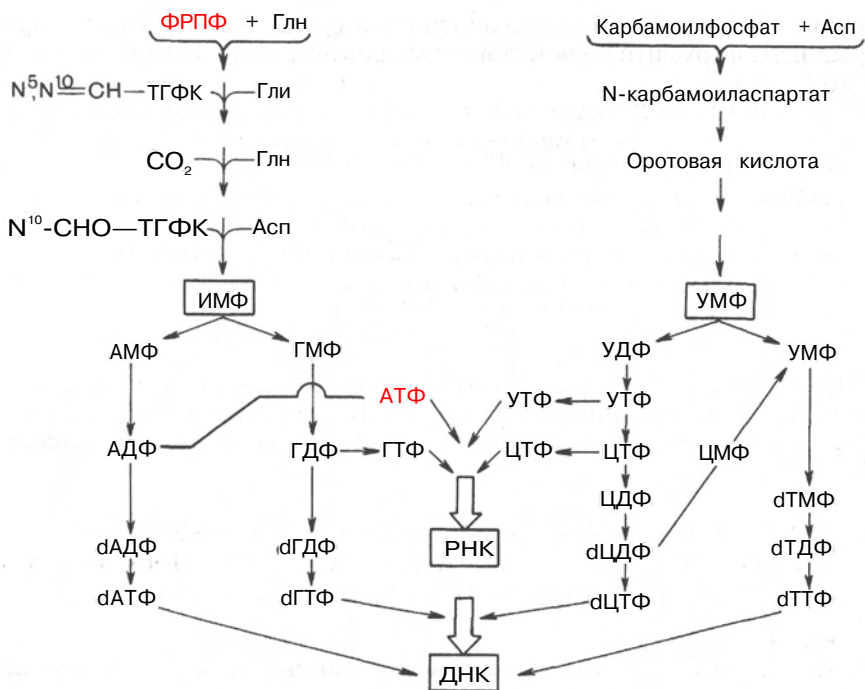


Синтез всех остальных дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов, непосредственно участвующих в синтезе ДНК, также осуществляется путем фосфорилирования дезоксирибонуклеозид-5'-дифосфатов в присутствии АТФ:



Далее на двух схемах суммированы данные о взаимопревращениях пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, а также о связи их с синтезом нуклеиновых кислот. Как видно из схем, 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 отметить 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, закодированной в нуклеотидной последовательности ДНК. Различают три основных этапа реализации генетической информации. На первом этапе—этапе 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 (синтез молекулы РНК на матрице ДНК). На третьем этапе—этапе трансляции генетическая информация, содержащаяся уже в нуклеотидной последовательности молекулы РНК, переводится в аминокислотную последовательность белка. Далее представлены основные итоги исследований и наши представления о биосинтезе полимерных молекул ДНК, РНК и белка, полученные к середине 1996 г.

## Биосинтез ДНК

Прежде чем изложить современные представления о механизме биосинтеза ДНК, следует представить сведения о синтезе этого соединения в бес-

клеточной системе, которыми располагает биохимия. Известно, что для любого синтеза полимерной органической молекулы, осуществляемого *in vitro* или *in vivo*, требуется энергия. Источником энергии в реакциях полимеризации мононуклеотидов является энергия, освобождаемая всеми четырьмя типами дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, участвующих в синтезе ДНК. Образующийся пирофосфат под действием пирофосфатазы также расщепляется на две молекулы ортофосфата, давая дополнительную энергию для биосинтеза ДНК.

Помимо энергии, биогенез ДНК требует наличия специфических ферментов, катализирующих отдельные этапы синтеза, и множества белковых факторов, абсолютно необходимых для регулирования процесса репликации и проявления каталитической активности ферментов.

Ферментные системы синтеза ДНК у про- и эукариот до конца не выяснены. По имеющимся данным, 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 (терминация) процесса, участвует более 40 ферментов и белковых факторов, объединенных в единую **ДНК-репликационную систему**, называемую **реплисомой**.

После открытия в 1958 г. А. Корнбергом у *E. coli* фермента, катализирующего биосинтез ДНК и названного ДНК-полимеразой I, в течение почти 10 лет считалось, что этот фермент является единственной полимеразой, принимающей участие в репликации ДНК *in vitro*\*. 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 участие нескольких ферментов. ДНК-полимераза I не наделена способностью инициировать синтез цепей ДНК *de novo*. Одним из хорошо изученных ферментов, участвующих в стадии инициации репликации ДНК, является специфическая клеточная РНК-полимераза, названная праймазой, которая катализирует синтез короткого олигорибонуклеотида (от 10 до 60 нуклеотидов), т.е. праймера, с которого затем начинается синтез ДНК. Праймазы различаются как по структуре, так и по специфичности действия. Получены новые данные о существенной роли праймасомы в каталитическом действии фермента. Праймасома представлена ансамблем из 7 различных субъединиц, включающих около 20 полипептидов общей мол. массой 70000. При помощи белка  $\eta'$  праймасома подвергается быстрому перемещению к отстающей цепи ДНК за счет энергии, генерируемой АТФазной активностью белка  $\eta'$ . В состав праймасомы входит также комплекс белков  $\text{dna B}$  и  $\text{dna C}$ , который вблизи репликационной вилки периодически участвует в формировании специфической вторичной структуры ДНК, подходящей для узнавания праймазой.

Основным ферментом, катализирующим биосинтез новообразованной ДНК (точнее, стадию элонгации репликации ДНК), является ДНК-полимераза III, представляющая собой мультимерный комплекс собственно ДНК-полимеразы (мол. масса около 900000) и ряда других белков. ДНК-полимераза III из *E. coli* состоит минимум из 10 субъединиц. Одна из них —  $\beta$ -субъединица получена в кристаллическом виде, и выяснена ее третичная структура. Имеются доказательства, что в димерной форме

\* За выдающийся вклад в решение проблем биосинтеза ДНК и РНК А. Корнберг и С. Очоа были удостоены Нобелевской премии в 1959 г.

ДНК-полимераза III катализирует сопряженный синтез ведущей (лидирующей) и отстающей цепей ДНК при репликации (см. далее). Более точно выяснена также роль ДНК-полимеразы I: она катализирует отщепление затравочного олигорибонуклеотидного праймера и заполнение образующихся после этого пробелов (ниш) дезоксирибонуклеотидами. Известно, что ДНК-полимераза II из *E. coli* (мол. масса 88000) выполняет «ремонтные» функции, исправляя повреждения цепей ДНК. Укажем также, что ДНК-полимераза I в качестве матрицы использует одноцепочечные участки, в то время как ДНК-полимераза III — двухцепочечные ДНК, в которых имеются короткие одноцепочечные последовательности.

Важную функцию соединения двух цепей ДНК или замыкания двух концов одной цепи ДНК в процессе репликации либо 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 репликационнойвилке, происходящего за счет энергии гидролиза АТФ, выполняет специфический гер-белок, названный хеликазой (мол. масса 300000). Образовавшиеся на определенное 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 (мол. масса 75600). В связи с этим их иногда называют дестабилизирующими двойную спираль белками. Имеются, кроме того, особые ферменты топоизомеразы (у прокариот одна из них названа ДНК-гиразой), которые играют особую роль в сверхспирализации, обеспечивая как репликацию, так и транскрипцию ДНК. Эти ферменты наделены способностью не только создавать супервитки, но и уничтожать суперспирализацию путем сшивания образующихся разрывов или разрезания ДНК. 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 излучение, УФ-лучи, химический мутагенез и др.).

Из клеток животных выделено несколько ДНК-полимераз, и в разных лабораториях они получили различные наименования.

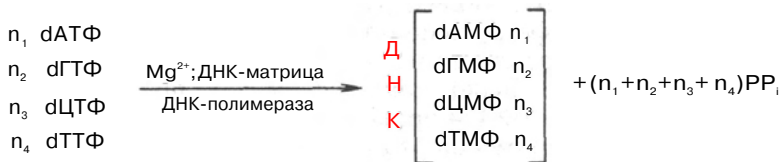
К настоящему времени у эукариот, как и у бактерий (см. ранее), открыто несколько ДНК-полимераз. В репликации ДНК эукариот участвуют два главных типа полимераз —  $\alpha$  и  $\delta$ . Показано, что ДНК-полимераза  $\alpha$  состоит из 4 субъединиц и является идентичной по структуре и свойствам во всех клетках млекопитающих, причем одна из субъединиц оказалась наделенной праймазной активностью. Самая крупная субъединица ДНК-полимеразы  $\alpha$  (мол. масса 180000) катализирует реакцию полимеризации, преимущественно синтез отстающей цепи ДНК, являясь составной частью праймасомы. ДНК-полимераза  $\delta$  состоит из 2 субъединиц и преимущественно катализирует синтез ведущей цепи ДНК (см. далее). Открыта также ДНК-полимераза  $\epsilon$ , которая в ряде случаев заменяет  $\delta$ -фермент, в частности при репарации ДНК (исправление нарушений ДНК, вызванных ошибками репликации или повреждающими агентами). Следует отметить, что в эукариотических клетках открыты два белковых фактора репликации, обозначаемых RFA и RFC. Фактор репликации A выполняет функцию белка — связывание одноцепочечной ДНК (наподобие белковых факторов связывания разъединенных цепей ДНК при



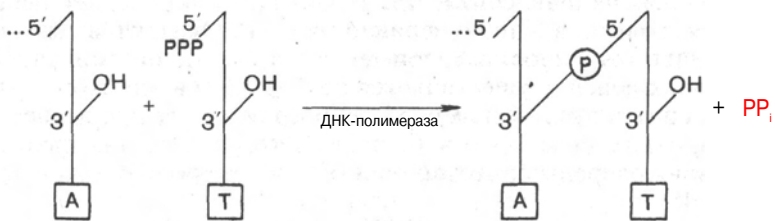
репликации у *E. coli*), фактор С—функцию стабилизатора всего репликационного комплекса.

В генетической инженерии с целью получения белков в достаточных количествах и с заданными свойствами (например, для генотерапии наследственных и соматических болезней) широкое применение получили эндонуклеазы рестриктазы, катализирующие расщепление молекулы двухцепочечной ДНК по специфическим нуклеотидным последовательностям внутри цепи. Рестриктазы узнают определенные 4–7-членные последовательности, вызывая, таким образом, разрывы в определенных сайтах цепи ДНК. При этом образуются не случайные последовательности, а фрагменты ДНК строго определенной структуры с липкими концами (рекомбинантные ДНК), используемые далее для конструирования гибридных молекул и получения генно-инженерной, биотехнологической продукции (например, инсулина, гормона роста, интерферона, вакцин против вируса гепатита В, СПИДа и др.).

**Общий механизм синтеза ДНК.** Основываясь на данных о двухспиральной антипараллельной структуре, химическом составе ДНК (см. главу 3) и значении «активированной» формы энергии для биосинтеза полимерных молекул, А. Корнберг еще в 1955 г. 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:

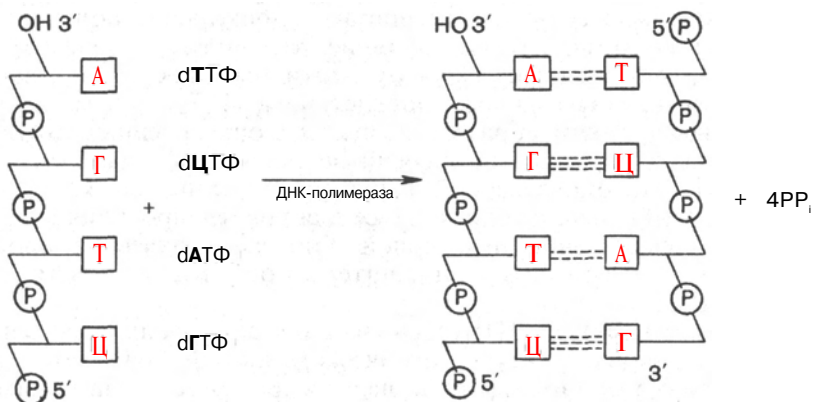


Химический смысл полимеризации состоит в том, что свободная 3'-гидроксильная группа матрицы атакует α-фосфатную группу соответствующего присоединяемого нуклеозидтрифосфата (определяется природой азотистого основания затравки), при этом происходят отщепление остатка пиррофосфата и образование фосфодиэфирной связи. Далее свободный 3'-гидроксил вновь присоединенного нуклеотида атакует α-фосфатную группу следующего нуклеозидтрифосфата, и таким путем продолжается процесс полимеризации, идущий в направлении 5'→3', антипараллельно матрице, оканчивающейся 5'-фосфатом:



Реакция требует присутствия одноцепочечной ДНК или в крайнем случае небольшого полидезоксирибонуклеотида. В деталях выяснено значение преобразованной ДНК в механизмах действия ДНК-полимераз:

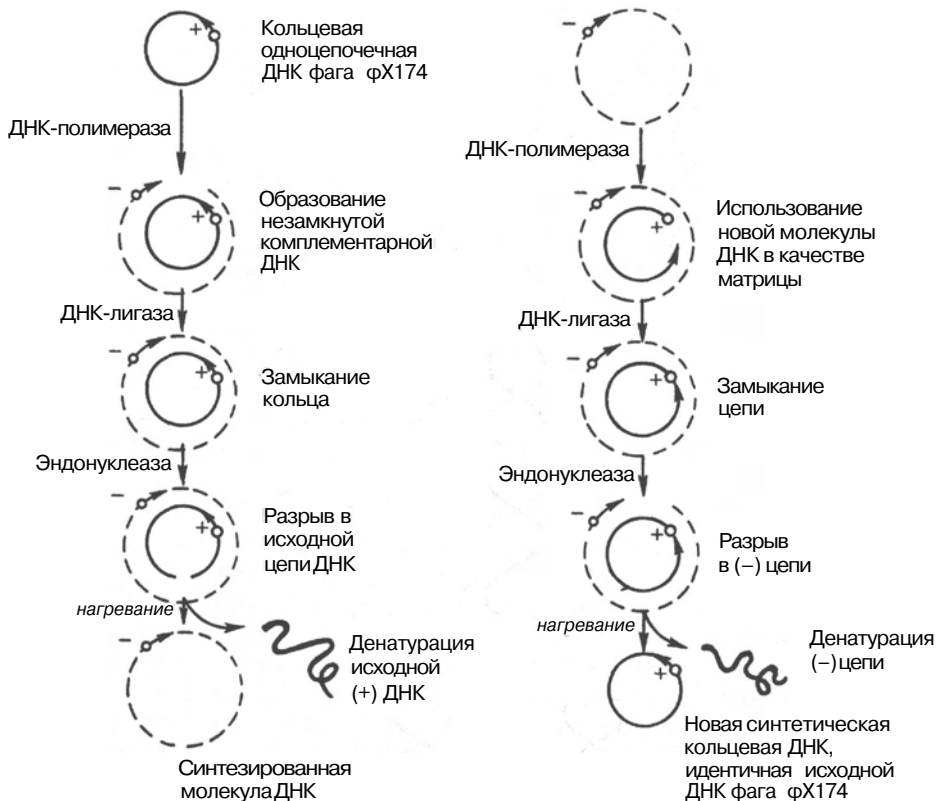
ДНК служит не только затравкой, но и матрицей, на которой фермент комплементарно и антипараллельно синтезирует дочернюю цепь ДНК. Это можно представить в виде схемы:



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, обладающую способностью катализировать соединение (сшивку) концов разрывов в молекуле ДНК. Было показано, что в процессе репликации одноцепочечная ДНК фага (φX174 проходит стадию образования двухцепочечной кольцевой ДНК. Применяв 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. 13.1). 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. 13.2; 13.3).

Сложность процесса репликации ДНК объясняется тем, что обе цепи реплицируются одновременно, хотя имеют разное направление (5'→3' и 3'→5'); кроме того, рост дочерних цепей также должен происходить в противоположных направлениях. Элонгация каждой дочерней цепи может осуществляться только в направлении 5'→3'. Р. Оказаки высказал предположение, подтвержденное экспериментальными данными, что синтез одной из дочерних цепей осуществляется непрерывно в одном направлении, в то время как синтез другой дочерней цепи происходит прерывисто, путем соединения коротких фрагментов (в честь автора названы фрагментами Оказаки), в свою очередь синтезирующихся в противоположном направлении (рис. 13.4).

Как видно, синтез ведущей цепи ДНК идет всегда в направлении 5'→3', соответствующем направлению движения репликационной вилки. Сохраняя правило синтеза дочерних молекул ДНК 5'→3', синтез на второй цепи родительской ДНК идет в направлении, противоположном движению репликационной вилки. В зависимости от типа клетки фрагменты Оказаки

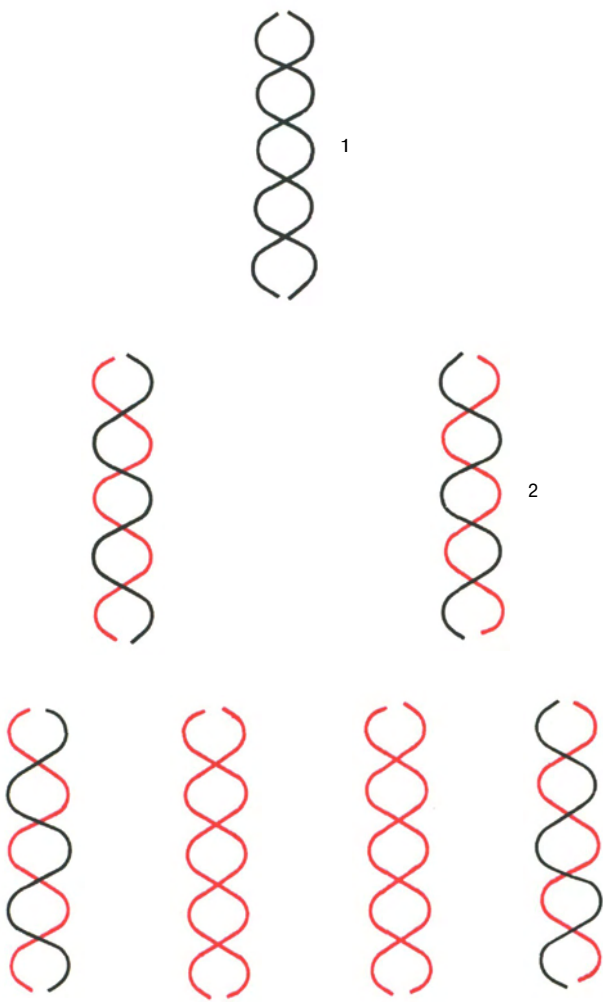


**Рис. 13.1.** Роль ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы в синтезе кольцевой одноцепочечной ДНК фага φX174.

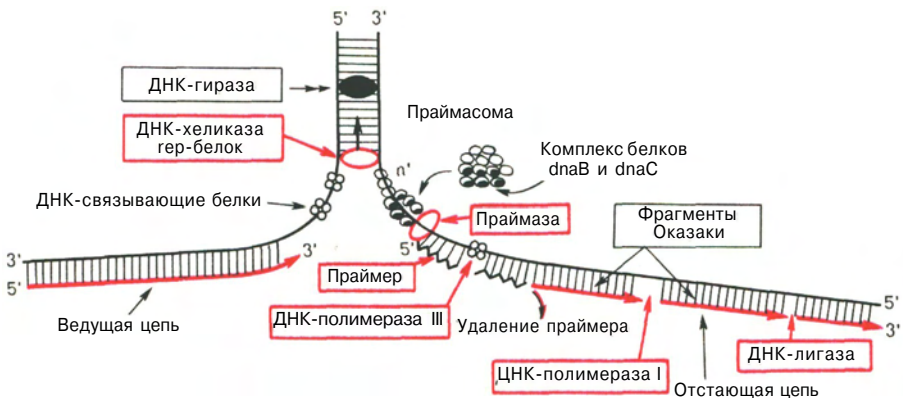
имеют разные размеры—от нескольких сот до нескольких тысяч нуклеотидов (150–200 у эукариот и 1000–2000 у бактерий).

Получены доказательства, что образование каждого фрагмента Оказаки требует наличия короткого затравочного комплементарного праймера — участка РНК, синтез которого катализируется праймазой. Затем при участии ДНК-полимеразы III синтезируются длинные участки ДНК. РНК-затравки далее вырезаются при участии ДНК-полимеразы I, а свободные места их (брешы) замещаются (достраиваются) комплементарными дезоксирибонуклеотидами под действием той же ДНК-полимеразы I; наконец, сшивание разъединенных участков отстающей цепи 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.

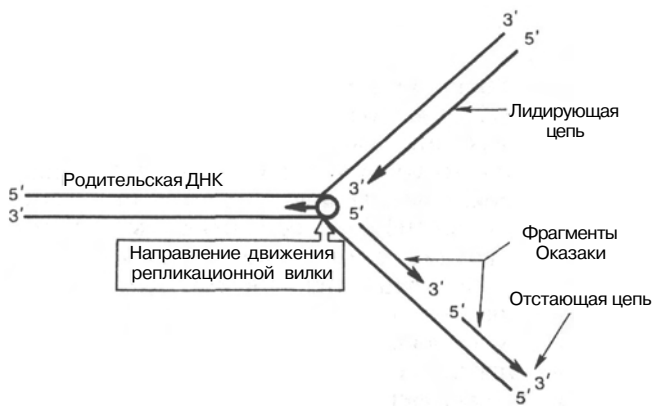
**Особенности репликации ДНК у эукариот.** Репликация ДНК у эукариот, по существу аналогичная репликации ДНК у прокариот, имеет ряд особенностей. Например, вместо одной точки репликации в ДНК эукариот имеются специфические точки «начала», так называемые автономно реплицирующие последовательности (около 300 нуклеотидных пар); в дрожжевой клетке таких элементов около 400. Кроме того, скорость движения репликационной вилки у эукариот (примерно 50 нуклеотидов



**Рис. 13.2.** Полуконсервативная репликация ДНК *in vitro*. 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).



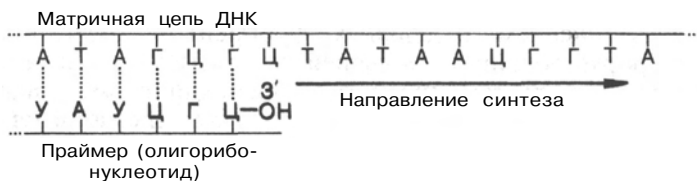
**Рис. 13.3.** Основные этапы репликации ДНК (схема).



**Рис. 13.4.** Схематическое изображение непрерывного и прерывистого синтеза цепей ДНК при репликации.

в секунду) почти в 10 раз ниже, чем у *E. coli*. Для репликации ДНК генома человека из одной-единственной точки с подобной скоростью потребовалось бы более 500 ч; вместо этого репликация генома человека происходит в обоих направлениях и одновременно из множества точек (множество «начал» репликации), вовлекая от 30000 до 330000 пар оснований. Репликация продолжается до тех пор, пока не будут синтезированы две дочерние молекулы ДНК, в каждой из которых содержится одна родительская цепь (см. рис. 13.4). Таким образом, множественность точек «начала» репликации ДНК, вероятнее всего, является общим правилом для всех клеток эукариот.

Как было указано, 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 короткий олигорибонуклеотид синтезируется комплементарно на матрице ДНК при участии особого фермента — праймазы, наделенной РНК-полимеразной активностью.



Предполагают, что именно с этой точки концевой 3'-гидроксила рибозы праймера начинается истинный синтез лидирующей дочерней цепи ДНК, комплементарной родительской. Синтез начинается с реакции между 3'-ОН-группой концевой рибонуклеотида праймера и  $\alpha$ -фосфатной группой первого дезоксирибонуклеотидтрифосфата в строгом соответствии с комплементарностью родительской цепи ДНК, при этом освобождается пирофосфат. В дальнейшем этот фрагмент РНК, комплементарно присоединенный к новообразованной цепи ДНК, разрушается под действием ДНК-полимеразы I, 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 ранее ферментов и белковых факторов, однако детали некоторых этапов этого синтеза еще не выяснены. Основываясь главным образом на данных, полученных в опытах *in vitro*, предполагают, что условно механизм синтеза ДНК у *E. coli* может быть подразделен на три этапа; инициацию, т.е. начало, элонгацию, т.е. продолжение, и терминацию, т.е. завершение (прекращение) синтеза. Каждый из этих этапов требует участия специфических ферментов и белковых факторов.

Этап I—инициация биосинтеза ДНК—является началом синтеза дочерних нуклеотидных цепей; в инициации участвует минимум восемь хорошо изученных и разных ферментов и белков. Первая фаза—это, как указано ранее, ферментативный биосинтез на матрице ДНК необычного затравочного олигорибонуклеотида (праймера) со свободной гидроксильной группой у С-3' рибозы. При инициации к цепям ДНК последовательно присоединяются ДНК-раскручивающие и ДНК-связывающие белки, а затем комплексы ДНК-полимераз и праймаз (см. рис. 13.3). Инициация представляется единственной стадией репликации ДНК, которая весьма тонко и точно регулируется, однако детальные механизмы ее до сих пор не раскрыты и в настоящее время интенсивно исследуются.

Этап II — элонгация синтеза ДНК—включает два кажущихся одинаковыми, но резко различающихся по механизму синтеза лидирующей и отстающей цепей на обеих материнских цепях ДНК. Синтез лидирующей цепи начинается с синтеза праймера (при участии праймазы) у точки начала репликации, затем к праймеру присоединяются дезоксирибонуклеотиды под действием ДНК-полимеразы III; далее синтез протекает непрерывно, следуя шагу репликационной вилки. Синтез отстающей цепи, напротив, протекает в направлении, обратном движению репликационной вилки и начинается фрагментарно. Фрагменты всякий раз синтезируются отдельно, начиная с синтеза праймера, который может переноситься с готового фрагмента при помощи одного из белковых факторов репликации в точку старта биосинтеза последующего фрагмента противоположно направлению синтеза фрагментов. Элонгация завершается отделением олигорибонуклеотидных праймеров, объединением отдельных фрагментов ДНК при помощи ДНК-лигаз и формированием дочерней цепи ДНК. Нельзя исключить, однако, возможности сопряженного и согласованного механизма синтеза лидирующей и отстающей цепей ДНК при участии полимераз и всего комплекса праймасом.

Этап III — 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.

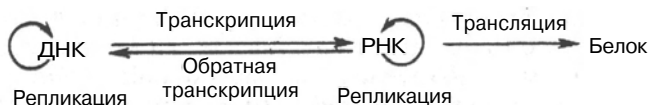
**Синтез ДНК на матрице РНК.** Выдающимся достижением биохимии нуклеиновых кислот является открытие в составе онковирусов (вирус Раушера и саркомы Рауса) фермента обратной транскриптазы, или ревертазы (РНК-зависимая ДНК-полимераза), катализирующего биосинтез молекулы ДНК на матрице РНК. Накоплены данные о том, что многие РНК-содержащие онкогенные вирусы, получившие наименование онкорнавирусов, содержат ревертазу в составе покровных белков. Фермент открыт также во многих клетках прокариотов и эукариотов, в частности

в лейкозных клетках, пролиферирующих тканях, включая эмбриональные ткани. Ревертаза онкорнавирусов содержит ионы  $Zn^{2+}$  и активируется катионами  $Mn^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ . Предполагают, что синтез ДНК на матрице РНК происходит в 3 этапа. На I этапе фермент ревертаза синтезирует на матрице вирусной РНК комплементарную цепь ДНК, что приводит к формированию гибридной молекулы. Второй этап – разрушение исходной вирусной РНК из комплекса гибридной молекулы под действием РНКазы. Наконец, на III этапе на матрице цепи ДНК комплементарно синтезируются новые цепи ДНК. Ревертазой активностью обладают и ДНК-полимеразы: например, фермент из *E. coli* способен 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):

ДНК → РНК → Белок.

В настоящее время можно дополнить эту основную схему передачи генетической информации в живой клетке и представить ее в более полной форме:



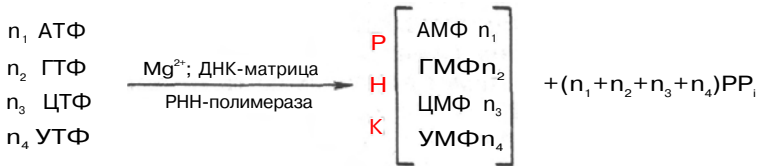
На схеме стрелки вокруг ДНК и РНК указывают на возможность молекул копировать самих себя в живых системах при участии соответствующих ферментов. Как знать, не станем ли мы свидетелями открытия принципиальной возможности поворота стрелки и на следующей стадии – от белка на РНК, что могло происходить на Земле при зарождении первичных живых существ?

## Биосинтез РНК

Поток генетической информации называется **экспрессией генов**. Он 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. Транскрипция, несмотря на кажущуюся схожесть с репликацией, в частности химическим механизмом, направлением синтеза и использованием матрицы, отличается рядом особенностей: не требует синтеза праймера, использует не всю молекулу ДНК, а только ее отдельные короткие сегменты (отдельные гены или группы генов) и, наконец, требует наличия только одной из цепей ДНК в качестве матрицы, которая полностью сохраняется (при репликации ДНК она сохраняется наполовину). Геном каждой клетки человека состоит из  $3,5 \cdot 10^9$

пар оснований; они могут обеспечить кодирование более  $1,5 \cdot 10^6$  пар генов. Однако имеющиеся данные о количестве и разнообразии белков в организме человека (около 100000) свидетельствуют о том, что значительная часть генома человека не транскрибируется и соответственно не переводится на аминокислотную последовательность белков. Известно также, что определенная часть нетранслируемого генома человека выполняет регуляторную функцию в процессе экспрессии генов. В молекуле ДНК различают, кроме уникальных неповторяющихся последовательностей, содержащих кодирующие гены, также множество повторяющихся последовательностей (повторы), биологический смысл которых до сих пор неясен (см. далее).

Современные представления о механизме синтеза РНК в клетках в значительной степени обязаны открытию в 1960 г. в двух лабораториях США (Дж. Хервиц и С. Вейс) особого фермента — РНК-полимеразы, катализирующей синтез РНК из свободных нуклеозидтрифосфатов. Фермент требует наличия ионов  $Mg^{2+}$  или  $Mn^{2+}$  и одновременного присутствия всех 4 типов рибонуклеозидтрифосфатов (АТФ, ГТФ, ЦТФ и УТФ). Самым удивительным свойством фермента оказалось то, что для включения нуклеотидов в РНК необходимо обязательное присутствие преобразованной ДНК-матрицы\*. При тщательном изучении механизма синтеза РНК при участии РНК-полимеразы, называемой также ДНК-зависимой РНК-полимеразой (транскриптазой), было установлено, что молекула преобразованной ДНК, необходимая для реакции полимеризации, полностью определяет последовательность рибонуклеотидов во вновь синтезированной молекуле РНК. Другими словами, на матрице ДНК комплементарно строится полирибонуклеотид, являющийся копией первичной структуры ДНК, с той только разницей, что вместо тимидилового нуклеотида ДНК в РНК включается уридилловый нуклеотид. 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, сам механизм действия фермента РНК-полимеразы во многом совпадает с таковым ДНК-полимеразы: синтез также идет в направлении 5'→3', цепь РНК имеет полярность, противоположную цепи преобразованной ДНК. Однако выявлены и существенные различия. РНК-полимераза *E. coli* предпочтительнее функционирует в присутствии нативной двухцепочечной ДНК; в опытах *in vitro* обе цепи ДНК копируются РНК-полимеразой; *in vivo* транскрибируется, вероятнее всего, только одна цепь ДНК. Предполагают, что РНК-полимераза связывается с одной цепью нативной ДНК в определенной точке, вызывая расплетение биспиральной структуры на ограниченном участке, где и происходит синтез РНК. Данные свидетельствуют, что у *E. coli*, скорее всего, имеется единственная ДНК-зави-

\* Позже были открыты также ферменты (преимущественно в составе оболочек фагов и у ряда бактерий), катализирующие синтез РНК на матрице РНК.



симая РНК-полимераза, которая катализирует синтез всех типов клеточных РНК.

РНК-полимераза *E. coli* изучена наиболее подробно. Это олигомерный фермент, состоящий из двух одинаковых  $\alpha$ -субъединиц (мол. масса 36000), двух разных  $\beta$  ( $\beta_1$  и  $\beta_2$ )-субъединиц (мол. масса соответственно 151000 и 155000),  $\omega$ -субъединицы (мол. масса 11000) и  $\sigma$ -субъединицы; общая мол. масса фермента около 390000. Считают, что функция  $\sigma$ -субъединицы ( $\sigma$ -фактор) — узнавание определенного участка на матрице ДНК, названного промотором, к которому присоединяется РНК-полимераза. В результате образуется так называемый открытый комплекс фермента с ДНК: двухцепочечная структура ДНК раскрывается («плавится»). Далее на одной из нитей ДНК, как на матрице, синтезируется мРНК; синтез заканчивается в определенной точке в конце гена или прерывается под действием особых белков. Другим субъединицам фермента приписывают функцию инициации биосинтеза РНК ( $\alpha$ -субъединицам) и основную каталитическую функцию (связывание субстратов и элонгация синтеза) —  $\beta$ -субъединицам. Кроме того, открыт ряд белков, принимающих участие в механизме синтеза РНК в клетке. В частности, исследуется природа репрессорных белков и белка-терминатора ( $\rho$ -фактора). Последний обладает способностью обратимо связываться с терминирующими участками ДНК (так называемые стоп-сигналы транскрипции), выключая действие РНК-полимеразы. При отсигналы этого белка образуются исключительно длинные цепи РНК.

У эукариот открыты три разные РНК-полимеразы (I, II и III) с большой молекулярной массой (от 500000 до 600000), каждая из которых наделена специфической функцией. РНК-полимераза I ответственна за синтез только рибосомных РНК (рРНК), точнее одного-единственного прерибосомного РНК-транскрипта, предшественника 5,8S, 18S и 28S рРНК; фермент связывается с разными промоторными участками. РНК-полимераза II — основной фермент, катализирующий синтез матричной РНК (мРНК). Он наделен способностью распознавать огромное множество промоторных участков, многие из которых имеют специфические ключевые последовательности, являющиеся местами (сайтами) связывания транскрипционных белковых факторов. РНК-полимераза III катализирует преимущественно синтез транспортных РНК (тРНК), а также 5S рРНК и ряда других низкомолекулярных РНК со специфической функцией. У эукариот работу РНК-полимеразы обеспечивает множество регуляторных белков (факторы транскрипции), объединенных вместе с ферментом в единый транскрипционный комплекс. В частности, открыты транскрипционные факторы типа J, активные только в виде идентичных димеров (J1J1 или J2J2) или разных димеров (J1J2); эти факторы кодируются отдельными генами и сами запускают работу ряда генов, регулирующих клеточное деление. В результате мутации генов, кодирующих синтез транскрипционных факторов, резко повышается прочность связывания J-факторов с ДНК, что обычно приводит к нерегулируемому опухолевому росту клеток.

## **Биогенез матричных РНК**

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, т.е. у

прокариот транскрипция и трансляция являются сопряженными процессами. Биосинтез тРНК у прокариот из первичного тРНК транскрипта проходит стадию процессинга аналогично синтезу мРНК и тРНК у эукариот (см. далее).

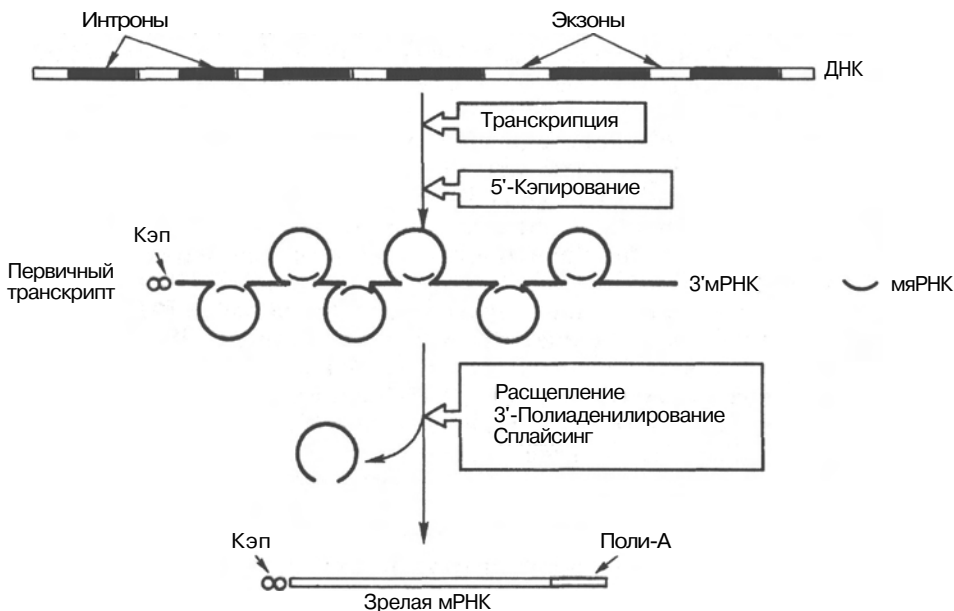
Биогенез мРНК у эукариот существенно отличается не только механизмом регуляции транскрипции, но и многоступенчатостью формирования активной молекулы. До открытия феномена сплайсинга (от англ. splicing—созревание, сращивание) мРНК было известно, что многие мРНК эукариот синтезируются в виде гигантских высокомолекулярных предшественников (пре-мРНК), которые уже в ядре подвергаются пост-транскрипционному процессингу. Предполагали, что процессинг включает удаление длинных 5'- и 3'-концевых участков, которые якобы выполняют регуляторные функции. Как оказалось, ген эукариот является не непрерывной, а мозаичной структурой, содержащей наряду с кодирующими (экзоны) также некодирующие (интроны) последовательности. Фермент 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.

С открытием интрон-экзонного строения генов, характерного для эукариотических клеток, начался новый этап исследований на пути реализации генетической информации. Транскрипция гена, состоящего из чередующихся кодирующих и некодирующих нуклеотидных последовательностей, обеспечивала полное его копирование и приводила к синтезу РНК-предшественника. Поэтому было высказано предположение о существовании между транскрипцией и трансляцией еще одного важного звена—образования пригодной для трансляции «зрелой» молекулы мРНК. Этот этап получил название **процессинга**, или созревания, мРНК.

К настоящему времени считается установленным, что процессинг мРНК включает три основных процесса: 1) кэпирование—химическая модификация 5'-концевой последовательности мРНК; 2) сплайсинг—удаление некодирующих интронных последовательностей из мРНК и сшивание образующихся экзонов; 3) полиаденилирование—химическая модификация 3'-концевой последовательности мРНК (рис. 13.5).

В осуществлении каждого из указанных процессов специфическое участие принимает ряд белков и нуклеиновых кислот, хотя конкретные молекулярные механизмы этих превращений еще не полностью раскрыты. Все три указанных процесса имеют важное значение в формировании зрелой молекулы мРНК. Однако наибольший интерес исследователи проявляют к выяснению молекулярного механизма сплайсинга, который должен обеспечить, во-первых, постепенное и высокоточное вырезание интронов из первичного транскрипта и, во-вторых, сшивание образующихся фрагментов—экзонов—«конец в конец». Любые отклонения или смещения границ в процессе вырезания интронов и сшивания экзонов даже на один нуклеотид могут привести не только к глубокому искажению смысла в кодирующих последовательностях, но и к нарушению передачи генетической информации и развитию патологии.

Последовательность нуклеотидов в молекуле мРНК обычно начинается с пары 5'-ГУ и заканчивается парой АГ-3'. Эти последовательности,



**Рис. 13.5.** Биогенез мРНК у эукариот.

вероятнее всего, служат сайтами (местами) узнавания для ферментов сплайсинга. Поскольку 5'-ГУ ... АГ-3' последовательности не открыты в молекулах предшественников тРНК, было высказано предположение о существовании по меньшей мере двух типов ферментов сплайсинга; одного для мРНК и другого 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 синтезированные на структурных генах первичные транскрипты подвергаются процессингу, прежде чем выполнят 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: например, терминальные реакции полиаденилирования и метилирования остатков нуклеозидов.

Химический смысл кэпирования сводится к присоединению остатка 7-метилгуанозина посредством трифосфатной группы к 5'-концу молекулы транскрипта, метилированию 2'-ОН-группы первого и второго нуклеотидов на 5'-конце мРНК. Полиаденилирование 3'-конца первичного транскрипта включает ряд стадий и участие эндонуклеазы и полиаденилатполимеразы. Эндонуклеаза расщепляет мРНК вблизи специфической сигнальной последовательности (5')ААУААА(3'), отличающейся высокой консервативностью. Полиаденилатполимераза синтезирует поли-А-конец (от 20 до 250 нуклеотидов) начиная с точки распада.

Функции 5'-кэп и 3'-поли-А раскрыты недостаточно полно. Показано, что 5'-кэп, соединяясь со специфическим белком, принимает участие в свя-

зывании мРНК с рибосомой, способствуя инициации синтеза белка. Допускают, что основное назначение 5'-кэп и поли-А—защита мРНК от энзиматического распада. Известно также, что не все цитоплазматические мРНК содержат участки поли-А на 3'-концах и что в цитоплазме клеток животных происходит как присоединение, так и удаление участка поли-А из молекулы мРНК. Следует отметить, что размер молекулы цитоплазматической мРНК даже после удаления 3'-поли-А оказывается все же намного большим, чем требуется для синтеза кодируемого белка. В частности, размер мРНК белка глобина (эритроциты кролика) составляет 550 нуклеотидов, в то же время кодирующий участок состоит из 430 нуклеотидов (размер поли-А—40 нуклеотидов). Другой пример: размер мРНК тяжелого иммуноглобулина (из клеток миеломы мышей) составляет 1800 нуклеотидных остатков, а кодирующая часть—1350 нуклеотидов (размер поли-А—150—200 нуклеотидов). Интересно, что большинство указанных процессов, если не все, могут регулироваться независимо, изменяя уровень экспрессии гена. Более того, даже после завершения формирования мРНК изменения ее стабильности могут оказывать существенное влияние на экспрессию гена.

В последние годы интенсивно исследуются структура и назначение нетранслируемых участков генов—интронов. Они различаются по числу, размеру и топографии. Показано, например, что ген сывороточного альбумина хотя и содержит всего 6 интронов, но на их долю приходится до 80% этого гена; интроны имеют размеры от 90 до 2000 нуклеотидных пар. Ген коллагена содержит более 50 интронов. Исключение составляют лишь гены, кодирующие гистоны, не содержащие интронных структур. Различают 4 класса интронов. Первый класс открыт как в ядерных, так и в митохондриальных генах, кодирующих рибосомные рРНК; второй класс интронов открыт в первичных транскриптах митохондриальных матричных мРНК. Оказалось, что оба эти класса интронов не нуждаются ни в источнике энергии, ни в участии ферментов, но наделены способностью самосплайсинга. Третий—самый большой класс интронов обнаружен в первичных транскриптах ядерных мРНК, подвергающихся созреванию. Сплайсинг требует наличия комплекса белков и особой группы клеточных РНК, названных малыми ядерными РНК (мяРНК). Выделено и охарактеризовано 5 групп богатых уридином мяРНК, соответственно обозначаемых U1, U2, U4, U5 и U6, размерами от 100 до 200 нуклеотидов. Комплексы мяРНК и белков, названные малыми ядерными нуклеопротеинами, объединяются в единую систему—сплайсосому, координирующую весь процесс сплайсинга. Предполагают, что мяРНК соединяются с обеими концами интрона, способствуя формированию специфической конформации, необходимой для узнавания ее участвующими в процессе ферментами, сближению двух экзонов, удалению интронов и воссоединению кодирующих экзонов. Четвертый класс интронов открыт в ряде тРНК. Сплайсинг этой группы интронов требует доставки энергии и присутствия эндонуклеаз и лигаз, катализирующих соответственно разрыв фосфодиэфирных связей с 5'- и 3'-концов интрона и соединяющих два экзона.

Укажем также на весьма интересные и новые данные о существовании в структуре мРНК-предшественника, помимо экзонов и интронов, особых, так называемых альтернативно сплайсируемых, последовательностей. Выявлены примеры неоднозначного протекания сплайсинга для ряда генов. Результат **альтернативного сплайсинга**—появление нескольких продуктов при экспрессии одного гена. Так, получены доказательства, что экспрессия

одного и того же гена тропомиозина позволяет получить семь изоформных белков, специфичных для разных групп мышц (гладких и поперечно-полосатых) или для фибробластов и миоцитов. В то же время известны примеры формирования одного белкового продукта (например, олигомерного фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) при экспрессии двух разных генов. Все эти данные свидетельствуют о том, что альтернативный сплайсинг может играть существенную роль в функционировании генома клеток высших организмов.

В нетранскрибируемых последовательностях генома перед экзон-интронами открыты специфические участки, названные промоторами, а также энхансерами (повышающие уровень транскрипции) и силансерами (ослабляющие уровень транскрипции). При взаимодействии с белками они выполняют функции регуляторных сигналов при транскрипции. Этот способ регуляции широко используется клетками эукариот как в процессах дифференцировки, так и при индукции репрессии (см. главу 14).

Нельзя не упомянуть об открытии рибозимов, т.е. молекул РНК, выступающих в качестве катализатора. Пожалуй, это единственные из известных макромолекул, которые наделены как информационной, так и каталитической функцией. Открытие каталитических РНК поколебало само понятие «фермент». Оказалось, что некоторые РНК осуществляют посттранскрипционный процессинг, катализируя самосплайсинг, т.е. участвуют в разрезании и удалении интронов. Наделенные рядом свойств истинных и эффективных катализаторов рибозимы участвуют в двух типах реакций: в гидролизе (разрыве) фосфодиэфирной связи и в реакциях трансэтерификации. В качестве субстрата могут служить, помимо собственного, предшественник (про-РНК) и другие молекулы РНК. Сейчас интенсивно изучается третичная структура рибозимов, а первичная и вторичная структуры ряда из них уже расшифрованы. Эти исследования, несомненно, интересные сами по себе, могут пролить свет и на пути развития биологической эволюции.

Для полного понимания молекулярных механизмов сложного процесса биогенеза мРНК предстоит решить множество вопросов. В частности, необходимо выделить в чистом виде и охарактеризовать белковые факторы, принимающие участие в этой регуляторной системе. Далее следует раскрыть механизмы узнавания промотора, терминации и антитерминации, избирательного метилирования, а также тонкие молекулярные механизмы регуляции сплайсинга. Решение указанных проблем будет, несомненно, способствовать лучшему пониманию сущности механизмов регуляции экспрессии генов эукариотических клеток в норме и при патологии.

## **Биогенез транспортных РНК**

Транспортные РНК в клетке выполняют адапторную функцию при трансляции информации мРНК в первичную структуру белка. Как было указано в главе 3, в молекуле тРНК содержится 8–10% необычных («минорных») азотистых оснований в составе нуклеотидов. Молекулы тРНК как у эукариот, так и у прокариот синтезируются в виде больших предшественников, часто содержащих последовательности более одной тРНК, которые затем подвергаются нуклеолитическому процессингу при участии специфических рибонуклеаз. Гены некоторых тРНК содержат вблизи участка ДНК, ответственного за синтез антикодоновой петли, интронные последовательности (около 18 нуклеотидов). Эти участки также транскриби-

руются, поэтому процессинг тРНК включает, помимо удаления 18-членного рибонуклеотидного интрона, также необходимый сплайсинг антикодоновой 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 ядре, в то время как ферментативные процессы удаления интрона и присоединения триплета ЦЦА происходят, скорее всего, в цитоплазме. Помимо акцепторного и антикодонового участков, тРНК содержит специфичные участки узнавания для ферментов—аминоацил-тРНК-синтетаз, а также участки для связывания с большими субчастицами рибосом (см. далее главу 14).

## Биогенез рибосомных РНК

У прокариот синтез 23S, 16S и 5S рРНК осуществляется из более крупного 30S предшественника, получившего название прерибосомной РНК (пре-рРНК). 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 (рис. 13.6).

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 она 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

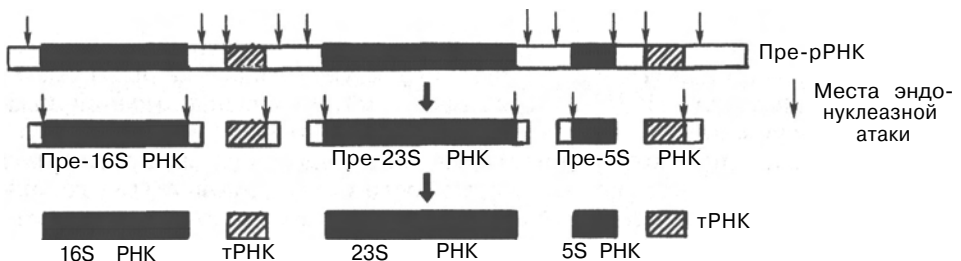


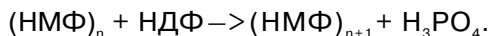
Рис. 13.6. Постсинтетическая модификация пре-рРНК прокариот (по Николову).

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 используется нуклеозидтрифосфаты для синтеза одноцепочечной вирусной РНК. Этот синтез должен пройти через стадию образования репликативной формы. Следовательно, на I стадии РНК-репликаза на матрице РНК-вируса специфически строит комплементарную, с противоположной полярностью цепь РНК. Последняя на II 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. Этот фермент наделен способностью синтезировать *in vitro* полимерную молекулу РНК из однотипных или разных рибонуклеозиддифосфатов (НДФ). Реакция, являющаяся обратимой, протекает по уравнению:



Рибонуклеозидтрифосфаты и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты не являются субстратами фермента. Фермент не нуждается в матрице, однако для синтеза необходима затравочная цепь РНК  $(\text{НМФ})_n$  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 предполагают, что он катализирует, скорее всего, обратную реакцию—расщепление мРНК с образованием нуклеозиддифосфатов.

Полученные 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 в некоторых экстремальных условиях. Кроме того, в лабораторных условиях фермент может найти применение для синтеза РНК-праймеров, используемых далее при синтезе ДНК.

**Проблемы генетической инженерии.** Генетическая инженерия, по определению А.А. Баева, представляет собой систему экспериментальных приемов, позволяющих создавать в лаборатории (в пробирке) искусственные биологические структуры. В качестве инструментов для генно-инженерных операций применяются созданные самой природой ферменты: одни из них рассекают молекулу ДНК в строго определенных участках (рестриктазы), другие, напротив, сшивают разрозненные участки в единое целое (лигазы). Конечной целью генетической инженерии является получение организмов (животных и растений) с новыми наследственными свойствами с помощью лабораторных приемов. Для достижения этой пока еще отдаленной цели необходимо проведение огромной работы на уровне отдельного гена или генов. Ген, представленный определенным участком ДНК и соответствующий определенному белку, можно или выделить из другого организма, или синтезировать химическим либо 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, 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 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. Синтезированы ДНК-копии на мРНК, кодирующие синтез белка глобина (человека, кролика, мыши, голубя, утки), иммуноглобулина, белка хрусталика глаза и др. 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: трансформацией (перенос генов посредством выделенной из клеток и освобожденной от примесей ДНК), трансдукцией (перенос генов посредством вирусов) и гибридизацией клеток, полученных из разных организмов (высших животных, микроорганизмов и др.) (рис. 13.7, 13.8). Заключительный этап этих экспериментов сводится к адаптации введенного гена в организме хозяина, но он почти не зависит от искусства экспериментатора.

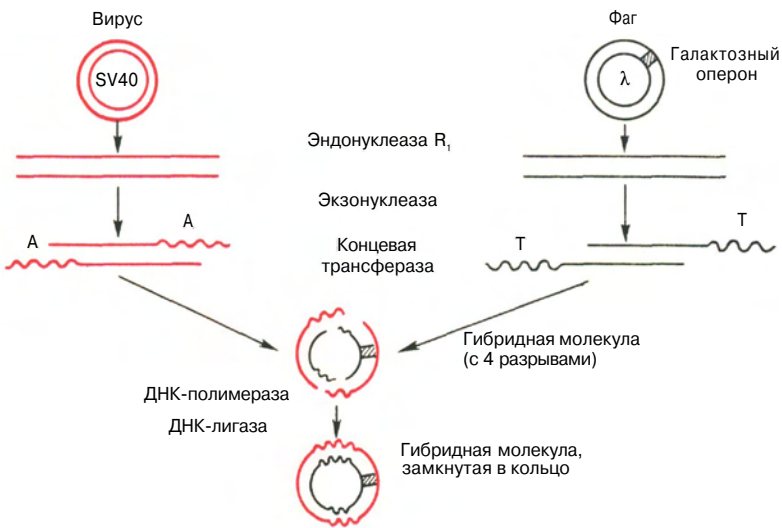
Исследования в области генетической инженерии могут служить основой для решения практических задач здравоохранения и сельского хозяйства. Полученные в лаборатории искусственные гены, помимо широкого использования в микробиологической и фармацевтической промышленности для приготовления кормового белка и лекарственных препаратов (инсулин, интерферон, гормон роста, гормоны щитовидной железы, стимуляторы иммунитета и др.), возможно, смогут применяться при лечении многих наследственных заболеваний (их насчитывается около 5000), генетический дефект которых точно известен пока только для небольшого числа (не более 50) болезней.

Первые попытки применения лактозного гена при галактоземии (наследственное заболевание, связанное с непереносимостью галактозы вследствие отсутствия фермента гексозо-1-фосфат-уридилтрансферазы; см.





**Рис. 13.7.** Схематическое изображение двух способов введения генов в клетку — трансформации и трансдукции (по А. А. Баеву).



**Рис. 13.8.** Получение гибридной молекулы, содержащей одновременно ДНК вируса SV40, ДНК фага λ, и галактозный оперон (схема по А. А. Баеву).

Под действием эндонуклеазы R<sub>1</sub> E. coli кольцевые ДНК разрываются в одной точке, в результате 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 (A), у другой - из тимидиловых (T) остатков. При смешивании молекул концевые остатки A и T образуют комплементарные пары, замыкая линейные молекулы в кольца. Вначале эти кольца содержат 4 разрыва, которые затем закрываются при участии еще одного фермента - ДНК-лигазы.

главу 10) 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 оказался затруднен рядом технических сложностей вследствие мозаичности структуры генов последних. В частности, открытие экзон-интронной структуры генов, явления сплайсинга (формирование зрелой матричной РНК) указывает на необходимость соблюдения высочайшей точности процедуры вырезания необходимого гена 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, неизвестных ранее в природе организмов с заранее заданными свойствами. Современная **биотехнология** явилась логическим развитием этого направления науки. Она сложилась на основе фундаментальных достижений биохимии, генетики и микробиологии, открыв широкие возможности для создания новых сортов растений, новых пород животных и т.п. Учитывая исключительную важность биотехнологии для народного хозяйства, в 1985 г. в нашей стране был создан и успешно работает межотраслевой научно-технический комплекс (МНТК) «Биоген». Комплекс был призван обеспечить создание и организацию промышленного производства новых биологически активных веществ и препаратов для медицины, ветеринарии, растениеводства на основе прогрессивных биотехнологических методов, в том числе методов 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 молекулах ДНК и РНК, вызывающие деполимеризацию 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. К настоящему времени открыты 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 открыты также моно- и динуклеотиды. Типичными представителями этих ферментов являются ДНКазы поджелудочной железы. Одна из них (ДНКаза I) была получена в чистом виде, расшифрована последовательность всех ее 257 аминокислотных остатков. Фермент наиболее активен при pH 6,8–8,0, активируется двухвалентными ионами  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  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 ДНКаза II, выделенная из селезенки, имеющая мол. массу 38000 и состоящая из 343 аминокислотных остатков. В составе этой ДНКазы открыт глюкозамин. Фермент также активируется ионами металлов, ингибируется анионами; его оптимум pH 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 четыре таких фермента, обозначаемых экзодезоксирибонуклеазами I, II, III и IV.

*Рестриктазы*—ферменты ДНКазного типа действия—катализируют распад чужеродной (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 оказывают строго специфическое действие, поэтому они используются для расшифровки последовательности нуклеотидных остатков в ДНК фагов и вирусов. Кроме того, это 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). В результате клетке передается ряд не свойственных ей прежде наследственных признаков. Теоретическое и главным образом практическое значение подобных исследований трудно переоценить. Свидетельством огромного интереса к проблемам генетической инженерии является создание и успешное выполнение в институтах Российской АН и лабораторий ряда стран совместной комплексной программы—проекта «Рестриктазы».

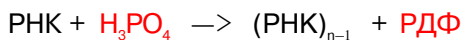
Многие сотни рестриктаз выделены в очищенном состоянии и уже являются коммерческими препаратами.

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 аминокислотных остатков во всех случаях, хотя ферменты несколько различаются последовательностью аминокислотных остатков; выяснена также третичная структура ряда РНКаз (см. главу 4). Получен в гомогенном состоянии из плесневого гриба рода *Aspergillus* 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, преимущественно 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 (НДФ) 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 15).

Открыта группа *ДНК-гликозидаз*, участвующих в реакциях отщепления модифицированных пуриновых и пиримидиновых оснований (например, урацила, образующегося при дезаминировании остатка цитозина в одной из цепей ДНК).

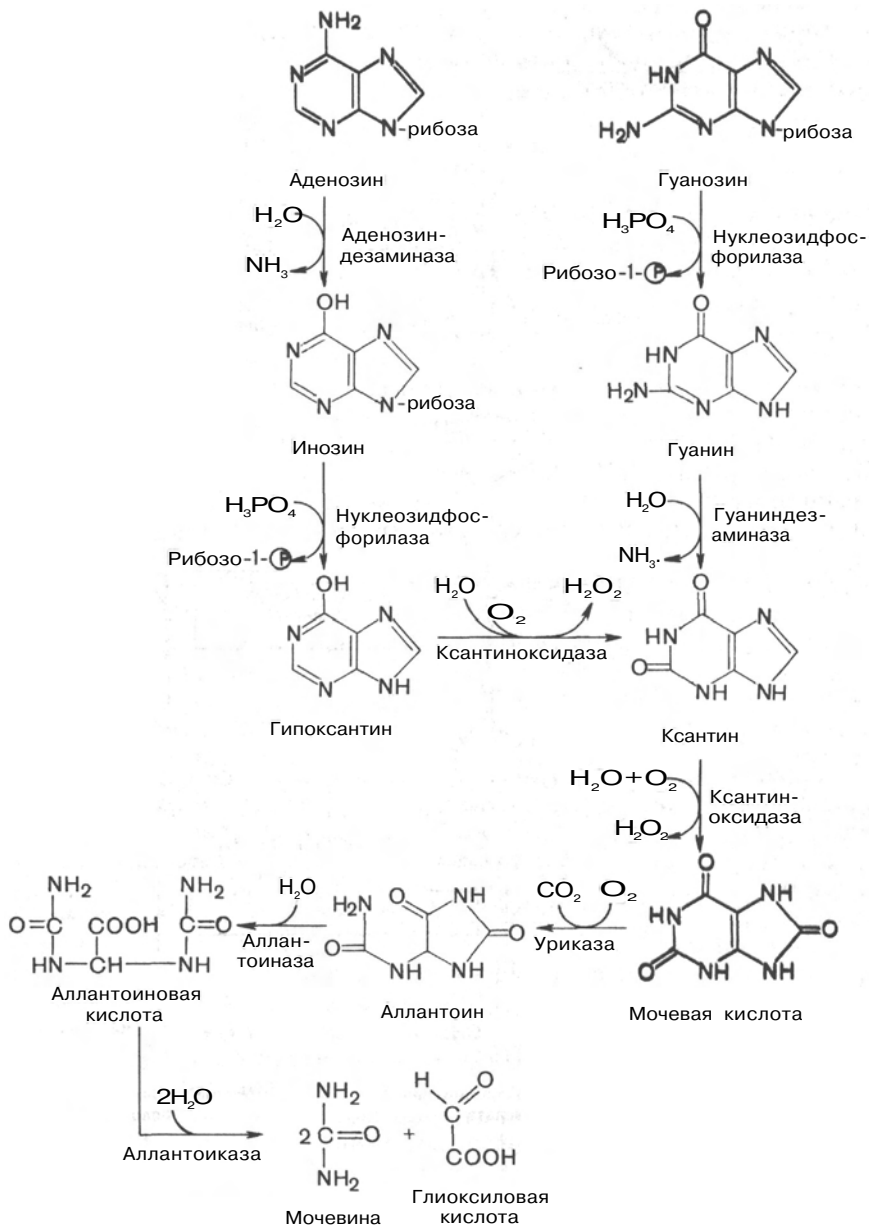
Таким образом, ДНК-гликозидазы выполняют важную функцию в процессах репарации (восстановление структуры) молекулы ДНК.

В результате последовательного действия разнообразных клеточных экзо- и эндонуклеаз нуклеиновые кислоты подвергаются распаду до стадии рибо- и дезоксирибонуклеозид-3'- и 5'-фосфатов. Дальнейший распад образовавшихся продуктов связан с ферментативными превращениями мононуклеотидов\*, нуклеозидов и далее свободных азотистых оснований. На I 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 II этапе происходит перенос остатка рибозы от нуклеозида на свободную фосфорную кислоту с образованием рибозо-1-фосфата и свободного азотистого основания.

