

## Биологическая химия. Биохимия полости рта

Библиография Биологическая химия. Биохимия полости рта [Электронный ресурс] : учебник / Т.П. Вавилова, А.Е. Медведев. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. - <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970436349.html>

Авторы Т.П. Вавилова, А.Е. Медведев

Издательство ГЭОТАР-Медиа

Год издания 2016

Прототип Электронное издание на основе: Биологическая химия. Биохимия полости рта : учебник / Т.П. Вавилова, А.Е. Медведев. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 560 с. : ил. - ISBN 978-5-9704-3634-9.

### Аннотация

Учебник подготовлен в соответствии с федеральным государственным образовательным стандартом третьего поколения. При его написании был использован многолетний опыт чтения лекционного курса по общей биохимии и биохимии тканей и жидкостей полости рта студентам Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова. Изложенный в учебнике материал отражает основные достижения в области биохимии, опубликованные в монографиях и периодической литературе последних лет как отечественных, так и зарубежных авторов. Книга позволяет получить необходимые представления о смежных разделах медицинских наук, в том числе и стоматологии, в которых успешно используются биохимические подходы и методы. Учебник предназначен студентам стоматологического и лечебного факультетов медицинских вузов, а также ординаторам и аспирантам.

Гриф Министерство образования и науки РФ

Рекомендовано ГБОУ ВПО "Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова" в качестве учебника для студентов учреждений высшего профессионального образования, обучающихся по специальностям 060102 "Стоматология" и 060101 "Лечебное дело"

## Оглавление

Биологическая химия. Биохимия полости рта .....	1
Аннотация .....	1
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	6
ПРЕДИСЛОВИЕ .....	9
ЧАСТЬ I. СТРУКТУРА БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ.....	11
ГЛАВА 1. СТРУКТУРА БЕЛКОВ .....	11
ОПРЕДЕЛЕНИЕ.....	12
КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АМИНОКИСЛОТ .....	15
УРОВНИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ .....	17
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ .....	39
ГЛАВА 2. СТРУКТУРА УГЛЕВОДОВ .....	57
ОПРЕДЕЛЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ УГЛЕВОДОВ .....	58
ГЛАВА 3. СТРУКТУРА ЛИПИДОВ.....	74
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПИДОВ .....	74
ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ.....	76
ГЛИЦЕРОЛИПИДЫ .....	80
ГЛИЦЕРОФОСФОЛИПИДЫ .....	81
СФИНГОЛИПИДЫ.....	84
СТЕРОИДНЫЕ ЛИПИДЫ.....	89
ПРЕНОЛЬНЫЕ ЛИПИДЫ.....	92
Убихиноны .....	94
ПОЛИПРЕНОЛЫ.....	96
ГЛИКОЛИПИДЫ И ПОЛИКЕТИДЫ .....	96
ГЛАВА 4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ .....	97
СТРОЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ .....	101
ОПРЕДЕЛЕНИЕ.....	107
КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ.....	110
КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ .....	112
СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ КАК БЕЛКОВ .....	114
СТРУКТУРА ФЕРМЕНТОВ.....	114
КИСЛОТНО-ОСНОВНОЙ И КОВАЛЕНТНЫЙ КАТАЛИЗ.....	116
КОФАКТОРЫ И КОФЕРМЕНТЫ.....	118
ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ.....	125
МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ .....	128

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ .....	129
ФЕРМЕНТЫ В МЕДИЦИНЕ.....	142
ГЛАВА 6. РИБОЗИМЫ И АБЗИМЫ .....	146
РИБОЗИМЫ .....	146
КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ АНТИТЕЛА (АБЗИМЫ) .....	148
ГЛАВА 8. ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ .....	149
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА.....	149
ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ ТРАНСПОРТЕРОВ.....	153
ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ПЕРЕНОС МАКРОМОЛЕКУЛ, НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ И ЧАСТИЦ .....	156
ПАРАКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ.....	160
ГЛАВА 9. ПРИНЦИПЫ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ И ТРАНСМЕМБРАННАЯ ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА.....	161
СТРУКТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ .....	162
РЕГУЛЯЦИЯ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ .....	167
МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ .....	170
ЯДЕРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЛИПОФИЛЬНЫХ ГОРМОНОВ .....	171
МЕХАНИЗМЫ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ СИГНАЛА ЧЕРЕЗ МЕМБРАННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ..	172
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ОПОСРЕДУЕМЫЕ ЦГМФ.....	175
СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ С УЧАСТИЕМ ДРУГИХ ВТОРИЧНЫХ ПОСРЕДНИКОВ.....	177
ПРОТЕИНКИНАЗЫ .....	178
ЛИГАНДЗАВИСИМЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ.....	180
ПУТИ ВЫКЛЮЧЕНИЯ РЕЦЕПТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ .....	181
ЧАСТЬ II. ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ.....	183
ГЛАВА 10. ПОНЯТИЕ О МЕТАБОЛИЗМЕ. ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ .....	183
ПРЕВРАЩЕНИЕ ПИРУВАТА В АЦЕТИЛ-КОА.....	184
ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ.....	185
АМФИБОЛИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ .....	188
РЕГУЛЯЦИЯ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ .....	189
ГЛАВА 11. ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ МИТОХОНДРИЙ.....	190
МЕХАНИЗМ СИНТЕЗА АТФ В ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ.....	193
РАЗОБЩЕНИЕ ДЫХАНИЯ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ .....	195
ИНГИБИТОРЫ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ.....	197
ПАТОЛОГИИ ПРИ НАРУШЕНИИ ТРАНСПОРТА ЭЛЕКТРОНОВ ПО ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ.....	198
ГЛАВА 12. СВОБОДНОЕ ОКИСЛЕНИЕ. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА.....	200

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ, ИСПОЛЬЗУЮЩИХ КИСЛОРОД В КАЧЕСТВЕ АКЦЕПТОРА ЭЛЕКТРОНОВ .....	200
МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ .....	201
СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ .....	204
АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА .....	205
ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ .....	207
ЗАЩИТА ОТ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА.....	208
ЧАСТЬ III. ОСНОВНЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ. ....	212
ГЛАВА 13. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ .....	212
ПЕРЕВАРИВАНИЕ УГЛЕВОДОВ .....	212
ОБМЕН ГЛЮКОЗЫ В КЛЕТКАХ .....	218
ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ.....	227
ОБМЕН ДРУГИХ МОНОСАХАРИДОВ.....	241
ПЕРЕВАРИВАНИЕ ЛИПИДОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ .....	247
ТКАНЕВЫЙ ЛИПОЛИЗ.....	251
ПЕРЕВАРИВАНИЕ ЛИПИДОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ .....	252
РЕГУЛЯЦИЯ ТКАНЕВОГО ЛИПОЛИЗА .....	258
ОБМЕН ГЛИЦЕРОЛА .....	259
ОБМЕН ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ .....	269
СИНТЕЗ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛОВ .....	274
ОБМЕН ФОСФОЛИПИДОВ .....	275
ГЛАВА 15. КАТАБОЛИЗМ БЕЛКОВ.....	279
ХАРАКТЕРИСТИКА ПИЩЕВЫХ БЕЛКОВ.....	279
ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ .....	280
ГЛАВА 16. ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ .....	293
ТРАНСПОРТ АМИНОКИСЛОТ В КЛЕТКУ .....	293
МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ .....	295
ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ АММИАКА.....	302
БИОСИНТЕЗ МОЧЕВИНЫ.....	304
ПРЕВРАЩЕНИЕ УГЛЕРОДНОГО СКЕЛЕТА АМИНОКИСЛОТ.....	307
ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ .....	309
СИНТЕЗ ЗАМЕНИМЫХ АМИНОКИСЛОТ .....	312
ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ОТДЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ .....	313
ГЛАВА 17. ОБМЕН ГЕМОПРОТЕИНОВ .....	328
СТРУКТУРА ГЕМА.....	329

БИОСИНТЕЗ ГЕМОПРОТЕИНОВ .....	330
КАТАБОЛИЗМ ГЕМОПРОТЕИНОВ.....	333
БИЛИРУБИНЕМИИ .....	336
ОБМЕН ЖЕЛЕЗА.....	338
ГЛАВА 18. МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕОТИДОВ.....	340
БИОСИНТЕЗ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ .....	340
ЧАСТЬ IV. ХРАНЕНИЕ И РЕАЛИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ. ....	351
ГЛАВА 19. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ РЕПЛИКАЦИИ И РЕПАРАЦИИ ДНК У ЭУКАРИОТ .....	351
ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ РЕПЛИКАЦИИ ДНК У ЭУКАРИОТ .....	351
РАСПЛЕТЕНИЕ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК .....	353
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК ПОЛИМЕРАЗ ЭУКАРИОТ .....	355
ГЛАВА 20. ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНОВ ЭУКАРИОТ .....	364
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ .....	364
ГЛАВА 21. БИОСИНТЕЗ БЕЛКА.....	378
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОСИНТЕЗА БЕЛКА .....	378
ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ФАКТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА .....	378
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССА ТРАНСЛЯЦИИ .....	385
СИНТЕЗ БЕЛКА В МИТОХОНДРИЯХ.....	389
ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ И ТОКСИНОВ НА СИНТЕЗ БЕЛКА.....	389
ФЕРМЕНТЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ФОЛДИНГЕ БЕЛКА .....	389
ЧАСТЬ V. ЧАСТНАЯ БИОХИМИЯ. ....	391
ГЛАВА 22. МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ .....	391
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ.....	391
ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА .....	393
ПРОТЕОГЛИКАНЫ .....	408
ОБМЕН ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ.....	412
ГЛАВА 23. ХРЯЩЕВАЯ ТКАНЬ.....	413
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ .....	414
ГЛАВА 24. МИНЕРАЛИЗОВАННЫЕ ТКАНИ .....	419
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИНЕРАЛИЗОВАННЫХ ТКАНЕЙ .....	419
КОСТНАЯ ТКАНЬ.....	427
ЗУБНЫЕ ТКАНИ .....	432
РАЗВИТИЕ ЗУБНЫХ ТКАНЕЙ.....	433
ГЛАВА 25. БИОХИМИЯ КРОВИ.....	438

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ КРОВИ .....	438
КЛЕТОЧНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ КРОВИ.....	439
Тромбоциты.....	446
ПЛАЗМА КРОВИ.....	446
ГЛАВА 26. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЖИДКОСТИ.....	458
СМЕШАННАЯ СЛЮНА .....	459
ДЕСНЕВАЯ ЖИДКОСТЬ.....	478
СПИННОМОЗГОВАЯ ЖИДКОСТЬ.....	481

---

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

NO - оксид азота

pH опт - оптимальная величина pH

АДГ - алкогольдегидрогеназа

АДФ - аденозиндифосфат

АКТГ - адренкортикотропный гормон

АЛТ - аланинаминотрансфераза

АПБ - ацилпереносящий белок

АСТ - аспаратаминотрансфераза

АТФ - аденозинтрифосфат

АФК - активные формы кислорода

АФРТ - аденинфосфорибозилтрансфераза

ББП - белки, богатые пролином

БИФ - бифункциональный фермент

БТШ - белок теплового шока

ГАГ - гликозаминогликан

ГАМК -  $\gamma$ -аминомасляная кислота

ГДФ - гуанозиндифосфат

ГПО - глутатионпероксидаза

ГТФ - гуанозинтрифосфат

ДАГ - диацилглицерол

ДАГ-липаза - диацилглицероллипаза

ДАО - диаминооксидаза

ДГБП - 7,8-дигидробиоптерин

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ДОФА - 3,4-дигидроксифенилаланин

ИЛ - интерлейкины

ИМФ - инозинмонофосфат

ИФ<sub>3</sub> - инозитол-1,4,5-трисфосфат

ИЭТ - изоэлектрическая точка

КК - креатинкиназа

КФ - классификация ферментов

ЛДГ - лактатдегидрогеназа

ЛПВП - липопротеины высокой плотности

ЛПНП - липопротеины низкой плотности

ЛПОНП - липопротеины очень низкой плотности

ЛППП - липопротеины промежуточной плотности

ЛХАТ - лецитин-холестеролацилтрансфераза

МАГ - моноацилглицерол

МАГ-липаза - моноацилглицероллипаза

МАО - моноаминооксидаза

ММП - матриксные металлопротеиназы

мРНК - мессенджерная рибонуклеиновая кислота

мяРНК - малая ядерная рибонуклеиновая кислота

НвР - эмбриональный примитивный гемоглобин

НАД<sup>+</sup> - никотинамидадениндинуклеотид окисленный

НАДН - никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

НАДФ<sup>+</sup> - никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный

НАДФН - никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

ОМФ - оротидин-5'-монофосфат

ПААГ - полиакриламидный гель

ПДК - пируватдегидрогеназный комплекс

ПКА - протеинкиназа А (цАМФ-зависимая)

ПКС - протеинкиназа С (Са<sup>2+</sup>-зависимая)

ПКО - цГМФ-зависимая протеинкиназа

ПОЛ - перекисное окисление липидов

РНК - рибонуклеиновая кислота

СИР - субстраты инсулинового рецептора

СОД - супероксиддисмутаза

ТАГ - триацилглицерол

ТАГ-липаза - триацилглицероллипаза

ТГБП - 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин

ТИМП - тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ

ТОФА - триоксифенилаланин

тРНК - транспортная рибонуклеиновая кислота

тРНК<sup>Sec</sup> - селеноцистеиновая транспортная рибонуклеиновая кислота

ТТГ - тиреотропный гормон  
ТФР-β - трансформирующий фактор роста-β  
УДФ - уридиндифосфат  
УМФ - уридин-5'-монофосфат  
УТФ - уридинтрифосфат  
ФАД - флавинадениндинуклеотид окисленный  
ФАДН<sub>2</sub> - флавинадениндинуклеотид восстановленный  
ФАФС - 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат  
ФДТ - фотодинамическая терапия  
ФИФ - фосфатидилинозитол-4-фосфат  
ФИФ<sub>2</sub> - фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат  
ФМН - флавинмонопнуклеотид  
Фн - фосфат неорганический  
ФНО - фактор некроза опухоли  
ФРПФ - 5-фосфорибозил-1-пирофосфат  
ХМ - хиломикроны  
цАМФ - циклический аденозин-3',5'-монофосфат  
цГМФ - циклический гуанозин-3',5'-монофосфат  
ЦТК - цикл трикарбоновых кислот  
ЦТФ - цитидинтрифосфат  
ЭПР - эндоплазматический ретикулум  
ЭФР - эпидермальный фактор роста

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Современная биохимия - динамично развивающаяся область биомедицинских знаний. Ее изучение - неотъемлемый компонент подготовки

специалистов медицинского профиля. Это обусловлено тем, что биохимия все больше становится важной составной частью таких медико-биологических наук, как нормальная и патологическая физиология, фармакология, медицинская генетика, внутренние болезни, стоматологические науки и т.д.

Предлагаемый вниманию читателей учебник написан в соответствии с программами обучения студентов лечебного и стоматологического факультетов учреждений высшего медицинского образования. Материал представлен в 7 частях, каждая из которых разбита на главы. В учебнике последовательно рассмотрены структура биологических макромолекул, биологические катализаторы, молекулярная организация биомембран и трансмембранная передача сигнала, введение в обмен веществ и биологическое окисление, характеристика основных метаболических процессов в клетке, хранение и реализация генетической информации, а также вопросы частной биохимии.

В первой части учебника приведены основные характеристики аминокислот и белков с описанием современных методов их исследования. Описана структура других биологических молекул - углеводов, липидов и нуклеиновых кислот. Вторая часть учебника знакомит читателя с биологическими катализаторами. В ней содержится глава, посвященная таким биологическим катализаторам, как ферменты, рибозимы и абзимы (каталитически активные антитела). В третьей части учебника представлены материалы по строению биологических мембран, принципам межклеточной сигнализации и трансмембранной передачи регуляторных сигналов.

Введение в обмен веществ и биологическое окисление рассмотрены в четвертой части, где изложены современные представления о работе цикла трикарбоновых кислот, дыхательной цепи и других путях использования кислорода в клетке. Особое внимание в последней главе этой части уделено активным формам кислорода, окислительному стрессу и антиоксидантам различной природы, участвующих в предотвращении и прерывании реакций свободнорадикального окисления.

В главах пятой части последовательно приведены современные представления о метаболических превращениях углеводов, липидов, белков, аминокислот и нуклеотидов. Особенно важными для будущих врачей можно считать изложение вопросов по образованию метаболитов

полиненасыщенных жирных кислот - эйкозаноидов, а также по распаду белков и регуляции этих процессов.

Процессы хранения и реализации генетической информации (репликация, транскрипция и трансляция) изложены в трех главах шестой части учебника.

Заключительная часть учебника посвящена некоторым частным вопросам биохимии. Учитывая адресную направленность учебника (для студентов стоматологических вузов), в разделе «Частная биохимия» основное внимание уделено соединительной и минерализованной тканям, а также крови и другим биологическим жидкостям, которые широко используют в клинико-лабораторной диагностике независимо от медицинской специализации.

Учебник хорошо иллюстрирован, содержит много схем и таблиц. В связи со все возрастающей ролью биохимии в практике здравоохранения ряд важных (но часто выходящих за рамки вузовской программы) вопросов помещен в отдельную рубрику - «В записную книжку врача».

Хотя данный учебник предназначен для студентов-медиков стоматологического и лечебного факультетов, он может оказаться полезным и для студентов других медико-биологических специальностей, занимающихся изучением биохимии.

*Т.П. Вавилова, А.Е. Медведев*

## **ЧАСТЬ I. СТРУКТУРА БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ.**

### **ГЛАВА 1. СТРУКТУРА БЕЛКОВ**

Вопросы по теме

- Характеристика протеиногенных аминокислот.
- Структуры белковых молекул.

- Физико-химические свойства белков.
- Классификация белков.
- Краткая характеристика отдельных белков.
- Методы исследования белков.
- Функции белков.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ

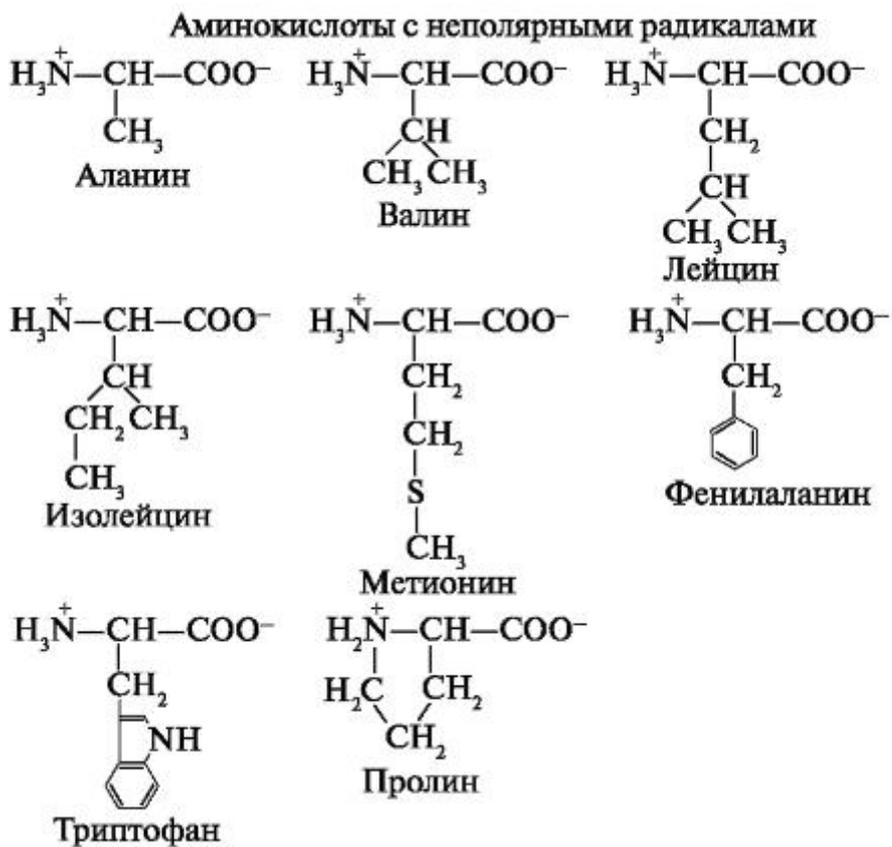
Белки - важнейший класс биологических макромолекул, которые играют ключевую роль в жизнедеятельности всех живых организмов. На их долю приходится не менее 50% сухой массы всех органических веществ клетки. Жизнь всех (и одно-, и многоклеточных) организмов определяется высококоординированной работой тысяч и тысяч белков, молекулы которых, взаимодействуя между собой и с другими органическими и неорганическими веществами, выполняют многочисленные функции в клетке. В медицине известно немало примеров, как изменение структуры и функции одного единственного белка в организме человека может вызвать фатальные последствия, предотвратить которые врачи до сих пор не могут.

*Белки* (синоним: протеины; от греч. *protos* - первый) - биополимеры, построенные из α-L-аминокислот, соединенных пептидными связями.

Точно такое же определение можно дать и пептидам: граница между белками и пептидами достаточно условна. Главное отличие между белками и пептидами в том, что белки могут формировать (самопроизвольно или с помощью особых помощников - шаперонов) и поддерживать определенную пространственную структуру. Такая стабилизация структуры обеспечивается сложной системой ковалентных и нековалентных связей и взаимодействий, которые возникают лишь при определенной длине полипептидной цепи.

Включенную в молекулу белка аминокислоту называют *аминокислотным остатком*, а порядок расположения аминокислотных остатков в белковой молекуле - *аминокислотной последовательностью*. Каждый индивидуальный белок характеризуется специфичной аминокислотной последовательностью.

В настоящее время в составе белков человека обнаружена 21 L-аминокислота, структура которых приведена на рис. 1-1, а в табл. 1-1 даны их трех- и однобуквенные обозначения. Их отличительная особенность в том, что каждая из этих аминокислот генетически закодирована одним или несколькими триплетами азотистых оснований - кодонами. Именно поэтому аминокислоты, кодируемые кодонами и входящие в состав белков, называют протеиногенными.



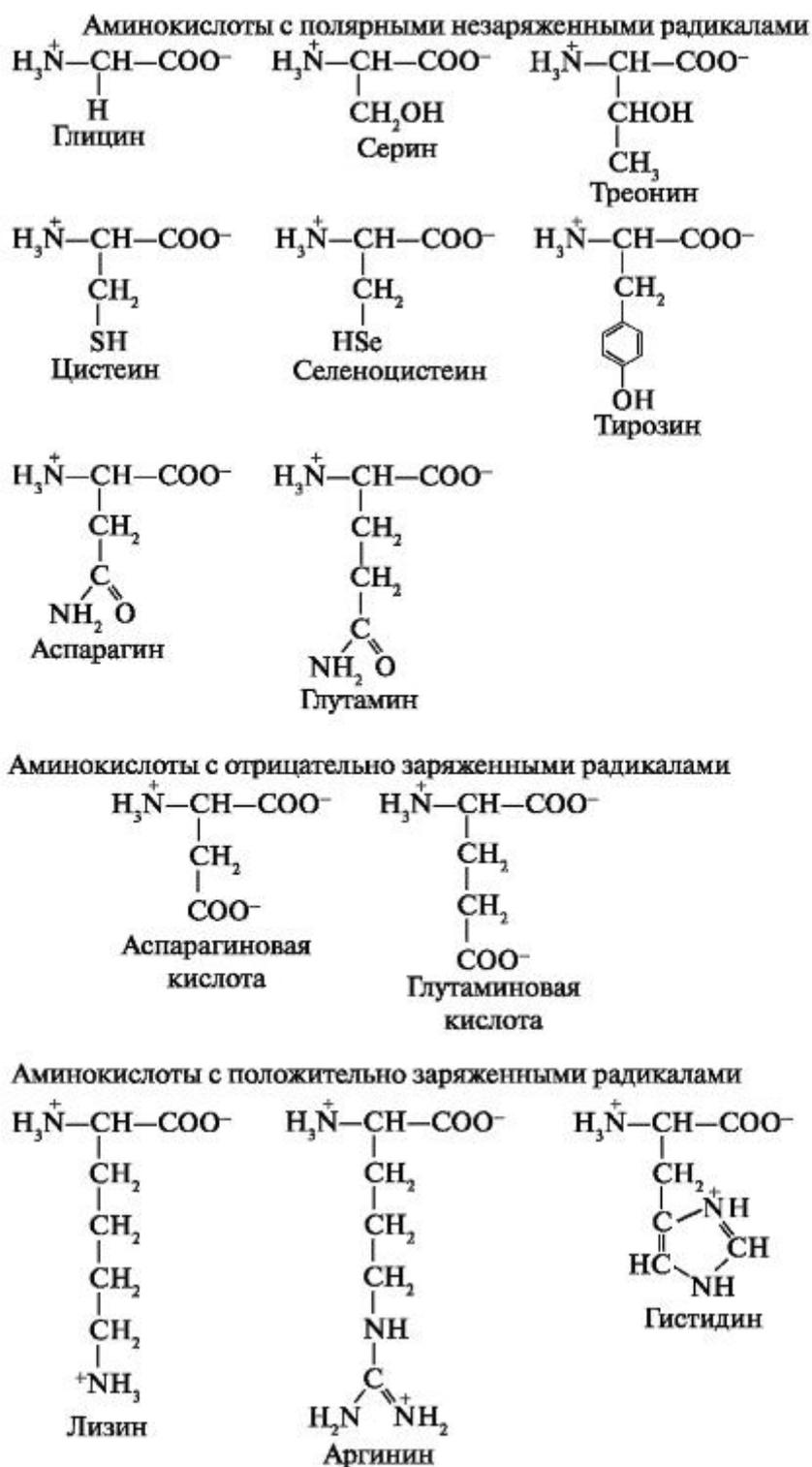


Рис. 1-1. Структура протеиногенных аминокислот

Таблица 1-1. Принятые трех- и однобуквенные обозначения аминокислот

Тривиальное название	Трехбуквенные обозначения		Однобуквенное обозначение
Аланин	Ала	<i>Ala</i>	A

Аргинин	Арг	<i>Arg</i>	R
Аспарагин	Асн	<i>Asn</i>	N
Аспарагиновая кислота	Асп	<i>Asp</i>	D
Валин	Вал	<i>Val</i>	V
Гистидин	Гис	<i>His</i>	H
Глицин	Гли	<i>Gly</i>	G
Глутамин	Глн	<i>Gln</i>	Q
Глутаминовая кислота	Глу	<i>Glu</i>	E
Изолейцин	Иле	<i>Ile</i>	I
Лейцин	Лей	<i>Leu</i>	L
Лизин	Лиз	<i>Lys</i>	K
Метионин	Мет	<i>Met</i>	M
Пролин	Про	<i>Pro</i>	P
Селеноцистеин*	Се-Цис*	<i>Sec</i>	U
Серин	Сер	<i>Ser</i>	S
Тирозин	Тир	<i>Tyr</i>	Y
Треонин	Тре	<i>Thr</i>	T
Триптофан	Три	<i>Trp</i>	W
Фенилаланин	Фен	<i>Phe</i>	F
Цистеин	Цис	<i>Cys</i>	C

\* В русскоязычной литературе трехбуквенного обозначения для селеноцистеина пока не придумали.

## КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АМИНОКИСЛОТ

Аминокислоты - производные карбоновых кислот, у которых один или несколько атомов водорода замещены аминогруппой. В состав белка входят α-аминокислоты, у которых аминогруппа находится у α-атома углерода (рис. 1-2).

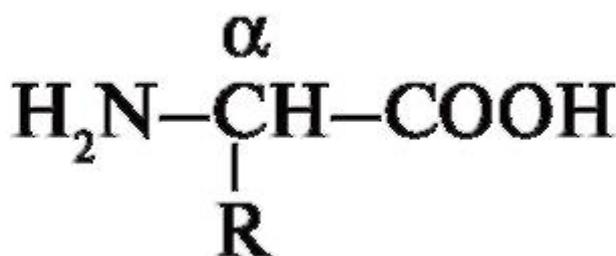


Рис. 1-2. Структура  $\alpha$ -аминокислот

Помимо белковых  $\alpha$ -аминокислот в организме обнаружены  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -аминокислоты, которые в состав белка не входят и выполняют в организме другие функции.

К числу небелковых  $\alpha$ -аминокислот относятся:

- ДОФА (диоксифенилаланин) - промежуточный продукт синтеза катехоламинов;
- орнитин - переносчик карбамоильной группы из матрикса митохондрий в цитозоль в процессе синтеза мочевины.

К числу  $\beta$ - и  $\gamma$ -аминокислот относятся:

- $\beta$ -аланин - компонент регуляторных дипептидов карнозина и ансерина, которые выполняют роль внутриклеточных буферов и участвуют в поддержании рН;
- $\gamma$ -аминомасляная кислота - главный тормозной медиатор головного мозга.

При физиологических значениях рН аминокислоты в водных растворах существуют в виде биполярных ионов, называемых цвиттер-ионами (рис. 1-3).

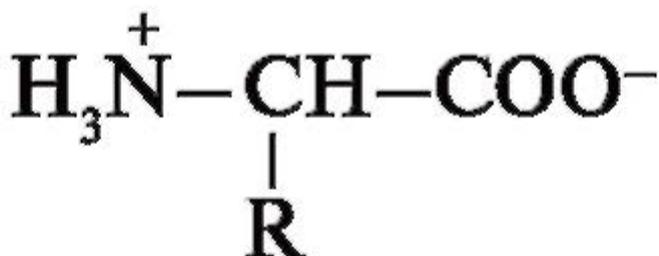


Рис. 1-3. Структура цвиттер-иона

На растворимость аминокислот влияет природа радикала: аминокислоты полярные и заряженные лучше растворимы в воде, чем содержащие в своем составе неполярные гидрофобные радикалы.

Заряд аминокислот зависит от рН раствора. Однако при определенном значении рН суммарный заряд каждой аминокислоты равен нулю, и в таком состоянии аминокислота неподвижна в электрическом поле. Значение рН, при котором суммарный заряд аминокислоты равен нулю,

называют изоэлектрической точкой. Изоэлектрическую точку обозначают символом  $pI$  или аббревиатурой ИЭТ. При любом значении  $pH$ , превышающем  $pI$ , аминокислота несет суммарный отрицательный заряд и в электрическом поле движется по направлению к аноду (положительно заряженному электроду). Если же  $pH$  оказывается ниже  $pI$ , аминокислота несет суммарный положительный заряд и движется по направлению к катоду (отрицательно заряженному электроду).

Суммарный заряд всех аминокислотных остатков, входящих в состав белка, и определяет суммарный заряд белка, в состав которого они входят.

## УРОВНИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ

Белки характеризуются несколькими уровнями структурной организации.

### Первичная структура

Первичная структура белка - последовательность аминокислотных остатков в молекуле белка, соединенных пептидными связями. Пептидные связи - это амидные связи, в образовании которых участвуют  $\alpha$ -карбоксильные и  $\alpha$ -аминогруппы соседних аминокислотных остатков (рис. 1-4).

Пептидная связь

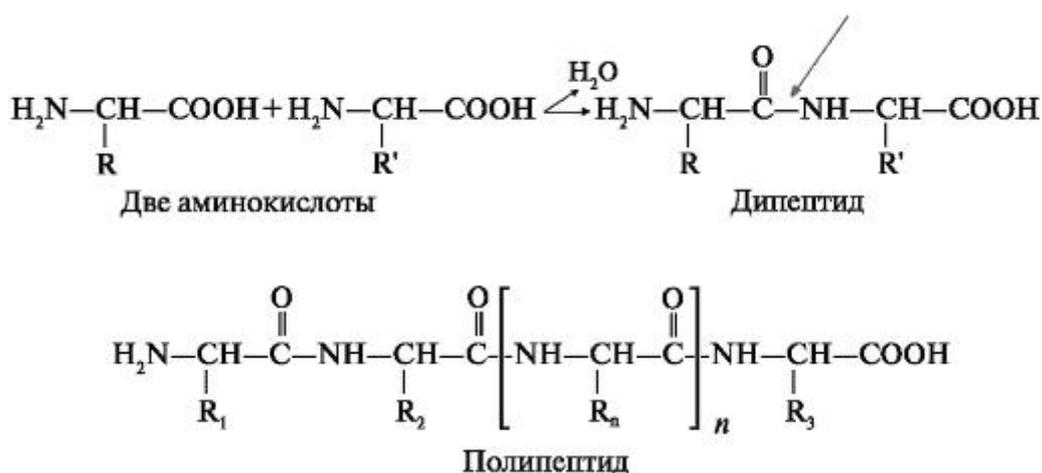


Рис. 1-4. Структура дипептида и полипептида

Пептидная связь очень прочная (так называемая полуторная связь), поэтому полный гидролиз белка до аминокислот в пробирке проводят только при очень жестких условиях кипячения в кислоте в течение 24-72 ч.

В отличие от остатков аминокислот, расположенных внутри полипептидной цепи, у концевых аминокислотных остатков молекулы белка в образовании полипептидных связей участвуют либо карбоксильная, либо аминогруппа. Другая группа остается свободной, поэтому в полипептидной цепи различают N- и C-концы, содержащие свободную амино- и карбоксильную группу, соответственно. Поскольку при биосинтезе белка в образовании первой пептидной связи участвует карбоксильная группа первой аминокислоты, нумерация аминокислотных остатков в полипептидной цепи идет от N- к C-концу.

Первичная структура уникальна для каждого белка. Информация о ней «записана» в структурных генах *дезоксирибонуклеиновой кислоты* (ДНК). Процесс установления первичной структуры белка получил название «секвенирование» (от англ. *sequence* - последовательность). Первоначально секвенирование проводили что называется вручную, осуществляя последовательный гидролиз пептидных связей исследуемого белка, и определяли концевые аминокислотные остатки с помощью различных химических реакций. Современные роботизированные приборы секвенаторы позволяют быстро установить аминокислотную последовательность, для чего необходимо не более 1 нг (0,000000001 г!) белка.

### Вторичная структура

Белковые молекулы содержат множество пептидных связей, поляризованные ( $-C=O^{\delta-}-NH^{\delta+}$  и  $-N-H^{\delta+}$ ) группы которых могут участвовать в образовании водородных связей с соответствующими ( $-N-H^{\delta+}$  и  $-C=O^{\delta-}$ ) группами той же или соседней полипептидной цепи. (Напомним, что символы « $\delta^+$ » и « $\delta^-$ » обозначают соответственно частичный положительный или отрицательный заряд на атоме.) Образование таких связей и формирует вторичную структуру белка.

Вторичной структурой называют регулярную, пространственно упорядоченную укладку полипептидной цепи молекулы белка или ее отдельных участков.

Существует два основных вида вторичной структуры белка:  $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -складчатый лист. Последний называют также  $\beta$ -структурой. Поскольку белки построены из L-аминокислот, энергетически более выгодной оказывается правовращающая спираль.

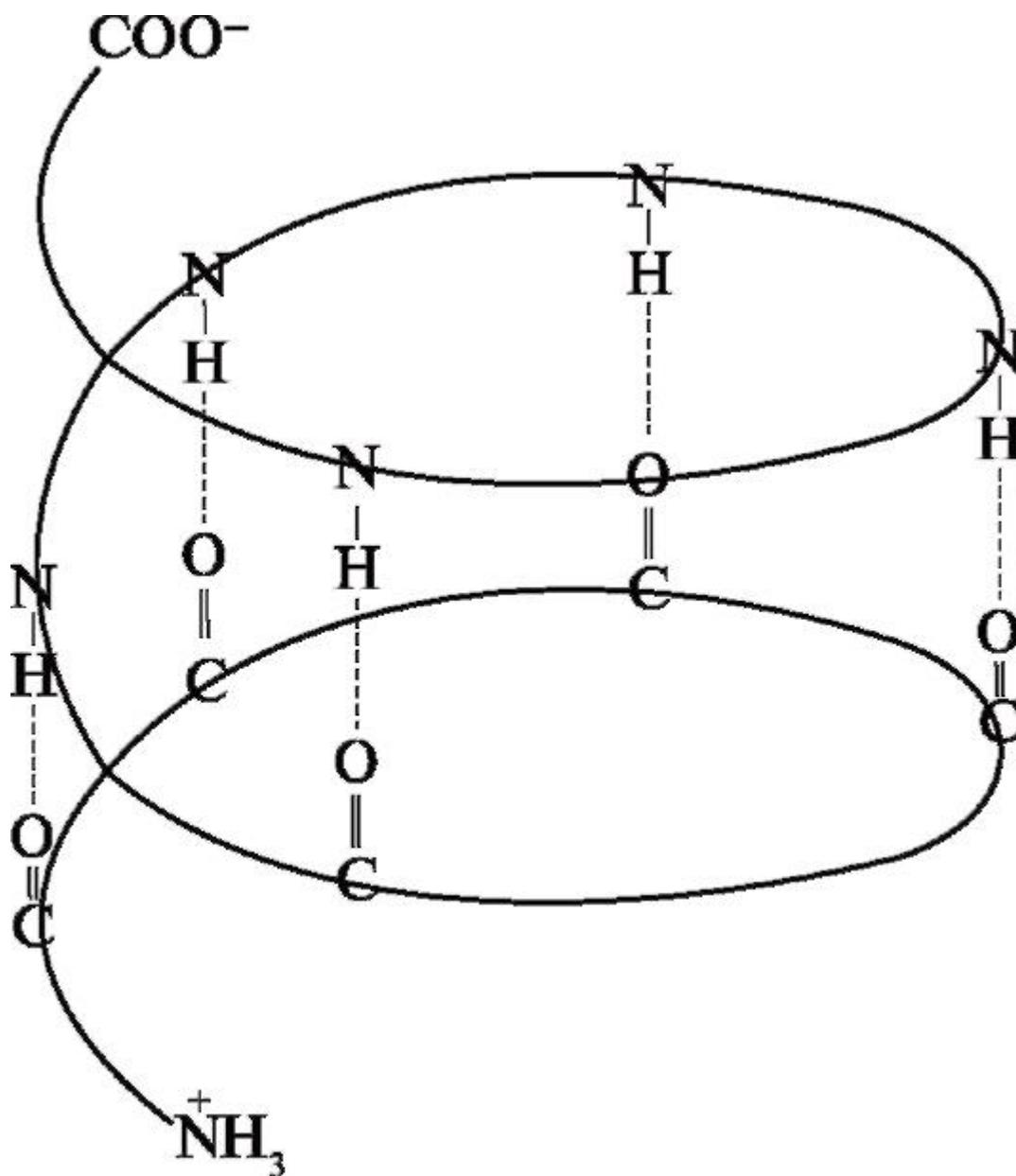


Рис. 1-5. Правовращающая  $\alpha$ -спираль

В  $\alpha$ -спирали (рис. 1-5) каждая NH-группа полипептидного остова образует водородную связь ( $-\text{C}=\text{O}^{\delta-} \cdots \text{H}^{\delta+}-\text{N}-$ ) с группой  $-\text{C}=\text{O}$  четвертого от нее аминокислотного остатка.  $\alpha$ -Спираль характеризуется следующими регулярными (т.е. повторяемыми у разных белков) параметрами:

- один виток спирали образуют 3,6 аминокислотных остатка;

- шаг спирали - расстояние между двумя соседними витками, которое составляет 0,54 нм;
- высота витка - 0,15 нм (см. рис. 1-5).