## **Распад пуриновых нуклеозидов**

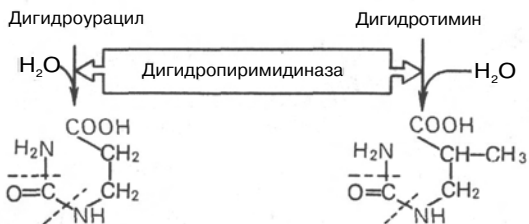
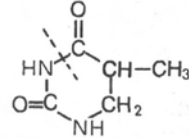
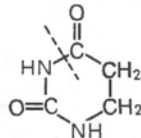
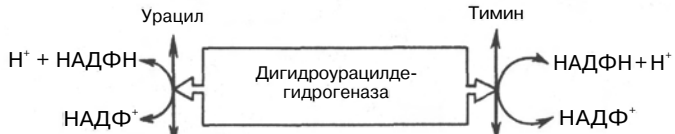
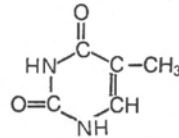
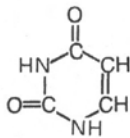
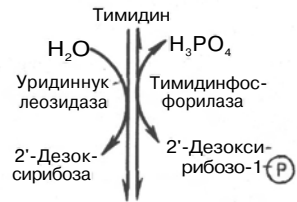
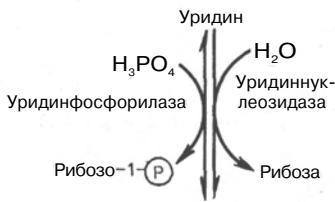
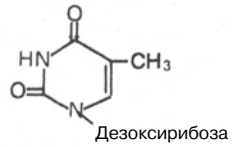
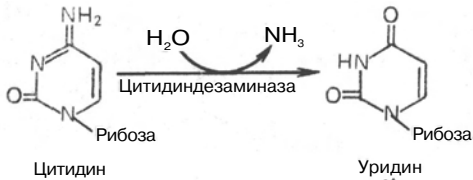
Образовавшиеся при гидролизе пуриновые нуклеозиды—аденозин и гуанозин—подвергаются ферментативному распаду в организме животных вплоть до образования конечного продукта—мочевой кислоты, которая выводится с мочой из организма. У человека, приматов, большинства животных, птиц и некоторых рептилий мочевая кислота является конечным продуктом пуринового обмена. У других рептилий и некоторых млекопитающих мочевая кислота расщепляется до аллантаина и у рыб—до аллантаиновой кислоты и мочевины. Последовательность всех этих превращений, катализируемых специфическими ферментами, можно представить в виде следующей схемы:

\* АМФ может подвергаться в животных тканях обратимому дезаминированию в инозиновую кислоту.



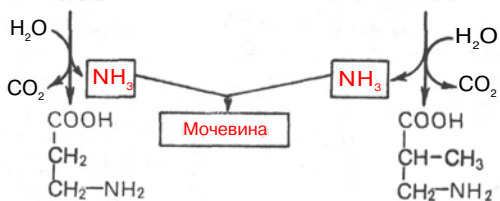
## Распад пиримидиновых нуклеозидов

Последовательность ферментативных реакций гидролиза пиримидиновых нуклеозидов можно представить в виде схемы:



N-карбамоилпропионовая кислота

N-карбамолизомазная кислота

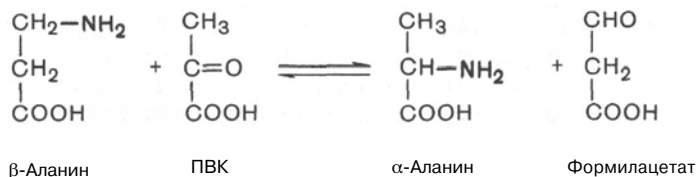


β-Аланин

β-Аминоизомазная кислота

Мочевина

Начальные этапы реакции распада пиримидиновых нуклеотидов катализируются специфическими ферментами. Конечными продуктами реакции являются  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , мочеви́на,  $\beta$ -аланин и  $\beta$ -аминоизомасляная кислота. Следует указать, что гидролитический путь распада пиримидинов является, очевидно, главным путем образования  $\beta$ -аланина, который может служить источником для синтеза ансерина и карнозина (см. главу 20), а также для образования КоА. Известно, что  $\beta$ -аланин в животных тканях подвергается дальнейшему распаду. В тканях животных открыта специфическая аминотрансфераза, катализирующая трансаминирование между  $\beta$ -аланином и пировиноградной кислотой. В процессе этой обратимой реакции синтезируются  $\alpha$ -аланин и формилацетат (полуальдегид малоновой кислоты):



Образовавшийся формилацетат далее подвергается окислительному декарбосилированию 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 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%, 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  $\text{Fe}^{2+}$  после освобождения его из комплексов с белками. В клетках слизистой оболочки кишечника железо уже в трехвалентной форме  $\text{Fe}^{3+}$  соединяется с белком апоферритином с образованием стабильного комплекса ферритина. Дальнейший транспорт железа к местам кроветворения осуществляется в комплексе с  $\beta_1$ -глобу-

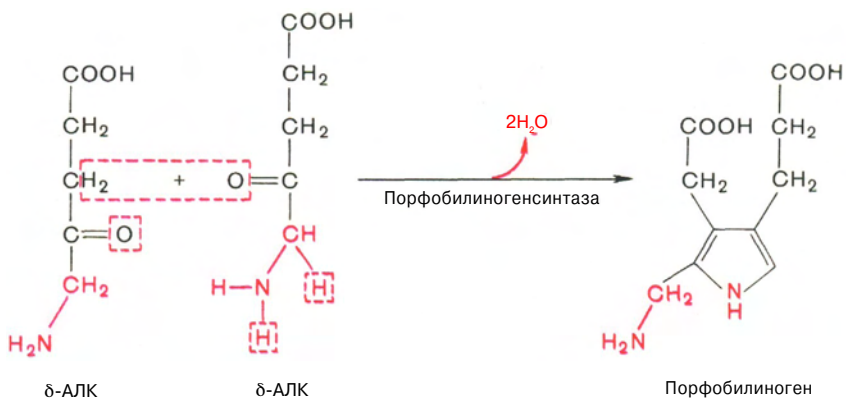




Эту стадию катализирует специфический пиридоксальфосфатзависимый фермент  $\delta$ -аминолевулинатсинтаза – ключевой, аллостерический фермент синтеза тетрапирролов.

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 II стадии происходит конденсация 2 молекул  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты с образованием первого монопиррольного соединения – порфобилиногена (ПБГ).



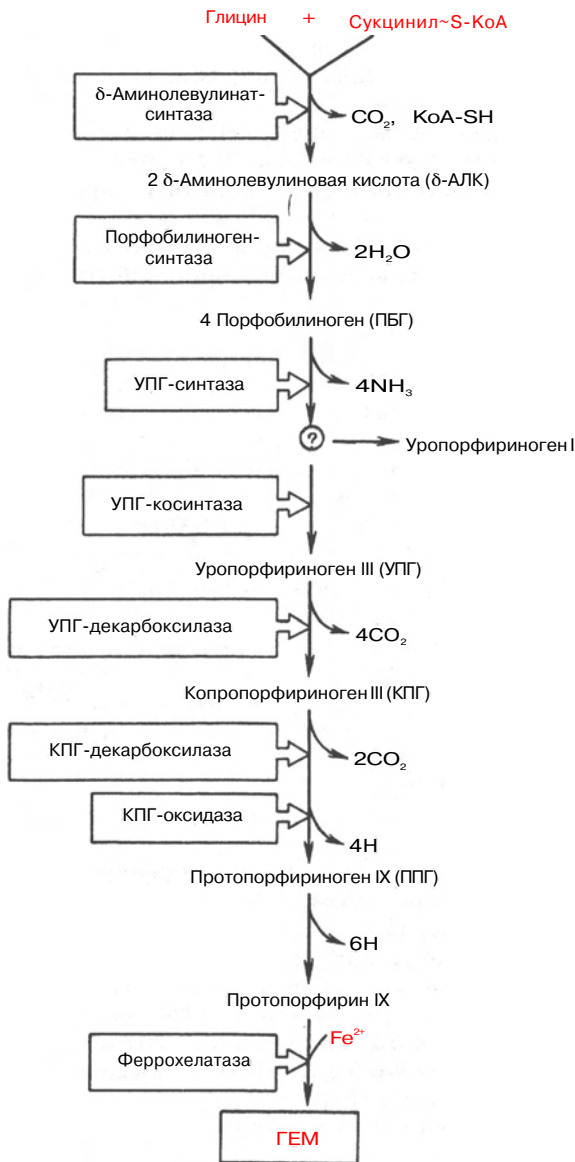
Фермент, катализирующий эту стадию, – порфобилиногенсинтаза также является регуляторным ферментом, подвергаясь ингибированию конечными продуктами синтеза. Предполагают, что механизм этой сложной реакции дегидратации включает образование кетиминной связи (шиффово основание) между кетогруппой одной молекулы  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты и  $\delta$ -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 феррохелатазы (гемсинтазы), и образуется гем. Последний используется для биосинтеза всех гемсодержащих хромопротеинов.

Источником железа для этой реакции является ферритин, который считается резервным гемопротеином, откладывающимся в клетках костного мозга, печени и селезенки.

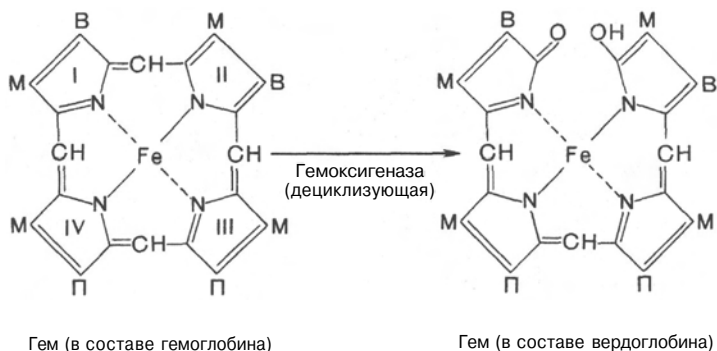
Имеются указания, что, помимо железа, в синтезе гема участвуют некоторые кофакторы, в частности витамин  $\text{B}_{12}$ , ионы меди, хотя конкретная их роль не раскрыта.

Таким образом, весь путь синтеза гема может быть представлен в виде схемы, в которой даны полные и сокращенные обозначения промежуточных метаболитов и ферментов.



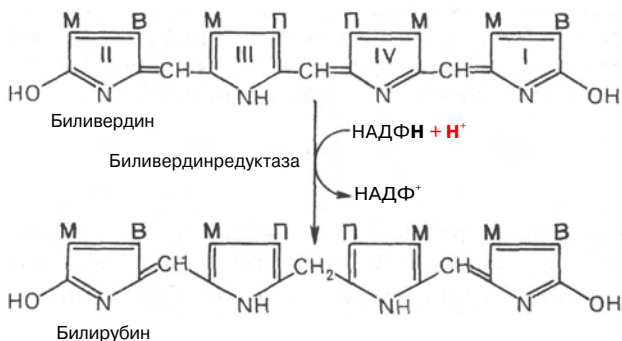
## Распад гемоглобина в тканях (образование желчных пигментов)

Продолжительность жизни эритроцитов составляет 120 дней, затем они разрушаются и освобождается гемоглобин. Главными органами, в которых происходят 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 (хологлобина):



В приведенных структурных формулах здесь и далее в желчных пигментах М — метильная  $\text{CH}_3$ -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  $\text{Fe}^{2+}$  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:



Основное место образования билирубина — печень, селезенка и, по-видимому, эритроциты (при распаде их иногда разрывается одна из метиновых связей в протопорфирине). Образовавшийся во всех этих клетках билирубин поступает в печень, откуда вместе с желчью попадает в желчный пузырь (см. главу 16). Билирубин, образовавшийся в клетках системы макрофагов, называется свободным, или непрямым, билирубином, поскольку вследствие 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 желтухе. Более высокий уровень билирубина в крови вызывает явления тяжелого отравления. Непрямой билирубин, поступая с током крови в печень, подвергается обезвреживанию путем связывания с глюкуроновой кислотой. В этом процессе принимают участие особый фермент УДФ-глюкуронилтрансфераза и УДФ-глюкуроновая кислота, являющаяся донором глюкуроновой кислоты. При этом к билирубину присоединяются 2 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 прямого и непрямого билирубина, а также соотношение между ними резко меняются при поражениях печени, селезенки, костного мозга, болезнях крови и т.д., поэтому определение содержания обеих форм билирубина в крови имеет существенное значение при дифференциальной диагностике различных форм желтухи. При желчнокаменной болезни в составе желчных камней наряду с основным их компонентом — холестерином всегда обнаруживается не прямой билирубин. Вследствие 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 освобожденный билирубин подвергается восстановлению в стеркобилиноген, который выводится из кишечника. В сутки человек выделяет около 300 мг стеркобилиногена. Последний легко окисляется под действием света и воздуха в стеркобилин. Механизм бактериальных превращений билирубина до стеркобилиногена до конца еще не расшифрован. Имеются данные, что промежуточными продуктами восстановления являются последовательно мезобилирубин и 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 с мочой. Однако называть его уробилиногеном не совсем точно (см. главу 18). Суточное содержание стеркобилиногена в моче составляет около 4 мг, и, пожалуй, именно стеркобилиноген является нормальной органической составной частью мочи. Если с мочой выделяется повышенное содержание уробилиногена (точнее, мезобилиногена), то это является свидетельством недостаточности функции печени, например, при печеночной или гемолитической желтухе, когда печень частично теряет способность извлекать этот пигмент из крови воротной вены. Химически уробилиноген (мезобилиноген) неидентичен 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 и др.).

Таким образом, количественный и качественный анализ желчных пигментов в моче может представлять большой клинический интерес.

## Глава 14

# БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

Целое есть нечто большее,  
чем простая сумма его частей.

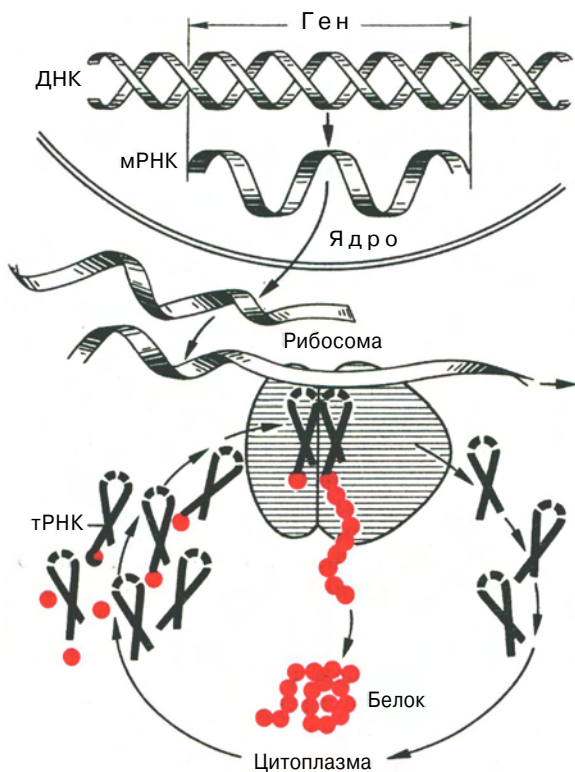
*Платон*

Одной из глобальных задач современной биологии и ее новейших разделов: молекулярной биологии, биоорганической химии, физико-химической биологии—является выяснение молекулярных основ и тонких механизмов синтеза белка, содержащего сотни, а иногда и тысячи остатков L-аминокислот. Последние располагаются, как это установлено, не хаотично, а в строго заданной последовательности, обеспечивая тем самым уникальность структуры синтезированной белковой молекулы, наделенной уникальной функцией. Другими словами, механизм синтеза должен обладать весьма тонкой и точной кодирующей системой, которая автоматически программирует включение каждого аминокислотного остатка в определенное место полипептидной цепи. Установлено, что кодирующая система однозначно определяет первичную структуру, в то время как вторичная и третичная структуры белковой молекулы определяются физико-химическими свойствами и химической структурой радикалов аминокислот в полипептиде.

Первоначально представляли, что синтез белка могут катализировать те же протеолитические ферменты, которые вызывают и его гидролиз, но путем обратимости химической реакции. Однако 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 последующим их объединением в одну полипептидную цепь. Более правильным оказалось предположение, что для синтеза белка требуются источники энергии, наличие активированных свободных аминокислот и нескольких типов клеточных нуклеиновых кислот.

В выяснение молекулярных механизмов синтеза белка определенный вклад внесли российские 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. Орехович еще в 50-е годы установил, что перенос аминокислотных или пептидных группировок на  $\text{NH}_2$ -группу аминокислот может осуществляться не только с амидной или пептидной, но и со сложноэфирной связи. Как будет показано далее, 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, трансформи-



**Рис. 14.1.** Принципиальная схема биосинтеза белка (по А.С. Спирину).

Красные кружочки - свободные аминокислоты и их остатки в составе полипептидной цепи.

руется 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. 14.1). В природе, как известно, существует 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 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 российских 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 уста-

новлено, что ДНК локализована в ядре клетки, в то время как синтез белка протекает главным образом в микросомах цитоплазмы. Первые экспериментальные доказательства 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 ядре\*, 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 синтезируется в ядре, затем поступает в цитоплазму, где выполняет роль матрицы в синтезе белка. Полученные значительно позже экспериментальные данные подтвердили гипотезу о том, что основными функциями нуклеиновых кислот являются хранение генетической информации и реализация этой информации путем программированного синтеза специфических белков.

В последовательности ДНК—>РНК—>Белок недоставало сведений о том, каким образом происходит расшифровка наследственной информации и синтез специфических белков, определяющих широкое разнообразие признаков живых существ. В настоящее время выяснены основные процессы, посредством которых осуществляется передача наследственной информации: репликация, т.е. синтез ДНК на матрице ДНК; транскрипция, т.е. синтез РНК на матрице ДНК или перевод языка и типа строения ДНК на молекулу РНК (см. ранее), и трансляция—процесс, в котором генетическая информация, содержащаяся в молекуле мРНК, направляет синтез соответствующей аминокислотной последовательности в белке. Напомним, однако, что многие тонкие механизмы транскрипции и трансляции окончательно еще неясны.

## **ТРАНСЛЯЦИЯ И ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К СИНТЕЗУ БЕЛКА В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ**

Непосредственное отношение к механизмам передачи наследственной информации, или экспрессии генов, имеет процесс трансляции, означающий перевод «четырёхбуквенного языка нуклеиновых кислот на двадцатибуквенную речь белков». Другими словами, трансляция сводится к синтезу белка в рибосомах. В этом процессе только последовательность расположения нуклеотидов в мРНК определяет первичную структуру белка, т.е. строго упорядоченную последовательность расположения отдельных аминокислотных остатков в молекуле синтезируемого белка.

Остановимся на анализе тех условий, которые необходимы для осуществления синтеза белка в бесклеточной системе. В современных представлениях о синтезе белка выдающуюся роль сыграли три экспериментальных подхода, разработанные в начале 50-х годов. Во-первых, в классических исследованиях П. Замечника и сотр. при использовании меченых

\* Получены экспериментальные доказательства наличия ДНК также в митохондриях (около 1-2% от суммарной ДНК клеток). Она негомологична и некомплементарна ядерной ДНК. Установлено, что ДНК кодирует синтез некоторых структурных белков самих митохондрий и особых митохондриальных РНК.

Таблица 14.1. Состав белоксинтезирующей системы у про- и эукариот в разные стадии синтеза белка

Стадия	Прокариоты	Эукариоты
1. Активация аминокислот	20 аминокислот 20 аминоацил-тРНК-синтетаз Минимум 20 тРНК АТФ и $Mg^{2+}$	20 аминокислот 20 аминоацил-тРНК-синтетаз Минимум 20 тРНК АТФ и $Mg^{2+}$
2. Инициация	мРНК Инициаторная аминоацил-тРНК (N-формилметионил-тРНК) Иницирующий кодон в молекуле мРНК (АУГ) 30S и 50S рибосомные субчастицы <i>Факторы инициации:</i> IF-1, IF-2 и IF-3, ГТФ и $Mg^{2+}$	мРНК Инициаторная аминоацил-тРНК (метионил-тРНК) Иницирующий кодон в молекуле мРНК (АУГ) 40S и 60S рибосомные субчастицы <i>Факторы инициации:</i> eIF-1, eIF-2, eIF-2A, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4C, eIF-4D и кэп-узнающий фактор, ГТФ и $Mg^{2+}$
3. Элонгация	Иницирующий комплекс (функциональная 70S рибосома) Специфические тРНК, определяемые кодонами <i>Факторы элонгации:</i> EF-Tu, EF-Ts и EF-G, ГТФ и $Mg^{2+}$	Иницирующий комплекс (функциональная 80S рибосома) Специфические РНК, определяемые кодонами <i>Факторы элонгации:</i> eEF-1 $\alpha$ , eEF-1 $\beta\gamma$ и eEF-2, ГТФ и $Mg^{2+}$
4. Терминация	Терминирующие кодоны в молекуле мРНК: УАА, УАГ и УГА <i>Факторы терминации</i> (рилизинг-факторы): RF-1, RF-2, RF-3, АТФ	Терминирующие кодоны в молекуле мРНК: УАА, УАГ и УГА <i>Факторы терминации</i> (рилизинг-факторы): eRF, АТФ
5. Процессинг и формирование третичной структуры	Специфические ферменты и кофакторы, вызывающие освобождение иницирующих остатков и сигнальных последовательностей, ограниченный протеолиз и химическую модификацию	Специфические ферменты и кофакторы, вызывающие освобождение иницирующих остатков и сигнальных последовательностей, ограниченный протеолиз и химическую модификацию



аминокислот был впервые решен вопрос о месте синтеза белка; им оказалась рибосома. При введении крысам  $^{15}\text{N}$ -аминокислот и 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. Во-вторых, добавление АТФ к белоксинтезирующей системе цитозоля вызывало «активирование» аминокислоты и связывание ее с термостабильной и растворимой формой РНК, впоследствии названной транспортной (тРНК), что приводило к образованию комплекса, названного позже аминоацил-тРНК. Ферменты, катализирующие этот процесс, сейчас называются аминоацил-тРНК-синтетазами. В-третьих, выяснена роль самих адапторных РНК в процессе трансляции. Дальнейшие исследования были направлены на поиск других компонентов белоксинтезирующей системы.

Белоксинтезирующая система включает набор всех 20 аминокислот, входящих в состав белковых молекул; минимум 20 разных тРНК, обладающих специфичностью к определенному ферменту и определенной аминокислоте; набор минимум 20 различных ферментов—аминоацил-тРНК-синтетаз, также обладающих двойной специфичностью к какой-либо определенной аминокислоте и к одной тРНК; рибосомы (точнее, полисомы, состоящие из 4–12 монорибосом с присоединенной к ним мРНК); АТФ и АТФ-генерирующую систему ферментов; ГТФ, принимающий специфическое участие в стадиях инициации и элонгации синтеза белка в рибосомах; ионы  $\text{Mg}^{2+}$  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. Основные компоненты белоксинтезирующей системы про- и эукариотов в разные стадии синтеза белка обобщены в табл. 14.1.

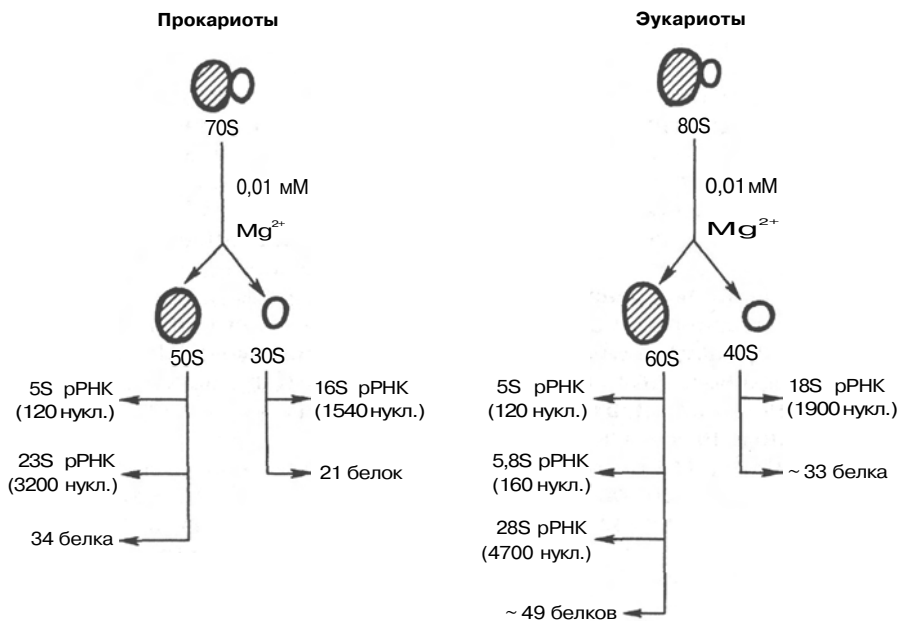
Рассмотрим более подробно структуру и функцию главных компонентов белоксинтезирующей системы.

## Рибосомы

Как известно, живые организмы 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 (в ряде случаев и хлоропласты) и другие субклеточные органеллы.

Оба типа клеток имеют рибосомы, причем рибосомы эукариот (мол. масса  $4,2 \cdot 10^6$ ) значительно большего размера (23 нм в диаметре), чем рибосомы прокариот (мол. масса  $2,5 \cdot 10^6$ , 8 нм в диаметре). Обычно рибосомы характеризуют по скорости их седиментации в центрифужном поле, которая количественно выражается константой седиментации  $s$  в единицах Сведберга S (см. главу 1). Величина  $s$  зависит не только от размера частиц, но и от формы и плотности, так что она непропорциональна размеру. Число рибосом в микробной клетке равно примерно  $10^4$ , а эукариот—около  $10^5$ .

Химически рибосомы представляют собой нуклеопротеины, состоящие из РНК и белков, причем 80S рибосомы эукариот содержат примерно



**Рис. 14.2.** Компоненты рибосом прокариот и эукариот (схема).

равное их количество, а у 70S рибосом прокариот соотношение РНК и белка составляет 65% и 35% соответственно (рис. 14.2). РНК рибосом принято называть рибосомными и обозначать рРНК. Как 80S, так и 70S рибосомы состоят из двух субчастиц, которые можно увидеть под электронным микроскопом или после 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 вторую. Так, у 70S рибосом величины  $s$  для субчастиц равны 50S и 30S, у 80S рибосом—соответственно 60S и 40S (см. рис. 14.2). Укажем также, что у *E. coli* большая и малая субчастицы содержат 34 белка и 21 белок соответственно и, кроме того, 2 молекулы рРНК с коэффициентами седиментации 23S и 5S в большой и одну молекулу рРНК (16S) в малой субчастице. Рибосомные белки не только все выделены, но и секвенированы; отличаются большим разнообразием молекулярной массы (от 6000 до 75000). Считается, что все 55 бактериальных рибосомных белков участвуют в синтезе полипептидов в качестве ферментов или структурных компонентов, но, за исключением небольшого числа, детальная функция большинства из них не выяснена. РНК 23S и 5S содержат 3200 и 120 нуклеотидов соответственно, а 16S РНК—1540 нуклеотидов. Субчастицы рибосом клеток эукариот построены более сложно. В их составе четыре разные рРНК и более 70 разных белков в обеих субчастицах, при этом большая субчастица (60S) содержит три разного размера рРНК: 28S (4700 нуклеотидов), 5,8S (160 нуклеотидов) и 5S (120 нуклеотидов)—и около 49 белков. Малая субчастица (40S) содержит всего одну молекулу 18S рРНК и около 33 белков. Укажем также, что биологические функции компонентов эукариотических рибосом также связаны, вероятнее всего, с синтезом полипептидной цепи, но их конкретная роль недостаточно раскрыта.

Рибосомы представляют собой сложную молекулярную «машину» («фабрику») синтеза белка. Для выяснения тонких механизмов синтеза белка в рибосомах необходимы более точные сведения о структуре и функциях всех компонентов 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 (из 21), содержащихся в определенных топографических участках молекулы 16S рРНК.

Известно, что рРНК образуется из общего предшественника всех типов клеточных РНК, в свою очередь синтезирующегося на матрице ДНК в ядре (см. главу 13). 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 группа рибосом вместе с мРНК образует полисомы или полирибосомы, принимающие непосредственное участие в синтезе белка.

### **Аминоацил-тРНК-синтетазы**

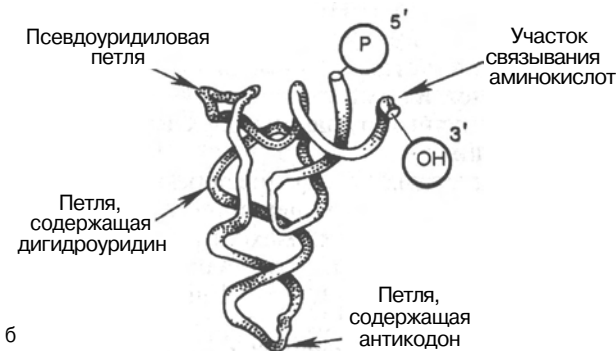
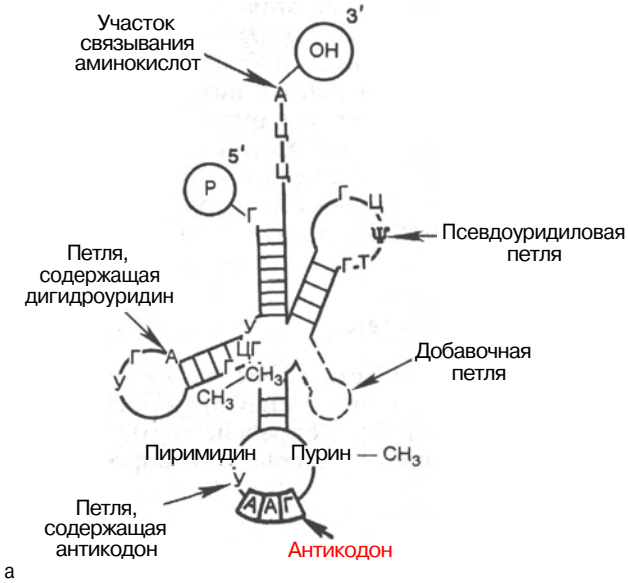
Экспериментально доказано существование в любых клетках живых организмов специфических ферментов, катализирующих активирование аминокислот и связывание последних с определенными тРНК. Все эти ферменты выделены в чистом виде из *E. coli*, секвенированы, и для ряда их установлена трехмерная структура.

Все они оказались чувствительными к реагентам на SH-группы и требуют присутствия ионов  $Mg^{2+}$ . Ферменты обладают абсолютной специфичностью действия, поскольку они узнают только одну какую-либо L-аминокислоту или одну тРНК. Для тех аминокислот, для которых открыты две и более тРНК (см. далее), соответствующая аминокацил-тРНК-синтетаза катализирует аминокислотирование всех этих тРНК. Это обстоятельство чрезвычайно важно, поскольку в дальнейшем в белковом синтезе «узнавание» аминокацил-тРНК основано не на природе аминокислоты, а на химической природе антикодона тРНК. Считается, что в молекуле каждой аминокацил-тРНК-синтетазы имеется по крайней мере 3 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.

Аминокацил-тРНК-синтетазы в последнее время стали делить на 2 класса в соответствии с различиями в их первичной и третичной структурах, а также в зависимости от своеобразия механизма катализируемой реакции. Первый класс включает ферменты, катализирующие синтез аминокацил-тРНК следующих аминокислот: Арг, Вал, Глн, Глу, Иле, Лей, Мет, Тир, Трп, Цис; второй класс — аминокислот Ала, Асн, Асп, Гис, Гли, Лиз, Про, Сер, Тре, Фен. Оказалось, что ферменты 1-го класса обеспечивают перенос аминокислотной группы сначала ко второй 2'-ОН-группе терминального остатка адениловой кислоты, затем перемещение ее к 3'-ОН-группе (путем

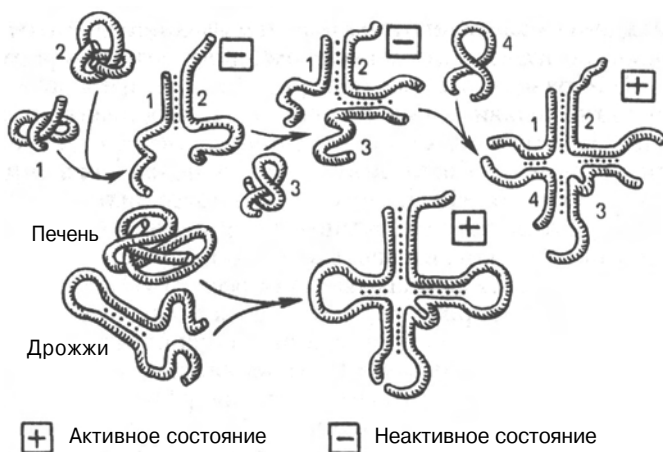
реакции трансэтерификации), в то время как ферменты 2-го класса катализируют перенос аминокислотной группы непосредственно к 3'-ОН-группе концевой адениловой нуклеотида.

Аминоацил-тРНК-синтазы в активном центре содержат гистидин, имидазольное кольцо которого участвует в связывании АТФ посредством ионов  $Mg^{2+}$ . Наибольшим сродством эти ферменты, как было указано, обладают к молекулам специфических тРНК, хотя конкретный механизм, посредством которого ферменты узнают подходящую РНК, пока неясен. В то же время эти ферменты отличаются низкой молярной активностью (число оборотов не превышает нескольких сот каталитических актов в минуту).



**Рис. 14.3.** Структура тРНК.

а - общая структура различных тРНК; б - пространственная структура тРНК.



**Рис. 14.4.** Созревание валиновой тРНК (по А.А. Баеву).

Цифрами обозначены фрагменты молекулы тРНК.

## Транспортные РНК

В лаборатории М. Хогланда было выяснено, что при инкубации  $^{14}\text{C}$ -аминокислоты с растворимой фракцией цитоплазмы в присутствии АТФ и последующим добавлением трихлоруксусной кислоты в образовавшемся белковом осадке метка не открывается. Эти данные позволили сделать заключение, что меченая аминокислота не включается в белковую молекулу. Метка оказалась связанной ковалентно с РНК, содержащейся в безбелковом фильтрате. Дальнейшие исследования показали, что РНК, к которой присоединяется меченая аминокислота, имеет небольшую молекулярную массу и сосредоточена в растворимой фракции, поэтому ее сначала называли растворимой, а позже адапторной, или транспортной, РНК (тРНК). На долю тРНК приходится около 10–15% от общего количества клеточной РНК. К настоящему времени открыто более 60 различных тРНК. Для каждой аминокислоты в клетке имеется по крайней мере одна специфическая тРНК. (Для ряда аминокислот открыто более одной: в частности, для серина, лейцина и аргинина—6 разных тРНК, для аланина, треонина 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 24000 до 29000. Они содержат от 75 до 85 нуклеотидов, в том числе 8 и более из них являются модифицированными основаниями. Аминокислоты присоединяются в конечном итоге к свободной 3'-ОН-группе (см. ранее о ферментах аминоацил-тРНК-синтетаз 1-го класса) конечного мононуклеотида, представленного во всех тРНК АМФ (адениловая кислота), путем образования эфирной связи. Интересно, что почти все тРНК обладают не только удивительно сходными функциями, но и очень похожей трехмерной структурой (рис. 14.3).

Установлена первичная структура почти всех 60 открытых тРНК (рис. 14.4). 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 трехмерная структура, установленная методом

рентгенокристаллографического анализа и названная первоначально конформацией клеверного листа; на самом деле эта конформация имеет перевернутую L-образную форму (см. рис. 14.3). Определение тРНК этим методом позволило выявить ряд отличительных особенностей структуры. В молекуле тРНК открыты спирализованные участки, необычные водородные связи и гидрофобные взаимодействия во внеспирализованных участках. Показано, что тРНК имеет псевдоуридиловую петлю, образованную из нуклеотидов, содержащих псевдоуридин (ТψС), и дигидроуридиловую петлю. Обе петли участвуют в образовании угла буквы L. На 3'-ОН-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, как было указано, получены доказательства возможности предварительного присоединения аминокислоты и через его 2'-ОН-группу.

Роль отдельных участков тРНК недостаточно раскрыта. В частности, псевдоуридиловая петля, по-видимому, обеспечивает связывание аминоксил-тРНК с рибосомой, а дигидроуридиловая петля, вероятнее всего, необходима как сайт (место) для узнавания специфическим ферментом — аминоксил-тРНК-синтетазой. Имеется, кроме того, добавочная петля, состав которой варьирует у разных типов молекул тРНК; ее назначение неизвестно. Существенным, с полностью раскрытой функцией участком является антикодоновая петля, несущая триплет, названный антикодоном, и расположенная на противоположной стороне от того конца, к которому присоединяется аминокислота. Антикодоновая петля состоит из 7 нуклеотидов: три занимают центральное положение и формируют собственный высокоспецифичный антикодон, по два нуклеотида расположены по обе стороны от него, включая модифицированный пурин и варьирующее основание с одной стороны и два пиримидиновых основания — с другой стороны. Антикодон является специфичным и комплементарным к соответствующему кодону мРНК, причем оба они антипараллельны 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. Однако, поскольку между нуклеиновой кислотой и специфической функциональной группой аминокислот нет соответствия и сродства, эту функцию узнавания, точнее, посредника между тРНК и аминокислотой, должна выполнять белковая молекула фермента. Взаимодействие между аминоксил-тРНК-синтетазой и тРНК принято обозначать как «вторичный генетический код», подчеркивая тем самым его ключевую роль в обеспечении точности синтеза белка, причем правила кодирования являются, вероятнее всего, более сложными, чем правила «первичного» генетического кода (см. далее).

## Матричная РНК

Ранее было указано на необходимость участия предобразованной молекулы РНК для правильной расстановки аминокислот в полипептидной цепи. Еще сравнительно недавно предполагали, что такой молекулой может служить рРНК. Это предположение как будто бы подкреплялось и опытами по заражению клеток *E. coli* ДНК фага. Оказалось, что немедленно после

заражения синтез нормальных клеточных ДНК прекращается и начинается интенсивный синтез фаговой ДНК. Более того, весь белоксинтезирующий аппарат клеток перестраивался на синтез только фаговых белков. 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. По мнению ряда известных ученых, 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 подобную скорость обновления нуклеотидного состава. Фактически рРНК оказалась метаболически малоактивной и весьма стабильной, поэтому становилось очевидным, что она не может служить в качестве матрицы.

В ряде лабораторий (в частности, в лаборатории С. Бреннера) были получены данные о возможности существования в клетках в соединении с рибосомами короткоживущей РНК\*, названной информационной (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 осуществляется синтез белка. Эта блестящая гипотеза затем экспериментально была доказана в лаборатории М. Ниренберга. При изучении влияния различных фракций клеточной РНК на способность рибосом, выделенных из *E. coli*, к синтезу белка было установлено, что некоторые из них стимулировали включение <sup>14</sup>C-аминокислот в синтезируемый полипептид. Добавление синтетического полинуклеотида, в частности полиуридилевой кислоты (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, искусственно синтезированный полирибонуклеотид, добавленный к препаратам рибосом, включавшим известные к тому времени факторы белкового синтеза и источники энергии, вызывал синтез определенного, запрограммированного полипептида.

Эти опыты открыли возможность для экспериментальной расшифровки всего генетического кода, при помощи которого информация от РНК передается на синтезируемый белок. Последовательность нуклеотидов РНК реализуется в специфической последовательности аминокислот синтезируемой полипептидной цепи. Опыты М. Ниренберга свидетельствуют также о том, что не рибосома и не рибосомная 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 белка, как и других полимерных молекул ДНК и РНК (см. ранее), в настоящее время получила подтверждение. Ее правомочность была доказана в экспериментах, которые обеспечивали точное воспроизведение первичной структуры полимерных молекул. Этот

\* Впервые на возможность существования в клетках быстро обменивающейся молекулы РНК было указано в работах А.Н. Белозерского и А.С. Спирина.

синтез в отличие от малоуправляемого 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

Проблема синтеза белка тесно связана с понятием генетического кода. Генетическая информация, закодированная в первичной структуре ДНК, еще в ядре переводится в нуклеотидную последовательность мРНК. Вопрос о том, каким образом эта информация передается на белковую молекулу, долго не был ясен. Первые указания на существование прямой линейной зависимости между структурой гена и его продуктом — белком можно найти у Ч. Яновского. В серии изящных опытов с применением методов генетического картирования и секвенирования он показал, что порядок изменений в структуре мутантного гена триптофансинтазы у *E. coli* точно соответствует порядку изменений в аминокислотной последовательности молекулы белка-фермента.

Эукариотические клетки обладают особым механизмом точного и эффективного перевода последовательности мРНК в соответствующую последовательность аминокислот синтезируемого белка. Сами молекулы мРНК не имеют сродства к аминокислотам, и было высказано предположение о том, что для перевода нуклеотидной последовательности мРНК на аминокислотную последовательность белков необходим некий посредник, названный адаптором (см. ранее). Молекула адаптора должна быть наделена способностью узнавать нуклеотидную последовательность специфической мРНК и соответствующую аминокислоту. Клетка, имеющая подобную адапторную молекулу, может встраивать каждую аминокислоту в подходящее место полипептидной цепи в строгом соответствии с нуклеотидной последовательностью мРНК. Остается, таким образом, незыблемым положение, что сами по себе функциональные группы аминокислот не способны вступать в контакт с матрицей и информационной мРНК.

Было показано, что в нуклеотидной последовательности мРНК имеются кодовые «слова» для каждой аминокислоты — генетический 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. Однако 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 входит 20 аминокислот. Для кодирования всех аминокислот белковой молекулы был бы достаточным триплетный код, когда число возможных комбинаций составит 64 ( $4^3 = 64$ ).

Из приведенных данных М. Ниренберга становится очевидным, что поли-У, т.е. РНК, гипотетически содержащая остатки только одного уридилowego 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 трех уридилowych нуклео-



тидов—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 (кодонами) для кодирования пролина и лизина.

В выяснении полного генетического кодового «словаря» выдающуюся роль сыграли разработанные Г. Хорана подходы к синтезу полирибонуклеотидов (искусственных мРНК) с определенными повторяющимися триплетными последовательностями (кополимеры). Их потом использовали в качестве матрицы в белоксинтезирующей системе. Образованные при этом полипептиды содержали равные количества аминокислот в полном соответствии с матрицей кополимера.

Вскоре в лабораториях М. Ниренберга, С. Очоа и Г. Хорана, пользуясь этими искусственно синтезированными мРНК, были представлены доказательства не только состава, но и последовательности триплетов всех кодонов, ответственных за включение каждой из 20 аминокислот в белковую молекулу. Приводим полный кодовый «словарь», т.е. все 64 кодона:

		Второй нуклеотид кодона				
		У	Ц	А	Г	
Первый нуклеотид кодона	У	УУУ } Фен	УЦУ } Сер	УАУ } Тир	УГУ } Цис	У
		УУЦ } Фен	УЦЦ } Сер	УАЦ } Тир	УГЦ } Цис	Ц
		УУА } Лей	УЦА } Сер	УАА } Терм	УГА } Терм	А
		УУГ } Лей	УЦГ } Сер	УАГ } Терм	УГГ } Трп	Г
Ц	Лей	ЦУУ } Лей	ЦЦУ } Про	ЦАУ } Гис	ЦГУ } Арг	У
		ЦУЦ } Лей	ЦЦЦ } Про	ЦАЦ } Гис	ЦГЦ } Арг	Ц
		ЦУА } Лей	ЦЦА } Про	ЦАА } Глн	ЦГА } Арг	А
		ЦУГ } Лей	ЦЦГ } Про	ЦАГ } Глн	ЦГГ } Арг	Г
А	Иле	АУУ } Иле	АЦУ } Тре	ААУ } Асн	АГУ } Сер	У
		АУЦ } Иле	АЦЦ } Тре	ААЦ } Асн	АГЦ } Сер	Ц
		АУА } Иле	АЦА } Тре	ААА } Лиз	АГА } Арг	А
		АУГ } Мет + Иниц	АЦГ } Тре	ААГ } Лиз	АГГ } Арг	Г
Г	Вал + Иниц	ГУУ } Вал	ГЦУ } Ала	ГАУ } Асп	ГГУ } Гли	У
		ГУЦ } Вал	ГЦЦ } Ала	ГАЦ } Асп	ГГЦ } Гли	Ц
		ГУА } Вал + Иниц	ГЦА } Ала	ГАА } Глу	ГГА } Гли	А
		ГУГ } Вал	ГЦГ } Ала	ГАГ } Глу	ГГГ } Гли	Г

Генетический код для аминокислот является вырожденным. Это означает, что значительное большинство аминокислот кодируется несколькими кодонами. За исключением метионина и триптофана, по существу все остальные аминокислоты имеют более одного специфического кодона. Узнавание кодона мРНК антикодомом тРНК основано не только на спаривании оснований, когда каждое основание кодона образует пару оснований с комплементарным азотистым основанием антикодона. В этом случае каждый антикодон, соответственно каждая молекула тРНК, может в принципе узнавать только один кодон мРНК. Имеются данные о том, что

некоторые тРНК могут узнавать более одного кодона. В частности, показано, что аланиновая тРНК, выделенная из дрожжей, узнает 3 кодона: ГЦУ, ГЦЦ и ГЦА. Как видно, различия касаются только природы 3-го нуклеотида. В связи с этим была выдвинута гипотеза «качаний», предполагающая, что на спаривание 3-го основания, очевидно, накладываются менее строгие ограничения и что имеется неполное, неоднозначное соответствие этого нуклеотида, являющееся, вероятнее всего, одной из причин вырожденности генетического кода. 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. Вполне допустимо поэтому предположение, что последовательность первых двух нуклеотидов определяет в основном специфичность каждого кодона, в то время как 3-й нуклеотид, очевидно, менее существен. В последнее время появились сторонники возможности существования гипотезы два из трех, означающей, что код белкового синтеза, возможно, является квази- или псевдодуплетным.

Оказалось, что вырожденность генетического кода имеет несомненный биологический смысл, обеспечивая организму ряд преимуществ. В частности, она способствует «совершенствованию» генома, так как в процессе точечной мутации, вызванной химическими или физическими факторами, возможны 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 точной и в высшей степени упорядоченной последовательности аминокислотных остатков в молекуле белка. В противном случае последовательность нуклеотидов в кодонах будет нарушена и приведет к синтезу «бессмысленной» полипептидной цепи с измененной структурой и непредсказуемой функцией. Следует указать еще на одну весьма существенную особенность кода — его универсальность для всех живых организмов от *E. coli* до человека. Код не подвергся существенным изменениям за миллионы лет эволюции.

Среди 64 мыслимых кодонов 61 имеет смысл, т.е. кодирует определенную аминокислоту. В то же время три из них, а именно УАГ, УАА, УГА, оказываются «бессмысленными»; они были названы нонсенс-кодонами, так как не кодируют ни одной из 20 аминокислот. Однако эти кодоны не лишены смысла, поскольку по крайней мере два из них выполняют важную функцию сигналов терминации в синтезе полипептида в рибосомах (функцию окончания, терминации синтеза).

При исследовании генетического кода в опытах *in vivo* также были получены доказательства универсальности кода, однако в последние годы выявлены некоторые особенности его в митохондриях животных, включая клетки человека. Генетический код цитоплазмы отличается от такового митохондрий 4 кодонами. Два кодона: АУГ, который обычно является инициаторным кодоном, кодирует также метионин в цепи, и УГА, являющийся нонсенс-кодоном, кодирует в митохондриях триптофан. Кодоны АГА и АГГ являются для митохондрий скорее терминирующими, а не кодирующими аргинин. В результате для считывания генетического кода митохондрий требуется меньше разных тРНК, в то время как цитоплазматическая система трансляции обладает полным набором тРНК.

# ЭТАПЫ СИНТЕЗА БЕЛКА

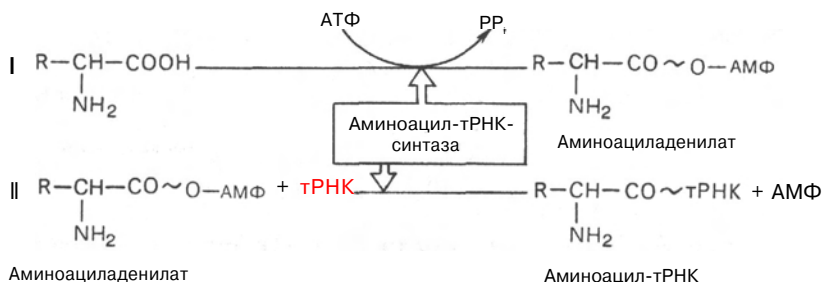
Синтез белка представляет собой циклический энергозависимый многоступенчатый процесс, в котором свободные аминокислоты полимеризуются в генетически детерминированную последовательность с образованием полипептидов. Система белкового синтеза, точнее система трансляции, которая использует генетическую информацию, транскрибированную в мРНК, включает участие множества разнообразных молекул (низкомолекулярные вещества и макромолекулы, а также надмолекулярные структуры). В табл. 14.1 обобщены известные к настоящему времени данные о составе белоксинтезирующей системы у про- и эукариот в каждой из 5 стадий синтеза, из которых 3 стадии (инициация, элонгация и терминация) по аналогии со стадиями синтеза полимерных молекул ДНК и РНК (см. главу 13) считаются главными и основными, а 2 стадии (активация аминокислот и постсинтетический процессинг) рассматриваются в качестве дополнительных, вспомогательных стадий синтеза. Более 100 макромолекул участвует в активировании аминокислот и их переносе на рибосомы (все тРНК, аминоацил-тРНК-синтетазы), более 60 макромолекул входит в состав 70S и 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 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 C-концом, т.е. процесс протекает в направлении  $\text{NH}_2 \rightarrow \text{COOH}$ .

Белковый синтез, или процесс трансляции, может быть условно разделен на 5 стадий, из которых две считаются подготовительными и завершающимися, в частности активирование аминокислот и постсинтетическая модификация белковой молекулы, и 3 стадии составляют собственно трансляцию.

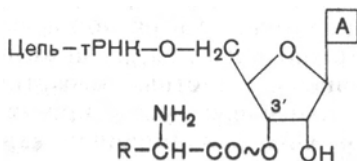
## Активирование аминокислот

Необходимым условием синтеза белка, который в конечном счете сводится к полимеризации аминокислот, является наличие в системе не свободных, а так называемых активированных аминокислот со своим внутренним запасом энергии. Активация свободных аминокислот осуществляется при помощи специфических ферментов—аминоацил-тРНК-синтетаз—в присутствии АТФ.

Этот процесс протекает в две стадии:



Обе стадии катализируются одним и тем же ферментом. На I стадии аминокислота вступает в реакцию с АТФ, при этом освобождается пирофосфат и образуется промежуточный продукт, который на II стадии реагирует с соответствующей 3'-ОН-тРНК, в результате чего образуется аминоацил-тРНК (aa-тРНК) и освобождается АМФ. Аминоацил-тРНК располагает необходимым запасом энергии и имеет следующее строение:



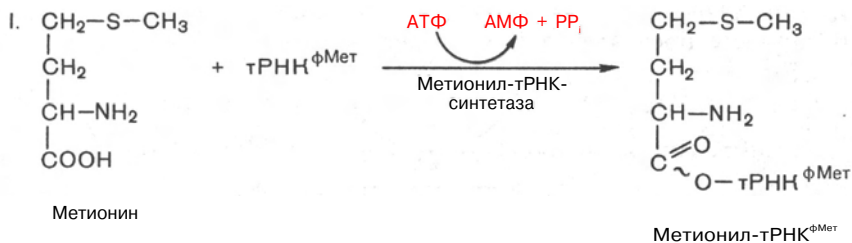
Необходимо еще раз подчеркнуть, что аминокислота присоединяется к свободному концевому 3'-ОН-гидроксилу (или 2'-ОН) АМФ, который вместе с двумя остатками ЦМФ образует концевой триплет ЦЦА, являющийся одинаковым для всех транспортных РНК.

## Процессы трансляции

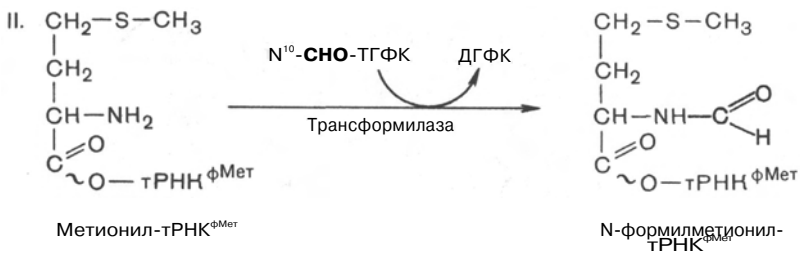
Многоступенчатый матричный синтез белка, или собственно трансляцию, протекающую в рибосоме, также условно делят на 3 стадии: инициацию, элонгацию и терминацию.

**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 аминоацил-тРНК (aa-тРНК), иницирующих кодонов в составе мРНК и белковых факторов инициации. Экспериментально доказано, что синтез белка иницирует единственная аминокислота—метионин. В кодовом «словаре» имеется только один кодон для метионина (АУГ), однако во всех живых организмах открыты две тРНК для метионина: одна используется при инициации синтеза белка, другая—для включения метионина во внутреннюю структуру синтезируемого полипептида в стадии элонгации (см. далее). Соответственно эти тРНК принято обозначать тРНК<sup>фМет</sup> и тРНК<sup>Мет</sup>. Укажем также, что эукариотическая клетка не нуждается в формилировании метионина.

У прокариот синтез N-формилметионил-тРНК протекает в две стадии:



Данную стадию катализирует метионил-тРНК-синтетаза. Реакция нуждается в доставке энергии гидролиза АТФ.

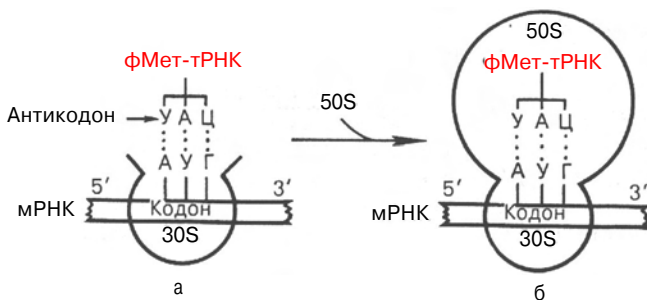


Катализирующая II стадию трансформилаза оказалась более специфичной, чем метионил-тРНК-синтетаза: она не формилирует ни свободный метионин, ни метионин в комплексе с тРНК<sup>Мет</sup>.

Таким образом, N-формилметионил-тРНК является первой aa-тРНК, которая определяет включение N-концевого остатка аминокислоты и тем самым начало трансляции. Процесс формилирования имеет важный химический и биологический смысл: блокируя участие NH<sub>2</sub>-группы метионина в образовании пептидной связи, он обеспечивает тем самым синтез белка в направлении NH<sub>2</sub>->COOH; образовавшаяся формилметионил-тРНК, кроме того, первой связывается с определенным участком 30S субчастицы рибосомы и с мРНК.

Необходимым условием инициации, как было отмечено, является также наличие иницирующих кодонов, кодирующих формилметионин. У бактерий эту функцию выполняют триплеты АУГ и ГУГ мРНК. Однако они кодируют формилметионин (или начальный метионин в эукариотической клетке) только будучи начальными триплетами при считывании мРНК. Если эти триплеты являются обычными, т.е. внутренними, то каждый из них кодирует свою аминокислоту: в частности, АУГ кодирует метионин, а ГУГ—валин. Ясно, что начальный, инициаторный 5'-АУГ-кодон должен чем-то отличаться от других АУГ-кодонов, возможно, структурой окружения триплета. Предполагают, что инициаторному 5'-АУГ-кодону у прокариот предшествует сигнальная полипуриновая (порядка от 8 до 13 оснований) последовательность (Shine-Dalgarno sequence), которая узнается полипиримидиновой 3'-антипараллельной последовательностью в молекуле 16S рРНК 30S субчастицы. Допускается, кроме того, существование определенных различий во вторичной структуре мРНК в участке иницирующего кодона, способствующих его узнаванию.

К настоящему времени выяснена природа белковых факторов инициации. У *E. coli* (см. табл. 14.1) открыты три таких иницирующих фактора, обозначаемых соответственно IF-1, IF-2, IF-3. Все они получены в высокоочищенном состоянии с примерными молекулярными массами 9000, 10000 и 22000 соответственно. IF-3 обеспечивает узнавание участка на молекуле мРНК, к которому присоединяется формилметионил-тРНК. Данный белковый фактор первым связывается со свободной 30S субчастицей рибосомы и препятствует ассоциации 30S и 50S субчастиц в 70S рибосому без молекулы мРНК. IF-1 способствует связыванию инициаторной формилметионил-тРНК с комплексом 30S субчастицы и мРНК. Белковый фактор IF-2, вероятнее всего, способствует объединению 30S и 50S субчастиц после того, как на первой субчастице уже присутствуют иницирующие кодоны мРНК, N-формилметионил-тРНК, IF-3, IF-1 и ГТФ. Этот белок рассматривают как фактор стабилизации всего инициаторного 70S комплекса (см. далее).

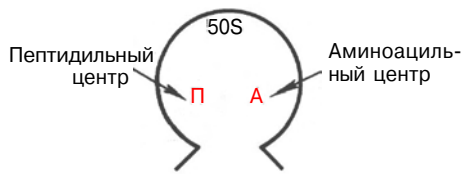


**Рис. 14.5.** Схематическое изображение взаимодействия формилметионил-тРНК и мРНК с 30S субчастицей рибосомы (а) и транслирующей (функционально активной) 70S рибосомой (б).

Аналогичные белковые факторы инициации обнаружены также в эукариотических клетках. Открыто около 10 эукариотических белковых факторов инициации (см. табл. 14.1), их принято обозначать eIF. Все они, по-видимому, важны для инициации, однако только три из них абсолютно необходимы и существенны для белкового синтеза: eIF-2, eIF-3 и eIF-5. Они получены в чистом виде: eIF-2 состоит из  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц (мол. масса 38000, 47000 и 50000 соответственно), eIF-3 (мол. масса 500000–700000) и eIF-5 (мол. масса 125000). Укажем также, что в синтезе белка их роль тождественна роли инициаторных белков у прокариот. Отличительной особенностью синтеза белка у эукариот является, кроме того, наличие среди 10 белковых факторов инициации еще одного белка, названного кэп-связывающим. Соединяясь с 5'-участком кэп мРНК, этот белок содействует образованию комплекса между мРНК и 40S рибосомной субчастицей. Необходимо отметить, что до сих пор не раскрыты тонкие молекулярные механизмы участия белковых факторов инициации как у про-, так и у эукариот в сложном процессе синтеза белка.

Образование инициаторного комплекса. Экспериментально доказано, что в процессе белкового синтеза наблюдаются постоянная диссоциация 70S рибосом на 30S и 50S субчастицы и последующая их реассоциация. Сначала образуется инициаторный комплекс путем присоединения белковых факторов, формилметионил-тРНК и ГТФ к 30S субчастице, к которой комплементарно антикодону формилметионил-тРНК присоединяется мРНК при участии кодона АУГ (рис. 14.5).

Следует указать на особую роль формилметионил-тРНК: она помогает мРНК найти на 30S субчастице определенное местоположение, обеспечивающее точную трансляцию информации о последовательности аминокислот в полипептидной цепи (установление рамки). Как только мРНК присоединяется к комплексу, высвобождается белковый фактор IF-3 и 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 этом комплексе формилметионил-тРНК оказывается прикрепленной к пептидильсвязывающему центру рибосомы. В гидролизе ГТФ принимает участие IF-2. У образовавшейся активной, полностью сформированной 70S рибосомы, содержащей формилметионил-тРНК, оказывается свободным аминокатильный центр, который может



**Рис. 14.6.** 50S субчастица рибосомы с двумя центрами связывания тРНК.

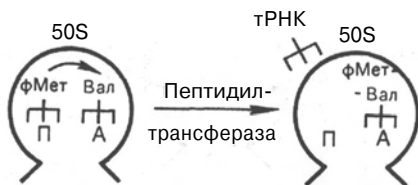
реагировать с определенной аа-тРНК, соответствующей очередному кодону мРНК. С этого момента начинается II этап синтеза белка—элонгация.

**Элонгация трансляции.** Процесс элонгации полипептидной цепи у *E. coli* начинается с образования первой пептидной связи и непосредственно, точнее топографически, связан с большой субчастицей (50S) рибосомы, содержащей два центра для связывания тРНК: один из них называется аминоацильным (А), другой—пептидильным (П) (рис. 14.6).

В процессе элонгации у *E. coli* также участвует три белковых фактора — элонгационные факторы трансляции, сокращенные обозначаемые Tu, Ts и G (см. табл. 14.1): EF-Tu (мол. масса 43000), EF-Ts (мол. масса 35000) и EF-G (мол. масса 80000). У эукариот также открыты три таких фактора, названных эукариотическими элонгационными факторами трансляции и обозначаемых соответственно eEF-1 $\alpha$  (мол. масса 53000), eEF-1 $\alpha\beta$  (мол. масса 30000) и eEF-2; почти все они получены в чистом виде, для ряда из них установлена первичная структура.

Процесс элонгации принято делить на 3 стадии: узнавание кодона и связывание аминоацил-тРНК, образование пептидной связи и транслокация. На I стадии в соответствии с природой кодона мРНК в свободный А-участок рибосомы доставляется аминоацил-тРНК при участии фактора элонгации Tu. Этот процесс требует затраты энергии и сопряжен с гидролизом ГТФ и образованием прочно связанного комплекса Tu—ГТФ. Образовавшийся комплекс подвергается диссоциации только в присутствии второго фактора элонгации Ts, при котором освободившийся фактор Tu может вновь, соединяясь с молекулой ГТФ, принять участие в доставке аа-тРНК в рибосому. Таким образом, в транслирующей 70S рибосоме в пептидильном центре располагается формилметионил-тРНК, а в А-центре—аминоацил-тРНК (первая аминокислота после метионина). С этого момента начинается II стадия элонгации—образование первой пептидной связи. Для этого в рибосоме осуществляется ферментативная реакция транспептидирования между формилметионил-тРНК в П-центре и новой аа-тРНК в А-центре. В процессе этой реакции остаток формилметионина переносится на свободную NH<sub>2</sub>-группу аа-тРНК и замыкается первая пептидная связь в будущей полипептидной цепи. Параллельно из пептидильного центра освобождается тРНК<sup>Met</sup> в цитозоль. Фермент, катализирующий реакцию транспептирования, получил название пептидилтрансферазы (рис. 14.7); он, вероятнее всего, является составной частью белков 50S субчастицы. Таким образом, в процессе транспептидазной реакции в А-центре образуется дипептидил-тРНК, а П-центр остается свободным («вакантным»).

На III стадии процесса элонгации необходимо иметь свободный аминоацильный центр для присоединения следующей аа-тРНК. Для этого благодаря процессу транслокации образовавшийся фрагмент дипептидил-тРНК переносится от аминоацильного на пептидильный центр. Достигается

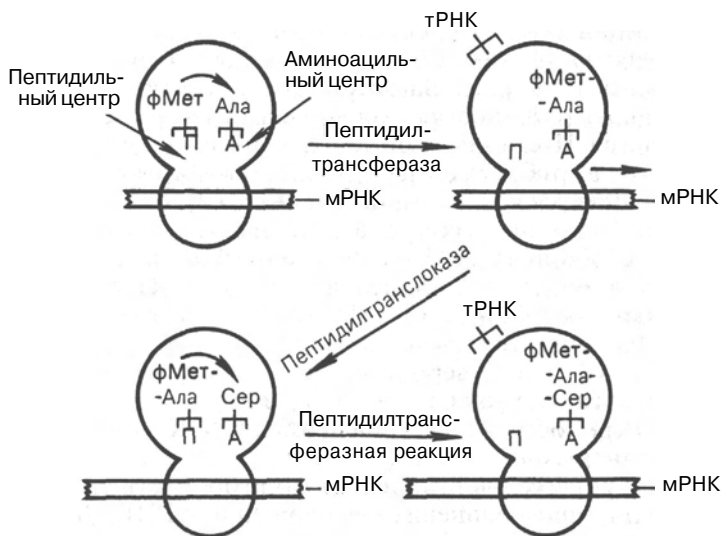


**Рис. 14.7.** Перенос фМет-тРНК между двумя центрами (П и А) на большой 50S субчастице рибосомы.

транслокация благодаря передвижению рибосомы относительно мРНК при участии фермента транслоказы (функцию ее выполняет фактор элонгации G у *E. coli* и eEF-2 у эукариот) за счет использования энергии распада еще одной молекулы ГТФ. В результате транслокации дипептидный тРНК занимает место в пептидном центре рибосомы, а аминоацильный центр освобождается для нового цикла узнавания и может присоединить новую следующую аа-тРНК, соответствующую кодону мРНК. 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. 14.8 видно, что рибосома вступает в следующий цикл—происходит присоединение третьего аминокислотного остатка и т.д.

Таким образом, на стадии элонгации происходит последовательное наращивание полипептидной цепи по одной аминокислоте в строгом соответствии с последовательностью триплетов (кодонов) в молекуле мРНК.

Существенным является выяснение вопроса о количестве энергии, необходимой для синтеза одной пептидной связи при биосинтезе белка. Как было отмечено, при активировании аминокислоты еще до стадии инициации, т.е. при формировании аа-тРНК, расходуется энергия распада АТФ на АМФ и пирофосфат, что приблизительно эквивалентно гидролизу



**Рис. 14.8.** Процесс элонгации полипептидной цепи (схема).



2 молекул АТФ до 2 молекул АДФ, поскольку пирофосфат подвергается распаду на 2 молекулы неорганического фосфата. 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 (т.е. гидролиз четырех макроэргических фосфатных связей) 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.** На IV стадии биосинтеза белка завершается синтез полипептидной цепи в 70S рибосоме при участии трех белковых факторов терминации (рилизинг-факторов). Эти белки обозначаются RF-1 (мол. масса 47000), RF-2 (мол. масса 35000–48000) и RF-3 (мол. масса 46000) у прокариот (см. табл. 14.1). В клетках животных открыт единственный белок с аналогичным свойством – рилизинг-фактор R (eRF, мол. масса 56000–105000). У *E. coli* RF-1 наделен свойством узнавания в молекуле мРНК терминирующих кодонов УАГ и УАА, а RF-2 – соответственно УГА и УАА. Эукариотический рилизинг-фактор eRF узнает все три терминирующих кодона (нонсенс-кодона) и индуцирует освобождение синтезированного полипептида опосредованно через пептидилтрансферазу. После того как терминирующий кодон мРНК занимает свое место в аминокислотном центре рибосомы, к нему присоединяется не тРНК, поскольку отсутствуют соответствующие антикодоны тРНК, узнающие этот терминальный сигнал, а один из белковых факторов терминации и блокируется дальнейшая элонгация цепи. Считают, что терминирующие кодоны и белковые факторы индуцируют изменение специфичности пептидилтрансферазной активности таким образом, что она катализирует перенос растущей пептидной цепи, скорее, к молекуле воды, вызывая гидролиз, чем к аминокислоте. Следствием этого являются отделение белковой молекулы от рибосомы и освобождение молекул тРНК и мРНК (последняя подвергается распаду до свободных рибонуклеотидов). Одновременно 70S рибосома диссоциирует 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. 14.9. ГТФ в терминации трансляции у *E. coli* рассматривается в качестве аллостерического регулятора, а у эукариотов ГТФ, вероятнее всего, распадается на ГДФ и  $P_i$ .

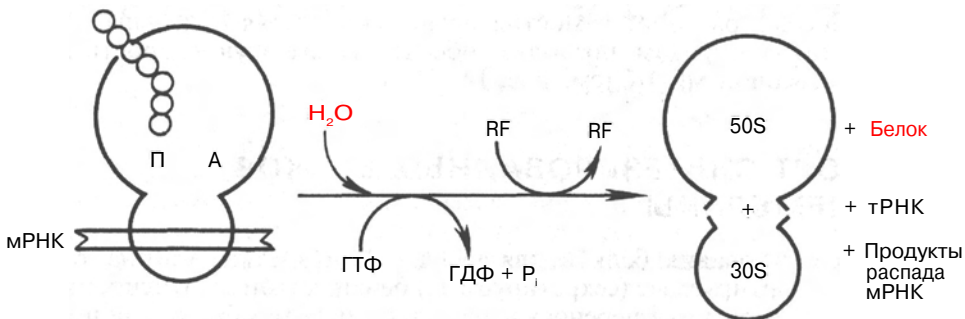
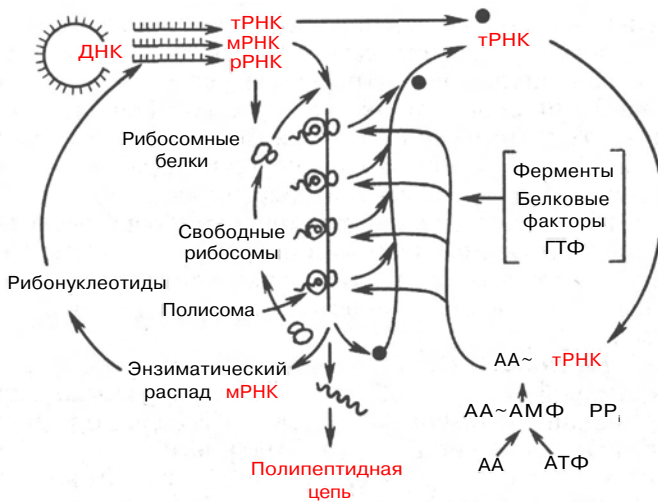
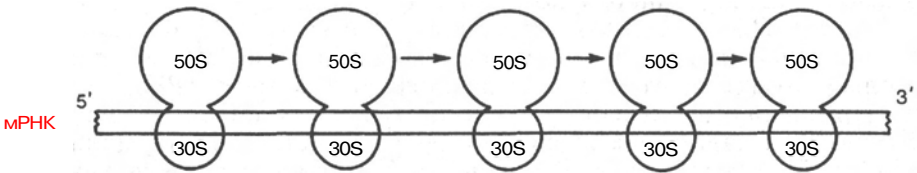


Рис. 14.9. Процесс терминации синтеза белка (схема).



**Рис. 14.10.** Схематическое изображение роли разных типов РНК в синтезе белка (по Уотсону).



**Рис. 14.11.** Схематическое изображение организации бактериальной полирибосомы (полисомы) и движения рибосом вдоль мРНК.

В общей форме зависимость между репликацией ДНК, транскрипцией и трансляцией мРНК представлена на рис. 14.10. 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 (рис. 14.11). Они значительно повышают эффективность использования мРНК, т.е. ускоряют синтез белка.

Рибосомы движутся в направлении 5' → 3' вдоль цепи мРНК, причем каждая рибосома работает самостоятельно, синтезируя отдельный белок. Полисома, таким образом, позволяет обеспечить высокую скорость трансляции единственной мРНК (см. рис. 14.11).

## ТРАНСПОРТ СИНТЕЗИРОВАННЫХ БЕЛКОВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ

Помимо использования белков для нужд самой клетки, многие так называемые экспортируемые (секретируемые) белки, которые функционируют вне клетки, подвергаются переносу через клеточную мембрану при помощи особых низкомолекулярных пептидов (от 15 до 30 аминокислотных остат-

ков), получивших название лидирующих, или сигнальных, пептидов. Особенность их состава—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 эндоплазматического ретикулула, 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 специфической лидирующей (сигнальной) пептидазы, а зрелый белок через пластинчатый комплекс (аппарат Гольджи) покидает 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—поринов, химическая природа и механизм действия которых выяснены пока недостаточно.

## **СИНТЕЗ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ**

В митохондриях клеток высших организмов (см. главу 13) содержится до 2% клеточной ДНК, отличающейся от ДНК ядра по массе и структуре. Митохондрии имеют весь аппарат, включая рибосомы, тРНК и мРНК, необходимый для синтеза определенных белков. Синтезируемые в митохондриях белки являются нерастворимыми белками и участвуют в основном в организации структуры этих же органелл, в то время как местом синтеза растворимых 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**

На V, последней, стадии синтеза белка происходят формирование третичной структуры и процессинг молекулы полипептида. Синтезированная на рибосоме в строгом соответствии с генетической программой линейная одномерная полипептидная молекула уже содержит определенную информацию. Такая молекула называется конформационной, т.е. она претерпевает не хаотичные структурные изменения, а подвергается превращению (процессингу) в строго 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 «пост-синтетическая, или посттрансляционная, модификация». Подобные модификации структуры полипептида начинаются или сразу после трансляции, или еще до окончания формирования третичной структуры белковой молекулы.

Помимо указанного процесса протеолитического удаления сигнального пептида, во многих белках отщепляется начальный N-концевой метионин. Оказалось, что в прокариотических клетках имеются особые ферменты, модифицирующие N-концевые остатки, в частности деформилаза, катализирующая отщепление формильной группы от N-концевого метиона, 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 некоторые пробелки, или проферменты (например, трипсиноген, химо-трипсиноген и др.), и предшественники гормонов (например, препроинсулин, пре- $\beta$ -липотропин и др.). В ряде случаев наблюдается и C-концевая модификация синтезированного белка.

Как известно, участок ДНК, несущий информацию о синтезе индивидуального белка, называется геном, а участок, контролирующей синтез единственной полипептидной цепи и ответственный за него, — цистроном. Следовательно, если белок состоит из нескольких (более одного) полипептидов, то естественно предположить, что в синтезе такого белка должны участвовать несколько (более одного) цистронов. Это не всегда соответствует действительности, особенно если полипептидные цепи идентичны (например,  $\alpha_2$ - и  $\beta_2$ -цепи гемоглобина). Если, например, пептидные цепи какой-либо одной белковой молекулы являются неидентичными, то это не всегда означает, что они синтезируются как результат действия разных цистронов. Подобный белок может синтезироваться в виде единственной полипептидной цепи с последующими протеолитическими разрывами в одном или нескольких местах и отщеплением неактивных участков. Типичным примером подобной 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 разных размеров и последовательности полипептидные цепи (см. рис. 1.14).

Следует подчеркнуть, однако, что значительно больший удельный вес имеет **посттрансляционная химическая модификация белков**, затрагивающая радикалы отдельных аминокислот. Одной из таких существенных модификаций является ковалентное присоединение протетической группы к молекуле белка. Например, только после присоединения пиридоксальфосфата к  $\epsilon$ -аминогруппе остатка лизина белковой части — апоферменту — образуется биологически активная трехмерная конфигурация аминотрансфераз, катализирующих реакции трансаминирования аминокислот. Некоторые белки подвергаются гликозилированию, присоединяя олигосахаридные остатки (образование гликопротеинов), и обеспечивая тем самым доставку белков к клеткам-мишеням. Широко представлены химические модификации белков в результате реакции гидроксилирования остатков пролина, лизина (при формировании молекул коллагена), реакции метилирования (остатки лизина, глутамата), ацетилирования ряда N-концевых аминокислот, реакции карбоксилирования остатков глутамата и аспартата ряда белков (добавление экстракарбоксильной группы). В частности, протромбин (белок свертывающей

системы крови) содержит ряд  $\gamma$ -карбоксихлутаматных остатков на N-конце, в образовании которых активное участие принимает витамин K, содержащий фермент. Предполагают, что  $\gamma$ -карбоксихлутаматные остатки принимают участие в связывании ионов  $Ca^{2+}$ , необходимых для инициации свертывания крови.

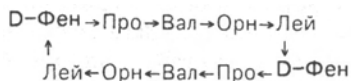
Одной из широко распространенных химических постсинтетических модификаций является фосфорилирование остатков серина и треонина, например, в молекуле гистоновых и негистоновых белков, а также казеина молока. Фосфорилирование-дефосфорилирование OH-группы серина абсолютно необходимо для множества ферментов, например для активности гликоген-фосфорилазы и гликоген-синтазы. Фосфорилирование некоторых остатков тирозина в молекуле белка в настоящее время рассматривается как один из возможных и специфических этапов формирования онкобелков при малигнизации нормальных клеток. Хорошо известны также реакции окисления двух остатков цистеина и образование внутри- и межцепочечных дисульфидных связей при формировании третичной структуры (фолдинг). Этим обеспечивается не только защита от внешних денатурирующих агентов, но и образование нативной конформации и проявление биологической активности.

Менее известны реакции фарнезилирования остатков цистеина ряда белков: белка G (см. главу 8), группы белков ядерного матрикса, а также белков-онкогенов *ras* и протоонкогенов; источником изопренильных групп является фарнезил-пирофосфат (промежуточный продукт при синтезе холестерина). Получены доказательства, что блокирование реакции фарнезилирования, вызванное специфическими препаратами (ингибиторами), приводит к потере канцерогенной активности онкогена *ras*. Эти результаты могут служить основой для разработки эффективных средств борьбы с опухолевыми заболеваниями человека, основанными на ингибировании посттрансляционной модификации белков вообще или онкобелков в частности.

Следует отметить, что, хотя биосинтез белка, представляющий сложный многоступенчатый процесс, подробно описан во многих обзорах и монографиях, наши знания о структурно-функциональных взаимоотношениях многих его этапов все еще недостаточны. Действительно, выделены и охарактеризованы рибосомы (более полно у *E. coli*), состоящие из множества индивидуальных белков и 3 типов молекул РНК; более того, выяснена аминокислотная последовательность всех 55 белковых молекул, первичная и вторичная структура 3 типов РНК, интенсивно изучается трехмерная структура отдельных белков рибосом прокариот. Тем не менее многие существенные детали механизма белкового синтеза неясны. Например, недостаточно известно, какие участки или составные части рибосом ответственны за инициацию, элонгацию и терминацию белкового синтеза; каков молекулярный механизм процессов транслокации, пептидилтрансферазной реакции; каковы тонкие взаимодействия рибосом с белковыми факторами, мРНК, тРНК и антибиотиками. Потребуется еще немало усилий для определения полной молекулярной архитектуры рибосом и отдельных ее субчастиц, а также для выяснения и получения точных данных об их третичной структуре, форме и размерах, достаточных для раскрытия на молекулярном уровне функций рибосомы в сложном процессе синтеза белка.

**Внерибосомный механизм синтеза пептидов.** Накопленные данные, действительно, свидетельствуют о том, что матричный механизм синтеза лежит в основе биосинтеза почти всех белков живых организмов. Тем не

менее синтез ряда низкомолекулярных (коротких) пептидов в биологических системах может осуществляться не только без участия нуклеиновых кислот, в частности без матричной мРНК, но даже в отсутствие 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 циклических пептидных антибиотиков—грамицидина S и тироцидина как в цельных экстрактах, полученных из *Bacillus brevis*, так и в изолированных из экстрактов белковых фракциях. В частности, выделенные из экстрактов *B. brevis* и очищенные два белковых препарата обеспечивали точность сборки циклического полипептида—грамицидина S, состоящего из 10 аминокислотных остатков, расположенных в строгой последовательности. Очищенные белковые фракции (с мол. массами 100000 и 180000) требовали присутствия только свободных аминокислот, АТФ и ионов  $Mg^{2+}$  для синтеза этого циклического декапептида (О-фенилаланилпролилвалилорнитиллейцин);



Показано, что именно легкая белковая фракция (мол. масса 100000) обеспечивает рацемизирование и включение D-фенилаланина в первую полипептидную цепь, а тяжелая фракция (мол. масса 180000)—включение 4 остальных L-аминокислот; оба фермента принимают участие также и в образовании пептидных связей. 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 аминокислотаденилатов (при участии этих же ферментов), из которых остатки аминокислот затем переносятся на SH-группы обоих ферментов. При этом образуются активированные промежуточные тиоэфирсы, подобные тиоэфирам при синтезе высших жирных кислот (см. главу 11). В структуре первого (легкого) фермента открыт ковалентно связанный остаток фосфопантотеина, поэтому предполагают участие его тиоловой группы в переносе растущей пептидной цепи с одного участка фермента на другой. Аналогичный механизм синтеза доказан также для антибиотика тироцидина (декапептид) и для 13-членного циклического пептида—антибиотика микобациллина.

Таким образом, природа (условно в лице бактериальной клетки), очевидно, не утратила полностью существовавшего до матричного, рибосомного, пути атактистического механизма синтеза белковых тел и используется для этого весьма примитивными, но достаточно эффективными приемами.

## РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА БЕЛКА

Основным условием существования любых живых организмов является наличие тонкой, гибкой, согласованно действующей системы регуляции, в которой все элементы тесно связаны друг с другом. В белковом синтезе не только количественный и качественный состав белков, но и время синтеза имеют большое значение. 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.

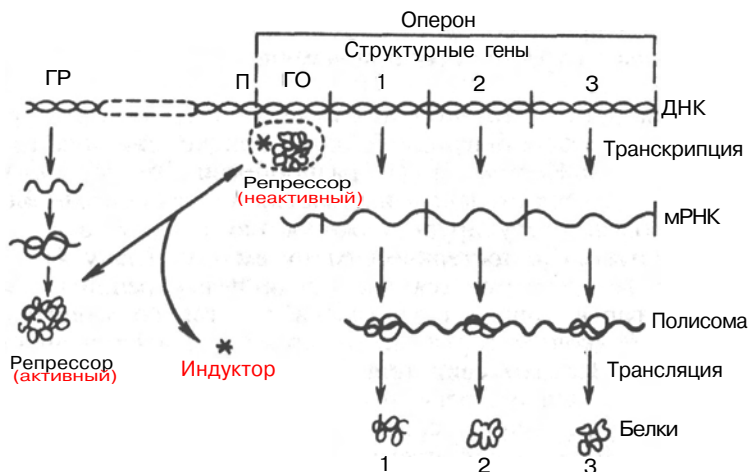
Клетки живых организмов обладают способностью синтезировать огромное количество разнообразных белков. Однако они никогда не синтезируют все белки. Количество и разнообразие белков, в частности ферментов, определяются степенью их участия в метаболизме. Более того, интенсивность обмена регулируется скоростью синтеза белка и параллельно контролируется аллостерическим путем (см. главу 4). Таким образом, синтез белка регулируется внешними и внутренними факторами и условиями, которые диктуют клетке синтез такого количества белка и такого набора 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 французские ученые, лауреаты Нобелевской премии 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 на синтез специфических белков. Эта теория, доказанная в опытах на бактериях, получила широкое признание, хотя в эукариотических клетках механизмы регуляции синтеза белка, вероятно всего, являются более сложными (см. далее). У бактерий доказана индукция ферментов (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 синтеза ферментов. Оба явления — индукция и репрессия — взаимосвязаны.

Согласно теории Ф. Жакоба и Ж. Моно, в биосинтезе белка у бактерий участвуют по крайней мере 3 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, служит матрицей для биосинтеза белка. Регуляция синтеза белка путем индукции представлена на рис. 14.12.

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, расположенного рядом с геном-оператором и являющегося точкой инициации для синтеза мРНК, и распространяется последовательно вдоль оператора и структурных генов. Синтезированную молекулу мРНК, кодирующую синтез нескольких разных белков, принято называть полигенным (полицистронным) транскриптом. Координированный одним оператором одиночный ген или группа структурных генов образует оперон.

В свою очередь деятельность оперона находится под контролирующим влиянием другого участка цепи ДНК, получившего название гена-регулятора. Структурные гены и ген-регулятор расположены в разных участках цепи ДНК, поэтому связь между ними, как предполагают



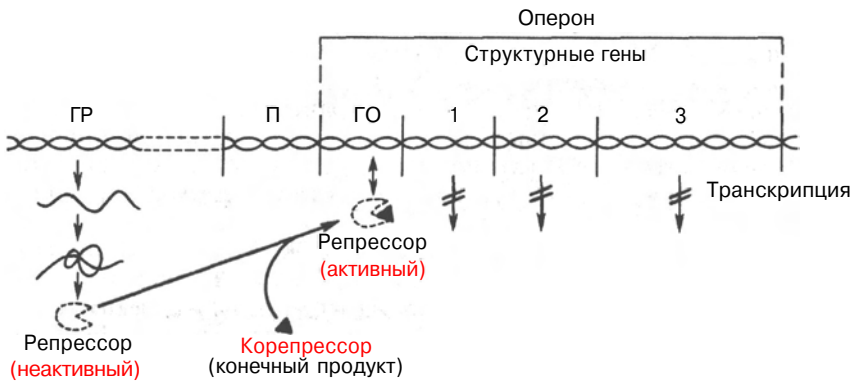
**Рис. 14.12.** Регуляция синтеза белка путем индукции (схема).

ГР- ген-регулятор; П- промотор; ГО - ген-оператор.

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 (рис. 14.13). 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 (запрещать) деятельность структурных генов, синтезирующих мРНК. Репрессор, кроме того, обладает способностью строго специфически связываться с определенными низкомолекулярными веществами, называемыми индукторами, или эффекторами. Если такой индуктор соединяется с репрессором, то 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. Процесс этот 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 с *E. coli* на примере синтеза  $\beta$ -галактозидазы (лактазы) — фермента, расщепляющего молочный сахар на глюкозу и галактозу. Дикая штамм *E. coli* обычно растет на глюкозе. Если вместо глюкозы в питательную среду добавить лактозу (новый источник энергии и углерода), то штамм не будет расти, пока не будут синтезированы соответствующие ферменты (адаптивный синтез). При поступлении в клетку лактозы (индуктор) молекулы ее связываются с белком-репрессором и блокируют связь между репрессором и геном-оператором. Ген-оператор и структурные гены при этом начинают снова функционировать и синтезировать необходимую мРНК, которая





**Рис. 14.13.** Регуляция синтеза белка путем репрессии (схема).  
 Обозначения те же, что на рис. 14.12.

«дает команду» рибосомам синтезировать  $\beta$ -галактозидазу. Одновременно ген-регулятор продолжает вырабатывать репрессор, но последний 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  $\beta$ -галактозидазы в рибосомах.

Таким образом, биосинтез мРНК, контролирующей синтез белка в рибосомах, зависит от функционального состояния репрессора. Этот репрессор представляет собой тетрамерный белок с общей мол. массой около 150000. Если он находится в активном состоянии, т.е. не связан с индуктором, то 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, снижают его сродство к гену-оператору). Структурные гены выходят из-под запрещающего контроля и начинают синтезировать нужную мРНК.

Как было указано, концентрация ряда ферментов в клетках резко снижается при повышении содержания отдаленных конечных продуктов, образующихся в цепи последовательных ферментативных реакций. Такой эффект, получивший название репрессии ферментов, часто наблюдается при реакциях биосинтеза. В этих случаях 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 (см. рис. 14.13).

Конечный продукт выступает, таким образом, в качестве корепрессора. Имеются данные, что в качестве корепрессоров в синтезе ферментов обмена аминокислот, по-видимому, выступает не только свободная аминокислота как конечный продукт биосинтетической реакции, но и комплекс ее с тРНК—аминоацил-тРНК.

В регуляции экспрессии структурных генов специфическое участие принимает особый белок—катаболитный генактивирующий белок (от англ.

catabolite gene activation protein, сокращенно CAP). Этот белок, взаимодействующий с цАМФ, образует 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.

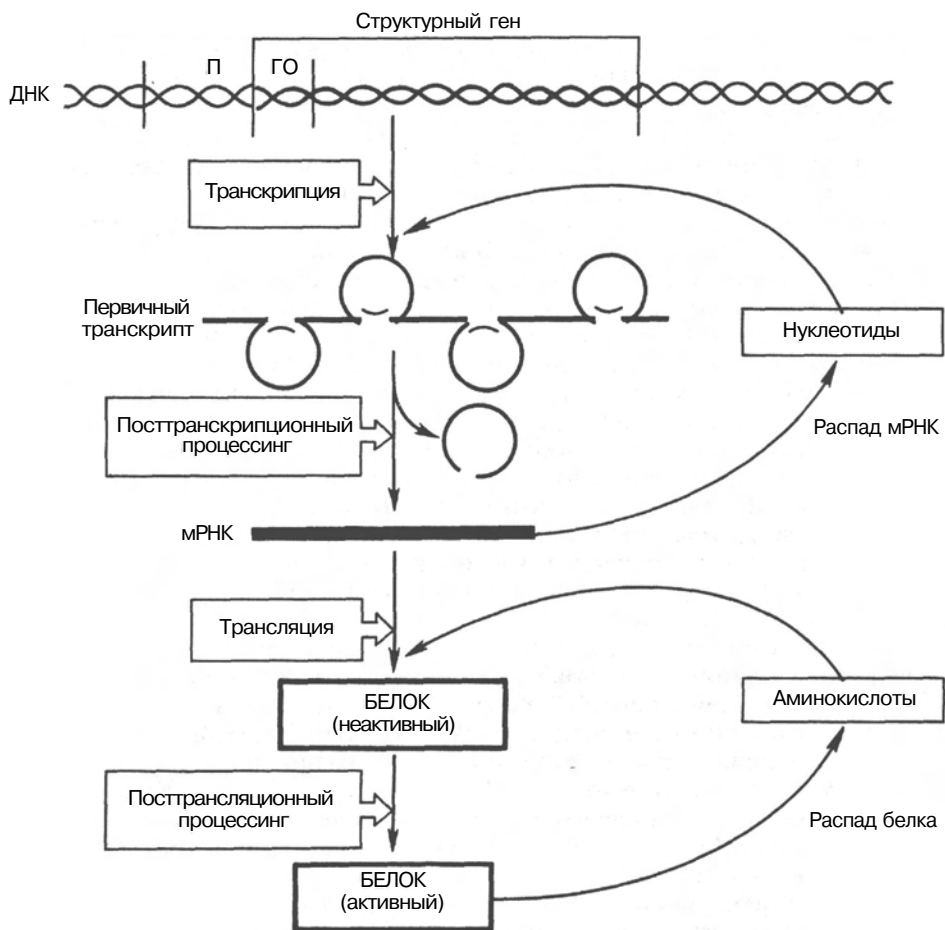
Таким образом, концепция Ф. Жакоба и Ж. Моно о механизме проявления (экспрессии) активности генов признана одним из блестящих достижений молекулярной биологии. Она явилась логическим развитием многочисленных исследований, проведенных генетиками и биохимиками в предшествующие десятилетия.

Регуляция экспрессии активности генов у эукариот осуществляется значительно более сложным путем, поскольку процессы транскрипции и трансляции разделены не только пространственно ядерной биомембраной, но и во времени. Эта регуляция базируется как минимум на 6 уровнях сложных биологических процессов, определяющих скорость синтеза и распада генетического продукта (рис. 14.14).

Для большинства эукариотических клеток, как и клеток прокариот, стадия инициации транскрипции является основной, главной регуляторной точкой экспрессии активности генов. Тем не менее имеются существенные различия: во-первых, место процессов транскрипции (в ядре) и трансляции (в цитоплазме); во-вторых, активирование транскрипции у эукариот связано с множеством сложных изменений структуры хроматина в транскрибируемой области; в-третьих, в эукариотических клетках преобладают положительные регуляторные механизмы над отрицательными.

Положительная или отрицательная регуляция определяется типом белков, вовлеченных в механизм регуляции. Получены доказательства существования минимум 3 типов белков, участвующих в регуляции процесса инициации транскрипции, опосредованного через РНК-полимеразу: специфические факторы, репрессоры и активаторы. Первые вызывают изменение специфичности РНК-полимеразы к данному промотору или группе промоторов; репрессоры связываются с промотором, блокируя тем самым доступ РНК-полимеразы к промотору; активаторы, напротив, связываются вблизи промоторного участка, повышая связывание промотора и РНК-полимеразы.

В многоклеточных организмах среднее число регуляторных сайтов для одного гена минимум равно пяти; положительные регуляторные белки связываются со своими специфическими последовательностями в структуре ДНК (вероятнее всего, посредством водородных связей между амидной группой Глн или Асн и пуриновыми и пиримидиновыми основаниями нуклеотидов). Следует указать еще на один момент, почему эукариотическая клетка использует положительные механизмы регуляции экспрессии генов. Подсчитано, что в геноме человека содержится около 100000 генов, соответственно каждая клетка при отрицательном механизме регуляции могла бы синтезировать 100000 разных репрессоров, причем в достаточных количествах. При положительном механизме регуляции большинство генов в принципе неактивно, соответственно молекула РНК-полимеразы не связывается с промотором и клетка синтезирует ограниченный и избирательный круг активаторных белков, необходимых для инициации транскрипции.



**Рис. 14.14.** Схематическое изображение регуляции экспрессии активности гена у эукариот.

У эукариот выделены и охарактеризованы также пять регуляторных белков, получивших название транскрипционных факторов (ТФ: ПА, ПВ, ПД, ПЕ и ПФ). Они необходимы для узнавания участка (сайта) ДНК, названного ТАТА (consensus последовательности, ТАТАААА). Детальный молекулярный механизм действия факторов транскрипции пока не раскрыт.

Более подробно в структурном и функциональном отношении у эукариот изучена группа белков, получивших название белков-активаторов транскрипции. Эти белки имеют специфические структурные домены для связывания с другими, но определенными регуляторными нуклеотидными последовательностями в молекуле ДНК. В частности, они содержат домен, специфически связывающийся с ДНК, и один или несколько доменов, необходимых для активирования или взаимодействия с другими регуляторными белками. Среди этих белков-активаторов транскрипции имеются белки, содержащие богатые глутамином домены (до 25%) и богатые пролином домены. Следует отметить, однако, что не-

которые из них или почти все регуляторные белки активируют транскрипцию не прямо, а опосредованно—через промежуточные белки, названные коактиваторами. Происхождение и механизм действия последних также не выяснены.

Современные знания о механизмах регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях (см. рис. 14.4) были подробно рассмотрены ранее (см. главы 13 и 14).

Рассмотрим кратко вопрос о регуляции процессов дифференцировки клеток высших организмов. ДНК, присутствующая во всех соматических клетках, вероятнее 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 имеется весьма тонкий механизм контроля деятельности ДНК в разных тканях, обеспечивающий синтез многообразия белков.

Механизмы, лежащие в основе этой регуляции, пока неизвестны. Для их объяснения существует ряд гипотез. Предполагают, 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. С молекулой ДНК у эукариот связаны гистоны, поэтому считается, что именно эти белки выполняют роль репрессоров. Прямых доказательств их роли в качестве репрессоров не получено, хотя, как было показано, в клетках эукариот открыт класс регуляторных белков процесса транскрипции. Высказано предположение, что в ядре синтезируется высокомолекулярная молекула мРНК, содержащая информацию для синтеза широкого разнообразия белков, но в цитоплазму попадает только небольшая часть зрелой мРНК, а основная часть ее распадается. Неясны, однако, биологический смысл и назначение этого механизма избирательного распада и соответственно траты огромной массы молекулы мРНК.

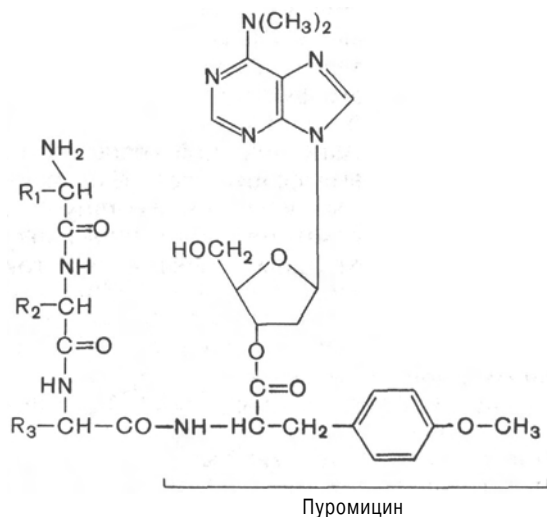
Существует еще одно предположение, что на ДНК клетки синтезируются все мыслимые, возможные мРНК, которые поступают в цитоплазму, и процесс трансляции регулируется путем специфического и избирательного взаимодействия рибосом с определенными молекулами мРНК.

## **Ингибиторы синтеза белка**

Один из путей выяснения тонких молекулярных механизмов синтеза нуклеиновых кислот и белков в клетках—использование таких лекарственных препаратов, которые могли бы избирательно тормозить эти процессы у бактерий, не влияя на клетки организма человека. Некоторые препараты, действительно, оказывают такое избирательное действие, взаимодействуя с белками рибосом прокариот и выключая бактериальный синтез белка. Однако многие из них являются токсичными и для человека. В настоящее время в медицинской практике применяются многие антибиотики, часть из которых будет рассмотрена с целью выяснения молекулярного механизма их действия на ключевые химические реакции синтеза белка и нуклеиновых кислот.

Один из мощных ингибиторов белкового синтеза—пурамицин. Он представляет собой аналог концевой участка аминокил-тРНК адениловой

кислоты и поэтому легко взаимодействует с А-центром пептидил-тРНК с образованием пептидил-пурамицина\*:



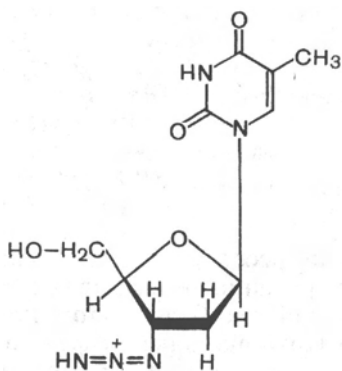
Пептидил-пурамицин не несет на себе триплета антикодона и поэтому тормозит элонгацию пептидной цепи, вызывая обрыв реакции, т.е. преждевременную терминацию синтеза белка. При помощи пурамицина было доказано, например, что гормональный эффект в ряде случаев зависит от синтеза белка *de novo*. Укажем также, что пурамицин оказывает тормозящее действие на синтез белка как у прокариот, так и у эукариот.

Белковый синтез тормозится актиномицином D, обладающим противопухолевым эффектом, однако вследствие высокой токсичности препарат применяется редко. Он тормозит синтез всех типов клеточной РНК, особенно мРНК. Данное свойство объясняется тормозящим влиянием актиномицина D на ДНК-зависимую РНК-полимеразу, поскольку он связывается с остатками дезоксирибозы цепи ДНК, выключая матричную функцию последней; это дает основание 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, связываясь с ферментом. Наиболее чувствительной к нему оказалась бактериальная РНК-полимераза. На организм животных этот антибиотик оказывает незначительное влияние. По механизму действия он резко отличается от актиномицина D. Следует указать, кроме того, на недавно открытое противовирусное действие рифамицина; в частности, он успешно используется при лечении трахомы, которая вызывается ДНК-содержащим вирусом. Это дает основание предположить, что данный антибиотик найдет применение в клинической онкологии при лечении опухолей, вызываемых вирусами.

\* Пурамицин является структурным аналогом тирозинил-тРНК. Связываясь с аминокислотным центром рибосомы, он тормозит связывание новой аа-тРНК на стадии элонгации синтеза белка.

Одним из мощных ингибиторов синтеза вирусной РНК оказался азидотимидин (3'-азидо-2',3'-дидезокситимидин), синтезированный еще в 1964 г. в надежде на его противоопухолевый эффект. Было показано, что вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) содержит РНК-й геном, в составе которого имеются как стандартные гены ретровирусов, так и необычные небольшие гены со множеством функций. Последние, в частности, подвержены мутациям с высокой скоростью вследствие низкой точности репликации, вызванной свойствами обратной транскриптазы. Эта вирусная обратная транскриптаза иммунодефицита человека оказалась наделенной значительно большим сродством к азидотимидину, чем к природному дезокситимидинтрифосфату (дТТФ). Азидотимидин конкурентно тормозит связывание дТТФ, вызывая тем самым терминацию (окончание) синтеза вирусной РНК.



Азидотимидин

Выявлены некоторые детали механизма действия ряда других антибиотиков, используемых 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. Тормозит синтез белка в 80S рибосоме (без поражения процесса в 70S рибосоме) циклогексимид—специфический ингибитор транслоказы.

Весьма интересен молекулярный механизм действия дифтерийного токсина. Он оказался наделенным способностью катализировать реакцию АДФ-рибозилирования фактора элонгации эукариот (eEF-2), выключая тем самым его из участия в синтезе белка. Резистентность многих животных к дифтерийному токсину, вероятно всего, обусловлена трудностью или полным отсутствием проникновения (транспорта) токсина через мембрану клеток.

Противотуберкулезные и антибактериальные антибиотики, в частности стрептомицин и неомицин, действуют на белоксинтезирующий аппарат чувствительных к ним штаммов бактерий. Было высказано предположение, что эти антибиотики обуславливают ошибки в трансляции мРНК, приводящие к нарушению соответствия между кодонами и включаемыми аминокислотами: например, кодон УУУ вместо фенилаланина начинает кодировать лейцин, в результате чего 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. Считают, что тетрациклины тормозят связывание аминоацил-тРНК с аминоацильным центром в 50S рибосоме. 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 рибосомного 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 о механизме действия антибиотиков на синтез белка с учетом стадии и топографии процесса трансляции суммированы в табл. 14.2 (по Харперу с небольшими изменениями).

Таблица 14.2. 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	–	+	+

Условные обозначения: + торможение; – отсутствие торможения; \* стимулирование; ? неизвестно.

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, однако, 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.



## Глава 15

# ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОЦЕССОВ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ В ОРГАНИЗМЕ

Живой организм и его функционирование находятся в постоянной зависимости от окружающей среды. Интенсивность обмена с внешней средой и скорость внутриклеточных процессов обмена веществ поддерживают постоянство внутренней среды и целостность организма.

Как было указано, обмен веществ в организме человека протекает не хаотично; он 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 целостный процесс метаболизма, подчиняющийся диалектическим закономерностям взаимозависимости и взаимообусловленности, допускающий также взаимопревращения между отдельными классами органических веществ. Подобные взаимопревращения диктуются физиологическими потребностями организма, а также целесообразностью замены одних классов органических веществ другими в условиях блокирования какого-либо процесса при патологии.

Еще Кребс и Корнберг отмечали, что, несмотря на огромное разнообразие пищевых веществ (белки, жиры, углеводы), число химических реакций, обеспечивающих их превращения (распад) и образование энергии, «удивительно мало». Эти закономерности свойственны как организму животных и человека, так и микроорганизмам и растениям.

В настоящее время экспериментально обосновано существование четырех главных этапов распада молекул углеводов, белков и жиров, которые интегрируют образование энергии из основных пищевых источников. На I 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 II этапе мономерные молекулы (гексозы, глицерин, жирные кислоты и аминокислоты) подвергаются дальнейшему распаду, в процессе которого образуются богатые энергией фосфатные соединения и ацетил-КоА. В частности, при гликолизе гексозы расщепляются до пировиноградной кислоты и далее до ацетил-КоА. Этот процесс сопровождается образованием ограниченного числа богатых энергией фосфатных связей путем субстратного фосфорилирования. На этом этапе высшие жирные кислоты аналогично распадаются до ацетил-КоА, в то время как глицерин окисля-

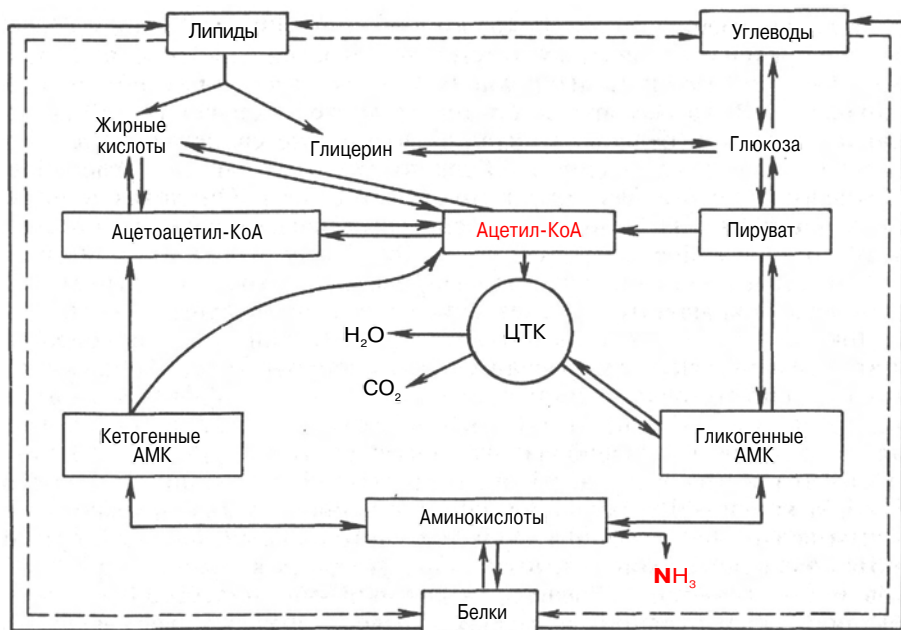
ется по гликолитическому пути до пировиноградной кислоты и далее до ацетил-КоА. Для аминокислот ситуация на II этапе несколько отлична. При преимущественном использовании аминокислот в качестве источника энергии (при дефиците углеводов или при сахарном диабете) некоторые из них непосредственно превращаются в метаболиты лимоннокислого цикла (глутамат, аспарат), другие — опосредованно через глутамат (пролин, гистидин, аргинин), третьи — в пируват и далее в ацетил-КоА (аланин, серин, глицин, цистеин). Наконец, ряд аминокислот, в частности лейцин, изолейцин, расщепляется до ацетил-КоА, а из фенилаланина и тирозина, помимо ацетил-КоА, образуется оксалоацетат через фумаровую кислоту. Как видно, II этап можно назвать этапом образования ацетил-КоА, являющегося по существу единым (общим) промежуточным продуктом катаболизма основных пищевых веществ в клетках.

На III этапе ацетил-КоА (и некоторые другие метаболиты, например  $\alpha$ -кетоглутарат, оксалоацетат) подвергаются окислению («сгоранию») в цикле ди- и трикарбоновых кислот Кребса. Окисление сопровождается образованием восстановленных форм НАДН +  $H^+$  и ФАДН<sub>2</sub>.

На IV этапе осуществляется перенос электронов от восстановленных нуклеотидов на кислород (через дыхательную цепь). Он сопровождается образованием конечного продукта — молекулы воды. Этот транспорт электронов сопряжен с синтезом АТФ в процессе окислительного фосфорилирования (см. главу 9).

Необходимо отметить, что, помимо взаимных переходов между разными классами веществ в организме, доказано существование более сложных форм связи. В частности, интенсивность и направление любой химической реакции определяются ферментами, т.е. белками, которые оказывают непосредственное влияние на обмен липидов, углеводов и нуклеиновых кислот. В свою очередь синтез любого белка-фермента требует участия ДНК и всех 3 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 становятся понятными удивительная согласованность и координированность огромного разнообразия химических процессов, совершающихся в организме. Многие из этих процессов были подробно освещены при описании обмена отдельных классов веществ (см. главы 10-12). В данной главе кратко представлены примеры взаимных переходов отдельных структурных элементов белков, жиров, углеводов (рис. 15.1) и нуклеиновых кислот в процессе их превращений и обмена.

Помимо прямых переходов метаболитов этих классов веществ друг в друга, существует тесная энергетическая связь, когда энергетические потребности 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. Ранее было отмечено большое значение белков и аминокислот для синтеза ряда специализированных соединений (пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, порфирины, биогенные амины и др.). Кетогенные аминокислоты, образующие 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 липи-



**Рис. 15.1.** Взаимосвязь белков, жиров и углеводов.

дов, в частности фосфоглицеринов, имеют своим источником аминокислоты и их производные, например серин, этаноламин, сфингозин и холин. Необходимо подчеркнуть, что превращение 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  $\alpha$ -кетоглутарат. В то же время из глицерина нейтральных жиров через пируват полностью осуществляется синтез углеродных скелетов некоторых гликогенных аминокислот.

Продукты гидролиза пищевых и тканевых триацилглицеролов, 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 поперечно-полосатая мускулатура), или предшественниками синтеза тканевых триацилглицеролов с последующим их отложением в клетках ряда органов (депо липидов).

Получены доказательства синтеза глюкозы из большинства аминокислот. Для некоторых аминокислот (аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты) связь с глюконеогенезом является непосредственной, для других она осуществляется через побочные метаболические пути. Следует особо подчеркнуть, что три  $\alpha$ -кетокислоты (пируват, оксалоацетат и кетоглутарат), образующиеся соответственно из аланина, аспартага и глутамата, не только служат исходным материалом для синтеза глюкозы, но являются своеобразными кофакторами при распаде ацетильных остатков всех классов пищевых веществ в цикле Кребса для получения энергии.

Синтез незаменимых аминокислот из продуктов обмена углеводов и жиров в организме животных отсутствует. Клетки животных не содержат ферментных систем, катализирующих синтез углеродных скелетов этих аминокислот. 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 глюконеогенеза. Он доказан прямым путем в опытах на животных с экспериментальным диабетом: 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—глюкозо-аланинового цикла, 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 аминокислоты, образующиеся в мышцах при распаде белков и поступающие в печень, в которой они подвергаются дезаминированию. Образовавшийся аммиак в печени 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.

Между циклом лимонной кислоты и орнитиновым циклом мочевинообразования имеются сложные связи, определяющие в известной степени скорость реакций, зависимость от энергетических потребностей клетки и концентраций конечных продуктов метаболизма. Как было показано (см. главу 12), фумаровая кислота образуется в процессе распада аргининоянтарной кислоты, синтез которой в свою очередь требует наличия аминокислоты аспартата. Образовавшаяся фумаровая кислота (из предшественника аминокислоты аспартата) далее вступает в цикл лимонной кислоты и под действием двух ферментов этого цикла: фумаратгидратазы и малатдегидрогеназы—превращается в оксалоацетат, который при участии специфической трансминазы вновь превращается в аспартат, т.е. получается своеобразный аспартат-аргининоянтарный шунт цикла лимонной кислоты, соединенного с циклом мочевинообразования (рис. 15.2). Таким образом, при помощи этого необычного сцепленного механизма происходит переплетение реакций обоих циклов (мочевинообразования и ди- и трикарбоновых кислот). Этот механизм получил название «велосипед Кребса» (The "Krebs bicycle").

Из приведенной общей схемы (см. рис. 15.1) 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



**Рис. 15.2.** The "Krebs Bicyclo". (Печатается с любезного разрешения д-ра David L. Nelson и д-ра M.M. Cox, 1993.)

в состав триацилглицеролов и фосфоглицеринов, 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 пусковым 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  $\text{CO}_2$  благодаря реакции карбоксилирования или образоваться из аспарагиновой кислоты в процессе трансаминирования с  $\alpha$ -кетоглутаратом. Две молекулы ацетил-КоА, конденсируясь, образуют ацетоуксусную кислоту (ацетоацетат), которая является источником других кетонных тел в организме, в частности  $\beta$ -оксимасляной кислоты ( $\beta$ -оксибутирата) и ацетона (см. главу 11). Следует подчеркнуть, что ацетоуксусная и  $\beta$ -оксимасляная кислоты часто рассматриваются как транспортные формы активной уксусной кислоты, доставляющие ее для окисления в цикле Кребса в периферических тканях. Эти же реакции конденсации двух молекул ацетил-КоА составляют начальные этапы синтеза холестерина, в свою очередь являющегося предшественником гормонов стероидной природы, витамина  $\text{D}_3$ , а также желчных кислот. Последние в виде парных желчных кислот выполняют важную функцию эмульгаторов при переваривании липидов пищи в кишечнике, а также функцию транспортеров, способствуя всасыванию высших жирных кислот.

Следует указать также на использование галактозы и частично глюкозы для биосинтеза цереброзидов и гликолипидов, выполняющих важные и специфические функции в деятельности ЦНС. В этом синтезе участвуют не свободные моносахариды, а гексозамины (галактозамин и глюкозамин), биосинтез которых в свою очередь требует доставки амидного азота глутамина, интегрируя тем самым обмен углеводов, липидов и белков.

В последние годы накоплено немало экспериментальных данных, свидетельствующих о существовании в живых организмах множества регулирующих механизмов, осуществляющих метаболический контроль и обеспечивающих как взаимопревращения белков, липидов и углеводов, так и интеграцию энергии. Не отрицая значение других типов регуляции метаболизма (см. главы 8, 9), следует подчеркнуть, что движущей силой во взаимопревращениях веществ и интенсивности метаболизма, вероятнее всего, является энергетическое состояние клетки, в частности уровень АТФ (точнее, отношение АМФ/АТФ). Так, при низких концентрациях АМФ и высоких концентрациях АТФ (состояние, которое принято обозначать «энергонасыщенностью») в клетках происходит резкое снижение гликолитического распада глюкозы, обусловленное действием этих нуклеотидов на ключевой фермент гликолиза—фосфофруктокиназу и на фосфатазу фруктозо-6-фосфата. В результате в клетках накапливается не только фруктозо-6-фосфат, но и его предшественник—глюкозо-6-фосфат. Последний, являясь положительным модулятором фермента гликогенсинтазы, стимулирует синтез полисахарида—гликогена. При низких концентрациях АТФ (соответственно при высоком уровне АМФ) в клетках отмечаются стимуляция гликолиза и окисление пирувата в лимоннокислом цикле, что способствует обеспечению клеток энергией. Однако при низких концентрациях АМФ имеет место снижение скорости цикла трикарбоновых кислот, обусловленное торможением активности изоцитратдегидрогеназы, соответственно наблюдается снижение скорости синтеза АТФ и накопление изолимонной кислоты. Последняя, как известно, повышает активность другого фермента—ацетил-КоА-карбоксилазы, которая в свою очередь катализирует I стадию превращения ацетил-КоА в жирную кислоту. Благодаря этим обстоятельствам клетка переводит образовавшуюся при гликолизе молекулу ацетил-КоА с энергетического пути на путь синтеза липидов и их отложения в депо. В то же время при восстановлении скорости утилизации АТФ, что обычно наблюдается при синтезе жирных кислот, соответствующее повышение уровня АМФ способствует снижению концентрации лимонной кислоты и соответственно торможению синтеза липидов.

Перечисленными примерами абсолютно не исчерпывается все многообразие взаимопревращений органических веществ, которые постоянно совершаются в живых организмах. Здесь 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, скорость распада одних питательных веществ и биосинтеза других прежде всего определяется физиологическим состоянием и потребностями организма в энергии и метаболитах. Благодаря 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 будут определяться степенью повреждения структуры и функций отдельных молекулярных и надмолекулярных компонентов клеток.

# Глава 16

## ПЕЧЕНЬ

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. В печень человека более 70% крови поступает через воротную вену, остальная кровь попадает 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 общий 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 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 без преувеличения можно констатировать, что в организме нет путей обмена веществ, которые прямо или косвенно не контролировались бы печенью, в связи с чем многие важнейшие функции печени уже рассматривались в соответствующих главах учебника. 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 нормы, а диапазон колебаний от 20 до 60 г на 1 кг массы тела.

В табл. 16.1 представлены некоторые данные о химическом составе печени в норме.

Из данных табл. 16.1 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 в печени — снизиться до 55%. Более половины сухого остатка печени приходится на долю белков, причем примерно 90% из них — на глобулины. Печень богата

Таблица 16.1. 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		

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 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 достигает 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.

## РОЛЬ ПЕЧЕНИ В УГЛЕВОДНОМ ОБМЕНЕ

Основная роль печени в углеводном обмене заключается в обеспечении постоянства концентрации глюкозы в крови. Это достигается регуляцией между синтезом и распадом гликогена, депонируемого в печени.

В печени синтез гликогена 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, если ее содержание значительно уменьшается (например, у человека это происходит при недостаточном поступлении углеводов с пищей или в период ночного «голодания»).

Необходимо подчеркнуть важную роль фермента глюкокиназы в процессе утилизации глюкозы печенью. Глюкокиназа, подобно гексокиназе, катализирует фосфорилирование глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата, 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 концентрация\*. Повышение концентрации глюкозы в печени вызывает существенное увеличение активности глюкокиназы и автоматически увели-

\* При всасывании углеводов из кишечника уровень глюкозы в крови воротной вены повышается до 20 ммоль/л, а в периферической крови ее содержится не более 5 ммоль/л.



чивает 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  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Синтезированные в печени триглицериды в норме выделяются в кровь в составе липопротеинов и транспортируются в жировую ткань для более «постоянного» хранения.

В реакциях пентозофосфатного пути в печени образуется НАДФН, 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 происходит и ее образование. Непосредственным источником глюкозы в печени служит гликоген. Распад гликогена в печени происходит в основном 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 глюкозы и саморегуляции углеводного обмена в печени играет глюкозо-6-фосфат. Он резко тормозит фосфоролитическое расщепление гликогена, активирует ферментативный перенос глюкозы с уридиндифосфоглюкозы на молекулу синтезируемого 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 (рис. 16.1).

Как отмечалось, наиболее мощным аллостерическим активатором фосфофруктокиназы-1 и ингибитором фруктозо-1,6-бисфосфатазы печени

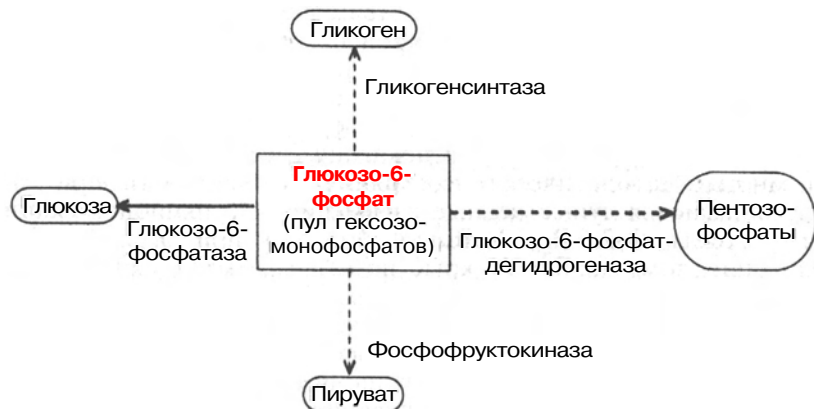
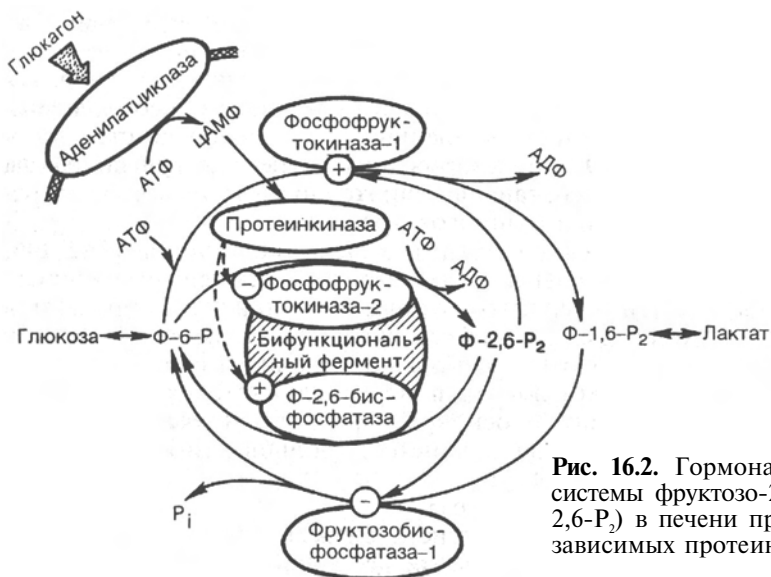


Рис. 16.1. Участие глюкозо-6-фосфата в метаболизме углеводов.



**Рис. 16.2.** Гормональная регуляция системы фруктозо-2,6-бисфосфата (Ф-2,6-Р<sub>2</sub>) в печени при участии цАМФ-зависимых протеинкиназ.

является фруктозо-2,6-бисфосфат (Ф-2,6-Р<sub>2</sub>). Повышение в гепатоцитах уровня Ф-2,6-Р<sub>2</sub> способствует усилению гликолиза и уменьшению скорости глюконеогенеза. Ф-2,6-Р<sub>2</sub> снижает ингибирующее действие АТФ на фосфофруктокиназу-1 и увеличивает сродство этого фермента к фруктозо-6-фосфату. При ингибировании фруктозо-1,6-бисфосфатазы Ф-2,6-Р<sub>2</sub> возрастает значение  $K_m$  для фруктозо-1,6-бисфосфата. Содержание Ф-2,6-Р<sub>2</sub> в печени, сердце, скелетной мускулатуре и других тканях контролируется бифункциональным ферментом, который осуществляет синтез Ф-2,6-Р<sub>2</sub> из фруктозо-6-фосфата и АТФ и гидролиз его до фруктозо-6-фосфата и P<sub>i</sub>, т.е. фермент одновременно обладает и киназной, и бисфосфатазной активностью. Бифункциональный фермент (фосфофруктокиназа-2/фруктозо-2,6-бисфосфатаза), выделенный из печени крысы, состоит из двух идентичных субъединиц с мол. массой 55000, каждая из которых имеет два различных каталитических центра. Киназный домен при этом расположен на N-конце, а бисфосфатазный — на C-конце каждой из полипептидных цепей. Известно также, что бифункциональный фермент печени является прекрасным субстратом для цАМФ-зависимой протеинкиназы А. Под действием протеинкиназы А происходит фосфорилирование остатков серина в каждой из субъединиц бифункционального фермента, что приводит к снижению его киназной и повышению бисфосфатазной активности. Заметим, что в регуляции активности бифункционального фермента существенная роль принадлежит гормонам, в частности глюкагону (рис. 16.2).

При многих патологических состояниях, в частности при сахарном диабете, отмечаются существенные изменения в функционировании и регуляции системы Ф-2,6-Р<sub>2</sub>. Установлено, что при экспериментальном (стептозотоциновом) диабете у крыс на фоне резкого увеличения уровня глюкозы в крови и моче в гепатоцитах содержание Ф-2,6-Р<sub>2</sub> снижено. Следовательно, снижается скорость гликолиза и усиливается глюконеогенез. Данный факт имеет свое объяснение. Возникающие у крыс при диабете нарушения гормонального фона: увеличение концентрации глюкагона и уменьшение содержания инсулина — обуславливают повышение концентрации цАМФ в ткани печени, усиление цАМФ-зависимого фосфо-

рилирования бифункционального фермента, что в свою очередь приводит к снижению его киназной и повышению бисфосфатазной активности. Таков может быть механизм снижения уровня  $\Phi\text{-}2,6\text{-P}_2$  в гепатоцитах при экспериментальном диабете. По-видимому, существуют и другие механизмы, ведущие к снижению уровня  $\Phi\text{-}2,6\text{-P}_2$  в гепатоцитах при стрептозотоциновом диабете. Показано, что при экспериментальном диабете в ткани печени имеет место снижение активности глюкокиназы (возможно, и снижение количества данного фермента). Это приводит к падению скорости фосфорилирования глюкозы, а затем к снижению содержания фруктозо-6-фосфата—субстрата бифункционального фермента. Наконец, в последние годы было показано, что при стрептозотоциновом диабете уменьшается количество мРНК бифункционального фермента в гепатоцитах и как следствие—снижается уровень  $\Phi\text{-}2,6\text{-P}_2$  в ткани печени, усиливается глюконеогенез. Все это еще раз подтверждает положение, что  $\Phi\text{-}2,6\text{-P}_2$ , являясь важным компонентом в цепи передачи гормонального сигнала, выступает в роли третичного посредника при действии гормонов, прежде всего на процессы гликолиза и глюконеогенеза.

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 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. Последний (в него легко переходит и диоксиацетонфосфат) подвергается обычным превращениям, в том числе с образованием в качестве промежуточного продукта пировиноградной кислоты.

Следует отметить, что при генетически обусловленной нетолерантности к фруктозе или недостаточной активности фруктозо-1,6-бисфосфатазы наблюдается индуцируемая фруктозой гипогликемия, возникающая вопреки наличию больших запасов гликогена. Вероятно, фруктозо-1-фосфат и фруктозо-1,6-бисфосфат ингибируют фосфоорилазу печени по аллостерическому механизму.

Известно также, что метаболизм фруктозы по гликолитическому пути в печени происходит гораздо быстрее, чем метаболизм глюкозы. Для метаболизма глюкозы характерна стадия, катализируемая фосфофруктокиназой-1. Как известно, на этой стадии осуществляется метаболический контроль скорости катаболизма глюкозы. Фруктоза минует эту стадию, что позволяет ей интенсифицировать в печени процессы метаболизма, ведущие к синтезу жирных кислот, их эстерификацию и секрецию липопротеинов очень низкой плотности; в результате может увеличиваться концентрация триглицеридов в плазме крови.

Галактоза в печени сначала фосфорилируется при участии АТФ и фермента галактокиназы с образованием галактозо-1-фосфата. Для галактокиназы печени плода и ребенка характерны значения  $K_M$  и  $V_{\text{макс}}$  примерно в 5 раз превосходящие таковые у ферментов взрослого человека. Большая часть галактозо-1-фосфата в печени превращается в ходе реакции, катализируемой гексозо-1-фосфат-уридилтрансферазой:

УДФ-глюкоза + Галактозо-1-фосфат → УДФ-галактоза + Глюкозо-1-фосфат.

Это 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

Ферментные системы печени способны катализировать все реакции или значительное 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 ацетонных (кетонных) тел и т.д.