В образовании  $\beta$ -складчатого листа также участвуют водородные связи, образованные между  $-C=O$  и  $-N-H$  группами (рис. 1-6).  $\beta$ -Складчатый лист может образовываться как фрагментами одной соответствующим образом изогнутой полипептидной цепи, так и несколькими цепями, как это происходит в молекуле белка  $\beta$ -кератина.

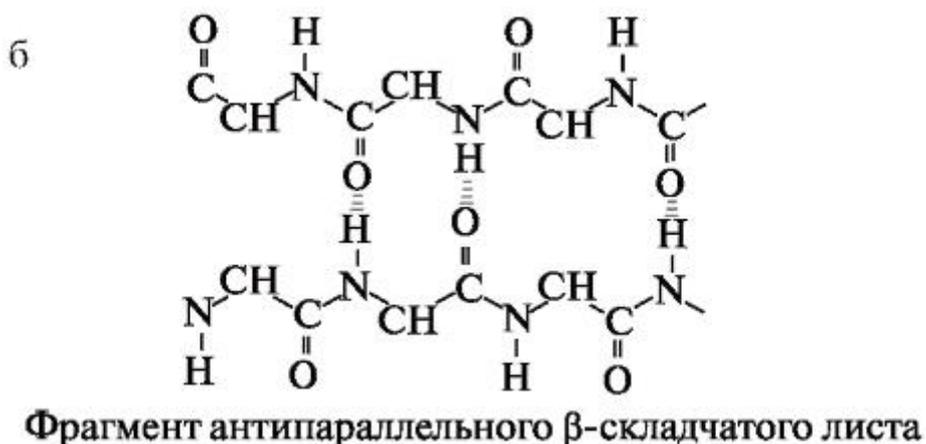


Рис. 1-6.  $\beta$ -Складчатый лист с расположением фрагментов полипептидной цепи: а - параллельным; б - антипараллельным

В тех случаях, когда направление полипептидных цепей одинаково, образуются параллельные  $\beta$ -структуры (см. рис. 1-6а), если же направление полипептидных цепей противоположно, образуются антипараллельные структуры (рис. 1-6б). В этом случае стабилизация структуры достигается уже не межцепочечными, а внутрицепочечными водородными связями.

Известны примеры белков, вторичная структура которых представлена только  $\alpha$ -спиралью (например,  $\alpha$ -кератин волос) или  $\beta$ -складчатым листом ( $\beta$ -кератин волос и фиброин шелка). Однако гораздо чаще в природе (в том числе и у человека) встречаются белки, содержащие оба этих вида вторичных структур. В молекуле инсулина, например, в формировании  $\alpha$ -спирали участвует 51% аминокислотных остатков, а  $\beta$ -структуры - 24%.

Итак, за образование вторичной структуры отвечают  $\text{C}=\text{O}$  и  $\text{-NH}$  группы пептидной связи. Однако необходимо отметить, что далеко не все аминокислотные остатки одинаково эффективно участвуют в формировании вторичной структуры. Аминокислота пролин, например, после образования пептидной связи не содержит  $\text{-NH}$ -группы и, следовательно, не может эффективно участвовать в формировании рассмотренных выше типов регулярных структур. Возникает так называемый пролиновый изгиб (рис. 1-7).

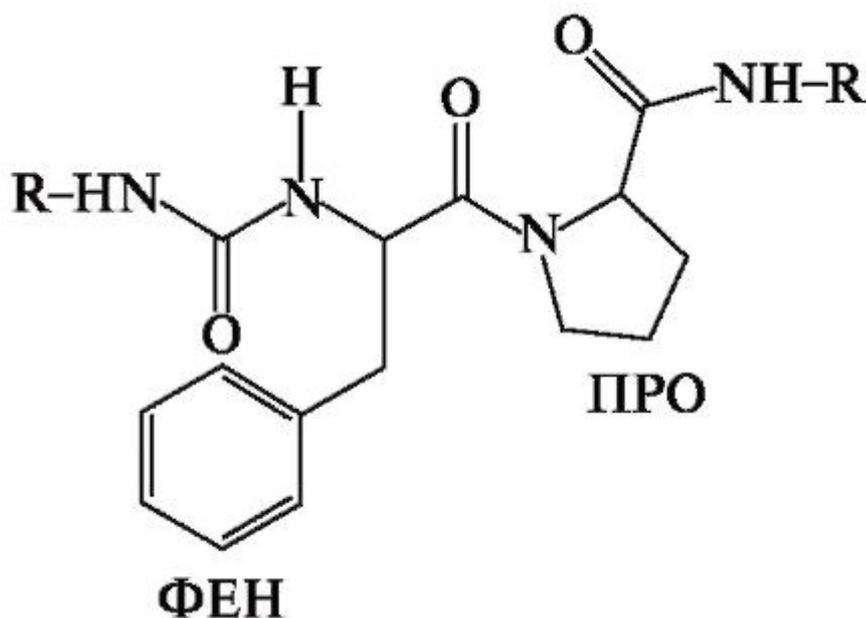


Рис. 1-7. Пролиновый изгиб

На стабильность вторичной структуры оказывают влияние и радикалы аминокислотных остатков. Так, у глицина роль радикала играет атом водорода, и его гораздо реже встречаются в  $\alpha$ -спиральных участках, чем аланин, глутамат или метионин.

Присутствие аминокислотных остатков, не способствующих формированию вторичной структуры, объясняет, что во многих глобулярных белках регулярные элементы вторичной структуры ( $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -складчатый лист)

представлены сравнительно короткими фрагментами полипептидной цепи, разделенными нерегулярными *соединительными петлями* (рис. 1-8). Этим термином обозначают фрагменты полипептидной цепи, которые нельзя отнести ни к  $\alpha$ -спирали, ни к  $\beta$ -складчатому листу. Они могут отличаться по числу аминокислотных остатков и их последовательности. Структура из четырех аминокислотных остатков, обеспечивающая поворот фрагмента полипептидной цепи на  $180^\circ$ , получила название  *$\beta$ -изгиб*, или  *$\beta$ -поворот*. Она стабилизируется одной водородной связью, и ее образованию мешают объемные радикалы аминокислот. Вот почему именно глицин и пролин чаще всего оказываются в области  $\beta$ -изгиба. Существование  $\beta$ -изгиба и соединительных петель позволяет уложить элементы вторичной структуры в компактную глобулу.

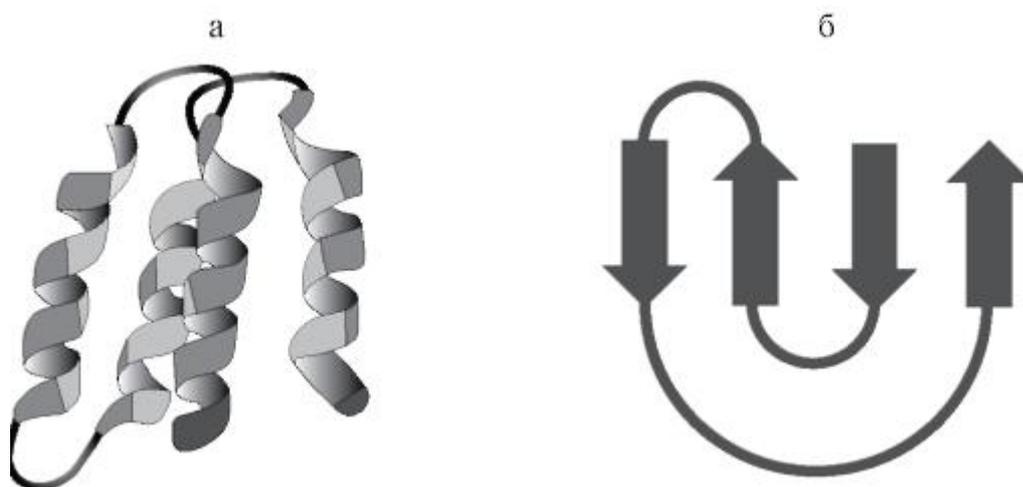


Рис. 1-8. Вторичная структура и соединительные петли, связывающие между собой отдельные ее элементы: а -  $\alpha$ -спираль; б - антипараллельный  $\beta$ -складчатый лист

Для схематического изображения видов вторичной структуры обычно используют следующие символы:

- $\alpha$ -спираль обычно представляют в виде свернутой в спираль ленты или цилиндром (с врисованными спиралями или без них);
- $\beta$ -структуру - разного рода стрелками.

В случае параллельных  $\beta$ -структур все стрелки ориентированы в одном направлении, а антипараллельных - в противоположном (см. рис. 1-8).

Надвторичная (супервторичная) структура

Следующий за вторичной структурой уровень организации белков получил название надвторичной (супервторичной) структуры. Так называют устойчивую комбинацию нескольких элементов вторичной структуры. В ее стабилизации уже участвуют боковые цепи аминокислотных остатков. Например, на рис. 1-9 схематически показана надвторичная структура  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ , стабилизацию которой обеспечивают гидрофобные аминокислотные остатки.

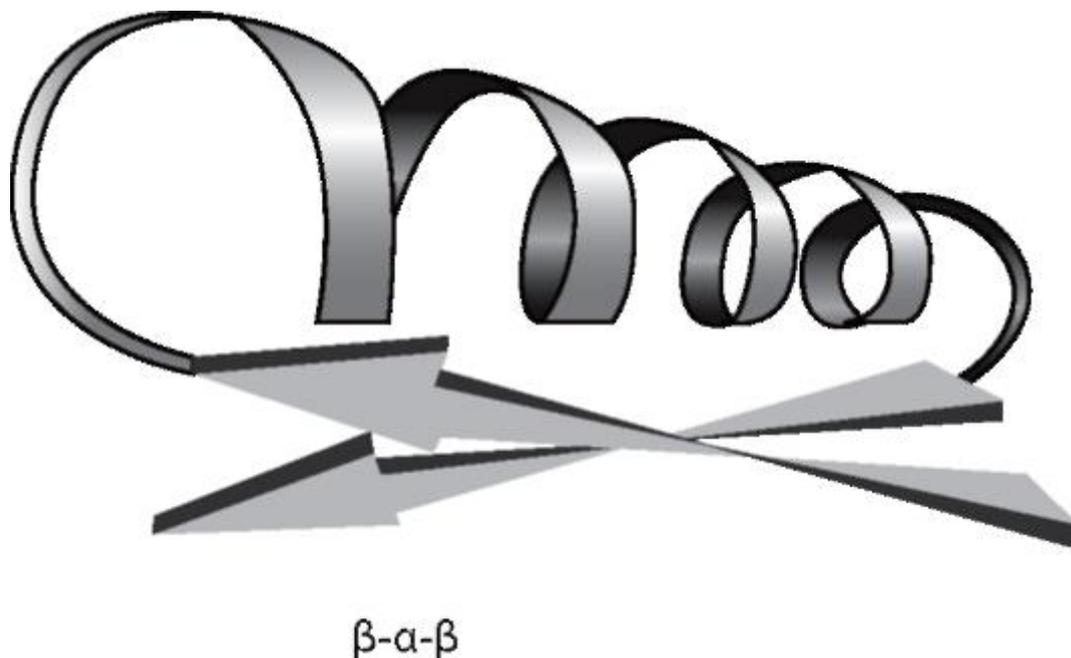


Рис. 1-9. Стабильный элемент надвторичной структуры  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$

Надвторичная структура представляет промежуточный этап на пути формирования третичной структуры всей молекулы белка. При этом элементы вторичной структуры, образованные соседними участками полипептидной цепи, сворачиваются определенным образом в пространстве.

Во многих случаях, особенно когда речь идет о белках, насчитывающих в своем составе 200 аминокислотных остатков и более, обнаруживают несколько самостоятельных компактных структур, которые объединены в составе одной полипептидной цепи с помощью соединительных петель. Такие структуры получили название доменов. Домен - фрагмент полипептидной цепи, которому свойственна определенная автономия структурной организации.

Зачастую домены могут формировать и поддерживать свою пространственную структуру независимо от других частей молекулы белка, и эта структура может существовать в автономном режиме, даже если ее

вырезать из полипептидной цепи данного белка. Во многих случаях домены выполняют определенные функции. Например, у НАД<sup>+</sup>-зависимых дегидрогеназ есть домен, связывающий кофермент НАД<sup>+</sup>, необходим для осуществления окислительно-восстановительных реакций.

### Третичная структура

Под третичной структурой понимают пространственное расположение всех атомов белковой молекулы.

Укладку, свойственную каждому белку, определяет вся сумма взаимодействий в белковой молекуле. Помимо уже рассмотренных типов связей, стабилизирующих первичную и вторичную структуры, устойчивость третичной обеспечивают взаимодействия радикалов аминокислотных остатков полипептидной цепи.

Схематически роль разных типов взаимодействий между боковыми цепями аминокислотных остатков, стабилизирующих третичную структуру белка, показана на рис. 1-10.

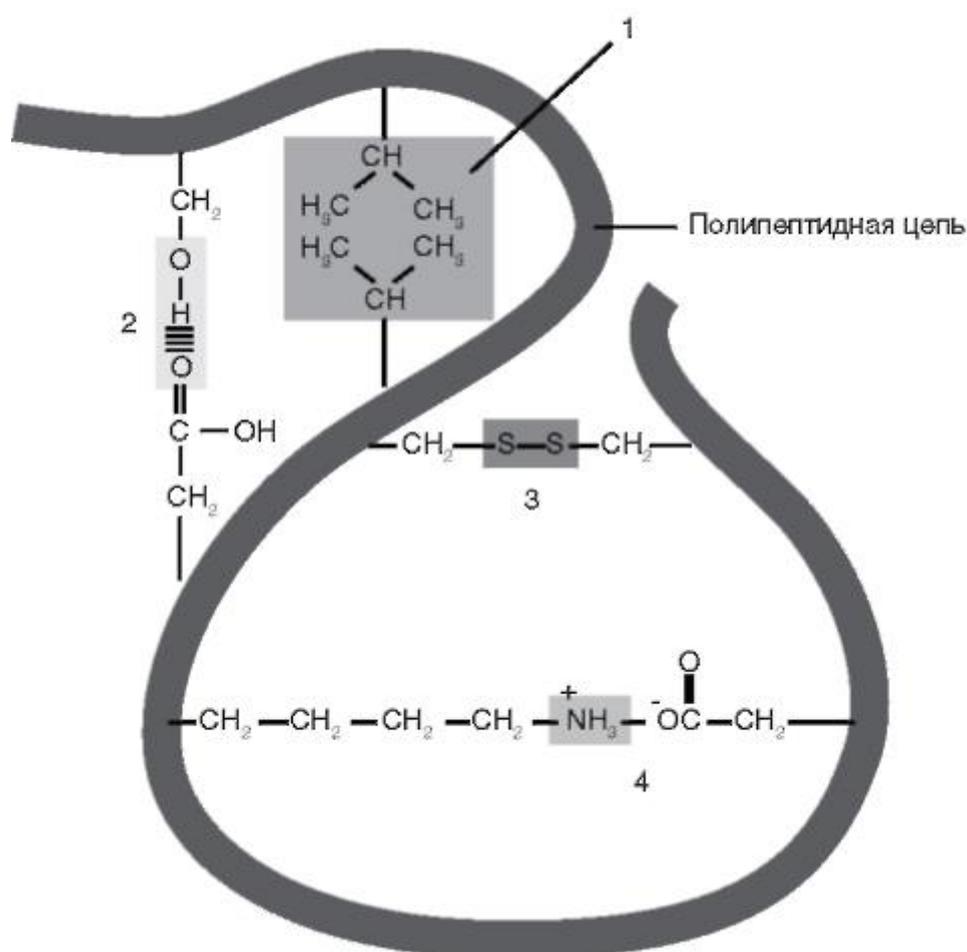


Рис. 1-10. Связи, стабилизирующие третичную структуру белка: 1 - гидрофобные взаимодействия; 2 - водородные связи; 3 - дисульфидные связи; 4 - ионные связи

Третичную структуру стабилизируют ковалентные *дисульфидные связи* (называемые также *дисульфидными мостиками*). Они образуются при взаимодействии дисульфидных групп (-SH) двух остатков цистеина. Даже нескольких дисульфидных связей оказывается достаточно для эффективной стабилизации третичной структуры белка. Например, в инсулине таких дисульфидных S-S-мостиков три, а в молекуле лизоцима - четыре. В то же время известно немало достаточно стабильных белков, в третичной структуре которых нет ни одной дисульфидной связи.

Стабильность третичной структуры белков придает вся совокупность нековалентных связей белковой молекулы. Существует несколько типов таких связей и взаимодействий, обеспечивающих стабильность третичной структуры:

- *водородные связи*, образованные между многочисленными полярными группами боковых цепей аминокислотных остатков;
- *ионные связи*, возникающие в результате электростатического притяжения между противоположно заряженными функциональными группами боковых цепей аминокислотных остатков;
- *гидрофобные взаимодействия*, возникающие между гидрофобными радикалами аминокислотных остатков и уменьшающие их соприкосновение с водой;
- *ван-дер-ваальсовы силы*, возникающие при тесном сближении атомов, когда их электронные оболочки почти соприкасаются.

При исследовании различных белков ученые обнаружили удивительный факт. Оказалось, что укладка (ее еще называют *фолдом*, а процесс сворачивания - *фолдингом*; от англ. *fold* - сгибание) третичной структуры может быть сходной у полипептидных цепей, имеющих различные аминокислотные последовательности. Это связано с тем, что фолдинг регулярных элементов вторичной структуры ( $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -структур) подчиняется определенным правилам, а различия в структуре и длине соединительных петель мало влияют на конечный фолд.

В зависимости от соотношения регулярных элементов вторичной структуры все типы пространственной структуры разделены на 4 основных класса:

- $\alpha$ -спиральные белки, преимущественно образованные из  $\alpha$ -спиралей;
- $\beta$ -складчатые белки, построенные в основном из  $\beta$ -складчатых листов;
- $\alpha/\beta$ -белки, укладка которых характеризуется чередованием  $\alpha$ -спиральных и  $\beta$ -складчатых структур;
- $(\alpha+\beta)$ -белки, в которых не происходит чередования элементов вторичных структур, а  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -листы сгруппированы таким образом, что в третичной структуре легко различаются чисто  $\alpha$ -спиральные и  $\beta$ -складчатые участки.

#### Четвертичная структура

Под четвертичной структурой понимают укладку взаимодействующих между собой субъединиц в функционально активном белковом комплексе.

Субъединицы (или протомеры) представляют собой отдельные полипептидные цепи белка, уложенные в третичную структуру. Белки, состоящие из нескольких субъединиц, называют *олигомерными*. В зависимости от числа субъединиц, входящих в состав такого белка, выделяют *димеры* (состоящие из двух субъединиц), *тримеры* (из трех субъединиц), *тетрамеры* (из четырех субъединиц) и т.д. Если четвертичная структура образована одинаковыми субъединицами, то к названию олигомерного белка добавляют приставку гомо-, а если белок состоит из нескольких типов субъединиц - гетеро-.

В отличие от других уровней организации белковых молекул, в которых участвуют все атомы аминокислотных остатков полипептидной цепи, в большинстве случаев в формировании четвертичной структуры участвуют лишь отдельные участки белковой глобулы, на долю которых приходится не более 6-30% всей площади поверхности мономера. Они и формируют *области межсубъединичных контактов*, которыми, как правило, и ограничивается взаимодействие субъединиц (рис. 1-11).

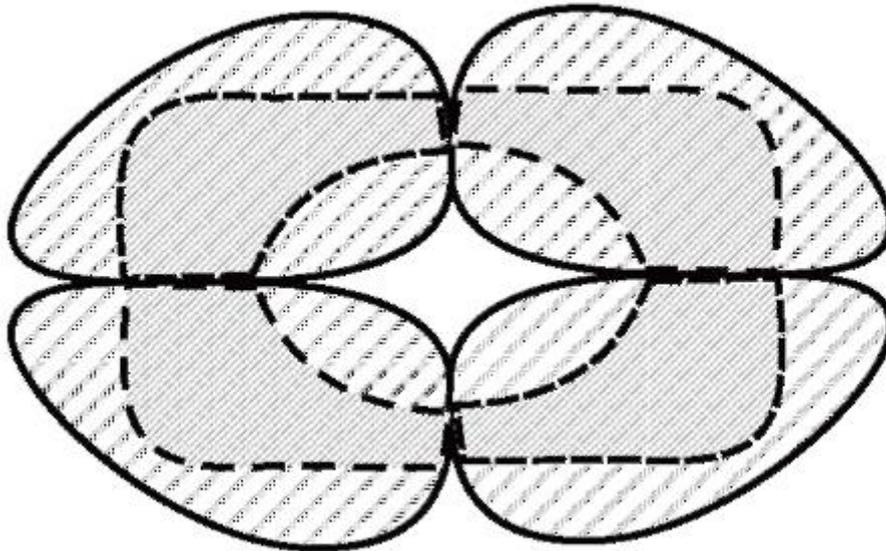


Рис. 1-11. Межсубъединичные контакты схематично показаны пунктиром на «разрезе» тетрамерного белка

Межсубъединичные контакты стабилизируют все те же связи и взаимодействия, которые стабилизируют третичную структуру белка. При этом третичная структура значительно прочнее четвертичной, и под действием различных факторов происходит нарушение межсубъединичных контактов с диссоциацией олигомера на мономеры без нарушения третичной структуры последних.

Несмотря на самостоятельность субъединиц в четвертичной структуре олигомерного белка, все они представляют «единую команду», выполняющую определенные функции.

- Интеграция нескольких взаимосвязанных функций в единой структуре. Например, синтаза жирных кислот представляет собой димер, каждой субъединице которого свойственны 7 различных функций (которые будут подробно рассмотрены в разделе, посвященном обмену липидов).
- Обеспечение множественности контактов. Эту функцию лучше всего иллюстрирует четвертичная структура антител, которые связывают антигены (так называют любую молекулу, способную вызвать иммунный ответ организма). Антитела, принадлежащие к иммуноглобулинам G, имеют Y-образную форму и состоят из 4 полипептидных цепей: двух легких L (от англ. *light* - легкий) и двух тяжелых H (от англ. *heavy* - тяжелый), соединенных дисульфидными связями (рис. 1-12).

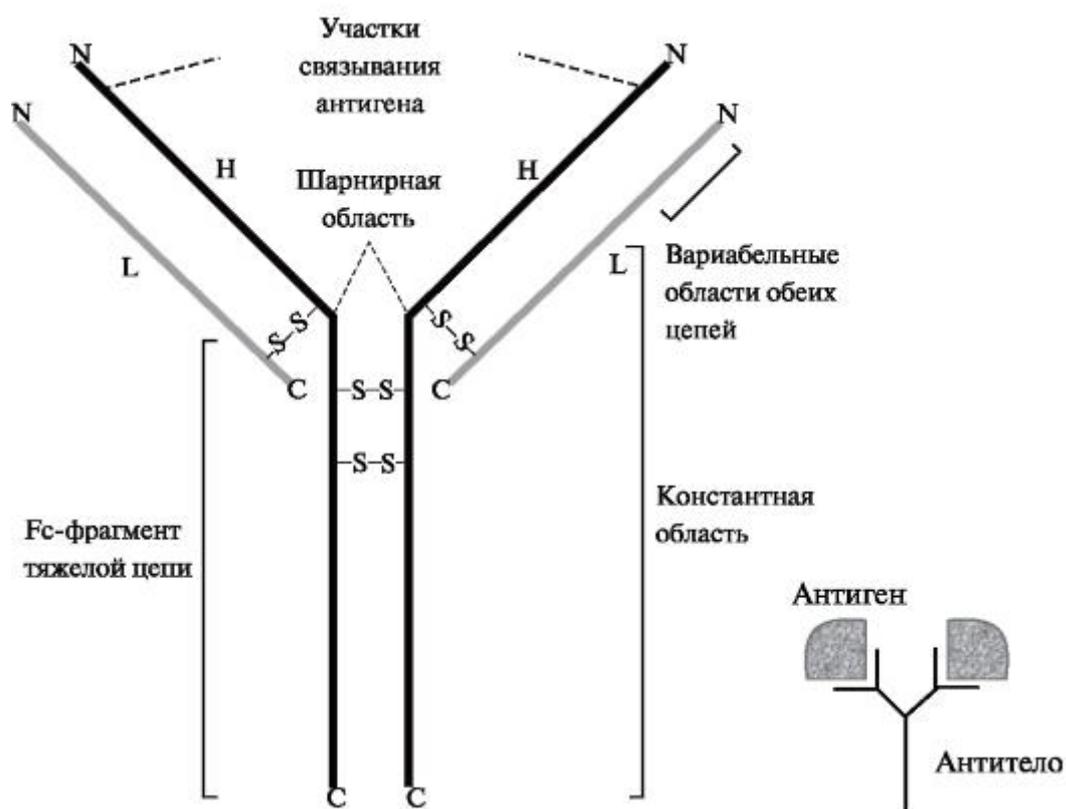


Рис. 1-12. Структура иммуноглобулина G

Поскольку на каждом конце луча формируется антигенсвязывающий центр, IgG имеет два одинаковых антигенсвязывающих центра. Это приводит к тому, что комплексы «антиген-антитело» характеризуются особой прочностью.

- Формирование метаболических и транспортных туннелей. В уже упоминаемой синтазе жирных кислот промежуточные продукты синтеза жирных кислот не высвобождаются во внутриклеточную среду, а передаются с одного участка молекулы на другой. Эффективность многостадийного процесса значительно возрастает.
- Регуляторная функция. Одним из классических примеров регуляторного взаимодействия субъединиц в олигомерном белке является гемоглобин. Этот тетрамерный белок состоит из двух  $\alpha$ -субъединиц и двух  $\beta$ -субъединиц, каждая из которых содержит небелковую часть - гем. Гемоглобин осуществляет транспорт кислорода из легких к тканям. При присоединении молекулы кислорода к одной из субъединиц этого тетрамера происходит изменение третичной структуры данной субъединицы. В свою очередь это вызывает целый ряд структурных перестроек в соседних субъединицах, которые приводят к изменению четвертичной структуры всей молекулы. В

результате присоединение последующих молекул кислорода к остальным субъединицам происходит намного эффективнее. Этот эффект получил название «положительная кооперативность». За счет кооперативного связывания кислорода субъединицами гемоглобина кривая насыщения этого белка кислородом приобретает сигмоидную форму (рис. 1-13).

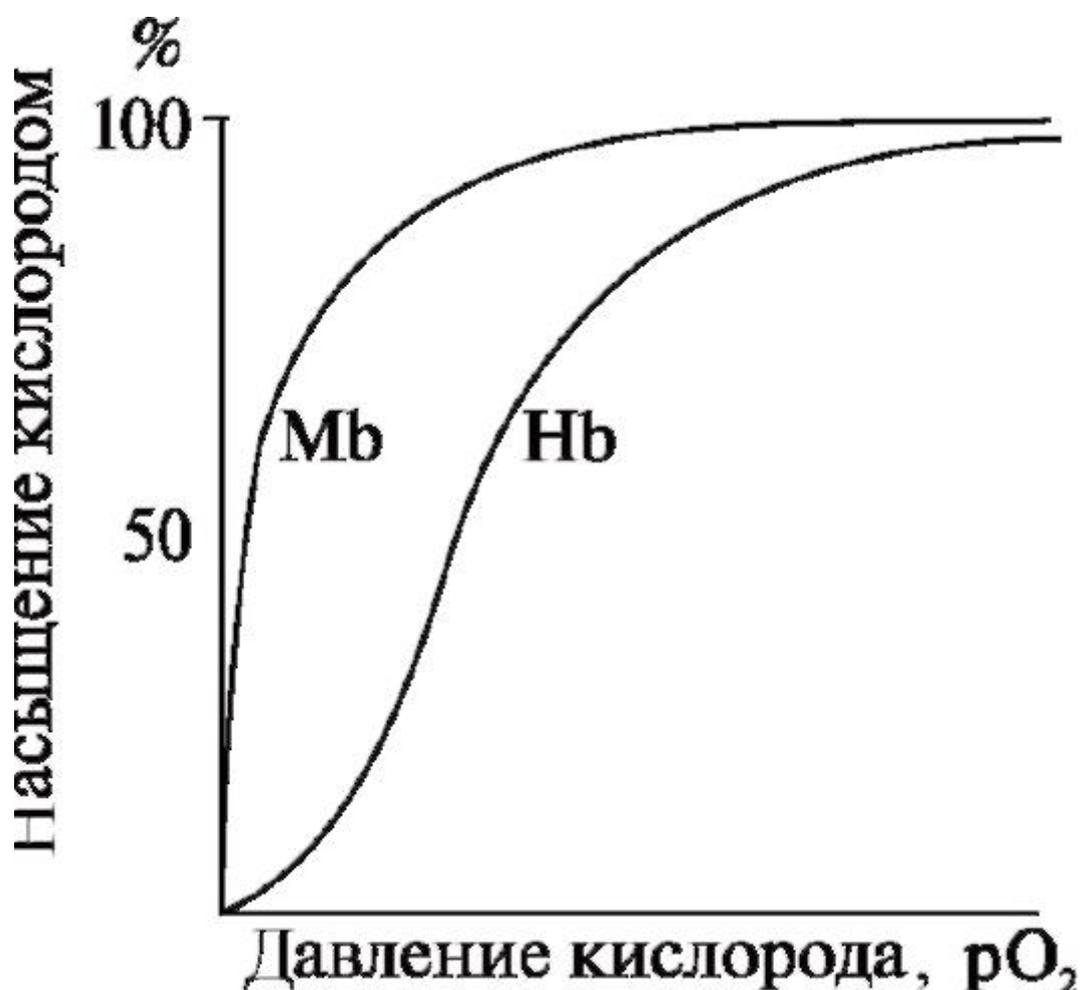


Рис. 1-13. Кривые насыщения гемоглобина и миоглобина кислородом. Mb - миоглобин; Hb - гемоглобин

Субъединицы гемоглобина имеют третичную структуру, очень схожую с миоглобином - кислородпереносящим белком мышц, который принимает кислород от гемоглобина и доставляет его к клеткам. Однако миоглобин лишен четвертичной структуры, и его функция заключается в хранении кислорода в мышцах. Процесс насыщения миоглобина кислородом описывается простой гиперболической кривой. Полное насыщение миоглобина происходит при очень низком парциальном давлении кислорода, свойственном тканям (см. рис. 1-13).

Таким образом, четвертичная структура гемоглобина позволяет регулировать присоединение и отсоединение кислорода. Это и обусловило разграничение полномочий между двумя кислородтранспортными белками: гемоглобин легче принимает кислород в легких и отдает его в капиллярах при понижении парциального давления, а миоглобин, благодаря высокой степени насыщения при низком парциальном давлении, обеспечивает хранение кислорода в мышечных клетках.

### Надмолекулярные комплексы

Четвертичная структура имеет ряд преимуществ, которые были рассмотрены в предыдущем разделе. Как оказалось, многие белки, в том числе и имеющие четвертичную структуру, образуют более сложные надмолекулярные комплексы, которые обеспечивают эффективное протекание самых разных процессов в клетке. К их числу относят, например, комплексы дыхательной цепи митохондрий, ответственные за преобразование энергии в клетке и синтез аденозинтрифосфата (АТФ) (см. главу 11).

Надмолекулярным комплексам также свойственна определенная стабильность структуры, которую обеспечивают все ранее рассмотренные связи и взаимодействия.

### Денатурация и ренатурация белка

Денатурация - нарушение третичной и вторичной структур белка, приводящее к утрате его биологических функций и физико-химических свойств. При этом не происходит нарушения первичной структуры белка.

Денатурацию белка вызывают различные физико-химические факторы, такие, как высокая температура, резкое изменение рН среды, органические растворители, соли тяжелых металлов, высокие концентрации ряда соединений (например, гуанидина хлорида или мочевины). Их часто называют *денатурирующими агентами*.

Денатурация - сложный процесс, который во многом определен свойствами денатурирующего агента. Общим является то, что в ходе денатурации происходит нарушение системы нековалентных взаимодействий, определяющих образование вторичной и третичной структур белка. Например, мочевина ( $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ), а также гуанидин гидрохлорид имитируют элементы пептидной связи и, конкурируя с последними,

вызывают нарушение системы водородных связей. В результате этого происходит разупорядочивание структуры белковой молекулы.

Органические растворители вызывают нарушение гидрофобных взаимодействий неполярных радикалов аминокислотных остатков, способствуя дестабилизации гидрофобного ядра. Кроме того, полярные группы спиртов вызывают нарушение водородных связей, участвующих в формировании третичной структуры.

*В записную книжку врача*

Использование денатурации белка в клинико-лабораторной диагностике

В лабораторной диагностике часто приходится делать анализы, проведению которых мешает присутствие белка. В таких случаях исследуемый объект (плазма крови, слюна) обрабатывают растворами различных денатурирующих агентов и после осаждения белка оставшийся безбелковый фильтрат используют для анализа. Таким образом, например, проводят депротеинизацию при определении содержания витаминов и противоопухолевых препаратов в крови, антибиотиков в слюне после орошения ротовой полости.

Ренатурация - процесс восстановления пространственной структуры белка и его биологической функции, наблюдаемый после прекращения действия и удаления денатурирующего агента.

При медленном удалении денатурирующего агента и реагентов, необходимых для поддержания сульфгидрильных групп в восстановленном состоянии (и препятствующих формированию -S-S-связей), могут произойти самопроизвольное сворачивание (*рефолдинг*) белковой молекулы, формирование нативной пространственной структуры и возникновение биологической активности, свойственной данному белку (рис. 1-14).

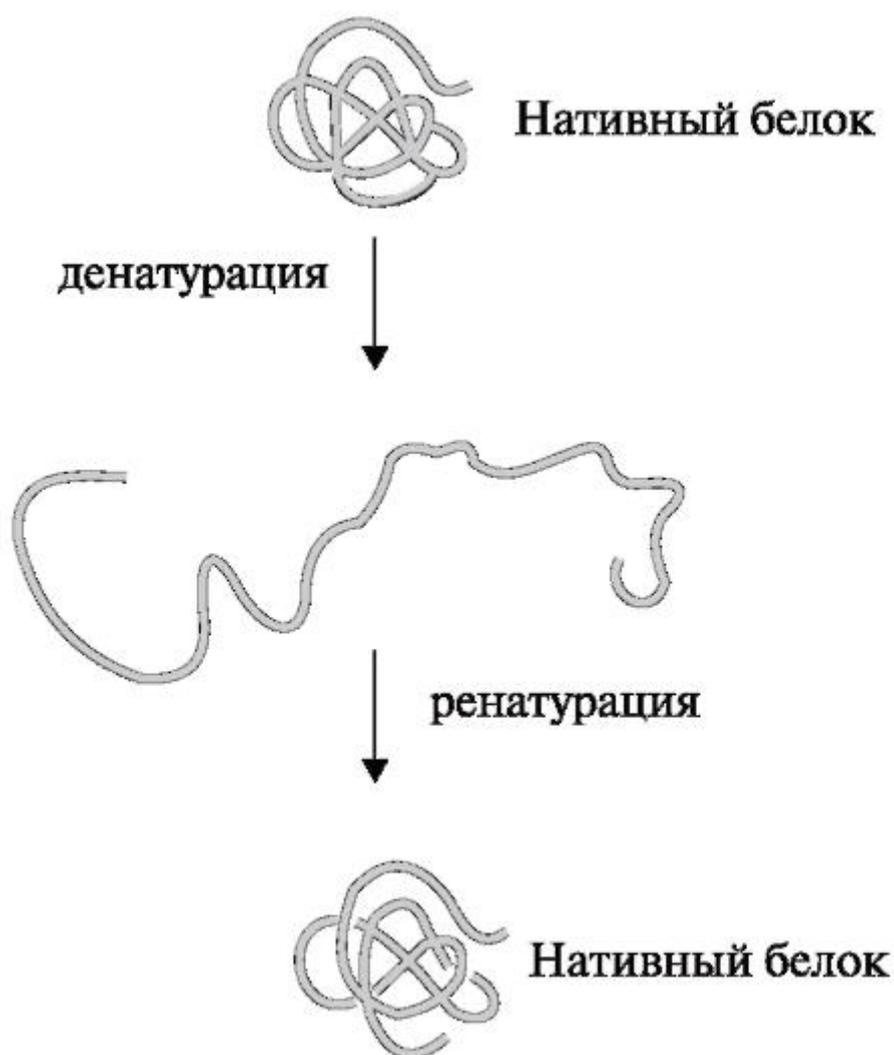


Рис. 1-14. Денатурация/ренатурация белка (схема)

Наиболее демонстративным примером успешной ренатурации считают рефолдинг *in vitro* фермента панкреатической рибонуклеазы, денатурированной под действием высоких концентраций мочевины или гуанидина гидрохлорида. Хотя теоретическая вероятность такого рефолдинга не превышала 1%, в ходе ренатурации происходило восстановление структуры практически у всех молекул фермента, подвергнутых денатурации.