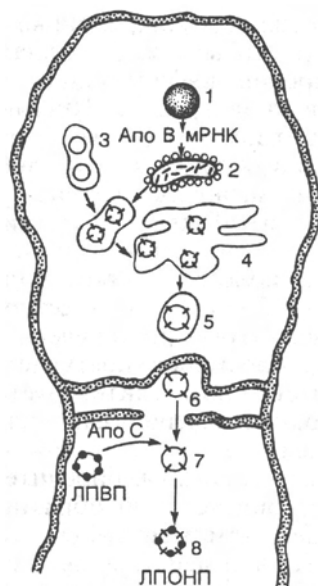
Напомним, что ферментативные реакции синтеза триглицеридов в печени и жировой ткани сходны. Так, КоА-производные жирной кислоты с длинной цепью взаимодействуют с глицерол-3-фосфатом с образованием фосфатидной кислоты, которая затем гидролизуется до диглицерида. Путем присоединения к последнему еще одной 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 отмечалось, основным местом образования плазменных пре-β-липопротеинов (липопротеины очень низкой плотности — ЛПОНП) и α-липопротеинов (липопротеины высокой плотности — ЛПВП) является печень.

Рассмотрим образование ЛПОНП. Согласно данным литературы, основной белок апопротеин В-100 (апо В-100) липопротеинов синтезируется в рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикулума гепатоцитов. В гладком эндоплазматическом ретикулуме, где синтезируются и липидные компоненты, происходит сборка ЛПОНП. Одним из основных стимулов образования ЛПОНП является повышение концентрации неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК). Последние либо поступают в печень с током крови, будучи связанными с альбумином, либо синтезируются непосредственно в печени. НЭЖК служат главным источником образования триглицеридов (ТГ). Информация о наличии НЭЖК и ТГ передается на мембранно-связанные рибосомы шероховатого эндоплазматического ретикулума, что в свою очередь является сигналом для синтеза белка (апо В-100). Синтезированный белок внедряется в мембрану шероховатого ретикулума, и после взаимодействия с фосфолипидным бислоем от мембраны отделяется участок, состоящий из фосфолипидов (ФЛ) и белка, который и является предшественником ЛП-частицы. Далее белокфосфолипидный комплекс поступает в гладкий эндоплазматический ретикулум, где взаимодействует с ТГ и эстерифицированным холестерином (ЭХС), в результате чего после соответствующих структурных перестроек формируются насцентные, т.е. незавершенные, частицы (н-ЛПОНП). Последние поступают через тубулярную сеть аппарата Гольджи в секреторные везикулы и в их составе доставляются к поверхности клетки, после чего

**Рис. 16.3.** Образование липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) в печеночной клетке (по А.Н. Климову и Н.Г. Никульчевой).

1 - ядро; 2 - шероховатый эндоплазматический ретикулум; 3 - гладкий эндоплазматический ретикулум, синтезированные в нем липиды и образовавшиеся н-ЛПОНП; 4 - аппарат Гольджи; 5 - секреторная везикула с частицей н-ЛПОНП; 6 - частица с н-ЛПОНП в пространстве Диссе; 7 - перенос апопротеинов С с ЛПВП на н-ЛПОНП; 8 - частица нативных ЛПОНП.



путем экзоцитоза выделяются в перисинусоидные пространства (пространства Диссе). Из последнего н-ЛПОНП поступают в просвет кровяного синусоида, где происходят перенос апопротеинов С из ЛПВП на н-ЛПОНП и достраивание последних (рис. 16.3). Установлено, что время синтеза апо В-100, образования липид-белковых комплексов и секреции готовых частиц ЛПОНП составляет 40 мин.

У человека основная масса  $\beta$ -липопротеинов (липопротеины низкой плотности—ЛПНП) образуется в плазме крови из ЛПОНП при действии липопротеинлипазы. В ходе этого процесса образуются сначала промежуточные короткоживущие липопротеины (Пр.ЛП), а затем формируются частицы, обедненные триглицеридами и обогащенные холестерином, т.е. ЛПНП.

При высоком содержании жирных кислот в плазме их поглощение печенюе возрастает, усиливается синтез триглицеридов, а также окисление жирных кислот, что может привести к повышенному образованию кетоновых тел.

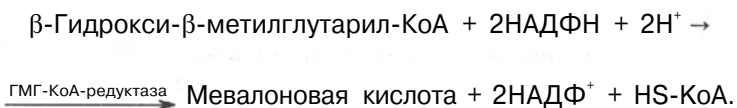
Следует подчеркнуть, что кетоновые тела образуются в печени в ходе так называемого  $\beta$ -гидрокси- $\beta$ -метилглутарил-КоА пути. Однако существует мнение, что ацетоацетил-КоА, являющийся исходным соединением при кетогенезе, может образоваться как непосредственно в ходе  $\beta$ -окисления жирных кислот, так и в результате конденсации ацетил-КоА [Марри Р. и др., 1993]. Из печени кетоновые тела током крови доставляются в ткани и органы (мышцы, почки, мозг и др.), где они быстро окисляются при участии соответствующих ферментов, т.е. по сравнению с другими тканями печень является исключением.

В печени происходит интенсивный распад фосфолипидов, а также их синтез. Помимо глицерина и жирных кислот, которые входят в состав нейтральных жиров, для синтеза фосфолипидов необходимы неорганические фосфаты и азотистые соединения, в частности холин, для синтеза фосфатидхолина. Неорганические фосфаты в печени имеются в достаточном количестве. При недостаточном образовании или недостаточном поступлении в печень холина 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 фосфолипидов необходим либо холин, либо соединения, которые могут являться донорами метильных групп и участвовать в образовании холина (например, метионин). Такие 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.

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  $\beta$ -гидрокси- $\beta$ -метилглутарил-КоА-редуктазной реакции:



Часть синтезированного в печени холестерина выделяется из организма вместе с желчью, другая часть превращается в желчные кислоты и используется в других органах для синтеза стероидных гормонов и иных 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 ОБМЕНЕ БЕЛКОВ

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 альбумины\* плазмы, 75–90%  $\alpha$ -глобулинов и 50%  $\beta$ -глобулинов синтезируются гепатоцитами. Лишь  $\gamma$ -глобулины продуцируются не гепатоцитами, а системой макрофагов, к которой относятся звездчатые ретикулоэндотелиоциты (клетки Купфера). В основном  $\gamma$ -глобулины образуются в печени. Печень является единственным органом, где синтезируются такие важные для организма белки, как протромбин, фибриноген, проконвертин и проакцелерин.

\* В печени здорового человека ежедневно может синтезироваться 13–18 г альбуминов.

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 привести к геморрагическим явлениям.

При поражениях печени нарушается также процесс дезаминирования аминокислот, что способствует 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 возрастает до 21 ммоль/л, что приводит к аминоацидурии. Например, при острой атрофии печени количество 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 расходуется 3 молекулы АТФ). При заболевании 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 составляет 1:1.

Большая часть мочевой кислоты также образуется в печени, где много фермента ксантиноксидазы, при участии которого оксипурины (гипоксантин и ксантин) превращаются в мочевую кислоту. Нельзя забывать о роли печени и в синтезе креатина. Имеются два источника креатина в организме. Существует экзогенный креатин, т.е. креатин пищевых продуктов (мясо, печень и др.), и эндогенный креатин, синтезирующийся в тканях. Синтез креатина происходит в основном в печени, откуда он с током крови поступает в мышечную ткань. Здесь креатин, фосфорилируясь, превращается в креатинфосфат, а из последнего образуется креатин.

## **Детоксикация различных веществ в печени**

Чужеродные вещества (ксенобиотики) в печени нередко превращаются в менее токсичные и даже 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. Наряду с микросомальным 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, которая образуется при действии указанных

оксидаз; отсюда и название этих микротелец—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 триптофона—скатол и индол. Эти вещества всасываются и с током крови поступают в печень, где обезвреживаются путем образования парных соединений с серной или глюкуроновой кислотой.

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 УДФГК\*.

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 непрямой, 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.

Синтез гиппуровой кислоты у человека протекает преимущественно в печени. Поэтому в клинической практике довольно часто для выяснения антитоксической функции печени применяют пробу Квика—Пытеля (при нормальной функциональной способности почек): после нагрузки бензоатом натрия в моче определяют количество 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 ацетилирования\*\*. В частности, в печени ацетилированию подвергаются различные сульфаниламидные препараты.

Примером обезвреживания токсичных продуктов в печени путем восстановления является превращение нитробензола в парааминофенол. Многие ароматические углеводы обезвреживаются путем окисления с образованием соответствующих карбоновых кислот.

Печень принимает активное участие в инактивации различных гормонов. С током крови гормоны попадают в печень, при этом 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.

\* Индол и сканол, 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.

\*\* В печени содержание кофермента ацетилирования (HS-KoA) в 20 раз превышает его концентрацию в мышечной ткани.



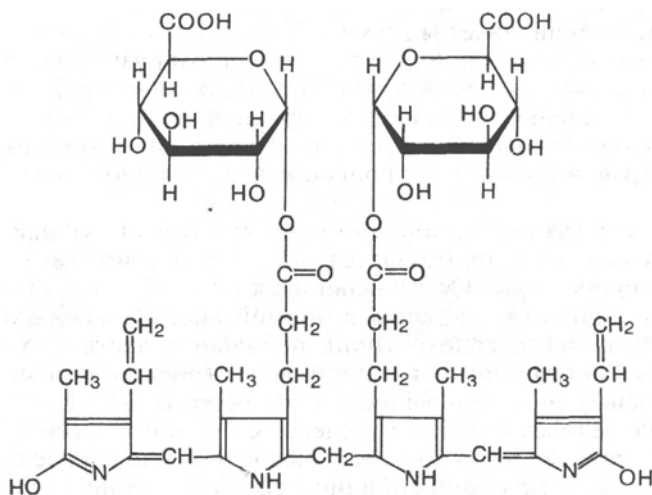
Из приведенных примеров видно, что печень способна инактивировать ряд сильнодействующих физиологических и чужеродных (в том числе токсичных) веществ.

## Роль печени в пигментном обмене \*

Рассмотрим только 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.

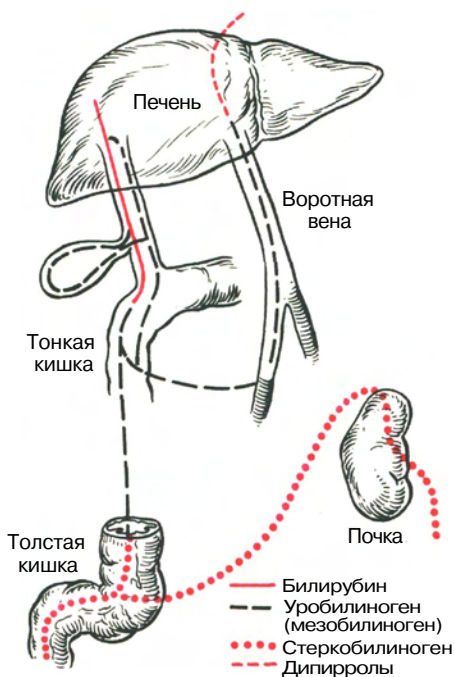
Как отмечалось (см. главу 13), начальным этапом распада гемоглобина является разрыв одного метинового мостика с образованием вердоглобина. В дальнейшем от молекулы вердоглобина отщепляются атом железа и белок глобин. В результате образуется биливердин, который представляет собой цепочку из четырех пиррольных колец, связанных метановыми мостиками. Затем биливердин, восстанавливаясь, превращается в билирубин—пигмент, выделяемый с желчью и поэтому называемый желчным пигментом. Образовавшийся билирубин называется непрямой (неконъюгированным) билирубином. Он нерастворим в воде, дает непрямую реакцию с диазореактивом, т.е. реакция протекает 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 (конъюгированный билирубин). Он растворим в воде и дает прямую реакцию с диазореактивом. Большая часть билирубина соединяется с двумя молекулами глюкуроновой кислоты, образуя диглюкуронид билирубина:



Диглюкуронид билирубина

\* Написано совместно с канд. мед. наук П.П. Мининым.



**Рис. 16.4.** Нормальный обмен уробилиногеновых тел (схема).

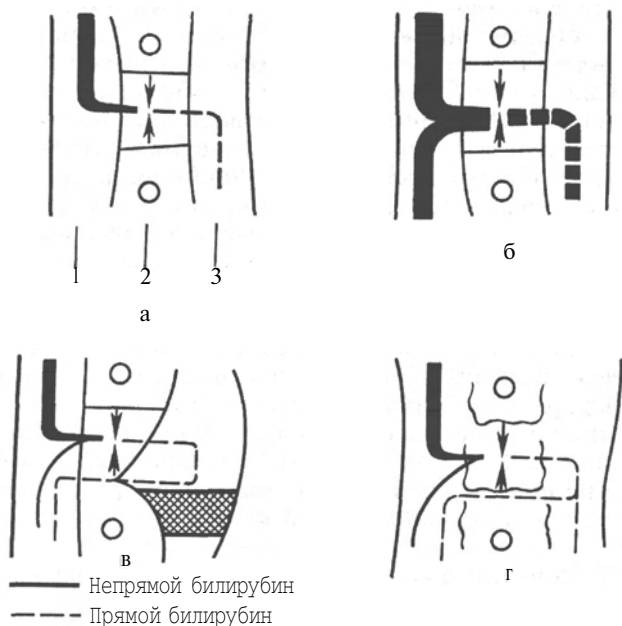
Образовавшийся в печени прямой билирубин вместе с очень небольшой частью непрямого билирубина выводится с желчью в тонкую кишку. Здесь от прямого билирубина отщепляется глюкуроновая кислота и происходит его восстановление с последовательным образованием мезобилирубина и мезобилиногена (уробилиногена). Принято считать, что около 10% билирубина восстанавливается до мезобилиногена на пути в тонкую кишку, т.е. во внепеченочных желчных путях и в желчном пузыре. Из тонкой кишки часть образовавшегося мезобилиногена (уробилиногена) резорбируется через кишечную стенку, попадает в воротную вену 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 тонкой кишки поступает в толстую и здесь восстанавливается до стеркобилиногена при участии анаэробной микрофлоры. Образовавшийся стеркобилиноген в нижних отделах толстой кишки (в основном в прямой кишке) окисляется до стеркобилина и выделяется с калом. Лишь небольшая часть стеркобилиногена всасывается в систему нижней полой вены (попадает сначала в геморроидальные вены) и в дальнейшем выводится с мочой. 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. На рис. 16.4 схематично показаны пути образования уробилиногеновых тел в организме человека.

В клинической практике укоренился термин «уробилиноген мочи». Под этим термином следует понимать те производные билирубина (билирубиноиды), которые обнаруживаются в моче. Положительная реакция на

уробилиноген может быть обусловлена повышенным содержанием того или иного билирубиноида в моче и является, как правило, отражением патологии.

Определение в клинике содержания билирубина в крови (общего, непрямого и прямого), а также уробилиногена мочи имеет важное значение при дифференциальной диагностике желтух различной этиологии (рис. 16.5). При гемолитической желтухе («надпеченочной») вследствие повышенного гемолиза эритроцитов и разрушения гемоглобина происходит интенсивное образование непрямого билирубина в ретикулоэндотелиальной системе (см. рис. 16.5, б). Печень оказывается неспособной утилизировать такое большое количество непрямого билирубина, что приводит к его накоплению в крови и тканях. В печени при этом синтезируется повышенное количество прямого билирубина, который с желчью попадает в кишечник. В тонкой кишке в повышенных количествах образуется мезобилиноген и в последующем — стеркобилиноген. Всосавшаяся часть мезобилиногена утилизируется печенью, а резорбирующийся в толстой кишке стеркобилиноген выводится с мочой. Таким образом, для гемолитической желтухи в типичных случаях характерны следующие клиничко-лабораторные показатели: повышение уровня общего и непрямого билирубина в крови, в моче — отсутствие билирубина (непрямой билирубин не фильтруется почками) и положительная реакция на уробилиноген (за счет повышенного попадания в кровь и мочу стеркобилиногена, а в тяжелых случаях — и за счет мезобилиногена, не утилизирующегося печенью); лимонно-желтый оттенок кожных покровов (сочетание желтухи и анемии); увеличение размеров селезенки; ярко окрашенный кал.



**Рис. 16.5.** Патогенез билирубинемии при различных патологических состояниях (схема).

а - норма; б - гемолиз; в - застой в желчных капиллярах; г - поражение паренхиматозных клеток печени; 1 - кровеносный капилляр; 2 - клетки печени; 3 - желчный капилляр.

При механической (обтурационной, или «подпеченочной») желтухе (см. рис. 16.5, в) нарушен отток желчи (закупорка общего желчного протока камнем, рак головки поджелудочной железы). Это приводит к деструктивным изменениям в печени и попаданию элементов желчи (билирубин, холестерин, желчные кислоты) в кровь. При полной обтурации общего желчного протока желчь не попадает в кишечник, поэтому образования в кишечнике билирубиноидов не происходит, кал обесцвечен и реакция на уробилиноген мочи отрицательная. Таким образом, при механической желтухе в крови повышено количество общего билирубина (за счет прямого), увеличено содержание холестерина и желчных кислот, а в моче — высокий уровень билирубина (прямого). Клиническими особенностями обтурационной желтухи являются яркая желтушная окраска кожи, бесцветный кал, зуд кожи (раздражение нервных окончаний желчными кислотами, отлагающимися в коже). Следует заметить, что при длительно сохраняющейся механической желтухе могут существенно нарушаться функции печени, в том числе одна из главных — детоксикационная. В этом случае может произойти частичный «отказ» печени от непрямого билирубина, что может привести к его накоплению в крови. Иными словами, увеличение уровня фракции непрямого билирубина при механической желтухе является плохим прогностическим признаком.

При паренхиматозной («печеночной») желтухе (см. рис. 16.5, г), возникающей чаще всего при ее вирусном поражении, развиваются воспалительно-деструктивные процессы в печени, ведущие к нарушению ее функций. На начальных этапах гепатита процесс захвата и глюкуронирования непрямого билирубина сохраняется, однако образующийся прямой билирубин в условиях деструкции печеночной паренхимы частично попадает в большой круг кровообращения, что ведет к желтухе. Экскреция желчи также нарушена, билирубина в кишечник попадает меньше, чем в норме. Меньше обычного образуется мезобилиногена, и меньшее количество его всасывается в кишечнике. Однако даже это небольшое количество поступающего в печень мезобилиногена не усваивается ею. Мезобилиноген, «уклоняясь», попадает в кровь, а затем выделяется с мочой, что предопределяет положительную реакцию на уробилиноген. Количество образующегося стеркобилиногена также снижено, поэтому кал гипохоличный. Итак, при паренхиматозной желтухе отмечается повышение в крови концентрации общего билирубина, преимущественно за счет прямого. В кале снижено содержание стеркобилиногена. Реакция на уробилиноген мочи положительная за счет попадания в мочу мезобилиногена. Следует отметить, что при прогрессирующем гепатите, когда печень утрачивает свою детоксикационную функцию, в крови накапливается значительное количество и непрямого билирубина. Кроме того, при резко выраженном воспалении печени, ее «набухании», может произойти сдавление желчных капилляров и протоков, возникнуть внутрипеченочный холестаз, что придает паренхиматозной желтухе черты механической с соответствующей клинико-лабораторной картиной (ахоличный кал, отсутствие реакции на уробилиноген).

В табл. 16.2 приведены наиболее характерные сдвиги клинико-лабораторных показателей при различных типах желтух.

Следует иметь в виду, что в практике редко наблюдается желтуха какого-либо одного типа в «чистом» виде. Чаще встречается сочетание того или иного типа. Так, при выраженном гемолизе неизбежно страдают различные органы, в том числе и печень, что может привести элементы паренхиматозной желтухи при гемолизе. В свою очередь паренхиматозная

Таблица 16.2. Дифференциальная диагностика различных типов желтух

Тип желтухи	Кровь			Моча		Кал
	били- рубин общий	били- рубин непря- мой	били- рубин прямой	били- рубин прямой	уроби- лино- ген	стерко- билино- ген
Гемолитическая	↑	↑	N или ↑	0	+	↑
Паренхиматозная («печеноч- ная»)	↑	N или ↑	↑	↑	0	0
Обтурационная (механическая)	↑	↑	↑	↑	+	↓

Обозначения: N - норма; ↑ повышение; ↓ снижение; + определяется; 0 не определяется.

желтуха, как правило, включает в себя элементы механической. При механической желтухе, возникающей вследствие сдавливания большого сосочка двенадцатиперстной кишки (фатерова соска) при раке головки поджелудочной железы, неизбежен повышенный гемолиз как следствие раковой интоксикации.

## ЖЕЛЧЬ

Желчь—жидкий секрет желтовато-коричневого цвета, отделяется 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 пузырьной—1,04. Концентрация основных компонентов в пузырьной желчи в 5—10 раз выше, чем в печеночной (табл. 16.3).

Таблица 16.3. Содержание основных компонентов желчи человека

Компоненты	Пече- ночная желчь	Пузыр- ная желчь	Компоненты	Пече- ночная желчь	Пузыр- ная желчь
Вода, %	97,4	86,65	Ионы, ммоль/л: катионы: Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> Ca <sup>2+</sup> анионы: Cl <sup>-</sup> ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	145 5 2,5 100 28	130 9 6 75 10
Плотные веще- ства, %:	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, вследствие 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 вещества, которые присутствуют в желчи в количествах, мало отличающихся от их концентрации в плазме крови (например, ионы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , креатин 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. Кроме того, в желчи обнаружен ряд ферментов, из которых особо следует отметить щелочную фосфатазу печеночного происхождения. При нарушении оттока желчи активность данного фермента в сыворотке крови возрастает.

**Основные функции желчи.** Эмульсификация. Соли желчных кислот обладают способностью значительно уменьшать поверхностное натяжение. Благодаря этому они осуществляют эмульгирование жиров в кишечнике, растворяют жирные кислоты и нерастворимые в воде мыла. Нейтрализация кислоты. Желчь, рН которой немногим более 7,0, нейтрализует кислый химус, поступающий из желудка, подготавливая его для переваривания в кишечнике. Экскреция. Желчь—важный носитель экскретуемых желчных кислот и холестерина. Кроме того, она удаляет из организма многие лекарственные вещества, токсины, желчные пигменты и различные неорганические вещества, такие, как медь, цинк и ртуть. Растворение холестерина. Как отмечалось, холестерин, подобно высшим жирным кислотам, представляет собой нерастворимое в воде соединение, которое сохраняется в желчи в растворенном состоянии лишь благодаря присутствию в ней солей желчных кислот и фосфатидилхолина. При недостатке желчных кислот холестерин выпадает в осадок, при этом могут образовываться камни. Обычно камни имеют окрашенное желчным пигментом внутреннее ядро, состоящее из белка. Чаще всего встречаются камни, у которых ядро окружено чередующимися слоями холестерина и билирубината кальция. Такие камни содержат до 80% холестерина. Интенсивное образование камней отмечается при застое желчи и наличии инфекции. При застое желчи встречаются камни, содержащие 90–95% холестерина, а при инфекции могут образовываться камни, состоящие из билирубината кальция. Принято считать, что присутствие бактерий сопровождается увеличением  $\beta$ -глюкуронидазной активности желчи, что приводит к расщеплению конъюгатов билирубина; освобождающийся билирубин служит субстратом для образования камней.

## Глава 17

# КРОВЬ

Кровь—жидкая ткань, осуществляющая в организме транспорт химических веществ (в том числе кислорода), благодаря чему происходит интеграция биохимических процессов 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 — осмотическое давление плазмы крови. Оно определяется осмотической концентрацией, т.е. суммой всех частиц, находящихся в единице объема. При температуре 37°С осмотическое давление плазмы крови ~ 7,6 атм. Эта величина в основном обусловлена содержащимися в крови хлоридом натрия и другими низкомолекулярными веществами; около 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, гормональная система и др.), обеспечивающих 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. 17.1.

Таблица 17.1. **Органические составные компоненты цельной крови и плазмы человека**

Составные 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
Кетонные 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
$\alpha$ -Кетоглутарат, ммоль/л	–	0,02–0,07
Янтарная кислота, ммоль/л	–	0,01–0,04
Билирубин общий, мкмоль/л	–	4–26

Из данных табл. 17.1 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: альбумины, глобулины и 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%) от 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 определенного момента — «поворотного», когда падающее гидростатическое давление становится равным коллоидно-осмотическому. После «поворотного» момента в венозной части капилляров происходит обратный ток 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 клетчатки.

2. Белки плазмы принимают активное участие в свертывании крови. Ряд белков, в том числе фибриноген, являются основными компонентами системы свертывания крови.

3. Белки плазмы в известной мере определяют вязкость крови, которая, как 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 к тканям.

6. Белки плазмы играют важную роль в процессах иммунитета (особенно это касается иммуноглобулинов).

7. В результате образования с белками плазмы недиализируемых 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 позволили открыть и описать около 100 различных белковых компонентов плазмы крови. Особое значение приобрело электрофоретическое разделение белков плазмы (сыворотки) крови.

В сыворотке крови здорового человека при электрофорезе на бумаге можно обнаружить 5 фракций: альбумины,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -глобулины. Методом электрофореза в агаровом геле в сыворотке крови выделяют 7–8 фракций, а при электрофорезе в крахмальном или полиакриламидном геле — до 16–17 фракций. Следует помнить, что терминология 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 меняться.

Еще большее число белковых фракций (свыше 30) можно получить методом иммуноэлектрофореза (рис. 17.1). Этот метод 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.

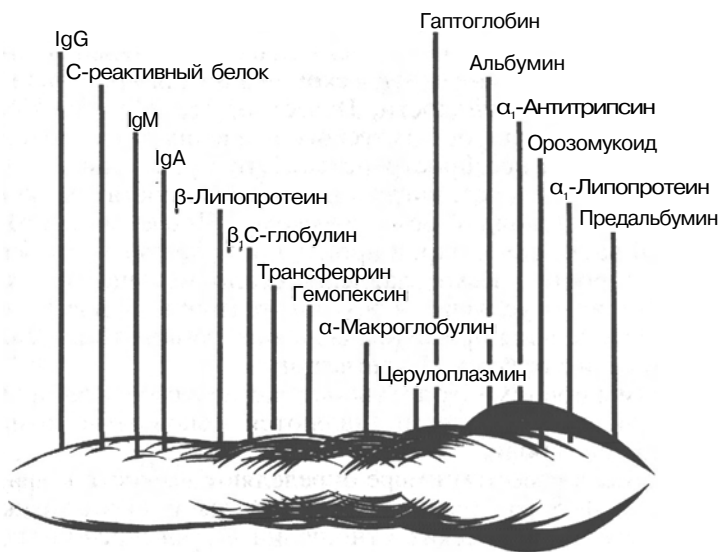


Рис. 17.1. Имуноэлектрофореграмма белков сыворотки крови человека (по Генри).

### Характеристика основных белковых фракций

**Альбумины.** На долю альбуминов приходится более половины (55–60%) белков плазмы крови человека. Мол. масса альбумина около 70000. Сывороточные альбумины сравнительно быстро обновляются (период полураспада альбуминов человека 7 дней).

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 крови 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, которую иногда принимают за врожденную. Описано появление быстрого компонента альбумина у больных, получавших большие дозы пеницилли-

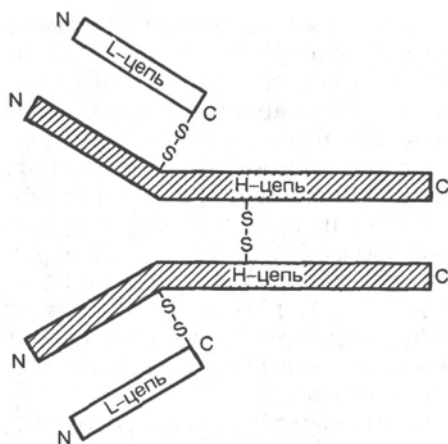


Рис. 17.2. Строение молекулы иммуноглобулинов (схема). Объяснения в тексте.

на. После отмены пенициллина этот компонент вскоре исчез из крови. Существует предположение, что повышение электрофоретической подвижности фракции альбумин-антибиотиксвязано с увеличением отрицательного заряда за счет  $\text{COOH}$ -групп пенициллина.

**Глобулины.** Сывороточные глобулины при высаливании нейтральными солями можно разделить на 2 фракции—эуглобулины и псевдоглобулины. Фракция эуглобулинов в основном состоит из  $\gamma$ -глобулинов, а фракция псевдоглобулинов включает  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулины, которые при электрофорезе, особенно в крахмальном или полиакриламидном геле, способны разделяться на ряд подфракций.  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулиновые фракции содержат липопротеины, а также белки, связанные с металлами. Большая часть антител, содержащихся в сыворотке, находится во фракции  $\gamma$ -глобулинов. При снижении уровня белков этой фракции резко понижаются защитные силы организма.

Имуноглобулины, или антитела \*, синтезируются В-лимфоцитами или образующимися из них плазматическими клетками. Известно 5 классов иммуноглобулинов: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE, при этом IgG, IgA и IgM — основные классы; IgD и IgE — минорные классы иммуноглобулинов плазмы человека. Молекула иммуноглобулина состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей. Каждая пара в свою очередь состоит из двух разных цепей: легкой (L) и тяжелой (H). Иными словами, молекула иммуноглобулинов состоит из двух легких (L) цепей (мол. масса 23000) и двух тяжелых (H) цепей (мол. масса 53000—75000), образующих тетрамер ( $L_2H_2$ ) при помощи дисульфидных связей (рис. 17.2). Каждая цепь разделена (может быть, несколько условно) на специфические домены, или участки, имеющие определенное структурное и функциональное значение. Половину легкой цепи, включающую карбоксильный конец, называют константной областью ( $C_L$ ), а N-концевую половину легкой цепи — варибельной областью ( $V_L$ ).

\* Существует мнение, что не все иммуноглобулины являются антителами [Уайт А. и др., 1981], т.е. термин «иммуноглобулины» относится не только к нормальным классам антител, но и, в частности, к большому числу «патологических» белков, обычно называемых миеломными белками.

Примерно четвертую часть тяжелой цепи, включающую N-конец, относят к вариабельной области H-цепи ( $V_H$ ), остальная часть ее — это константные области ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ). Участок иммуноглобулина, связывающийся со специфическим антигеном, формируется N-концевыми вариабельными областями легких и тяжелых цепей, т.е.  $V_H$ - и  $V_L$ -доменами. У высших позвоночных имеются все 5 классов антител (IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), каждый со своим классом H-цепей:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  соответственно. Молекулы IgA содержат  $\alpha$ -цепи, молекулы IgG —  $\gamma$ -цепи и т.д. Кроме того, имеется ряд подклассов иммуноглобулинов IgG и IgA. Например, у человека существует 4 подкласса IgG: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>, содержащих тяжелые цепи  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  и  $\gamma_4$  соответственно. Разные H-цепи придают шарнирным участкам и «хвостовым» областям антител различную конформацию и определяют характерные свойства каждого класса и подкласса (подробнее см. руководства по иммунологии).

В клинической практике встречаются состояния, характеризующиеся изменением как общего количества белков плазмы крови, так и процентного соотношения отдельных белковых фракций.

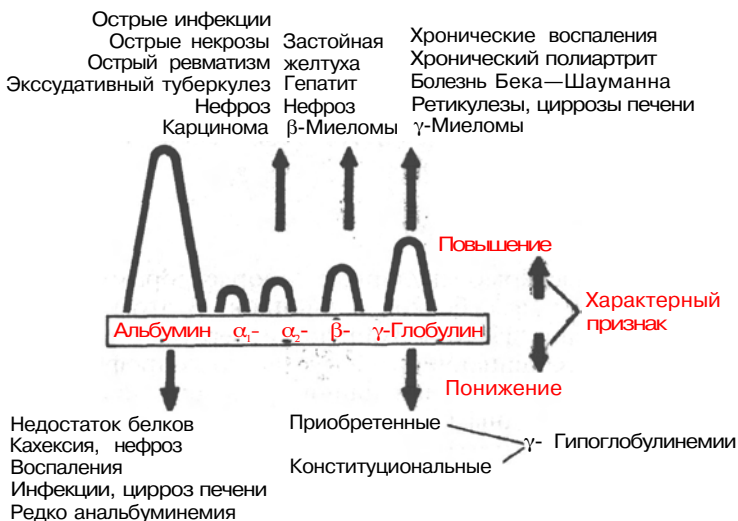
*Гиперпротеинемия* — увеличение общего содержания белков плазмы. Диарея у детей, рвота при непроходимости верхнего отдела тонкой кишки, обширные ожоги могут способствовать повышению концентрации белков в плазме крови. Иными словами, потеря воды организмом, а следовательно, и плазмой приводит к повышению концентрации белка в крови (относительная гиперпротеинемия).

При ряде патологических состояний может наблюдаться абсолютная гиперпротеинемия, обусловленная увеличением уровня  $\gamma$ -глобулинов: например, гиперпротеинемия в результате инфекционного или токсического раздражения системы макрофагов; гиперпротеинемия при миеломной болезни. В сыворотке крови больных миеломной болезнью обнаруживаются 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, представляющие собой легкие цепи иммуноглобулинов, получили название белков Бенс-Джонса. Явления парапротеинемии можно наблюдать и при макроглобулинемии Вальденстрема. Для болезни Вальденстрема характерно появление в плазме крови белков с большой молекулярной массой (1000000–1600000); содержание макроглобулинов может достигать 80% от общего количества белка, составляющего в этом случае 150–160 г/л.

*Гипопротеинемия*, или уменьшение общего количества белка в плазме крови, наблюдается главным образом при снижении уровня 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 пищеварительного 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 сыворот-



**Рис. 17.3.** Изменения электрофореграммы белков сыворотки крови при некоторых заболеваниях (по Эмриху).

ке крови остается в пределах нормы. Такое состояние носит название «диспротеинемия». На рис. 17.3 схематично представлен характер изменения белковых фракций сыворотки крови при ряде заболеваний без учета формы и стадии болезни.

В течении 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) и глюкозамин. Несколько реже встречается связь между гидроксилом треонина или серина и гексозаминами или гексозами.

Нейраминная 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 α<sub>1</sub>- и α<sub>2</sub>-фракциях глобулинов. Гликопротеины, связанные с α-глобулиновыми фракциями, содержат небольшое количество фруктозы, а гликопротеины, выявляемые в составе β- и особенно γ-глобулиновых фракций, содержат фруктозу в значительном количестве.

Повышенное содержание гликопротеинов в плазме или сыворотке крови наблюдается при туберкулезе, плевритах, пневмониях, остром ревматизме, гломерулонефритах, нефротическом синдроме, диабете, инфаркте миокар-

да, подагре, а также при остром и хроническом лейкозах, миеломе, лимфосаркоме и некоторых других болезнях. У больного ревматизмом увеличение содержания гликопротеинов в сыворотке соответствует тяжести заболевания. Это объясняется, по мнению ряда исследователей, деполимеризацией основного вещества соединительной ткани, что приводит к поступлению гликопротеинов в кровь.

### **Липопротеины плазмы крови**

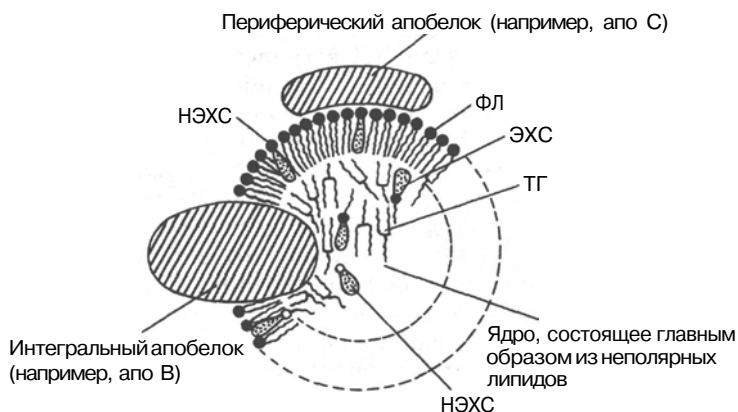
Липопротеины—это высокомолекулярные водорастворимые частицы, представляющие собой комплекс белков и липидов. В этом комплексе белки вместе с полярными липидами формируют поверхностный гидрофильный слой, окружающий и защищающий внутреннюю гидрофобную липидную сферу от водной среды и обеспечивающий транспорт липидов в кровяном русле и их доставку в органы и ткани.

Плазменные липопротеины (ЛП)—это сложные комплексные соединения, имеющие характерное строение: внутри липопротеиновой частицы находится жировая капля (ядро), содержащая неполярные липиды (триглицериды, эстерифицированный холестерин); жировая капля окружена оболочкой, в состав которой входят фосфолипиды, белок и свободный холестерин. Толщина наружной оболочки липопротеиновой частицы (ЛП-частица) составляет 2,1–2,2 нм, что соответствует половине толщины липидного бислоя клеточных мембран. Это позволило сделать заключение, что в плазменных липопротеинах наружная оболочка в отличие от клеточных мембран содержит липидный монослой. Фосфолипиды, а также неэстерифицированный холестерин (НЭХС) расположены в наружной оболочке таким образом, что полярные группы фиксированы наружу, а гидрофобные жирно-кислотные «хвосты»—внутри частицы, причем какая-то часть этих «хвостов» даже погружена в липидное ядро. По всей вероятности, наружная оболочка липопротеинов представляет собой не гомогенный слой, а мозаичную поверхность с выступающими участками белка. Существует много различных схем строения ЛП-частицы. Предполагают, что входящие в ее состав белки занимают только часть наружной оболочки. Допускается, что часть белковой молекулы погружена в ЛП-частицу глубже, чем толщина ее наружной оболочки (рис. 17.4). Итак, плазменные ЛП представляют собой сложные надмолекулярные комплексы, в которых химические связи между компонентами комплекса носят нековалентный характер. Поэтому применительно к ним вместо слова «молекула» употребляют выражение «частица».

**Классификация липопротеинов.** Существует несколько классификаций ЛП, основанных на различиях в их свойствах: гидратированной плотности, скорости флотации, электрофоретической подвижности, а также на различиях в апопротеиновом составе частиц.

Наибольшее распространение получила классификация, основанная на поведении отдельных ЛП в гравитационном поле в процессе ультрацентрифугирования. Применяя набор солевых плотностей, можно изолировать отдельные фракции ЛП: хиломикроны (ХМ)—самые легкие частицы, затем липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП) и липопротеины высокой плотности (ЛПВП).

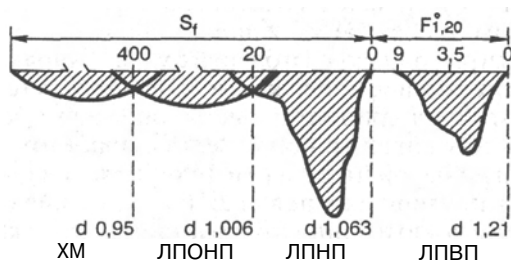
Различная электрофоретическая подвижность по отношению к глобулинам плазмы крови положена в основу другой классификации ЛП, согласно которой различают ХМ (остаются на старте подобно  $\gamma$ -глобулинам),  $\beta$ -ЛП, пре- $\beta$ -ЛП и  $\alpha$ -ЛП, занимающие положение  $\beta$ -,  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -глобулинов соответ-



**Рис. 17.4.** Строение ЛП-частицы (схема). Имеется сходство со структурой плазматической мембраны. Некоторое количество эстерифицированного холестерина и триглицеридов (не показано) содержится в поверхностном слое, а в ядре частицы — небольшое количество неэстерифицированного холестерина (по А.Н. Климову и Н.Г. Никутьевой). Объяснение в тексте.

ственно. Электрофоретическая подвижность фракций ЛП, выделенных путем ультрацентрифугирования, соответствует подвижности отдельных глобулинов, поэтому иногда используют двойное их обозначение: ЛПОНП и пре- $\beta$ -ЛП, ЛПНП и  $\beta$ -ЛП, ЛПВП и  $\alpha$ -ЛП (рис. 17.5). Следует помнить, что изолированные различными методами ЛП не являются полностью идентичными, поэтому рекомендуется использовать терминологию, соответствующую методу выделения.

**Аполипопротеины (апобелки, апо)** входят в состав липопротеинов. Это один белок либо несколько белков, или полипептидов, которые называют апобелками (сокращенно апо). Эти белки обозначают буквами латинского алфавита (А, В, С). Так, два главных апобелка ЛПВП обозначаются А-I и А-II. Основным апобелком ЛПНП является апобелок В, он входит также в состав ЛПОНП и хиломикронов. Апобелки С-I, С-II и С-III представляют собой небольшие полипептиды, которые могут свободно переходить от одного липопротеина к другому. Помимо апобелков А, В и С, в липопротеинах плазмы крови идентифицировано еще несколько апобелков. Одним из них является выделенный из ЛПОНП апобелок Е, на его долю приходится 5–10% от общего количества апобелков ЛПОНП.



**Рис. 17.5.** Шлирен-профиль липопротеинов плазмы крови человека при аналитическом ультрацентрифугировании (по А.Н. Климову и Н.Г. Никутьевой, 1995).

Апобелки выполняют не только структурную функцию, но и обеспечивают активное участие комплексов ЛП в транспорте липидов в токе крови от мест их синтеза к клеткам периферических тканей, а также обратный транспорт холестерина в печень для дальнейших метаболических превращений. Апобелки выполняют функцию лигандов во взаимодействии ЛП со специфическими рецепторами на клеточных мембранах, регулируя тем самым гомеостаз холестерина в клетках и в организме в целом. Не меньшее значение имеет также регуляция апобелками активности ряда основных ферментов липидного обмена: лецитин-холестеролацилтрансферазы, липопротеинлипазы, печеночной триглицеридлипазы. Структура и концентрация в плазме крови каждого апобелка находится под генетическим контролем, в то время как содержание липидов в большей степени подвержено влиянию диетических и других факторов.

*Дислиппротеинемией* (ДЛП) называют изменения в содержании липопротеинов в плазме (сыворотке) крови: повышение, снижение или практически полное отсутствие. Сюда же относят случаи появления в крови необычных или патологических ЛП. Таким образом, понятие «дислиппротеинемия» охватывает все разновидности изменения уровня ЛП в крови. Более узким является термин «гиперлиппротеинемия» (ГЛП), отражающий увеличение какого-то класса или классов ЛП в крови. Первой и весьма успешной попыткой систематизации отклонений от нормы в липопротеидном спектре крови явилась классификация типов ГЛП, разработанная D. Fredrickson и соавт. и одобренная экспертами ВОЗ. Согласно варианту ВОЗ, различают следующие типы ГЛП.

Тип I—гиперхиломикронемия. Основные изменения в липопротеинограмме следующие: высокое содержание ХМ, нормальное или слегка повышенное содержание ЛПОНП; резко повышенный уровень триглицеридов в сыворотке крови. Клинически это состояние проявляется ксантоматозом.

Тип II делят на два подтипа: тип IIa — гипер- $\beta$ -липопротеинемия с характерным высоким содержанием в крови ЛПНП и тип IIб — гипер- $\beta$ -липопротеинемия с высоким содержанием одновременно двух классов липопротеинов (ЛПНП, ЛПОНП). При типе II отмечается высокое, а в некоторых случаях очень высокое содержание холестерина в плазме крови. Уровень триглицеридов в крови может быть либо нормальным (типа IIa), либо повышенным (тип IIб). Клинически проявляется атеросклеротическими нарушениями, нередко развивается ишемическая болезнь сердца (ИБС).

Тип III — дис- $\beta$ -липопротеинемия. В сыворотке крови появляются липопротеины с необычно высоким содержанием холестерина и высокой электрофоретической подвижностью («флотирующие»  $\beta$ -липопротеины). Они накапливаются в крови вследствие нарушения превращения ЛПОНП в ЛПНП. Этот тип ГЛП часто сочетается с различными проявлениями атеросклероза, в том числе с ИБС и поражением сосудов ног.

Тип IV — гиперпре- $\beta$ -липопротеинемия. Характерны 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, ИБС.

Тип V — гиперпре- $\beta$ -липопротеинемия и гиперхиломикронемия. Наблюдаются повышение уровня ЛПОНП, наличие ХМ. Клинически проявляется ксантоматозом, иногда сочетается со скрытым диабетом. Ишемической болезни сердца при данном типе ГЛП не наблюдается.

Несомненным достоинством данной классификации является то, что она выделила связь нарушений обмена ЛП с развитием атеросклероза, благо-



даря чему не утратила своего значения и в настоящее время. Однако эта классификация не охватывает все возможные варианты отклонений от нормы в содержании липидов и ЛП в плазме крови. В частности, она не учитывает изменения концентрации ЛПВП, пониженное содержание которых является независимым фактором риска развития атеросклероза и ИБС, а повышенное, наоборот, выполняет роль антириск-фактора.

Исследования, проведенные во многих странах мира, показали, что у больных ИБС содержание  $\alpha$ -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 (К), представляющий собой отношение уровня холестерина ЛПНП и ЛПОНП к содержанию холестерина ЛПВП:

$$K = \frac{\text{Холестерин ЛПНП} + \text{холестерин ЛПОНП}}{\text{Холестерин ЛПВП}}$$

В клинике очень удобно рассчитывать этот коэффициент на основании определения уровня общего холестерина и холестерина ЛПВП:

$$K = \frac{\text{Общий холестерин} - \text{холестерин ЛПВП}}{\text{Холестерин ЛПВП}}$$

Чем выше этот коэффициент (у здоровых лиц он не превышает 3), тем выше опасность развития (и наличия) ИБС.

### **Отдельные наиболее изученные и интересные в клиническом отношении белки плазмы**

**Гаптоглобин** входит в состав глобулиновой фракции. Этот белок обладает способностью соединяться с гемоглобином. Образовавшийся гаптоглобин–гемоглобиновый комплекс может поглощаться системой макрофагов, при этом предупреждается потеря железа, входящего в состав гемоглобина как при физиологическом, так и при патологическом его освобождении из эритроцитов. Методом электрофореза выявлены 3 группы гаптоглобинов: Нр 1–1, Нр 2–1 и Нр 2–2. Установлено, что имеется связь между наследованием типов гаптоглобинов и резус-антигенами.

**Ингибиторы трипсина** обнаруживаются при электрофорезе белков плазмы крови в зоне  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -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, беременности и ряде других состояний содержание белков-ингибиторов протеолитических ферментов увеличивается.

**Трансферрин** относится к  $\beta$ -глобулинам и обладает способностью соединяться с железом. Комплекс трансферрина с железом окрашен в оранжевый цвет. В этом комплексе железо находится в трехвалентной форме. Концентрация трансферрина в сыворотке крови составляет около 200–400 мг% (23–45 мкмоль/л). В норме только  $\frac{1}{3}$  трансферрина насыщена железом. Следовательно, имеется определенный резерв трансферрина, способного связывать железо. Трансферрин у различных людей может принадлежать к разным типам. Выявлено 19 типов трансферринов, 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. Концентрация церулоплазмينا в сыворотке крови в норме 25—43 мг% (1,7—2,9 мкмоль/л). При гепатоцеребральной дистрофии (болезнь Вильсона—Коновалова) содержание церулоплазмينا в сыворотке крови значительно снижено, а концентрация меди в моче высокая. Снижение уровня церулоплазмينا отмечается также при мальабсорбции, нефрозе, дефиците меди, возникающем при парентеральном питании.

Содержание церулоплазмينا повышено при беременности, гипертиреозе, инфекции, апластической анемии, остром лейкозе, лимфогранулематозе, циррозе печени.

Электрофоретическими методами установлено наличие 4 изоферментов церулоплазмينا. В норме в сыворотке крови взрослых людей обнаруживается 2 изофермента, которые заметно различаются по своей подвижности при электрофорезе в ацетатном буфере при pH 5,5. В сыворотке новорожденных также были выявлены 2 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.

**C-реактивный белок** получил свое название в результате способности вступать в реакцию преципитации с C-полисахаридом пневмококков. В сыворотке крови здорового организма C-реактивный белок отсутствует, но обнаруживается при многих патологических состояниях, сопровождающихся воспалением и некрозом тканей.

Появляется C-реактивный белок в острый период болезни, поэтому его иногда называют белком «острой фазы». С переходом в хроническую фазу заболевания C-реактивный белок исчезает из крови и снова появляется при обострении процесса. При электрофорезе белок перемещается вместе с  $\alpha_2$ -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°C. При электрофорезе Криоглобулин чаще всего передвигается вместе с  $\gamma$ -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 (мол. масса 220000), так и в димерной формах. Данный белок широко распространен в соединительной ткани.

**Интерферон**—специфический белок, синтезируемый в клетках организма в ответ на воздействие вирусов. Этот белок обладает способностью угнетать размножение вирусов 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 3 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. Один из них находится главным образом в цитозоле клетки (ЛДГ, альдолаза), другие — в митохондриях (глутаматдегидрогеназа), третьи — в лизосомах ( $\beta$ -глокуронидаза, 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; 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.). В физиологических условиях эти ферменты в основном выделяются с желчью. Еще не полностью выяснены механизмы, регулирующие поступление данных ферментов в желчные капилляры. При многих патологических процессах выделение экскреторных ферментов с желчью нарушается, а активность в плазме крови повышается.

Особый интерес для клиники 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 тканей. Однако известны ферменты, которые более или менее специфичны для печеночной ткани. К таким ферментам, в частности, относится  $\gamma$ -глутамилтранспептидаза, или  $\gamma$ -глутамилтрансфераза (ГГТ). Данный фермент — высокочувствительный индикатор при заболеваниях печени. Повышение активности ГГТ отмечается при остром инфекционном или токсическом гепатите, циррозе печени, внутрпеченочной или внепеченочной закупорке желчных путей, первичном или метастатическом опухолевом поражении печени, алкогольном поражении печени. Иногда повышение активности ГГТ наблюдается при застойной сердечной недостаточности, редко — после инфаркта миокарда, при панкреатитах, опухолях поджелудочной железы.

**Органоспецифическими ферментами** для печени считаются также гистидаза, сорбитолдегидрогеназа, аргиназа и орнитинкарбамоилтрансфераза. Изменение активности этих ферментов в сыворотке крови свидетельствует о поражении печеночной ткани.

В настоящее время особо важным лабораторным тестом стало исследование активности изоферментов в сыворотке крови, в частности изоферментов ЛДГ. Известно, что в сердечной мышце наибольшей активностью

обладают изоферменты ЛДГ<sub>1</sub> и ЛДГ<sub>2</sub>, а в ткани печени—ЛДГ<sub>4</sub> и ЛДГ<sub>5</sub> (см. главу 10). Установлено, что у больных с острым инфарктом миокарда в сыворотке крови резко повышается активность изоферментов ЛДГ<sub>1</sub> и отчасти ЛДГ<sub>2</sub>. 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 ЛДГ<sub>4</sub> и ЛДГ<sub>5</sub> и уменьшается активность ЛДГ<sub>1</sub> и ЛДГ<sub>2</sub>.

Диагностическое значение имеет также исследование активности изоферментов креатинкиназы в сыворотке крови. Существуют по крайней мере 3 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 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. Повышение активности МВ-формы в сыворотке крови свидетельствует о поражении именно сердечной мышцы.

Возрастание активности ферментов сыворотки крови при многих патологических процессах объясняется прежде всего двумя причинами: 1) выходом в кровяное русло ферментов из поврежденных участков органов или тканей на фоне продолжающегося их биосинтеза в поврежденных тканях; 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%), 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 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 (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 вызывающих ее причин подразделяется на ретенционную и продукционную. Ретенционная азотемия развивается в результате недостаточного выделения с мочой азотсодержащих продуктов при нормаль-

\* Эрготионеин - бетаин-2-меркаптогистидин, соединение, входящее в состав эритроцитов; обнаружен также в печени и моче.

ном 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 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 развивается 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 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 ммоль/л (в расчете на азот мочевины)\* 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 (в процентах):

$$\frac{\text{Азот мочевины}}{\text{Остаточный азот}} \times 100.$$

В норме это соотношение меньше 48%. При почечной недостаточности оно повышается и может достигать 90%, а при нарушении мочевинообразовательной функции печени снижается (ниже 45%).

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 мочевой кислоты в цельной крови составляет 0,18–0,24 ммоль/л (в сыворотке крови – около 0,29 ммоль/л). Повышение содержания мочевой кислоты в крови (гиперурикемия) – главный симптом подагры. При подагре уровень мочевой 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 пищеварительного тракта, другая часть аминокислот образуется в результате распада белков ткани. Почти пятую часть содержащихся в плазме аминокислот составляют глутаминовая кислота и глутамин (табл. 17.2). 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 со-

\* Содержание азота мочевины (2 атома с мол. массой 14) в 2,14 раза меньше, чем самой мочевины (мол. масса 60).

Таблица 17.2. Концентрация свободных аминокислот в плазме крови человека

Аминокислота	Концентрация, мкмоль/л	Аминокислота	Концентрация, мкмоль/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

держанию 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.

Суммарное определение уровня пептидов в крови производят сравнительно редко. Следует помнить, что многие пептиды крови являются биологически активными соединениями и их определение представляет большой клинический интерес. К таким соединениям относятся кинины (см. главу 8).

## 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, представлены в табл. 17.1. В клинике большое значение придают 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. Часть внеклеточной воды находится в сосудистом русле (5% от массы тела), большая часть – вне сосудистого русла – это межклеточная (интерстициальная), или тканевая, жидкость (15% от массы тела). Кроме того, различают «свободную воду», составляющую основу внутри- и внеклеточной жидкости, 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 натрий занимает ведущее место и составляет 93% от всего их количества. Среди анионов следует выделить прежде всего хлор и бикарбонат. Сумма анионов и катионов практически одинакова, т.е. вся система электронейтральна.

**Натрий.** Это основной осмотически активный ион внеклеточного пространства. В плазме крови концентрация ионов  $\text{Na}^+$  приблизительно в 8 раз выше (132–150 ммоль/л), чем в эритроцитах.

При *гипернатриемии*, как правило, развивается синдром, обусловленный гипергидратацией организма. Накопление натрия в плазме крови 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 достигается введением растворов хлорида натрия с расчетом дефицита его во внеклеточном пространстве и клетке.

**Калий.** Концентрация ионов  $\text{K}^+$  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.

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 в работе 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 кальция.

Кальций принимает активное участие в процессах нервно-мышечной возбудимости (как антагонист ионов  $\text{K}^+$ ), 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. В таких случаях кальций поступает в плазму из костей, которые становятся ломкими.

Важное диагностическое значение имеет определение уровня кальция при *гипокальциемии*. Состояние гипокальциемии наблюдается при гипопаратиреозе. Нарушение 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 организме магний локализуется в основном внутри клетки – 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 определяют содержание неорганического фосфата в плазме (сыворотке) крови.

Уровень неорганического фосфата в плазме крови повышается 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 недостаточно выражены. Гипофосфатемия наблюдается также при введении инсулина, гиперпаратиреозе, остеомалации, спру и некоторых других заболеваниях.

**Железо.** В цельной крови железо содержится в основном в эритроцитах (около 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 возрастают. Известно, что в двенадцатиперстной кишке железо всасывается 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 трехвалентное. В костном мозге, печени и селезенке железо депонируется в форме ферритина—своеобразного резерва легкомобилизуемого железа. Кроме того, избыток железа может откладываться в тканях в виде хорошо известного морфологам метаболически инертного гемосидерина.

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.

**Микроэлементы.** Обнаруживаемые в тканях, в том числе 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 находится в связанном с белками состоянии. Так, медь плазмы входит в состав церулоплазмينا, цинк эритроцитов целиком связан с карбоангидразой (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 составляет комплекс преимущественно со специфическим связывающим его глобулином, который располагается при электрофорезе сывороточных белков между двумя фракциями  $\alpha$ -глобулина. Поэтому тироксинсвязывающий белок носит название интеральфаглобулина.



Кобальт, обнаруживаемый в крови, также находится в белково-связанной форме и лишь частично как структурный компонент витамина В<sub>12</sub>. 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 выделяют гипо-, нормо- и гиперхромную анемию 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 HbA<sub>1</sub> (96–98% от общего содержания гемоглобина), в небольшом количестве присутствуют HbA<sub>2</sub> (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 описано более 100 типов таких гемоглобинов. Появление в крови аномальных типов гемоглобина 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 3 типов: лимфоцитами (26% от общего числа лейкоцитов), моноцитами (7%) и полиморфно-ядерными лейкоцитами, или гранулоцитами (70%). При окрашивании различными красителями выявляются 3 типа гранулоцитов: нейтрофилы, эозинофилы и базофилы.

Лимфоциты продуцируются 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. Тромбоциты не могут считаться полноценными клетками, поскольку не содержат ядра, однако 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 рН внутренней среды организма обусловлено совместным действием буферных систем и ряда физиологических механизмов. К последним относятся дыхательная деятельность легких и выделительная функция почек.

Кислотно-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.

Буферная система\* представляет собой сопряженную кислотно-основную пару, состоящую из акцептора и донора 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 позволяет 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

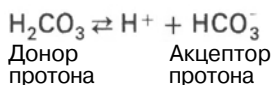
Установлено, что состоянию нормы соответствует определенный диапазон колебаний рН крови—от 7,37 до 7,44 со средней величиной 7,40 \*\*. Кровь представляет собой взвесь клеток в жидкой среде, поэтому ее кислотно-основное равновесие поддерживается совместным участием буферных систем плазмы и клеток крови. Важнейшими буферными системами крови являются бикарбонатная, фосфатная, белковая и наиболее мощная 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. Бикарбонат-

\* 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.

\*\* 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.

ная система \* представляет собой сопряженную кислотно-основную пару, состоящую из молекулы угольной кислоты  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , выполняющую роль донора протона, и бикарбонат-иона  $\text{HCO}_3^-$ , выполняющего роль акцептора протона:



Для данной буферной системы величину pH в растворе можно выразить через константу диссоциации угольной кислоты ( $\text{pK}_{\text{H}_2\text{CO}_3}$ ) и логарифм концентрации недиссоциированных молекул  $\text{H}_2\text{CO}_3$  и ионов  $\text{HCO}_3^-$ :

$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{H}_2\text{CO}_3} + \lg = \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}.$$

Истинная концентрация недиссоциированных молекул  $\text{H}_2\text{CO}_3$  в крови незначительна \*\* и находится в прямой зависимости от концентрации растворенного углекислого газа ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$ ). Поэтому удобнее пользоваться тем вариантом уравнения, в котором  $\text{pK}_{\text{H}_2\text{CO}_3}$  заменена «кажущейся» константой диссоциации  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , учитывающей общую концентрацию растворенного  $\text{CO}_2$  в крови:

$$\text{pH} = \text{pK}_1 + \lg = \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2(\text{p})]},$$

где  $\text{K}_1$  – «кажущаяся» константа диссоциации  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ;  $[\text{CO}_2(\text{p})]$  – концентрация растворенного  $\text{CO}_2$ .

При нормальном значении pH крови (7,4) концентрация ионов бикарбоната  $\text{HCO}_3^-$  в плазме крови превышает концентрацию  $\text{CO}_2$  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  $\text{H}^+$  взаимодействуют с ионами бикарбоната  $\text{HCO}_3^-$ , что приводит к образованию слабодиссоциирующей угольной кислоты  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . Последующее снижение концентрации  $\text{H}_2\text{CO}_3$  достигается в результате ускоренного выделения  $\text{CO}_2$  через легкие в результате их гипервентиляции (напомним, что концентрация  $\text{H}_2\text{CO}_3$  в плазме крови определяется давлением  $\text{CO}_2$  в альвеолярной газовой смеси).

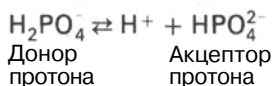
Если в крови увеличивается количество оснований, то они, взаимодействуя со слабой угольной кислотой, образуют ионы бикарбоната и воду. При этом не происходит сколько-нибудь заметных сдвигов в величине pH. Кроме того, для сохранения нормального соотношения между компонентами буферной системы в этом случае подключаются физиологические механизмы регуляции кислотно-основного равновесия: происходит задер-

\* Бикарбонаты во внеклеточной жидкости находятся в виде натриевой соли  $\text{NaHCO}_3$  и внутри клеток - калиевой соли  $\text{KHCO}_3$ , имеющих общий анион  $\text{HCO}_3^-$ .

\*\* Молярная концентрация  $\text{H}_2\text{CO}_3$  по сравнению с концентрацией  $\text{CO}_2$  в плазме крови очень низкая. При  $\text{P}_{\text{CO}_2} = 53,3$  гПа (40 мм рт. ст.) на 1 молекулу  $\text{H}_2\text{CO}_3$  приходится примерно 500 молекул  $\text{CO}_2$ .

ка в плазме крови некоторого количества  $\text{CO}_2$  в результате гиповентиляции легких\*. Как будет показано далее, данная буферная система тесно связана с гемоглибиновой системой.

**Фосфатная буферная система** представляет собой сопряженную кислотно-основную пару, состоящую из иона  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (донор протонов) и иона  $\text{HPO}_4^{2-}$  (акцептор протонов):



Роль кислоты в этой системе выполняет однозамещенный фосфат  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , а роль соли двузамещенный фосфат —  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

Фосфатная буферная система составляет всего лишь 1% от буферной емкости крови. В других 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 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.

Буферное действие фосфатной системы основано на возможности связывания водородных ионов ионами  $\text{HPO}_4^{2-}$  с образованием  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ( $\text{H}^+ + \text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), а также ионов  $\text{OH}^-$  с ионами  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ( $\text{OH}^- + \text{H}_2\text{PO}_4^- \rightarrow \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O}$ ). Буферная пара ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ — $\text{HPO}_4^{2-}$ ) способна оказывать влияние при изменениях pH в интервале от 6,1 до 7,7 и может обеспечивать определенную буферную емкость внутриклеточной жидкости, величина pH которой в пределах 6,9—7,4. В крови максимальная емкость фосфатного буфера проявляется вблизи значения pH 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 КОР в плазме крови, чем другие буферные системы.

Белки образуют буферную систему благодаря наличию кислотно-основных групп в молекуле белков: белок— $\text{H}^+$  (кислота, донор протонов) и белок (сопряженное основание, акцептор протонов). Белковая буферная система плазмы крови эффективна в области значений pH 7,2—7,4.