Однако эксперименты по рефолдингу более крупных белков, состоящих из нескольких доменов, не были столь успешны. Как показали последующие исследования, процесс сворачивания белка происходит при участии других специализированных белков, играющих роль своеобразных ассистентов-помощников. Их назвали шаперонами.

ММ В записную книжку врача

## Использование денатурации белка в клинико-лабораторной диагностике

В лабораторной диагностике часто приходится делать анализы, проведению которых мешает присутствие белка. В таких случаях исследуемый объект (плазма крови, слюна) обрабатывают растворами различных денатурирующих агентов и после осаждения белка оставшийся безбелковый фильтрат используют для анализа. Таким образом, например, проводят депротеинизацию при определении содержания витаминов и противоопухолевых препаратов в крови, антибиотиков в слюне после орошения ротовой полости.

Ренатурация - процесс восстановления пространственной структуры белка и его биологической функции, наблюдаемый после прекращения действия и удаления денатурирующего агента.

При медленном удалении денатурирующего агента и реагентов, необходимых для поддержания сульфгидрильных групп в восстановленном состоянии (и препятствующих формированию  $-S-S-$ связей), могут произойти самопроизвольное сворачивание (*рефолдинг*) белковой молекулы, формирование нативной пространственной структуры и возникновение биологической активности, свойственной данному белку (рис. 1-14).

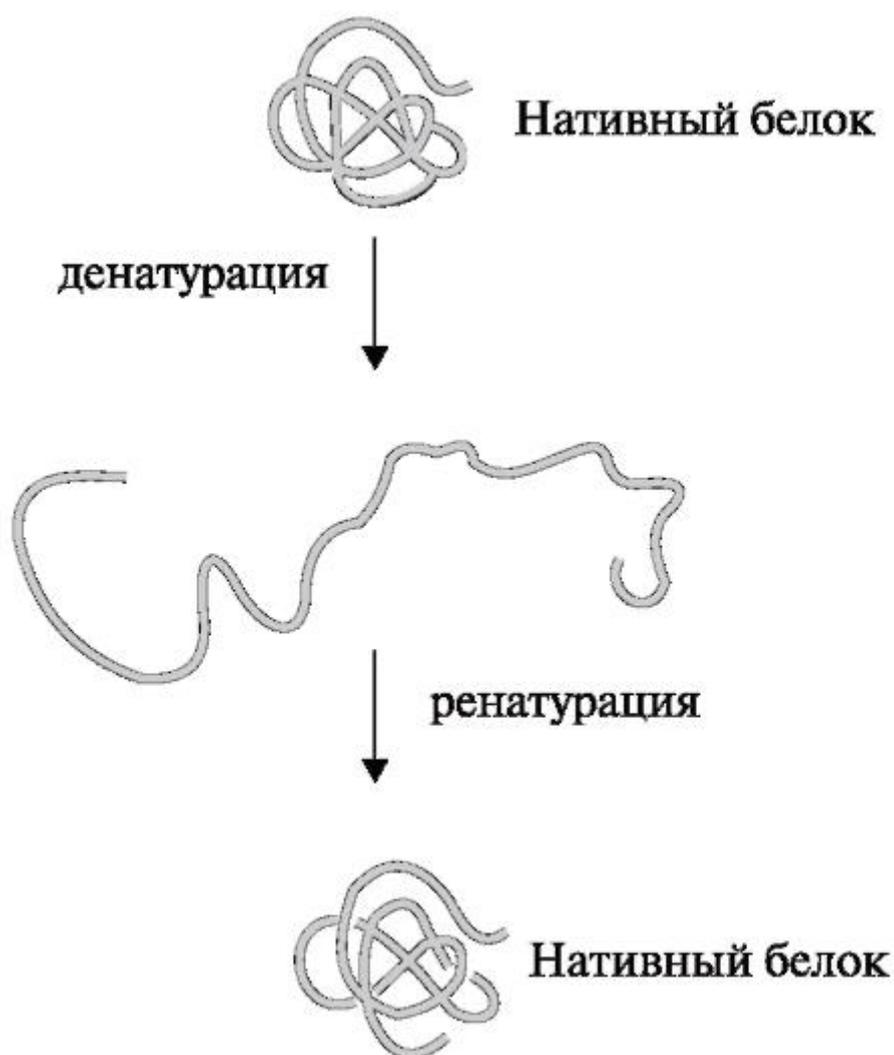


Рис. 1-14. Денатурация/ренатурация белка (схема)

Наиболее демонстративным примером успешной ренатурации считают рефолдинг *in vitro* фермента панкреатической рибонуклеазы, денатурированной под действием высоких концентраций мочевины или гуанидина гидрохлорида. Хотя теоретическая вероятность такого рефолдинга не превышала 1%, в ходе ренатурации происходило восстановление структуры практически у всех молекул фермента, подвергнутых денатурации.

Однако эксперименты по рефолдингу более крупных белков, состоящих из нескольких доменов, не были столь успешны. Как показали последующие исследования, процесс сворачивания белка происходит при участии других специализированных белков, играющих роль своеобразных ассистентов-помощников. Их назвали шаперонами.

*В записную книжку врача*

## Использование денатурации белка в клиничко-лабораторной диагностике

В лабораторной диагностике часто приходится делать анализы, проведению которых мешает присутствие белка. В таких случаях исследуемый объект (плазма крови, слюна) обрабатывают растворами различных денатурирующих агентов и после осаждения белка оставшийся безбелковый фильтрат используют для анализа. Таким образом, например, проводят депротеинизацию при определении содержания витаминов и противоопухолевых препаратов в крови, антибиотиков в слюне после орошения ротовой полости.

Ренатурация - процесс восстановления пространственной структуры белка и его биологической функции, наблюдаемый после прекращения действия и удаления денатурирующего агента.

При медленном удалении денатурирующего агента и реагентов, необходимых для поддержания сульфгидрильных групп в восстановленном состоянии (и препятствующих формированию -S-S-связей), могут произойти самопроизвольное сворачивание (*рефолдинг*) белковой молекулы, формирование нативной пространственной структуры и возникновение биологической активности, свойственной данному белку (рис. 1-14).

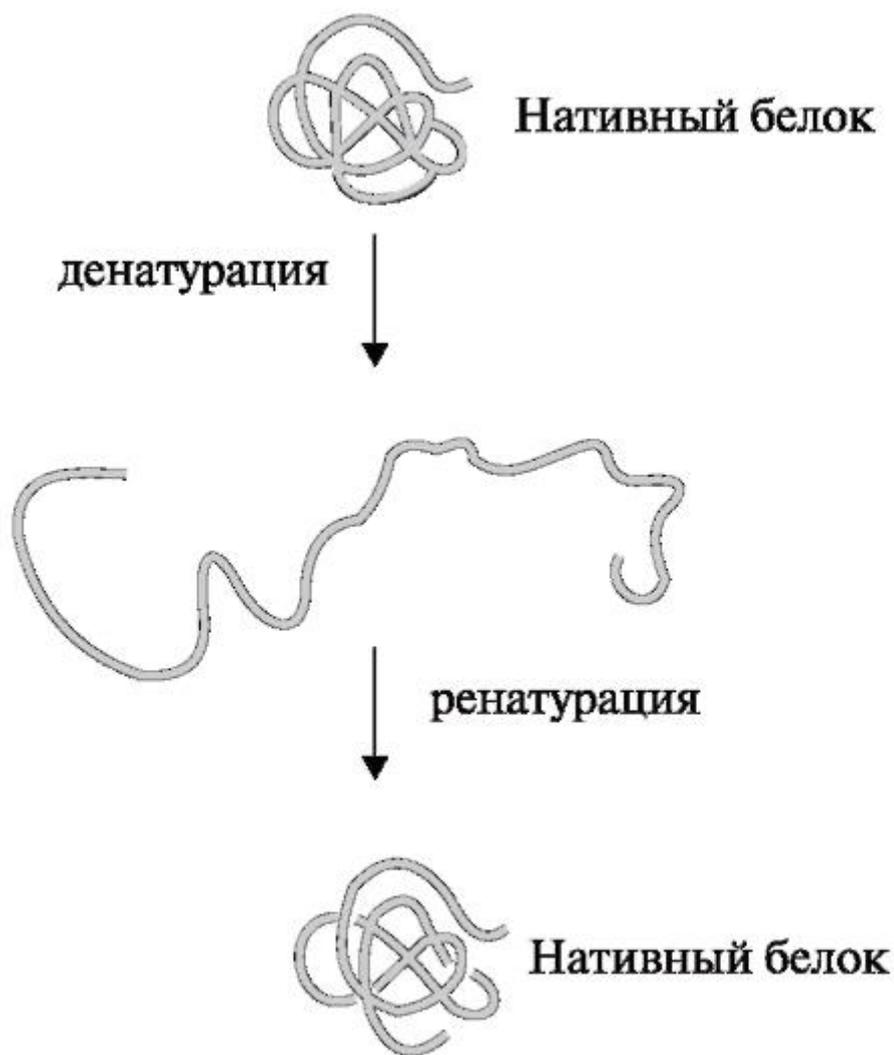


Рис. 1-14. Денатурация/ренатурация белка (схема)

Наиболее демонстративным примером успешной ренатурации считают рефолдинг *in vitro* фермента панкреатической рибонуклеазы, денатурированной под действием высоких концентраций мочевины или гуанидина гидрохлорида. Хотя теоретическая вероятность такого рефолдинга не превышала 1%, в ходе ренатурации происходило восстановление структуры практически у всех молекул фермента, подвергнутых денатурации.

Однако эксперименты по рефолдингу более крупных белков, состоящих из нескольких доменов, не были столь успешны. Как показали последующие исследования, процесс сворачивания белка происходит при участии других специализированных белков, играющих роль своеобразных ассистентов-помощников. Их назвали шаперонами.

Молекулярные шапероны

Шапероны (от англ. *chaperon* - буквально: «спутница молодой девушки на балах») - специализированные внутриклеточные белки, ответственные за быстрое нахождение правильной пространственной структуры. Они могут узнавать и связываться с частично свернутыми или развернутыми (денатурированными) белками. Поскольку количество шаперонов в клетках увеличивается при повышении температуры, их называют также белками теплового шока (БТШ; англ. *Heat shock proteins* - Hsp). В зависимости от молекулярной массы выделяют несколько семейств шаперонов: БТШ 90, БТШ 70, БТШ 60, а также низкомолекулярные белки теплового шока БТШ 25, БТШ 20 и т.д.

В самом общем виде роль шаперонов в фолдинге белка можно представить следующим образом (рис. 1-15). Связываясь с частично свернутой (например, только что синтезированной) или развернутой (в результате теплового шока) полипептидной цепью, шапероны помогают уложить проблемные участки полипептидной цепи. По мере усложнения структурной организации могут образовываться несколько промежуточных форм сворачиваемого белка, которые в конце концов будут уложены в нативную конформацию белка. После высвобождения с шаперона полипептидная цепь либо самостоятельно завершает процесс фолдинга, либо вновь «просит помощи» у шаперона, который помогает завершить формирование нативной структуры белка.

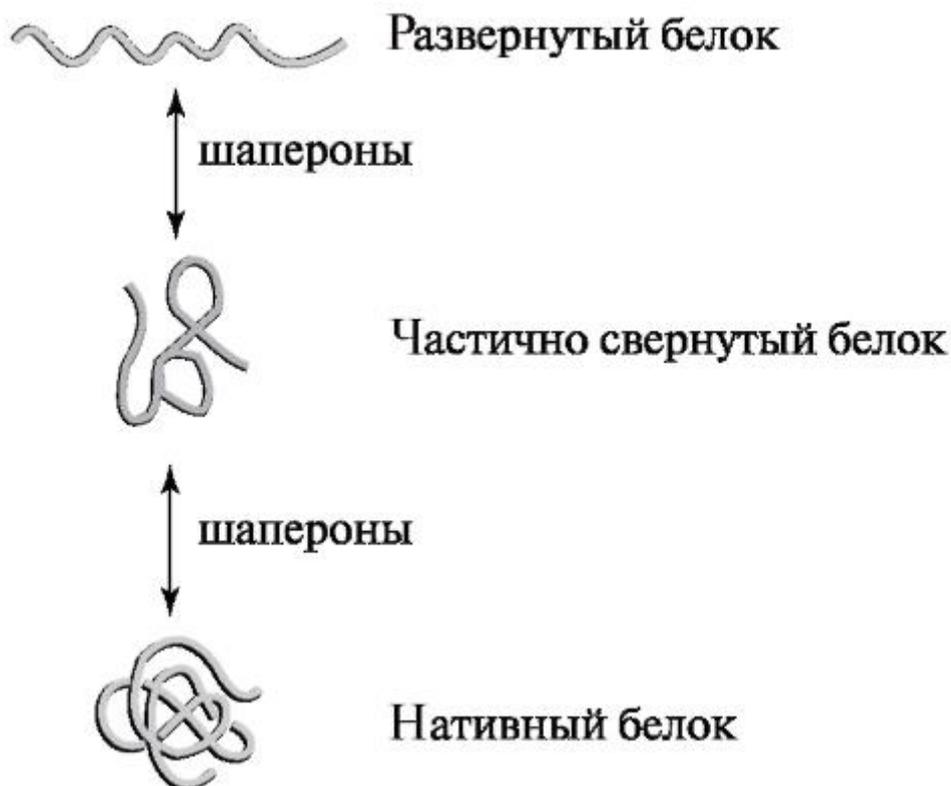


Рис. 1-15. Роль молекулярных шаперонов в фолдинге белка

Прионы (от англ. *proteinaceous infectious particle* - белковые инфекционные частицы) - белки, которые могут находиться в одной из двух различных конформаций. В третичной структуре нормального прионового белка (его обозначают PrP<sup>c</sup>) преобладают  $\alpha$ -спиральные элементы, а на долю  $\beta$ -структур приходится не более 3%. В третичной структуре патогенного двойника (его обозначают PrP<sup>Sc</sup>), имеющего ту же аминокислотную последовательность, преобладают  $\beta$ -складчатые листы. Это защищает патологический белок от расщепления под действием протеолитических ферментов и способствует его накоплению в клетках. Устойчивый к протеолизу патогенный прионовый белок PrP<sup>Sc</sup> может поражать нормальный белок, изменяя третичную структуру последнего. Это способствует быстрому накоплению патогенного прионового белка PrP<sup>Sc</sup>.

Шансы на самопроизвольное превращение нормального зрелого белка PrP<sup>c</sup> в патогенный PrP<sup>Sc</sup> ничтожно малы (1 случай на 1 млн), и наследственные формы прионовых болезней встречаются также очень редко. Гораздо большее значение в возникновении таких заболеваний придают употреблению с пищей мяса крупного рогатого скота, страдавшего болезнью коровьего бешенства, которое вызывают прионы.

*В записную книжку врача*

Болезни, вызванные нарушением конформации белка

В последнее время становится все более очевидным существование целой группы нейродегенеративных болезней, в основе которых лежит нарушение нативной конформации белка. К их числу относят болезни, вызываемые прионами, болезни Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона и др. Несмотря на различные клинические проявления, свойственные каждому заболеванию, их объединяет то, что определенный (как правило, специфичный для данного заболевания) белок может принять стабильную альтернативную конформацию, не свойственную этому белку в обычных условиях.

Нарушение нативной конформации или неправильный фолдинг белка приводят к тому, что в определенных отделах головного мозга происходит образование внутри- и внеклеточных белковых агрегатов, нарушающих нормальное функционирование нервной системы.

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Молекулярная масса

Поскольку в полипептидных цепях различных белков количество аминокислотных остатков варьирует в очень широких пределах, молекулярная масса белков, которую определяют с помощью разнообразных физико-химических методов, также варьирует в широких пределах. Молекулярную массу белков выражают в дальтонах в честь английского ученого Джона Дальтона, разработавшего атомарную теорию строения материи.

*Дальтон (Да)* - единица массы, равная массе атома водорода. Поскольку молекулярная масса белков может достигать 100 000 и даже 1 000 000 Да, на практике пользуются величиной килодальтон (кДа): 1 кДа = 1000 Да.

Термостабильность и термолабильность белков

Все белки можно условно разделить на две большие группы - термостабильные и термолабильные. Термостабильные белки выдерживают нагревание порой до 90-100°C, в то время как уже небольшое нагревание термолабильных белков вызывает изменения их конформации, а при 50-60°C большинство из них необратимо денатурирует. Таким образом, нагревая белковый раствор, можно отделить термостабильные белки,

которые будут оставаться в растворимой фракции, от термолабильных, которые выпадут в осадок, легко отделяемый центрифугированием.

### Растворимость и заряд белков

Все белки можно разделить на две другие большие группы по их растворимости в водной среде. Крастворимым белкам относят многие белки цитоплазмы, межклеточной жидкости, митохондриального матрикса и других водных сред организма. К нерастворимым белкам, прежде всего, относят мембраносвязанные и фибриллярные белки, а также белки, образующие при определенных условиях в водной среде нерастворимые комплексы (агрегаты).

Растворимость белка определяется как свойствами самого белка, так и природой растворителя. В водной среде на растворимость белка влияет рН раствора, в котором он находится. Это связано с тем, что при различных значениях рН степень ионизации функциональных групп аминокислотных остатков различна. Для любого белка существует *оптимальная величина рН* ( $pH_{\text{опт}}$ ), при которой он имеет стабильную структуру и физиологическую активность. Для большинства белков (но далеко не для всех) это нейтральные значения рН. При изменении рН в кислую или щелочную область может произойти денатурация белков (обратимая или необратимая). В этих условиях участки белковой молекулы либо приобретают большое количество зарядов одного знака, что приводит к отталкиванию между ними и разворачиванию молекулы белка, либо теряют заряды, обеспечивающие притяжение между участками молекулы и, таким образом, стабилизирующие структуру белка.

В водных растворах поляризованные молекулы воды располагаются вокруг молекул белка, создавая гидратную оболочку, которая препятствует электростатическому взаимодействию участков белковых молекул, несущих противоположные заряды.

Присутствие солей в растворе может либо увеличить, либо уменьшить растворимость белка. При физиологических концентрациях солей и нейтральных значениях рН большинство растворимых белков не образует агрегатов, тогда как в дистиллированной воде многие из них плохо растворимы (исключение составляют, например, альбумины плазмы крови, растворимые в дистиллированной воде). Глобулины же растворимы лишь в

слабых солевых растворах. В водной среде соли диссоциируют на ионы, которые взаимодействуют с заряженными группами аминокислотных остатков, препятствуя тем самым взаимодействию белковых молекул друг с другом, что способствует повышению растворимости белков.

Высокие концентрации солей щелочных и щелочно-земельных металлов приводят к агрегации белковых молекул и их осаждению в водных растворах. Это явление получило название высаливания. Его объясняют тем, что при высоких концентрациях солей количество ионов в среде намного превышает количество заряженных групп аминокислотных остатков, что приводит к нарушению гидратной оболочки белка в результате перемещения молекул воды к ионам солей. В результате гидрофобные участки на поверхности молекулы белка начинают взаимодействовать друг с другом. Чем больше таких участков на молекулах белка, тем быстрее они агрегируют, а белки с незначительным содержанием неполярных остатков на поверхности остаются в растворе даже при очень высоких концентрациях солей. Многие белки осаждаются в узкой области концентраций солей, что делает эту процедуру высокоэффективным методом фракционирования.

Добавление к водному белковому раствору органических растворителей (аcetона, этанола, метанола и т.п.) также приводит к нарушению гидратной оболочки белка и снижению диэлектрической постоянной воды. В результате этого молекулы белка за счет электростатических сил начинают взаимодействовать друг с другом, образуя агрегаты. В зависимости от свойств белков и их размера скорость образования агрегатов различается. Это лежит в основе фракционирования смеси белков с помощью органических растворителей.

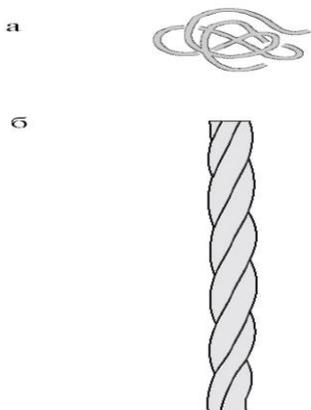


Рис. 1-16. Белки: а - глобулярные; б - фибриллярные. Глобулярные белки уложены в компактную структуру, а в фибриллярных - полипептидные цепи вытянуты вдоль одной оси (схема трех цепей кератина, формирующих канатоподобную структуру)

### Форма белковых молекул

По форме молекул все белки можно разделить на два основных класса:

- *фибриллярные белки*, в которых вытянутые полипептидные цепи образуют длинные нити-фибриллы или слои;
- *глобулярные белки*, в которых полипептидные цепи уложены в компактные сферические структуры, называемые *глобулами* (рис. 1-16).

Фибриллярные белки выполняют структурные или защитные функции. Они участвуют в формировании основных компонентов кожи, волос, ногтей, являются главным органическим материалом соединительной ткани, включая хрящи, сухожилия и кости. Типичные фибриллярные белки -  $\alpha$ -кератин волос и коллаген.

Глобулярные белки выполняют довольно разнообразные функции, составляющие основу жизнедеятельности многих клеток. К ним относят почти все ферменты, транспортные белки крови, антитела и др.

### Методы разделения и очистки белков

В медицинской практике часто используют высокоочищенные препараты белков для лечения больных (например, инсулин, лизоцим, РНКаза и др.). Кроме того, в диагностических целях бывает необходимо разделить белки плазмы крови и других биологических жидкостей. Именно поэтому медикам необходимо иметь хотя бы общие представления о способах очистки белков и их разделения.

Существуют относительно грубые и более тонкие методы фракционирования белков. К первым главным образом относят тепловую обработку, осаждение органическими растворителями и высаливание, рассмотренные выше. Ко вторым - различные виды хроматографии, электрофорез и изоэлектрофокусирование.

Процесс хроматографии в самом простом виде представляет собой распределение молекул фракционируемой смеси растворимых белков между

раствором и сорбентом, на котором молекулы белка могут задерживаться в зависимости от своих свойств.

Наиболее широко для разделения белков используют различные виды колоночной хроматографии (рис. 1-17). Самая простая колонка представляет собой пластиковую или стеклянную трубку со специальным фильтром на дне, заполненную сорбентом, на который наносят белковую смесь, а затем подают раствор, элюирующий (смывающий) белки в зависимости от их свойств в определенной последовательности.

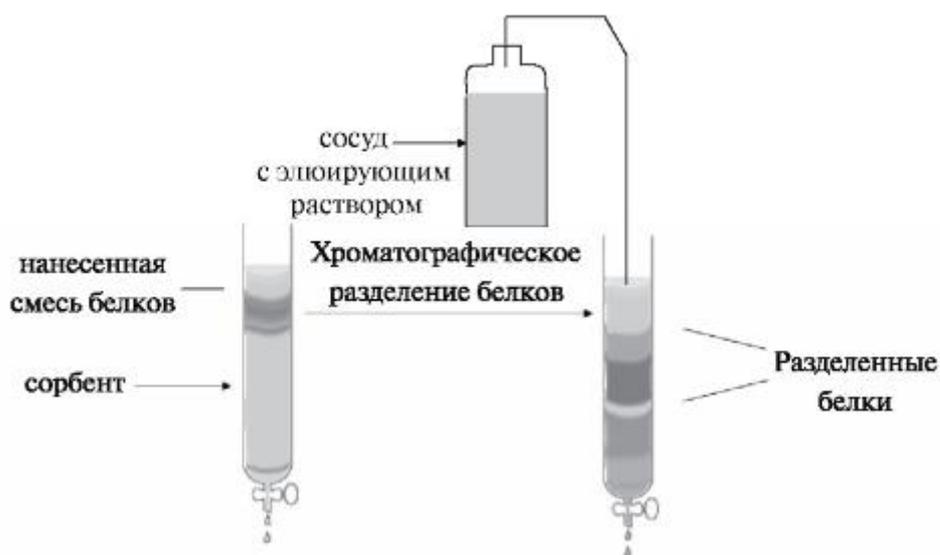


Рис. 1-17. Колоночная хроматография

В зависимости от природы сорбента и элюирующего раствора выделяют несколько видов хроматографии, среди которых наиболее широко используют гель-хроматографию, ионообменную и аффинную.

Принцип *гель-хроматографии* заключается в разделении молекул с разной молекулярной массой, а следовательно, различного размера на носителе, представляющем собой пространственную сетку гидрофильного полимера, свернутого в гранулы (рис. 1-18).



Рис. 1-18. Разделение белков методом гель-хроматографии

При пропускании белковых растворов через колонку с таким сорбентом (гелем) крупные молекулы не способны проникать внутрь гранул и проходят через колонку транзитом, не задерживаясь на ней. Мелкие молекулы легко диффундируют внутрь гранул геля и задерживаются в нем, «путешествуя» в сетке полимера. Молекулы среднего (промежуточного) размера застревают в порах сетки полимера на некоторое время и перемещаются вдоль колонки с промежуточной скоростью. Поскольку разделение молекул при гель-хроматографии происходит в зависимости от их размера, этот метод еще называют методом *гель-фильтрации*, или *молекулярных сит*. Помимо размера молекул, определяемого, как правило, их молекулярной массой, при разделении белков методом гель-хроматографии следует также учитывать *форму* их молекул, так как очевидно, что глобула будет проникать внутрь гранул гораздо легче, чем вытянутая молекула.

В основе *ионообменной хроматографии* лежат силы притяжения между противоположно заряженными ионами. К гидрофильным гранулам нитей полимера пришивают положительно или отрицательно заряженные группы, заряд которых уравнивают противоионами, способными

диссоциировать от носителя в водном растворе и замещаться другими противоионами, например, заряженными молекулами белка.

Все ионообменники делят на *катионо-* и *анионообменники* (катиониты и аниониты) (рис. 1-19). В катионообменниках ионогенные группы (подобно катоду) заряжены отрицательно и связывают из раствора положительно заряженные катионы. В анионообменниках ионогенные группы (подобно аноду) заряжены положительно и связывают отрицательно заряженные анионы.

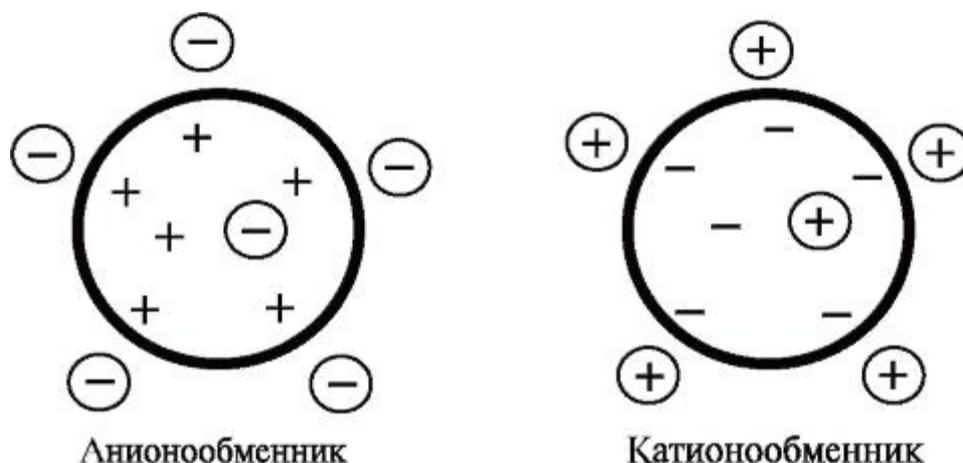


Рис. 1-19. Схема работы катионообменника и анионообменника

При нанесении на ионообменник разделяемые вещества медленно диффундируют внутрь гранул полимера (если позволяют их размеры) или связываются лишь на поверхности. Для электростатического взаимодействия с ионогенными группами носителя молекулы разделяемых веществ, прежде всего, должны иметь заряд, противоположный заряду ионогенных групп сорбента.

Очевидно, что в зависимости от аминокислотного состава знак и величина суммарного заряда разделяемых белков при одном и том же значении рН будут различаться. Чем больше суммарный заряд белка, тем прочнее он связывается с противоположно заряженным сорбентом.

Сорбция и разделение веществ на ионообменнике будут сильно зависеть от концентрации в растворе противоионов, в роли которых выступают ионы диссоциируемых солей (например, NaCl). Изменяя концентрацию соли, можно поочередно элюировать с колонки белки, обеспечивая их разделение (рис. 1-20).

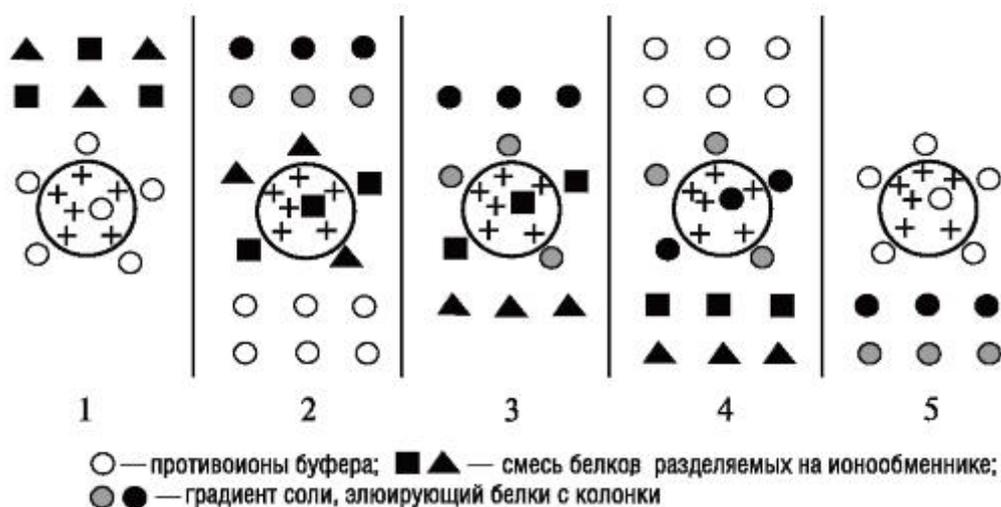


Рис. 1-20. Процесс ионообменной хроматографии (схема): 1 - носитель уравновешен буфером, содержащим противоионы, на сорбент нанесена смесь белков; 2 - обмен противоионов на компоненты разделяемой смеси, их адсорбция на носителе; 3 - начало элюции компонентов смеси с сорбента буфером с невысокой концентрацией соли, происходит десорбция наименее прочно связанных белков; 4 - полная десорбция белков при высокой концентрации соли; 5 - регенерация носителя

В состав белков, помимо гидрофильных, входят также гидрофобные аминокислотные остатки. Последние могут образовывать гидрофобные связи с сорбентом. Поскольку их число для разных белков различно, такие гидрофобные взаимодействия лежат в основе хроматографического разделения белков на гидрофобных носителях, например, на фенил-или октил-сефарозе.

*Аффинная хроматография, или хроматография по сродству, -* высокоизбирательный и высокоэффективный метод фракционирования белков за счет биоспецифического взаимодействия между молекулами, обладающими высоким сродством друг к другу (ферментом и его субстратом, кофактором, ингибитором; антигеном и антителом; гормоном и рецептором и др.). Если один из компонентов такой пары закрепить на матрице в качестве лиганда, то с его помощью можно извлечь из смеси родственные ему одно или несколько соединений или схожих с ними по своей структуре веществ (рис. 1-21). Примесные молекулы удаляют промыванием сорбента, после чего смывают (элюируют) нужное вещество, создавая неблагоприятные условия для специфического связывания и ослабляя силу его взаимодействия с лигандом.

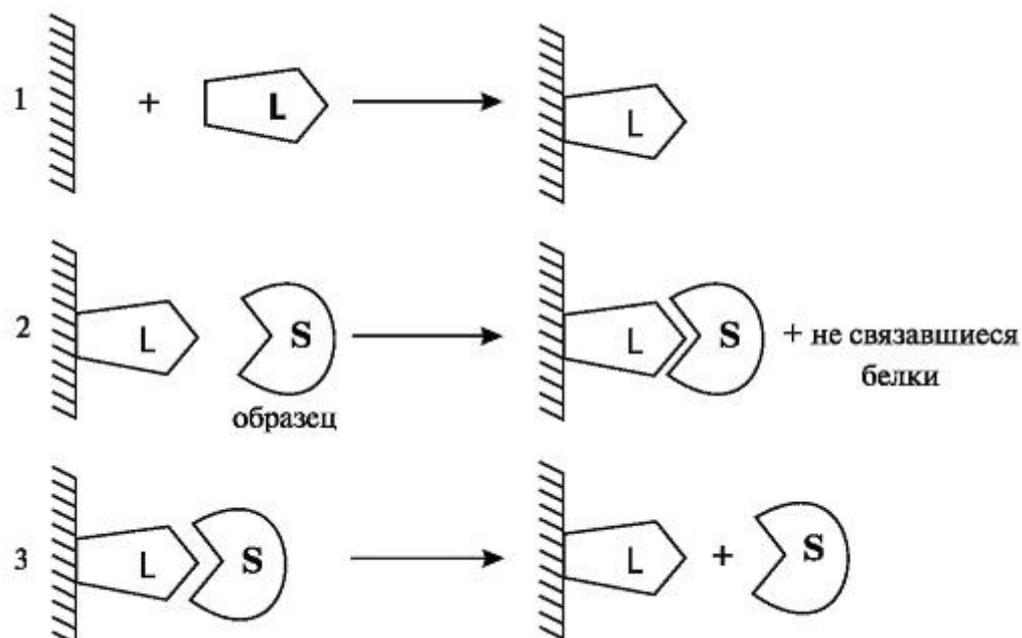


Рис. 1-21. Принцип аффинной хроматографии: 1 - иммобилизация лиганда (L) на матрице; 2 - взаимодействие иммобилизованного лиганда с комплементарной белковой молекулой (S); 3 - десорбция комплементарной молекулы с носителя

В качестве такого лиганда часто используют антитела, с высокой специфичностью реагирующие с определенным белком (антигеном), на который они получены. В этом случае речь идет об иммуноаффинной хроматографии, которую используют не только для очистки белковых препаратов, предназначенных для лечения больных, но и удаления некоторых белков из крови пациентов.

*В записную книжку врача*

Использование иммуносорбции при ишемической болезни сердца

Развитие ишемической болезни сердца может протекать на фоне увеличенного содержания в плазме крови липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), которые способствуют прогрессированию данного заболевания. В одних случаях добиться нормализации уровня ЛПНП можно путем медикаментозной терапии. Однако в других (устойчивых к лекарственной терапии) случаях показана так называемая экстракорпоральная иммуносорбция. В ее основе лежит метод аффинной хроматографии: при пропускании плазмы крови через специальные колонки с иммобилизованными на них антителами против ЛПНП. Эти липопротеины

будут оседать на иммобилизованных антителах, а очищенная кровь возвращается в кровеносное русло пациентов.

Помимо хроматографических методов фракционирования в настоящее время для разделения белков широко используют различные методы электрофореза - направленного движения заряженных частиц (рис. 1-22). Под действием электрического поля заряженные молекулы мигрируют в направлении катода или анода, причем скорость их движения определена величиной суммарного электрического заряда, размером и формой молекул, а также зависит от состава среды.

Для разделения молекул используют специальные носители, имеющие пористую структуру (фильтровальную бумагу, целлюлозу, крахмал, силикагель и др.). При разделении смеси белков наибольшее распространение в настоящее время нашел метод *электрофореза в полиакриламидном геле*. Полиакриламидный гель (ПААГ) представляет собой полимер нитей акриламида ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ), сшитых N,N'-метилен-бис-акриламидом ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{N}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ). Качество разделения белков зависит не только от соотношения полимера и его сшивки, но и от состава, величины pH и ионной силы среды, в которой происходит электрофорез.

Изоэлектрофокусирование - электрофоретический метод, позволяющий разделить белки, имеющие различные ИЭТ. Для этого в геле с помощью сложных смесей амфотерных соединений (амфолитов) создают градиент pH.

При разделении белковой смеси каждый белок будет мигрировать в электрическом поле до тех пор, пока не достигнет значения pH, совпадающего с его pI. Таким образом, белки с разными ИЭТ распределяются по разным зонам pH-градиента.

Двумерный электрофорез - сочетание двух электрофоретических методов разделения (электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия и изоэлектрофокусирования) в двух направлениях лежит в основе двумерного электрофореза. Последний позволяет эффективно разделять сложные смеси белков с идентичной молекулярной массой, но различными величинами pI или, наоборот, белки с одинаковым значением pI, но с разными молекулярными массами.

В настоящее время с помощью двумерного электрофореза в слюне человека удалось обнаружить более ста различных белков (рис. 1-22). При этом их соотношение в норме и при патологии может сильно варьировать.

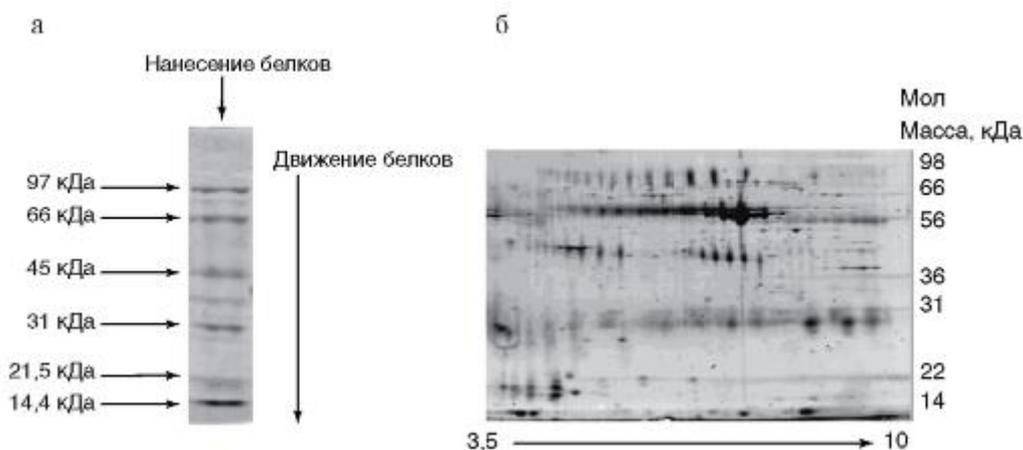


Рис. 1-22. Электрофорез: а - смеси белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (разделение по молекулярной массе); б - двумерный электрофорез слюны человека.

В плазме крови удалось разделить и обнаружить более тысячи индивидуальных белков, количество которых постоянно увеличивается.

Успехи в разделении и анализе белков биологических жидкостей, а также отдельных клеток и тканей человека и животных привели к возникновению новой дисциплины - протеомики.

### Протеомика

Протеомикой называют науку, которая занимается системной инвентаризацией белков в целях детального описания структуры, функции и контроля биологических систем в норме и при патологии. Она базируется на:

- различных методах разделения белков, включая двумерный электрофорез;
- масс-спектрометрической идентификации разделенных белков;
- компьютерном анализе полученных результатов.

Двумерный электрофорез позволяет получить так называемые белковые карты исследуемого объекта, например, плазмы крови, слюны, органа или ткани.

Далее разделенные белки сначала расщепляют с помощью протеолитических ферментов на более мелкие пептидные фрагменты, которые затем поступают

в масс-спектрометр, где их ионизируют и определяют соотношение массы и заряда полученных пептидных фрагментов. Поскольку каждый пептидный фрагмент обладает своим «отпечатком пальцев», то по нему и определяют индивидуальные белки. Полученные величины соотношений массы и заряда используют для идентификации белков в базах данных.

Такой системный подход к анализу всего разнообразия белков исследуемого органа или ткани имеет высокую диагностическую ценность и позволяет распознавать заболевания на ранних стадиях, когда врачи могут эффективно бороться за выздоровление и жизнь больных.

*В записную книжку врача*

Использование протеомики в диагностике заболеваний

Слюна - удобный и легкодоступный объект исследования, поэтому уже получены протеомные карты слюны человека. Их анализ показывает, что слюна человека содержит большое количество белков, участвующих в реакции на воспаление и иммунные ответы. Именно поэтому анализ протеомных карт слюны человека в норме и при патологии также может быть использован как в диагностических, так и прогностических целях (например, для оценки лекарственной терапии пародонтита).

Простые и сложные белки

Белки, состоящие только из аминокислот, называют *простыми*. Однако многие белки могут содержать в своем составе и небелковый компонент. Такие белки называют *сложными*. Как правило, присоединение небелкового компонента может происходить либо во время процесса трансляции (биосинтеза белка на рибосомах) - и тогда изменение структуры белка называют *котрансляционной модификацией*, либо после завершения синтеза полипептидной цепи - в таком случае говорят о *посттрансляционной модификации*.

Присоединение небелкового компонента расширяет функциональные возможности белка. Например, образование остатков  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты, которое происходит в результате включения  $\text{CO}_2$  в остаток глутаминовой кислоты белка костной ткани остеокальцина, способствует формированию комплексов с ионами кальция и образованию частиц гидроксиапатита - минерального компонента кости.

В зависимости от природы небелкового компонента различают следующие классы сложных белков:

- гликопротеины;
- липопротеины;
- хромопротеины;
- нуклеопротеины;
- фосфопротеины;
- металлопротеины.

Белковая часть сложных белков, именуемая *апобелком* (или *апопротеином*), может быть связана в разных белках с небелковым компонентом, который называют *простетической группой*, с помощью ковалентных, ионных связей или гидрофобных взаимодействий.

В гликопротеинах, к числу которых принадлежат белки плазмы крови (фибриноген, иммуноглобулины), белки секретов слюнных желез (муцины), ферменты (панкреатическая рибонуклеаза), гормоны (тиреотропин), структурные белки (коллаген, ламинин) и рецепторы (инсулина), углеводный компонент чаще всего присоединен к апобелку N- или O-гликозидной связью (рис. 1-23).

В первом случае в образовании N-гликозидной связи участвует амидный азот остатка аспарагина апобелка, а во втором - гидроксильная группа серина или треонина.

Первым моносахаридным звеном, образующим N-гликозидную связь с аспарагином, всегда является N-ацетилглюкозамин. В O-гликопротеинах в присоединении углеводного компонента к апобелку участвует N-ацетилгалактозамин.

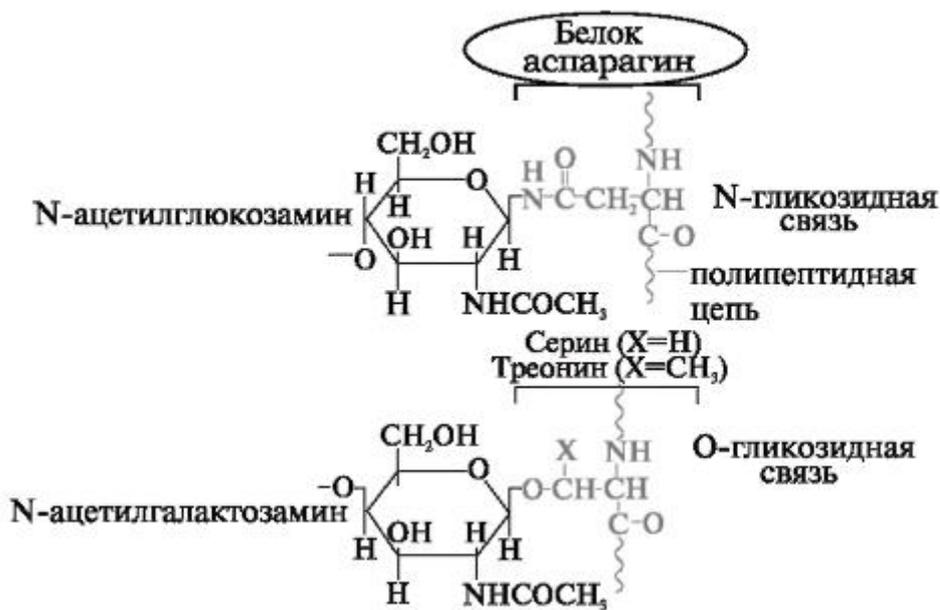


Рис. 1-23. Пример N- и O-гликозидных связей в гликопротеинах

В липопротеинах, среди которых важную роль играют липопротеины плазмы крови, сильно гидрофобные участки аполипопротеинов с помощью гидрофобных взаимодействий образуют оболочку вокруг гидрофобного ядра, а гидрофильные области этих белков обращены в водную среду (рис. 1-24).

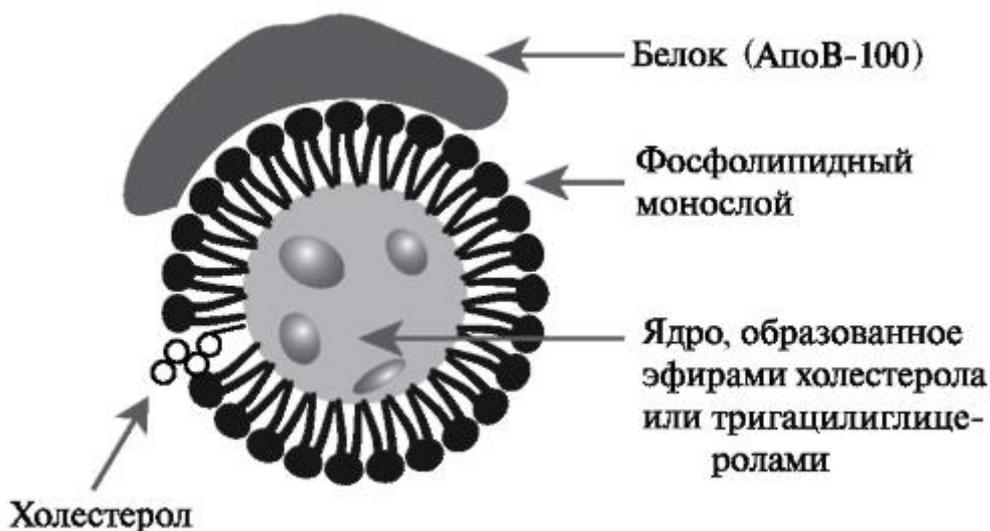


Рис. 1-24. Структура липопротеина низкой плотности

В хромопротеинах небелковым компонентом являются разнообразные окрашенные вещества, прежде всего гем и флавин (производное витамина B<sub>2</sub>). У гемопротеинов гем может быть соединен с белком как с помощью ковалентных, так и нековалентных связей. Например, в молекуле миоглобина гем связан с апобелком с помощью нековалентных взаимодействий.

Поскольку число таких нековалентных межатомных взаимодействий достигает 80, это обеспечивает прочное связывание протетической группы в молекуле этого белка. Примером ковалентного связывания гема с белковой частью гемопroteина является цитохром *c*. В этом белке гем связан с апоцитохромом с помощью сульфгидрильных (-SH) групп двух остатков цистеина.

*Цитохром с* (рис. 1-25) - небольшой водорастворимый гемопroteин митохондрий осуществляет одноэлектронный перенос электронов, в котором участвует железо гема. Ион железа может принимать и отдавать электроны, поочередно переходя в ферро ( $Fe^{2+}$ )- и ферри ( $Fe^{3+}$ )-формы.

В молекулах различных флавопротеинов в ковалентном присоединении протетической группы (ФАД или ФМН) к апопротеину также участвуют различные аминокислотные остатки (например, гистидин, цистеин).

Рис. 1-25. Модель цитохрома *c*

Стабилизацию структуры нуклеопротеинов обеспечивают ионные связи между положительными зарядами аминокислотных остатков лизина и аргинина белка и отрицательно заряженными фосфатными группами молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или рибонуклеиновой кислоты (РНК). Более подробно структура нуклеопротеинов рассмотрена в последующих главах.

В фосфопротеинах один или несколько остатков фосфорной кислоты ковалентно соединены (фосфоэфирной связью) с остатками гидроксилсодержащих аминокислот серина, треонина или тирозина. Фосфорилирование внутриклеточных белков, т.е. присоединение остатка фосфорной кислоты, процесс обратимый. Он играет важную роль в регуляции биологической активности белков. Присоединение остатков фосфорной кислоты приводит к созданию отрицательного заряда на молекуле белка (или нейтрализации положительного заряда). Это сопровождается изменением электростатических взаимодействий и водородных связей белков и их функциональной активности.

Фосфорилирование белка играет важную роль в минерализации ткани. Например, фосфорилирование остатков серина в  $Ca^{2+}$ -связывающем белке

дентина *фосфофторине* приводит к возникновению отрицательного заряда, который способствует связыванию положительно заряженных ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

В большинстве случаев ионы металлов связаны с апобелками металлопротеинов ионными связями. Таким образом, например, отрицательно заряженные остатки  $\gamma$ -карбоксихлутаминовой кислоты белка остеокальцина эффективно связывают ионы  $\text{Ca}^{2+}$ . Другим примером металлопротеина может быть карбоксипептидаза А. Этот фермент, катализирующий реакцию отщепления С-концевой аминокислоты от полипептидной цепи, содержит  $\text{Zn}^{2+}$ . Ион цинка связан с апобелком с помощью отрицательно заряженного остатка глутаминовой кислоты, а также двух остатков гистидина.

Рис. 1-25. Модель цитохрома с

Стабилизацию структуры нуклеопротеинов обеспечивают ионные связи между положительными зарядами аминокислотных остатков лизина и аргинина белка и отрицательно заряженными фосфатными группами молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или рибонуклеиновой кислоты (РНК). Более подробно структура нуклеопротеинов рассмотрена в последующих главах.

В фосфопротеинах один или несколько остатков фосфорной кислоты ковалентно соединены (фосфоэфирной связью) с остатками гидроксилсодержащих аминокислот серина, треонина или тирозина. Фосфорилирование внутриклеточных белков, т.е. присоединение остатка фосфорной кислоты, процесс обратимый. Он играет важную роль в регуляции биологической активности белков. Присоединение остатков фосфорной кислоты приводит к созданию отрицательного заряда на молекуле белка (или нейтрализации положительного заряда). Это сопровождается изменением электростатических взаимодействий и водородных связей белков и их функциональной активности.

Фосфорилирование белка играет важную роль в минерализации ткани. Например, фосфорилирование остатков серина в  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающем белке дентина *фосфофторине* приводит к возникновению отрицательного заряда, который способствует связыванию положительно заряженных ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

В большинстве случаев ионы металлов связаны с апобелками металлопротеинов ионными связями. Таким образом, например, отрицательно

заряженные остатки  $\gamma$ -карбоксихлутаминовой кислоты белка остеокальцина эффективно связывают ионы  $\text{Ca}^{2+}$ . Другим примером металлопротеина может быть карбоксипептидаза А. Этот фермент, катализирующий реакцию отщепления С-концевой аминокислоты от полипептидной цепи, содержит  $\text{Zn}^{2+}$ . Ион цинка связан с апобелком с помощью отрицательно заряженного остатка глутаминовой кислоты, а также двух остатков гистидина.

Рис. 1-25. Модель цитохрома с

Стабилизацию структуры нуклеопротеинов обеспечивают ионные связи между положительными зарядами аминокислотных остатков лизина и аргинина белка и отрицательно заряженными фосфатными группами молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или рибонуклеиновой кислоты (РНК). Более подробно структура нуклеопротеинов рассмотрена в последующих главах.

В фосфопротеинах один или несколько остатков фосфорной кислоты ковалентно соединены (фосфоэфирной связью) с остатками гидроксилсодержащих аминокислот серина, треонина или тирозина. Фосфорилирование внутриклеточных белков, т.е. присоединение остатка фосфорной кислоты, процесс обратимый. Он играет важную роль в регуляции биологической активности белков. Присоединение остатков фосфорной кислоты приводит к созданию отрицательного заряда на молекуле белка (или нейтрализации положительного заряда). Это сопровождается изменением электростатических взаимодействий и водородных связей белков и их функциональной активности.

Фосфорилирование белка играет важную роль в минерализации ткани. Например, фосфорилирование остатков серина в  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающем белке дентина *фосфофрине* приводит к возникновению отрицательного заряда, который способствует связыванию положительно заряженных ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

В большинстве случаев ионы металлов связаны с апобелками металлопротеинов ионными связями. Таким образом, например, отрицательно заряженные остатки  $\gamma$ -карбоксихлутаминовой кислоты белка остеокальцина эффективно связывают ионы  $\text{Ca}^{2+}$ . Другим примером металлопротеина может быть карбоксипептидаза А. Этот фермент, катализирующий реакцию отщепления С-концевой аминокислоты от полипептидной цепи, содержит

Zn<sup>2+</sup>. Ион цинка связан с апобелком с помощью отрицательно заряженного остатка глутаминовой кислоты, а также двух остатков гистидина.

### Функции белков

Белкам свойственны многочисленные функции, среди которых отметим следующие.

**Каталитическая функция.** Подавляющее большинство химических реакций в организме катализируют ферменты - биологические катализаторы белковой природы.

**Транспортная функция.** Белки могут переносить самые разные вещества. Гемоглобин и миоглобин переносят кислород, трансферрин - железо. Специальные белки-транспортёры плазматических и внутриклеточных мембран осуществляют высокоизбирательный перенос отдельных молекул как в клетку, так и в различные субклеточные структуры. Например, транспортёр глюкозы плазматических мембран отвечает за поступление глюкозы внутрь клеток, а митохондриальная транслоказа адениновых нуклеотидов обеспечивает поступление аденозиндифосфата (АДФ) в митохондрии и доставку аденозинтрифосфата (АТФ) из митохондрий.

**Защитная функция.** Защитная функция белков также очень многообразна. Она связана с функционированием иммунной системы и выработкой иммуноглобулинов, со свертыванием крови для предотвращения кровотечений и заживления повреждений кровеносных сосудов. Кроме того, цитохром Р450 печени защищает организм от ксенобиотиков (от греч. *xenos* - чужой и *bios* - жизнь). Ксенобиотиками называют разнообразные химические соединения, поступающие в организм. К их числу относят лекарственные средства, пестициды, продукты бытовой химии и т.д. Под действием цитохрома Р450 происходит химическая модификация этих молекул, в результате которой повышается их растворимость. Это способствует выведению молекул из организма.

**Опорно-двигательная функция.** Белки составляют основу соединительной ткани. Сократительные белки мышц осуществляют разнообразные виды сократительной деятельности - от произвольного сокращения скелетной мускулатуры, обеспечивающей движение, сохранение позы и равновесия, до перистальтики кишечника, поддержания тонуса сосудов. Белки цитоскелета

ответственны за поддержание формы клеток, внутриклеточный транспорт, расхождение цитоплазмы (цитокinesis) в процессе деления клеток.

Регуляторная функция. Сообщение между клетками, органами и тканями осуществляют специализированные сигнальные молекулы. Их выделяют одни клетки, они поступают к другим, снабженным рецепторным аппаратом, способным воспринимать эти сигналы. Белки составляют большую группу сигнальных молекул, к числу которых относят гормоны и факторы роста. Первые синтезируются эндокринными железами, поступают в кровь и с ее током разносятся по всему организму, находя свои клетки-мишени. Так действуют, например, гормон поджелудочной железы инсулин, тропные гормоны гипофиза и др. К регуляторным белкам относят и факторы роста. Они могут действовать на те же клетки, которые их и секретируют. К ним относят, например, цитокины - факторы роста, участвующие в иммунном ответе, тромбо-цитарный фактор роста, инсулиноподобные факторы роста I и II.

Питательная функция. Хотя в организме человека нет специального депо, в котором бы белки откладывались про запас, подобно жирам или гликогену, ряд белков, которые при дефиците пищевых белков расщепляются в первую очередь и являются источником аминокислот, можно рассматривать в качестве резервных. Прежде всего на эту роль претендуют белки мышц и печени, альбумин плазмы крови, расщепление которых позволяет при голодании восполнить дефицит аминокислот для синтеза белков в таких жизненно важных органах, как мозг и сердце. Питательную функцию выполняют пищевые белки, например казеин молока.

## **ГЛАВА 2. СТРУКТУРА УГЛЕВОДОВ**

Вопросы по теме

- Определение и классификация углеводов.
- Структура и функции важнейших моносахаридов.
- Структура и функции важнейших олигосахаридов.
- Полисахариды (крахмал, гликоген, целлюлоза, гиалуроновая и хондроитинсерные кислоты, гепарин), их строение, свойства и функции.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ УГЛЕВОДОВ

### МОНОСАХАРИДЫ

В природе моносахариды встречаются в свободном виде крайне редко, и известны они лишь как компоненты олиго- и полисахаридов.

Моносахариды представляют собой полигидроксиальдегиды или полигидроксикетоны, содержащие от 3 до 9 атомов углерода. В зависимости от положения карбонильной группы различают альдозы (группа  $-C=O$  занимает концевое положение) и кетозы (группа  $-C=O$  располагается внутри углеродной цепи). В зависимости от числа атомов углерода моносахариды делят на триозы (3C), тетрозы (4C), пентозы (5C), гексозы (6C), гептозы (7C) и т.д. В живых организмах наиболее распространены пентозы и гексозы. В основу наименований моносахаридов в большинстве случаев положены тривиальные названия, которые имеют окончания *-оза*: глюкоза, рибоза, фруктоза и т.д. Для обозначения кетоз используют окончание *-улоза*. Моносахариды хорошо растворимы в воде и имеют сладкий вкус.

#### Стереометрия моносахаридов

Моносахариды содержат несколько хиральных центров - асимметрических атомов углерода, к числу которых относят атомы, соединенные с четырьмя различными заместителями. Наличие хиральных центров определяет существование большого количества стереоизомеров, соответствующих одной и той же структурной формуле. Стереоизомеры, которые относятся друг к другу, как предмет к его зеркальному изображению, называют *энантиомерами* (рис. 2-2). Для изображения многочисленных стереоизомеров удобны проекционные формулы Фишера, в которых атомы углерода обозначают пересечением вертикальных и горизонтальных линий (рис. 2-3).

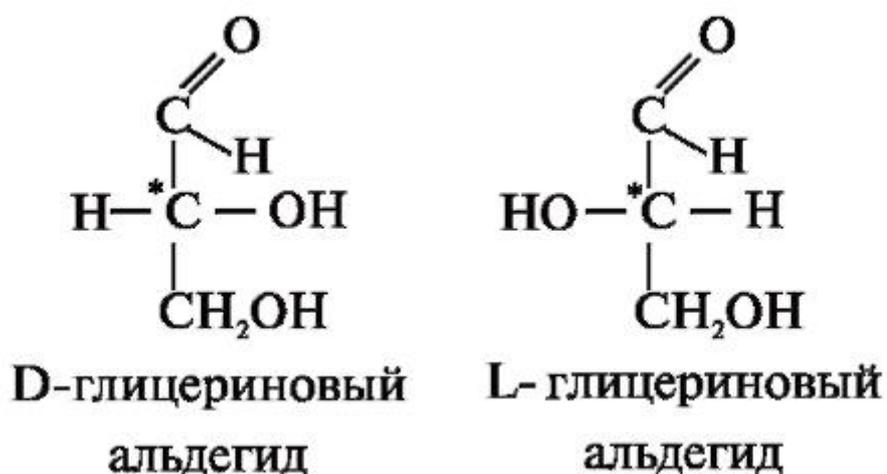


Рис. 2-2. Энантиомеры глицеринового альдегида \* - асимметрические атомы углерода

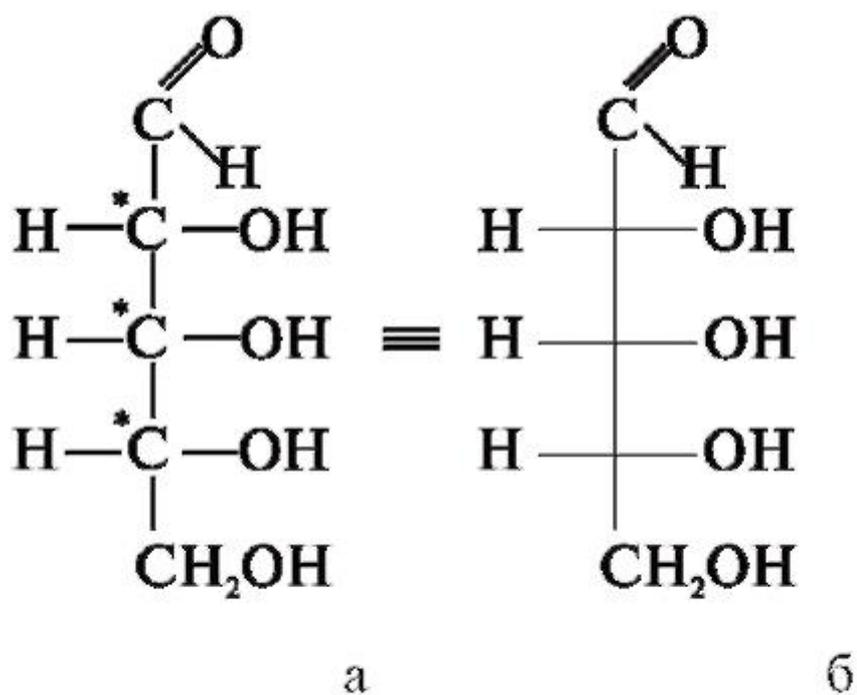


Рис. 2-3. Изображение D-рибозы (а, б). Проекционная формула Фишера (б)

Подавляющее большинство природных моносахаридов принадлежит к D-ряду. Принадлежность к D- и L-стереохимическому ряду определяют путем сравнения конфигураций *последнего асимметрического* атома углерода и оптического эталона - D-глицеринового альдегида.

Наиболее распространены почти все альдозы D-ряда, в то время как альдозы и кетозы, относимые к L-ряду, встречаются крайне редко.

*В записную книжку врача*

Узнаваемость изомеров моносахаров в организме

Хотя D- и L-стереоизомеры имеют очень схожие свойства, живые организмы, усваивая D-глюкозу, «не узнают» ее энантиомер - L-глюкозу.

Моносахариды классифицируют по расположению карбонильной группы и длине углеродной цепи (рис. 2-4).

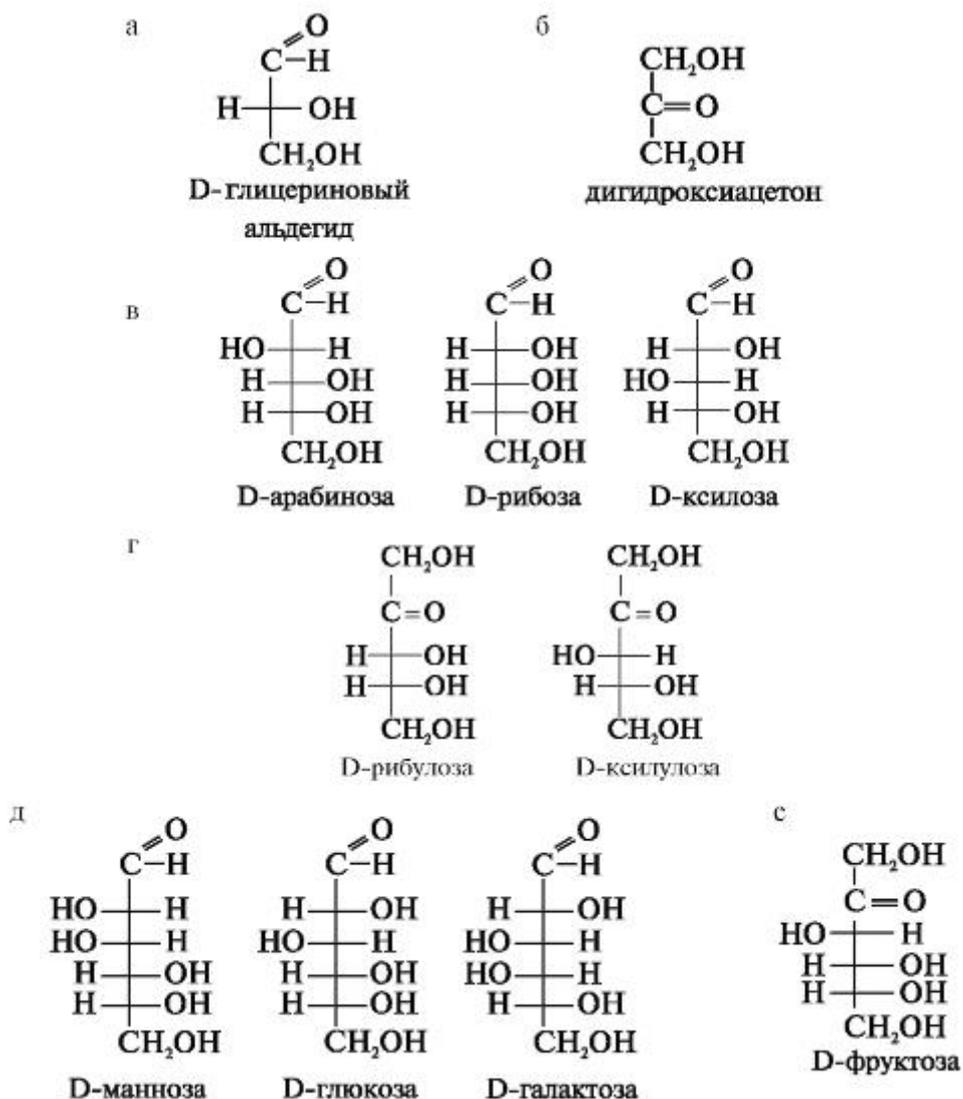


Рис. 2-4. Биологически важные моносахариды: а - альдотриозы; б - кетотриозы; в - альдопентозы; г - кетопентозы; д - альдогексозы; е - кетогексозы

### Циклические формы моносахаридов

Пентозы и гексозы существуют обычно в циклической форме, которая образуется в результате нуклеофильной атаки атома углерода карбонильной

группы атомом кислорода достаточно удаленной гидроксильной группы, как это показано на рис. 2-5.

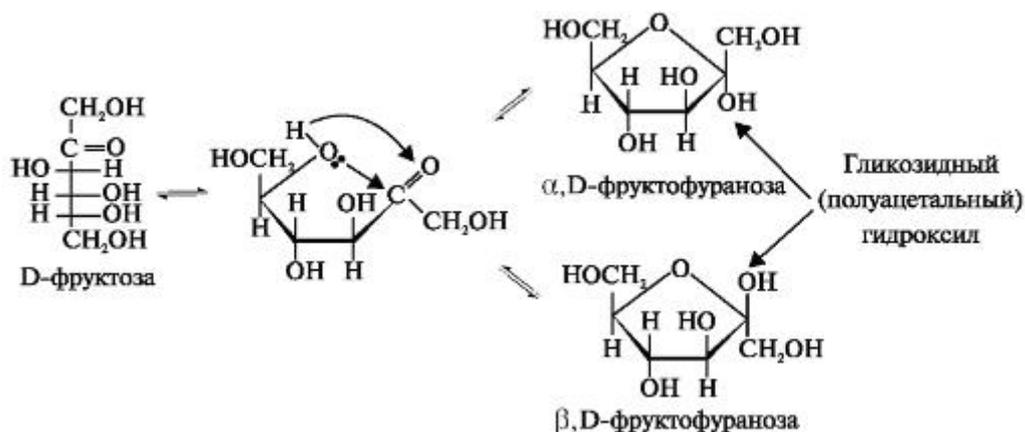


Рис. 2-5. Цепная и циклическая формы D-фруктозы

Образование циклической формы сопровождается появлением дополнительного хирального центра и новой гидроксильной группы, которую также называют *гликозидной*, или *полуацетальной*. Этот атом углерода называют аномерным, а образующиеся при этом  $\alpha$ - и  $\beta$ -формы - *аномерами*. В составе олиго- и полисахаридов  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеры формируют углеводы, различаемые по физико-химическим свойствам и биологическим функциям. Так,  $\alpha$ -D-глюкоза является структурной единицей полисахарида амилозы, а  $\beta$ -D-глюкоза - целлюлозы.

### Таутомерия

Если в образовании цикла участвует гидроксильная группа пятого атома углерода, то образуются шестичленные циклы. Такие циклы называют *пиранозными*. В тех случаях, когда в образовании циклов участвуют гидроксильные группы четвертого атома углерода, формируются пятичленные циклы, которые называют *фуранозными*. При изображении структуры моносахаридов часто пользуются формулами Хеурса, что позволяет отразить пространственную структуру молекулы. При написании формулы пиранозные и фуранозные циклы изображают в виде плоских шести- и пятиугольников, лежащих перпендикулярно плоскости бумаги. Углеродные атомы цикла, как правило, не пишут, а связи, находящиеся ближе к читателю, изображают более жирными линиями. Заместители располагают выше или ниже плоскости кольца.

В кристаллическом состоянии моносахариды существуют в виде одной из циклических форм. Например, из водного раствора D-глюкоза кристаллизуется в виде  $\alpha$ - и  $\beta$ -D-глюкопиранозы. При растворении в воде цикл раскрывается с образованием цепной формы, которая преобразуется в  $\alpha$ - и  $\beta$ -формы пиранозных и фуранозных циклов. Через некоторое время в растворе устанавливается равновесие из пяти таутомерных форм, которые самопроизвольно могут переходить друг в друга (рис. 2-6).

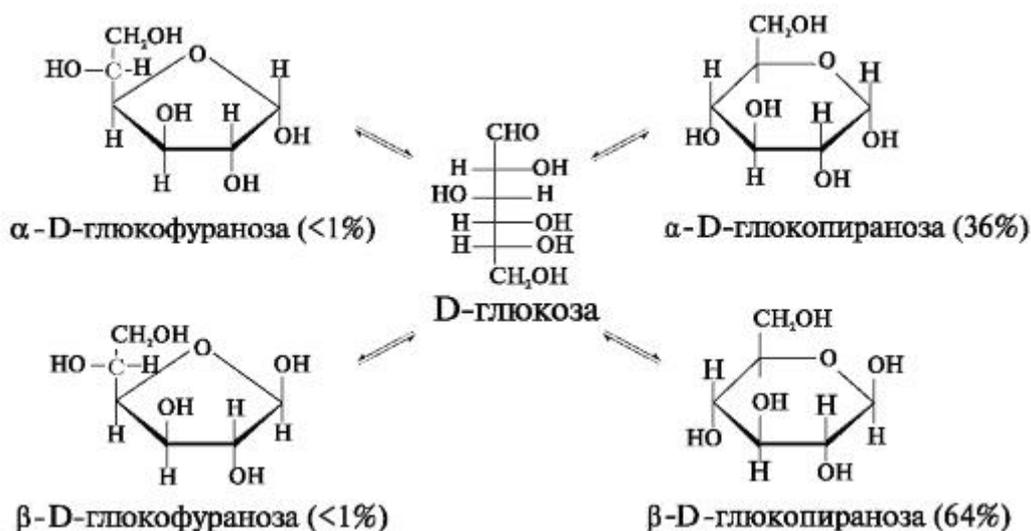


Рис. 2-6. Таутомерные формы D-глюкозы

### Конформация моносахаридов

Под конформациями молекул и, в частности моносахаридов, понимают различные пространственные формы, возникающие вследствие свободного вращения атомных групп вокруг простых одинарных связей или при наличии цикла в результате изменения положения отдельных частей цикла пиранозы. Моносахариды существуют главным образом в наименее напряженной форме *кресла*, а в некоторых случаях возможно существование конформации *лодки* (рис. 2-7). Расположение групп в экваториальном положении обеспечивает стабильность молекулы. Этими свойствами обладает  $\beta$ -D-глюкоза.

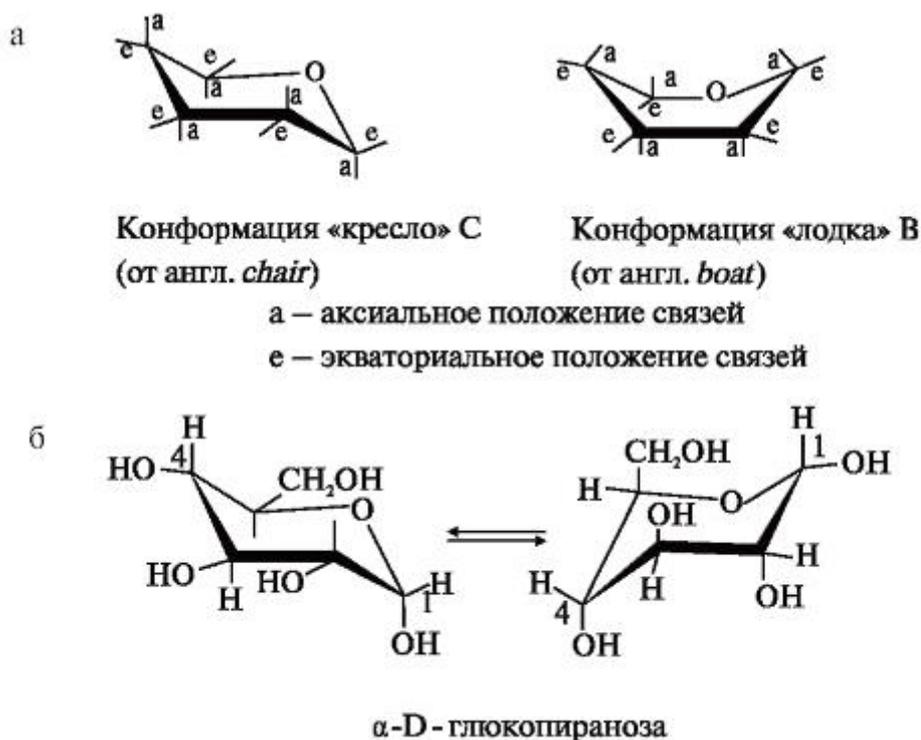


Рис. 2-7. Конформации пиранозного цикла: а - кресла и лодки пиранозного цикла гексозы; б - две возможные конформации кресла  $\alpha$ -D-глюко-пиранозы

#### Химические свойства и производные моносахаридов

Моносахариды вступают во многие химические реакции, характерные для содержащихся в их составе функциональных групп. Как спирты, они могут превращаться в простые эфиры, реагировать с кислотами и их производными с образованием сложных эфиров. Как соединения, содержащие карбонильную группу, они могут легко окисляться и восстанавливаться и вступать в реакции нуклеофильного присоединения. При окислении  $C_1$ -глюкозы образуется D-глюконовая кислота, а при окислении  $C_6$ -глюкозы - D-глюкуроновая и L-идурононовая кислоты (рис. 2-8).