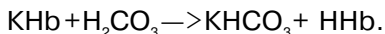
**Гемоглибиновая буферная система**—самая мощная буферная система крови. Она в 9 раз мощнее бикарбонатного буфера; на ее долю приходится 75% от всей буферной емкости крови.

Участие гемоглобина в регуляции pH 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 кислородом гемоглобин становится более сильной кислотой ( $\text{H}\text{HbO}_2$ ). Гемоглобин, отдавая кислород, превращается в очень слабую органическую кислоту ( $\text{H}\text{Hb}$ ).

Итак, гемоглибиновая буферная система состоит из неионизированного гемоглобина  $\text{H}\text{Hb}$  (слабая органическая кислота, донор протонов) и калие-

\* 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 для этого нужно всего лишь 30 с.

вой соли гемоглобина КНб (сопряженное основание, акцептор протонов). Точно так же может быть рассмотрена оксигемоглобиновая буферная система. Система гемоглобина и система оксигемоглобина являются взаимопревращающимися системами и существуют как единое целое. Буферные свойства гемоглобина прежде всего обусловлены возможностью взаимодействия кисло реагирующих 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 ННб 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 кисло реагирующих продуктов обмена.

Гемоглобин (ННб), попадая в капилляры легких, превращается в оксигемоглобин (ННбО<sub>2</sub>), что приводит к некоторому подкислению крови, вытеснению части Н<sub>2</sub>СО<sub>3</sub> из бикарбонатов и понижению щелочного резерва крови\*. 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.

## Нарушения кислотно-основного равновесия

Если компенсаторные механизмы организма не способны предотвратить сдвиги концентрации водородных ионов, то нарушается кислотно-основное равновесие. При этом наблюдаются два противоположных состояния — ацидоз и алкалоз.

При **ацидозе** концентрация водородных ионов в крови выше нормальных величин. Естественно, при этом рН уменьшается. Снижение величины рН ниже 6,8 вызывает смерть.

В тех случаях, когда концентрация водородных ионов в крови уменьшается (соответственно значение рН возрастает), 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 КОР выделяют 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  $P_{\text{CO}_2}$  артериальной крови. Как следствие увеличивается содержание Н<sub>2</sub>СО<sub>3</sub> в плазме

\* Щелочной резерв крови - способность крови связывать СО<sub>2</sub> - исследуют теми же способами, что и общую концентрацию СО<sub>2</sub>, но в условиях уравнивания плазмы крови при  $P_{\text{CO}_2} = 53,3$  гПа (40 мм рт. ст.): определяют общее количество СО<sub>2</sub> и количество физически растворенного СО<sub>2</sub> в исследуемой плазме. Вычитая из первой цифры вторую, получают величину, которая называется щелочным резервом крови. Она выражается в объемных процентах СО<sub>2</sub> (объем СО<sub>2</sub> в миллилитрах на 100 мл плазмы). В норме у человека эта величина составляет 50-60 об. % СО<sub>2</sub>.

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 нарушенной КОР. 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 пищеварительного тракта, шоке (кардиогенном, травматическом, ожоговом и др.).

Особенно явно метаболический ацидоз проявляется у больных тяжелой формой диабета и не получающих инсулина. Увеличение кислотности обусловлено поступлением в кровь больших количеств кетоновых тел. В ответ на постоянную выработку кетоновых тел ( $\beta$ -оксималяной 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 выделения  $CO_2$  легкими (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. Все это 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  $P_{CO_2}$  в артериальной крови).

Данный вид алкалоза может наблюдаться, например, при вдыхании чистого кислорода, компенсаторной одышке, сопровождающей ряд заболеваний, пребывании в разреженной атмосфере и при 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 полностью компенсировать уменьшение концентрации  $H_2CO_3$  и гипервентиляция способна за несколько минут поднять внеклеточный рН до 7,65. При дыхательном алкалозе 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 подверглись 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. 17.3). Кислотность мочи и содержание аммиака в ней понижены.

Таблица 17.3. Наиболее простые показатели оценки кислотно-основного равновесия

Сдвиги (изменения) кислотно-основного равновесия	Моча, pH	Плазма, $\text{HCO}_3^-$ , ммоль/л	Плазма, $\text{H}_2\text{CO}_3$ , ммоль/л
Норма	6–7	25	0,625
Дыхательный ацидоз	↓	↑	↑
Дыхательный алкалоз	↑	↓	↓
Метаболический ацидоз	↓	↓	↓
Метаболический алкалоз	↑	↑	↑

В клинической практике изолированные формы дыхательных или метаболических нарушений встречаются крайне редко. Уточнить характер этих нарушений и степень компенсации помогает определение комплекса показателей КОР. В последние десятилетия для изучения показателей КОР широко используются чувствительные электроды для прямого измерения pH и  $P_{\text{CO}_2}$  крови. В клинических условиях удобно пользоваться приборами типа «Аstrup» или отечественными аппаратами АЗИВ, АКОР. При помощи этих приборов и соответствующих номограмм можно определить следующие основные показатели КОР:

- 1) актуальный pH крови—отрицательный десятичный логарифм концентрации водородных ионов крови в физиологических условиях;
- 2) актуальное  $P_{\text{CO}_2}$  цельной крови—парциальное давление углекислого газа ( $\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{CO}_2$ ) в крови в физиологических условиях;
- 3) актуальный бикарбонат (AB)—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 (NBV)—буферные основания цельной крови при физиологических значениях pH и  $P_{\text{CO}_2}$  альвеолярного воздуха;
- 7) излишек оснований (BE)—показатель избытка или недостатка буферных мощностей (BB—NBV).

## ДЫХАТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ КРОВИ

Сущность дыхательной функции крови состоит в доставке кислорода от легких к тканям и углекислого газа от тканей к легким (табл. 17.4).

### 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.

Таблица 17.4. Состав вдыхаемого, альвеолярного и выдыхаемого воздуха (по Уайту и др., 1981)

Газ	Вдыхаемый воздух		Альвеолярный воздух		Выдыхаемый воздух	
	Р (гПа)	об. %	Р (гПа)	об. %	Р (гПа)	об. %
O <sub>2</sub>	210,9	20,95	134,9	14,0	154,9	16,1
CO <sub>2</sub>	0,4	0,04	53,3	5,6	38,0	4,5
N <sub>2</sub>	795,3	79,0	762,4	80,0	757,7	79,2
H <sub>2</sub> O	6,7	—	62,7	—	62,7	—
Всего...	1013,3	99,99	1013,3	99,6	1013,3	99,8

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 раз и более (до 2–3 л/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. 17.5).

Таблица 17.5. Коэффициенты абсорбции (растворимости) вдыхаемых газов (в миллилитрах на 1 мл среды при давлении 1013,3 гПа - 760 мм рт. ст.)

Среда	t °C	Газ		
		O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
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

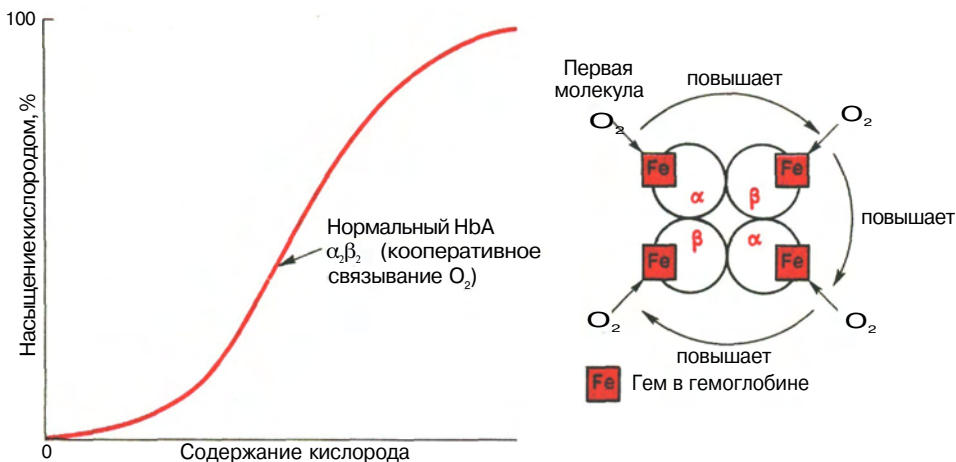
Исходя из приведенных в табл. 17.5 данных, а также зная P<sub>O<sub>2</sub></sub> в артериальной крови – 107–120 гПа (80–90 мм рт. ст.), нетрудно видеть, что количество физически растворенного кислорода в плазме крови не может превышать 0,3 об. %. При расчете кислородной емкости крови этой величиной можно пренебречь.

Итак, функцию переносчика кислорода в организме выполняет гемоглобин. Напомним, что молекула гемоглобина построена из 4 субъединиц (полипептидных цепей), каждая из которых связана с гемом (см. главу 2). Следовательно, молекула гемоглобина имеет 4 гема, к которым может присоединяться кислород, при этом гемоглобин переходит в оксигемоглобин.

Гемоглобин человека содержит 0,335% железа. Каждый грамм-атом железа (55,84 г) в составе гемоглобина при полном насыщении кислородом связывает 1 грамм-молекулу кислорода (22400 мл). Таким образом, 100 г гемоглобина могут связывать

$$\frac{0,335 \cdot 22400}{55,84} = 134 \text{ мл кислорода,}$$





**Рис. 17.6.** Кривая насыщения гемоглобина кислородом. Объяснение в тексте.

а каждый грамм гемоглобина – 1,34 мл кислорода. Содержание гемоглобина в крови здорового человека составляет 13–16%, т.е. в 100 мл крови 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 содержит 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

$$\frac{15 \cdot 1,34 \cdot 70}{100} = 14,1 \text{ мл кислорода (около 14 об. \%)}.$$

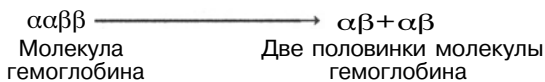
Артериовенозная разница по кислороду\* будет около 6 об. %. Таким образом, за 1 мин ткани в состоянии покоя получают 200–240 мл кислорода (при условии, что минутный объем сердца в покое составляет 4 л).

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 свойство гемоглобина к кислороду (рис. 17.6).

Характерная для гемоглобина S-образная кривая насыщения кислородом свидетельствует, что связывание первой молекулы кислорода одним из

\* 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 пищеварительном тракте - 3, в почках - 1,5 об. %.

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, 4 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  $\alpha$ -цепь и одну  $\beta$ -цепь:



При взаимодействии молекулы кислорода с одним из четырех гемов гемоглобина кислород присоединяется к одной из половинок молекулы гемоглобина (допустим, к  $\alpha$ -цепи этой половинки). Как только такое присоединение произойдет,  $\alpha$ -полипептидная цепь претерпевает конформационные изменения, которые передаются на тесно связанную с ней  $\beta$ -цепь; последняя также подвергается конформационным сдвигам.  $\beta$ -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 половинки молекулы гемоглобина возникает новое, внутреннее, напряженное состояние молекулы гемоглобина, которое вынуждает и вторую половину гемоглобина изменить конформацию. Теперь еще две молекулы кислорода, по-видимому, по очереди связываются со второй половинкой\* 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 со 133,3 до 80–93,3 гПа. Поэтому подъем на высоту до 3,0–3,5 км над уровнем моря не сопровождается развитием выраженной гипоксемии.

Численно сродство гемоглобина к кислороду принято выражать величиной  $P_{50}$  — 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. 17.6). 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

\* Термин «субъединица» не вполне однозначен в применении к молекуле гемоглобина, так как она содержит четыре структурных элемента (две  $\alpha$ -цепи и две  $\beta$ -цепи), но имеет при этом только две функциональные субъединицы, а именно две  $\alpha\beta$ -половинки.

легко отдает кислород. В легких  $\text{CO}_2$  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 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 различаются 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 2 группы:

1. Гипоксия вследствие понижения  $P_{\text{O}_2}$  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 нормальное, но  $P_{\text{O}_2}$  понижено: например, при аварии 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  $P_{\text{O}_2}$  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 гипервентиляцией, 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  $P_{\text{O}_2}$  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 кровообращению органов и тканей. Для газового состава крови в типичных случаях циркуляторной гипоксии характерны нормальные напряжение и со-

держание кислорода в артериальной крови, снижение этих показателей в венозной крови и высокая артериовенозная 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 гемоглобина. При образовании карбоксигемоглобина и метгемоглобина напряжение кислорода в венозной крови и тканях оказывается значительно пониженным, одновременно уменьшается артериовенозная разница 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 чего подавляется потребление кислорода клетками. Иными словами, при гистотоксической гипоксии ткани не в состоянии извлекать кислород из тканевых капилляров даже при высоком  $P_{O_2}$ .

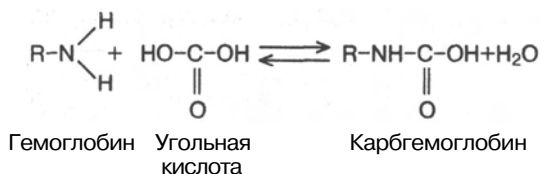
## **Перенос углекислого газа кровью от тканей к легким**

В организме человека, не выполняющего физической работы (состояние покоя), от тканей к легким каждую минуту переносится примерно 180 мл углекислого газа. Эту величину легко рассчитать. Если дыхательный коэффициент равен 0,85, то при поглощении тканями в покое 200 мл кислорода в минуту должно образовываться около 170 мл углекислого газа ( $200 \cdot 0,85$ ). На самом деле величина несколько больше, поскольку количество поглощаемого в покое кислорода колеблется от 200 до 240 мл в минуту.

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 его переносится в физически растворенном виде. Растворимость  $CO_2$  в плазме крови в 40 раз превышает растворимость в ней кислорода, тем не менее при небольшой артериовенозной разнице  $P_{CO_2}$  (напряжение  $CO_2$  в венозной крови, притекающей к легким по легочной артерии, равно 60 гПа, а в артериальной крови — 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  $\text{CO}_2$ .

Количество карбаминовой формы невелико: в артериальной крови оно составляет 3 об. %, в венозной—3,8 об. % \*. В виде карбаминовой формы из ткани к легким переносится от 3 до 10% всего углекислого газа, поступающего из тканей в кровь. Основная масса  $\text{CO}_2$  транспортируется с кровью к легким в форме бикарбоната, при этом важнейшую роль играет гемоглобин эритроцитов.

Как отмечалось, кислотный характер оксигемоглобина выражен значительно сильнее, чем гемоглобина (константа диссоциации  $\text{H}\text{HbO}_2$  примерно в 20 раз больше константы диссоциации  $\text{H}\text{Hb}$ ). Важно также запомнить, что поступающий в ткани с кровью оксигемоглобин является более сильной кислотой, чем  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , и связан с катионом калия. Эту калийную соль оксигемоглобина можно обозначить как  $\text{K}\text{HbO}_2$  (рис. 17.7). В периферических капиллярах большого круга кровообращения гемоглобин эритроцитов отдает кислород тканям ( $\text{K}\text{HbO}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{K}\text{Hb}$ ), его способность связывать ионы водорода увеличивается. Одновременно в эритроцит поступает продукт обмена—углекислый газ. Под влиянием фермента карбоангидразы \*\* углекислый газ взаимодействует с водой, при этом образуется угольная кислота. Возникающий за счет угольной кислоты избыток водородных ионов связывается с гемоглобином, отдавшим кислород, а накапливающиеся анионы  $\text{HCO}_3^-$  выходят из эритроцита в плазму \*\*\*:



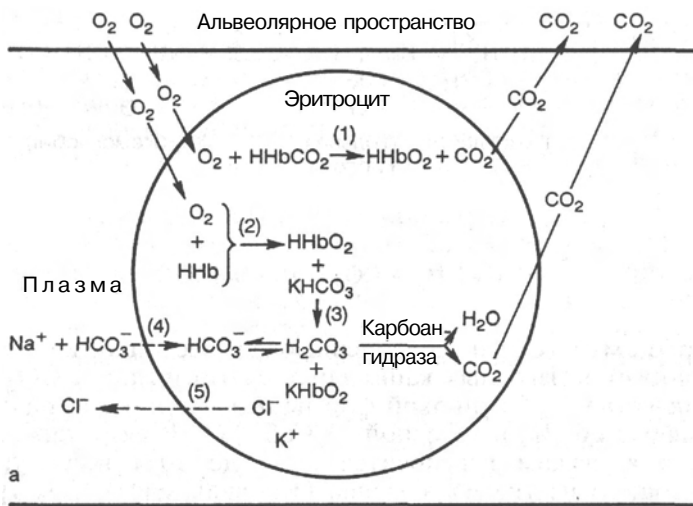
В обмен на эти ионы в эритроцит поступают анионы хлора, для которых мембрана эритроцитов проницаема, в то время как натрий—другой составной элемент хлорида натрия, содержащегося в крови, остается в плазме. В итоге в плазме крови повышается содержание бикарбоната натрия  $\text{NaHCO}_3$ .

Этот процесс способствует восстановлению щелочного резерва крови, т.е. бикарбонатная буферная система находится в довольно тесных функциональных связях с буферной системой эритроцитов.

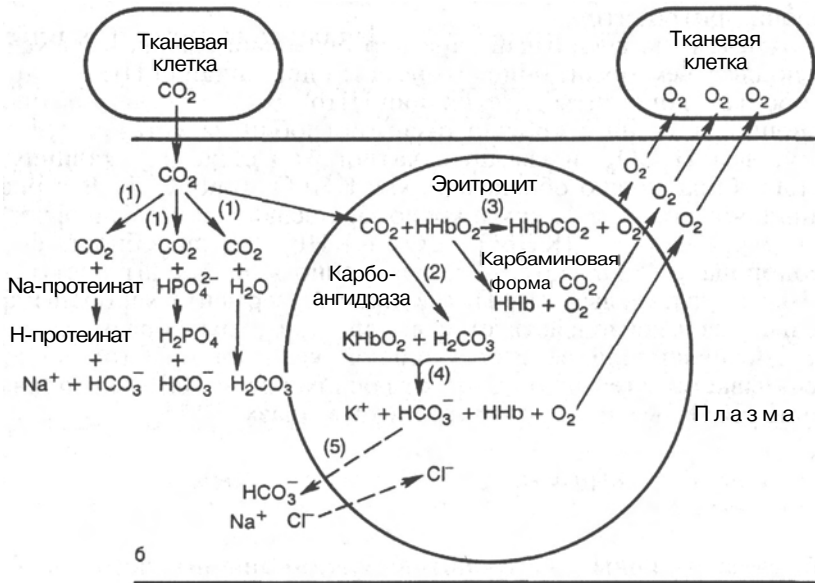
\* Содержание карбаминовой формы  $\text{CO}_2$  в венозной крови составляет 1,5-2,0 ммоль/л, в артериальной— 1,0 ммоль/л.

\*\* Карбоангидраза существует в нескольких молекулярных формах (изоферменты А, В и С), которые можно разделить при помощи электрофореза.

\*\*\* В артериальной крови содержится  $\text{HCO}_3^-$ : в плазме— 25,5 ммоль/л, в эритроцитах— 12,7 ммоль/л, в венозной крови— соответственно 26,4 и 13,9 ммоль/л.



a

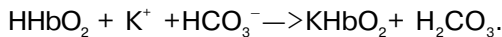


б

**Рис. 17.7.** Роль системы плазма-эритроцит в дыхательной функции крови (по Г.Е. Владимирову, Н.С. Пантелеевой).

а- химические процессы в капиллярах легких; б- химические процессы в капиллярах ткани.

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  $P_{\text{CO}_2}$  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  $\text{HCO}_3^-$ , а в плазму выходит эквивалентное количество ионов  $\text{Cl}^-$ . 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% от 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. Первоначально она сводилась к следующему: свертывание крови—ферментативный процесс; для свертывания крови необходимо присутствие трех веществ: фибриногена, фибринопластического вещества и тромбина.

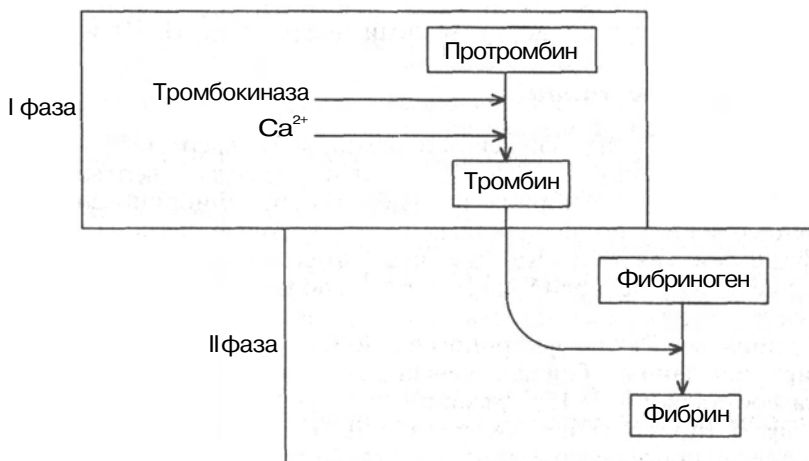
В ходе реакции, катализируемой тромбином, первые два вещества, соединяясь между собой, образуют фибрин. Циркулирующая в сосудах кровь не свертывается по причине отсутствия в ней тромбина.

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 тромбоцитов и ионы кальция.

Таким образом, через 20 лет после открытия тромбина была сформулирована классическая ферментативная теория свертывания крови, которая в литературе получила название теории Шмидта—Моравица.

Схематически 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 (I фаза). Затем под влиянием образовавшегося тромбина фибриноген превращается в фибрин (II фаза). Сравнительно простая по своей сути теория Шмидта—Моравица в дальнейшем необычайно усложнилась, обросла новыми сведениями, «превратив» свертывание крови в самый сложный ферментативный процесс.

## **Современные представления о свертывании крови**

При повреждении кровеносного сосуда кровотечение может продолжаться различное время. Если сосуд небольшой, то кровотечение быстро прекращается, происходит гемостаз. Выделяют 4 фазы гемостаза.

Первая фаза—сокращение поврежденного сосуда.

Вторая фаза—образование в месте повреждения рыхлой тромбоцитарной пробки, или белого тромба. Имеющийся в участке повреждения сосуда коллаген служит связующим центром для тромбоцитов. При агрегации тромбоцитов освобождаются вазоактивные амины, например серотонин и адреналин, а также метаболиты простагландинов, например тромбоксан, которые стимулируют сужение сосудов.

Третья фаза—формирование красного тромба (кровяной сгусток).

Четвертая фаза—частичное или полное растворение сгустка.

Различают три типа тромбов, или сгустков. Белый тромб образуется из тромбоцитов и фибрина; в нем относительно мало эритроцитов. Формируется он в местах повреждения сосуда в условиях высокой скорости кровотока (в артериях). Второй вид тромбов—диссеминированные отложения фибрина в очень мелких сосудах (в капиллярах). Третий вид тромбов—красный тромб. Он состоит из эритроцитов и фибрина. Морфология красного тромба сходна с морфологией сгустков, образующихся в пробирке. Красные тромбы формируются *in vivo* в областях замедленного кровотока при отсутствии патологических изменений в стенке сосуда или на измененной стенке сосуда вслед за иницирующей тромбоцитарной пробкой.

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 3 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 46 нм, мол. масса 330000—340000. 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 расщепле-



нии протромбина образуется активный фермент свертывания крови — тромбин\*. Концентрация протромбина в плазме крови 1,4–2,1 мкмоль/л. Он является гликопротеином, который содержит 11–14% углеводов, включая гексозы, гексозамины и нейраминовую кислоту. По электрофоретической подвижности протромбин относится к  $\alpha_2$ -глобулинам, имеет мол. массу 68000–70000. Размеры большой и малой осей его молекулы соответственно 11,9 и 3,4 нм. Изоэлектрическая 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  $\text{Ca}^{2+}$ , при этом наступают конформационные изменения молекулы белка.

Превращение протромбина в тромбин связано с резким изменением молекулярной массы белка (с 70000 до 35000). Есть основание 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 мол. массой — до 167000000.

**Фактор IV** (ионы  $\text{Ca}^{2+}$ ). Известно, что удаление из крови ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (осаждение оксалатом или фторидом натрия), а также перевод ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в неионизированное состояние (с помощью цитрата натрия) предупреждает свертывание крови. Следует также помнить, что нормальная скорость свертывания крови обеспечивается лишь оптимальными концентрациями ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Для свертывания крови человека, декальцинированной с помощью ионообменников, оптимальная концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  определена в 1,0–1,2 ммоль/л. Концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  выше и ниже оптимальной обуславливает замедление процесса свертывания. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  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, стабилизации 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 снижение 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

\* 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.

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 фактора IX геморрагические нарушения носят менее выраженный характер, чем при недостаточности фактора VIII.

**Фактор X** (фактор Стюарта—Прауэра) назван по фамилиям больных, у которых был впервые обнаружен его недостаток. Он относится к  $\alpha$ -глобулинам, имеет мол. массу 87000. Фактор X участвует в образовании тромбина из протромбина. У пациентов с недостатком фактора X увеличено время свертывания крови, нарушена утилизация протромбина. Клинически недостаточность фактора X выражается в кровотечениях, особенно после хирургических вмешательств или травм. Фактор X синтезируется клетками печени; его синтез зависит от содержания витамина К в организме.

**Фактор XI** (фактор Розенталя)—антигемофильный фактор белковой природы. Недостаточность этого фактора при гемофилии С 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 др. 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 геморрагии.

**Фактор XIII** (фибринстабилизирующий фактор) является белком плазмы крови, который стабилизирует образовавшийся фибрин, т.е. участвует в образовании прочных межмолекулярных связей в фибрин-полимере. Мол. масса 330000—350000. Белок состоит из трех полипептидных цепей, каждая из которых имеет мол. массу 110000.

## **Факторы тромбоцитов**

Кроме факторов плазмы крови и тканей, в процессе свертывания крови принимают участие факторы, связанные с тромбоцитами. В настоящее время известно около 10 отдельных факторов тромбоцитов. Приводим 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.

## «Внешний» и «внутренний» пути свертывания крови

Свертывание крови может осуществляться с помощью двух механизмов, тесно связанных между собой,— так называемых внешнего и внутреннего путей свертывания (рис. 17.8).

Инициация образования сгустка в ответ на повреждение ткани осуществляется по «внешнему» пути свертывания, а формирования красного тромба в области замедленного кровотока или на аномальной сосудистой стенке при отсутствии повреждения ткани—по «внутреннему» пути свертывания. На этапе активации фактора X происходит как бы объединение обоих путей и образуется конечный путь свертывания крови.

На каждом из путей последовательно образующиеся ферменты активируют соответствующие зимогены, что приводит к превращению растворимого белка плазмы фибриногена в нерастворимый белок фибрин, который и образует сгусток. Это превращение катализируется протеолитическим ферментом тромбином. В нормальных условиях тромбина в крови нет, он образуется из своего активного зимогена—белка плазмы протромбина. Этот процесс осуществляется протеолитическим ферментом, названным фактором Xа, который также в обычных условиях отсутствует в крови; он образуется при кровопотере из своего зимогена (фактора X). Фактор Xа превращает протромбин в тромбин только в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  и других факторов свертывания.

Таким образом, свертывание крови включает эффективно регулируемую серию превращений неактивных зимогенов в активные ферменты, что в итоге приводит к образованию тромбина и превращению фибриногена в фибрин. Заметим, что «внутренний» путь свертывания крови—медленный процесс, поскольку в нем участвует большое число факторов свертывания (табл. 17.6).

Таблица 17.6. Участие факторов коагуляции во «внутреннем» и «внешнем» путях свертывания крови

Фактор		Путь коагуляции	
полное название	обозначение	«внутренний»	«внешний»
Фибриноген	I	+	+
Протромбин	II	+	+
Тканевый фактор (тканевый тромбопластин)	III	—	+
Ионы кальция	IV	+	+
Проакцелерин <sup>1</sup>	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	+	+

<sup>1</sup> Активный фактор V (акцелерин) иногда рассматривают в качестве самостоятельного и обозначают как фактор VI.



Затем под влиянием комплекса факторов: Ха, Va, 3 и ионов  $Ca^{2+}$  (фактор VI)—происходит образование тромбина из протромбина.

Далее под влиянием фермента тромбина от фибриногена отщепляются 2 пептида А и 2 пептида В (мол. масса пептида А—2000, а пептида В—2400). Установлено, что тромбин разрывает пептидную связь аргинин—лизин.

После отщепления пептидов, получивших название «фибрин-пептиды», фибриноген превращается в хорошо растворимый в плазме крови фибрин-мономер, который затем быстро полимеризуется в нерастворимый фибрин-полимер. Превращение фибрин-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.

## ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩАЯ СИСТЕМА КРОВИ

Кровь в живом организме находится в жидком состоянии, несмотря на наличие очень мощной свертывающей системы. 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: анти-тромбопластины, 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 геморрагии. Сочетание явлений рассеянного тромбоза и геморрагии может быть обусловлено нарушением регуляторных взаимоотношений свертывающей и противосвертывающей систем.

В кровеносных сосудах имеются хеморецепторы, способные реагировать на появление в крови активного тромбина. Хеморецепторы связаны с нейрорегуморальным механизмом, регулирующим образование антикоагулянтов. Таким образом, если тромбин появляется в циркулирующей крови в условиях нормального нейрорегуморального контроля, то в этом случае он не только не вызывает свертывания крови, но, напротив, рефлекторно стимулирует образование антикоагулянтов и тем самым выключает свертывающий механизм.

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. Наибольшая антитромбиновая активность присуща антитромбину III; он сильно активизируется в присутствии гепарина, обладающего большим отрицательным зарядом. Гепарин способен связываться со специфическим катионным участком антитромбина III,

вызывая конформационные изменения его молекулы. В результате этого изменения антитромбин III приобретает возможность связываться со всеми сериновыми протеазами (большинство факторов свертывания крови представляют собой сериновые протеазы). В системе свертывания крови антитромбин III ингибирует активность тромбина, факторов IXa, Xa, XIa и XIIa. Известно, что небольшое количество гепарина находится на стенках сосудов, вследствие этого снижается активация «внутреннего» пути свертывания крови. У лиц с наследственной недостаточностью антитромбина III наблюдается склонность к образованию тромбов.

Гепарин часто используется в качестве препарата, предотвращающего свертывание крови. Действие гепарина в случае его передозировки можно устранить связыванием его рядом веществ—антагонистов гепарина. К ним относится прежде всего протамин (протамина сульфат). Протамин—сильно катионный полипептид, конкурирует с катионными участками антитромбина III за связывание с полианионным гепарином.

Не менее важно применение так называемых искусственных антикоагулянтов. Например, 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 ранее факторов свертывания крови. Этот способ воздействия дает эффект не сразу; а спустя несколько часов или даже дней.

## Фибринолиз

В организме существует мощная **фибринолитическая система**, обеспечивающая возможность растворения (фибринолиз) сформировавшихся кровяных сгустков—тромбов (рис. 17.9).

Ретрагированный сгусток фибрина в организме человека и животных под влиянием протеолитического фермента плазмы крови—плазмина подвергается постепенному рассасыванию с образованием ряда растворимых в воде продуктов гидролиза—пептидов. В норме плазмин находится в крови в форме неактивного предшественника—плазминогена. Превращение плазминогена в плазмин сопровождается отщеплением от полипептидной цепи 25% аминокислотных остатков. Катализируется эта реакция как активаторами крови, так и активаторами тканей\*. Ведущая роль в этом процессе принадлежит кровяным активаторам. В норме активность кровяных активаторов плазминогена очень 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, антиплазмина и других антиактиваторов.

\* Тканевые активаторы плазминогена имеются в легких, матке, предстательной железе. При операциях на этих органах вследствие выхода значительного количества активатора из ткани в кровяное русло может возникнуть острый фибринолиз.



Рис. 17.9. Схема фибринолиза.

В практической медицине в лечебных целях ферментные препараты и их ингибиторы широко используются при нарушениях свертывающей и противосвертывающей систем крови. Так, при тромбозах сердечно-сосудистой системы применяют ферменты, способствующие либо лизису образовавшегося тромба, либо снижению повышенной свертываемости крови. При состояниях, сопровождающихся развитием фибринолиза, используются ингибиторы ферментов.

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 после начала болезни. В качестве фибринолитических препаратов при инфаркте миокарда можно использовать также активаторы плазминогена — урокиназу и стрептокиназу.

Новое перспективное направление — использование иммобилизованных ферментов (стрептодеказа и др.). Такие формы ферментов полностью сохраняют каталитическую активность, действие их в организме более длительно, а антигенность снижена.

Следует помнить, что терапия тромболитическими препаратами требует хорошо организованного лабораторного контроля, так как протеолитическое действие плазмина не является строго специфическим только для фибрина — основного компонента тромба: введение плазмина может вызвать нежелательное расщепление многих важных для свертывания крови веществ, что в свою очередь может привести к серьезным осложнениям, в частности к развитию геморрагического диатеза.

# Глава 18

## ПОЧКИ И МОЧА

Масса обеих почек у взрослого человека составляет около 300 г. Почки – один из важных органов, основная задача которого заключается в поддержании постоянства внутренней среды организма. Это главный секреторный орган организма, вырабатывающий из компонентов плазмы жидкость – мочу.

Почки участвуют в регуляции водно-электролитного баланса, поддержании кислотно-основного равновесия, выделении азотистых шлаков, поддержании осмотического давления жидкостей организма, регуляции кровяного давления, стимуляции эритропоэза и т.д.

### ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ПОЧЕК

В ткани почки выделяют два слоя: внешний – корковое вещество и внутренний – мозговое вещество. Основная структурно-функциональная единица почечной паренхимы – нефрон. В обеих почках человека их около 2 млн, у крысы – 62000, у собаки – 816000.

В нефроне млекопитающих (рис. 18.1) выделяют почечное (мальпигиево) тельце, состоящее из сосудистого клубочка и двухслойной капсулы клубочка (капсула Боумена) \* и системы канальцев нефрона. От капсулы клубочка отходит почечный каналец, который в корковом веществе является проксимальной частью канальца нефрона, переходящей в петлю нефрона (петля Генле). В петле выделяют нисходящую и восходящую части. Последняя переходит в дистальную часть канальца нефрона, впадающего в собирательные почечные трубочки. По несколько собирательных трубочек впадают в сосочковые протоки, открывающиеся в почечные чашки.

В почке млекопитающих различают два типа нефронов: корковые нефроны (85%), почечное тельце которых локализуется в корковом веществе, и юкстамедуллярные нефроны (15%), клубочки которых расположены на границе коркового и мозгового вещества, а петля с нисходящей и входящей частями – в мозговом веществе.

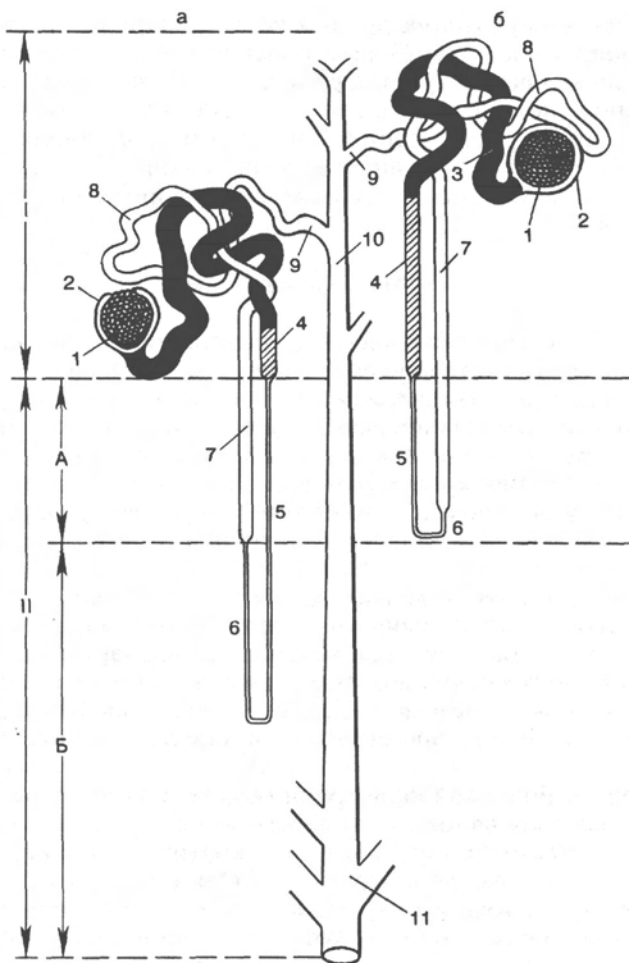
### МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ МОЧИ

В нефроне происходят три главных процесса: фильтрация в клубочках, реабсорбция и секреция в канальцах.

**Клубочковая фильтрация.** Начальным этапом образования мочи является фильтрация: в почечном тельце из капиллярного клубочка в полость капсулы фильтруется жидкая часть крови. Клубочковая фильтрация – это

\* Сосудистый клубочек был открыт русским ученым А.В. Шумлянским, а окружающая его капсула впервые описана в 1842 г. У. Боуменом.





**Рис. 18.1.** Строение юкстамедуллярного (а) и коркового (б) нефронов.

I - корковое вещество; II - 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.

пассивный процесс. В условиях покоя у взрослого человека около  $\frac{1}{4}$  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  $1,5 \text{ м}^2$ . В клубочках из кровеносных капилляров в просвет капсулы почечного клубочка происходит ультрафильтрация плазмы крови, в результате чего образуется первичная моча, в которой практически отсутствует белок. В норме белки как коллоидные вещества не проходят через стенку капил-

ляров в полость капсулы почечного клубочка. При ряде патологических состояний проницаемость мембраны почечного фильтра повышается, что ведет к изменению состава ультрафильтрата. Повышение проницаемости является главной причиной протеинурии, 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 величина 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 в диаметре, 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 в кровяное русло ввести 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 прохождении ее через почки. Веществами, по которым чаще определяют клубочковую фильтрацию, являются инулин и маннитол. Для расчета 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 С—клиренс;  $K_m$ —концентрация данного соединения в моче;  $K_{кр}$ —концентрация в плазме крови;  $V$ — количество мочи в 1 мин, мл. Например, при расчете клиренса инулина в норме получим величину клубочковой фильтрации, равную 100–125 мл за 1 мин\*.

**Реабсорбция и секреция.** Суточное количество ультрафильтрата в 3 раза превышает общее количество жидкости, содержащейся в организме. Естест-

\* Принято считать, что в норме у человека с массой тела 70 кг величина клубочковой фильтрации составляет 125 мл/мин, или 180 л/сут.

венно, что первичная моча во время движения по почечным канальцам 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 чашки, 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;  $\frac{1}{7}$  жидкости, составляющей первичную мочу, подвергается реабсорбции также в проксимальных канальцах. Вода первичной мочи частично (парциально) реабсорбируется в дистальных канальцах. В этих же канальцах происходит дополнительная реабсорбция натрия, 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 натрий 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 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; этот процесс регулируется антидиуретическим гормоном.

Калий в отличие от натрия 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 механизмы 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). В зависимости от того, комбинируется ли фильтрация с реабсорбцией или с секрецией, выделяют два вида смешанного клиренса: фильтрационно-реабсорбционный и фильтрационно-секреционный. 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 в норме он равен 0. Максимальное всасывание глюкозы в канальцах составляет 350 мг/мин. Максимальную способность канальцев к обратному всасыванию принято обозначать  $T_m$  (транспорт максимум). Иногда встречаются пациенты 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  $T_m$ .



**Рис. 18.2.** Регуляция реабсорбции в почке (схема по А.П. Зильберу). Объяснение в тексте.

Для мочевины величина смешанного фильтративно-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 фильтративно-секреторного клиренса может быть больше клубочкового клиренса, так как к первичной моче прибавляется дополнительное количество вещества, которое секретируется в канальцах. Этот клиренс тем больше, чем сильнее секреция канальцев. Клиренс некоторых веществ, секретируемых 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. 18.2. При недостаточном поступлении крови к почечным клубочкам, сопровождающемся небольшим растяжением стенок артериол (снижение давления), происходит возбуждение заложённых в стенках артериол клеток юкстагломерулярного аппарата (ЮГА). Они начинают усиленно секретировать протеолитический фермент ренин, катализирующий начальный этап образования ангиотензина. Субстратом ферментативного действия ренина является ангиотензиноген (гликопротеин), относящийся к  $\alpha_2$ -глобулинам и содержащийся в плазме крови и лимфе.

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, — 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 проявляется в среде, близкой к нейтральной. Он активируется ионами  $Ca^{2+}$  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 сотр. 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 объемные рецепторы (волюморепцепторы); 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 гиалуроновую кислоту, повышает проницаемость стенок канальцев. Вода пассивно диффундирует через мембраны клетки вследствие осмотического градиента между гиперосмотической 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 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 оказывают значительное влияние на кислотно-основное равновесие, но оно сказывается по истечении значительно большего времени, чем влияние буферных систем крови и легких. Влияние буферных систем крови обнаруживается в течение 30 с. Легким требуется примерно 1—3 мин, чтобы сгладить наметившийся сдвиг концентрации водородных ионов в крови, почкам необходимо около 10—20 ч 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. 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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  превращается в однозамещенный  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  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 взаимодействии 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  $\text{H}_2\text{CO}_3$  легко распадается на  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  и в таком виде покидает организм.

Третьим процессом, который также способствует сохранению натрия в организме, является образование в почках аммиака, который используется вместо других катионов для нейтрализации и выведения кислых эквивалентов с мочой. Основным источником этого служат процессы дезаминирования глутамина, а также окислительного дезаминирования аминокислот, главным образом глутаминовой кислоты.

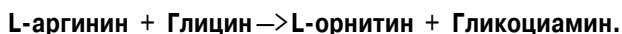
Распад глутамина происходит при участии фермента глутаминазы, при этом образуются глутаминовая кислота и свободный аммиак (см. главу 12). Глутаминаза обнаружена в различных органах и тканях человека, однако

наибольшая ее активность отмечена в тканях почек. В общем итоге соотношение концентрации 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 В ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ**

Сложные физиологические процессы в почечной ткани протекают с постоянным потреблением большого количества энергии, выделяемой при метаболических реакциях. Не менее 8–10% всего поглощаемого человеком в покое кислорода используется на окислительные процессы 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 этих ферментов встречается и в других органах. Так, 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 гликоциамина:



Эта реакция является начальным этапом синтеза креатина (см. главу 20). Глицин-амидинотрансфераза была открыта еще в 1941 г., но только 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.

Наивысшая 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 отечно-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 ЛДГ<sub>1</sub> и ЛДГ<sub>2</sub>. При изучении тканевых гомогенатов различных слоев почек обнаруживается четкая дифференциация изоферментных спектров ЛДГ. В корковом веществе преобладает активность ЛДГ<sub>1</sub> и ЛДГ<sub>2</sub>, а в мозговом — ЛДГ<sub>5</sub> и ЛДГ<sub>4</sub>. При острой почечной недостаточности в сыворотке крови повышается активность анодных изоферментов ЛДГ, т.е. изоферментов с высокой электрофоретической подвижностью (ЛДГ<sub>1</sub> и ЛДГ<sub>2</sub>).

Определенный интерес представляет также исследование изоферментов аланинаминопептидазы (ААП). Известны 5 изоферментов ААП. В отличие от изоферментов ЛДГ изоферменты ААП определяются в различных органах не в виде полного спектра (5 изоферментов), а чаще как один изофермент. Так, изофермент АА<sub>1</sub> представлен главным образом в ткани печени, ААП<sub>2</sub> — в поджелудочной железе, ААП<sub>3</sub> — в почках, ААП<sub>4</sub> и ААП<sub>5</sub> — в различных отделах стенки кишки. При повреждении ткани почек изофермент ААП<sub>3</sub> обнаруживается в крови и моче, что является специфическим признаком поражения почечной ткани.

Не менее важно в диагностике заболеваний почек исследование активности ферментов мочи. При острых воспалительных процессах в почках прежде всего отмечается повышенная проницаемость клубочковых мембран, что обуславливает выделение белка, в том числе ферментов, с мочой. В целом 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 и составляет в среднем 50–80% от объема принятой жидкости. Суточное количество мочи ниже 500 мл и выше 2000 мл у взрослых 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*) — 15 л в сутки и более.

Уменьшение суточного количества мочи (олигурия) наблюдается при недостаточном приеме жидкости, лихорадочных состояниях (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 никтурией.

Цвет мочи в норме колеблется от соломенно-желтого до насыщенного желтого. Окраска мочи зависит от содержания в ней пигментов: урохрома\*, уробилина, уроэритрина, урозеина и др.

\* Считают, что нормальная окраска мочи на 95% обусловлена присутствием урохрома. Химическое строение урохрома недостаточно выяснено. По-видимому, этот пигмент образуется в организме при распаде триптофана.



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. в зависимости от наличия в ней не встречающихся в норме красящих веществ. Например, красный или розово-красный цвет мочи наблюдается при гематурии и гемоглобинурии, а также после приема антипирина, амидопирина, сантонины и других лекарственных средств. Коричневый или красно-бурый цвет встречается при высокой концентрации в моче уробилина и билирубина.

В мочу здорового человека в очень незначительных количествах попадает стеркобилин, всасывающийся по системе геморроидальных вен. На свету и на воздухе бесцветный стеркобилин окисляется в окрашенный пигмент (стеркобилин) (см. главу 16). Как отмечалось, в клинической практике стеркобилин мочи нередко называют уробилином. При заболеваниях печени, когда она теряет способность разрушать всосавшийся из тонкой кишки мезобилиноген (уробилиноген) до ди- и трипиролов, в моче в большом количестве появляется уробилиноген (на свету и на воздухе превращается в уробилин). В таких случаях моча приобретает темный цвет.

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.). Чаще 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.

При тяжелой недостаточности почек все время выделяется моча с одинаковой относительной плотностью, равной плотности первичной мочи, или ультрафильтрата (~ 1,010). Это состояние носит название изостенурии.

Постоянно низкое значение плотности мочи указывает на нарушение концентрационной функции\* почек при хроническом нефрите, первично или вторично сморщенной почке. При несахарном диабете также выделяется моча низкой плотности (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,

\* Способность почек концентрировать и разводить первичную мочу имеет большое значение для поддержания постоянства осмотического давления крови.

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) \*. 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,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  или  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). 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 (микробактерии 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 (табл. 18.1).

Таблица 18.1. Содержание ионов некоторых неорганических веществ и основных органических веществ в моче взрослого человека

Компонент	Содержание (в расчете на суточное количество мочи)		Молярное отношение к содержанию в плазме крови
	г/сут	ммоль/сут	
$\text{Na}^+$	3-6	130-260	0,8-1,10
$\text{K}^+$	1,5-3,2	38-82	7-12
$\text{Mg}^{2+}$	0,1-0,2	4,2-8,4	4-5
$\text{Ca}^{2+}$ (общий)	0,1-0,25	2,5-6,2	0,8-1,5
Азот аммиака	0,5-1,0	36-71	2000-3500
Хлорид ( $\text{Cl}^-$ )	3,6-9,0	100-250	0,8-2,0
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 более 150 химических ингредиентов. Далее представлены данные лишь о наиболее важных компонентах мочи человека в норме и при некоторых патологических состояниях.

\* Реакцию мочи обычно определяют с помощью лакмусовой бумаги. Если синяя бумага краснеет, а красная не изменяет своего цвета, то реакция мочи кислая; если красная бумага синее, а синяя не изменяется, то реакция мочи щелочная. При нейтральной реакции бумага не меняет своего цвета.

## 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, выделяемого с мочой за сутки, колеблется от 10 до 18 г, причем 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 при приеме некоторых лекарственных средств (например, ряда гормонов). Содержание выделяемой с мочой мочевины уменьшается при тяжелых поражениях печени (печень является основным местом синтеза мочевины в организме), заболеваниях почек (особенно при нарушенной фильтрационной способности почек), а также при приеме 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 моче взрослых людей в норме практически отсутствует. Он появляется либо при употреблении значительных количеств креатина с пищей, либо при патологических состояниях. Как только уровень креатина в сыворотке крови достигает 0,12 ммоль/л, он появляется в моче.

В первые годы жизни ребенка возможна «физиологическая креатинурия». По-видимому, появление креатина в моче детей раннего возраста обусловлено 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.

Принято считать, 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 креатиновый 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, аддисонова 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 при других состояниях.

Известны также нарушения обмена отдельных аминокислот. Многие из этих нарушений имеют врожденный или наследственный характер (см. главу 12). Примером может служить фенилкетонурия. Причина заболевания — наследственно обусловленный недостаток фенилаланин-4-монооксигеназы в печени, вследствие чего метаболическое превращение аминокислоты фенилаланина в тирозин блокировано. Результат такого блокирования — накопление в организме фенилаланина и его кетопроизводных и появление их 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 (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 заключается в недостатке оксидазы гомогентизиновой кислоты.

Известны также врожденные болезни: гиперпролинемия (возникает в результате недостатка фермента пролиноксидазы, 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, полицитемии, 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. 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 снижается.

**Безазотистые органические компоненты мочи**—это щавелевая, молочная и лимонная (цитрат), а также масляная, валериановая, янтарная (сукцинат),  $\beta$ -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. При тех или иных состояниях выведение многих из них увеличивается и 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**

В моче содержатся практически все минеральные вещества, 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.

**Ионы натрия и хлора.** В норме около 90% принятых с пищей хлоридов выделяется с мочой (8–15 г NaCl в сутки). При ряде патологических состояний (хронический нефрит, диарея, острый суставной ревматизм и др.) выведение хлоридов с мочой может быть снижено. Максимальная концентрация ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  (в моче по 340 ммоль/л) может наблюдаться после введения в организм больших количеств гипертонического раствора.

**Ионы калия, кальция и магния.** Многие исследователи считают, что практически все количество ионов 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  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  выводятся через почки в небольшом количестве (см. табл. 18.1). Принято считать, что с мочой выделяется лишь около 30% всего количества ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , 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 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 последних в моче человека в определенной степени отражает кислотно-основное равновесие. При ацидозе их количество в моче увеличивается, а при алкалозе снижается. Содержание аммонийных солей в моче может быть 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 присутствуют 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 наличие белка. При ряде заболеваний, особенно при 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 в результате замедления тока крови в клубочках. Внепочечные протеинурии обусловлены поражением мочевых путей или предстательной железы.

Часто употребляемое в клинической практике название «альбуминурия» (при обнаружении в моче белка) неправильно, так как 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, аминотрансферазы, урокиназы, фосфатазы,  $\alpha$ -амилазы, лейцинаминопептидазы и др. Основные трудности при определении активности ферментов мочи, кроме  $\alpha$ -амилазы и некоторых других, заключаются в необходимости сгущения (концентрирования) мочи и предотвращения 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 (исследование осадка мочи под микроскопом), а гемоглобинурию — химическим путем.

**Глюкоза.** Нормальная моча человека содержит минимальные количест-

ва глюкозы, которые не обнаруживаются обычными качественными пробами. При патологических состояниях содержание глюкозы в моче увеличивается (глюкозурия). Например, при сахарном диабете количество глюкозы, выделяемое с мочой, может достигать нескольких десятков граммов в сутки.

Иногда в моче обнаруживают и другие углеводы, в частности фруктозу, галактозу, пентозу. Фруктозурия наблюдается при врожденной недостаточности ферментов, превращающих фруктозу в глюкозу; встречаются также и врожденная пентозурия, и врожденная галактозурия.

**Кетоновые (ацетоновые) тела.** В нормальной моче эти соединения встречаются лишь в самых ничтожных количествах (не более 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 позволяют определить не только присутствие ацетона, но также и ацетоуксусной кислоты;  $\beta$ -оксимасляная кислота появляется в моче лишь при сильном увеличении количества кетоновых тел (сахарный диабет и др.).

Кетоновые тела выделяются с мочой не только при сахарном диабете, но и при голодании, исключении углеводов из пищи. Кетонурия наблюдается при заболеваниях, связанных с усиленным расходом углеводов: например, при тиреотоксикозе, кровоизлияниях в подпаутинные пространства, черепно-мозговых травмах. В раннем детском возрасте (продолжительные заболевания пищеварительного тракта (дизентерия, токсикозы) могут вызвать кетонемию и кетонурию в результате голода и истощения. Кетонурия нередко наблюдается при инфекционных заболеваниях: скарлатине, гриппе, туберкулезе, менингите. В этих случаях кетонурия не имеет диагностического значения и является вторичной.

**Билирубин.** В норме моча содержит минимальное количество билирубина, которое не может быть обнаружено обычными качественными пробами. Повышенное выделение билирубина, при котором обычные качественные пробы на наличие билирубина в моче становятся положительными, называется билирубинурией. 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 каналы травмируются и пропускают билирубин в кровяные капилляры. Если поражена паренхима печени, билирубин проникает в кровь через разрушенные печеночные клетки. Билирубинурия проявляется при уровне прямого билирубина в крови выше 3,4 мкмоль/л. Непрямой билирубин не может пройти через почечный фильтр. Это становится возможным при значительных поражениях почек.

**Уробилин.** В моче уробилин, точнее стеркобилин, присутствует всегда в незначительном количестве. Концентрация его резко возрастает при гемолитической и печеночной желтухах. Это связано с потерей печеную способность 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 16).

**Порфирины.** В норме моча содержит лишь очень малые количества порфиринов I типа (до 300 мкг в суточном количестве). Однако выделение порфиринов может резко возрасти (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.

## **Мочевые камни**

Мочевые камни—это плотные образования, встречающиеся в мочевыводящих путях. Мочевые камни могут располагаться в паренхиме почек, в чашках, лоханках, мочеточниках, мочевом пузыре и мочеиспускательном канале. Величина, форма и консистенция мочевых камней разнообразны. Мелкие мочевые камни имеют вид песчинок, большое количество которых образует так называемый мочевой песок. Более крупные мочевые камни обычно имеют округлую, овальную или, реже, коралловидную форму. Общим в структуре мочевых камней является наличие так называемого ядра, вокруг которого расположена различной толщины оболочка, или тело камня. Примерно треть или более таких камней состоит из  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$ ,  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  или их смесей, т.е. это щавелевокислые (оксалатные), фосфорнокислые (фосфатные) или смешанные мочевые камни. Часто образование камней происходит в результате хронического защелачивания мочи в мочевом пузыре и почечных лоханках, которое является следствием бактериальной инфекции. Образованию камней способствуют избыточное выделение ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , например, при гиперпаратиреозе, остеопорозе (в частности, вызванном неподвижностью) и необычайно высокое содержание  $\text{Ca}^{2+}$  в пище. Кроме того, камни, состоящие из оксалата кальция, патогномичны для оксалурии (наследственное нарушение метаболизма глицина, при котором практически весь синтезированный глицин окисляется через глиоксиловую кислоту до щавелевой кислоты).

У больных подагрой, как правило, встречаются камни, состоящие в основном из мочевой кислоты ( $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$ ), реже—из ее аммониевой или натриевой соли. Эти камни получили название мочекислых, или уратных. Отложение цистина (цистиновые камни) почти постоянно наблюдается у больных цистинурией.

Следует отметить, что изучение этиологических факторов, определение химического состава мочевых камней имеют важное значение для профилактики и лечения почечнокаменной болезни.



# Глава 19

## НЕРВНАЯ ТКАНЬ

Нервная ткань имеет общие черты, которые присущи клеткам любой ткани, а также 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 (нервные клетки); 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

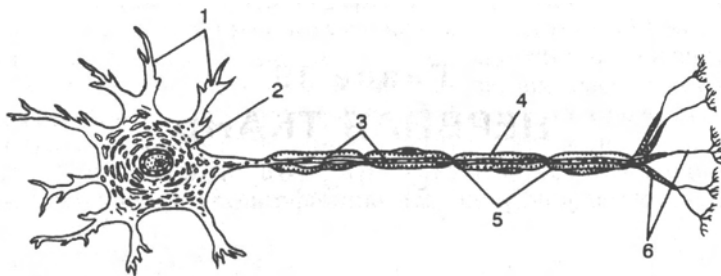
Нейрон имеет тело, многочисленные ветвящиеся короткие отростки—дендриты и один длинный отросток—аксон, длина которого может достигать нескольких десятков сантиметров (рис. 19.1).

Объем цитоплазмы, содержащейся в отростках нервной клетки, может в несколько раз превышать ее количество в теле клетки. Тело нейрона окружено плазматической мембраной—плазмалеммой (рис. 19.2). В тесной связи с плазмалеммой\* 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 метаболизме 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.

Характерной структурной основой нервной клетки является базофильное 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

\* При возбуждении нейрона проницаемость плазматической мембраны изменяется.



**Рис. 19.1.** Строение нейрона (схема по Шмитту).

1 - дендриты; 2 - тело нейрона; 3 - аксон; 4 - миелиновая оболочка; 5 - перехваты узла; 6 - окончания.

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 тканей.

Размер ядра нейрона колеблется от 3 до 18 мкм, достигая в крупных нейронах  $\frac{1}{4}$  величины их тела.

## Строение миелина

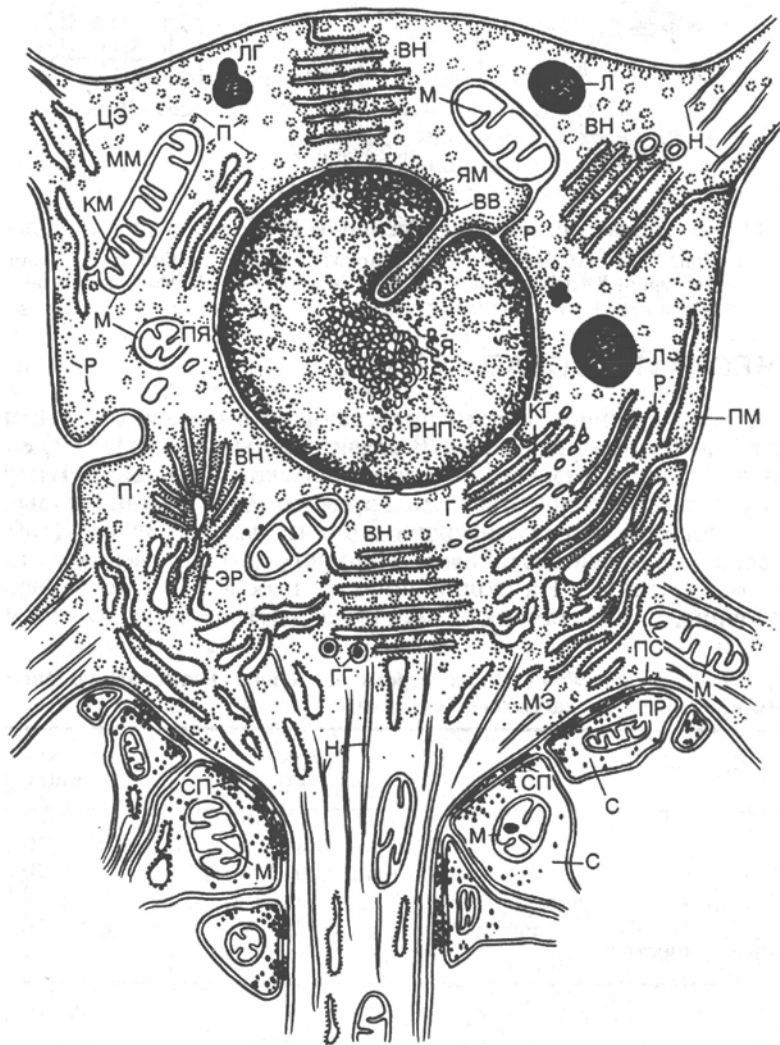
Нервные волокна, образующиеся из аксонов нервных клеток, по своему строению могут быть разделены на 2 типа: миелиновые (мякотные) и безмиелиновые (бедные миелином). Проводниковая система соматической нервной системы, а также ЦНС относятся к первому типу, функционально более совершенному, обладающему способностью с высокой скоростью передавать нервные импульсы.

Миелиновое вещество — понятие морфологическое. По сути миелин — это система, образованная многократно наслаивающимися мембранами клеток нейроглии\* 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.

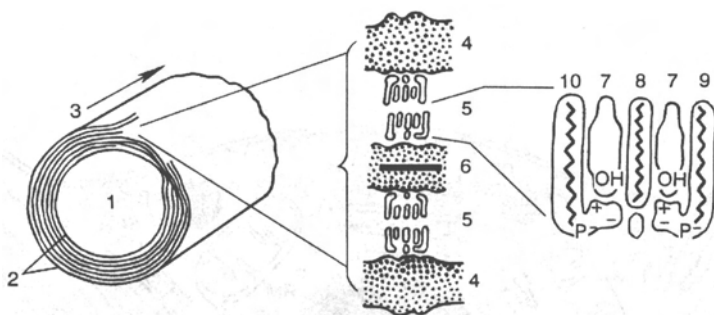
На долю липидов приходится до 80% плотного осадка; 90% всех липидов миелина представлено холестерином, фосфолипидами и цереброзидами. Считают, что в липоидных слоях миелиновых оболочек молекулы различных липидов имеют строго определенное расположение (рис. 19.3).

\* Тонкая структура нейроглии рассматривается в специальных руководствах, посвященных гистологии и морфологии нервной системы.



**Рис. 19.2.** Схематическое изображение ультратонкого строения нервной клетки по данным электронной микроскопии (по А.А. Маниной).

ВВ - влячивание 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; Р - рибосомы; РНП - рибонуклеопротеиновые гранулы; С - синапс; СП - синаптические пузырьки; ЦЭ - цистерны эндоплазматической сети; ЭР - эндоплазматический ретикулум; Я - ядро; ЯМ - ядерная мембрана.



**Рис. 19.3.** 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.

## ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МОЗГА

Серое вещество головного мозга представлено в основном телами нейронов, а белое вещество — аксонами. В связи с этим указанные отделы мозга значительно различаются по своему химическому составу. Эти различия носят прежде всего количественный характер. Содержание воды в сером веществе головного мозга заметно больше, чем в белом (табл. 19.1). В сером веществе белки составляют половину плотных веществ, а в белом веществе — одну треть\*. На долю липидов в белом веществе приходится более половины сухого остатка, в сером веществе — лишь около 30%.

**Таблица 19.1. 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

### Белки

На долю белков приходится примерно 40% от сухой массы головного мозга. Мозговая ткань является трудным объектом для изучения белкового состава вследствие большого содержания липидов и наличия белково-липидных комплексов.