Фосфорные эфиры глюкозы, фруктозы, галактозы и других моносахаридов являются важными промежуточными метаболитами клетки. Рибозо-5-фосфат входит в состав нуклеотидов.

Аминосакхара, такие, как D-глюкозамин и D-галактозамин, содержат аминогруппу в  $C_2$ -положении. Они найдены во многих олиго- и полисахаридах (рис. 2-9).

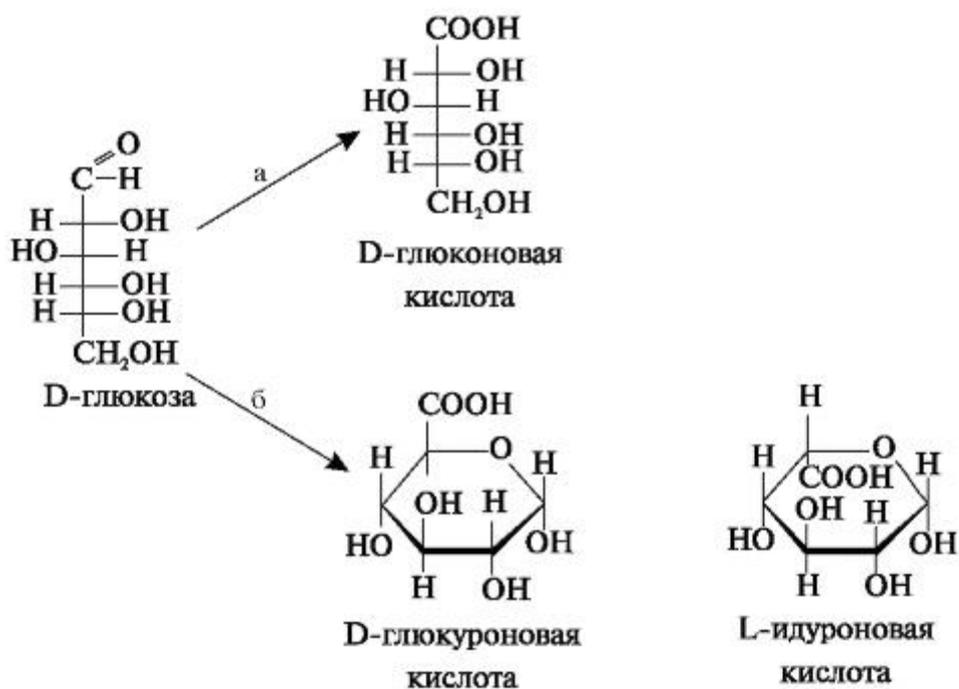


Рис. 2-8. Окисление глюкозы: а - по  $C_1$  до D-глюконовой кислоты; б - по  $C_6$  до D-глюкуроновой и L-идуруновой кислот

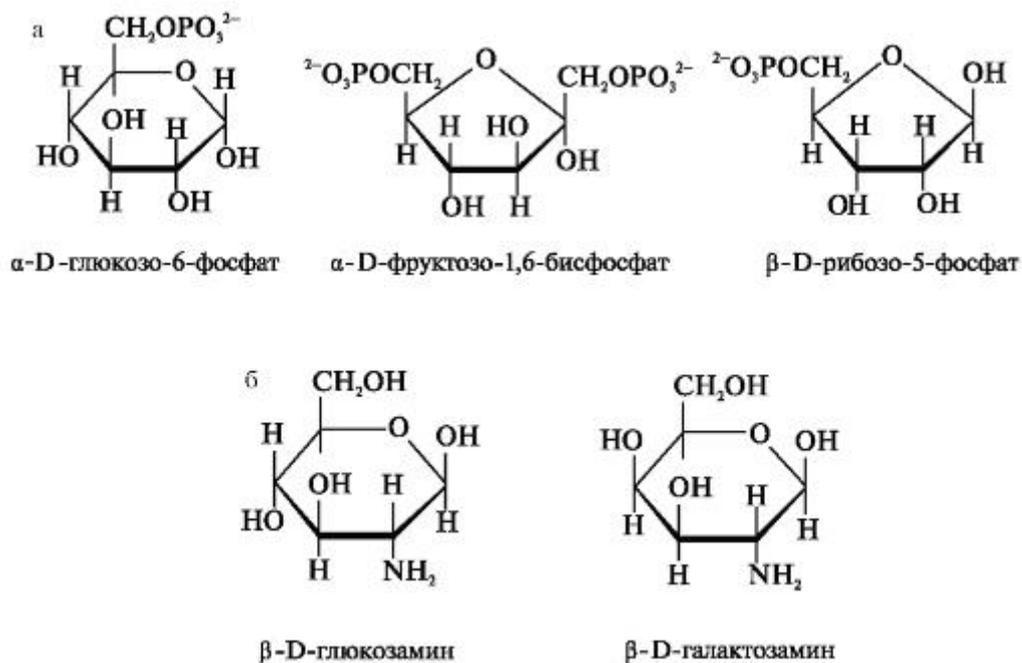


Рис. 2-9. Структура: а - фосфорных эфиров некоторых моносахаридов; б - аминсахаров

Мурамовая и нейраминовая кислоты являются компонентами полисахаридов клеточных мембран высших организмов, а также бактериальных стенок. N-ацетильные производные нейраминовой кислоты называют сиаловыми

кислотами (рис. 2-10). Сиаловые кислоты входят в состав сложных белков и липидов, хорошо связывают воду, защищают белки от неблагоприятных физико-химических воздействий и придают им адгезивные свойства, т.е. способность связываться с другими, прежде всего высокомолекулярными соединениями.

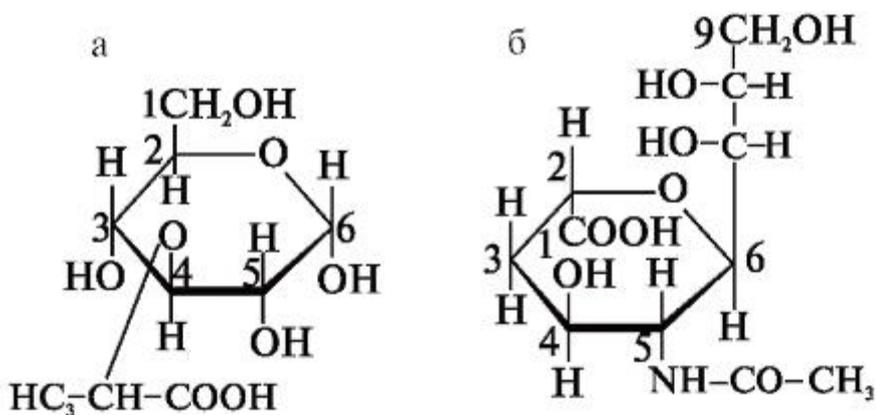


Рис. 2-10. Структура кислот: а - мурамовой; б - N-ацетил-D-нейраминовой

*В записную книжку врача*

### Сахароспирты

Сахароспирты образуются в процессе восстановления моносахаридов. Они имеют сладкий вкус, и их относят к сахарозаменителям (рис. 2-11).

Сорбитол, маннитол и ксилитол из-за отсутствия в полости рта ферментов, участвующих в их превращениях, часто используют как подсластители в напитках и жевательных резинках. Их применение позволяет снизить риск развития кариеса зубов. Их также рекомендуют включать в пищевой рацион больным сахарным диабетом.

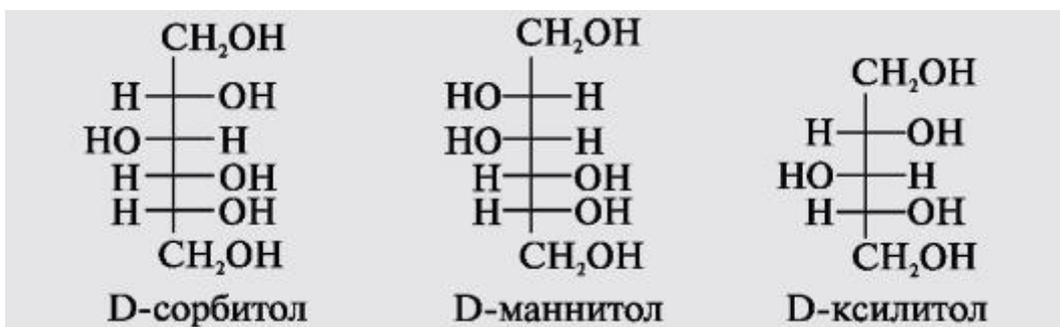


Рис. 2-11. Сахарозаменители

### ОЛИГОСАХАРИДЫ

Олигосахариды построены из остатков моносахаридов (от 2 до 10), соединенных гликозидными связями. Каждый моносахаридный остаток в олигосахариде может находиться в  $\alpha$ - или  $\beta$ -форме, в виде фуранозного или пиранозного цикла и соединяется гликозидной связью с любой гидроксильной группой соседнего остатка. Положение и направление гликозидной связи указывают номерами углеродных атомов, у которых произошло замещение. Буквами  $\alpha$  и  $\beta$  обозначают положение полуацетального гидроксила. Довольно часто используют сокращенную форму записи, когда моносахаридные остатки обозначают тремя первыми латинскими буквами их названия (для глюкозы - Glc, галактозы - Gal). В отечественной литературе остаток глюкозы обозначают буквой Г, галактозы - Гал, фруктозы - Фр.

В зависимости от числа моносахаридных остатков, входящих в состав молекул олигосахаридов, различают дисахариды, трисахариды, тетрасахариды и т.д.

Олигосахариды, содержащие два моносахаридных остатка, называют *дисахаридами*. Среди дисахаридов наиболее распространены мальтоза, лактоза, сахароза и изомальтоза. Мальтозу и изомальтозу называют гомодисахаридами, так как они состоят из двух остатков глюкозы (рис. 2-12).

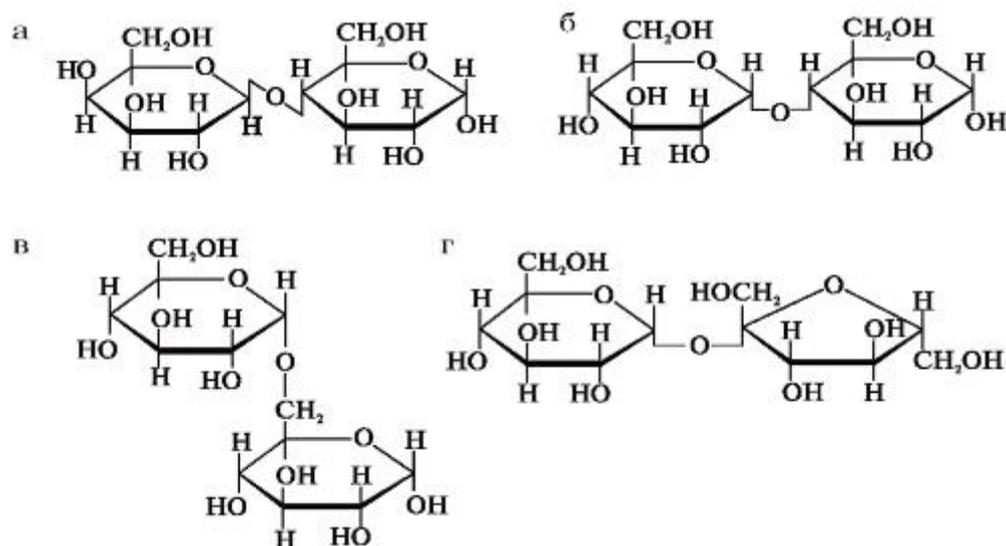


Рис. 2-12. Структура дисахаридов: а - лактозы; б - мальтозы; в - изомальтозы; г - сахарозы

*Мальтоза* (О- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-глюкопираноза) - солодовый сахар, состоящий из двух остатков  $\alpha$ -D-глюкозы. Мальтоза может

образовываться в процессе ферментативного гидролиза крахмала или гликогена. Поскольку в молекуле мальтозы у второго остатка глюкозы имеется свободный полуацетальный гидроксил, то она обладает восстанавливающими свойствами. В нативных молекулах мальтозы оба остатка глюкозы находятся в конформации кресла.

*Изомальтоза* (O- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-глюкопираноза) - дисахарид, образующийся при гидролизе некоторых полисахаридов. Входит в состав амилопектиновой фракции крахмала и гликогена, в котором остатки глюкозы соединены  $\alpha$ -(1-6)-гликозидной связью.

*Лактоза* (O- $\beta$ -D-галактопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-глюкопираноза) - молочный сахар. Синтезируется секреторными клетками желез млекопитающих в период лактации и содержится в молоке в количестве 2-8%. Из женского молока выделено более десяти олигосахаридов, структурным фрагментом которых является лактоза. Благодаря присутствию в молекуле свободного полуацетального гидроксила лактозу относят к восстанавливающим дисахаридам.

*Сахароза* (O- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-фруктофуранозид) - свекловичный или фруктовый сахар. Сахароза - широко распространенный резервный углевод растений, который образуется в процессе фотосинтеза. В отличие от других дисахаридов, сахароза не имеет свободного полуацетального гидроксила и поэтому не обладает восстанавливающими свойствами. Она очень легко гидролизуется с высвобождением глюкозы и фруктозы.

*Целлобиоза* (O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-глюкопираноза) образуется при кислотном гидролизе целлюлозы.

*В записную книжку врача* Другие олигосахариды

В организмах прокариотов и эукариотов встречаются и другие олигосахариды. Например, раффиноза - трисахарид, состоящий из остатков D-галактозы, D-глюкозы и D-фруктозы.

Антибиотики из группы аминогликозидов, к которым относятся стрептомицин, неомицин, канамицин и др., содержат олигосахаридные фрагменты, образованные аминасахарами, соединенными с помощью гликозидных связей с гексозами.

## ПОЛИСАХАРИДЫ

Полисахаридами называют полимерные углеводы, построенные из остатков моносахаридов, соединенных гликозидными связями. Самыми распространенными моносахаридами, входящими в состав полисахаридов, являются гексозы (глюкоза, галактоза, манноза), а также пентозы (арабиноза и ксилоза). Линейные полисахариды имеют по одному восстанавливающему и невосстанавливающему концу. В разветвленных полисахаридах имеются только один восстанавливающий конец и много невосстанавливающих. Восстанавливающий конец содержит свободный полуацетальный гидроксил, и именно к нему могут присоединяться молекулы неуглеводной природы - пептиды, белки и липиды. Все полисахариды выполняют две важные биологические функции: структурную (опорную, скелетную) и резервную.

*Структурные полисахариды*, в свою очередь, можно разделить на две группы: полисахариды, образующие волокнистые структуры, и гелеобразующие. К первой группе относят полисахариды, которые в клеточных стенках бактериальных и растительных клеток образуют протяженные цепи и укладываются в прочные волокна или пластины. Общая особенность этой группы - наличие  $\beta$ -гликозидной связи. К таким полисахаридам относят целлюлозу, хитин и др. К гелеобразующим принадлежат полисахариды с разнообразными гликозидными связями. Эта группа полисахаридов обеспечивает эластичность клеточных стенок и межклеточную адгезию в тканях. Они представлены гликозаминогликанами. *Резервные полисахариды* являются для клетки источником энергии и метаболитов. Это крахмал и гликоген. Быстрой мобилизации резервных полисахаридов способствует наличие в них лабильных  $\alpha$ -гликозидных связей.

В зависимости от состава все полисахариды делят на две большие группы: гомополисахариды и гетерополисахариды.

### Гомополисахариды

Гомополисахариды построены из идентичных моносахаридов. *Крахмал* - резервный полисахарид растений. Он представлен двумя фракциями - амилозой и амилопектином (рис. 2-13, 2-14).

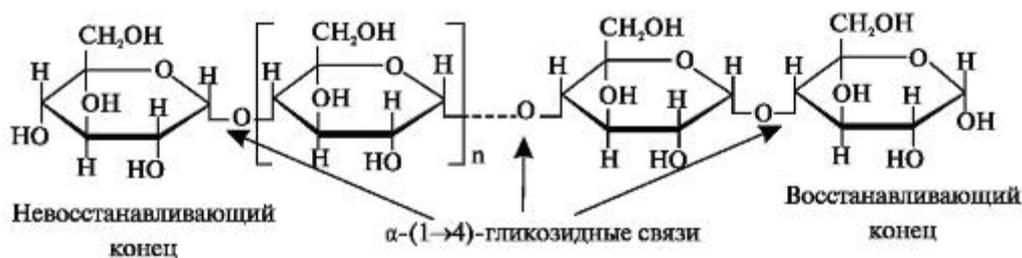


Рис. 2-13. Структура амилозы в структуре крахмала. Остатки  $\alpha$ -D-глюкозы связаны  $\alpha$ -(1→4)-гликозидными связями

*Амилоза* состоит главным образом из 200-1000 остатков  $\alpha$ -D-глюкопиранозы, соединенных  $\alpha$ -(1→4)-гликозидными связями, и имеет линейное строение. Остатки  $\alpha$ -D-глюкопираноз в амилозе, амилопектине и гликогене находятся в конформации кресла. Именно поэтому амилоза, а также линейные участки цепей в молекулах амилопектина и гликогена стремятся принять спиральную конформацию. Это способствует образованию плотных гранул, их и обнаруживают в большинстве растительных и животных клеток. Макромолекула амилозы свернута в виде спирали диаметром 1 нм, в которой на один виток приходится 6-7 остатков глюкозы.

*Амилопектин* имеет разветвленное строение. Молекула состоит из фрагментов амилозы, содержащих около 20 остатков  $\alpha$ -D-глюкозы, связанных между собой в точке ветвления  $\alpha$ -(1→6)-гликозидными связями (рис. 2-14).

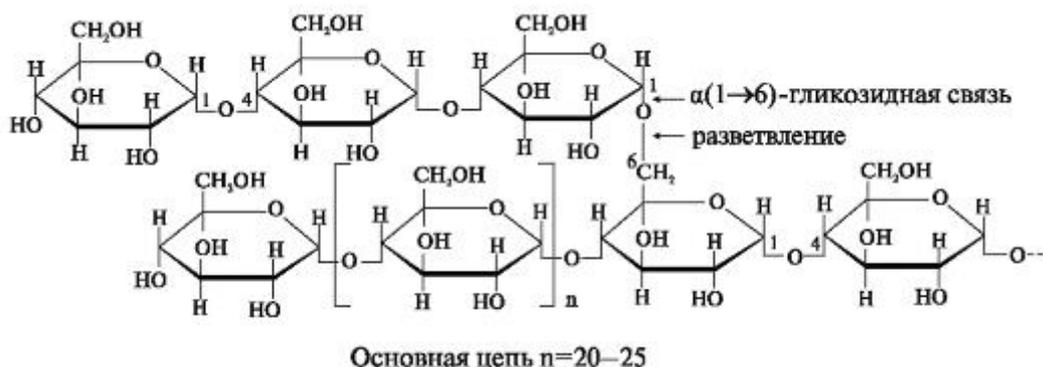


Рис. 2-14. Фрагмент молекулы амилопектина в структуре крахмала

*Гликоген* - резервный полисахарид тканей человека и животных. Основные его запасы сосредоточены в печени (до 6%) и мышцах (до 1,5%).

Гликоген имеет значительное структурное сходство с амилопектином, но в отличие от него обладает большей разветвленностью и более компактной

упаковкой молекулы. По форме молекула гликогена приближается к сферической и в клетках находится в виде гранул. Во внутренних частях молекулы разветвления расположены через 3-4 моносахаридных остатка, но к периферии количество  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-гликозидных связей уменьшается. Концевые остатки гликогена ковалентно связаны с остатками аминокислот, в основном с серином и треонином. В мышцах и печени гликоген через гидроксильную группу остатка тирозина связан с белком *гликогенином*. Сильное разветвление молекулы гликогена способствует более эффективному отщеплению большого количества остатков глюкозы в экстремальных ситуациях. Гликоген также участвует в регуляции водного баланса клеток.

*Целлюлоза* - основной высокомолекулярный линейный неразветвленный полисахарид клеточных стенок растений и микроорганизмов, состоящий из остатков  $\beta$ -D-глюкопиранозы, связанных между собой  $\beta$ -(H4)-гликозидными связями (рис. 2-15).

Остатки  $\beta$ -D-глюкопираноз в составе целлюлозы находятся в конформации кресла, и благодаря этому жесткая спираль целлюлозы сильно вытянута и стабилизирована внутримолекулярными водородными связями. Полимерные цепи соединяются друг с другом боковыми поверхностями и удерживается межмолекулярными водородными связями. Так образуются высокоупорядоченные низкомолекулярные структурные фибриллы. Упаковка цепей обуславливает высокую механическую прочность, волокнистость, нерастворимость в воде и химическую инертность целлюлозы.

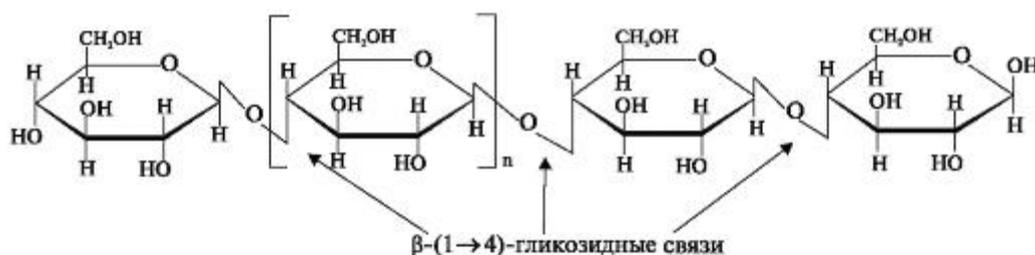


Рис. 2-15. Фрагмент молекулы целлюлозы

### Гетерополисахариды

Гетерополисахариды состоят из двух или более видов моносахаридных остатков. К этой группе углеводов относят *гликозаминогликаны*.

Они построены из уроновых кислот и аминсахаров, аминогруппы которых обычно ацетилированы. Между собой дисахаридные единицы в гликозаминогликанах соединены  $\beta$ -(1→4)-гликозидными связями, а остатки уроновых кислот и сульфатированных гликозаминов, которые в свободном виде не встречаются, -  $\beta$ -(1→3)-гликозидными связями. К несulfатированным гликозаминогликанам относят *гиалуроновую кислоту*. Наличие сульфатных и карбоксильных групп в гликозаминогликанах придает им большой отрицательный заряд и способность связывать воду. Именно поэтому гликозаминогликаны способны набухать и образовывать гели, занимающие большой объем. Они связываются с небольшим количеством белка, образуя *протеогликаны*. Структура дисахаридных единиц, входящих в состав гликозаминогликанов, представлена на рис. 2-16.

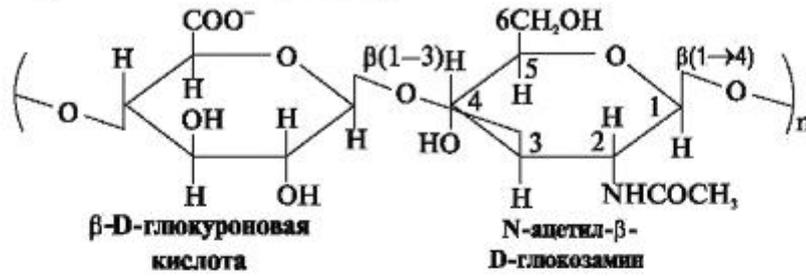
*Хондроитинсульфаты* содержат повторяющиеся дисахаридные единицы, соединенные  $\beta$ -(1→4)-гликозидными связями. Дисахариды построены из глюкуроновой кислоты и сульфатированного  $\beta$ -D-N-ацетилгалактозамина, соединенных между собой  $\beta$ -(1→3)-гликозидными связями. В зависимости от положения сульфатной группы различают хондроитин-4-сульфат и хондроитин-6-сульфат. Одна полисахаридная цепь хондроитинсульфата содержит около 40 повторяющихся дисахаридных единиц. Несмотря на минимальные различия в химической структуре, хондроитинсульфаты существенно отличаются по физико-химическим свойствам и распределению в различных видах соединительной ткани.

*Дерматансульфат* сходен по строению с хондроитинсульфатом. В отличие от последнего, дисахаридный фрагмент дерматансульфата содержит вместо  $\beta$ -D-глюкуроновой кислоты остаток  $\beta$ -L-идуроновой кислоты.

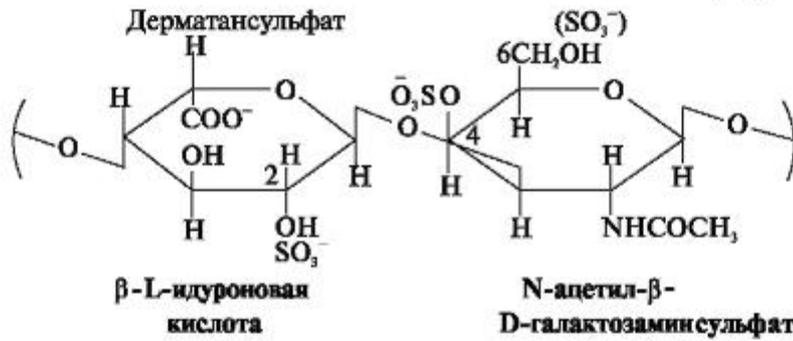
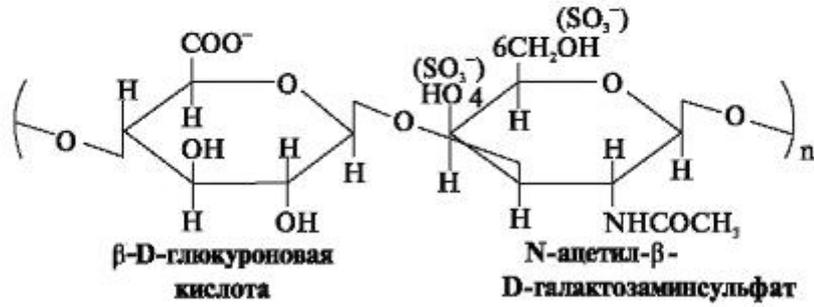
*Кератансульфаты* - наиболее гетерогенная группа гликозаминогликанов. Они отличаются друг от друга по суммарному содержанию углеводов и распределению в разных тканях. В отличие от всех остальных гликозаминогликанов, кератансульфаты вместо уроновой кислоты содержат остатки  $\beta$ -D-галактозы, которые связаны  $\beta$ -(1→4)-гликозидными связями с остатками  $\beta$ -D-N-ацетилглюкозамин-6-сульфата. Между собой дисахаридные фрагменты соединены  $\beta$ -(1→3)-гликозидными связями.

*Гепарин* состоит из повторяющихся дисахаридных единиц, в состав которых входят остатки D-глюкозамина, D-глюкуроновой или L-идуруновой кислоты, причем в количественном отношении преобладает L-идуруновая кислота.

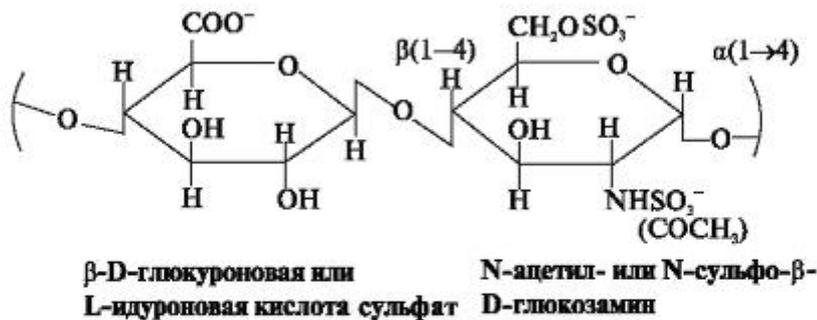
Гиалуроновая кислота ( $n < 50000$ )



Хондроитинсульфат ( $n < 250$ )



Гепарансульфат ( $n=15-30$ )



Кератансульфат ( $n=20-40$ )

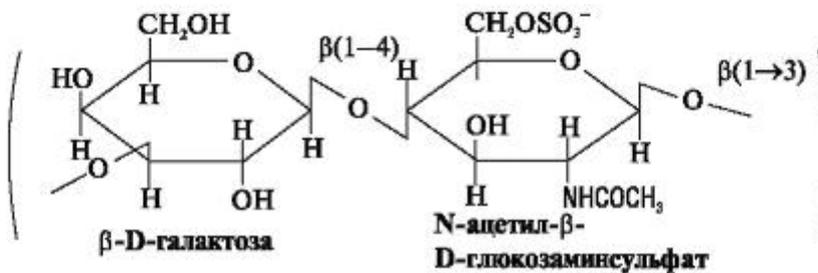


Рис. 2-16. Структура повторяющихся дисахаридных единиц в гликозаминогликанах.

Остатки производных моносахаридов внутри дисахаридного фрагмента и дисахариды связаны между собой  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями.

Аминогруппа большинства остатков глюкозамина сульфатирована.

Сульфатные группы находятся как у ряда остатков L-идуроновой кислоты, так и у C<sub>2</sub>- и C<sub>6</sub>-глюкозаминных остатков.

*Гепарансульфат* построен из глюкуроновой кислоты и N-ацетил-глюкозамина и содержит большое количество сульфатных групп.

*Гиалуроновая кислота* представлена дисахаридными остатками, которые соединены  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями. В дисахаридных фрагментах остатки  $\beta$ -D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамина, связаны между собой  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-гликозидными связями. Гиалуроновая кислота имеет высокую молекулярную массу и существует как свободная молекула, не соединенная ковалентными связями, ни с белками, ни с другими веществами. Связывая воду, она образует гелеподобную структуру, обеспечивающую барьерную функцию.

### ГЛАВА 3. СТРУКТУРА ЛИПИДОВ

Вопросы по теме

- Классификация липидов.
- Наиболее распространенные жирные кислоты, их строение и номенклатура.
- Свойства и функции природных триацилглицеролов.
- Структура и функции глицерофосфолипидов.
- Стероиды, их строение и биологическая роль.
- Жирорастворимые витамины.

#### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПИДОВ

В настоящее время существует несколько определений липидов, и только один главный признак позволяет объединить разные по строению органические соединения в одну группу. Итак, липиды - класс природных биологических молекул, обладающих преимущественно *гидрофобными*

*свойствами.* Они нерастворимы в воде и хорошо растворяются в неполярных растворителях (эфире, спирте, хлороформе и др.).

В организме здорового взрослого человека содержание липидов достигает 6-10 кг и более, и их представители выполняют ряд важных функций, в числе которых:

- наиболее компактная форма депонирования энергии в организме;
- энергетическая функция - при окислении 1 г липидов выделяется 39 кДж энергии, что в 2 раза выше, чем при сгорании 1 г углеводов;
- защитная функция - сформированный жировой слой из триацилглицеролов обладает выраженными термоизоляционными свойствами и предохраняет организм от переохлаждения, механических и физических повреждений;
- пластическая функция - фосфолипиды образуют комплексы с белками и являются структурными компонентами биомембран (от состава и свойств мембранных липидов зависят состояние мембран и активность мембраносвязанных ферментов);
- регуляторная функция - липиды являются предшественниками гормонов общего и местного действия (стероидных гормонов, эйкозаноидов - простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов и др.), а также вторичных посредников - инозитолтрифосфата и диацилглицеролов;
- растворение и всасывание ряда других молекул, в частности жирорастворимых витаминов.

Липиды образуются совместными действиями многочисленных ферментов, их переносят белки, они узнаваемы рецепторами. Целый раздел современной науки - *липидомика* - посвящен изучению структуры липидных молекул и их биологических свойств, участию в физиологических и патологических процессах. На современном этапе развития липидомики липиды подразделяются на 8 категорий:

- жирные кислоты;
- глицеролипиды;
- глицерофосфолипиды;
- сфинголипиды;

- стероидные липиды;
- пренольные липиды;
- гликолипиды;
- поликетиды.

Все эти вещества представлены молекулами, которые относятся к различным классам и подклассам органических веществ, но имеют общее сходство химической структуры.

## ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

Жирные кислоты - карбоновые кислоты с длинной алифатической цепью. В настоящее время известны свыше 200 природных жирных кислот, но наиболее часто в организме человека встречаются примерно 9 из них. Они редко существуют в свободном виде и, образуя эфирные или амидные связи, входят в состав различных групп липидов. Жирные кислоты, присутствующие в клетках человека, обладают рядом общих структурных особенностей:

- это монокарбоновые кислоты, содержащие линейные углеводородные цепи с общей формулой  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}]$ ;
- часто содержат четное число атомов углерода (от 14 до 24);
- бывают как насыщенными, так и ненасыщенными (на долю ненасыщенных кислот в липидах приходится примерно три четверти всех жирных кислот);
- как правило, природные ненасыщенные жирные кислоты находятся в  $\wedge$ -ис-конфигурации.

### Номенклатура жирных кислот

Каждую жирную кислоту можно описать молекулярной формулой, где первое число указывает общее количество углеродных атомов в жирной кислоте, включая карбоксильную группу. Нумерацию углеродных атомов начинают с углерода карбоксильной группы, и остальные атомы нумеруют последовательно, начиная с этого углерода. Углеродный атом, примыкающий к атому углерода карбоксильной группы, обозначают буквой греческого алфавита  $\alpha$ , а остальные углеродные атомы - буквами  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  и т.д. Последний углеродный атом, наиболее удаленный от углерода

карбокисильной группы, обозначают как ω-атом (по «имени» последней буквы греческого алфавита). Количество двойных связей указывает цифра, поставленная после двоеточия, а положение двойных связей обозначают добавлением к двум цифрам буквы ω или n. Возможна еще одна форма записи, при которой положение двойных связей указывают, начиная с карбокисильного конца, символом Δ. Например, линоленовая кислота может быть записана как C18:3 ω3, или C18:3 n-3, а также 18:3<sup>Δ</sup> (9, 12, 15). Некоторые наиболее распространенные представители жирных кислот приведены в табл. 3-1, 3-2.

Таблица 3-1. Представители наиболее распространенных в организме человека насыщенных жирных кислот

Количество атомов углерода	Наименование кислоты	Символ	Молекулярная формула
12	Лауриновая	12:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -COOH
14	Миристиновая	14:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -COOH
16	Пальмитиновая	16:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -COOH
18	Стеариновая	18:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -COOH
20	Арахидиновая	20:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> -COOH
22	Бегеновая	22:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>20</sub> -COOH
24	Лигноцериновая	24:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>22</sub> -COOH

Таблица 3-2. Представители ненасыщенных жирных кислот

Количество атомов углерода	Наименование кислоты	Символ	Молекулярная формула
<b>Мононенасыщенные жирные кислоты</b>			
16	Пальмитоолеиновая	16:1 n-7	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH
18	Олеиновая	18:1 n-9	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH
<b>Полиненасыщенные жирные кислоты</b>			
18	α-Линоленовая	18:3 n-3	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -(CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -COOH
18	γ-Линоленовая	18:3 n-6	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -COOH
20	Арахидоновая	20:4 n-6	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -COOH
20	Эйкозопентае-	20:5 n-3	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> -COOH

	новая		
--	-------	--	--

### Структура жирных кислот

По данным рентгеноструктурного анализа монокристаллов высших жирных кислот, насыщенные углеводородные цепи представляют собой зигзагообразные структуры, в которых угол между С-С-связями лежит в пределах 110-114°. Угол 123° характерен для двойной связи природного цис-изомера кислоты. Дисконфигурация двойной связи придает углеводородной цепи укороченный вид за счет изгиба, что существенно влияет на свойства жирных кислот (рис. 3-1). С увеличением числа двойных связей значительно снижается температура плавления жирных кислот и возрастает их растворимость в неполярных растворителях.

Все природные ненасыщенные жирные кислоты при комнатной температуре находятся в жидкокристаллическом состоянии. В водном растворе жирные кислоты образуют мицеллы, конформация которых зависит от длины углеводородной цепи, числа двойных связей, соотношения полярной и неполярной частей молекулы. В обычных мицеллах гидрофильные полярные головки ( $-\text{COO}^-$ ) жирных кислот обращены в сторону водной фазы, тогда как неполярные углеводородные цепи образуют гидрофобное ядро, изолированное от водного окружения. Изгиб в углеводородной цепи ненасыщенной жирной кислоты и большой объем этой кислоты приводят к тому, что они упаковываются не так плотно, как насыщенные жирные кислоты.