А.Я. Данилевский впервые разделил белки мозговой ткани на растворимые в воде и солевых растворах белки и нерастворимые белки. Обширные исследования в этой области были проведены также А.В. Палладиным

\* При пересчете на сырую массу ткани белки распределяются примерно поровну между серым (8%) и белым (9%) веществом головного мозга.

и сотр., которые разделили белки нервной ткани на 4 фракции: извлекаемые водой, 4,5% раствором KCl, 0,1% раствором NaOH и 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, различающихся 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 выделить из ткани мозга около 100 различных растворимых белковых фракций.

В нервной ткани содержатся как простые, так и сложные белки. Простые белки—это альбумины (нейроальбумины), глобулины (нейроглобулины), катионные белки (гистоны и др.) и опорные белки (нейросклеропротеины).

Альбумины и глобулины по своим физико-химическим свойствам несколько отличаются от аналогичных белков сыворотки крови, поэтому их называют **нейроальбуминами** и **нейроглобулинами**. Количество нейроглобулинов в головном мозге относительно велико—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 катионных. Главнейшими представителями 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.

**Нейросклеропротеины** можно охарактеризовать как структурно-опорные белки. Основные представители этих белков—нейроколлагены, нейроэластины, нейростромины и др. Они составляют примерно 8–10% от общего количества 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 и, возможно, липогликонуклеопротеиновые комплексы.

**Нуклеопротеины**—белки, которые принадлежат либо к дезоксирибонуклеопротеинам, либо к рибонуклеопротеинам. 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—это в основном фосфолипиды и холестерин.

**Протеолипиды**—это белково-липидные соединения, экстрагируемые органическими растворителями из ткани мозга. Отличаются от водорастворимых липопротеинов тем, что они нерастворимы в воде, но растворимы в смеси хлороформ—метанол. Белки, освобожденные от липидов, раство-

римы в воде, а также (благодаря высокому содержанию гидрофобных аминокислот) в смеси хлороформ–метанол. 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% от общего количества всех сложных белков 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 состоит 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 нервной ткани обнаружен ряд специфических белков, в частности 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 белка в головном мозге. Установлено, что концентрация белка S-100 возрастает при обучении (тренировках) животных. Пока нет оснований считать, что белок S-100 непосредственно участвует в формировании и хранении памяти. Не исключено, что его участие в этих процессах опосредованно. 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. 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 др.

## Липиды

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 фосфолипиды, холестерин, сфингомиелины, цереброзиды, ганглиозиды и очень небольшое количество нейтрального жира (табл. 19.2). Многие липиды нервной ткани находятся в тесной взаимосвязи с белками, образуя сложные системы типа протеолипидов.

В сером веществе головного мозга фосфолипиды 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.

Таблица 19.2. Липидный состав нервной ткани

	Серое вещество	Белое вещество	Миелин
Общее содержание липидов, % от сухой массы	32,7	54,9	70
<b>В процентах от общих липидов</b>			
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, но 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 гликогена – 2,5–4,5 мкмоль на 1 г ткани. 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 (табл. 19.3).

Таблица 19.3. 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

В мозговой ткани на долю адениновых нуклеотидов приходится около 84% от всех свободных нуклеотидов. Большую часть оставшихся нуклеотидов составляют производные гуанина. В целом количество высокоэргических соединений в нервной ткани невелико. Содержание нуклеотидов и креатинфосфата в головном мозге крыс составляет в среднем (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 макроэргических 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 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

Ионы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  распределены в головном мозге относительно равномерно в сером и белом веществе (табл. 19.4). Содержание фосфатов в белом веществе выше, чем в сером.

Таблица 19.4. Содержание основных минеральных компонентов в ткани головного мозга и в плазме крови человека

Компонент	Мозговая ткань, ммоль/кг	Плазма крови, ммоль/л
$\text{Na}^+$	57	141
$\text{K}^+$	96	5
$\text{Ca}^{2+}$	1	2,5
$\text{Cl}^-$	37	101
$\text{HCO}_3^-$	12	28

Из данных таблицы 19.4 видно, что концентрация ионов  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , а также  $\text{Cl}^-$  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 функций 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 крови различных веществ, в том числе кислорода, можно судить по артериовенозной разнице. Установлено, что во время прохождения через мозг кровь теряет около 8 об.% кислорода. В 1 мин на 100 г мозговой ткани приходится 53–54 мл крови. Следовательно, 100 г мозга потребляет в 1 мин 3,7 мл кислорода, а весь головной мозг (1500 г) – 55,5 мл кислорода\*.

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 белого 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 меньше при наркозе. Напротив, интенсивность дыхания мозга возрастает при увеличении функциональной активности.

## Метаболизм углеводов

Основным субстратом дыхания мозговой ткани является глюкоза. В 1 мин 100 г ткани мозга потребляют в среднем 5 мг глюкозы. Подсчитано, что более 90% утилизируемой глюкозы в ткани мозга окисляется до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  при участии цикла трикарбонных 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 (НАДФН) используется для синтеза 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 ткань мозга окисляется 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 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

\* В целом потребление кислорода тканями взрослого человека в состоянии покоя составляет 200–240 мл/мин.

пока недостаточно ясно, ибо гликолиз как источник энергии ни в коей мере не может сравниться по эффективности с тканевым дыханием в головном мозге.

## **Метаболизм 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. В случае прекращения 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 целостном организме выражается наступлением 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 разряда или химическим путем.

## **Метаболизм аминокислот и белков**

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%  $\alpha$ -аминоазота головного мозга. В мозге содержится ряд свободных аминокислот, которые лишь в незначительных количествах обнаруживаются в других тканях млекопитающих. Это  $\gamma$ -аминомасляная кислота, N-ацетиласпарагиновая кислота и цистатионин (см. главу 1).

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.

Поступления аминокислот в мозговую ткань и выход из нее, а также использование глюкозы крови для синтеза аминокислот нейтронов и глии

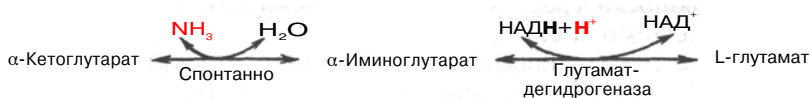
в разных отделах мозга различны. Эти различия в существенной мере обусловлены наличием гематоэнцефалического барьера, который следует рассматривать конкретно для каждого вещества или класса веществ. Гематоэнцефалический барьер не следует представлять как единое структурное образование, создающее преграду для транспорта; различие относительно скоростей поступления веществ в разные отделы мозга может быть обусловлено особенностями эпителия сосудов, базальной мембраны или расположения прилегающих отростков глиальных клеток. В условиях *in vitro* (в отсутствие барьера) многие аминокислоты накапливаются в клетках мозга за счет активного транспорта, в котором участвует несколько самостоятельных  $\text{Na}^+$ -зависимых транспортных систем.

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 полушарий большого мозга и белки мозжечка отличаются особенно большой скоростью обновления. В участках головного мозга, богатых проводниковыми структурами—аксонами (белое вещество головного мозга), скорость синтеза и распада белковых молекул меньше.

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. Под влиянием наркоза скорость распада и синтеза белков снижается.

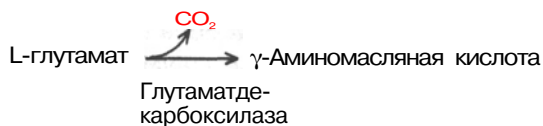
Возбуждение нервной системы сопровождается повышением содержания аммиака в нервной ткани. Это явление наблюдается как при раздражении периферических нервов, так и при раздражении мозга. Считают, что образование аммиака при возбуждении в первую очередь происходит за счет дезаминирования АМФ.

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 12). Непосредственный источник глутаминовой кислоты в мозговой ткани—путь восстановительного аминирования  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты;



Образование глутаминовой кислоты из  $\alpha$ -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 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.

## Метаболизм липидов

Липиды составляют около половины сухой массы головного мозга. Как отмечалось, в нервных клетках серого вещества особенно много фосфолипидов, а в миелиновых оболочках нервных стволов — сфингомиелина. Из фосфолипидов серого вещества мозга наиболее интенсивно обновляются фосфатидилхолина 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 людей синтез холестерина в головном мозге резко снижается.

Основная часть холестерина в зрелом мозге находится в неэтерифицированном состоянии, эфиры холестерина обнаруживаются в относительно высокой концентрации в участках активной миелинизации. Пути биосинтеза фосфолипидов в мозге сходны с теми, которые осуществляются в других тканях. Жирные кислоты образуются в основном из глюкозы, однако частично синтез их происходит из ацетоацетата, цитрата и даже ацетиласпартата.

## ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ПРОВЕДЕНИЯ НЕРВНЫХ ИМПУЛЬСОВ

Рассмотрим химические основы возникновения и поддержания биоэлектрических потенциалов (потенциала покоя и потенциала действия). Большинство исследователей придерживаются мнения, что явления электрической поляризации клетки обусловлены неравномерным распределением ионов  $K^+$  и  $Na^+$  по обе стороны клеточной мембраны. Мембрана обладает избирательной проницаемостью: большей для ионов  $K^+$  и значительно меньшей для ионов  $Na^+$ . 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  $Na^+$ .

В состоянии покоя внутренняя сторона клеточной мембраны заряжена электроотрицательно по отношению к наружной поверхности. Объясняется это тем, что количество ионов  $Na^+$ , выкачиваемых из клетки с помощью натриевого насоса, не вполне точно уравнивается поступлением в клетку ионов  $K^+$ . В связи с этим часть катионов натрия удерживается внутренним слоем противоионов (анионов) на наружной поверхности клеточной мембраны. Таким образом, на мембранах, ограничивающих нервные клетки, поддерживается разность электрических потенциалов (трансмембранная разность электрических потенциалов); эти мембраны электрически возбудимы.

При возбуждении, вызванном тем или иным агентом, селективно изменяется проницаемость мембраны нервной клетки (аксона): увеличивается избирательно для ионов  $Na^+$  (примерно в 500 раз) и остается без изменения

для ионов  $K^+$ . В результате ионы  $Na^+$  устремляются внутрь клетки. Компенсирующий поток ионов  $K^+$ , направляющийся 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  $K^+$  над поступлением ионов  $Na^+$  — мембранный потенциал возвращается к норме. После проведения импульса в клетке восстанавливается состояние покоя. В этот период ионы  $Na^+$ , вошедшие в нейрон при возбуждении, заменяются на ионы  $K^+$ . Этот переход происходит против градиента концентрации, так как ионы  $Na^+$  во внешней среде, окружающей нейроны, намного больше, чем в клетке после момента ее возбуждения. Переход ионов  $Na^+$  против градиента концентрации, как 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. Заметим, что миелиновые мембраны, образуемые шванновскими клетками, окутывают нервные волокна и служат электрическим изолятором. Этот изоляционный слой покрывает большинство нервных волокон и сильно ускоряет распространение электрической волны (сигнала); при этом ионы входят в клетку и выходят из нее только в тех местах, где изолятор отсутствует. Как уже отмечалось, миелиновая мембрана состоит из фосфолипидов, в частности из сфингомиелина, холестерина, а также белков и гликофинголипидов. Некоторые заболевания, например рассеянный склероз, характеризуются демиелинизацией и нарушением проведения нервного импульса. Другим не менее важным процессом для нервной ткани является передача нервного импульса от одной нервной клетки к другой или воздействию на клетки эффекторного органа.

## **Роль медиаторов в передаче нервных импульсов**

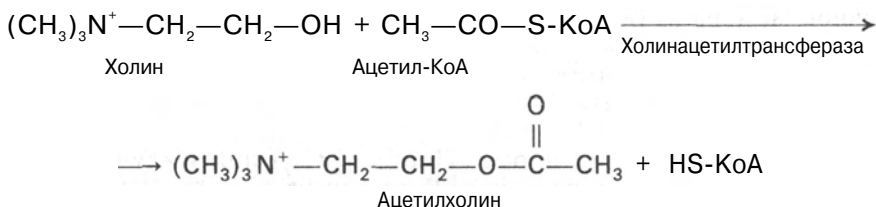
Связь миллиардов нейронов мозга осуществляется посредством медиаторов. Химическое вещество можно отнести к числу медиаторов лишь в том случае, если оно удовлетворяет ряду критериев. В нервных волокнах должны содержаться ферменты, необходимые для синтеза этого вещества. При раздражении нервов это вещество должно выделяться, реагировать со специфическим рецептором на постсинаптической клетке и вызывать биологическую реакцию. Должны существовать механизмы, быстро прекращающие действие этого 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 удовлетворяют многим, но не всем перечисленным критериям. К таким медиаторам относят 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—ацетилкоэнзима А при помощи специального фермента холин-ацетилтрансферазы (холинацетилазы):



**Синапс** можно представить себе как узкое пространство (щель), ограниченное с одной стороны пресинаптической, а с другой—постсинаптической мембраной (рис. 19.4). Пресинаптическая мембрана состоит из внутреннего слоя, принадлежащего цитоплазме нервного окончания, и наружного слоя, образованного нейроглией. Мембрана в некоторых местах утолщена и уплотнена, в других истончена и имеет отверстия для сообщения цитоплазмы аксона с синаптическим пространством. Постсинаптическая мембрана менее плотная, не имеет отверстий. Подобным образом построены и нервно-мышечные синапсы, но они имеют более сложное строение мембранного комплекса.

В общих чертах картину участия ацетилхолина в осуществлении передачи нервного импульса возбуждения можно представить следующим образом. В синаптических нервных окончаниях имеются пузырьки (везикулы) диаметром 30–80 нм, которые содержат нейромедиаторы. Эти пузырьки покрыты оболочкой, которая образована белком клатрином (мол. масса 180000). В холинергических синапсах каждый пузырек диаметром 80 нм содержит ~ 40000 молекул ацетилхолина. При возбуждении высвобождение медиатора происходит «квантами», т.е. путем полного опорожнения каждого отдельного пузырька. В нормальных условиях под влиянием сильного импульса выделяется примерно 100–200 квантов медиатора—количество, достаточное для инициирования потенциала действия в постсинаптическом нейроне. Происходит это, по-видимому, следующим образом. Деполяризация мембраны синаптических окончаний вызывает быстрый ток ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку. Временное увеличение внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  стимулирует слияние мембраны синаптических пузырьков с плазматической мембраной и таким образом запускает процесс высвобождения их содержимого. Для выброса содержимого одного пузырька требуется примерно 4 иона  $\text{Ca}^{2+}$ . Выделенный в синаптическую щель ацетилхолин вступает во взаимодействие с белком-хеморецептором, входящим в состав постсинаптической мембраны. В результате изменяется проницаемость мембраны—резко увеличивается ее пропускная способность для ионов  $\text{Na}^+$ . Взаимодействие между 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.

\* Ацетилхолин служит также медиатором в двигательных концевых пластинках (нервно-мышечные соединения, являющиеся участками контактов между нервом и поперечнополосатой мышцей).



вуют 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:  $\alpha$ - и  $\beta$ -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.

$\beta$ -Адренергические рецепторы включают эфферентную клетку с помощью аденозин-3',5'-монофосфата, или цАМФ—универсального «второго посредника» между гормонами и различными функциями клеток, на которые воздействуют гормоны (см. главу 8).

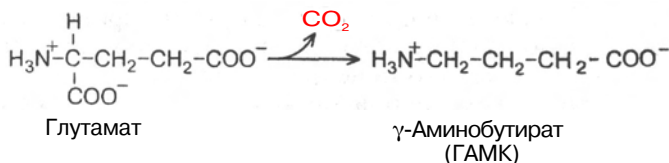
Установлено, что как только  $\beta$ -адренергический рецептор, расположенный на наружной поверхности мембраны эфферентной клетки, начинает взаимодействовать с норадреналином, на внутренней поверхности клеточной мембраны активируется фермент аденилатциклаза. Затем в клетке аденилатциклаза превращает 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  $\beta$ -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 указанные медиаторы. В последние годы было показано, что, помимо ферментативного превращения, существует и другой механизм быстрой инактивации, точнее удаления, медиаторов. Оказалось, что норадреналин быстро исчезает из синаптической 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 п-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  $\gamma$ -аминомасляная кислота (ГАМК), количество которой в головном мозге во много раз больше, 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. ГАМК увеличивает проницаемость постсинаптических мембран для ионов  $\text{K}^+$  и тем самым отдалает мембранный потенциал от порогового уровня, при котором возникает потенциал действия; таким образом, ГАМК—это тормозной нейромедиатор. ГАМК образуется при декарбоксилировании глутамата в реакции, катализируемой глутаматдекарбоксилазой:





В терапевтической практике применяется большое количество лекарственных средств, которые действуют через систему медиаторов. Многие лекарственные препараты, 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  $\alpha$ -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 блока-

торов синтеза РНК, напротив, затрудняет этот процесс. Существуют данные, что после запоминания информации меняется антигенный состав мозговой ткани. 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 память*. Этот вид памяти хотя и включает элементы генетической памяти, но находится на более высокой ступени 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 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.

**Роль нейромедиаторов в регуляции памяти.** Процессы памяти тесно связаны с модификацией синтетических процессов. Поэтому химические передатчики нервного возбуждения должны играть в этом принципиальную роль. Накоплен большой экспериментальный материал о значении нейромедиаторов в процессах памяти и обучения. Полученные к настоящему времени результаты свидетельствуют о большой значимости основных медиаторов (ацетилхолин, норадреналин, дофамин, серотонин, ГАМК) в этих процессах, хотя конкретные формы участия каждого медиатора зависят от того, какой именно тип информации запоминается. Например, показано, что снижение содержания ацетилхолина в мозге ингибиторами холинацетилазы нарушает обучение, а его повышение ускоряет выработку оборонительных навыков. Серотонин облегчает выработку и хранение навыков, основанных на положительном (пищевом) подкреплении, и отрицательно влияет на формирование оборонительных реакций. По существу представлениям, норадренергическая и серотонинергическая системы являются в значительной степени антагонистами в отношении процессов памяти, и способность к выработке тех или иных навыков зависит не столько от абсолютного уровня содержания того или иного медиатора, сколько от соотношения активностей этих систем. Так, нарушения, вызванные увеличением содержания серотонина, могут быть компенсированы параллельной активацией норадренергической системы и наоборот. Следует заметить, что существуют многочисленные данные, свидетельствующие о выраженном угнетающем влиянии на процессы запоминания и обучения со стороны ГАМК.

**Олигопептиды - регуляторы памяти.** Установлено, что некоторые олигопептиды, представляющие собой молекулы из небольшого числа аминокислотных остатков, способны модифицировать процесс обучения и влиять

на степень выработки, хранения и угасания приобретенных поведенческих реакций. Из пептидов, относящихся к числу гормонов, наиболее выраженное действие на процессы обучения и памяти оказывают гормоны гипофиза—адреноркортикотропный гормон (АКТГ) и вазопрессин. При изучении влияния АКТГ на процессы памяти было показано, что главная роль в его действии принадлежит фрагменту АКТГ<sub>4-10</sub>, который оказывает на эти процессы практически такой же эффект, как и целый гормон. Кроме того, установлено, что стимулирующее влияние фрагментов АКТГ на обучение не связано с собственно гормональной функцией пептида, так как фрагменты—активаторы памяти лишены такой функции.

Гормон задней доли гипофиза вазопрессин также обладает ярко выраженным положительным влиянием на выработку условных реакций у животных. Стимуляция вазопрессином процессов памяти не связана с его гормональным действием, так как такое же стимулирующее действие оказывают некоторые его аналоги и фрагменты, не вызывающие свойственных вазопрессину гормональных реакций. Есть все основания считать, что АКТГ и вазопрессин либо их фрагменты, образующиеся в организме в результате расщепления гормонов, не только стимулируют запоминание при введении их извне, но постоянно функционируют в мозге в качестве регуляторов процессов памяти [Ашмарин И.П. и др., 1996].

## **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.

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.

## **ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНАЯ ЖИДКОСТЬ**

Общий объем cerebroспинальной жидкости у взрослого человека в норме составляет около 125 мл; каждые 3—4 ч жидкость обновляется. Иногда cerebroспинальную жидкость рассматривают как первичный трансудат или ультрафильтрат плазмы. Состав существенно отличается от состава плазмы крови (см. табл. 17.1), что позволяет приписывать сосудистому эндотелию в нервной системе главную роль в осуществлении барьерной функции. Вода в cerebroспинальной жидкости составляет 99%, на долю плотного остатка приходится около 1% (табл. 19.5).

**Таблица 19.5. Химический состав цереброспинальной жидкости**

Компоненты	Содержание	Компоненты	Содержание
Белки	0,15-0,40 г/л	Триацилглицерины	Следы
Альбумины/глобулины	4:1	Лецитин	»
Остаточный азот	8,57-14,28 ммоль/л	Na <sup>+</sup>	146 ммоль/л
Азот аминокислот	1,14-1,93 »	K <sup>+</sup>	3,5-4,0 »
Азот мочевины	2,86-7,14 »	Ca <sup>2+</sup>	1,5 »
Глюкоза	2,50-4,16 »	Cl <sup>-</sup>	125 »
Молочная кислота	1,67 ммоль/л	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25 »
Холестерин	2,62-5,20 ммоль/л		

Содержание белка в цереброспинальной 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 цереброспинальной жидкости отсутствуют. Общее содержание низкомолекулярных азотсодержащих веществ, особенно аминокислот, в 2–2,5 раза меньше, чем в крови. В ткани мозга, как отмечалось, количество свободных аминокислот велико и во много раз превышает концентрацию их в крови и тем более в цереброспинальной 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 цереброспинальной 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 ионов K<sup>+</sup> и Na<sup>+</sup> цереброспинальная жидкость практически не отличается от плазмы крови. Ионов Ca<sup>2+</sup> в ней почти в 2 раза меньше, чем в плазме крови. Содержание ионов Cl<sup>-</sup> заметно выше, а концентрация ионов бикарбоната несколько ниже в цереброспинальной жидкости, чем в плазме. Таким образом, минеральный состав цереброспинальной жидкости имеет характерные особенности и отличается от такового плазмы 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 цереброспинальной жидкости при патологических состояниях имеет важное клиническое значение. Установлено, что при остром гнойном менингите содержание белка в ней может резко повышаться (5–20 г/л при норме 0,15–0,40 г/л). Концентрация глюкозы также существенно изменяется. Гипогликорахия (уменьшение содержания глюкозы в цереброспинальной жидкости) характерна для менингита, тогда как гипергликорахия (увеличение содержания глюкозы в цереброспинальной жидкости) наблюдается при энцефалитах, диабете и т.д. Характерны снижение концентрации хлора в цереброспинальной жидкости при менингитах и повышении его уровня при энцефалитах. Показано также, что при менингитах, инсультах, опухолях мозга, травмах в цереброспинальной жидкости повышается активность АсАТ, ЛДГ и ряда других ферментов.

## Глава 20

# 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.

Различают три типа мышечной ткани: скелетную, сердечную и гладкую мышечную ткань.

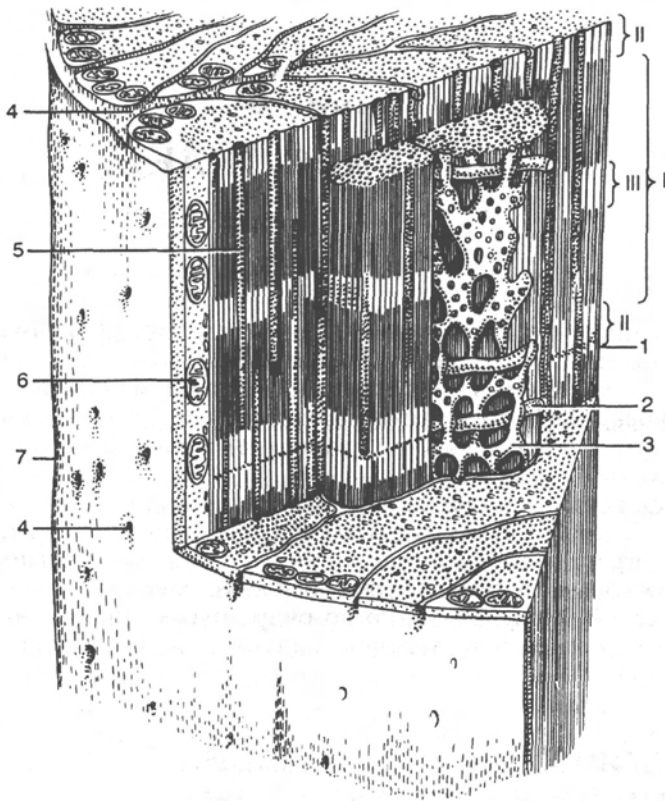
Существует также деление на гладкие и поперечно-полосатые (исчерченные) мышцы. К поперечно-полосатым мышцам, помимо скелетных, относятся мышцы языка и верхней трети пищевода, внешние мышцы глазного яблока и некоторые другие. Морфологически миокард относится к поперечно-полосатой мускулатуре, но по ряду других признаков он занимает промежуточное положение между гладкими и поперечно-полосатыми мышцами.

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТОЙ МЫШЦЫ

Поперечно-полосатая мышца состоит из многочисленных удлинённых волокон\*, или мышечных клеток. Двигательные нервы входят в различных точках в мышечное волокно и передают ему электрический импульс, вызывающий сокращение. Мышечное волокно обычно рассматривают как многоклеточную клетку гигантских размеров, покрытую эластичной оболочкой – сарколеммой (рис. 20.1). Диаметр функционально зрелого поперечно-полосатого мышечного волокна обычно составляет от 10 до 100 мкм, а длина волокна часто соответствует длине мышцы.

В каждом мышечном волокне в полужидкой саркоплазме по длине волокна расположено, нередко в форме пучков, множество нитевидных образований – миофибрилл (толщина их обычно менее 1 мкм), обладающих, как и все волокно в целом, поперечной исчерченностью. Поперечная 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 микроскопе.

\* 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.

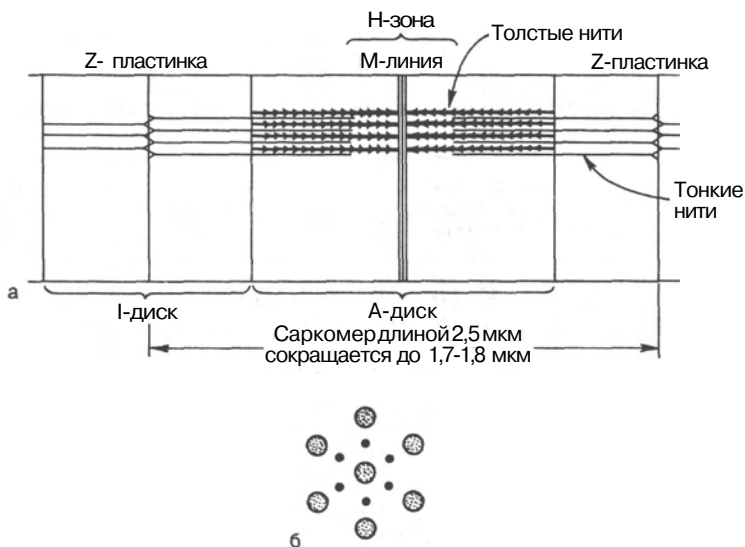


**Рис. 20.1.** Структура волокна скелетной мышцы (по Гассельбаху).

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 - митохондрия; 7 - сарколемма.

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. 20.1).

Повторяющимся элементом поперечно-полосатой 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. В поляризованном свете она дает сильное двойное лучепреломление. Эту зону 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.



**Рис. 20.2.** Строение саркомера скелетной мышцы.

а - схематическое изображение структуры саркомера; б - расположение толстых и тонких нитей (поперечное сечение).

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. 20.2).

При исследовании тонких срезов мышц под электронным микроскопом было обнаружено, что белковые нити расположены строго упорядоченно. Толстые нити диаметром 12–16 нм и длиной примерно 1,5 мкм уложены в форме шестиугольника диаметром 40–50 нм и проходят через весь диск А. Между этими толстыми нитями расположены 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 ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТОЙ 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 азотсо-

держашие вещества, соли органических и неорганических кислот и другие химические соединения (табл. 20.1).

Таблица 20.1. **Химический состав поперечно-полосатых мышц млекопитающих (средние значения)**

Компонент	В процентах от сырой массы	Компонент	В процентах от сырой массы
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 + креатин-фосфат	0,2-0,55	зола	1,0-1,5

## Мышечные белки

А.Я. Данилевский впервые разделил экстрагируемые из мышц белки на 3 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, миофибрилярные и белки стромы. На долю первых приходится около 35%, вторых—45% и третьих—20% от всего количества 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**, относятся к протеинам, растворимым 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 разнообразные белки-ферменты, локализованные главным образом в митохондриях и катализирующие процессы тканевого дыхания, окислительного фосфорилирования, а также многие стороны азотистого и липидного обмена. Недавно была открыта группа саркоплазматических белков—парвальбумины, которые способны связывать ионы  $Ca^{2+}$ . Их физиологическая роль остается еще неясной.

**К группе миофибрилярных белков** относятся миозин, актин и актомиозин—белки, растворимые в солевых средах с высокой ионной силой, и так называемые регуляторные белки: тропомиозин, тропонин,  $\alpha$ - и  $\beta$ -актинин, образующие в мышце с актомиозином единый комплекс. Перечисленные миофибрилярные белки тесно связаны с сократительной функцией мышц.



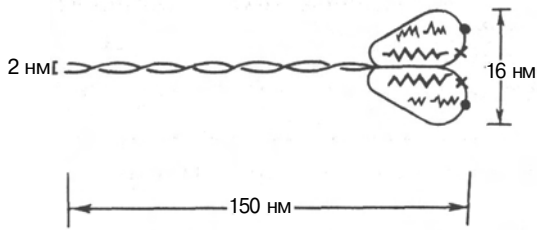


Рис. 20.3. Строение молекулы миозина. Объяснение в тексте.

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 этих работах 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 500000 (для миозина кролика 470000). Молекула миозина (рис. 20.3) имеет сильно вытянутую форму, длину 150 нм. Она может быть расщеплена без разрыва ковалентных связей на субъединицы: две тяжелые полипептидные цепи с мол. массой 205000–210000 и несколько коротких легких цепей, мол. масса которых около 20000. Тяжелые цепи образуют длинную закрученную  $\alpha$ -спираль («хвост» молекулы), конец каждой тяжелой цепи совместно с легкими цепями создает глобулу («головка» молекулы), способную соединяться с актином. Эти «головки» выдаются из основного стержня молекулы. 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). ЛММ, подобно миозину, образует нити, однако он не обладает АТФазной активностью и не связывает актин. ТММ катализирует гидролиз АТФ и связывает актин. ТММ можно расщепить далее путем более длительной обработки трипсином или папаином, в результате чего получается один  $S_2$ -фрагмент длиной 40 нм с мол. массой 62000 и два  $S_1$ -фрагмента с мол. массой 110000, представляющие собой «головки» миозина.

Толстые нити (толстые миофиламенты) в саркомере надо понимать как образование, полученное путем соединения большого числа определенным образом ориентированных в пространстве молекул миозина (рис. 20.4).

Актин, составляющий 20% от сухой массы миофибрилл, был открыт Ф. Штраубом в 1942 г. Известны две формы актина: глобулярный актин (G-актин) и фибриллярный актин (F-актин). Молекула G-актина с мол. массой 42000 состоит из одной полипептидной цепочки (глобула), в обра-



Рис. 20.4. Строение толстого миозинового филамента.

зовании которой принимают участие 374 аминокислотных остатка. При повышении ионной силы до физиологического уровня G-актин полимеризуется в F-актин (фибрилярная форма). На электронных микрофотографиях волокна F-актина выглядят как две нити бус, закрученных одна вокруг другой (рис. 20.5).

Актомиозин образуется при соединении миозина с F-актином. Актомиозин, как естественный, так и искусственный, т.е. полученный путем соединения *in vitro* высокоочищенных препаратов миозина и F-актина, обладает АТФазной активностью, которая отличается от таковой миозина, АТФазная активность миозина значительно возрастает в присутствии стехиометрических количеств F-актина. Фермент актомиозин активируется ионами  $Mg^{2+}$  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 pH для обоих ферментов также различны.

Как 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  $\alpha$ -спиралей и имеет вид стержня длиной 40 нм; его мол. масса 65000. На долю тропомиозина приходится около 4–7% всех белков миофибрилл.

Тропонин—глобулярный белок, открытый С. Эбаси в 1963 г.; его мол. масса 80000. В скелетных мышцах взрослых животных и человека тропонин (Тн) составляет лишь около 2% от всех миофибриллярных белков. В его состав входят три субъединицы (Тн-И, Тн-С, Тн-Т). Тн-И (ингибирующий) может ингибировать 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  $Ca^{2+}$  (рис. 20.6).

Установлено, 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 vitro* к регуляции мышечного сокращения, остается пока открытым.

Белки стромы в поперечно-полосатой 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.

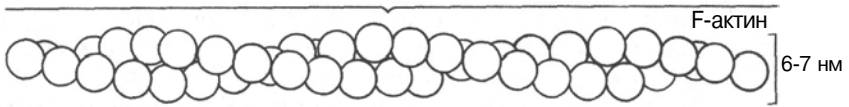


Рис. 20.5. Схематическое изображение F-актина.

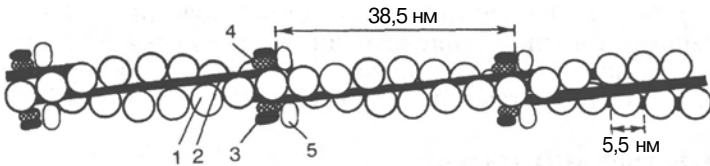


Рис. 20.6. Структура тонкого филамента.

1 - актин; 2 - тропомиозин; 3 - тропонин С; 4 - тропонин I; 5 - тропонин Т.

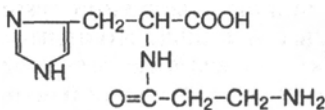
## Небелковые азотистые экстрактивные вещества

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.

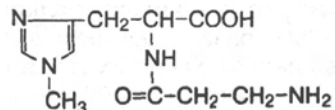
На долю креатина и креатинфосфата приходится до 60% небелкового азота мышц. Креатинфосфат и креатин относятся к тем азотистым экстрактивным веществам мышц, которые участвуют в химических процессах, связанных с мышечным сокращением.

Напомним, что синтез креатина в основном происходит в печени. Из печени с током крови он поступает в мышечную ткань, где, фосфорилируясь, превращается в креатинфосфат. В синтезе креатина участвуют три аминокислоты: аргинин, глицин и метионин (см. главу I).

К азотистым веществам мышечной ткани принадлежат 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. Они 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 высока концентрация глутаминовой кислоты (до 1,2 г/кг) и ее амида глутамина (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 приходится десятки и сотни доли процента. В мышцах находят лишь следы свободной глюкозы и очень мало гексозофосфатов. В процессе метаболизма глюкозы, а также аминокислот в мышечной ткани образуются молочная, пировиноградная кислоты и много других карбоновых кислот. В том или ином количестве в мышечной ткани обнаруживаются также триглицериды и холестерин.

Состав неорганических солей в мышцах разнообразен. Из катионов больше всего калия и натрия. 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 (миоэпителии)—до 20,3 мг/г. В сердечной мышце и особенно в гладких мышцах значительно меньше миофибриллярных белков, чем в скелетной мышце. Общее содержание миофибриллярных белков в гладкой мышечной ткани желудка примерно в 2 раза ниже, чем в скелетных мышцах. Концентрация белков стромы в гладких мышцах 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 более 0,1 г на 1 кг сырой массы).

Имеется определенная зависимость между характером работы 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 больше воды, чем в функционально зрелой мускулатуре. Соответственно общее содержание белка в мышечной ткани эмбрионов в пересчете 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, появлением  $Ca^{2+}$ -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 ЛДГ<sub>3</sub> и ЛДГ<sub>2</sub> приходится соответственно 40 и 31% от общей активности ЛДГ. В процессе эмбрионального развития в скелетной мускулатуре происходят постепенное возрастание активности катодных и снижение активности анодных изоферментов ЛДГ, так что у взрослых особей в скелетной мускулатуре наибольшей активностью обладают уже изоферменты ЛДГ<sub>5</sub> и ЛДГ<sub>4</sub>. В процессе развития плода изменяется также изоферментный спектр гексокиназы в мышечной ткани: повышается активность изофермента I и снижается активность изофермента II. Приведенные данные об изменении химического состава мышечной ткани в онтогенезе относятся почти исключительно к скелетной мускулатуре.

## **ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ БИОХИМИЯ МЫШЦ**

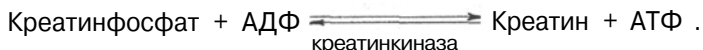
Мышечный аппарат человека и животных характеризуется полифункциональностью. Однако основной функцией мышц является осуществление двигательного акта, т.е. сокращение и расслабление. При сокращении

мышц осуществляется работа, связанная с превращением химической энергии в механическую. В данном разделе в основном рассматривается структурная основа процесса сокращения поперечно-полосатых мышц позвоночных, поскольку этот процесс изучен наиболее полно. Как отмечалось, сократительная система поперечно-полосатой мышцы состоит из перекрывающихся белковых нитей, которые скользят относительно друг друга. Сокращение происходит за счет энергии, освобождающейся при гидролизе АТФ. В поперечно-полосатой мышце сокращение зависит от концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , которая в свою очередь регулируется саркоплазматическим ретикуломом—специализированной системой мембран, накапливающей  $\text{Ca}^{2+}$  в состоянии покоя и высвобождающей его при воздействии на мышечное волокно нервного импульса.

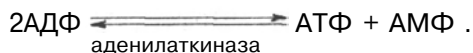
## Источники энергии мышечной деятельности

Принято считать, что процессом, непосредственно связанным с работающим механизмом поперечно-полосатого мышечного волокна, является распад АТФ с образованием АДФ и неорганического фосфата. Возникает вопрос: каким образом мышечная клетка может обеспечить свой сократительный аппарат достаточным 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. Применив специфический ингибитор креатинкиназы (1-фтор-2,4-динитрофенол), а также с помощью агентов, препятствующих 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 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

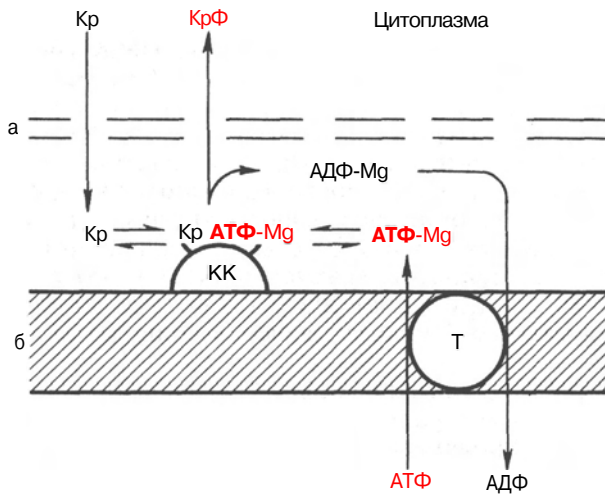


Рис. 20.7. Перенос энергии из митохондрий в цитоплазму клетки миокарда (схема по В.А. Саксу и др.). Объяснение в тексте.

а - наружная мембрана; б - внутренняя мембрана; Кр - креатин; Крф - креатинфосфат; КК - креатинкиназа; Т - транслоказа.

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 легкоомобилизуемых макроэргических фосфатных групп, но также роль транспортной формы макроэргических фосфатных связей, образующихся в процессе тканевого дыхания и связанного с ним окислительного фосфорилирования. Предложена схема переноса энергии из митохондрий в цитоплазму клетки миокарда (рис. 20.7). 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  $Mg^{2+}$ ) 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 интенсивной мышечной работе скорость расщеп-

ления гликогена или глюкозы с образованием молочной кислоты увеличивается в сотни раз. Соответственно содержание молочной кислоты в мышечной ткани может повышаться до 1,0–1,2 г/кг и более. С током крови значительное количество молочной кислоты поступает в печень, где ресинтезируется в глюкозу и гликоген (глюконеогенез) за счет энергии окислительных процессов (см. главу 16). Перечисленные механизмы ресинтеза АТФ при мышечной деятельности включаются в строго определенной последовательности. Наиболее экстренным является креатинкиназный механизм, и лишь примерно через 20 с максимально интенсивной работы начинается усиление гликолиза, интенсивность которого достигает максимума через 40–80 с. При более длительной, а следовательно, и менее интенсивной работе все большее значение приобретает аэробный путь ресинтеза АТФ.

Содержание АТФ и креатинфосфата в сердечной мышце ниже, чем в скелетной мускулатуре, а расход АТФ велик. В связи с этим ресинтез АТФ в миокарде должен происходить намного интенсивнее, чем в скелетной мускулатуре. Для сердечной мышцы теплокровных животных и человека основным путем образования богатых энергией фосфорных соединений является путь окислительного фосфорилирования, связанный с поглощением кислорода. Регенерация АТФ в процессе анаэробного расщепления углеводов (гликолиз) в сердце человека практического значения не имеет. Именно поэтому сердечная мышца очень чувствительна к недостатку кислорода. Характерной особенностью обмена веществ в сердечной мышце по сравнению со скелетной является также то, что аэробное окисление веществ неуглеводной природы при работе сердечной мышцы имеет большее значение, чем при сокращении скелетной мышцы. Только 30–35% кислорода, поглощаемого сердцем в норме, расходуется на окисление углеводов и продуктов их превращения. Главным субстратом дыхания в сердечной мышце являются жирные кислоты. Окисление неуглеводных веществ обеспечивает около 65–70% потребности миокарда в энергии. Из свободных жирных кислот в сердечной мышце особенно легко подвергается окислению олеиновая кислота.

## Механизм мышечного сокращения

Рассмотрим, к чему сводятся представления о механизме попеременного сокращения и расслабления мышц. В настоящее время принято считать, что биохимический цикл мышечного сокращения состоит из 5 стадий (рис. 20.8):

1) миозиновая «головка» может гидролизовать АТФ до АДФ и  $H_3PO_4$  (P<sub>i</sub>), но не обеспечивает освобождения продуктов гидролиза. Поэтому данный процесс носит скорее стехиометрический, чем каталитический, характер (см. рис. 20.8, а);

2) содержащая АДФ и  $H_3PO_4$  миозиновая «головка» может свободно вращаться под большим углом и (при достижении нужного положения) связываться с F-актином, образуя с осью фибриллы угол около 90° (см. рис. 22.8, б);

3) это взаимодействие обеспечивает освобождение АДФ и  $H_3PO_4$  из актин-миозинового комплекса. Актин-миозиновая связь имеет наименьшую энергию при величине угла 45°, поэтому изменяется угол миозина с осью фибриллы с 90° на 45° (примерно) и происходит продвижение актина (на 10–15 нм) в направлении центра саркомера (см. рис. 20.8, в);

4) новая молекула АТФ связывается с комплексом миозин–F-актин (см. рис. 20.8, г);



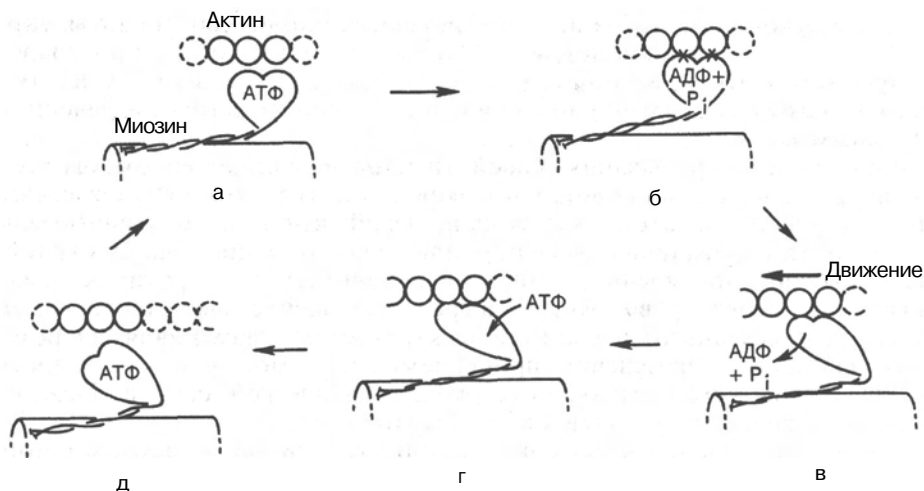


Рис. 20.8. Биохимический цикл мышечного сокращения. Объяснение в тексте.

5) комплекс миозин—АТФ обладает низким сродством к актину, и поэтому происходит отделение миозиновой (АТФ) «головки» от F-актина. Последняя стадия и есть собственно расслабление, которое отчетливо зависит от связывания АТФ с актин-миозиновым комплексом (см. рис. 20.8, д). Затем цикл возобновляется.

**Регуляция сокращения и расслабления мышц.** Сокращение любых мышц происходит по общему механизму, описанному ранее. Мышечные волокна разных органов могут обладать различными молекулярными механизмами регуляции сокращения и расслабления, однако всегда ключевая регуляторная роль принадлежит ионам  $\text{Ca}^{2+}$ . Установлено, что миофибриллы обладают способностью взаимодействовать с АТФ и сокращаться в его присутствии лишь при наличии в среде определенных концентраций ионов кальция\*. Наибольшая сократительная активность наблюдается при концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  около  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  М. При понижении концентрации до  $10^{-7}$  М или ниже мышечные волокна теряют способность к укорочению и развитию напряжения в присутствии АТФ.

По современным представлениям, в покоящейся мышце (в миофибриллах и межфибрилярном пространстве) концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  поддерживается ниже пороговой величины в результате связывания их структурами (трубочками и пузырьками) саркоплазматической сети и так называемой Т-системой при участии особого  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего белка, получившего название кальсеквестрина, входящего в состав этих структур.

Связывание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  разветвленной сетью трубочек и цистерн саркоплазматической сети не является простой адсорбцией. Это активный физиологический процесс, который осуществляется за счет энергии, освобождающейся при расщеплении АТФ  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФазой сарко-

\* Молекулярные структуры гладких мышц весьма сходны с соответствующими структурами поперечнополосатых мышц, но расположение саркомеров в них не дает характерной для поперечнополосатых мышц картины исчерченности. Подобно скелетным мышцам, гладкие мышцы содержат молекулы  $\alpha$ -актина и тропомиозина, но не имеют тропониновой системы. Тем не менее сокращение гладких мышц, как и сокращение поперечнополосатых, регулируется ионами  $\text{Ca}^{2+}$ .

плазматической сети \*. При этом наблюдается весьма своеобразная картина: скорость выкачивания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из межфибрилярного пространства стимулируется этими же ионами. В целом такой механизм получил название «кальциевая помпа» 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  $\text{Ca}^{2+}$  в среде, окружающей миофибриллы, ниже того предела, при котором еще возможны проявление АТФазной активности и сократимость 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  $\text{Ca}^{2+}$  в саркоплазму.

Как отмечалось, «чувствительность» актомиозиновой системы к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  (т.е. потеря актомиозином способности расщеплять АТФ и сокращаться в присутствии АТФ при снижении концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  до  $10^{-7}$  М) обусловлена присутствием в контрактильной системе (на нитях F-актина) белка тропонина, связанного с тропомиозином. В тропонин-тропомиозиновом комплексе ионы  $\text{Ca}^{2+}$  связываются именно с тропонином. В молекуле тропонина при этом 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  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы.

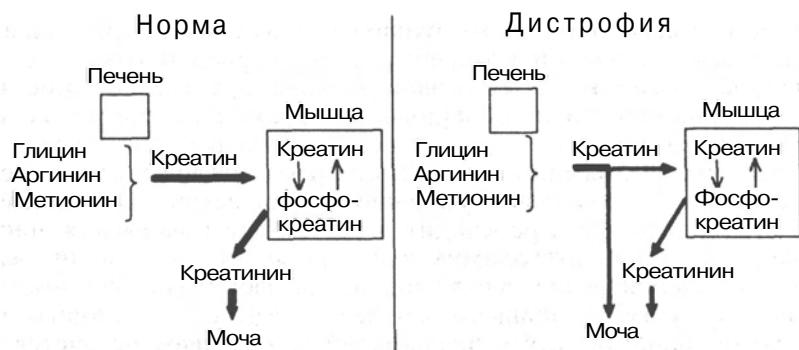
В продвижении актиновых нитей вдоль миозиновых, по данным Э. Хаксли, важную роль играют временно замыкающиеся между нитями поперечные мостики, которые являются «головками» миозиновых молекул. Итак, чем большее число мостиков прикреплено в данный момент к актиновым нитям, тем больше сила мышечного сокращения.

Наконец, если возбуждение прекращается, содержание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в саркоплазме снижается (кальциевая помпа), то циклы прикрепление—освобождение прекращаются, т.е. «головки» миозиновых нитей перестают прикрепляться к актиновым нитям. В присутствии АТФ мышца расслабляется и ее длина достигает исходной. Если прекращается поступление АТФ (аноксия, отравление дыхательными ядами или смерть), то мышца переходит в состояние очождения. 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**

Общими для большинства заболеваний мышц (прогрессирующие мышечные дистрофии, атрофия мышц в результате их денервации, тенотомия, полимиозит, некоторые авитаминозы и т.д.) является резкое снижение

\* Существует еще один компонент  $\text{Ca}^{2+}$ -регулирующей системы саркоплазматической сети. Это ионофор - протеолипид, экстрагируемый из сети; известно, что он ускоряет действие АТФазы как насоса.



**Рис. 20.9.** Схематическое изображение происхождения креатинурии при прогрессирующей мышечной дистрофии (по Д.Л. Фердману).

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 уровня АТФ и креатинфосфата. Например, через 12 дней после денервации содержание АТФ в денервированной икроножной мышце кролика снижается более чем в 2 раза. Отмечаются 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 уровень фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, концентрация сфингомиелина и лизофосфатидилхолина повышается. До сих пор истинные механизмы изменения фосфолипидного состава мышечной ткани при патологии не выяснены, неизвестна также роль этих сдвигов в патогенезе мышечных дистрофий.

Для многих форм патологии мышечной ткани характерны 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 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 креатинина; содержание последнего в моче резко снижается. В результате креатинурии и нарушения синтеза креатинина резко повышается креатиновый показатель (креатин/креатинин) мочи. Данный механизм представлен на рис. 20.9.

При патологии мышечной ткани можно наблюдать определенную закономерность в изменении 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.** Для ишемизированного миокарда характерны сниженное окислительное фосфорилирование и повышенный анаэробный обмен. Раннее увеличение гликогенолиза и гликолиза за счет имеющегося в сердечной мышце гликогена и 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.

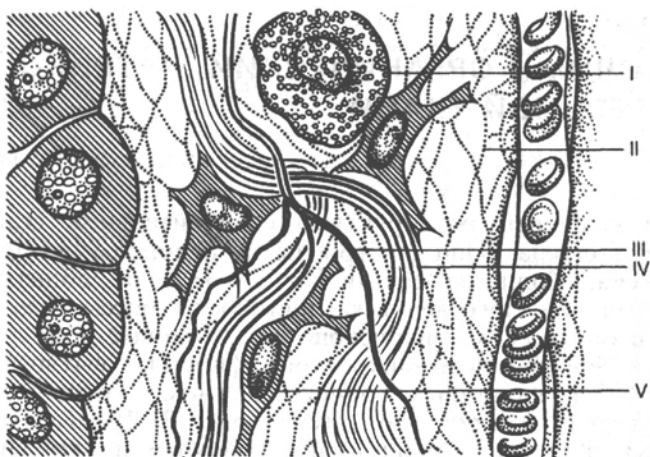
Содержание АТФ и креатинфосфата в клетке резко снижается в результате нарушения окислительного фосфорилирования в митохондриях. Одно из первых проявлений этого состояния—нарушение мембранной проницаемости. Нарушение целостности мембран способствует выходу из клетки ионов, в том числе ионов  $K^+$ , а 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, снижение 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 ЛДГ<sub>1</sub> и ЛДГ<sub>2</sub>). В последние годы четко показано, что определение в сыворотке крови миокардиально специфических белков (миоглобин, тропонин Т и др.)—весьма чувствительный ранний тест повреждения миокарда.

## Глава 21

# СОЕДИНИТЕЛЬНАЯ ТКАНЬ

Соединительная ткань составляет примерно 50% от массы тела. Рыхлая соединительная ткань подкожной клетчатки, компактная кость и зубы, сухожилия и межмышечные фасциальные прослойки, кожа и внутриорганный строма паренхиматозных органов, нейроглия и брюшина – все это соединительная ткань.



**Рис. 21.1.** Строение соединительной ткани (схема по А.И. Слущкому).

I- тучная клетка; II- ретикулиновые волокна; III- эластическое волокно; IV- коллагеновые волокна; V- фибробласт.

Все разновидности соединительной ткани, несмотря на их морфологические различия, построены по общим, единым принципам, которые в основном заключаются в следующем (рис. 21.1):

а) соединительная ткань, как всякая другая, содержит клетки, однако 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) межклеточное вещество соединительной ткани имеет очень сложный химический состав.

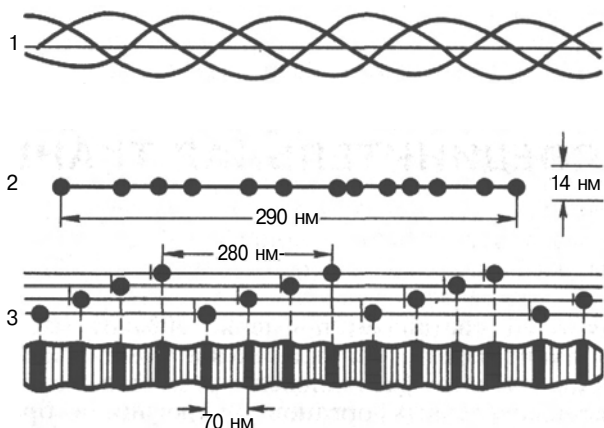


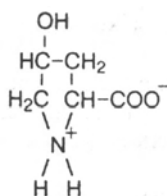
Рис. 21.2. Различные уровни структурной организации коллагена (по Кону).  
1 - третичная структура; 2 - молекула тропоколлагена; 3 - коллагеновое волокно.

## МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ОРГАНИЧЕСКИЙ МАТРИКС СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

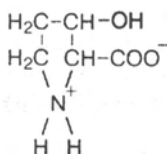
### Коллаген

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.

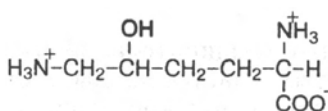
Видимые в оптическом микроскопе коллагеновые волокна состоят из различных в электронном микроскопе фибрилл—вытянутых в длину белковых молекул, названных тропоколлагеном. Тропоколлаген—основная структурная единица коллагена (рис. 21.2). Необходимо четко разграничивать понятия «коллагеновые волокна» и «коллаген». Первое понятие по существу является морфологическим и не может быть сведено к биохимическим представлениям о коллагене как о белке. Коллагеновое волокно представляет собой гетерогенное образование и содержит, кроме белка коллагена, 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,  $\frac{1}{3}$ —пролин и 4-гидроксипролин, около 1%—гидроксилизин; некоторые молекулярные формы коллагена содержат также 3-гидроксипролин, хотя и в весьма ограниченном количестве:



4-Гидроксипролин



3-Гидроксипролин



5-Гидроксилизин

Молекулярная масса тропоколлагена около 285000. Тропоколлаген состоит из трех полипептидных цепей одинакового размера, которые сливаются в спиралевидный триплет. Тройная спираль стабилизируется многочисленными межцепочечными поперечными сшивками между лизиновыми и гидроксизиновыми остатками. Каждая полипептидная цепь тропоколлагена содержит около 1000 аминокислотных остатков. Таким образом, основная структурная единица коллагена имеет очень большие размеры, например в 10 раз больше, чем химотрипсин.

Изучение аминокислотного состава и последовательности чередования аминокислот в полипептидных цепях тропоколлагена показало, что существует два типа цепей—цепи  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$ , а также четыре разновидности цепи  $\alpha 1$ :  $\alpha 1$  (I),  $\alpha 1$  (II),  $\alpha 1$  (III) и  $\alpha 1$  (IV). В табл. 21.1 представлены данные о структуре коллагенов различных тканей.

Таблица 21.1. Типы коллагенов и некоторые их структурные свойства (по Уайту и др., 1981)

Тип	Ткань	Полипептидные цепи	Дополнительная характеристика
I	Кожа, кости, сухожилия, роговица глаза	$[\alpha 1$ (I)] <sub>2</sub> $\alpha 2$	< 10 остатков оксипролина в цепи
II	Хрящ, стекловидное тело	$[\alpha 1$ (II)] <sub>3</sub>	> 10 остатков оксипролина в цепи
III	Кровеносные сосуды, кожа плода	$[\alpha 1$ (III)] <sub>3</sub>	Слишком высокое содержание оксипролина и глицина
IV	Базальная мембрана	$[\alpha 1$ (IV)] <sub>3</sub>	Высокое содержание 3-оксипролина; > 20 остатков оксипролина в цепи; низкое содержание аланина

Как и все белки, коллаген синтезируется клетками из свободных аминокислотных остатков. Аминокислотные остатки, специфичные для молекулы коллагена, гидроксипролин и гидроксизин не образуются из соответствующих свободных аминокислот. Эти аминокислотные остатки появляются после включения пролина и лизина в полипептидную цепь с участием ферментов пролилгидроксилазы или лизилгидроксилазы и кофактора—аскорбиновой кислоты.

Учитывая наличие разных молекулярных форм в пределах одного типа (например, коллаген типа I имеет состав  $[\alpha 1$  (I)]<sub>2</sub>  $\alpha 2$  либо  $[\alpha 1$  (I)]<sub>3</sub>, есть основание считать, что существует по крайней мере не менее 10 молекулярных форм коллагена (Е.С. Северин).

Напомним, что коллаген—внеклеточный белок, но он синтезируется в виде внутриклеточной молекулы-предшественника, которая перед образованием фибрилл зрелого коллагена подвергается посттрансляционной модификации. Предшественник коллагена (сначала препроколлаген, а затем проколлаген) претерпевает процессинг в ходе прохождения через эндоплазматический ретикулум и комплекс Гольджи до появления во внеклеточном пространстве. Внеклеточные амино- и карбоксипротеаза проколла-

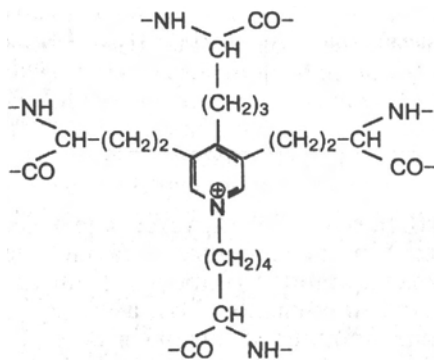
гена удаляют соответственно аминоконцевой и карбоксиконцевой пропептиды. Вновь образованные молекулы коллагена спонтанно собираются в коллагеновые фибриллы. В результате перекрестного связывания цепей и спиральных молекул фибрилл через основания Шиффа и альдольную конденсацию (т.е. перекрестное связывание их рядом ковалентных связей) образовавшиеся фибриллы приобретают силу напряжения зрелых коллагеновых фибрилл.

## Эластин

Эластин—основной белковый компонент, из которого состоят эластические волокна. Он отличается от коллагена по химическому составу и молекулярной структуре.

Общими для эластина и коллагена являются 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: 4 остатка лизина, соединяясь своими радикалами, образуют замещенное пиридиновое кольцо. Считают, что при образовании десмозина сначала 3 остатка лизина окисляются до соответствующих ε-альдегидов, а затем происходит их соединение с четвертым остатком лизина:



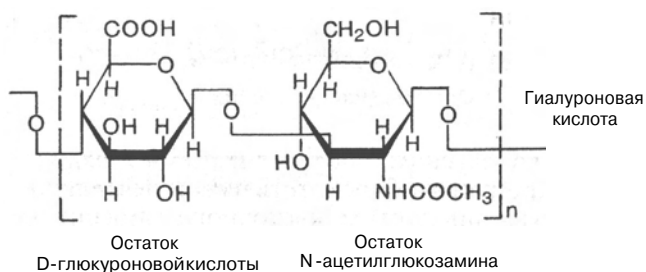
Десмозин

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 орнитиним и лизином. Оказалось, что это лизиннорлейцин, который обеспечивает наряду с десмозином и изодесмозином поперечные связи в молекуле эластина:







**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 су-

Таблица 21.2. 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 <sup>1</sup>	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 <sup>2</sup> 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 ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ )

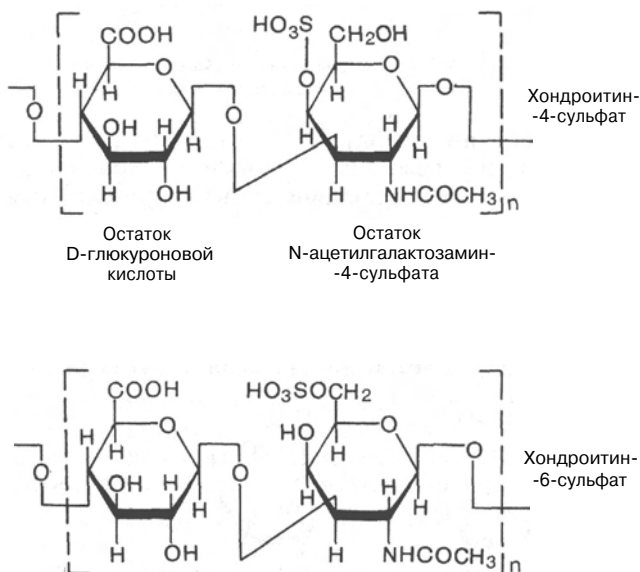
<sup>1</sup> В состав дисахаридной единицы может входить D-глюкуроновая кислота.

<sup>2</sup> Может содержать N-сульфопроизводное глюкозамина вместо N-ацетилглюкозамина и различное количество идуроновой и глюкуроновой кислот.