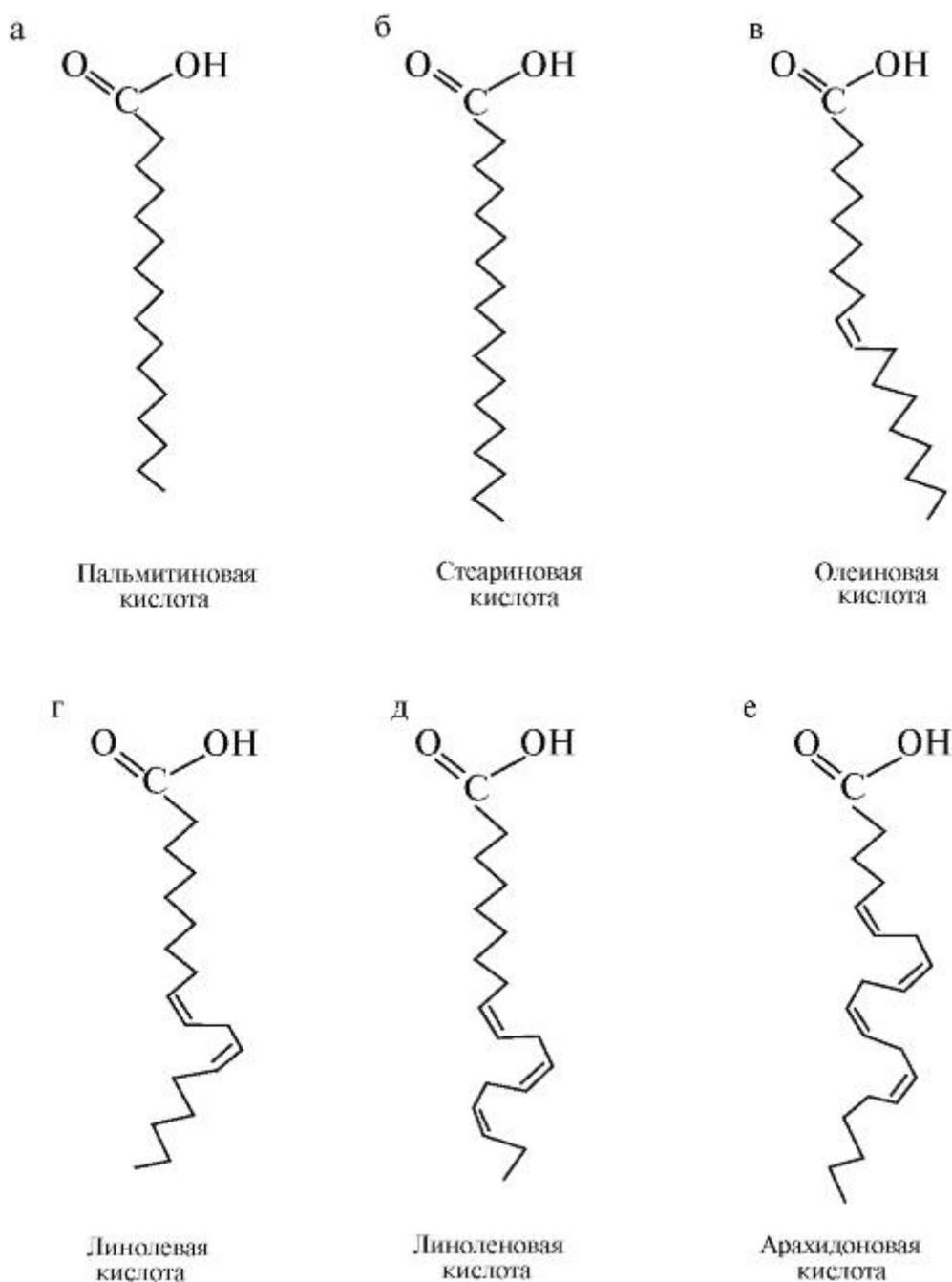


Рис. 3-1. Структурные формулы некоторых жирных кислот: а, б - насыщенные жирные кислоты; в - мононенасыщенная жирная кислота; г, д, е - полиненасыщенные жирные кислоты. Дис-двойные связи вызывают изгиб углеводородных цепей ненасыщенных жирных кислот

*В записную книжку врача*

Полиненасыщенные жирные кислоты (линолевая, линоленовая, арахидоновая) не синтезируются в организме человека, а поступают только с пищевыми продуктами. Они для человека незаменимы и поэтому получили название *эссенциальных* жирных кислот, которые также объединяют

термином витамин F. Насыщенные (пальмитиновая, стеариновая) и ряд мононенасыщенных жирных кислот могут синтезироваться в организме из углеводов и углеродного скелета аминокислот.

### ГЛИЦЕРОЛИПИДЫ

Значительное количество жирных кислот в тканях находится в составе глицеролипидов. Глицеролипиды - сложные эфиры жирных кислот и трехатомного спирта глицерола, в котором этерифицированы одна, две или три гидроксильные группы глицерола.

В случае этерификации одной или двух гидроксильных групп глицерола образуются соответственно моно- и диацилглицеролы (МАГ и ДАГ), а трех гидроксильных групп - триацилглицеролы (ТАГ), которые также называют триглицеридами. В названии глицеролипидов указывают входящие в их состав радикалы жирных кислот, цифрами отмечая положение этих радикалов у соответствующих атомов углерода глицерола (рис. 3-2).

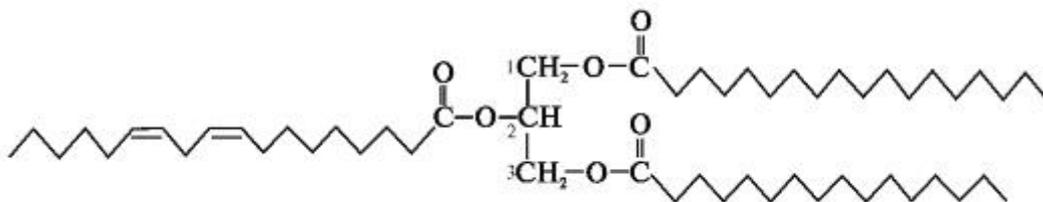


Рис. 3-2. Формула триацилглицерола (1-стеароил-2-линолеил-3-пальмитоил-Sn-глицерол)

Глицеролипиды не содержат ионных групп, поэтому их относят к нейтральным липидам. Физико-химические свойства глицеролипидов зависят от присутствующих в них жирных кислот. Чем больше в глицеролипидах остатков ненасыщенных и короткоцепочечных жирных кислот, тем ниже температура плавления, и наоборот, при наличии насыщенных длинноцепочечных жирных кислот температура точки плавления ТАГ будет выше. Большая часть ТАГ запасается в жировой ткани, а молекулы МАГ и ДАГ, как правило, высвобождаются в процессе гидролиза ТАГ.

## ГЛИЦЕРОФОСФОЛИПИДЫ

Глицерофосфолипиды - производные фосфатидной кислоты. Она представляет собой 1,2-диацилглицерол, у которого третий атом углерода в молекуле глицерола этерифицирован фосфатной группой (рис. 3-3).

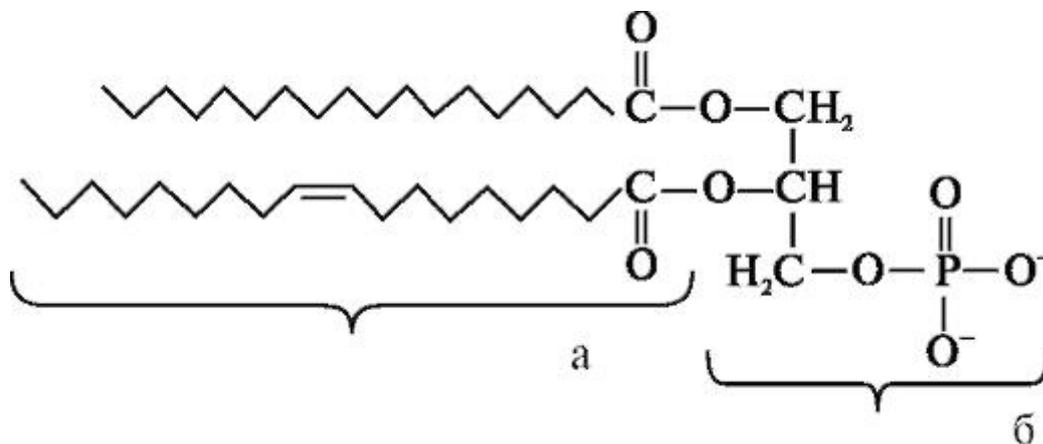


Рис. 3-3. Структурная формула фосфатидной кислоты, главного компонента глицерофосфолипидов: а - неполярные (гидрофобные) хвосты; б - полярная (гидрофильная) головка

Разнообразие глицерофосфолипидов связано с присоединением различных полярных групп (холина, серина, этаноламина, инозитола) к фосфатному остатку фосфатидной кислоты и разных жирнокислотных остатков (рис. 3-4). В большинстве случаев глицерофосфолипиды содержат у первого атома углерода глицерола ацильный остаток насыщенной, а у второго атома углерода - ацильный остаток ненасыщенной жирной кислоты. Молекулы глицерофосфолипидов имеют типичную *амфипатическую структуру*, для которой характерны полярная головка, образованная фосфорной кислотой и другим гидрофильным соединением (холином, серином и др.), и гидрофобные хвосты, представленные углеводородными цепями жирных кислот. Гидролиз связей в молекулах фосфолипидов осуществляют ферменты фосфолипазы А<sub>1</sub> и А<sub>2</sub>, которые расщепляют связи, возникающие между жирнокислотным остатком и гидроксильной группой С-1 и С-2 глицерола соответственно. Фосфолипаза С катализирует гидролиз связи между глицеролом и фосфатом, что приводит к высвобождению ДАГ, а действие фосфолипазы D сопровождается высвобождением фосфатидной кислоты и гидрофильного остатка, в данном случае холина (см. рис. 3-4а).

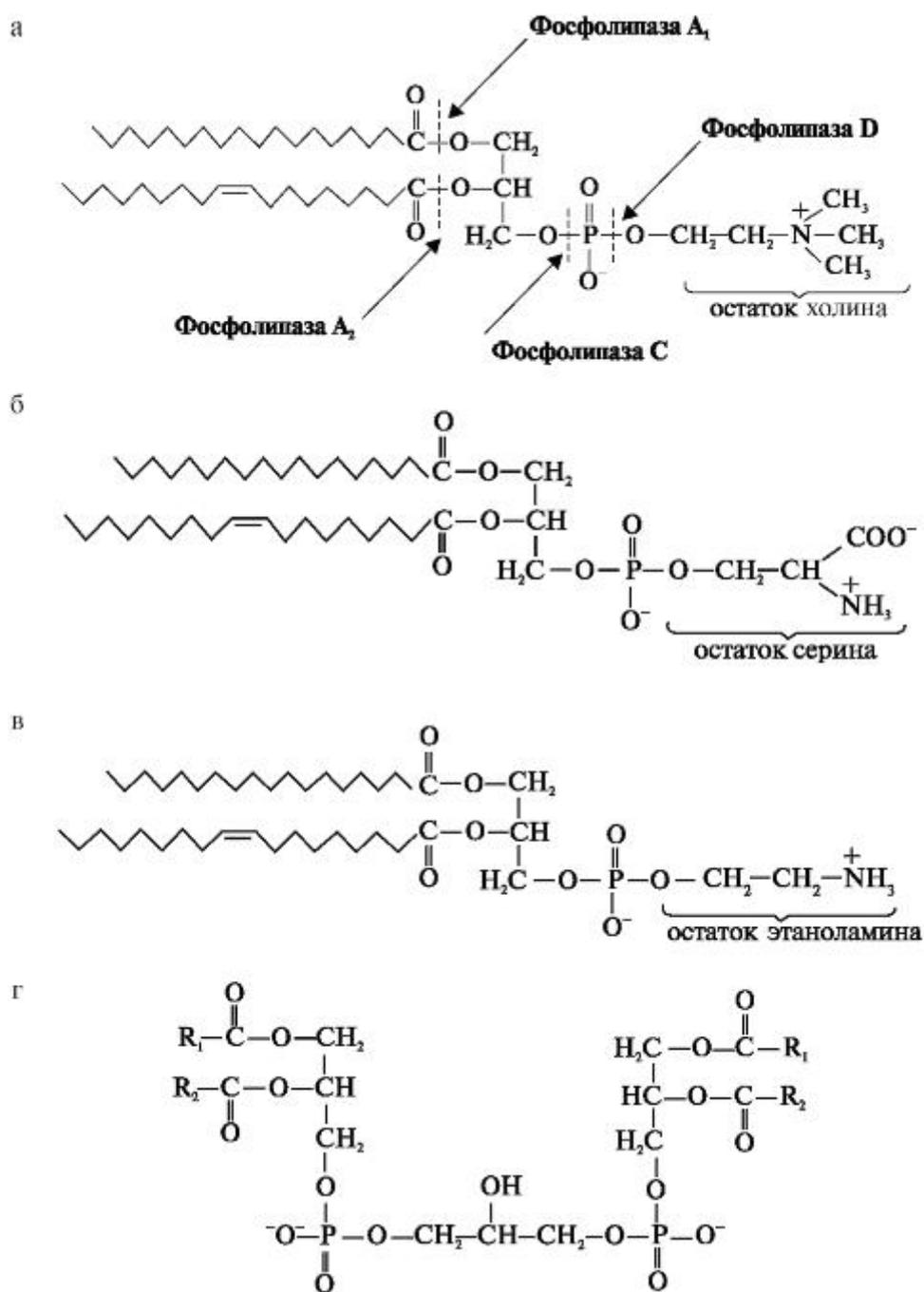


Рис. 3-4. Формулы некоторых мембранных глицерофосфолипидов: а - фосфатидилхолина; б - фосфатидилсерина; в - фосфатидилэтанолamina; г - дифосфатидилглицерола. Ферменты фосфолипазы A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C и Д осуществляют расщепление указанных сложноэфирных связей в молекулах глицерофосфолипидов

Из внутренней мембраны митохондрий кардиомиоцитов человека и животных были выделены кардиолипины (дифосфатидилглицеролы), представляющие молекулу глицерола, связанную с двумя остатками фосфатидной кислоты (см. рис. 3-4г).



*В записную книжку врача*

### Фактор активации тромбоцитов

Фактор активации тромбоцитов (ФАТ) - уникальная сигнальная молекула, относящаяся к глицерофосфолипидам. В отличие от других плазмалогенов, это соединение содержит ацетильный остаток при втором атоме углерода глицерола, поэтому ФАТ лучше растворим в воде по сравнению с остальными липидами. ФАТ содержится в клетках крови и некоторых тканей. Связываясь с мембранными рецепторами, он стимулирует агрегацию тромбоцитов и вызывает расширение сосудов, способствуя развитию воспалительных и аллергических реакций, токсического шока.

### СФИНГОЛИПИДЫ

Сфинголипиды - производные 18-углеродного непредельного аминоспирта сфингозина, который имеет амфипатическую структуру. Присоединение остатка жирной кислоты через амидную связь ко второму углеродному атому сфингозина приводит к образованию *церамида*, предшественника всех сфинголипидов.

К семейству сфинголипидов относят *сфингомиелины*. Только они имеют фосфатную группу, присоединенную к гидроксильной группе при С-1 атоме церамида, и остаток холина. Поэтому их можно классифицировать как фосфолипиды (рис. 3-6). Существует определенное сходство между амфипатической молекулой сфингомиелинов и молекулой фосфатидилхолина. Обе молекулы - цвиттерионы, содержащие положительно заряженный холин, отрицательно заряженный фосфат и два длинных гидрофобных хвоста. Сфингомиелины присутствуют в плазматических мембранах многих клеток млекопитающих и являются главным компонентом миелиновых оболочек некоторых нервных клеток.

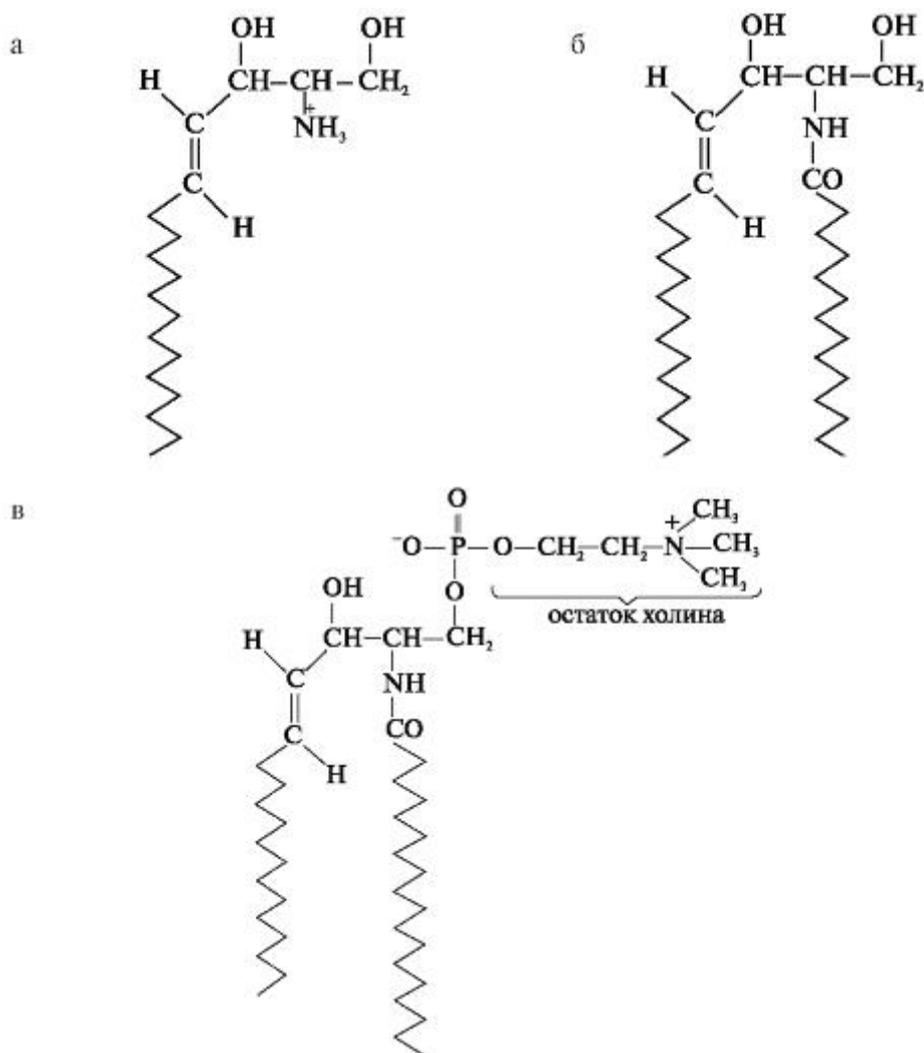


Рис. 3-6. Структурные формулы: а - сфингозина; б - церамида; в - сфингомиелина

### Гликоэфинголипиды

К ним относят цереброзиды, которые содержат один моносахаридный остаток, присоединенный к С-1 атому церамида через  $\beta$ -гликозидную связь. В составе цереброзидов чаще всего встречаются длинноцепочечные жирные кислоты - лигноцериную (С24:0) и нервоновую (С 24:1).

*Галактоцереброзиды* формируются в случае присоединения к церамиду  $\beta$ -D-галактозы, которая и является полярной головкой (рис. 3-7). Они присутствуют в тканях нервной системы и составляют около 15% общего количества липидов миелиновых оболочек. Количество галактоцереброзидов в наружном монослое миелиновой оболочки достигает 40%. Считают, что они играют важную роль в специфическом взаимодействии миелинообразующей клетки и аксона. Этерификация сульфатом С-3 атома

галактозы или глюкозы приводит к образованию цереброзид-сульфатидов, которые встречаются в белом веществе мозга.

*Глюкоцереброзиды* вместо молекулы  $\beta$ -D-галактозы содержат остаток  $\beta$ -D-глюкозы. Они распространены в мембранах клеток многих тканей организма млекопитающих.

*Ганглиозиды* образуют самую сложную группу сфинголипидов. Впервые они были обнаружены в плазматической мембране ганглиозидных клеток нервной ткани, откуда и произошло их название. Характерной особенностью структуры ганглиозидов является наличие одного или нескольких остатков сиаловой кислоты в составе их олигосахаридной группировки.

Олигосахаридные цепи, которые связаны с церамидом, помимо остатков N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты содержат остатки  $\beta$ -D-глюкозы,  $\beta$ -D-галактозы и N-ацетил- $\beta$ -D-галактозамина. Присутствие карбоксильной группы N-ацетилнейраминовой кислоты в составе ганглиозидов придает молекулам отрицательный заряд. Известны более 60 различных ганглиозидов, отличающихся по составу и последовательности углеводных единиц. Все они построены на основе моносиалоганглиозида GM<sub>1</sub>, содержащего один остаток сиаловой кислоты (рис. 3-8). Присоединение дополнительных остатков сиаловых кислот приводит к образованию дисиалоганглиозидов GD<sub>1a</sub> и GD<sub>1b</sub>, а также трисиалоганглиозида GT<sub>1b</sub>. В отличие от других липидов, ганглиозиды способны растворяться не только в органических растворителях, но и в воде, где они образуют мицеллы. Наиболее богат ганглиозидами головной мозг, особенно его серое вещество. Позднее их обнаружили и в других тканях (почках, печени, селезенке, легких и др.).

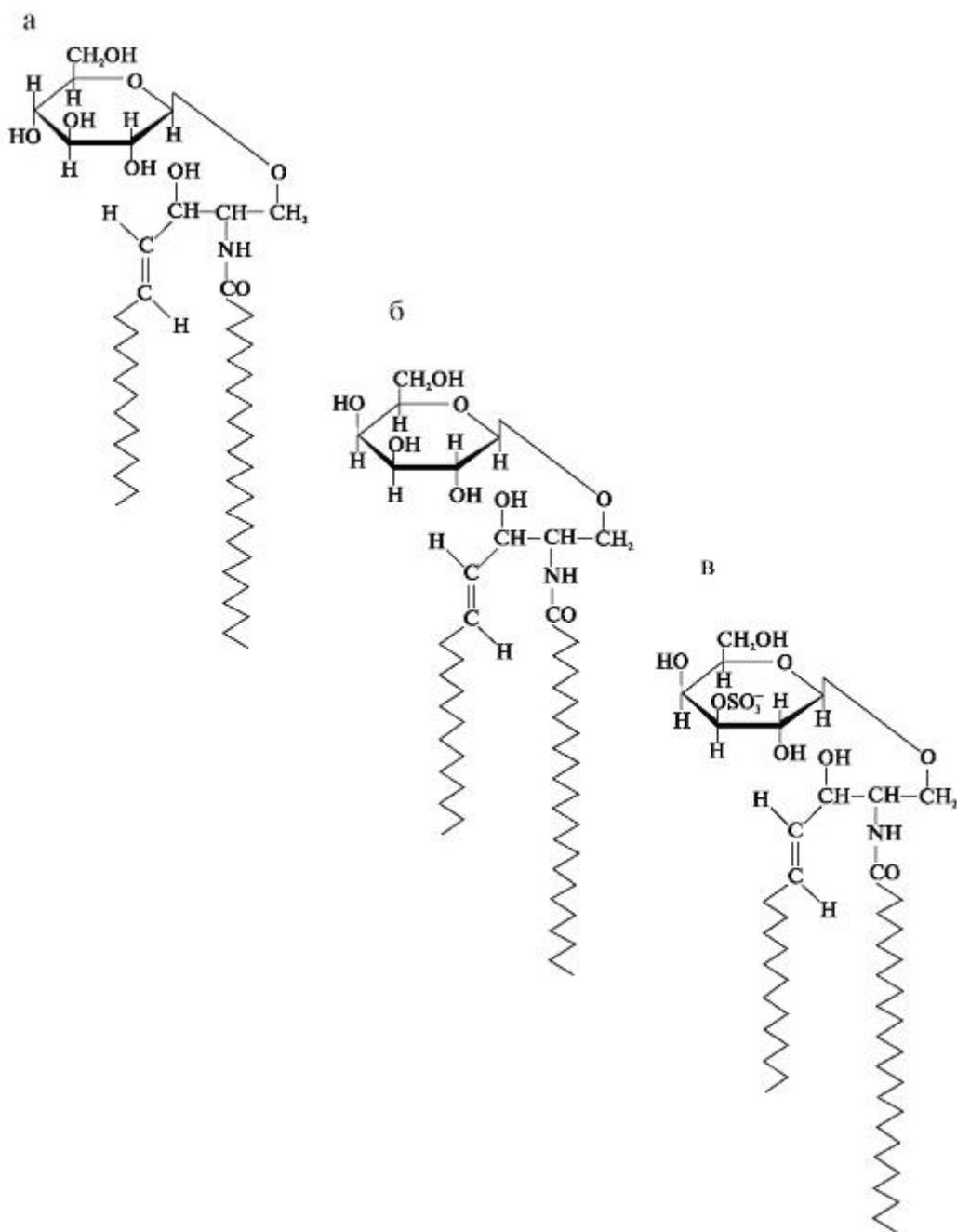


Рис. 3-7. Структурные формулы: а - глюкоцереброзида; б - галактоцереброзида; в - галактоцереброзид-сульфатида

Эти соединения локализуются преимущественно в плазматических мембранах (в наружном монослое) и, по-видимому, в значительной степени определяют контактное торможение, адгезию и электрофоретическую подвижность клеток. Существует предположение, что ганглиозиды активно участвуют в транспорте ионов через мембраны нервных клеток. Они действуют и как поверхностные рецепторы для ряда гормонов гипофиза, а также токсинов ботулизма, столбняка, холеры, дифтерийной палочки и др.

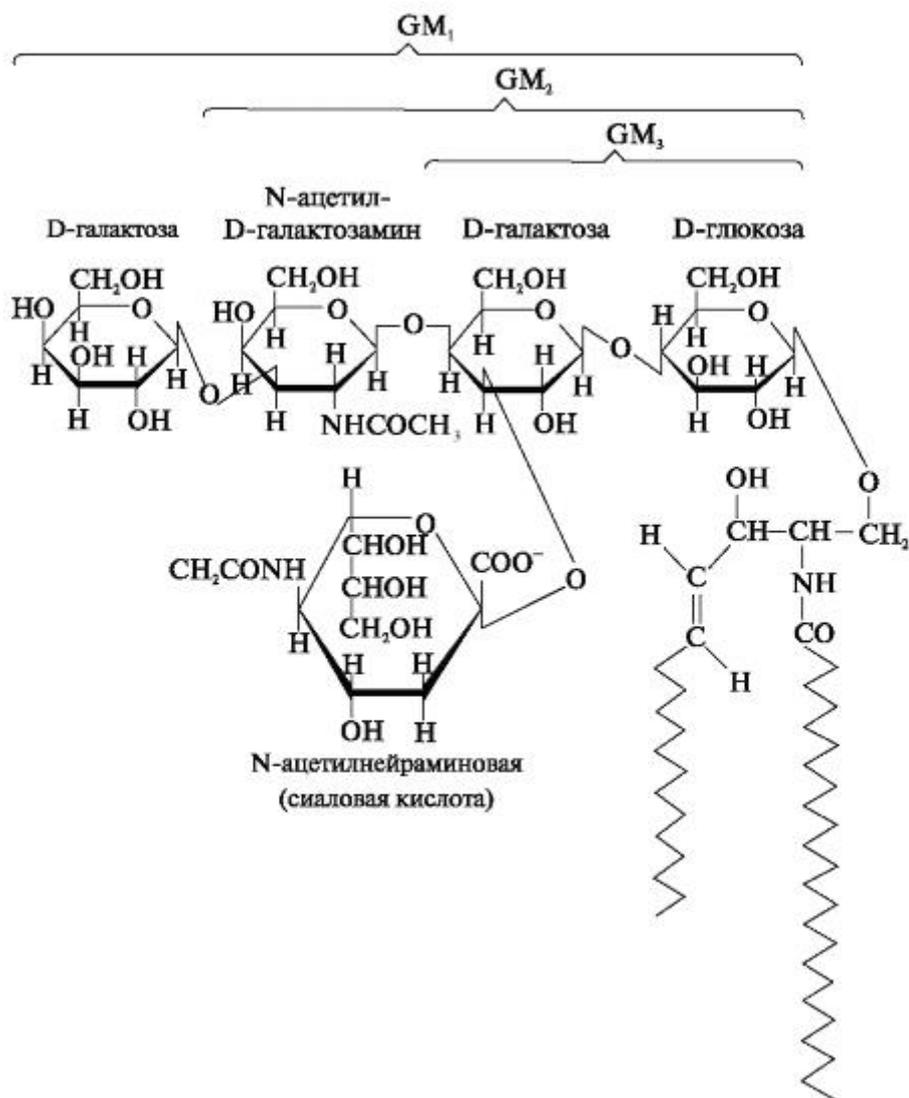


Рис. 3-8. Структурные формулы ганглиозидов GM<sub>1</sub>, GM<sub>2</sub> и GM<sub>3</sub>

*В записную книжку врача*

Ганглиозиды и болезни

Ганглиозид GM<sub>1</sub> является рецептором для холерного токсина, вызывающего изнурительную диарею при холере.

С изменением состава ганглиозидов связывают также трансформацию здоровой клетки в злокачественную, поскольку в таких клетках значительно увеличивается количество ганглиозидов с укороченной олигосахаридной цепью. Считают, что такие изменения сопровождаются возникновением новых свойств цитоплазматической мембраны.

Нарушения в метаболизме ганглиозидов, обусловленные генетическими дефектами, приводят к развитию целого ряда заболеваний - болезни Тея-Сакса, генерализованному ганглиозидозу и др.

### СТЕРОИДНЫЕ ЛИПИДЫ

К стероидным липидам относят соединения, которые имеют в своей структуре *циклопентанопергидрофенантроновое кольцо*. Оно образовано тремя шестиуглеродными кольцами (их обозначают как А, В, С) и одним пятиуглеродным (D). Вещества, относящиеся к этой группе липидов, отличаются друг от друга присутствием дополнительных боковых углеродных радикалов, двойных связей, различных функциональных групп. Все представители стероидных липидов главным образом подразделяются на группы, в зависимости от выполняемой биологической функции. Основные классы и подклассы стероидных липидов приведены в табл. 3-3.

Таблица 3-3. Классификация основных стероидных липидов

Класс	Подкласс
Стеролы	Холестерол и его производные (эферы холестерола)
Стероиды	Эстрогены, андрогены, глюко- и минералокортикоиды, прогестерон и их производные
Секостероиды	Витамины D <sub>2</sub> и D <sub>3</sub> и их производные
Желчные кислоты	Желчные кислоты и их производные
Стероидные конъюгаты	Глюкурониды, сульфаты, тауриновые и глициновые конъюгаты

#### Стеролы и стероиды

Основным представителем стеролов у млекопитающих является *холестерол*, называемый также холестеринном (рис. 3-9). Его молекула представлена жестким стероидным ядром, у третьего углеродного атома которого находится гидроксильная группа, и гибкой углеводородной цепью. В мембранах гидроксильная группа расположена среди гидрофильных головок молекул фосфолипидов, а стероидное ядро и углеводородная цепь в гидрофобной части ориентированы параллельно гидрофобным хвостам.

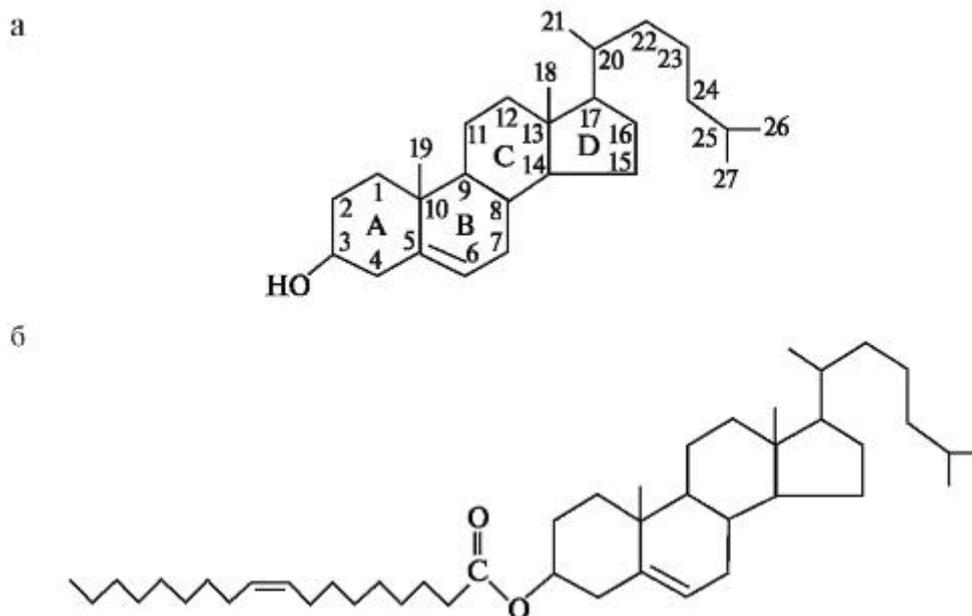


Рис. 3-9. Структурная формула стеролов: а - холестерол; б - холестерид, в котором молекула холестерола этерифицирована остатком олеиновой кислоты

Встраиваясь между другими липидами, холестерол препятствует плотной упаковке углеводородных цепей, поэтому он участвует в регуляции текучести биологических мембран, а также снижает температуру плавления липидов. При отсутствии холестерола фазовый переход из одного состояния в другое происходит в более узком интервале температур.

Количество холестерола в различных мембранах сильно отличается. Так, в митохондриальных мембранах и эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) гепатоцитов его очень мало (2-3%), в плазматической мембране эритроцитов - 11-20%, а в миелиновых мембранах в мозговой ткани - 19%. Холестерол также присутствует в составе плазменных липопротеинов. Эфиры холестерола образуются внутри клетки и выступают в качестве депо хранения холестерола. Они более гидрофобны, чем сама молекула холестерола.

Холестерол - не только компонент различных мембран, но и предшественник образующихся в печени желчных кислот (холевой и хено-дезоксихолевой), а также стероидных гормонов в половых железах и надпочечниках.

В коре надпочечников из холестерола синтезируются альдостерон, кортизол и другие минерало- и глюкокортикоиды. Они регулируют водно-минеральный, белковый, углеводный обмена. Представителями стероидов

являются мужской половой гормон - тестостерон, и женские половые гормоны - эстрадиол, прогестерон (рис. 3-10) и др.

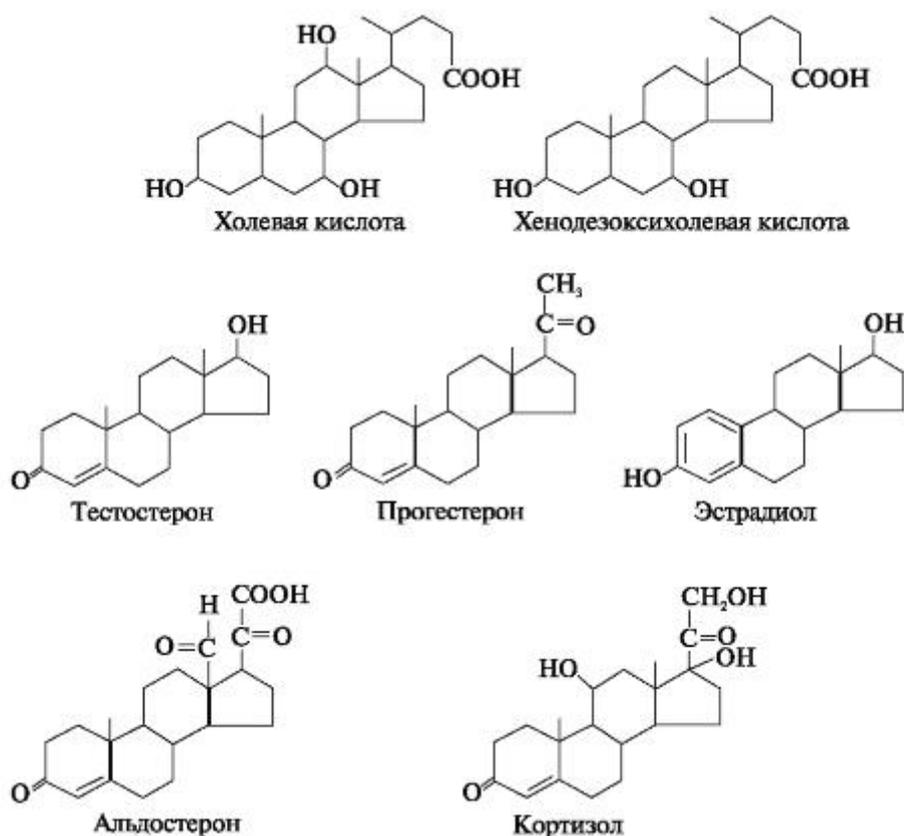


Рис. 3-10. Структурные формулы стероидов: холевой и хенодезоксихолевой желчных кислот, мужских (тестостерона) и женских (прогестерона, эстрадиола) половых гормонов, кортизола и альдостерона (гормонов коры надпочечников)

В растениях и грибах также содержатся растительные стеролы, которые, подобно холестеролу, имеют гидроксильную группу при С-3 атоме, но отличаются по длине углеводородной цепи, количеству и расположению метильных и других групп.

### *В записную книжку врача* Витамины

Витамины - группа низкомолекулярных органических соединений относительно простого строения и разнообразной химической природы. Эта группа веществ объединена по признаку абсолютной необходимости их для организма в качестве составной части пищи. Различают две группы витаминов: жирорастворимые (витамины А, D, Е, К, F) и водорастворимые (витамины группы В, витамин С, биотин). Недостаточное поступление витаминов в организм приводит к гиповитаминозам, а избыточное введение -

к другой патологии - гипервитаминозам. Симптомы гипо- и гипервитаминозов жирорастворимых витаминов приведены в табл. 3-4 (см. стр. 90).

### Секостероиды

К секостероидам относят витамины группы D и их производные. Их предшественниками служат провитамины D<sub>2</sub>-эргостерол (у растений) и D<sub>3</sub>-7-дегидрохолестерол. При воздействии ультрафиолетовых лучей на 7-дегидрохолестерол, присутствующий в животных тканях, или эргостерол растений происходит пространственная перегруппировка, что сопровождается превращением этих молекул в витамины D<sub>3</sub> и D<sub>2</sub>соответственно (рис. 3-11).

Рис. 3-11. Структурные формулы витамина D<sub>3</sub> и его предшественника

Витамины группы D у человека в печени и почках подвергаются гидроксилированию и превращаются в гидроксилированные метаболиты - гормоны 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> и 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Они совместно с паратиреоидным гормоном и кальцитонином регулируют фосфорно-кальциевый обмен.

### ПРЕНОЛЬНЫЕ ЛИПИДЫ

К пренольным липидам относят соединения, структура которых построена из пятиуглеродных молекул изопрена (рис. 3-12). Пренольные липиды представлены простыми изопреноидами (содержат от 5 до 40 атомов углерода), политерпенами, хинонами и полипренолами.

### Витамины группы А

Важнейшими простыми изопреноидами являются α-, β- и γ-каротины, выступающие в качестве предшественников витамина А и выполняющие антиоксидантную функцию. В организме человека β-каротин превращается в две молекулы витамина А<sub>1</sub> - ретинол. Из печени пресноводных рыб выделен витамин А<sub>2</sub> - дегидроретинол, который отличается от витамина А<sub>1</sub> наличием в β-ионовом кольце одной дополнительной связи между третьим и четвертым атомами углерода.

Наряду с ретинолом витамин А существует в виде ретиналя (альдегидная форма витамина А) и ретиноевой кислоты. У всех этих веществ, кроме 11-

цис-ретиная, находящегося в палочках сетчатки глаза, двойные связи в изопреновых единицах находятся в *транс*конфигурации.

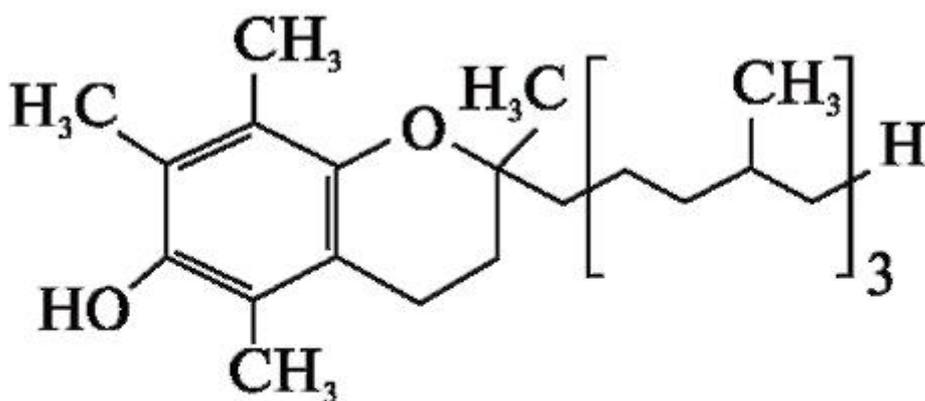
Разные функциональные группы придают этим соединениям различную биологическую активность. Так, ретинол транспортируется в плазме крови в соединении с ретинолтранспортным белком и откладывается в печени в виде ретинолпальмитата. Ретиноевая кислота необходима для роста и дифференцировки клеток эпителиальных тканей. Соединяясь ковалентно с белком опсином, 11-цис-ретиная образует в светочувствительных клетках сетчатки глаза хромолипопротеин - родопсин. Родопсин воспринимает свет, что сопровождается изомеризацией молекулы 11-цис-ретиная в транс-ретиная с последующим распадом белка. Высвобождаемый транс-ретиная через ряд реакций, катализируемых изомеразой и алкогольдегидрогеназой, вновь превращается в 11-цис-ретиная, способный соединяться с белком опсином.

Рис. 3-12. Структурные формулы пренольных липидов: а - изопрена (C<sub>5</sub>), б - β-каротина, в - ретинола, г - 11-цис-ретиная и д - ретиноевой кислоты

Другой биологически важный класс пренольных липидов представлен молекулами хинонов и гидрохинонов. Они содержат изопреноидную цепочку, связанную с хиноидной структурой неизопреноидного происхождения. К представителям этого класса относят витамины К и Е, а также убихиноны.

### Витамины группы Е

Они представлены α-, β-, γ-, δ-токоферолами - производными спирта токола. Наибольшей биологической активностью обладает α-токоферол (рис. 3-13). Он содержится главным образом в бислойе мембран клеток и способен взаимодействовать с полиненасыщенными жирными кислотами. Отдавая атом водорода от гидроксильной группы, токоферолы образуют устойчивые свободные радикалы. Это свойство токоферолов позволяет предотвращать окисление ненасыщенных жирных кислот и предохраняет биологические мембраны от разрушения, т.е. витамин Е выполняет *антиоксидантную функцию*.



**Витамин Е**  
**( $\alpha$ -токоферол)**

Рис. 3-13. Структурная формула витамина Е

### Витамины группы К

Витамины группы К - производные нафтохинона с углеводородными цепями разной длины. Витамин К<sub>1</sub>(филлохинон) имеет 4 изопреновых единицы, а К<sub>2</sub> (менахинон) - от 6 до 13 (рис. 3-14).

Витамины этой группы участвуют в посттрансляционной модификации новосинтезированных кальцийсвязывающих белков минерализованных тканей (кости, дентина, цемента зуба) и свертывающей системы крови (факторов II, VII, IX и X). При отсутствии витамина К нарушается  $\gamma$ -карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, и такие белки не способны связывать кальций (рис. 3-15).

Рис. 3-15. Посттрансляционная модификация остатков глутаминовой кислоты в молекуле кальцийсвязывающих белков с участием витамина К (а), присоединение ионов кальция к  $\gamma$ -карбоксилированной кислоте (б)

### Убихиноны

Во внутренней мембране митохондрий млекопитающих присутствует убихинон Q<sub>10</sub> (кофермент Q<sub>10</sub>), состоящий из хинона и боковой цепи из 10 изопреновых звеньев (рис. 13-16). Кофермент Q<sub>10</sub> способен принимать восстановительные эквиваленты от НАДН и флавиновых дегидрогеназ и

передавать электроны на последующие комплексы электронтранспортной цепи (см. главу 11).



Рис. 3-16. Структурная формула убихинона

Таблица 3-4. Признаки гипо- и гипервитаминозов жирорастворимых витаминов

Витамин	Гиповитаминоз	Гипервитаминоз
Группы А ретинол, ретиаль, ретиноевая кислота	Нарушение сумеречного и светового зрения, сперматогенеза; сухость глаз, слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей	Острая форма - сильные головные боли, тошнота, рвота, вялость, апатия; хроническая форма - гиперкератоз кожи, выпадение волос
Группы D D <sub>3</sub> - холекальци- ферол D <sub>2</sub> - эргокальци- ферол	У детей - рахит, мышечная слабость, искривление нижних конечностей, незаращение родничков, реберные четки и др. У взрослых - остеопороз, снижение в плазме крови количества кальция	Кальцинация сосудов и тканей, образование камней в почках, патологические переломы трубчатых костей
Группы E α-, β-, γ-токоферолы	Нарушение эмбриогенеза (в экспериментах на крысах). Мышечная слабость и гипотония вплоть до мышечной дистрофии	Головная боль, временное ухудшение зрения

Группы К К <sub>1</sub> - филлохинон, К <sub>2</sub> -менахинон	Подкожные кровоизлияния, кровотечения из десен, носа, желудочно-кишечного тракта	Тромбоз сосудов, поражение печени
Группы F линолевая и линоленовая кислоты	Гиперкератоз кожного покрова, дерматиты, гиперхолестеролемиа	Нет данных

### ПОЛИПРЕНОЛЫ

К группе пренольных липидов также относят *полипренолы* и их *фосфорилированные производные*. Они участвуют в транспорте олигосахаридов через мембраны и во внецитоплазматических реакциях гликозилирования. У человека и животных реакции N-гликозилирования белков происходят при участии вещества *долихола*, состоящего из 18- 22 изопреновых единиц (рис. 3-17).

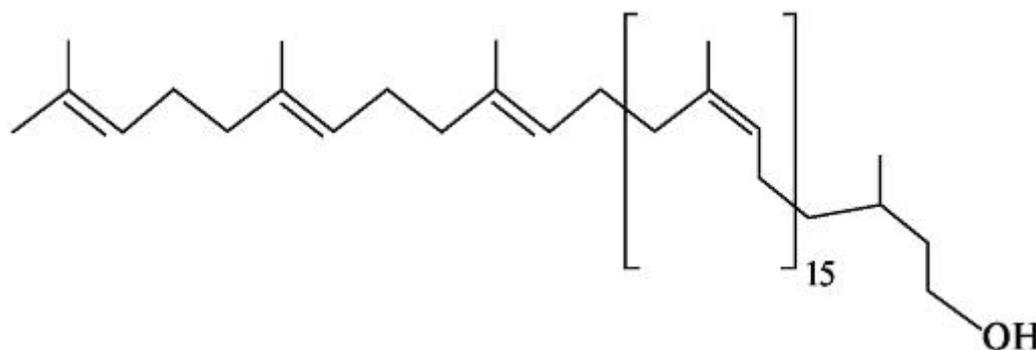


Рис. 3-17. Структурная формула долихола 19 ( $\alpha$ -дигидрононадекапренола), участвующего в процессе посттрансляционной модификации белковых молекул.

### ГЛИКОЛИПИДЫ И ПОЛИКЕТИДЫ

*Гликолипиды* - сложные липиды, содержащие углеводный компонент. Встречаются во многих рассмотренных классах липидов (рис. 3-7, 3-8). Их много в составе биологических мембран (см. раздел *Гликофинголипиды*).

К *поликетидам* относят лактоны макролидов и ароматические кольцевые системы. Поликетиды синтезируются чаще всего мультиферментными синтазами микроорганизмов. Они зачастую модифицированы, поскольку подвергаются гликозилированию, гидроксильрованию, окислению. Некоторые поликетиды связываются с синтезированными пептидами и формируют гибридные ветви (леса). Ряд поликетидов используют в качестве антибактериальных препаратов. Это эритромицины, тетрациклины и др. Нистатины обладающие противогрибковым действием, также относятся к полике-тидам. .

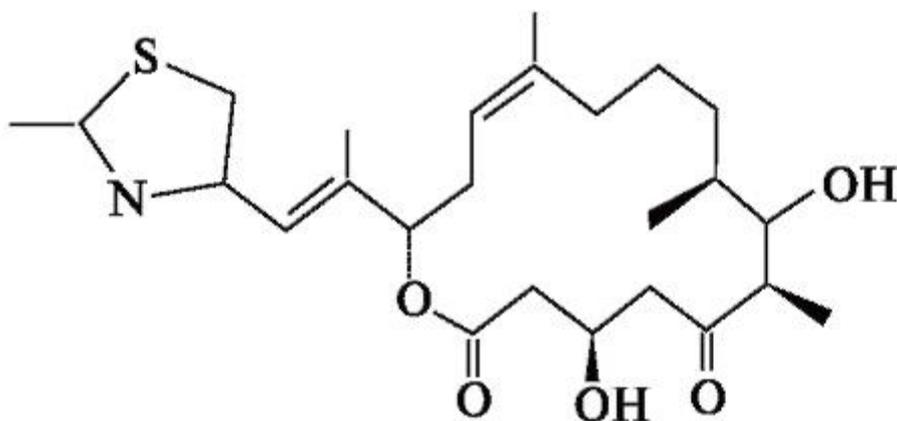


Рис. 3-18. Структура гибридного поликетид тилона D

В лечении опухолевых заболеваний используются другие поликетиды - эпотилоны (рис. 3-18). Некоторые поликетиды являются сильными ядами.

## ГЛАВА 4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

### Минорные азотистые основания

Помимо основных азотистых оснований в составе ДНК и РНК встречаются так называемые минорные азотистые основания. Так, в составе ДНК обнаружены: N<sup>6</sup>-метиладенин, N<sup>2</sup>-метилгуанин, 5-метилцитозин. Метилированные азотистые основания считают «сертификатом соответствия», который выдают клеточные системы «проверки» правильности процесса репликации. Синтетические (неприродные) азотистые основания, такие, как 5-фторурацил, меркаптопурин и некоторые другие, подавляют развитие ряда злокачественных опухолей. Меркаптопурин способствует подавлению иммунитета, и поэтому его применяют при лечении ряда аутоиммунных заболеваний, таких, например, как ревматоидный артрит, псориаз.

Азотистые основания связаны с сахарами с помощью N-гликозидной связи, в образовании которой участвует N-1 атом азота пиримидина и N-9 атом азота пурина. Гликозидная связь имеет  $\beta$ -конфигурацию. Азотистое основание с присоединенным к нему углеводным остатком называют *нуклеозидом* (рис. 4-3). Нуклеозиды, содержащие аденин или гуанин, называют *аденозином* или *гуанозином*, а нуклеозиды - производные урацила и цитозина, называют *уридином* и *цитидином*. Аналогичные нуклеозиды, содержащие в качестве углевода дезоксирибозу, называют *дезоксиаденозином*, *дезоксигуанозином*, *дезоксиуридином* и *дезоксицитидином*. Поскольку тимин встречается преимущественно в ДНК, то его дезоксирибонуклеозид называют *тимидином*, а рибонуклеозид (обнаруженный в некоторых видах транспортной РНК) - *риботимидином*.

Для сокращения обозначений нуклеозидов также используют однобуквенный код, в основе которого лежат начальные буквы их названий: А - аденозин, Г - гуанозин, У - уридин, Ц - цитидин. Для обозначения дезоксирибонуклеозидов используют приставку д: дА - дезоксиаденозин, дГ - дезоксигуанозин, дЦ - дезоксицитидин. Тимидин обозначают Т или дТ. Для того чтобы различать нумерацию атомов азотистых оснований и сахара, к нумерации атомов рибозы и дезоксирибозы сверху добавляют штрих. Например, С-2 атом рибозы в нуклеозиде записывают как С-2' атом, а связанный с ним гидроксил - 2'-гидроксил (см. рис. 4-1).

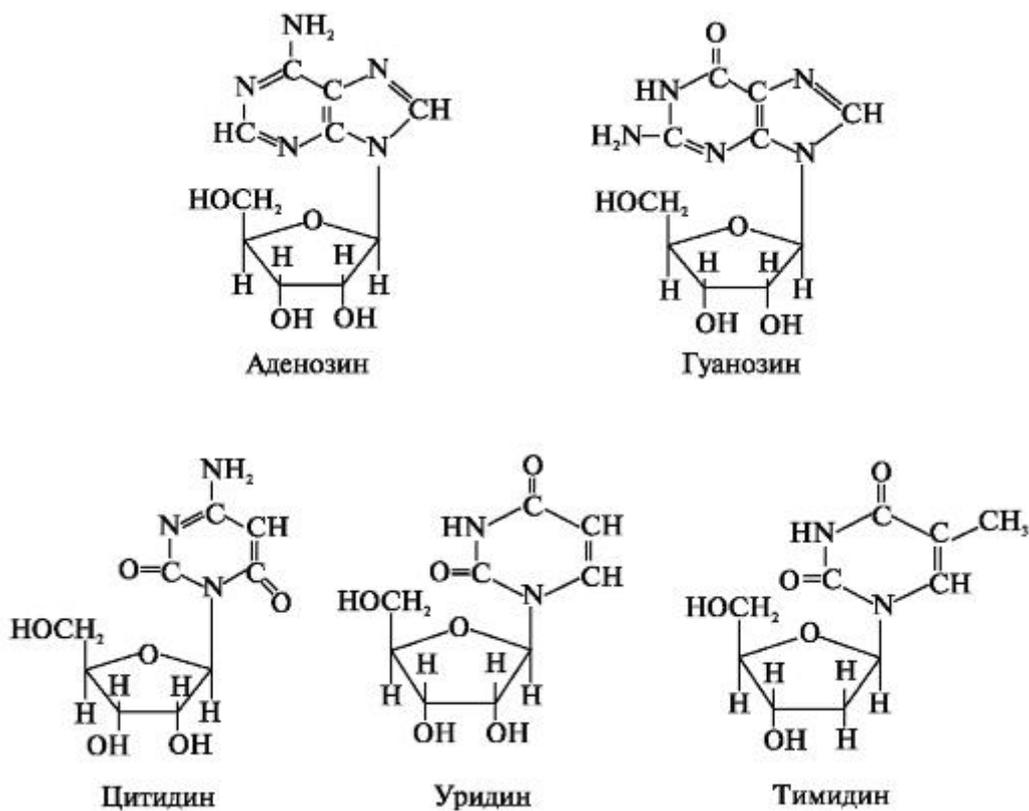


Рис. 4-3. Структурные формулы нуклеозидов

Третий компонент нуклеотида - ортофосфорная кислота, которая образует сложноэфирные связи с гидроксильными группами рибозы или дезоксирибозы. В образовании связи чаще всего участвуют гидроксильные группы С-5' и С-3' атомов углерода. В зависимости от числа остатков фосфорной кислоты различают нуклеозидмонофосфаты, нуклеозиддифосфаты и нуклеозидтрифосфаты. В тех случаях, когда не указывают атом углерода пентозы, к которому присоединен остаток фосфорной кислоты, речь идет о С-5' атоме.

Остатки фосфорной кислоты соединены между собой с помощью двух пиррофосфатных (ангидридных связей). В нуклеозидди- и трифосфатах их обозначают буквами греческого алфавита  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  (рис. 4-4).



Рис. 4-4. Структура нуклеотида на примере аденозинтрифосфата

*Пирофосфатные связи* между α- и β-, а также β- и γ-остатками фосфорной кислоты еще называют *высокоэнергетическими*, или *макроэргическими*. При их гидролизе выделяется большое количество энергии. Именно поэтому нуклеозид-5'-трифосфаты участвуют во многих реакциях организма, протекающих с затратами энергии. При этом АТФ является универсальным макроэргом, который участвует практически во всех видах обмена, а обратимый процесс  $\text{АТФ} \leftrightarrow \text{АДФ} + \text{Фн}$  является основным в переносе химической энергии в клетках.

Другие нуклеозидтрифосфаты участвуют преимущественно в каком-то одном виде обмена. Например, *цитидинтрифосфат* (ЦТФ) участвует в биосинтезе фосфолипидов, *уридинтрифосфат* (УТФ) - различных углеводов, а *гуанозинтрифосфат* (ГТФ) - в процессах клеточной сигнализации и биосинтезе белка.

Среди других важных для организма функций нуклеотидов, не связанных с образованием нуклеиновых кислот, необходимо отметить регуляторную функцию, которую выполняют в первую очередь циклический аденозин-3',5'-монофосфат (цГАФ), а также циклический гуанозин-3',5'-монофосфат (цГМФ) (рис. 4-5).

Циклический аденозин-3',5'-монофосфат образуется из АТФ при действии на клетку различных гормонов: например, адреналина, глюкагона, адренокортикотропного гормона (АКТГ) и др. Циклический гуанозин-3',5'-монофосфат образуется из ГТФ при действии на клетку оксида азота (NO) и натрийуретического фактора предсердий.

Эти циклические нуклеотиды являются посредниками, осуществляющими передачу внеклеточного регуляторного сигнала внутриклеточным структурам. В них остаток фосфорной кислоты образует две сложноэфирные связи с гидроксильными группами С-3' и С-5' атомов рибозы.

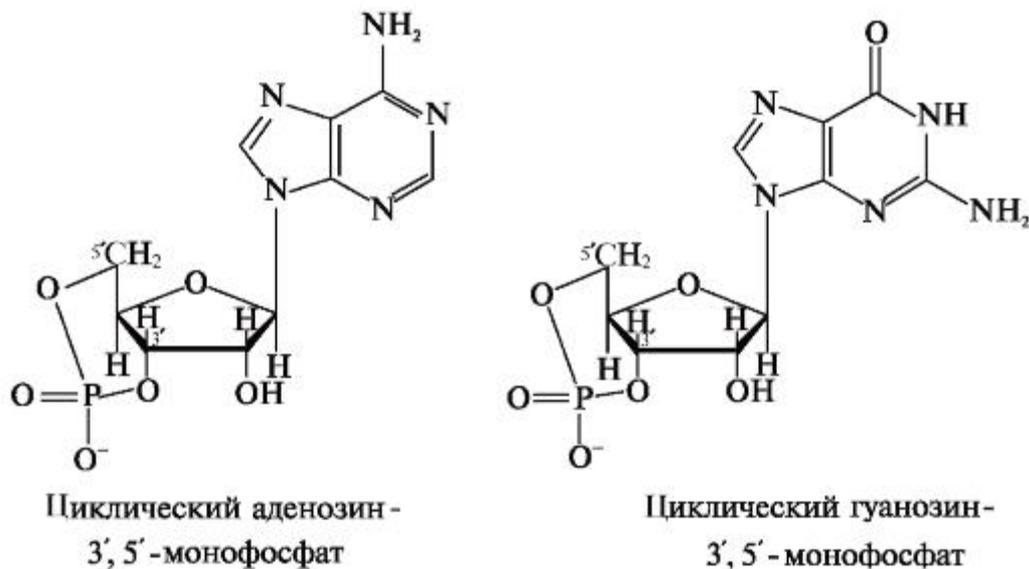


Рис. 4-5. Формулы циклического аденозин-3',5'-монофосфата и циклического гуанозин-3',5'-монофосфата

### СТРОЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нуклеиновые кислоты - линейные (неразветвленные) полимеры нуклеозидмонофосфатов. РНК построены из рибонуклеотидных мономеров, а ДНК - из дезоксирибонуклеотидных.

*Первичная структура* нуклеиновых кислот - последовательность нуклеотидов в полинуклеотидной цепи, соединенных 3'-5'-фосфодиэфирными связями. Фосфодиэфирными связями называют потому, что фосфат соединен с 3'- и 5'-углеродными атомами сахаров двух соседних нуклеотидов (рис. 4-6).

Уникальность каждой РНК и ДНК определена последовательностью азотистых оснований в полинуклеотидной цепи, выступающих из сахарофосфатного остова.

Отсутствие 2'-ОН-группы в дезоксирибозе придает большую стабильность ДНК. Именно поэтому ДНК является более надежным хранителем генетической информации, чем РНК.

Рис. 4-6. Структура рибонуклеотида. Азотистые основания: А - аденин; Ц - цитозин

Дезоксирибонуклеиновые кислоты

Особенностью ДНК является присутствие в молекуле дезоксирибозы и пиримидинового азотистого основания тимина вместо урацила.

Вторичная структура ДНК, за исключением некоторых вирусов, представлена двойной правовращающей спиралью, закрученной относительно общей оси. При этом сахарофосфатный остов расположен на периферии, а азотистые основания направлены внутрь, образуя своеобразную винтовую лестницу (рис. 4-7). Цепи ДНК удерживаются вместе водородными связями между комплементарными азотистыми основаниями, которые образуют ступеньки этой лестницы, а сахарофосфатный остов является ее перилами. Комплементарными парами являются азотистые основания: аденин-тимин, гуанин-цитозин. Каждая пара комплементарных оснований содержит один пурин и один пиримидин, поэтому размер этих пар всегда одинаков, и в двойной спирали ДНК число пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований равно.

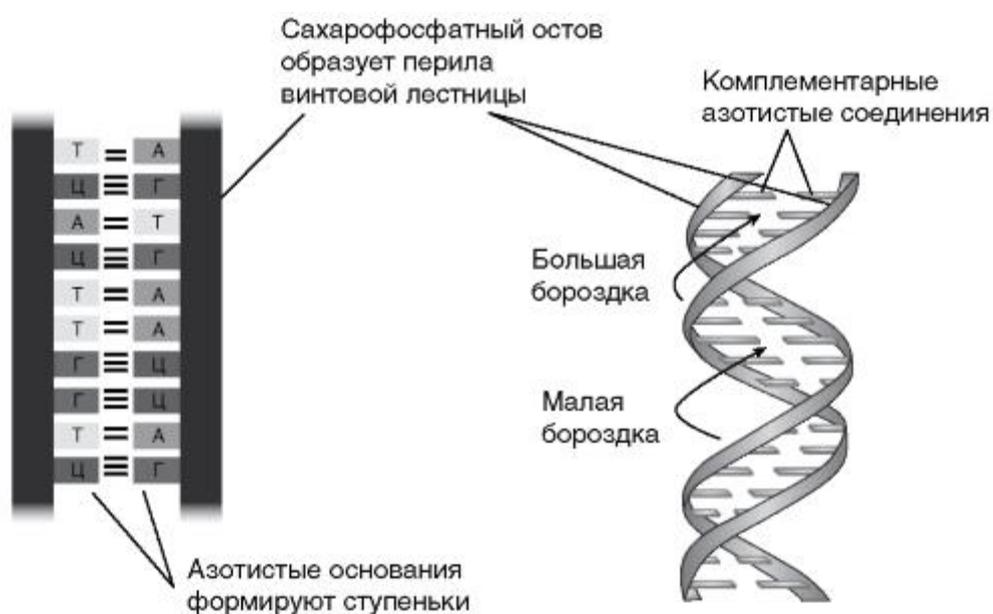


Рис. 4-7. Двойная спираль ДНК, образующая винтовую лестницу. Ее перилами является сахарофосфатный остов, а комплементарные азотистые основания, удерживаемые с помощью водородных связей, формируют ступеньки

При этом между парой аденин-тимин (А-Т) образуются две водородные связи, а между парой гуанин-цитозин (Г-Ц) - три.

В двойной спирали ДНК две цепи противоположно направлены. Каждая цепь имеет два конца, один из которых содержит свободную гидроксильную группу у 3'-углеродного атома дезоксирибозы, а другой - фосфатную группу у 5'-углеродного атома дезоксирибозы. Именно поэтому в каждой цепи ДНК различают 5'- и 3'-концы. Антипараллельность цепей означает, что 5'-концу одной цепи соответствует 3'-конец другой, и наоборот, 3'-концу одной соответствует 5'-конец другой (рис. 4-8).

Помимо водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями в стабилизации вторичной структуры ДНК участвуют и гидрофобные взаимодействия между парами азотистых оснований (ступеньками винтовой лестницы), уложенными стопкой внутри спирали.

Две цепи, закручиваясь друг относительно друга, образуют двойную правозакрученную спираль, в которой различают две бороздки - малую и большую. Часть каждого азотистого основания «видна» как из большой, так и из малой бороздки. Это способствует их взаимодействию с другими молекулами. Так, большая бороздка обеспечивает более легкое взаимодействие с белками, которые узнают соответствующие азотистые основания. К их числу относят, например, белки, содержащие так называемую лейциновую молнию. Димер такого белка присоединяется в соседних сегментах большой бороздки и регулирует процесс транскрипции.

5'-конец



Рис. 4-8. Две антипараллельные цепи ДНК. Азотистые основания антипараллельных цепей образуют водородные связи А-Т - 3, а Г-Ц - 2

Описанная структура двойной спирали ДНК получила название *B-формы*. Именно в такой форме ДНК обычно находится в клетке. Известно довольно много форм ДНК, которые обозначают буквами латинского алфавита. Одни формы зависят от особенностей нуклеотидной последовательности, другие - влажности, присутствия определенных ионов металлов (например,  $\text{Na}^+$  или  $\text{K}^+$  для А-формы).

Как и положено макромолекуле, с характерной вторичной структурой, молекула ДНК может подвергаться денатурации. Процесс термической денатурации ДНК называют *плавлением*. Под действием высокой температуры происходит разрыв водородных связей и расплетание цепей. При медленном охлаждении происходит спонтанная ренатурация

ДНК с восстановлением комплементарных пар азотистых оснований, которую называют *отжигом*. Плавление и отжиг ДНК используют в молекулярной биологии и медицине при проведении полимеразной цепной реакции.

Размеры молекул ДНК, оцениваемые по числу пар (или тысяч пар) оснований, очень велики. Геном человека (ДНК всех 46 хромосом) насчитывает 6 млрд пар оснований и может достигать длины 1-2 м. Именно поэтому необходим способ компактной упаковки ДНК в ядре. В клетках эукариот ДНК находится в составе хроматина, который представляет комплекс ДНК с белками (третичная структура ДНК). Белки представлены преимущественно гистонами - основными белками, богатыми лизином и аргинином. Выделяют 5 классов гистонов, которые различаются по соотношению остатков лизина и аргинина (табл. 4-1).

Таблица 4-1. Соотношение остатков лизина и аргинина в разных классах гистонов (процент общего числа аминокислотных остатков)

Класс	Соотношение	Содержание Арг, %	Содержание Лиз, %
H1	Арг << Лиз	1,3	29,5
H2A	Арг ~Лиз	9,3	10,9
H2B	Арг < Лиз	6,4	16,0
H3	Арг > Лиз	13,3	9,6

H4	Арг > Лиз	13,7	10,8
----	-----------	------	------

За счет своего положительного заряда гистоны образуют ионные связи с расположенными на внешней стороне двойной спирали ДНК отрицательно заряженными фосфатными группами. Гистоны H2A, H2B, H3 и H4 (по две молекулы каждого белка) образуют октамерный комплекс, называемый *нуклеосомной сердцевиной*. Молекула ДНК делает два оборота вокруг этой сердцевины (146 пар оснований). Такой комплекс октамера гистоновых белков с ДНК называют *нуклеосомой*. Отдельные нуклеосомы соединены между собой так называемой *линкерной ДНК*, с которой связан гистон H1. Нуклеосома является основной структурной единицей хроматина. Однако такой упаковки оказывается недостаточно, и далее ДНК упаковывается в более толстые нити (рис. 4-9). В результате длина молекулы ДНК уменьшается в 100 раз. Дальнейшее формирование петель, из которых, в свою очередь, образуются спирали или складки, приводит в конечном счете к 10 000-кратной конденсации исходной молекулы ДНК.

Помимо гистонов, в такой плотной упаковке ДНК участвуют и так называемые негистоновые белки. К ним относят белки, связанные с экспрессией генов, а также участвующие в организации компактной упаковки нуклеосом в структуры более высокого порядка (нити, петли и др.).

Рис. 4-9. Схема упаковки молекулы ДНК в хроматине

Рибонуклеиновые кислоты

Существует несколько видов РНК:

- мРНК - матричная (мессенджерная) РНК, которая переносит информацию об аминокислотной последовательности к месту синтеза белка (на рибосомах);
- рРНК - рибосомная, которая необходима для сборки и функционирования рибосом;
- тРНК - транспортная, которая обеспечивает доставку аминокислот к месту синтеза белка.

Спаривание комплементарных азотистых оснований может происходить и в пределах одной полинуклеотидной цепи (рис. 4-10). Именно поэтому элементы вторичной структуры, определяемые взаимодействием

комплементарных азотистых оснований, характерны и для РНК. Такую двухцепочечную структуру называют шпилькой. Она состоит из спаренных азотистых оснований, образующих двухцепочечный участок - стебель, который может заканчиваться петлей из неспаренных нуклеотидов.

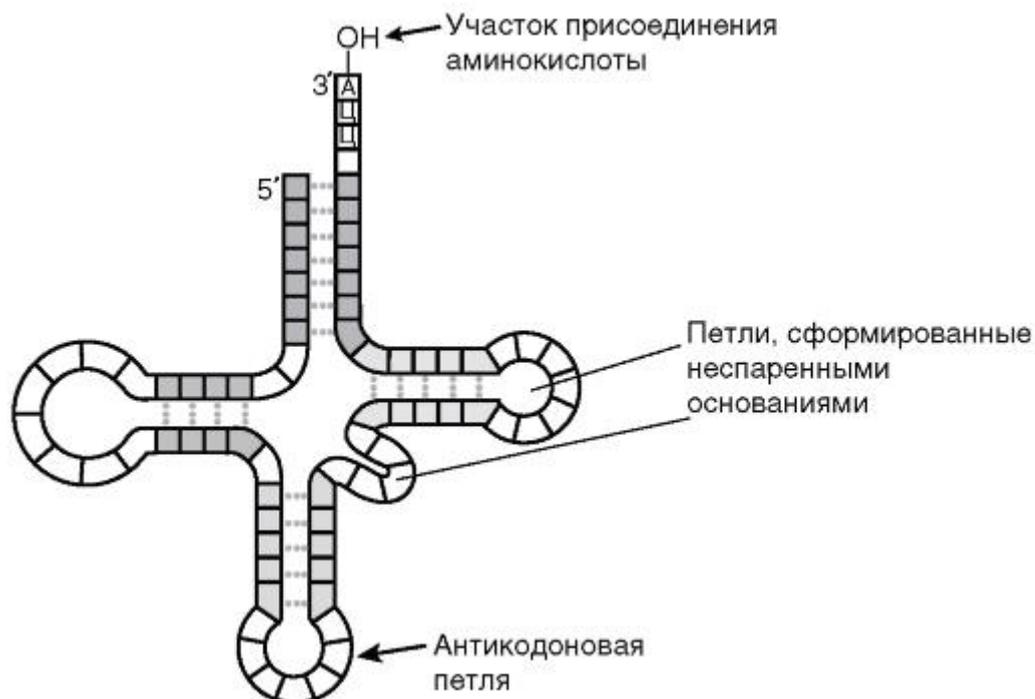


Рис. 4-10. Структура тРНК

Благодаря спариванию комплементарных азотистых оснований одной полинуклеотидной цепи, в структуре тРНК, которую обычно называют клеверным листом, выделяют несколько стеблей с петлями, сформированными из неспаренных оснований (см. рис. 4-10). Наиболее важными участками молекулы тРНК считают три неспаренных азотистых основания, формирующих антикодон, а также триплет 3'-концевых нуклеотидов ЦЦА, к которому присоединяется аминокислота.

Вопросы по теме

- Химическая природа и биологическая активность ферментов.
- Особенности ферментативного катализа. Механизм действия ферментов.
- Специфичность действия ферментов. Виды специфичности.
- Температурный оптимум действия ферментов. Термолабильность.
- Зависимость активности фермента от pH среды.

- Активный центр фермента.
- Регуляция ферментативных процессов. Понятие о ключевых ферментах.
- Активаторы и ингибиторы ферментов.
- Медицинская энзимология. Применение ферментов в медицине.,

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ

В клетках человека каждую секунду совершается множество химических превращений, которые осуществляются в мягких условиях (при температуре тела, умеренных значениях pH и атмосферном давлении) с высокой скоростью, благодаря присутствию особых биологических катализаторов. В настоящее время каталитическая активность обнаружена главным образом у ферментов, а также у антител и некоторых видов РНК.

Общие свойства биологических и небиологических катализаторов:

- действуют в ничтожно малых количествах по сравнению с содержанием реагирующих веществ;
- катализируют только энергетически возможные реакции;
- не сдвигают равновесие реакции, но ускоряют его достижение;
- не расходуются (за редким исключением) в процессе реакции.

Биологические катализаторы, как и катализаторы небиологических систем, ускоряют химические реакции, снижая энергию активации.

В обычном состоянии исходные молекулы субстрата (S) характеризуются стабильной структурой, обладают невысокой свободной энергией и потому химически инертны (рис. 5-1). Для дестабилизации структуры и увеличения реакционной способности молекулы субстрата необходимо перевести в *переходное состояние*, характеризуемое более высоким значением свободной энергии. Именно в переходном состоянии возможны разрыв старых химических связей и образование новых.

Энергию, необходимую для достижения субстратом переходного состояния, называют *энергией активации* (E<sub>акт</sub>). Для каждой химической реакции характерно свое значение энергии активации. Чем легче достигается переходное состояние, тем больше скорость реакции.