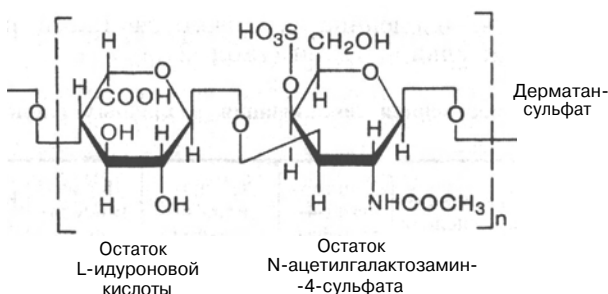
щественно различаются; последние различаются также распределением в разных видах соединительной ткани (табл. 21.3).

Таблица 21.3. Преимущественная локализация различных гликозаминогликанов в тканях

Ткань	Гиалуроно- вая кислота	Хондро- итин-4- сульфат	Хондро- итин-6- сульфат	Дерма- тансуль- фат	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		+			+	

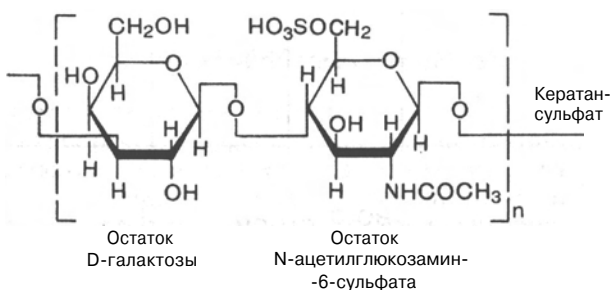


**Дерматансульфат** особенно характерен для дермы (кожи). Он резистентен к действию гиалуронидаз (тестикулярной и бактериальной). В этом одно из отличий дерматансульфата от хондроитинсульфатов. Кроме того, в состав дисахаридной единицы дерматансульфата входит L-идуруновая, а не D-глюкуроновая кислота (в малом количестве D-глюкуроновую кислоту можно обнаружить в повторяющихся единицах дерматансульфата):



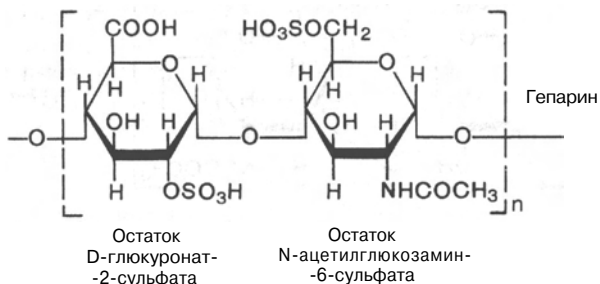
О биологической роли дерматансульфата почти ничего неизвестно. Роль этого гликозаминогликана не может быть сведена только к стабилизации коллагеновых пучков, так как дерматансульфат обнаруживается и в тканях эктодермального происхождения, не содержащих коллагена.

**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-идуронової кислоты:



Установлено, что кератансульфат, выделенный из роговицы глаза (кератансульфат I), и кератансульфат, полученный из хрящевой ткани (кератансульфат II), различаются 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 протеогликана; с гликозаминогликанами его объединяет и химическая структура\*.



\* Некоторые исследователи считают, что точная структурная формула гепарина еще неизвестна.

**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.** Известно, что синтез глюкозамина\* и глюкуроновой кислоты, входящих в состав гиалуроновой кислоты, происходит из D-глюкозы. Непосредственные предшественники гиалуроновой кислоты – нуклеотидные (уридиндифосфонуклеотидные) производные N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты.

Предшественником углеводных остатков сульфатированных гликозаминогликанов, как и у гиалуроновой кислоты, является молекула D-глюкозы. Далее происходит эимеризация глюкозамина в галактозамин, а глюкуроновой кислоты при синтезе дерматансульфата – в идуроновую 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 гиалуропротеин, 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.

Считают, что в большинстве случаев остаток серина служит той точкой полипептидной цепи молекулы протеогликанов, к которой присоединяется гликозаминогликан.

В соединительной ткани протеогликанов 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 мало. Из ферментов, способных гидро-

\* Клетки соединительной ткани могут использоваться для биосинтеза гликозаминогликанов готовый глюкозамин.

лизовать гликозаминогликаны, наиболее изучена  $\beta$ -гиалуронидаза. Последняя относится к лизосомальным ферментам.  $\beta$ -Гиалуронидаза млекопитающих гидролизует  $\beta$ -1,4-гликозидную связь между дисахаридными единицами гиалуроновой кислоты. В результате образуется дисахарид — глюкуроновая кислота ( $\beta$ 1—>3) N-ацетилглюкозамин, который дальше гидролизуется под влиянием лизосомальной  $\beta$ -гликозидазы. Хондроитин-сульфаты также способны расщепляться под влиянием  $\beta$ -гиалуронидазы.

К факторам, регулирующим метаболизм соединительной ткани, прежде всего следует отнести ферменты, гормоны и витамины.

Многие гормоны оказывают воздействие преимущественно на отдельные определенные разновидности соединительной ткани. В данном разделе рассматриваются гормональные влияния, которые носят общий характер. Так, ряд глюкокортикоидных гормонов (кортизон и его аналоги) угнетают биосинтез коллагена фибробластами, тормозят и другую важнейшую метаболическую функцию фибробластов — биосинтез гликозаминогликанов.

По-видимому, действие глюкокортикоидных гормонов на соединительную ткань не ограничивается угнетением биосинтетической активности фибробластов. Предполагают, что под их влиянием происходит активация ферментного катаболизма коллагена.

Минералокортикоидные гормоны (альдостерон, дезоксикортикостерон) надпочечников, напротив, стимулируют пролиферацию фибробластов и одновременно усиливают биосинтез «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. Показатель этого соотношения уменьшается как за счет нарастания содержания коллагена, так и в результате снижения концентрации гликозаминогликанов. В первую очередь значительно снижается содержание гиалуроновой кислоты. Однако не только уменьшается общее количество кислых гликозаминогликанов, но изменяется и количественное соотношение отдельных гликанов. 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* неравнозначно 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. Каждое из этих заболеваний имеет своеобразное течение и сугубо индивидуальные проявления. Среди многочисленных теорий развития коллагенозов наибольшее признание получила теория инфекционно-аллергического происхождения.

Наконец, необходимо отметить, что нарушение процесса гидроксирования коллагена—один из биохимических дефектов при цинге. Коллаген, синтезированный в отсутствие или при дефиците аскорбиновой кислоты, оказывается недогидроксированным и, следовательно, имеет пониженную температуру плавления. Такой коллаген не может образовать нормальные по структуре волокна, что и приводит к поражению кожи и ломкости сосудов, столь четко выраженных при цинге.

## Глава 22

# КОСТНАЯ ТКАНЬ

Костная ткань—особый вид соединительной ткани. Необходимо различать понятия «кость как орган» и «костная ткань».

Кость как орган—это сложное структурное образование, в которое наряду со специфической костной тканью входят надкостница, костный мозг, кровеносные и лимфатические сосуды, нервы и в ряде случаев хрящевая ткань.

Костная ткань является главной составной частью 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, остеоциты и остеокласты.

**Остеобласт**—клетка костной ткани, участвующая в образовании межклеточного вещества. Отличительной чертой остеобластов является наличие сильно развитого эндоплазматического ретикулума и мощного аппарата 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 отщепляются сначала N-концевой, а затем C-концевой домены и формируется тропоколлаген. Последний в межклеточном пространстве образует фибриллы. В дальнейшем после образования поперечных сшивок формируется зрелый коллаген (см. гл. 21).

В остеобластах синтезируются также гликозаминогликаны, белковые компоненты протеогликанов, ферменты и другие соединения, многие из которых затем быстро переходят в межклеточное вещество.

**Остеоцит** (костная клетка)—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 резорбировать\* обызвествленный хрящ и межклеточное вещество костной ткани в процессе развития и перестройки кости. Это основная функция остеокласта. Следует отметить, что остеокласты, так же как и остеобласты, синтезируют РНК, белки. Однако в остеокластах этот процесс протекает

\* Резорбция - рассасывание кости при участии остеокластов, т.е. процесс, характеризующийся образованием углублений (лакун) в костных пластинках.



менее интенсивно, так как у них слабо развит эндоплазматический ретикулум и имеется небольшое число рибосом, но содержится много лизосом и митохондрий.

## 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. Торбенко).

По данным А. Уайта и соавт., неорганические компоненты составляют около  $\frac{1}{4}$  объема кости; остальную часть занимает органический матрикс. Вследствие различий в относительной удельной массе органических и неорганических компонентов на долю нерастворимых минералов приходится половина массы кости.

**Неорганический состав костной ткани.** Более 100 лет назад было высказано предположение, что кристаллы костной ткани имеют структуру апатита. В дальнейшем это в значительной мере подтвердилось. Действительно, кристаллы кости относятся к гидроксилapatитам, имеют форму пластин или палочек и следующий химический состав —  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Кристаллы гидроксилapatита 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 кости преобладающим становится кристаллический гидроксилapatит. Обычно аморфный фосфат кальция рассматривают как лабильный резерв ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и фосфата.

В организме взрослого человека содержится более 1 кг кальция, который почти целиком находится в костях и зубах, образуя вместе с фосфатом нерастворимый гидроксилapatит. 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 гидроксилapatите, например ионы натрия, магния, калия, хлора и др. Высказано предположение, что в кристаллической решетке гидроксилapatита ионы  $\text{Ca}^{2+}$  могут 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 механи-

ческие 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 в коллагене костной ткани несколько больше оксипролина, чем в коллагене сухожилий и кожи. Для костного коллагена характерно большое содержание свободных ε-аминогрупп лизиновых и оксилизиновых остатков. Еще одна особенность костного коллагена – 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% неколлагеновых белков, среди которых находятся и белковые компоненты протеогликанов. 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 гиалуроновая кислота содержатся в небольших количествах.

Принято считать, что гликозаминогликаны имеют непосредственное отношение к оссификации\*. 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 недостаточного 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 (табл. 22.1).

**Таблица 22.1. Химический состав большеберцовой кости человека (в граммах на 100 г сухой обезжиренной кости) (Л.И. Слуцкий)**

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
Гексуоновая 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

\* Оссификация (окостенение) - физиологический процесс импрегнации межклеточного вещества хрящевой или соединительной ткани минеральными солями; протекает при образовании костной ткани.

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.

## ФОРМИРОВАНИЕ КОСТИ

Образование межклеточного вещества и минерализация костной ткани являются 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 (резорбция) 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.

Актуальным является изучение механизма оссификации. Процесс минерализации возможен лишь при наличии строго ориентированных коллагеновых волокон. Как было отмечено, 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 68 нм. Следовательно, период повторяемости структуры (исчерченности) коллагенового волокна в несколько раз меньше, чем длина составляющих волокно молекул тропоколлагена. Это доказывает, что ряды молекул тропоколлагена расположены не 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 по типу 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 протеогликаны, но и воду. Плотная, полностью

минерализованная кость практически обезвожена. В этих условиях коллаген составляет примерно 20% от массы и 40% от объема костной ткани, остальное приходится на долю минеральных компонентов.

Следует отметить, что не все коллагенсодержащие ткани в организме подвержены оссификации. По-видимому, существуют специфические ингибиторы кальцификации. Ряд исследователей считают, 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. При минерализации тканей ингибирующее действие пирофосфата снимается пирофосфатазой, которая, в частности, обнаружена в костной ткани. В целом биохимические механизмы минерализации костной ткани требуют 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. В удалении минеральных солей определенная роль принадлежит усиливающейся при остеоллизе\* продукции органических кислот, в том числе лактата. Известно, что сдвиг pH ткани в кислую сторону способствует растворению минералов и тем самым их удалению.

Резорбция 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 мог произойти внутриклеточный гидролиз, 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. 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 выделение кальция и фосфата регулируются весьма сложной системой, в которой среди других факторов важная роль принадлежит паратгормону (гормон окологла-

\* Остеолиз-рассасывание органического участка кости без последующего замещения другой тканью.

товидных желез) и кальцитонину (гормон щитовидной железы). При уменьшении концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в сыворотке крови возрастает секреция паратгормона (см. гл. 8). Непосредственно под влиянием этого гормона в костной ткани активируются клеточные системы, участвующие в резорбции кости (увеличение числа остеокластов и их метаболической активности), т.е. остеокласты способствуют повышенному растворению содержащихся в костях минеральных соединений. Заметим, что паратгормон увеличивает также реабсорбцию ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в почечных канальцах. Суммарный эффект проявляется в повышении уровня кальция в сыворотке крови.

В свою очередь при увеличении содержания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в сыворотке крови секретруется гормон кальцитонин, действие которого состоит в снижении концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  за счет отложения его в костной ткани. Иными словами, кальцитонин повышает минерализацию кости и уменьшает число остеокластов в зоне действия, т.е. угнетает процесс костной резорбции. Все это увеличивает скорость формирования кости.

В табл. 22.2 приведены краткие данные о гормональной регуляции образования и резорбции кости.

Таблица 22.2. Влияние различных гормонов на скорость образования и резорбции кости (по Лайтгину)

Гормон	Образование кости	Резорбция кости
Паратгормон	+	+ +
Кальцитонин	+	-
Тироксин	±	+
Соматотропин	+ +	+
Кортикостероиды	-	±

Обозначения: + стимулирующий эффект; + влияния нет или оно не четко выражено; - угнетающий эффект.

В регуляции содержания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  важная роль принадлежит витамину D, который участвует в биосинтезе  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков. Эти белки необходимы для всасывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в кишечнике, реабсорбции их 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 гипervитаминоза А, наблюдается резорбция кости, что может приводить к переломам.

Для нормального развития костной ткани необходим витамин С. Действие витамина С не метаболизм костной ткани обусловлено прежде всего влиянием на процессе биосинтеза коллагена. Аскорбиновая кислота

необходима для осуществления реакции гидроксилирования 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 БОЛЕЗНЕЙ КОСТИ

Общепринятой классификацией болезней костей нет. В нашей стране наиболее распространенной является классификация, в основу которой положены этиологический и патогенетический принципы. В классификации приведены сходные по морфологии группы патологических процессов без перечисления отдельных нозологических форм. Различают следующие группы болезней костей: травматические, воспалительные, дистрофические и диспластические.

**Травматические болезни (или повреждения) костей** — одна из самых многочисленных групп патологии костей: переломы, травматические артрозы, деформирующий спондилез и др.

**Воспалительные заболевания костей** вызываются стрептококками и стафилококками. Это так называемые неспецифические воспалительные заболевания (остеомиелит, остит и др.)\*. Различают также специфические воспалительные заболевания костей (в том числе 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 (остеохондропатии)\*\*** характеризуются местным нарушением кровообращения кости и появлением участков асептического некроза в губчатом веществе кости.

Такие болезни костей возникают под влиянием токсических поражений (фосфорные, фтористые и другие отравления), в результате алиментарных расстройств (цинга, рахит и др.), при эндокринных заболеваниях (паратиреоидная остеодистрофия и др.)

**Диспластические заболевания костей** — это недостаточное или избыточное развитие костей, в том числе гигантизм, пороки развития хрящевой ткани, остеосклероз\*\*\*.

К этой же группе болезней относятся опухоли костей — доброкачественные (остеома, хондрома и др.) и злокачественные (первичные — остеогенная саркома и др.; вторичные — метастатические).

\* Остит - воспаление или дистрофия компактного вещества кости.

\*\* Остеохондропатия - общее название болезней, характеризующихся дистрофией губчатого вещества коротких или эпифизов длинных трубчатых костей, обычно с патологическими изменениями суставного хряща.

\*\*\* Остеосклероз - перестройка костной структуры, для которой характерны увеличение числа костных перекладин в единице объема кости, их утолщение, деформация и уменьшение костномозговых полостей вплоть до полного их исчезновения.

## Рекомендуемая литература

- Авдонин П.В., Ткачук В.А. Рецепторы и внутриклеточный кальций.— М.: Наука, 1994.
- Арчаков А.И. Микросомальное окисление.— М.: Наука, 1975.
- Ашмарин И.П. Молекулярная биология.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1977.
- Биотехнология/ Под ред. А.А. Баева.— М.: Наука, 1984.
- Биохимия гормонов и гормональной регуляции / Под ред. Н.А. Юдаева.— М.: Наука, 1976.
- Бохински Р. Современные воззрения в биохимии: Пер. с англ.— М.: Мир, 1987.
- Браунштейн А.Е. На путях к познанию реакций и ферментов переноса аминокислот.— М.: Наука, 1974.
- Браунштейн А.Е. На стыке химии и биологии.— М.: Наука, 1987. - 239 с.
- Введение в биомембранологию/ Под ред. А.А. Болдырева.— М.: Изд-во МГУ, 1990.
- Владимиров Ю.А., Рошупкин Д.И., Потапенко А.Я., Деев А.И. Биофизика.— М.: Медицина, 1983.
- Зильва Дж.Ф., Пэннел П.Р. Клиническая химия в диагностике и лечении: Пер. с англ.— М.: Медицина, 1988.
- Климов А.Н., Никольчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз.— СПб.: «Питер», 1995.
- Курганов Б.И. Аллостерические ферменты.— М.: Наука, 1978.
- Курочкина Л.П., Месянжинов В.В. Фолдинг белка в клетке // Успехи биол. химии.— 1996.— Т. 36.— С. 49—86.
- Мардашев С.Р. Биохимические проблемы медицины.— М.: Медицина, 1975.
- Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: Пер. с англ.— М.: Мир, 1993.
- Мосс Д., Баттерворт П. Энзимология в медицине: Пер. с англ.— М.: Медицина, 1978.
- Нейрохимия/ Под ред. И.П. Ашмарина, П.В. Стукалова.— М.: Изд-во Ин-та биомедицинской химии РАМН, 1996.— 400 с.
- Николс Д. Биоэнергетика.— М.: Мир, 1985.
- Номенклатура ферментов/ Под ред. А.Е. Браунштейна.— М.: ВИНТИ, 1979.
- Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия.— М.: Просвещение, 1987.— 816 с.
- Перспективы биохимических исследований: Пер. с англ./ Под ред. Дж. Гуза, С. Прентиса.— М.: Мир, 1987.
- Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды: Пер. с англ.— М.: Мир, 1987.
- Скулачев В.П. Энергетика биологических мембран.— М.: Наука, 1989.
- Спирин А.С. Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка.— М.: Высшая школа, 1986.
- Спирин А.С. Регуляция трансляции мРНК-связывающими факторами у высших эукариот // Успехи биол. химии.— 1996.— Т. 36.— С. 3—48.
- 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, 1994.
- Gennis R. Biomembranes, molecular structure and function.— 1992.
- Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. Principles of Biochemistry.— New York, 1993.

## Предметный указатель \*

- Аа-тРНК** см. Аминоацил-тРНК  
Абзимы 21  
Авидин 228, 383  
Авитаминозы 205, 217, 222  
Аденилаткиназа 654  
Аденилатциклаза 255, 290-292, 317, 326  
Аденилирование-деаденилирование 293  
Аденилосукцинат **473**  
Аденин 470  
S-аденозилгомоцистеин 454  
S-аденозилметионин 396, 445, **454**  
Аденозилметиониндекарбоксилаза 442, 444  
Аденозиндифосфат 347, 654  
Аденозин-3'-монофосфат 103  
Аденозин-5'-монофосфат 102, 291, 294, 438, 439, 654  
– как эффектор аллостерический 329, 341, 342, 474  
– синтез 471, 472, **473**  
Аденозинтрифосфат 103, 122, 176, 290, 293, 305, 323, 326, 328-332, 334, 335, 337, 339, 342, 349, 371, 373, 382, 383, 392, 395, 396, 400, 513, 654  
– активирование аминокислот 523, 524  
– жирных кислот 373  
– в катаболизме глюкозы 352, 359  
– синтезе белка 515, 516, 534  
– РНК 448  
– как регулятор аллостерический 329, 343  
– синтез 473, 546 (см. также Фосфорилирование окислительное)  
– энергия свободная гидролиза 304-306, 450, 471, 479, 480, 528, 529  
Аденозинфосфорибозилтрансфераза 474  
Адреналин 271, 272, **273**, 274, 403, 673  
– регуляция обмена углеводов 324  
Адренодоксин 277  
Адренодоксинредуктаза 277  
Адренорецепторы 637, 641  
АДФ см. Аденозиндифосфат  
АДФ-рибозилирование 154  
Азидотимидин **542**  
Азот небелковый см. Азот остаточный  
– оксид 295 (см. также NO-радикал)  
– остаточный 580  
– экскреция 450, 451  
Азотемия 580, 581  
Аконитаза см. Аконитатгидратаза  
цис-Аконитат 346  
Аконитатгидратаза **346**  
Акромегалия 240  
АКТГ см. Гормон адренокортикотропный  
Активаторы 145, 292, 295, 538, 606  
Активация предшественником 156  
– профермента 159, 420, 421  
– ферментов 95, 603  
Активность каталитическая 122, 127, 161, 162, 493 (см. также Ферменты; Рибозимы)  
– оптическая 171  
Актин 301, 649, 650  
α-актинин 648  
β-актинин 648  
F-актин 650  
G-актин 649, 650  
Актиномицин D 494, 495, 541  
Актомиозин 650  
Аланин 38, 39, 50, 164, 411, 459, 546  
– как регулятор фермента 343  
β-Аланин **502**, 503  
Аланинаминопептидазы 616  
Аланин-аминотрансфераза 439, 579  
АЛАТ см. Аланин-аминотрансфераза  
δ-АЛК см. Кислота δ-аминолевулиновая  
Алкалоз 590, 591  
Алкаптонурия 457, 468, 620  
Алкогольдегидрогеназа 335  
Аллантион 500, **501**  
Альбинизм 457  
Альбумины 73, 74, 570  
Альдозы 170  
Альдолаза 329, 330, 579  
Альдомет см. α-Метилдофа  
Альдостерон **276**, 277, 279  
Амелетин 256  
ω-Амидаза 461, 462  
Амилаза слюны см. α-Амилаза  
α-Амилаза 319, 320  
– панкреатического сока 320  
– тканевая 324  
β-Амилаза 319  
γ-Амилаза 320  
Амило-1,6-глюкозидаза 320  
Амилоза 182  
Амилопектин 182  
Аминазин 641  
Аминоацил-тРНК **524**  
Аминоацил-тРНК-синтетазы 30, 512, 513, 515, 516, 518, 523

\* Полу жирным шрифтом выделена страница с изображением структуры соединения.



- 5-Аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотид **472**
- 5-Аминоимидазолрибонуклеотид 471, **472**
- Аминокислоты 28, 269, 464, 513, 515
- активированные 523, 524
  - активность оптическая 39
  - анаболизм 431
  - ароматические 427, 456-458, 458
  - всасывание 425
  - ВЭЖХ 43
  - гликогенные 338, 440, 456, 460
  - заменимые 414, 456, 460, 465
  - изомеры 442
  - катаболизм 431
  - кетогенные 440
  - в синтезе жирных кислот и стероидов 546
  - классификация 34
  - коды 520
  - конфигурация 39, 40
  - масса молекулярная 35
  - метаболизм промежуточный 431, 634
  - нарушения обмена 464, 467
  - незаменимые *см.* Аминокислоты эссенциальные
  - необычные 74
  - окисление серы 454
  - превращения индивидуальные 431
  - производные 37, 444
  - пул метаболический 411
  - реабсорбция в почках 466
  - свободные 33, 37, 534, 581, 582
  - превращения 545, 546
  - свойства амфотерные 34, 37
  - серосодержащие 427, 453-456
  - синтез 438, 439
  - смесь 417
  - стереохимия 39
  - точка изоэлектрическая 38
  - транспорт через мембраны 430
  - экзогенные 581, 582
  - эндогенные 581, 582
  - эссенциальные 413-415, 416, 456, 458, 463, 465
- D-аминокислоты 40, 77, 431, 432
- δ-Аминолевулинатсинтаза 505
- Аминопептидазы 423, 425
- Аминосахара 178
- Аминотрансфераза(ы) 227, 435, 437, 438
- аминокислот с разветвленной цепью 459
- Амины биогенные 227, 440, 443, 446
- Аммиак 433, 434, 438, 446, 448, 450, 451, 503
- в мозге 635
  - в синтезе аминокислот 450
  - связывание 438, 448
- АМФ *см.* Аденозин-5'-монофосфат
- Амфетамин 641
- АМФ циклический **104**, 255, 264, 286, 290-292, 296, 297, 324, 325, 326, 342, 371, 640 (*см. также* Мессенджеры вторичные)
- в мышцах 659, 660
  - как активатор протеинкиназ 317, 318
- Анаболизм 152
- Анализ рентгенокристаллографический 518
- рентгеноструктурный 47, 51, 56, 60, 64, 65, 311
- Анализатор автоматический аминокислот 42
- Аналоги 150
- аминокислот 515
  - природные витамина B<sub>12</sub> 233
  - синтетические 105, 232
  - гормонов 254, 255, 283
  - структурные 241
  - тирозинил-гРНК 541
- Ангиотензины 75, 613
- Ангиотензиноген 613
- Андрогены 282, 283, 412 (*см. также* Гормоны половые мужские)
- Андростерон **282**
- Анемия 243
- макроцитарная 231, 234
  - мегалобластная 231, 234
  - пернициозная 231, 234, 624
  - серповидно-клеточная 83
- Ансамбли ферментные 129
- Ансерин 503, **651**, 653
- Антагонисты 247
- витамина B<sub>6</sub> 232
  - тироксина 267
- Антивитамины 150, 206, 246
- биотина 247
  - витамина B<sub>1</sub> 247
  - B<sub>12</sub> 247
  - C 247
  - K 218, 247, 606
  - кислоты никотиновой 247
  - фолиевой 247
- Антидепрессанты 641
- Антикоагулянты 218, 605, 608
- искусственные 606
- Антикодон 110, 515, 518, 521, 529
- Антиметаболиты 148, 247
- Антиоксиданты 220, 315
- α<sub>1</sub>-Антипротеиназа 421
- Антитела *см.* Иммуноглобулины
- аномальные 91
- Антитромбины 605
- Антиферменты 147
- Антифибринолизин *см.* Факторы свертывания крови
- Анурия 616
- АПБ *см.* Белок ацилпереносящий

Апо В-100 *см.* Апопротеин В-100  
Апобелки 88, 575, 576  
Аполипопротеины 575, 576  
Апопротеин В-100 556  
Апоптоз 315  
Апофермент 120  
Апоферритин 584  
Арабиноза 321  
Аргиназа 141, 449, 579  
Аргинин 73, 295, 449, 450, 463, 546  
– в синтезе креатина 455  
– недостаточность 465  
Аргинин-вазотонин 257  
Аргининосукцинат 449, **450**  
Аргининосукцинатаза 449  
Артрит ревматоидный 91, 279  
Архебактерии 300  
АсАТ *см.* Аспаратаминотрансфераза  
Аскорутин 240  
Аспарагин 447, 460, 461  
L-аспарагиназа 168  
Аспарагинсинтетаза 447  
Аспарагинтрансаминаза 461, 462  
Аспартам 77, 164  
Аспаргат 351, 438, 450, 460, 464, 546  
– в синтезе нуклеиновых кислот 471-473  
Аспаратаминотрансфераза 351, 439,  
579, 660, 644  
Аспаргатдекарбоксилаза 143  
Аспаргаткарбамоилтрансфераза 474,  
475  
Атеросклероз 405, 406  
Атом углерода асимметричный 39, 40,  
171, 173, 451  
Атриопептиды 76  
Атропин 639  
АТФ *см.* Аденозинтрифосфат  
АТФ-АДФ-транслоказа 655  
АТФаза  $Ca^{2+}$ -зависимая 658  
– миозиновая 650  
– митохондриальная 119  
 $Ca^{2+}$ -АТФаза 304, 316  
 $H^{+}$ -АТФаза *см.* Насосы протонные  
 $Mg^{2+}$ -АТФаза 638  
 $Na^{+}$ -АТФаза *см.*  $Na^{+}$ -АТФ-синтетаза  
 $Na^{+}/K^{+}$ -АТФаза 304, 305, 316, 317  
АТФ-синтетаза 312  
 $H^{+}$ -АТФ-синтетаза 305, 311  
 $Na^{+}$ -АТФ-синтетаза 305  
АТФ-цитрат-лиаза 382  
Ацетальдегид **335**  
Ацетат 283, 639  
Ацетиласпаргат 460, 634, 636  
Ацетилирование 532  
Ацетил-КоА 344, 345, **346**, 349, 375, 378,  
380, 382, 383, 398, 399, 545, 546, 638  
– как эффектор аллостерический 339, 341  
Ацетил-КоА-ацетилтрансфераза 375, 380,  
398

Ацетил-КоА-карбоксилаза 383, 399  
N-ацетилсфингозин *см.* Церамид  
Ацетилхолин 246, 637, **638**, 642  
Ацетилхолинэстераза 639  
Ацетоацетат **379**, 380, 381, 456, 457  
– в мозге 636  
Ацетоацетил-КоА **379**, 380, 398  
Ацетоацетил-КоА-гидролаза 380, 385  
Ацетоацетил-S-АПБ 399  
Ацетон **379** (*см. также* Тела кетоновые)  
Ацидоз 448, 589, 590  
L-ацилглицерол-3-фосфат 392  
Ацилглицеролы **192**, 194  
Ацилкарнитин **374**  
Ацил-КоА 368, 373, **374**, 375, 388, 393,  
397  
Ацил-КоА-дегидрогеназы ФАД-содер-  
жащие 374, 375  
Ацил-КоА-синтетаза 369, 373, 381  
Ацил-малонил-АПБ 384  
Ацил-трансацетилаза 384  
Ацилтрансфераза 397  
Аутокатализ 153  
Аутотрофы 15  
Аутофосфорилирование 270  
**Бактерии** кишечника 508  
Бактериородопсин 305  
Бактериофаги 87  
Баланс азотистый отрицательный 412,  
414, 465  
Барьер гематоэнцефалический 635  
Белки 19, 44-46, 74, 118, 539  
– аномальные 544  
– выделение 23  
– высаливание 26  
– экстракция 24  
– гидролиз 33, 50, 52  
– ферментативный 56  
– гидрофильность 44  
– глобулярные 47, 63, 65  
– глюкагонсвязывающие 272  
– гниение в кишечнике 427  
– головного мозга 635  
– ДНК-связывающие 480, 486  
– изомеры 20  
– интегральные 301  
– катионные 629  
– классификация 71, 72  
– компоненты биомембран 298  
– кристаллические 118  
– мембранные 303, 316, 317  
– мышц 648  
– негистоновые 87  
– обмен, врожденные пороки 410  
– роль печени 558, 559  
– организация структурная 49  
– уровень пятый 71  
– очистка 32

- переваривание 417
- периферические 301
- плазмы крови 91, 93
- простые 72
- растворы в воде 26
- регуляторные 648
- резервные 416
- рибосомные 514, 515, 533
- свойства амфотерные 44
  - физико-химические 44
- секретлируемые 530, 531
- сложные 72, 78, 469
- состав аминокислотный 33, 37, 40
  - состояние коллоидное 44
- специфичность действия 22, 29
- сыворотки крови 31, 74
- транспортные 530
- функции 20-22, 409, 410
- экспортируемые *см.* Белки секретлируемые
- Белки-мишени 270, 290, 296
- Белки-онкогены *gas* 533
- Белок 14-3-2 630
  - ацилпереносящий 384, 385
    - генактивирующий катаболический 538
  - дефицит в пище 246
  - *dna B* 479
  - *dna C* 479
  - железосерный 85, 94, 309
  - заряд суммарный 52
  - ингибитор трипсина панкреатический 420, 421
  - конформация 66
  - кристаллический 32, 33
  - модификация химическая посттрансляционная 290
  - молекула конформационная 531
  - Мура *см.* Белок S-100
  - *n'* 479
  - S-100 630
  - С-реактивный 578
  - состояние гомогенное 24, 32
  - стеаринпереносящий 402
  - структура 52
    - вторичная 60, 62
    - первичная 52, 59
    - третичная 63, 68
    - участки варибельные 60
      - инвариантные 60
    - четвертичная 68
  - точка изоионная 49
    - изоэлектрическая 49
  - ценность биологическая 413, 415, 416
- Белок-репрессор 536, 537
- Беременность 281, 413
- Бери-бери 204, 205, 221, 222
- Бикарбонат(ы) 364, 383
  - калия 598
- Биливердин 507, 561
- Билирубин конъюгированный 508, 561
  - не прямой *см.* Билирубин свободный
  - общий 508
  - прямой *см.* Билирубин конъюгированный
  - свободный 507, 561
- Билирубин-диглюкуронид *см.* Билирубин прямой
- Билирубинурия 623
- Биология молекулярная 17
- Биомембраны 302, 303
- Биополимеры 30, 47, 94, 96, 102, 169
  - информативные 510
  - неинформативные 510
- Биотехнология 18, 498
- Биотин 228, 339, 383, 441 (*см. также* Витамин Н)
- Биофлавоноиды 240
- Биохимия 15, 17
  - направления развития 18
  - проблемы 115, 116, 123
- Биоцитин 228
- Биоэнергетика 305
  - 1,3-Бисфосфолицерат 330, 331
  - 2,3-Бисфосфолицерат 331
- Болезнь Аддисона 274, 279
  - Альцгеймера 316
  - Андерсона 361
  - базедова *см.* Болезнь Грейвса
  - Боткина 579
  - бронзовая 274, 275 (*см. также* Болезнь Аддисона)
    - Вильсона-Коновалова *см.* Дистрофия гепатоцеребральная
  - Гирке 361, 362
  - Грейвса 267
    - желчнокаменная 508, 566
  - кленового сиропа 459, 468
  - Кори 361
  - Мак-Ардла 361
  - миеломная 572
  - Паркинсона 316
  - Помпе 361
  - сердца ишемическая 576, 577, 660
    - коэффициент холестерина атерогенности 577
    - Таруи 361
    - Томпсона 361
  - Фобса *см.* Болезнь Кори
  - Хага 361
    - Хагемана 602
    - Хартнупа 426, 468
- Брожение 16, 17
  - молочнокислое 335
  - спиртовое 334, 335
- Бутирил-КоА 375
- Вазопрессин 256, 257**
- Вазотоцин 257

- Валин 459  
 Валиномицин *см.* Транслоказы  
 Варфарин 218  
 «Велосипед Кребса» 548, 549  
 Вердоглобин 507, 561  
 Вещество(а) биологически активные 284, 289, 560  
 – витаминоподобные 208, 240  
 – внеклеточные 187  
 – канцерогенные 314  
 – липотропные 558  
 – миелиновое 626, 627  
 Взаимодействия ван-дер-ваальсовы 113  
 – гетеротропные 126, 156  
 – гидрофобные 88, 132, 261, 298, 301  
 – гомотропные 126, 156  
 – ионные 298  
 – комплементарные 480, 485, 487, 488  
 – электростатические 132  
 Викасол 217  
 Вирус(ы)  
 – ДНК-содержащие 111  
 – иммунодефицита человека 90, 542  
 – мозаики табачной 69, 70, 87  
 – РНК-содержащие 87, 486  
 – самосборка 70, 87  
 Витаминология 204  
 Витамин(ы) 205  
 – А **209**, 314, 677  
 – В<sub>1</sub> **220**, 222  
 – В<sub>6</sub> **226**, 464  
 – В<sub>12</sub> **232**  
 – В<sub>15</sub> 241  
 – в белковом обмене 412  
 – С 122, 146, 205, 221, **238**, 240, 507, 677, 678  
 – D 201, 202, **213**, 677  
 – D<sub>3</sub> 264, 265  
 – E **219**  
 – жирорастворимые 208, 210-220  
 – К **216**, 217, 247, 602  
 – классификация 208  
 – методы определения 207, 208  
 – нарушения обмена врожденные 206  
 – Р **239**  
 – РР 221, **225**, 226, 458  
 – U 244  
 ВИЧ *см.* Вирус иммунодефицита человека  
 Вода 275, 277, 546  
 – компонент мембран 298  
 – отщепление 332, 472, 475  
 – свободная 582  
 – связанная 582  
 – связывание 346, 375, 665  
 Волюморепепторы 613  
 Воска **194**  
 Вращение удельное 39, 173  
 ВТМ *см.* Вирус мозаики табачной
- Газ** углекислый 335, 339, 471, 503, 596  
 --карбаминовая форма 596, 597  
 Галактоза 171, 180, 199, 320, 321, 337  
 – включение в гликолиз 337, 338  
 – в печени 555, 556  
 D-галактозамин 179, 180, 665  
 Галактоземия 165, 338, 496, 555  
 Галактозидаза 153  
 β-Галактозидаза 320, 536, 537  
 Галактозилцерамиды 199  
 Галактозо-1-фосфат 337, 338  
 Галактозурия 623  
 Галактокиназа 337  
 Галоперидол 641  
 ГАМК *см.* Кислота γ-аминомасляная  
 ГАМК-трансаминаза 462  
 Ганглиозиды 90, 199, 298, 300  
 Гаптоглобин 577  
 Гастрексин 420  
 Гастрины 289  
 ГДФ *см.* Гуанозиндифосфат  
 Гексозо-1-фосфат-уридилтрансфераза 337, 338, 556, 557  
 Гексозофосфаты 274  
 Гексозы 545  
 Гексокиназа 270, 322, 326, 328, 333, 335, 359, 552, 653  
 Гель-фильтрация 97  
 Гель-хроматография 30, 32, 45, 46, 97  
 – тонкослойная 45  
 Гель-электрофорез 31, 32, 74, 97, 128  
 Гем 79, 80, 295, 504, 505  
 Гематин 84, 504  
 Гематозид 200  
 Гематурия 622  
 Гемералопия 210  
 Гемина хлорид 84  
 Гемоглобин(ы) 59, 69, 78, 79, 503, 585  
 – аномальные 59, 81, 82, 585  
 – взрослого человека 81  
 – распад 506, 507  
 – S 83  
 – свойства буферные 588, 589  
 – связывание кислорода 592-595  
 -- углекислого газа 596-599  
 – фетальный 81  
 Гемоглобинозы 82  
 Гемоглобинопатии 82  
 Гемоглинурия 622  
 Гемоксигеназа дециклизирующая *см.* Оксидидаза НАДФ-содержащая  
 Гемопротейны 75-85, 310  
 Гемосидерин 95, 504  
 Гемостаз 600  
 Гемохроматоз 504  
 Гемохромоген 84  
 Гемоцианин 85  
 Гемсинтаза *см.* Феррохелатаза  
 Гемэритрин 85

- Ген(ы) 276, 490, 492  
 — гистонов 492  
 — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы 493  
 — искусственные 496  
 — код генетический 67, 519, 520, 522  
   --- вторичный 518  
   --- особенности 521, 522  
 — лактозный 537  
 — мозаичность структуры 498  
 — мутации 82, 489  
 — оператор 535, 536  
 — перенос в клетку 496  
 — регулятор 535, 536  
 — синтез 108  
 --искусственный на мРНК 496  
 — структурные 491, 535, 536  
 — транскрипция 277  
 — тРНК аланиновой 496  
 — тропомиозина 493  
 — экспрессия 110, 297, 487, 489, 511, 538  
   -- механизмы 536-538  
   -- регуляция 538  
   --- САР-цАМФ 538  
 Геном клетки 487, 488  
 Генотерапия 481  
 Гепарин 91, 186, 605, 606, **668**  
 Гепаринсульфат 669  
 Гепатит вирусный *см.* Болезнь Боткина  
 Геранилпирофосфат **401**  
 Гетеротрофы 15  
 β-Гиалуронидаза 670  
 Гиалуропротейн 669  
 Гидразин 54  
 β-Гидроксиацил-АПБ-дегидратаза 384  
 L-3-Гидроксиацил-КоА **375**  
 3-Гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа НАД-зависимая 375  
 3-Гидроксиацил-КоА-эпимераза 377  
 D-3-гидроксибутират **379**, 380, 387  
 1α-Гидроксилаза 215  
 Гидроксилапатиты 673  
 Гидроксилазы *см.* Моноксигеназы  
 Гидроксилирование 532  
 Гидроксил-радикал 315  
 3-Гидрокси-3-метилглутарил-КоА **379**, 380  
 β-Гидрокси-β-метилглутарил-КоА 398, **399**  
 Гидроксиметилглутарил-КоА-лиаза 380  
 Гидроксиметилглутарил-КоА-редуктаза НАДФ-зависимая 399, 402, 403  
 Гидроксиметилглутарил-КоА-синтаза 398  
 Гидроксиметилглутарил-КоА-синтетаза 380  
 3-Гидроксипролин **662**  
 4-Гидроксипролин **662**  
 5-Гидроксипролин **662**  
 Гидролаза эфиров холестерина *см.* Холестеролэстераза  
 Гидролазы 161, 418  
 Гидролиз ограниченный 123  
 — ступенчатый 106  
 — ферментативный 97, 103  
 — химический 97, 106  
 Гипераминоацидурия 466, 467, 620  
 Гипервалинемия 620  
 Гипервитаминозы 205, 206, 211  
 Гипергликемия 269, 272, 274, 277, 359, 360  
 Гипергликорахия 644  
 Гиперкалиемия 583  
 Гиперлипемия алиментарная 370  
 Гипернатриемия 583  
 Гиперплазия тканей 279  
 Гиперпролинемия 620  
 Гиперпротеинемия 572  
 Гипертиреоз 266 (*см. также* Болезнь Грейвса)  
 Гиперурикемия 581  
 Гиповитаминозы 205, 206  
 Гипогликемия 269, 359-361  
 Гипогликорахия 644  
 Гипокалиемия 583  
 Гипокальциемия 583  
 Гипоксия 595, 596  
 Гипонатриемия 583  
 Гипопаратиреоз 583  
 Гипопротеинемия 465, 572  
 Гипоталамус 251, 276  
 Гипохлорит-анион 315  
 Гипофиз 251, 255, 281  
 Гипофосфатемия 584  
 Гистамин **443**, 444, 637  
 Гистидаза 464, 579  
 Гистидин 95, 432, 443, 464, 516, 546  
 — недостаточность 465  
 Гистидинаммиаклиаза *см.* Гистидаза  
 Гистидиндекарбоксилаза микроорганизмов 442  
 Гистоны 73, 87, 96, 111  
 Гликобиология 90  
 Гликоген 184, 293, 552  
 — биосинтез 259, 322-324  
 — депонирование 321, 324  
 — «заправочная» цепь 323  
 — мобилизация 324-326, 334, 392 (*см. также* Гликогенолиз)  
 — распад 272  
 — расщепление *см.* Крахмал, расщепление  
 Гликогенозы 361, 362, 552  
 Гликогенолиз *см.* Гликоген, распад  
 Гликогенсинтаза 156, 272, 323, 324, 359  
 Гликогенфосфорилаза 228, 272, 292, 293, 322  
 Гликозаминогликаны 91, 186, 187, 665  
 — биосинтез 669  
 — локализация в тканях 667, 674  
 — структура 666

- β-Гликозидаза лизосомальная 670  
 Гликозиды 175, 179, 201  
 N-гликозиды **176**  
 O-гликозиды **176**  
 S-гликозиды **176**  
 Гликозилирование 301, 532  
 Гликозурия 269  
 Гликокаликс 321  
 Гликоконъюгаты 90  
 Гликолиз 327-334, 392  
 – анаэробный 328-332, 334  
   -- в условиях аэробных 353  
 – аэробный 328  
 – регуляция 342, 343, 358  
 Гликолипиды **199**, 298  
 Гликопротеины 90-94, 260, 264, 289, 366  
 – крови 573  
 – мембраносвязанные 430  
 – мозга 630  
 – слюны 93  
 – тканей хрящевой и костной 93  
 Глиоксилаза I 453  
 D-глицеральдегид **170**, 171, 336  
 Глицеральдегид-3-фосфат **332**, 336, 349, 351, 356, 357  
 Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа 330, 331  
 Глицерин *см.* Глицерол  
 Глицерол 170, 192, 193, 195, 197, 338, 367, 371, **392**, 545, 547  
 Глицеролкиназа 369, 392  
 Глицерол-3-фосфат 342, 349, 350  
 Глицеролфосфатацилтрансфераза 393  
 Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа 350, 392  
 α-Глицерофосфат **392**, 393, 369  
 Глицерофосфат-ацилтрансфераза 369  
 Глицерофосфолипиды 195  
 Глицин 33, 50, 246, 451, 452, 453, 477, 471, 504  
 – в синтезе креатина 455  
 – конъюгаты с кислотами желчными 364, 365  
 Глицин-амидинотрансфераза 455, 615  
 Глицинамидрибонуклеотид 471, **472**  
 Глицинемия некетогенная 453  
 Глобин 504, 507  
 Глобулин(ы) 73, 74, 571  
 – антигемофильный А *см.* Факторы свертывания крови  
   -- В *см.* Факторы свертывания крови  
 – X 648  
 Глутамат 73, 351, 433, 437, 438, 444, 450, 460, 462-464, 634, 635, 652  
 – амиака связывание 447, 460  
 – декарбоксилирование 635, 636  
 – синтез у растений 462, 463  
 – циклизация 255  
 Глутаматдегидрогеназа 238, 433, 434, 579  
 Глутаматдекарбоксилаза 244, 444  
 Глутаматсинтаза 462, 463  
 γ-Глутамилкарбоксилаза 218  
 γ-Глутамилтрансфераза 430, 579  
 Глутамин 168, 447, 460, 461, 464, 634, 635, 652  
 – в синтезе нуклеиновых кислот 471, 473, 474, 475  
 Глутаминаза 448, 461  
 Глутаминамидотрансфераза 461  
 L-глутамин(аспарагин)аза 168  
 Глутаминсинтаза 447, 462  
 Глутаминтрансминаза 461, 462  
 Глутатион 76, 122, 146, 430, 431, 453, 460, 634  
 Глутатионпероксидаза 37, 220, 585 (*см. также* Селен)  
 Глутатионредуктаза 453  
 Глюкагон 267, 269, **271**, 274, 289, 403, 554  
 – в регуляции обмена углеводов 342  
 – кишечный 272  
 – синтез 254  
 Глюкокортикоиды 275, 277, 403, 670  
 – как индукторы синтеза ферментов 360  
 Глюкоза 169, 171, 173, 175, 180, 182, 185, 199, 269, 272, 320, 321, 334, 434  
 – ингибирование гексокиназы 335, 337  
 – окисление анаэробное 327  
   --аэробное 327  
   --выход энергетический 351, 352  
 – синтез 272, 440  
 – уровень в крови 274, 275, 293  
 – фосфорилирование 322, 327, 328  
 D-глюкозамин 179, 180, 665  
 α-Глюкозидаза *см.* Мальтаза  
 Глюкозилцерамиды **199**  
 Глюкозо-1,6-бисфосфат 322, 326  
 Глюкозо-1-фосфат **322**, 325, 337, 338  
 Глюкозо-6-фосфат **322**, 326, 328, 334, 335, 337, 341, 353, 354, 553, 554  
 – как эффектор аллостерический 324, 328  
 Глюкозо-6-фосфатаза 326, 327, 341  
 Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 354  
 Глюкозо-6-фосфатизомераза 329  
 Глюкозо-1-фосфат-уридилтрансфераза *см.* УДФГ-пирофосфорилаза  
 Глюкозурия 359, 361, 362, 622  
 Глюкокиназа 322, 328, 552  
 Глюконеогенез 269, 277, 338-341, 548  
 – регуляция 341-343  
 β-Глюкуронидаза 579  
 Глотелины 73  
 ГМГ-КоА-редуктаза *см.* Гидрокси-метил-глутарил-КоА-редуктаза НАДФ-зависимая  
 ГМГ-КоА-синтаза *см.* Гидрокси-метил-глутарил-КоА-синтаза  
 ГМФ *см.* Гуанозинмонофосфат  
 – циклический 76, **104**, 293, 295-297

- Гомеостаз 248  
 Гомогенизация 23  
 Гомогентизинурия *см.* Алкаптонурия  
 Гомосерин **456**  
 Гомоцистеин 454, **456**  
 Гомоцистеинметилтрансфераза 454  
 Гомоцистинурия 227  
 Гонадолиберин **253**, 261  
 Гонадотропины 261  
 Гормон(ы) 248, 284  
 – адренокортикотропный **258**, 262, 276, 412  
 --действие антидиуретическое 257  
 – белковой природы 91, 250, 255  
 – гонадотропный 93  
 – железы щитовидной 412  
 – классификация 250, 251  
 – липотропные 261  
 –  $\beta$ -липотропный 643  
 – лютеотропный *см.* Пролактин  
 – надпочечников, коркового вещества 201, 412  
 – пептидные 250, 297  
 – половые 280, 404  
 --женские 280  
 --мужские 279, 282, 283  
 --неспецифические 275  
 – производные аминокислот 250  
 – растительные 289  
 – стероидные 202, 249, 250, 259, 264, 297, 434  
 – тиреоидные 266, 403, 404  
 – фолликулостимулирующий 93  
 – цинксодержащий 288  
 Грамицидин S 77, **534**  
 Группа протетическая 72, 120, 121, 146, 504, 532  
 Группы одноуглеродные 232  
 ГТФ *см.* Гуанозинтрифосфат  
 ГТФ-связывающий белок 289, 290-292, 316, 317  
 Гуанидинацетат **455**  
 Гуанидинацетатметилтрансфераза 455  
 Гуанилатциклаза 76, 293, 294  
 – растворимая 295  
 Гуанилрибонуклеаза 499  
 Гуанин 470  
 Гуанин(гипоксантин)-фосфорибозилтрансфераза 474  
 Гуанозилтимидинфосфат 104  
 Гуанозиндифосфат 473  
 Гуанозинмонофосфат 471-**473**  
 – как эфektor аллостерический 474  
 – циклический *см.* ГМФ циклический  
 Гуанозинтрифосфат 290, 293, 339, 347, 349, 434, 473, 529  
 – в синтезе белка 513, 526, 527  
 --РНК488  
 Гулонолактонооксидаза 239  
**Давление** кровяное 272, 273, 274, 295  
 Дальтонизм 212  
 dАМФ *см.* Дезоксиаденозинмонофосфат  
 dАТФ *см.* Дезоксиаденозинтрифосфат  
 dГТФ *см.* Дезоксигуанозинтрифосфат  
 ДГФК *см.* Кислота дигидрофолиевая  
 Деацилаза *см.* Ацетоацетил-КоА-гидролаза  
 Дегидрогеназы липоатсодержащие 309  
 – флавиновые 312  
 Дезаминирование аминов 446  
 – аминокислот 431-434, 559  
 --внутримолекулярное 432  
 --непрямое 438, 439  
 --неокислительное 434  
 --окислительное 432  
 Дезоксиаденозилкобаламин 234, 235 (*см. также* Витамин В<sub>12</sub>)  
 Дезоксиаденозинмонофосфат 476, 477  
 Дезоксиаденозинтрифосфат 477  
 Дезоксигуанозинтрифосфат 477  
 Дезоксикортикостерон **276**, 277  
 Дезоксирибоза 86, 98, 102, 169, **178**, 470, 475  
 Дезоксирибонуклеазы 498, 499  
 Дезоксирибонуклеопротеины 73, 86, 87  
 Дезоксирибонуклеотиды 475-477  
 Дезокситимидиндифосфат 476  
 Дезокситимидинмонофосфат 476  
 Дезокситимидинтрифосфат 476, 477  
 Дезоксиуридинмонофосфат **476**  
 Дезоксицитидинтрифосфат 477  
 Действие вазопрессорное 283  
 – противовирусное 541  
 Декарбоксилаза(ы) 227, 224  
 – аминокислот 441-443  
 –  $\alpha$ -кетокислот 441  
 Декарбоксилирование 400  
 – аминокислот 440-446  
 --с конденсацией 441  
 ---трансаминированием 441  
 – бактериальное 427  
 – глутамата 462  
 – окислительное 222, 245  
 --  $\alpha$ -кетокислот 459  
 --пирувата 341, 344, 345, 359  
 Декстран 30  
 Декстриназа терминальная *см.* Олиго-1,6-глюкозидаза  
 Декстрины 182, 184, 320  
 Деменция 225  
 Денатурация 23, 47, 118, 125, 127, 141  
 – агенты 52  
 Дерматансульфат 667, **668**  
 Дерматиты 225, 226, 227, 229, 236  
 Десатуразы 387  
 Десмозин **664**  
 Детергенты 24, 26  
 Дефекты наследственные 236

- Диабет несахарный 257, 617  
 – сахарный 269, 359, 380, 405, 440, 554, 555, 623  
 -- инсулинрезистентный 271  
 Диазореактив Эрлиха 507, 508  
 Диализ 119  
 Диатез геморрагический 217  
 Диацилглицерол-ацилтрансфераза 393  
 1,2-Диацилглицерол-3-фосфат *см.* Фосфатидат  
 Диацилглицеролы 192, 296, 297  
 Дигидролипоилацетилтрансфераза 344  
 Дигидролипоилдегидрогеназа 344, 345  
 Дигидрооротаза 475  
 Дигидрооротатдегидрогеназа НАД-содержащая 475  
 Дигидрофолатредуктаза НАДФН-зависимая 476  
 Дигидроэпиандростерон **282**, 283  
 1,2-Диглицерид 393, 395, 396  
 Диглицеридацилтрансфераза 369  
 Диглицеридлипаза 371  
 Диизопропилфторфосфат 124, 148  
 Дикумарол 218  
 Диметилаллилпиррофосфат **400**, 401  
 2,4-Динитрофенол 313  
 Динуклеотиды 469  
 Диоксиацетон **170**  
 Диоксиацетонфосфат **330**, 336, 350, 392  
 Диоксигеназы 313  
 3,4-Диоксифенилаланин **422**, 443  
 Диоксифенилэтиламин *см.* Дофамин  
 Дипептидил-карбоксипептидаза 613  
 Дипептидазы 423, 425  
 Дипептиды 651  
 Дисахариды **179**, 320, 321  
 Диск-электрофорез 31, 46  
 Дислипотеинемия 576, 577  
 Диспротеинемия 573  
 Дистрофия(и) гепатоцеребральная 74, 467, 578  
 – мышечные 659  
 Дифосфатнуклеозиды 469, 473, 475  
 Диффузия 321  
 Диэтилстильбэстрол **282**  
 ДНК 19, 20, 86, 87, **97**, 111, 297, 478, 487  
 – биосинтез на ДНК-матрице 486  
 – биспиральная 108  
 – клонирование 262  
 – конфигурация 110  
 – митохондрий 107, 511  
 – преобразованная 481, 482, 488  
 – реассоциация 108  
 – рекомбинантные 481  
 – репарация 500  
 – репликация 110  
 – синтез в бесклеточной системе 479  
 -- челночный у *E. coli* 483  
 – стабилизация 109  
 – типы 102  
 – транскрипция 110  
 – шаг спирали 110  
 ДНКазы 469, 499  
 ДНК-гираза 480  
 ДНК-гликозидазы 499  
 ДНК-лиаза 480, 482, 483, 486  
 ДНК-полимераза(ы) 108  
 – I 479, 480, 483, 485  
 – II 480  
 – III 479, 480, 483, 486  
 –  $\alpha$  480  
 –  $\delta$  480  
 –  $\epsilon$  480  
 – с ревертазной активностью 487  
 Долихолфосфат **192**  
 Домены 63, 93, 461, 539  
 ДОФА *см.* 3,4-Диоксифенилаланин  
 ДОФА-декарбоксилаза 244  
 Дофамин **273**, 274, 442, 443, 637  
 Дофамин-монооксигеназа 443  
 ДСН *см.* Натрия додецилсульфат  
 дТДФ *см.* Дезокситимидиндифосфат  
 дТМФ *см.* Дезокситимидинмонофосфат  
 дТТФ *см.* Дезокситимидинтрифосфат  
 дУМФ *см.* Дезоксиуридинмонофосфат  
 ДФФ *см.* Диизопропилфторфосфат  
 дЦТФ *см.* Дезоксицитидинтрифосфат  
 Дыхание несопряженное *см.* Окисление свободное  
 – тканевое 306, 307, 311  
**Единицы** Сведберга 45, 513, 515  
 Емкость буферная 39  
 Еноил-АПБ-редуктаза 384  
 Еноил-КоА **374**, 375  
 $\Delta^{2,3}$ -*транс*-Еноил-КоА **377**  
 $\Delta^{3,4}$ -*цис*-Еноил-КоА **377**  
 Еноил-КоА-гидратаза 375  
 $\Delta^{3,4}$ -*цис*  $\rightarrow$   $\Delta^{2,3}$ -*транс*-Еноил-КоА-изомераза 377  
 Енолаза 146, 332  
**Железа** паразитовидная 263  
 – поджелудочная 267, 423  
 – щитовидная 264  
 Железо 23, 79, 80, 94, 95, 146, 503, 507, 584, 632, 652  
 – в активном центре 314  
 – двухвалентное 503, 584  
 – комплексы с белками 503, 504, 505  
 – негемовое *см.* Белок железосерный  
 – трехвалентное 503, 584, 632  
 – функциональное 503  
 Желтуха гемолитическая 563  
 -- печеночная 508  
 – механическая 564  
 – надпочечная *см.* Желтуха гемолитическая



- обтурационная *см.* Желтуха механическая
- паренхиматозная 564
- Желчь 565, 566
- Жидкость цереброспинальная 644
  - спектр аминокислот 464
- Заболевания** наследственные 362, 426, 457, 459, 467, 468
  - эндокринные 678
- Закон действия масс 152
- Зимогены 603
- Зоб эндемический 266
- Изоаллоксазин** 223
- Изодезмосин 554
- Изолейцин 40, 155, 459
- Изомеразы 161, 355, 367
- Изомеризация 235
- Изомеры оптические 238
- Изопентенилпирофосфат **400**, 401
- Изоплиты 108
- Изопропиладреналин **273**
- Изостенурия 617
- Изотахофорез 31
- Изоферменты 126, 155, 161
- Изоцитрат **346**, 347
- Изоцитратдегидрогеназы 347, 359
- Изоэнзимы *см.* Изоферменты
- Иминокислоты 432, 433
- Имипрамин 641
- Иммобилизация клеток 164
- Иммунитет клеточный 315
- Иммуноглобулины 56, 93
  - как антитела 93, 571, 572
- Иммунология 93
- Иммуноэлектрофорез 569
- ИМФ *см.* Инозинмонофосфат
- Ингибирование бесконкурентное 151
  - необратимое 148
  - обратимое 148
    - неконкурентное 150
    - конкурентное 148, 149, 151
  - согласованное 446
  - тип смешанный 152
- Ингибитор(ы) 267, 292, 383, 443, 640
  - синтеза белка 93, 434, 515, 540, 543 (*см. также* Интерфероны)
  - РНК 494, 495
  - трипсина 147
  - факторов свертывания крови 605
  - ферментов 123, 147-149, 446, 533, 607, 642
  - эластазы *см.*  $\alpha_1$ -Антипротеиназа
- Индикан животный 428, 468
- Индолилацетат 458, 468
- Индолилацетилглутамин 468
- Индолилпируват 468
- Индукторы *см.* Эффекторы аллостерические
- Инженерия генетическая 18, 481, 496, 499
- Инозинмонофосфат 438, 471, **472**, 477
- Инозит *см.* Инозитол
- Инозитол 196, 242
- Инозитол-1,4,5-трифосфат 242, 296
- Инсулин 51, 56, 57, 267, **268**, 272, 403
  - А-форма 269
  - инактивация 453
  - как индуктор синтеза ферментов 359
    - репрессор 359
  - модификация 532
  - свободный 268
  - связанный 268, 269
  - синтез 254
- Интеральфаглобулин 584
- Интеркаляция 111
- Интерлейкин-2 92
- Интерфероны 92, 578
- Интроны 490-494
- Инулин 184
- Инфаркт миокарда 439, 580, 660
- Инфекция стрептококковая 606
- Информация генетическая 478
  - вторичная 510
  - первичная 510
  - передача 487
  - реализация 478, 510, 519
  - фенотипическая *см.* Информация генетическая вторичная
  - интрамолекулярная 68
  - наследственная 20, 86, 114
- Информосома 100
- Иодопсины 212
- Ионы металлов 96
- Йод** 23, 265-267
- Йодтиреоглобулин 264, 266
- Казеин** 424
- Казеиноген 89
- Калий 146, 275, 277, 332, 583, 611, 621, 622, 632, 652
  - генерация потенциала 636, 637
- Кальмодулин 296
- Кальсеквестрин 657
- Кальций 121, 146, 215, 255, 263-265, 291, 293, 295-297, 302, 422, 583, 632, 648, 650, 652, 676
  - в активном центре 319, 396
  - высвобождение медиатора 638
  - как мессенджер 296
    - фактор свертывания крови 601
  - сокращение мышечное 654, 657, 658
- Кальцитонин **264**, 676, 677
- Кальцитриол 264
- Кальциферол 213
- Камни мочевые 624
- Карбаматкиназа 449
- Карбамоилфосфат **448-450**, 474

- Карбамоилфосфатсинтетаза аммиакзависимая 449
- глутаминзависимая 449
  - цитоплазматическая 472
- Карбгемоглобин 597 (*см. также* Гемоглобин)
- Карбоангидраза 146, 584, 597
- Карбоксигемоглобин 84 (*см. также* Гемоглобин)
- Карбоксикатепсин 613
- Карбоксилирование 229, 378, 383, 386, 387, 532
- Карбоксипептидазы 422, 425
- Кардиолипиды 197, 298
- Карнитин 374, 383
- Карнитин-ацилтрансфераза 374
- Карнозин 315, 503, 651, 653
- Каротиноиды 188
- Каротины 212, 213
- Карта пептидная 56
- Катаболизм 152, 545, 546
- Каталаза 79, 314
- Катализаторы биологические 116, 117
- Катехоламины 273, 274, 324, 443
- Катехолметилтрансфераза 274
- Квашиоркор 465
- Керагансульфат **668**
- Кератомалиция 210
- $\beta$ -Кетоацил-АПБ-редуктаза 384
- $\beta$ -Кетоацил-КоА *см.* 3-Оксоацил-КоА
- Кетогексокиназа 336
- $\alpha$ -Кетоглутарат **347**, 351, 433, 437, 438, 454, 459, 460, 462
- аминирование восстановительное 635
  - декарбоксилирование окислительное 347
- $\alpha$ -Кетоглутаратдегидрогеназа *см.* Комплекс  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназный
- Кетозо-1-фосфатальдолаза 336
- Кетозы 170
- $\alpha$ -Кетокислоты 411, 437, 438, 459, 460
- аминирование восстановительное 450
  - в синтезе глюкозы 547
- Кетонемия 405
- Кетонурия 269, 405, 623
- 17-Кетостероиды 279, 283
- 3-Кетотиолаза *см.* Ацетил-КоА-ацетилтрансфераза
- $\beta$ -Кетотиолаза *см.* Ацетил-КоА-ацетилтрансфераза
- Киназа фосфорилазы *b* 326
- Кинины *см.* Пептиды крови
- Кинуренин 227, **458**, 459
- Кислота(ы) адениловая *см.* Аденозилмонофосфат
- 3',5'-адениловая *см.* АМФ циклический
  - аденилоянтранная *см.* Аденилосукцинат
  - аллантионовая 500, **501**
  - аллохолевая 365
  - $\beta$ -аминоизомасляная **502**, 503
  - $\gamma$ -аминомасляная **444**, 462, 634, 640, 642
  - $\delta$ -аминолевулиновая 227, 441, 453, **504**
  - арахидоновая 191, 284, 315, 316, 388, **389**, 390
  - путь превращения липоксигеназный 286, 287, 316, 390
  - циклооксигеназный 284, 285, 316, 390
  - аргининоянтранная *см.* Аргининосукцинат
  - аскорбиновая 122, 146, 456 (*см. также* Витамин С)
  - аспарагиновая *см.* Аспарат
  - N-ацетиласпарагиновая *см.* Ацетиласпарат
  - N-ацетилнейраминавая 200
  - ацетилсалициловая 218, 620
  - ацетоуксусная *см.* Ацетоацетат
  - 1,3-бисфосфоглицериновая *см.* 1,3-Бисфосфоглицерат
  - D-галактоновая 176
  - гиалуроновая 91, 665, **666**
  - гиппуровая **428**, 560
  - гликодезоксихолеваая 365
  - гликохенодезоксихолеваая 365
  - гликохолеваая **365**
  - глутаминовая *см.* Глутамат
  - D-глюконовая 176, 241
  - глюкуроновая 186, 427, 508, 560
  - конъюгаты 274
  - гомогентизиновая 456, **457**, 468
  - гуаниловая *см.* Гуанозинмонофосфат
  - дегидроаскорбиновая 238 (*см. также* Витамин С)
  - дезоксиадениловая *см.* Дезоксиаденозинмонофосфат
  - дезоксирибонуклеиновая *см.* ДНК
  - дезоксихолеваая **365**
  - дигидрофолиеваая 476
  - дигомо- $\gamma$ -линоленовая 284
  - дикарбоновые 40
  - желчные 146, 201, 202, 365, 367
  - активация липазы 366
  - конъюгированные с глицином *см.* Кислоты желчные парные
  - таурином *см.* Кислоты желчные парные
  - натриевые соли 364, 367
  - парные 365, 427, 444
  - жирные **189**, 193, 195, 197, 199, 364, 366, 368, 636
  - активирование 369, 373
  - ацил-КоА-производные 459
  - биомембран 299
  - биосинтез 381-388, 392, 399
  - удлинение цепи 388
  - всасывание 367
  - высокомолекулярные *см.* Кислоты жирные высшие

- высшие 299, 371, 545
- изомеры 191
- конфигурация 191, 192, 377
- конформация 190
  - незаменимые 188, 388, 389
  - недостаточность 389
- ненасыщенные 189, 191, 197, 274, 377
- образование из аминокислот 440
- окисление 373-377
- полиненасыщенные 220
- свободные 371, 374, 397
  - β-окисление 373-375
  - транспорт в крови 371
- с нечетным числом углеродных атомов 377
  - окисление 377, 378
- экзогенные 369, 370
- L-идуроновая 186, 667
- изолимонная *см.* Изоцитрат
- индолилмолочная 468
- индолилуксусная *см.* Индолилacetат
- инозиновая *см.* Инозинмонофосфат
- N-карбамоиласпарагиновая **474**, 475
- карбоновые 440, 621 (*см. также* Аминокислоты; α-Кетокислоты; Кислоты жирные)
- алифатические 189
- производные 33
- α-кетомасляная 456
- лизергиновая 641
- диэтиламин *см.* ЛСД
- лимонная *см.* Цитрат
- α-линолевая 189-191, 388, **389**
- линоленовая 191, 388
- липоевая 122, **245**
- амид 344, 347
- литохолевая 365
- малеилацетоуксусная 456, **457**
- мевалоновая *см.* Мевалонат
- 3-метокси-4-оксиминдальная 274
- молочная *см.* Лактат
- мочевая 500, **501**, 581, 620
- муравьиная 459
- нуклеиновые 469 (*см. также* ДНК; РНК)
  - ассоциированные с мембранами 298
  - биосинтез 259, 478-498
  - вирусные 113 (*см. также* Вирусы)
  - методы выделения 96, 97, 111
  - молекула гибридная 487
  - полярность цепи 109
  - распад 498
  - секвенирование 107
  - структура 105, 108, 111, 113
  - функции 96
- 3-оксиантраниловая **458**, 459
- β-оксимасляная *см.* D-3-гидроксибутират
- n-оксифенилпировиноградная 456, **457**
- олеиновая 189-191, 193, 377, 378, 387, 392
  - в составе биомембран 299
  - сердечной мышце 656
- оротовая **474**, 475
- пальмитиновая 189-191, 193, 375, 376, 378, 381, 382, 385, 392 (*см. также* Кислоты жирные)
- пальмитоолеиновая 387
  - в составе биомембран 299
- пантотеновая **236** (*см. также* Витамины)
- парааминобензойная 230, 240
- парные *см.* Кислоты желчные
- пентановая 284
- пировиноградная *см.* Пируват
- пироглутаминовая **253**, 255
- пропионовая 377
- рибонуклеиновая *см.* РНК
- серная *см.* Сульфат
- сиаловые 91, 180, 199
- синильная 78
- соляная 141, 145, 153, 423, 424, 443
- стеариновая 189, 190, 193, 387, 392
- в биомембранах 299
- тауродезоксихолевая 365
- таурохолендесоксихолевая 365
- таурохолевая **365**
- тетрагидрофолиевая 231, 452, 454, 455
- УДФ-глюкуроновая *см.* Кислота уридилдифосфоглюкуроновая
- уксусная *см.* Ацетат
- уреодезоксихолевая 365
- уридилдифосфоглюкуроновая 427, **428**, 560
- уридиловая *см.* Уридинмонофосфат
- уроновые 177, 180
- фенилпировиноградная *см.* Фенилпируват
- фолиевая **230**, 241 (*см. также* Витамин В<sub>9</sub>)
- фосфатидная *см.* Фосфатидат
- 2-фосфоглицериновая *см.* 2-Фосфоглицерат
- 3-фосфоглицериновая *см.* 3-Фосфоглицерат
- 6-фосфоглюконовая *см.* 6-Фосфоглюконат
- фосфоенолпировиноградная *см.* Фосфоенолпируват
- фосфорная *см.* Фосфат неорганический
- фумаровая *см.* Фумарат
- хенодесоксихолевая **365**
- хинолиновая **458**, 459
- холановая **364**
- холевая **365**
- хондроитинсерная 91
- цистеиновая **444**, 454
- цистеинсульфиновая **444**, 454
- шавелевоуксусная *см.* Оксалоацетат

- яблочная *см.* Малат
- янтарная *см.* Сукцинат
- Кишечник 225, 508
- злокачественные карциноиды 458, 465
- флора микробная 368, 426, 427
- Клетки эпителиальные 368-370
- δ-Коактиваторы 540
- КоА-трансфераза 381
- Кобаламин 233 (*см. также* Витамин В<sub>12</sub>)
- Кобальт 146, 233, 585, 652
- Кодон 518, 521, 525
- Колипаза 366
- Коллаген 63, 662-664, 669, 670, 671
- ткани костной 673, 674
- Коллоид 264
- Кома инсулиновая 634
- Комплекс(ы) дегидрогеназный α-кетокислот с разветвленной цепью 459
- иммунные 406
- инициаторный 526
- α-кетоглутаратдегидрогеназный 129, 245, 347, 359
- надмолекулярные 129
- пируватдегидрогеназный 245, 344, 345
- транскрипционный 489
- фермент-субстратный 130, 132, 134, 136, 147
- фетоплацентарный 281
- хлораминовый 315
- цепи дыхательной 309
- Конденсация НАДФН-зависимая 401
- Константа диссоциации 120
- логарифм отрицательный 38
- кажущаяся 38
- комплекса фермент-субстратного 135
- ингибиторная 149
- Михаэлиса 136, 137, 151
- равновесия термодинамическая 194
- седиментации 45, 111
- скорости реакции 134
- Контроль дыхательный 313
- Концепция хемиосмотическая 311, 312
- Конъюгаты с глюкуроновой кислотой 281
- Кооперативность 156
- связывания лиганда 84
- Копростерин 203, 368
- Корепрессор 537
- Кортизол 276, 277
- Кортизон 276, 277, 279, 670
- Кортиколиберин 254, 262, 276
- Кортикостероиды 275, 279, 282
- Кортикостерон 276
- Кортикотропин *см.* Гормон адренокортикотропный
- Косубстрат 121
- Кофактор 120, 121, 157, 218
- Кофермент(ы) 96, 120, 121, 169, 231, 234, 331, 344, 347
- А 236, 344, 347, 373, 382, 503
- Коэнзим(ы) *см.* Коферменты
- R 228 (*см. также* Биотин)
- Q 242, 310, 349, 350
- КоQH<sub>2</sub>-цитохром-с-редуктаза 309 (*см. также* Цепь дыхательная)
- Коэффициент Бодуэна 360
- фосфорилирования 312, 313
- Крахмал 169, 181
- расщепление 319, 320
- Креатин 455, 456, 559, 651
- Креатинин 455, 456
- Креатинкиназа 580, 654, 655, 660
- Креатинурия 659
- Креатинфосфат 305, 455, 456, 651, 654
- в миокарде 655
- Кремний 97
- Кретинизм 266
- Кривая(ые) гликемические 360
- титрования 38
- Криоглобулин 578
- Кровотечения 217
- Кровь, вещества органические безазотистые 582
- клетки 585
- плазма 464, 568, 569, 580-582
- белки 568-580
- давление осмотическое 567
- электролиты 582-585
- свертывание 603, 604 (*см. также* Факторы свертывания крови)
- формирование красного тромба 603
- функция дыхательная 591 (*см. также* Гемоглобин)
- щелочной резерв 589
- Ксантинооксидаза 314
- Ксенобиотики 313, 314
- Ксерофтальмия 209
- Ксилоза 321
- Ксилулозо-5-фосфат 355
- Кэп *см.* Шапочка
- Кэпирование 491, 492
- Лактаза** *см.* β-Галактозидаза 536, 537
- Лактат 328, 332, 334, 335, 343, 353
- в синтезе глюкозы 338
- Лактатдегидрогеназа 71, 128, 332, 333, 335, 579, 580, 644
- в диагностике инфаркта миокарда 660
- почках 615
- ткани мышечной эмбриональной 653
- спектр изоферментный 334
- ЛГ *см.* Лютропин
- ЛДГ *см.* Лактатдегидрогеназа
- Лактоза 180, 320
- Ланостерин 401
- Лейкотриен(ы) 284, 286, 389, 391

- А, **391**
- Лейцин 40, 459
- Лейцин-энкефалин **262**
- Лецитин *см.* Фосфатидилхолин
- Лиазы 161
- Либерины 252 (*см. также* Рилизинг-факторы)
- Лигазы 161, 496
- Лиганды 29, 84, 295, 576
- Лизин 38, 40, 228, 427, 521
  - недостаточность 427, 465
- Лизин-вазопрессин 257
- Лизиннорлейцин 664, **665**
- Лизофосфатидат *см.* L-ацилглицерол-3-фосфат
- Лизофосфолипаза 368
- Лизофосфолипиды 198, 316, 368, 397
- Лизоцим 58
- Лиофилизация 48, 120
- Липаза 142
  - желудочная 363, 364
  - лингвальная 364
  - сока панкреатического 366, 367
  - тканевая 272
- Липиды 88, 188, 370, 556-558
  - в комплексе с белками 412, 460
    - питании 363
  - классификация 188
  - компоненты биомембран 598
  - мезоморфизм 301
  - нарушение всасывания 404
  - окисление перекисное 224, 295, 315, 406
  - свойства иммунные 197
    - полярные 195
- Липогенез 381-388, 392 (*см. также* Кислоты жирные, биосинтез)
- Липолиз 371, 372, 403
- Липопротеинлипаза 404
- Липопротеины 88, 89, 202, 406
  - атерогенность 406
  - модификация перекисная 406
  - мозга 629
  - плазмы 405, 574, 577
    - классификация 405, 406, 574, 575
  - сыворотки крови 88, 89
- Липосомы 406-408
- Липотропины *см.* Гормоны липотропные
- ЛСД 641
- ЛТГ *см.* Гормоны липотропные
- Лютропин 261, 281, 283
  
- Магний** 23, 96, 121, 146, 291, 329, 331, 332, 335, 347, 373, 449, 488, 583, 621, 622, 632, 650, 652
  - в синтезе белка 513, 516
    - пептидов 534
  - как активатор фермента 487, 499
- Магнийпорфирины 78
- Макроглобулинемия Вальденстрема 572
  
- Макроэрги 305, 331, 332, 334, 344, 347, 448
  - в регуляции аллостерической 156
    - мышце эмбриональной 653
- Малат **339**, 340, 351, 450
- L-малат **348**
- Малатдегидрогеназа 348, 351, 450
  - митохондрий 339, 351, 382
  - цитоплазматическая 340, 351, 382
- Малонат 149
- Малонил-КоА **383**, 384, 386, 399
- Малонил-трансацилаза 384
- Мальтаза 320
- Мальтоза 179, 184, 319, 320
- Маннит 177
- Манноза 171, 180, 321
- МАО *см.* Моноаминоксидаза
- Марганец 23, 121, 146, 291, 332, 347, 383, 488, 632
  - как активатор фермента 487, 499
- Масла 194
- Мевалонат 243, 398, **399**, 400
- Медиатор боли 444
- Медь 122, 467, 505, 632
- Мезобилиноген 508, 562
- Мезобилирубин 508, 562
- Меланолиберин **254**
- Меланома злокачественная 465
- Меланостатин **254**
- Меланотонин 289
- Меланотропины 254, 258
- Мембрана(ы) биологические 188, 196, 197, 284
  - асимметрия 301
  - архебактерий 300
  - клеток 88, 94, 202
  - митохондрий 243
- полупроницаемая 32, 44
- Менингит гнойный острый 644
- Меромиозин 649
- Мессенджеры 96, 242, 296
  - вторичные 249, 271, 289, 290, 297, 303, 314, 315
  - NO-радикал 314, 315
  - первичные 303, 316
- Метаболизм 15, 545
- Метаболиты промежуточные 338, 468, 582
- Метаболоны 71
- Металлопротеины 94, 95
- Металлоферменты 95
- Метгемоглобин 84 (*см. также* Гемоглобин)
- N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-метенил-ТГФК 471, 476
- Метиламинооксидаза 244
- α-Метилдофа 443, 641
- Метилирование 274, 532
- Метилкобаламин 234, 235 (*см. также* Витамин В<sub>12</sub>)

D-метилмалонил-КоА **378**  
L-метилмалонил-КоА **378**  
Метилмалонил-КоА-мутаза 235, 378  
Метилмалонилэпимераза 378  
S-метилметионин 245  
Метионил-тРНК-синтетаза 524  
Метионин 56, 246, 453, 454, 524  
– активный *см.* S-аденозилметионин  
– во взаимопревращении аминокислот 454  
– недостаточность 465  
Метионин-энкефалин **262**  
Метод(ы) анализа седиментационного 44  
– гидролиза избирательного и неполного 55  
– иммунохимический 32  
– комплементарной ДНК 56  
– определения аминокислоты С-концевой 54  
----Акабори54  
----восстановлением борогидридом натрия 55  
----ферментативные54  
---N-концевой53  
----Сенджера53, 262  
----Эдмана53, 54  
– фракционирования 26  
Механизм(ы) челночный(е) 157  
-- глицеролфосфатный 349, 350  
--цитратный 382 (*см. также* Система трикарбоксилаттранспортная)  
--малат-аспаратный 351  
Микроскопия сканирующая 47  
Микросомы 387, 388  
Микрофлора *см.* Бактерии кишечника  
Микроэлементы 584, 585, 652  
Микседема *см.* Отек гипотиреоидный  
Минералокортикоиды 275, 277, 670  
Миоген 648  
Миоглобин 57, 65, 80, 503, 648  
Миозин 37, 649  
Миокиназа 140  
Миопатия 619, 659  
Мицеллы 182, 190, 367  
– вывернутые 302  
– смешанные 368  
Мобилизация жиров 259, 269  
Модификация химическая 123, 154  
-- обратимая 154  
-- постсинтетическая 154, 287 (*см. также* Белки)  
-- посттрансляционная 75, 90, 532-534  
Моноаминоксидаза 274, 446, 640, 641  
Моноацилглицеролы 192  
 $\alpha$ -Моноглицерид 367  
 $\beta$ (2)-Моноглицерид **366**, 367, 369  
Моноглицеридлипаза 371  
Моноуклеосома 86

Мононуклеотиды **102-105**, 500  
Моноксигеназы 153, 215, 313, 314  
Моносахариды **170**, 179  
Монофосфатнуклеотиды 469, 473, 475  
Морфин 256, 263  
Моча, компоненты 412, 427, 428, 448, 450, 451, 456, 458, 466, 508, 619, 620  
--минеральные 621, 622  
-- пигменты 616, 617  
– плотные вещества 618  
– спектр аминокислотный 464, 466, 619, 620  
– ферменты 622  
Мочевина 16, 448, 449, **450**, 451, 500, 501, 503, 581, 619  
– биосинтез *см.* Цикл мочевинообразования орнитинный Кребса  
МСГ *см.* Меланотропины  
Мукополисахариды *см.* Гликозаминогликаны  
Мультимер 68, 127 (*см. также* Белки)  
Мускарин 639  
Мутаротация 173  
Мышцы 22, 274, 654, 655  
– гладкие 257, 283, 652, 653, 657  
– поперечно-полосатые 647, 648, 654, 656  
– сердца 652, 653, 655, 656  
– скелетные 272

**Нагрузка** сахарная 360  
НАДН-дегидрогеназа 309  
НАДН-КоQН<sub>2</sub>-редуктаза 309 (*см. также* Цепь дыхательная)  
Надпочечники 272  
– вещество корковое 274  
--- гиперфункция 440  
-- мозговое 273  
НАДФН-оксидаза 314  
Насосы протонные 304, 305  
Натрий 275, 277, 583, 621, 622, 632, 652  
– генерация потенциала 636, 637, 638  
– додецилсульфат 24, 97  
– карбонат 597  
Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обменник *см.* Транслоказы  
Недостаточность белковая 409, 412, 465, 466  
Нейроальбумины 629  
Нейровасодилататоры 295  
Нейроглобулины 629  
Нейропептиды 76, 256  
Нейросклеропротеины 629  
Нейрофизины 255, 256  
Неомицин 542  
Нетолерантность к фруктозе 555  
Нефриты хронические 466  
Нефрозы 466  
Никель 652  
Никотин 639  
Никотинамидадениндинуклеотид 164, 176, 225, 226, **307-309**, 312, 546

- как кофермент 330, 332, 344, 347, 349
- Никотинамидадениндинуклеотидфосфат 176, 225, 226, **307**, 308, 312-314, 353, 357, 387, 401, 433, 434, 453, 475
- в синтезе веществ 355, 359, 384-387
- как кофермент 354, 355, 359
- Никтурия 616
- Нингидрин 41
- Нитроглицерин 295
- Норадреналин 273, 274, 403, 637, 641
- НО-радикал 314, 315 (*см. также* Мессенджеры вторичные)
- НО-синтаза 295, 296, 314
- HS-КоА *см.* Кофермент А
- Нуклеазы 102
- активность трансферазная 498
- Нуклеозиддифосфаткиназы 473
- Нуклеозиддифосфаты 103
- Нуклеозидмонофосфаткиназы 473
- Нуклеозидтрифосфаты 103
- Нуклеозидфосфорилазы 470
- Нуклеозиды 102, 103, 105, 176, 470
- всасывание 470
- метилирование 491
- пиримидиновые 501-503
- производные 122
- пуриновые 500, 501
- Нуклеопротеины 86-88, 96, 176, 469, 629
- Нуклеотидазы 102
- Нуклеотиды 449, 651
- пиримидиновые 469, 474-477
- пуриновые 469, 474
- циклические 104, 632
- Обезвреживание** аминов биологических 446
- аммиака 446-450, 560
- билирубина непрямого 508, 561
- веществ токсических 560, 561
- сульфита 454
- Обмен азотистый 451, 460
- веществ 114 (*см. также* Метаболизм)
- продукты неспецифические 467
- Оболочка гидратная 26
- Окисление биологическое 224, 306, 307
- цепь 349, 350
- микросомальное 313, 559
- свободное 313-315
- β-Окисление 373-377, 379
- Оксалоацетат **339**, 340, 345, 346, 348, 351, 380, 382, 411, 450, 452, 549
- Оксалурия наследственная 624
- β-Оксиацил-КоА *см.* L-3-гидроксиацил-КоА)
- Оксибутиратдегидрогеназа 579
- Оксигемоглобин 84, 594, 597 (*см. также* Гемоглобин)
- Оксигеназы специфические 285
- Оксидаза(ы) 244
- аминокислот 432, 433
- D-аминокислот 559
- НАДФ-содержащая 507
- Оксидоредуктазы 85, 160
- 3-Оксикинуренин **458**, 459
- Оксикислоты 299, 300 (*см. также* Мембраны биологические)
- 15-Оксипростагландиндегидрогеназа 286
- Оксидоредукция гликолитическая 330
- Окситочен 256, **257**
- Оксоадренохром 274
- 3-Оксоацил-КоА **375**
- Октопамин 637
- Олеил-КоА **388**
- Олиго-1,6-глюкозидаза 320
- Олигонуклеотиды, резистентные к действию РНКазы 469
- Олигопептиды 74, 75
- Олигосахариды 179
- Олигоурия 616
- Олигофрения фенилпировиноградная *см.* Фенилкетонурия
- ОМФ *см.* Оротидин-5'-фосфат
- Онкобелки 90
- Онковирусы 486
- Онкорнавирусы 486
- Оперон лактозный 496
- Опухоли 279
- Органы-мишени 250, 264
- Орнитин 427, 444, **445**, 449, 450, 455
- Орнитиндекарбоксилаза 444
- Орнитин-карбамоилтрансфераза 449, 579
- Оротидин-5'-фосфат **474**, 475, 477
- Осаждение 119
- Основания азотистые 97
- минорные 97-99, 108, 493
- пиримидиновые 97, 98
- пуриновые 97, 99, 470, 471
- Шиффовы 434-436, 442, 505, 664
- Оссификация 674-676
- Остеодистрофия паратиреоидная 678
- Остеолиз 676
- Остеомалация 214
- Остеопороз 215
- Отек гипотиреоидный 266, 279
- Отравления 361, 678 (*см. также* Яды)
- Палиндромы** 108, 110, 499
- Пальмитоил-КоА **388**
- Пальмитоолеил-КоА **388**
- Память 641-643
- нейромедиаторы 642
- регуляторы 642, 643
- Пангипопитуитаризм 259, 260
- Панкреозимин *см.* Холецистокинин
- Парапротеинемия 572
- Паратгормоны 263, 676, 677
- Парвальбумины 648
- Пеллагра 225

- Пенициллины 543  
 Пентозо-5-фосфаты 356  
 Пентозурия 623  
 Пентозы 86  
 Пепсин 140, 142, 147, 419, 424  
 Пепсиноген 419  
 Пептид(ы) 28, 56, 253, 425  
 – биологически активные 76, 262  
 – боли 643  
 – всасывание 426  
 – крови 582  
 – модификация посттрансляционная 75  
 – памяти 256  
 --регуляторные 642, 643  
 – предсердный натрийуретический 295  
 – сигнальные 530, 531  
 – синтез химический 76, 77  
 δ-Пептид сна 76  
 Пептидазы 425 (см. также Гидролазы)  
 Перекись водорода см. Пероксид водорода  
 Перенос электронов 277  
 Переносчики водорода 333, 335  
 – дыхательные 307-309, 311  
 Переход фазовый 302  
 Пероксид водорода 314, 315, 432  
 Пероксидазы 79, 314, 315  
 Пероксинитрит 314, 315  
 Пероксисомы 559  
 Печень 95, 198, 277, 281, 370, 373, 428, 439, 553, 560  
 – жировая инфильтрация 558  
 – инактивация биологически активных веществ 560  
 --метаболизм токсических 561  
 --продуктов гниения белка 560, 561  
 – образование билирубина 507  
 --кетоновых тел 379-381  
 -- пре-β-липопротеинов 556, 557  
 – распад гемоглобина 506, 507  
 – участие в обмене белков 558, 559  
 ----пигментов 561-565  
 Пигменты 507, 561, 616, 617  
 – желчные 507, 508, 561  
 --в моче 562, 563, 623  
 Пиелонефрит хронический 615  
 Пиранозы 173, 181, 184, 185  
 Пиридоксальфосфат 434, 435-437, 441, 452, 456, 532 (см. также Витамин В<sub>6</sub>)  
 Пиридоксин 221, 247 (см. также Витамин В<sub>6</sub>)  
 Пироглутамилпептидаза 255  
 Пирофосфат 322, 338, 395, 471, 485, 524, 528, 529  
 Пиррофосфомевалонат 400  
 Пирролохинолинохинон 209, 243  
 Пируват 332, 334, 344, 353, 411, 453, 454, 545, 546, 548  
 – в синтезе глюкозы 338  
 – декарбоксилирование 335 (см. также Декарбоксилирование окислительное пирувата)  
 – как кофермент 442  
 – карбоксилирование 339  
 Пируватдегидрогеназа 129, 344  
 Пируватдекарбоксилаза 335  
 Пируваткарбоксилаза 229, 339, 341  
 Пируваткиназа 332, 343, 359  
 Питание белковое парентеральное 417  
 Пищеварение внеклеточное см. Пищеварение пристеночное  
 – пристеночное 321  
 Плазмалогены 196, 298  
 Плазмин 606  
 Плазминоген 606  
 Пластохинон 243  
 Плацента 281  
 Подагра 624  
 Показатель креатининный 619, 659  
 Полиаденилатполимераза 491  
 Полиаденилирование 491, 492  
 Полиамины 96, 445, 446  
 Полинуклеотид-фосфорилаза 495, 499, 500  
 Полипептид панкреатический 267  
 Полипептиды 20, 49, 50, 74, 288  
 Полирибосома 100, 513, 515, 530  
 Полисахариды 180, 181, 182, 184, 185, 186  
 Полисома см. Полирибосома  
 Полиурия 616  
 Полуацеталь 173  
 Помпа кальциевая 658  
 Порины 530  
 Порфирины 503, 623  
 Порфирия 624  
 Порфобилиноген 505  
 Порфобилиногенсинтаза 505  
 Последовательность полиадениловая 107  
 Посредники см. Мессенджеры  
 Потенциал действия см. Спайк  
 – электрохимический 305, 312  
 Почки 22, 198, 264, 277, 448, 614  
 – клиренс 610  
 --смешанный 611, 612  
 – реабсорбция 466, 610, 611  
 – секреция 611  
 – транспорт максимум 611  
 – фильтрация клубочковая 608-610  
 Правила Чаргаффа 101  
 Праймаза с РНК-полимеразной активностью 485  
 Праймасома 479, 480, 486  
 Праймер 479, 483, 485, 486  
 Практика клиническая 26, 28, 42, 74, 129, 279, 410, 591 (см. также Практика медицинская)  
 – медицинская 48, 84, 105, 149, 217, 232, 281-283, 443, 607, 641  
 Прегнан 275, 276



- Прегненолон 277, 281, 283  
 Пре-мРНК 490  
 Препараты антигистаминные 444  
 – антипсихотические 641  
 – гипотензивные 641  
 – ингибиторы МАО 641  
 – лекарственные 147, 167, 168, 262, 279, 281, 283, 287, 314, 446, 464, 495, 540, 607, 635  
 -- транспорт 407, 408  
 – сульфаниламидные 229, 241, 247  
 -- ацетилирование 560  
 – ферментные 607  
 Препроглюкагон 271  
 Препроинсулин 268  
 Препропаратормоны 263  
 Пре-рРНК 494  
 Принцип комплементарности 71, 96, 108  
 Проакселерин 601 (см. также Факторы свертывания крови)  
 Проба гиппуровая см. Проба Квика-Пытеля  
 – Квика-Пытеля 560, 620  
 Провитамины 212, 213  
 Прогастрин 289  
 Прогестерон 280, 281  
 Прогестины 280  
 Проглюкагон 271  
 Проекция Фишера 193  
 Проинсулин 268  
 Прокариоты 107, 480, 513, 525  
 – мембраны 298, 299  
 – регуляция транскрипции 538  
 – рибосомы 512-514  
 – синтез N-формилметионил-тРНК 524, 525  
 Пролактин 260  
 Проламины 73  
 Пролин 73, 463, 521  
 Пропилаза 366  
 Промотор 489, 493, 535  
 Проопиокортин 262  
 Пропаратгормон 263  
 Пропионил-КоА 378  
 Пропионил-КоА-карбоксилаза 378  
 Простагландины 283, 389-391, 614  
 – вторичные 390, 391  
 – первичные 285, 286, 390  
 – эндоперекиси 285  
 Простагландинсинтаза см. Циклооксигеназа  
 Простаноиды 389  
 Простагциклины 284-286, 389, 391  
 Протамины 73  
 Протеиназы 51, 153, 420  
 Протеинкиназа(ы) 90, 154, 270, 290, 291, 292, 317, 318, 371  
 – А 292, 295, 297  
 – С 296  
 – Са<sup>2+</sup>/кальмодулинзависимые 296  
 – G 295  
 – цАМФ-зависимые 326  
 Протеинурия 622  
 Протеинфосфатаза 90, 154  
 Протеины 19 (см. также Белки)  
 Протеогликаны 91, 187, 665, 669, 670  
 Протеолиз ограниченный 261, 423, 532  
 – постсинтетический 271, 532  
 Протеолипиды 629  
 Протомер 68  
 Протопорфирины 79, 505  
 Протромбин 37, 217, 532, 533, 600, 601, 603 (см. также Факторы свертывания крови)  
 Процессинг 490, 531  
 – мРНК 490, 491  
 – тРНК 493, 494  
 Процесс(ы) амфиболические 155, 156  
 – светоощущения 210, 211  
 Псевдоуридин 518  
 Псевдохолинэстераза 639  
 Пуромидин 434, 540, 541
- Рак** молочной железы 283  
 Расстройства алиментарные 648  
 Рахит 214, 678  
 Рационы искусственные 465  
 Реакция(и) химическая(ие) 117, 122, 144, 139, 224, 229, 468  
 -- гидроксила полуацетального 174-176  
 -- образования пептидов 50  
 --- полуацеталей 173  
 -- окислительно-восстановительные 239, 240  
 -- омыления 194, 200  
 -- порядок нулевой 157  
 -- продукт 144, 155  
 -- сопряженные 164  
 -- тиолазная 375, 398  
 -- углеводов 176, 177  
 – цветные 41  
 -- биуретовая 51  
 -- нингидриновая 41, 42  
 Ревертаза см. Транскриптаза обратная  
 Ревматизм 574  
 Регуляция аллостерическая 155, 156  
 -- макроэргами 156  
 -- ретроингибирование 155  
 -- синтеза нуклеиновых кислот 474, 475  
 -- ферментов 152, 153  
 -- эффекторы 449  
 – взаимосвязи метаболических путей 550  
 – дифференцировки клеток 540  
 – кальцием 293  
 – ковалентная 292  
 – метаболизма углеводов 357-359  
 – обмена липидов 403, 404  
 – по принципу обратной связи 272

- согласованное ингибирование 446
- уровня глюкозы в крови 322, 327, 359, 360, 552
- факторы специфические 538
- Рекombинация 478
- Ренатурация 47, 125
- Ренин 75, 612, 613
- Ренин 420, 424
- гер-белок *см.* Хеликаза
- Репарация 478, 480, 486
- Репликация 511, 530
  - вилка 479, 482, 486
  - копирование 478, 479, 480, 484, 485
    - на матрице РНК 486, 487
  - механизм полуконсервативный 482, 483
- Реплисома 479
- Репрессоры 538
- Ресинтез диацилглицеридов 369
  - триацилглицеридов 368, 369
  - фосфолипидов 369, 370
- Рестриктазы 496, 499, 544
- Ретинены 209
- Рецепторы аденогипофизарные 255
  - адренергические 274, 290, 637, 640, 641
  - гормонов 250, 289, 290, 292
  - инсулина внутриклеточные 271
    - специфические 270
  - мембранные 303, 316
  - морфина 643
  - мускариновые 639
  - АКТГ 259
- Рибитол 223
- Рибоза 86, 98, 102, 169, 470, 474, 475
- Рибозимы 118, 493
- Рибозо-1-фосфат 500
- D-рибозо-5-фосфат 355, 359, 471, 472
- Рибонуклеазы 51, 58, 119, 499
- Рибонуклеозиддифосфатредуктаза 476
- Рибонуклеотид(ы) 472-475
  - кислоты 5-аминоимидазол-4-карбоновой 471, 472
    - никотиновой 458, 459
- Рибосомы 100, 256, 513-515, 523, 526, 529, 530
  - самосборка 88
  - формилирование 494
- Рибофлавин 221, 247 (*см. также* Витамин В<sub>2</sub>)
- D-рибулозо-5-фосфат 355
- Рилизинг-факторы 250, 255 (*см. также* Факторы терминации)
- Рифамицин 541
- РНК 97, 478
  - биосинтез 487, 498
  - вирусная 495, 542
  - информационная 519
  - как субстрат 493
  - матричная 100, 487, 489-493, 512, 513, 519
    - биогенез 489
    - зрелая 490
  - рибосомная 100, 107, 487, 514
  - синтез 489, 494
  - транскрипт первичный *см.* РНК ядерная гетерогенная
  - транспортная 106, 122, 487, 490, 491, 513, 515, 516-518, 522, 524
    - биогенез 493
    - связанная с метионином 524
      - формилметионином 524
    - синтез 489, 490
    - структура вторичная 110
      - третичная 113
  - ядерная гетерогенная 490
    - малая 492
- РНКаза 487, 499
- РНК-полимераза 58, 479, 483, 486, 490 (*см. также* Праймаза с РНК-полимеразной активностью)
  - I 489
  - II 489
  - III 489
    - ДНК-зависимая 488, 494
    - E.coli 489
    - РНК-зависимая 495
    - РНК-матрица 488
- РНК-праймеры 495
- РНК-репликаза *см.* РНК-полимераза РНК-зависимая
- Родопсин 211
- Рост опухолевый 489
- РQQ *см.* Пирролохинолинохинон
- РQQ-дегидрогеназы 244
- Сайты** 110, 481, 489, 491, 538, 539
- Сало 194
- Самосплайсинг 118, 493
- САР-белок *см.* Белок генактивирующий катаболический
- САР-цАМФ 538
- Сахараза 320
- Сахар инвертированный 320
- Сахароза 169, 180, 320
- Сахароспирты 177
- Связь гликозидная 92, 179, 181, 184, 185, 320, 323, 324
  - N-гликозидная 92, 102
  - O-гликозидная 91
  - ионная 88, 96
  - ковалентная 51, 120, 132, 150
    - дисульфидная 254, 265, 268, 453
  - координационная 132
  - α-метиновая 506
  - нековалентная 51, 52, 60, 88, 89, 120, 127
    - водородная 51, 61, 62, 108, 132
  - пептидная 34, 51, 236, 425, 527
  - фосфоангидридная 103

- фосфодиэфирная 105, 481, 488, 493
- Седогептулозо-7-фосфат **356**, 357
- Секвенатор 54
- Секретин 249, 269, 289, 423
- Селезенка 22, 95, 198
- Селен 220
- Серин 90, 124, 194, 196, 227, 246, 290, 396, 397, 452-454, 456, 477, 669
- Сериндегидратаза 434, 453
- Серин-оксиметилтрансфераза 452, 477
- Серотонин **442**, 443, 640-642
- дезаминирование окислительное 458
- Сефадекс 30
- Сила ионная 26
- Силансеры 493 (*см. также* Промоторы)
- Симптом Вернике 221
- Синдром Абергальдена-Фанкони *см.* Цистиноз
- Вейса 221
- Синзимы 126
- Синтаза жирных кислот 383, 384
- Синтез белка 259, 276, 509, 523-530
  - в бесклеточной системе 511-513
  - митохондриях 531
  - матрица 519
  - регуляция 534
  - ферменты 535, 537
- белков плазмы крови 558
- пептидов 75
- внерибосомный 533, 534
- низкомолекулярных *см.* Синтез пептидов внерибосомный
- Синтетазы 161, 383
- Синэстрол **282**
- Система(ы) аденилатциклазная 258, 259, 262, 264, 269, 272, 274, 276, 281, 290, 403
- адреналовая 272
- актомиозиновая 656-658
- антифибринолитическая 606
- белоксинтезирующая 512, 513
- гуанилатциклазная 293
- ДНК-репликазная *см.* Реплисома
- крови буферные 586-589
- противосвертывающая 605, 606
- мультиферментные 129, 344, 347, 369, 383, 384, 459, 479
- нервная, возбуждение 635
- оксигеназная 277
- ренин–ангиотензин–альдостерон 76
- трикарбоксилаттранспортная 382
- трис-буферная 24
- ферментная глицинрасщепляющая 452
- фибринолитическая 606, 607
- цитохромная 433
- Ситостерин 298
- Сквален 398, 400, **401**, 402
- Скваленоксидоциклаза 401
- Склероз рассеянный 637
- Скорбут *см.* Цинга
- Скотофобин 256
- Сок желудочный 320, 420, 424
- Соматолиберин **254**
- Соматомедин 259
- Соматостатин **254**, 289, 292
- поджелудочной железы 267
- Соматотропин 259, 283, 412
- Сорбит 177
- Сорбитолдегидрогеназа 579
- Состояния витаминозависимые 206
- витаминорезистентные 206
- Спайк 637
- Спектр аминокислотный тканей 464
- Специфичность действия 114, 119, 122, 124, 142, 143, 418
  - абсолютная 142
  - относительная 142
  - стереохимическая 142, 143
- Спираль тройная 110
- Сплайнсинг 490, 491
- альтернативный 492
- Сплайнсома 492
- Стагины 252
- СТГ *см.* Соматотропин
- Стеарил-КоА 388
- Стереоизомеры 171, 201, 365
- Стеркобилин 508
- Стеркобилиноген 508 (*см. также* Уробилиноген мочи)
- Стероиды 200, 201, 275, 505
- биомембран 298
- Стрептодеказа 607
- Стрептокиназа 606
- Стрептомицин 542
- Структуры гексагональные 302
- надвторичные 63
- надмолекулярные 88
- стабильность 60, 61, 93
- Субстанция Ниссля 625
- Субстраты 22, 122, 129, 136, 144, 146, 156
- σ-Субъединица 489
- Субъединицы 68, 70, 71, 127, 147
- Сукцинат 149, 347, **348**, 504
- Сукцинатдегидрогеназа 149, 348, 349
- Сукцинат-КоQ-редуктаза 309 (*см. также* Цепь дыхательная)
- Сукцинил-КоА **347**, 378, 504
- Сукцинил-КоА-синтаза 347
- Сульфат 199, 427, 560
- протамина 606
- Сульфатиды 298
- Сульфит 454
- Супероксид-анион 314, 315
- Супероксиддисмутаза 314
- Суперспираль 111
- Сфингозин 194, 198, 199, 395, 397
- Сфинголипиды 298, 441
- Сфингомиелины 198, 395, 397
- биомембран 298
- мозга 636

- Талассемии** 83, 84  
 Таурин 315, 364, 365, **444**, 454  
 Таутомерия 51, 99, 173, 176  
 ТГФК *см.* Кислота тетрагидрофолиевая  
 Тела ацетоновые *см.* Тела кетоновые  
 – кетоновые 379–381, 405, 549  
 -- как источник энергии 380, 381  
 -- образование из аминокислот 440  
 Теория индуцированного соответствия 132, 133  
 – Михаэлиса 130  
 – Фишера 130  
 – Шмидта-Морвица 599  
 Термолабильность 140  
 Тестостерон **282**, 283  
 Тетрагидриобиптерин **443**, 456 (*см. также* Коферменты)  
 Тетрахименин 298  
 Тетрациклины 543  
 Тиамин *см.* Витамин В<sub>1</sub>  
 Тиаминпирофосфат 221, 222, 335, 344  
 Тиаминпирофосфокиназа 221  
 Тимин 476 (*см. также* Основания азотистые)  
 Тимидилатсинтетаза 476  
 Тимозин α<sub>1</sub> 288  
 Тимопоэтин-5 288  
 Тимопоэтин II 288  
 Тимостерин 288  
 Тимус 288  
 Тиолаза 381  
 Тиоредоксин 475, 476  
 Тиоредоксинредуктаза ФАД-содержащая 475  
 Тирозин 265, 273, 290, 456, 457, 465  
 Тирозиназа 457, 468  
 Тирозинкиназа 270  
 Тирозин-3-монооксигеназа 443  
 Тирозиноз 457  
 Тироксин 264, **265**, 584, 670  
 Тиролиберин **253**  
 L-тиронин 265  
 Тиротропин 260, 261, 265  
 Тироцидин 534  
 Ткань жировая 370, 371  
 -- метаболизм 371, 373  
 -- резервный жир *см.* Триацилглицериды  
 – костная 187, 263, 673, 674  
 – нервная 198, 199, 628–631  
 -- макроэрги 632, 634  
 -- метаболизм 632–634  
 -- передача нервного импульса 637–641  
 α-Токоферол 315 (*см. также* Витамин Е)  
 Токоферолы 219  
 Токсин(ы) 295 (*см. также* Яды)  
 – дифтерийный 154, 426, 542  
 – холерный 154  
 Топоизомеразы 480  
 Торможение психической деятельности 468  
 Трансальдолаза 356, 357  
 Трансамидиназа 455  
 Трансаминазы 435, 437–439  
 Трансаминирование 351, 411, 435–440  
 – ГАМК 462  
 – сочетанное 461, 462  
 Трансдезаминирование 437  
 Транскарбоксилрование 229  
 Транскетолаза 356  
 Транскеталамин 234  
 Транскриптаза обратная 496  
 Транскрипция 478, 480, 487, 511, 530  
 – факторы 489, 539  
 Транслоказы 304  
 Транслокация 527, 528  
 – протонов 312  
 Трансляция 111, 478, 487, 490, 511–513, 524–530 (*см. также* Синтез белка)  
 Трансметилирование 235, 246, 454  
 Транспегидрирование 527  
 Транспозиция 478  
 Транспорт кислорода 80  
 – углекислого газа 80  
 – через мембраны 303  
 --- активный 304, 321  
 --- кислот дикарбоновых 351  
 --- пассивный 304  
 – электронов 224, 226  
 Трансреаминирование 438  
 Трансферазы 160  
 Трансферрин 94, 95, 85, 503, 577, 578  
 Трансформилаза 525  
 Трансэтерификация 493  
 Треонин 40, 90, 227, 290, 452  
 Треонинальдолаза 452  
 Треониндегидратаза 434  
 Триацилглицеридсинтетаза 369  
 Триацилглицероллипаза 261, 371, 403  
 Триацилглицеролы 192, 193, 364, 366  
 Триглицериды, биосинтез 392–394  
 -- путь глицерофосфатный 394  
 --- дигидроксиацетонфосфатный 394  
 --- β-моноглицеридный 394  
 – гидролиз в жировой ткани 371  
 Трийодтиронин 264, **265**  
 Триозофосфатизомераза 330  
 Триозы 170  
 Триокиназа 336  
 Трипсин 140, 153, 420, 421, 422, 577  
 Трипсиноген 420  
 Триптамин **442**  
 Триптофан 225, 227, 289, 458, 459, 465, 468  
 – в синтезе рибонуклеотида никотиновой кислоты 458  
 --- серотонина 458  
 – недостаточность 465

- Триптофан-2,3-диоксигеназа 458  
Триптофансинтаза 128  
Тритон-100 24  
Трифосфатнуклеозиды 469, 473, 475  
Тромбин 603  
Тромбоксан(ы) 284, 285, 389, 391  
Тромбопластин тканевый 601 (см. также Факторы свертывания крови)  
Тромбоциты 585  
Тромбы 600  
Тропины 255  
Тропоколлаген 662, 663  
Тропомизин 650  
Тропонин 658, 660  
Тропозеластин 665  
D-тубокурарин 640 (см. также Яды)
- Убихинол** см. Коэнзим Q  
**Убихинон** см. Коэнзим Q  
Углеводы 90, 91, 169, 177, 178, 552-556  
– бисфосфаты 117, 178  
– классификация 170  
– конфигурация 171, 174  
– метаболизм 319  
– при гипоксии 362  
– связь с белковым обменом 412, 460  
– стереохимия 171
- УДФ** см. Уридиндифосфат  
**УДФ-галактоза** см. Уридиндифосфат-галактоза  
**УДФ-глюкоза** см. Уридиндифосфат-глюкоза  
**УДФ-глюкоза-пирофосфорилаза** 338  
**УДФ-глюкоза-4-эпимераза** 338  
**УДФ-глюкуронилтрансфераза** 508  
**УДФГ-пирофосфорилаза** 322  
Ультрафильтрация 32  
Ультрацентрифугирование 44, 45, 97, 158  
**УМФ** см. Уридинмонофосфат  
Уравнение Бригса-Холдейна 136  
– Гендерсона-Хассельбаха 586  
– Лайнуивера-Бэрка 138  
– Михаэлиса-Ментен 136, 138  
Хилла 139  
– Эди-Хофсти 151
- Урацил 470  
Уремия 616  
Уридиндифосфат 475  
Уридиндифосфатгалактоза 337, 338  
Уридиндифосфатглюкоза 332, 337, 338  
Уридинмонофосфат 474, 475  
Уридинтрифосфат 322, 323, 475, 488  
Уробилиноген см. Мезобилиноген  
– мочи 508, 562, 563  
Урокиназа 464  
**УТФ** см. Уридинтрифосфат  
УФ-лучи, действие 118, 202, 213, 223, 314
- Факт** ф 482, 483  
**ФАД** см. Флавадениндинуклеотид  
σ-Фактор см. σ-Субъединица  
ρ-Фактор 489  
**Фактор(ы)** белковые инициации 525  
– Касла внутрениий 234  
– пищевые незаменимые 205, 244, 408  
– терминации 529  
– элонгации трансляции 527  
– репликации 480  
– роста инсулиноподобные 272  
– --опухолевых клеток 461  
– свертывания крови 600-602  
– транскрипции типа J 489  
– тромбоцитов 602  
– эндотелиальный 295  
**Фарнезилирование** 533  
**Фарнезилпирофосфат** 401, 533  
**ФАФС** см. 3'-Фосфоаденозин-5'-фосфосульфат  
**Фенилаланин** 243, 456, 457, 465, 468, 519  
**Фенилаланин-4-монооксигеназа** 456  
**Фенилацетилглутамин** 468  
**Фенилкетонурия** 165, 456, 467, 620  
**Фенилпируват** 468  
**Фермент(ы)** 16, 19, 22, 93, 114, 116, 118, 119, 139, 144, 166-168, 289, 467, 616, 630  
– аллостерические 126, 156, 329, 339, 341, 347, 434, 447, 474, 475, 505  
– бифункциональные 342, 422  
– время синтеза и распада 156  
– гемсодержащие 458  
– гликогенветвящий 324, 474, 475  
– единицы активности 157  
– иммобилизованные 163, 164, 168, 607 (см. также Препараты ферментные)  
– индуцибельные 434  
– кинетика реакций 134  
– классификация 159, 160, 162  
– конститутивные 153  
– мембранные 303, 316  
– насыщение субстратом 135, 136  
– обратной транскриптазы 486, 487 (см. также Транскриптаза обратная; ДНК-полимераза с ревертазной активностью)  
– олигомерные 126  
– органоспецифичные 579, 580  
– пиридоксальные 436, 456, 477, 505  
– пищеварения 267  
– плазмы крови 579  
– рН-оптимум 141  
– простые 120  
– протеолитические 60, 418, 419, 423  
– репарующие ДНК 480  
– сложные 120  
– специфичность действия 515  
– --- субстратная 418, 422, 423, 442, 444  
– стереоспецифичность 348, 375, 380  
– формы множественные 71, 128, 148 (см. также Изоферменты)  
– число оборотов 158

- Ферритин 94, 315, 503, 505  
 Феррохелатаза 505  
 Фибрин 605  
 Фибриноген 600 (*см. также* Факторы свертывания крови)  
 Фибрин-пептиды 605  
 Фибронектин 578  
 Фитин 242  
 Флавинадениндинуклеотид 85, 224, 307, **308**, 309, 432, 446, 546  
 – как кофермент 344, 347-350, 375  
 Флавиномононуклеотид 85, 224, 307, **308**-310, 432  
 Флавопротеины 78, 85, 224, 350, 432, 433  
 ФМН *см.* Флавиномононуклеотид  
 Фокусирование изoeлектрическое *см.* Изотахофорез  
 Фолдинг 67, 533  
 Фоллитропин 253, 261, 281  
 Форма лактамная 99, 100  
 – лактимная 99  
 – молекул белковых 47  
 Формамидаза 459  
 Формилацетат **503**  
 N-формилглицинамидинрибонуклеотид 471, **472**  
 N-формилглицинамидрибонуклеотид 471  
 Формилирование 524, 525  
 Формилкинуренин **458**, 459  
 Формилкинурениназа *см.* Формамидаза  
 N-формилметионил-тРНК<sup>Met</sup> **525**  
 N<sup>10</sup>-формил-ТГФК 471, 472 (*см. также* Кислота тетрагидрофолевая)  
 Формулы Хеурса 174  
 Фосфатаза 326  
 – кислая 470, 579  
 – щелочная 470  
 Фосфатидат 185, 197, 369, **392**, 395, 397  
 Фосфатидат-фосфогидролаза 369, 393  
 Фосфатидилинозитол(ы) 196, 296, 369, 395, 636  
 – биомембран 298  
 – биосинтез 397  
 Фосфатидилсерин(ы) 196, 396, 397  
 – биомембран 298  
 Фосфатидилхолин(ы) 195, 197, 368, 369, 395, 636  
 – биомембран 298, 299  
 – биосинтез 396  
 Фосфатидилэтаноламин(ы) 195, 197, 369  
 – биомембран 298, 299  
 – биосинтез 395, 396  
 Фосфат кальция 673  
 – неорганический 19, 89, 90, 97, 102, 103, 192, 194, 195, 263, 264, 274, 470, 500  
 --регуляция концентрации 500  
 3'-Фосфоаденозин-5'-фосфосульфат 427, **428**, 560, 669  
 2-Фосфоглицерат 331, **332**  
 3-Фосфоглицерат **331**  
 Фосфоглицераткиназа 331  
 Фосс юглицериды 652  
 Фосс юглококиназа 322  
 Фосфоглюкомутаза 322, 326, 334  
 6-Фосфоглюконат 354, **355**  
 6-Фосфоглюконатдегидрогеназа декарбоксолирующая 355  
 6-Фосфоглюконо-δ-лактон 354, **355**  
 6-Фосфоглюконолактоназа 354, 355  
 Фосфодиэстераза 290, 296, 403, 404, 469  
 Фосфоенолпируват**332**, 338-340  
 Фосс юенолпируваткарбоксикиназа 272  
 Фосс юенолпируваткарбоксилаза 339, 360  
 Фосфолипаза(ы) А 284  
 – А, тканевая 397, 398  
 – А<sub>2</sub> 198, 368, 390, 397, 398  
 – В 398  
 – С 284, 397, 398  
 -- мембраносвязанная 296  
 – D 398  
 – липосом 407  
 Фосфолипиды **94**, 246, 284, 296, 297, 395  
 – биомембран 298, 390  
 – желчи 367, 368  
 – распад 397, 398  
 5-Фосфомевалонат **400**  
 Фосфопантотин 534  
 3-Фосфо-5-пирофосфомевалонат **400**  
 Фосфопротеины 89, 90, 630  
 Фосфор 23, 215, 584, 676, 677  
 β-5-Фосфорибозиламин 471, **472**  
 5-Фосфорибозил-1-пирофосфат 178, 471, **472**, 475, 477  
 Фосфорилаза(ы) *a* 70, 292, 293, 324, 325, 334 (*см. также* Гликогенфосфорилаза)  
 – *b* 292, 293, 324, 325, 334 (*см. также* Гликогенфосфорилаза)  
 Фосфорилирование 317, 324, 533  
 – окислительное 305, 311, 349, 350, 546 (*см. также* Цепь дыхательная)  
 – разобшители 313  
 – субстратное 305, 331, 332, 334, 347  
 Фосфорилирование-дефосфорилирование 90, 290, 371  
 Фосфотриозы 330  
 Фосфофруктокиназа 329, 333, 342, 358  
 6-Фосфофруктокиназа 335  
 Фосфофруктокиназа-1 553, 554, 555  
 Фосфофруктокиназа-2-фруктозо-2,6-бисфосфатаза 554, 555 (*см. также* Фермент бифункциональный фруктозо-2,6-бисфосфата)  
 Фосфохолин 396  
 Фосфоэтаноламин **395**  
 Фрагменты Оказакы 482, 483, 485, 486  
 Фрагменты белковые *Bacillus brevis* 534  
 ФРПФ *см.* 5-Фосфорибозил-1-пирофосфат  
 Фруктоза 169, 171, 184, 320, 335, 555

- фосфорилирование 335, 336
- Фруктозе-1-фосфат **336**, 555
- Фруктозо-6-фосфат **329**, 335, 340, 353
- Фруктозе-1,6-бисфосфат 177, **329**, 335, 336, 340, 353, 555
- Фруктозо-2,6-бисфосфат 554, 555
- β-Фруктозо-2,6-бисфосфат **342**, 343
- Фруктозе-1,6-бисфосфатаза 340, 342, 553
- Фруктозурия 336, 337, 623
- Фруктокиназа 555
- ФСГ *см.* Фоллитропин
- Фукоза 88, 91
- Фумараза 143, 348, 450
- Фумарат 149, **348**, 449, 450, 456, 457, 460
- Фумаратгидратаза *см.* Фумараза
- Фуранозы 173, 181
- Фториды 332
- Хеликаза** 480
- Хеморецепторы 605
- Хиломикроны 370, 404
- Химотрипсин 123, 421, 422
- Хитин 184, 185
- Хлор 275, 277, 319, 621, 622
- Хлорамфеникол 542
- Хлорофилл 78, 503
- Хлорпромазин *см.* Аминазин
- n*-Хлорфенилаланин 640
- ХМ *см.* Хиломикроны
- Холестенон 368
- Холестериды 202
- Холестерин *см.* Холестерол
- Холестерол **201**, 276, 281, 283, 401, 402
- биомембран 298
- биосинтез 398-403
- в мозге 636
- в составе желчных камней 508
- желчи 367, 368
- свободный 368, 406
- эндогенный 368
- эстерифицированный 368, 406
- Холестеролэстераза 368
- Холецистокинин 424
- Холин 194, 195, 198, 245, 246, 638, 639
- фосфорилирование 396
- Холинацетилаза 638, 642
- Холинацетилтрансфераза *см.* Холинацетилаза
- Холинкиназа 396
- Холинорецепторы 637
- Холинэстераза 124, 579, 639
- Холофермент 120
- Хондроитин-4-сульфат 666, **667**
- Хондроитин-6-сульфат 666, **667**
- Хроматин 87, 88
- Хроматография 27 (*см. также* Гель-хроматография)
  - адсорбционная 27
  - аффинная 29, 97
  - ионообменная 29
  - ВЭЖХ 29, 43
  - колоночная 27, 29, 30
  - распределительная 28
  - на бумаге 92, 98
- Хромопротеины 78, 469, 503 (*см. также* Белки сложные; Гемоглобин)
- Хромосома 86
- цАМФ** *см.* АМФ циклический
- Цвиттерион 37, 38
- цГМФ *см.* ГМФ циклический
- ПДФ-диглицерид *см.* Цитидиндифосфат диглицерид
- ЦДФ-холин *см.* Цитидиндифосфатхолин
- ЦДФ-этаноламин *см.* Цитидиндифосфат-этаноламин
- Целлюлоза 163, 185
- Центр активный 122, 123, 125, 142, 147
  - свободнорадикальное окисление 314
  - аллостерический 125
  - аминокатальный 527
  - пептидный 527
- Центрифугирование дифференциальное 158
- Цепь дыхательная 243, 309
  - участки сопряжения 312
  - энергосопрягающих мембран 305
- полипептидная *см.* Белок, структура первичная
- свертывание 68
- Церамид 199, 397
  - биомембран 298
- Цереброзиды 298, 300, 630
- Церулоплазмин 93, 467, 578, 584
- Цикл глиоксилатный 338
  - глюкозо-аланиновый 548
  - Кребса *см.* Цикл трикарбоновых кислот
  - мочевинообразования орнитинный Кребса 448-451
  - пентозофосфатный 353-359, 387, 470
  - трикарбоновых кислот 345-351, 353, 380, 546, 548
    - регуляция 358, 359
    - связь с орнитиновым циклом 548
    - участие в глюконеогенезе 338
- Циклогексимид 542
- Циклооксигеназа 284, 285
- Циклопентанпергидрофенантрен 200, 275
- Цинга 204, 238, 239, 671, 678
- Цинк 146, 288, 422, 487, 584, 652
- Циркуляция гепатоэнтальная 367
- Цирроз печени 559
- Цистатионаза 456
- Цистатионин **456**, 634
- Цистатионин-γ-лиаза 434
- Цистатионин-β-синтаза 456
- Цистатионинурия 227
- Цистеин 76, 89, 453, 456, 465

- Цистин **453**, 454  
 Цистиноз 466, 467  
 Цистинурия 426, 467  
 Цистрон **532**  
 Цитидиндифосфатдиглицерид **397**  
 Цитидиндифосфатхолин 396, 397  
 Цитидиндифосфатэтаноламин **396**  
 Цитидинмонофосфат 102  
 Цитидинтрифосфат 155, 395, 396, 397  
 – ингибитор аллостерический 475  
 – синтез 475  
 Цитозин 476  
 Цитоскелет 301  
 Цитохром *a*-цитохромоксидаза 309  
 Цитохром(ы) 79, 310 (*см. также* Цепь дыхательная)  
 – *b*<sub>3</sub> 313, 387  
 – P-450 139, 277, 281, 313  
 – эндоплазматического ретикулума 313  
 Цитохромоксидаза 310, 311, 312  
 Цитрат **346**, 382, 636, 674  
 – ингибитор аллостерический 329, 345  
 – стимулятор липогенеза 382  
 Цитрат-синтаза 346, 382  
 Цитруллин 449, **450**  
 Цитруллинемия 620  
 ЦМФ *см.* Цитидинмонофосфат  
 ЦТФ *см.* Цитидинтрифосфат
- Шапероны** 67  
 Шапочка 107  
 Шпильки 113
- ЭДТА** *см.* Этилендиаминтетраацетат  
 Эйкозаноиды 250, 389  
 Экзодезоксирибонуклеазы 499  
 Экзонуклеазы 498  
 Экзоны 490, 491  
 Экзопептидазы 54, 418, 422  
 Экстракция 188  
 Эластаза 422, 425  
 Эластин 664, 665, 669  
 Электролиты 269, 582-585  
 Электрофорез 30 (*см. также* Гель-электрофорез; Диск-электрофорез; Изоахофорез; Иммуноэлектрофорез)  
 – двухмерный 32  
 – зональный 30  
 – на бумаге 43, 74  
 Элонгаза 388  
 Элонгация репликации 479, 482, 486  
 – трансляции 527-529  
 Эмульгирование жира 364, 365  
 Эндоамилаза *см.* α-Амилаза  
 Эндокринология 248  
 Эндонуклеазы 491, 498  
 – рестриктазы 481  
 – специфические 167  
 Эндопептидазы 418, 425
- β-Эндорфин 256, **262**  
 Эндорфины 263, 643  
 Энкефалины 263, 643  
 Энергия активации 133  
 – источники 546, 547, 550  
 – в мозге 462  
 – в сердечной мышце 655, 656  
 Энзимодиагностика 166, 167  
 Энзимология 114, 115, 138, 158  
 – горизонты 117  
 – инженерная 163-165  
 – медицинская 116, 165  
 – препаративная 26  
 Энзимопатология 165  
 Энзимотерапия 167  
 Энхансеры 493 (*см. также* Промоторы)  
 Эпимераза 355  
 Примеры 177  
 Эпифиз 289  
 Эргостерин 202, 213, 214  
 Эритрозо-4-фосфат **356**, 357  
 Эритропозитин 614  
 Эритроциты 504, 506  
 Эстрадиол **280**, 281  
 Эстрогены **280**, 281, 412 (*см. также* Гормоны половые женские)  
 Эстрон **280**  
 Этанол **335**  
 Этаноламин 194, 195, **395**  
 Этаноламинкиназа 395  
 Этаноламинфосфат-цитидилтрансфераза 395  
 Этаноламинфосфотрансфераза 396  
 Этилендиаминтетраацетат 120  
 Эукариоты 86, 107, 295, 296, 298, 299, 513, 526, 538, 539  
 – рибосомы 512, 513, 514  
 – тРНК для метионина 524  
 Эффект Бора 84  
 – липотропный 242  
 – Пастера 353  
 – трофический 276  
 – цитотоксический 105  
 Эффекторы аллостерические 449, 536  
 – модификаторы 125, 147, 156
- Явление** компартментализации 157  
 Яд(ы) 147, 153, 361, 426-428, 559, 635, 639, 658  
 – кураре 639  
 – обезвреживание в печени 427, 559, 560

ISBN 5-225-02709-1



9 785225 027094