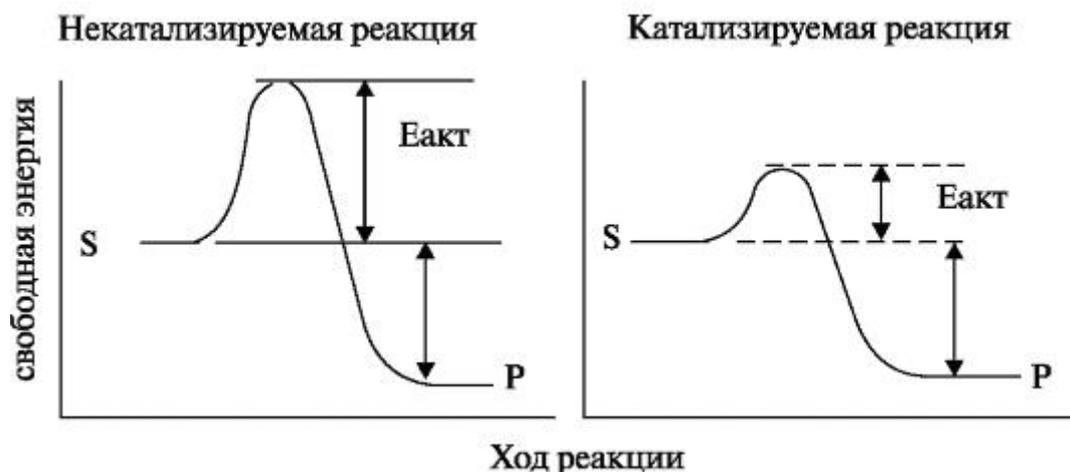


Рис. 5-1. Изменение свободной энергии некатализируемой и катализируемой химической реакции

Катализатор (биологический или небиологический) повышает скорость химической реакции (превращения субстрата S в продукт P), изменяя ее путь таким образом, что каталитической реакции свойственна более низкая величина энергии активации. При этом общая энергия суммарной реакции не изменяется.

Ферменты - биологические катализаторы белковой природы. Раздел биохимии, изучающий структуру ферментов и катализируемые ими реакции, называют энзимологией. Именно ферменты катализируют тысячи химических реакций, из которых в конечном счете складывается обмен веществ в клетке. Их отличают:

- высокая каталитическая эффективность - например, фермент карбоангидраза ускоряет реакцию образования угольной кислоты ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ) в  $10^7$  раз (в 10 млн!);
- специфичность действия - каждый фермент катализирует конкретную химическую реакцию, и при этом не образуются побочные продукты;
- регулируемость - разнообразные вещества могут увеличивать или снижать каталитическую активность ферментов.

Исследования структуры и функции ферментов позволили не только охарактеризовать особенности протекания метаболических процессов в клетках, но и использовать накопленные знания в клинической практике для диагностики и лечения многих заболеваний.

## Каталитическая активность ферментов

Об активности фермента судят по скорости катализируемой им реакции.

Если фермент  $E$  (от англ. *enzyme* - фермент) катализирует реакцию превращения субстрата  $S$  в продукт  $P$  ( $S \rightarrow P$ ), то его каталитическую активность определяют, измеряя убыль  $S$  или накопление  $P$  за определенный промежуток времени (рис. 5-2).

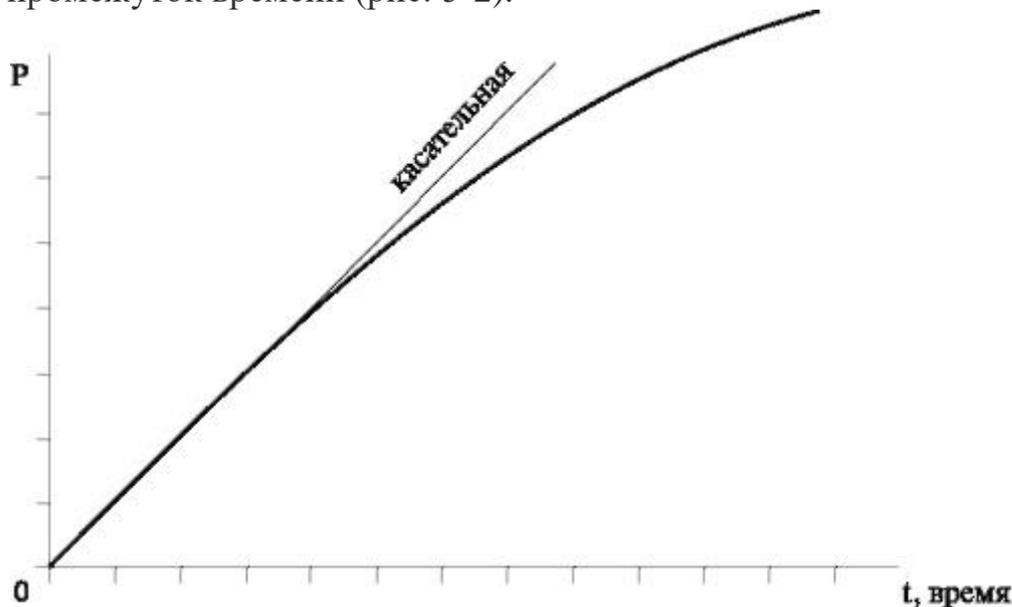


Рис. 5-2. Зависимость накопления продукта реакции ( $P$ ) от времени ( $t$ )

На начальном участке кривой зависимости скорости реакции от времени, регистрируемой по накоплению продукта  $P$ , реакция идет с постоянной скоростью. В дальнейшем такая пропорциональность теряется и скорость накопления продукта замедляется. Это может быть следствием разнообразных причин. Снижение скорости реакции, например, происходит по мере приближения химической реакции  $S \rightarrow P$  к положению равновесия. Именно поэтому на практике активность ферментов определяют на начальном участке кривой, который находят, проводя касательную.

В научной и клинико-лабораторной практике активность ферментов чаще всего выражают в международных единицах (сокращенно МЕ или просто ЕД). Международная единица активности фермента - такое его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в минуту (мкмоль/мин).

В системе СИ единица активности катал (сокращенно кат) соответствует тому количеству фермента, которое катализирует превращение 1 моля

субстрата в секунду. Одна международная единица активности фермента (1 МЕ) равна 16,67 нанокат ( $16,67 \times 10^{-9}$  катал), а 1 кат =  $6 \times 10^7$  МЕ. Правда, следует отметить, что катал как единица активности фермента не получила широкого применения.

В практической работе часто используют активность фермента, которую выражают в единицах фермента на 1 мг белка того объекта, в котором содержится данный фермент. В жидких средах организма (например, в плазме или сыворотке крови, слюне и десневой жидкости) активность выражают в единицах фермента на 1 л.

### КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

В основу классификации ферментов (КФ) положен тип катализируемой реакции, а также те превращения, которые претерпевают те или иные функциональные группы молекул субстратов. Все ферменты (а к настоящему времени открыто более 2000 ферментов, и этот список продолжает пополняться) разделены на 6 классов:

- *оксидоредуктазы* - катализируют окислительно-восстановительные реакции;
- *трансферазы* - осуществляют межмолекулярный перенос групп;
- *гидролазы* - катализируют гидролитическое расщепление субстратов;
- *лиазы* - осуществляют негидролитическое отщепление от субстратов различных химических групп ( $\text{NH}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  и др.) или присоединение по двойной связи молекул воды, а также других метаболитов без участия энергии АТФ;
- *изомеразы* - катализируют реакции изомеризации органических субстратов;
- *лигазы*, или *синтетазы*, - катализируют синтетические реакции, сопровождаемые отщеплением остатков фосфорной кислоты от АТФ или другого нуклеозидтрифосфата.

Каждый из этих классов подразделяют на подклассы, а их, в свою очередь, на более мелкие группы - подподклассы.

В современной КФ каждому индивидуальному ферменту присвоен свой шифр, состоящий из четырех разделенных точками чисел. Первое число показывает, к какому из шести классов принадлежит фермент. Второе число

указывает подкласс. Третье обозначает подподкласс, а четвертое - порядковый номер фермента в его подподклассе. Например, фермент алкогольдегидрогеназа, катализирующий реакцию дегидрирования спиртов ( $R-CH_2OH + НАД^+ \rightarrow R-CHO + НАДН + H^+$ ), имеет шифр КФ 1.1.1.1. Это означает, что он относится к 1-му классу ферментов (оксидоредуктаз), действует на -СН-ОН-группу окисляемого субстрата (1-й подкласс), что акцептором, на который переносятся атом водорода и электрон, является НАД (1-й подподкласс), и, наконец, что фермент алкогольдегидрогеназа стоит первым в списке такого рода ферментов.

#### Специфичность ферментов

Одним из характерных свойств ферментов является их высокая специфичность, в силу которой каждый фермент действует либо на одно вещество, либо на группу родственных по структуре веществ.

В зависимости от того, превращение какого количества субстратов катализирует данный фермент, различают абсолютную и относительную субстратную специфичность. Под термином абсолютная специфичность подразумевают способность фермента катализировать превращение одного единственного субстрата. Абсолютной специфичностью обладает, например, фермент аргиназа, катализирующий реакцию расщепления аргинина на мочевины и орнитин. Наивысшей степенью абсолютной субстратной специфичности является стереоспецифичность, когда фермент может осуществлять каталитическое превращение только одного из стереоизомеров вещества.

Например, фермент фумараза, катализирующий реакцию гидратации фумарата (*транс*-изомер), неактивен в отношении малеината (*цис*-изомера) (рис. 5-3).

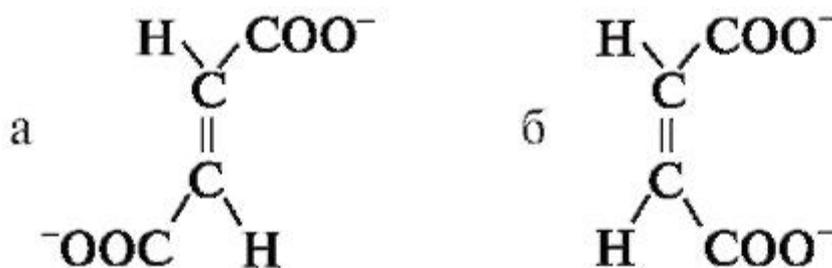


Рис. 5-3. Структурные формулы: а - фумарата; б - малеината

Чаще ферменты катализируют превращение сходной по строению группы субстратов, т.е. проявляют относительную (или групповую) субстратную специфичность. Такие ферменты, как правило, действуют либо на определенную химическую группу, либо на определенный тип химических связей. Например, уже упоминавшийся фермент алкогольдегидрогеназа катализирует реакцию дегидрирования не только этанола, но и метанола, а также других алифатических спиртов. Панкреатическая липаза, действующая в двенадцатиперстной кишке человека, гидролизует сложноэфирные связи в молекулах триацилглицеролов независимо от того, какие жирные кислоты участвуют в их образовании. Протеолитические ферменты катализируют реакцию гидролиза пептидной связи в различных белках. При этом протеолитические ферменты сильно различаются по степени субстратной специфичности. Так, фермент субтилизин, синтезируемый определенными видами бактерий, расщепляет пептидную связь независимо от природы образующих ее аминокислот, а фермент дуоденального сока трипсин расщепляет только те пептидные связи, которые образованы карбоксильными группами аргинина или лизина (рис. 5-4).



Рис. 5-4. Воздействие трипсина на пептидные связи

### КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Скорость ферментативной реакции зависит от концентрации субстрата [S] (рис. 5-5). При постоянной концентрации фермента E и низких концентрациях субстрата (которые тем не менее всегда намного выше концентрации фермента, [S] >> [E]) скорость реакции (v) практически прямо пропорциональна концентрации субстрата. При дальнейшем увеличении концентрации субстрата такая пропорциональность увеличения скорости реакции теряется, а при высоких концентрациях субстрата скорость реакции (v) перестает зависеть от концентрации субстрата. Это связано с тем, что все молекулы фермента E насыщены субстратом, и фермент находится в виде

фермент-субстратного комплекса ES, который затем распадается с высвобождением свободного фермента и продуктов реакции:



Именно поэтому связывание новых молекул субстрата с ферментом возможно только после превращения предыдущей молекулы субстрата в продукт P и высвобождения последнего от молекулы E. При этом принято считать, что во время работы фермента комплекс ES находится в равновесии с E и S.

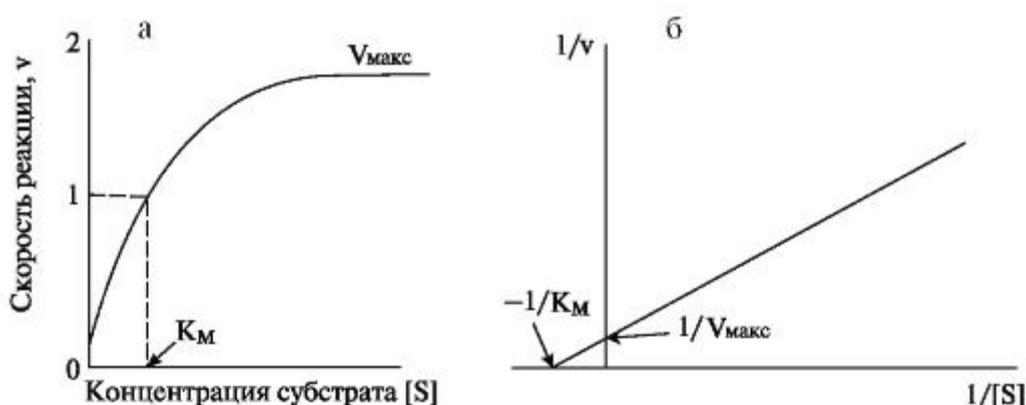


Рис. 5-5. Определение  $K_M$  и  $V_{\max}$  на графиках зависимости: а -  $v$  от концентрации субстрата; б -  $1/v$  от  $1/(S)$ . На гиперболической кривой зависимости  $v$  от  $S$  определяют концентрацию субстрата, при которой  $v = V_{\max}/2$ , это и есть  $K_M$ . Для ферментивных реакций, подчиняющихся кинетике Михаэлиса-Ментен, зависимость  $1/v$  от  $1/S$  представляет прямую линию, наклон которой численно равен величине  $K_M/V_{\max}$ . Отрезок, отсекаемый на оси ординат, равен величине  $1/V_{\max}$ , а отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, -  $1/K_M$

Такие концентрации субстрата, при которых скорость реакции перестает зависеть от концентрации субстрата  $S$ , называют *насыщающими*, а скорость ферментативной реакции при насыщающей концентрации субстрата - *максимальной скоростью*, которую обозначают  $V_{\max}$ . Помимо  $V_{\max}$  график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата характеризуется для каждого фермента еще одной величиной - константой Михаэлиса ( $K_M$ ), названной в честь ученого Леонора Михаэлиса, одного из основоположников теории ферментативного катализа.

Константа Михаэлиса - концентрация субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной. Она является мерой сродства фермента к своему субстрату. Чем выше величина  $K_m$ , тем ниже сродство фермента к субстрату, и наоборот.

### СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ КАК БЕЛКОВ

Поскольку ферменты - биологические катализаторы белковой природы, им присущи все те свойства, которые характерны белкам.

Молекулярная масса ферментов варьирует в широких пределах.

Панкреатическая рибонуклеаза (13 000 Да) и лизоцим (14 600 Да) являются одними из самых маленьких ферментов животных, а молекулярная масса олигомерных ферментов, таких, как цитохром с-оксидаза, может достигать 900 000 Да. По типу структурной организации ферменты можно разделить на несколько групп.

- Ферменты, образованные одной полипептидной цепью (лизоцим, рибонуклеаза).
- Ферменты, состоящие из нескольких одинаковых (протеиназа вируса СПИДа) или разных (цАМФ-зависимая протеинкиназа) субъединиц, соединенных нековалентными связями.
- Ферменты, образованные несколькими полипептидными цепями, соединенными ковалентными (дисульфидными) связями (химотрипсин).
- Полифункциональные ферментные ансамбли (синтаза жирных кислот).
- Полиферментные надмолекулярные комплексы (дыхательная цепь митохондрий).

### СТРУКТУРА ФЕРМЕНТОВ

Несмотря на то что молекулярная масса различных ферментов колеблется в очень широком диапазоне, размеры белковых молекул ферментов намного превышают размеры их субстратов. Именно поэтому ферменты взаимодействуют с субстратами сравнительно небольшим участком, получившим название «активный центр».

Активный центр

Активный центр - участок молекулы фермента, осуществляющий связывание субстрата и его каталитическое превращение (рис. 5-6). Поскольку он формируется на уровне третичной структуры белка, аминокислотные остатки, входящие в его состав, могут быть расположены в полипептидной цепи на значительном расстоянии друг от друга. Например, в активном центре пепсина расположены каталитические аминокислотные остатки Асп-32 и Асп-215 (номер указывает на положение аминокислотного остатка в полипептидной цепи), и именно их карбоксильные группы участвуют в расщеплении пептидной связи субстрата. В молекуле химотрипсина каталитическими аминокислотными остатками являются Гис-57, Асп-102 и Сер-195.

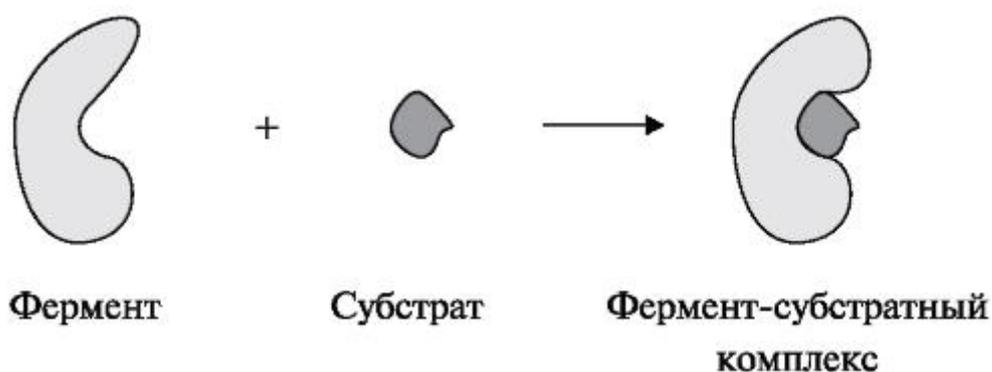


Рис. 5-6. Молекула фермента, в активном центре которого находится молекула субстрата

В составе активного центра выделяют участки *субстратсвязывающий* и *каталитический*, обеспечивающие ферментативное превращение субстрата.

Связывание субстрата с активным центром фермента осуществляется путем образования нековалентных связей (водородных, электростатических, гидрофобных) с аминокислотными остатками субстратсвязывающего участка. Это вызывает дестабилизацию связей в молекуле субстрата, которые атакуются каталитическими аминокислотными остатками с образованием продукта реакции (рис. 5-7).

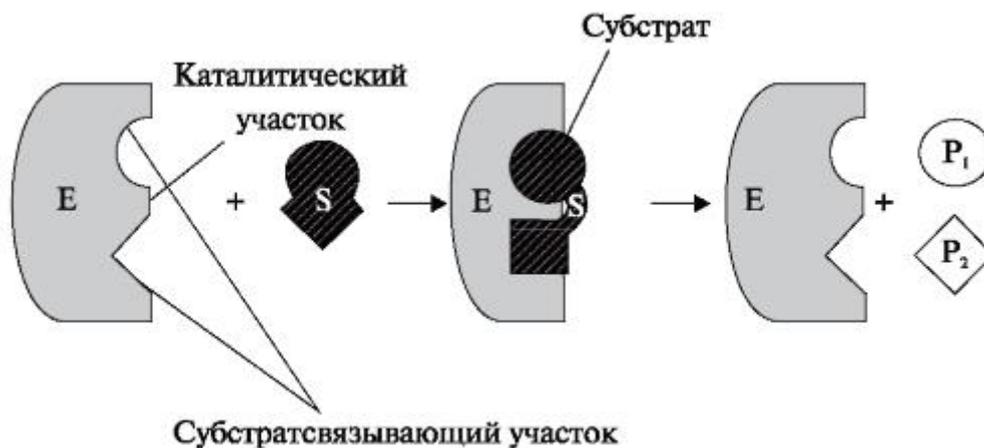


Рис. 5-7. Превращение субстрата S в активном центре фермента с образованием продуктов P<sub>1</sub> и P<sub>2</sub> (схема)

### КИСЛОТНО-ОСНОВНОЙ И КОВАЛЕНТНЫЙ КАТАЛИЗ

Функциональные группы каталитических аминокислотных остатков проявляют свойства кислоты (отдают протон) или основания (принимают протон). Осуществляя перенос протона, эти группы способствуют многократному увеличению скорости реакции. Такой вид катализа называют кислотно-основным.

При связывании субстрата в активном центре его атакуют электрофильные (т.е. принимающие электроны) или нуклеофильные (то есть отдающие электроны) группы каталитических аминокислотных остатков. Это вызывает перераспределение электронной плотности и разрыв связей в субстрате. Такой вид катализа называют ковалентным. Для него характерно формирование ковалентных связей между функциональными группами каталитических аминокислотных остатков активного центра и субстрата.

Для большинства ферментативных реакций характерно сочетание этих механизмов, которые можно рассмотреть на примере гидролиза пептидной связи химотрипсином (рис. 5-8). Активный центр этого фермента включает три каталитических аминокислотных остатка: Сер-195, Гис-57, Асп-102, где остаток гистидина выступает в качестве основания, которое принимает протон от гидроксильной группы Сер-195

Лишенный протона остаток Сер-O<sup>-</sup> осуществляет нуклеофильную атаку на группу C=O молекулы субстрата (на рисунке это пептид-CO-NH-пептид). Это приводит к образованию промежуточного соединения (интермедиата),

карбоксильная группа которого связана сложноэфирной связью с остатком Сер-195, и высвобождению одного продукта реакции (пептида-NH<sub>2</sub>).

Сложноэфирная связь затем подвергается гидролизу молекулой H<sub>2</sub>O, реакционная способность которой повышается в результате отщепления протона от Гис-57. Этому способствует карбоксильная группа Асп-102. На заключительном этапе положительно заряженный остаток гистидина выступает в качестве кислоты, отдающей протон остатку Сер-195. По завершении каталитического цикла все аминокислотные остатки активного центра возвращаются в исходное состояние.

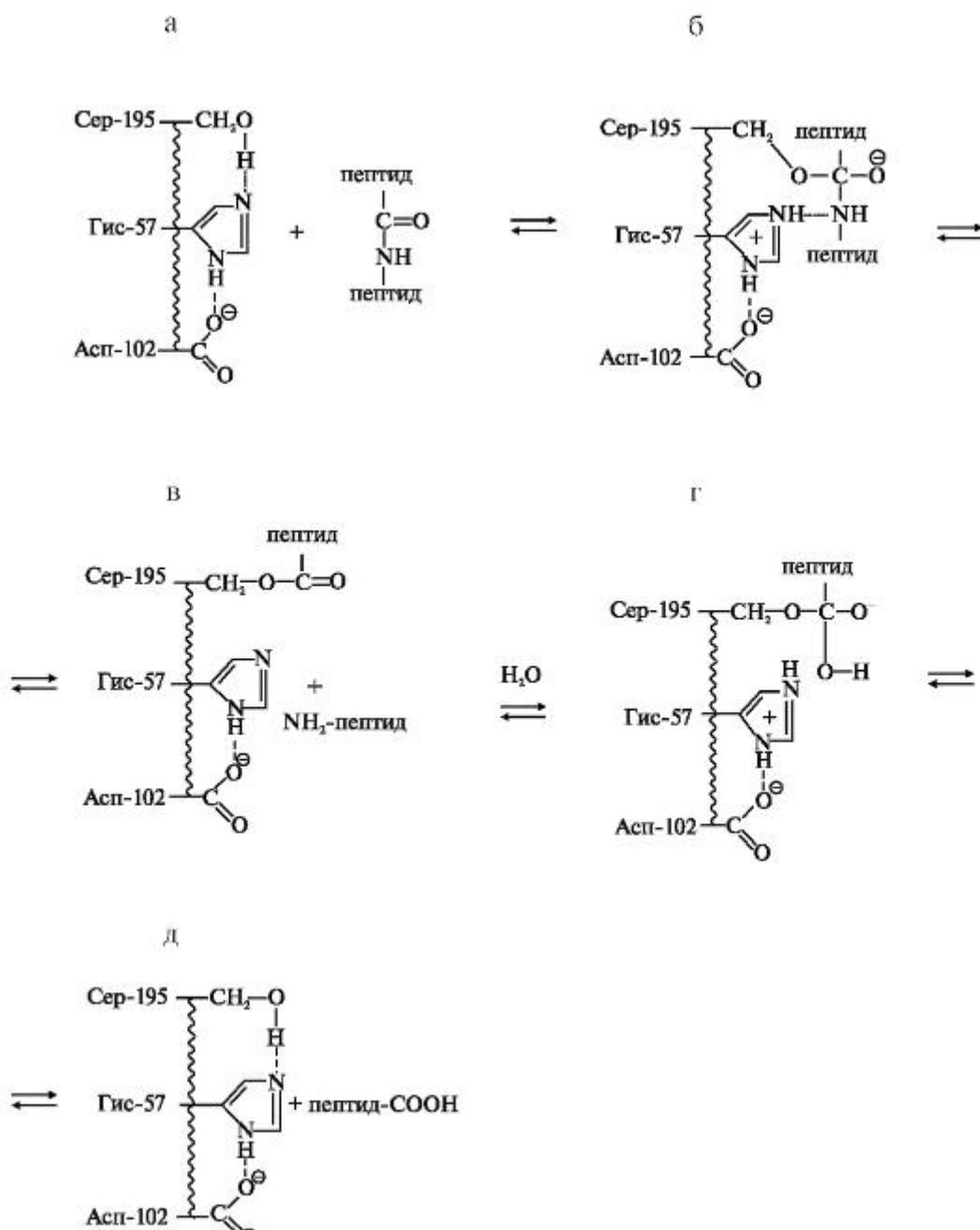


Рис. 5-8. Механизм гидролиза пептидной связи химотрипсином как пример кислотно-основного и ковалентного катализа (а-д)

### КОФАКТОРЫ И КОФЕРМЕНТЫ

Помимо аминокислотных остатков, активные центры многих ферментов могут содержать небелковый компонент, необходимый для осуществления каталитической активности. В зависимости от его природы различают кофакторы и коферменты. При их отсутствии белковая часть фермента (апофермент) не функционирует, и только комплекс апофермента с кофактором и/или коферментом, который называют холоферментом, проявляет каталитическую активность.

Кофакторами могут быть ионы металлов (например,  $\text{Fe}^{2+}$  в цитохромоксидазе и каталазе,  $\text{Mn}^{2+}$  в алкогольдегидрогеназе,  $\text{Zn}^{2+}$  в карбоксипептидазе А и ДНК-полимеразе). Коферментами называют сложные органические соединения, которые часто являются производными водорастворимых витаминов. Ферменты могут содержать как кофермент (простетическую группу), так и ионы металлов. Для проявления активности ряда ферментов (например, алкогольдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы) требуются как кофермент, так и один или несколько кофакторов-ионов металлов.

Ионы металлов могут либо непосредственно участвовать в катализе, либо играть роль своеобразных мостиков, связывающих кофермент с апоферментом.

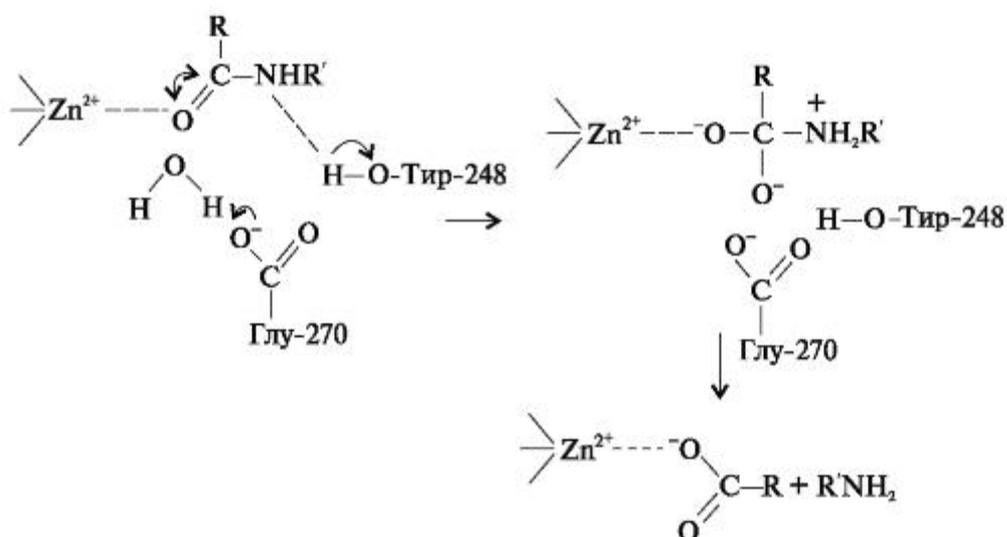


Рис. 5-9. Роль цинка в реакции гидролиза пептидной связи, катализируемой карбоксипептидазой А. Показаны каталитические аминокислотные остатки (Глу-270 и Тир-248) этого фермента

Например, ион цинка ( $Zn^{2+}$ ) в карбоксипептидазе А, осуществляющей гидролиз пептидной связи с С-конца полипептидной цепи, участвует в катализе, поляризуя подлежащую расщеплению пептидную связь (рис. 5-9).

В зависимости от прочности связи с апоферментом такие кофакторы подразделяют на коферменты и простетические группы. Коферменты связаны с апоферментом нековалентными связями и потому легко от него диссоциируют. Простетические группы связаны с апоферментом ковалентно.

Кофакторы играют очень важную роль в ферментативном катализе.

- Они способствуют либо изменению трехмерной структуры белка-фермента, что улучшает взаимодействие фермента с субстратом, либо изменению структуры субстрата.
- Коферменты (простетические группы), как правило, выступают в качестве дополнительных субстратов ферментативной реакции. Они могут быть донорами или акцепторами определенных химических группировок (например, метильной группы, аминогруппы) и электронов.

Очень важную группу коферментов составляют вещества, осуществляющие перенос восстановительных эквивалентов в окислительно-восстановительных реакциях.

Коферменты - производные водорастворимых витаминов

Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат ( $НАДФ^{+}$ ) - производные витамина РР (*ниацина*), который представляет собой амид никотиновой кислоты (никотинамид). Структурные формулы окисленных форм  $НАД^{+}$  и  $НАДФ^{+}$  приведены на рис. 5-10.

Рабочей частью молекулы, участвующей в окислительно-восстановительных реакциях, является положительно заряженное никотинамидное кольцо (на рис. 5-10 оно заштриховано), а остальная часть молекулы (АДФ-рибоза) отвечает за связывание  $НАД^{+}$  (или  $НАДФ^{+}$ ) в активном центре ферментов. Имеется сходство  $НАД^{+}$ -связывающих доменов ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции с помощью этого кофермента.

Теперь, зная структуру НАД<sup>+</sup>, нетрудно представить, что такое сходство во многом определяется именно тем, что все эти ферменты должны разместить в своем активном центре один и тот же фрагмент молекулы.

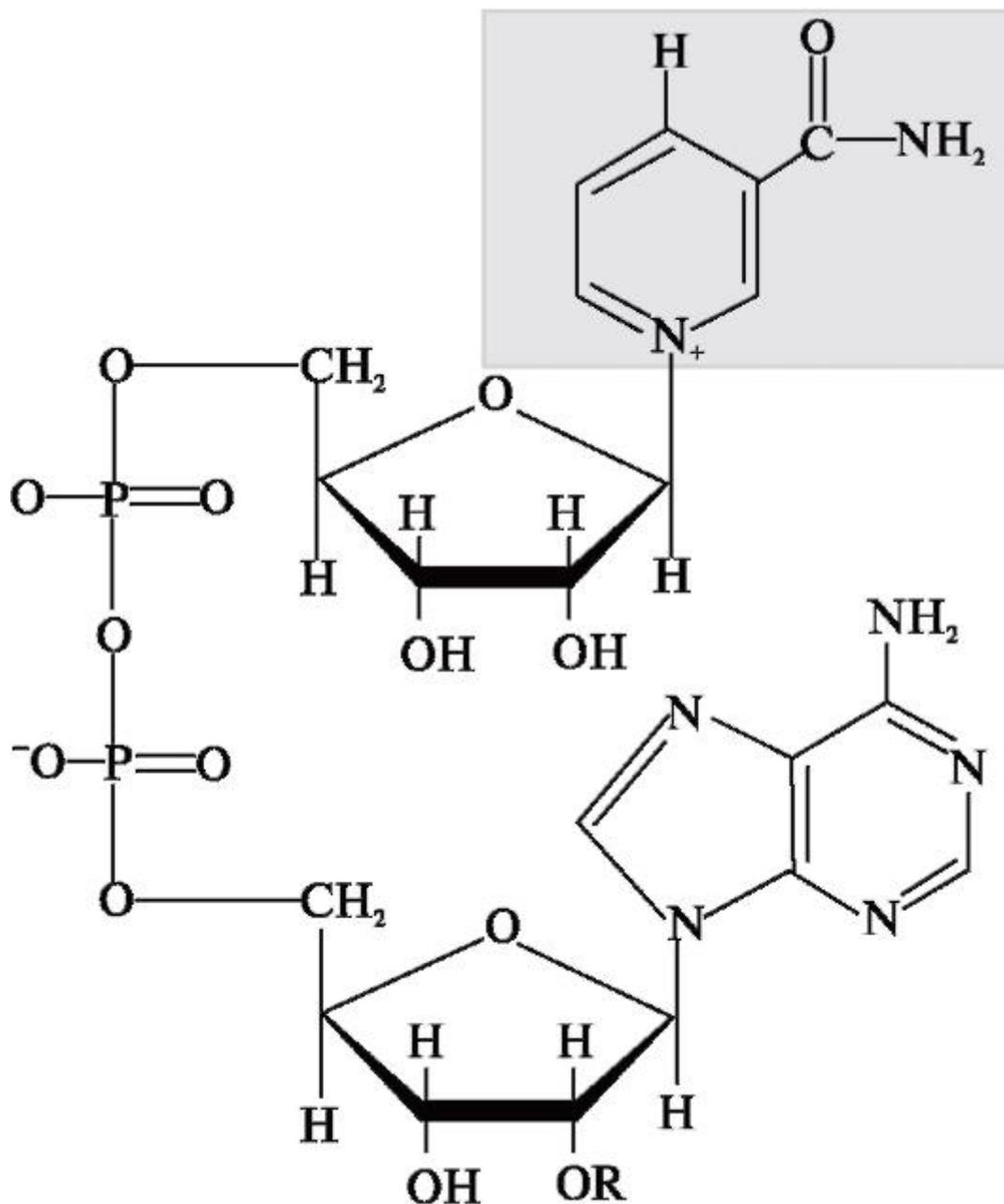


Рис. 5-10. Структурные формулы никотинамидадениндинуклеотида и никоти-намидадениндинуклеотидфосфата. В НАД - R = H, а НАДФ - R = PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Рабочая часть молекулы, участвующая в переносе восстановительных эквивалентов, заштрихована

Восстановление НАД(Ф)<sup>+</sup> (рис. 5-11) происходит путем присоединения атома водорода и электрона.

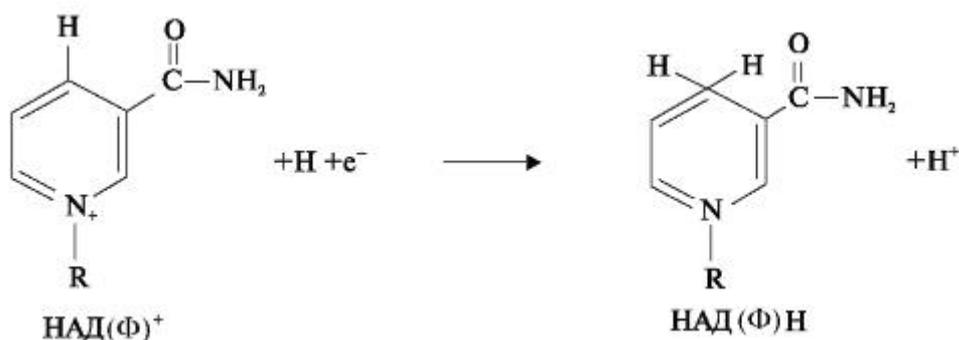
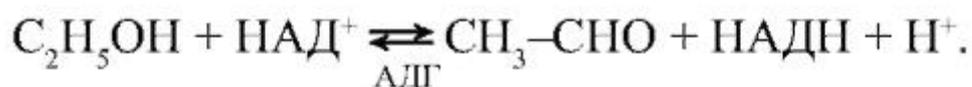


Рис. 5-11. Восстановление никотинамидаденинуклеотидфосфата

Благодаря тому что и НАД<sup>+</sup> и НАДФ<sup>+</sup> связаны с апоферментами нековалентно, восстановленные формы этих коферментов могут диффундировать к другим ферментам, где будет протекать обратная реакция (окисления кофермента).

Примером использования НАД<sup>+</sup> в качестве кофермента может быть реакция окисления этанола, которую катализирует фермент алкоголь-дегидрогеназа (АДГ):



Поскольку в процессе реакции произошло отщепление двух атомов водорода от субстрата, а НАД<sup>+</sup> может принять только один атом и электрон, то оставшийся протон высвобождается в среду.

Флавинаденинуклеотид (ФАД) - производное витамина В<sub>2</sub> (рибофлавина). Строение ФАД показано на рис. 5-12. Рабочей частью этого кофактора является изоаллоксазиновое кольцо, которое в процессе восстановления может принять два атома водорода (см. рис. 5-12). Отличительная особенность ФАД в том, что он связан со своими ферментами ковалентно, и поэтому его называют *простетической группой*.

Рис. 5-12. Окислительно-восстановительное превращение флавинадениндину-клеотида (флавиномононуклеотида) (схема)

Еще один флавиновый нуклеотид - флавиномононуклеотид (ФМН), тоже производное витамина В<sub>2</sub>, участвующее в окислительно-восстановительных

реакциях. От витамина В<sub>2</sub> ФМН отличается только наличием одной фосфатной группы (рис. 5-13).

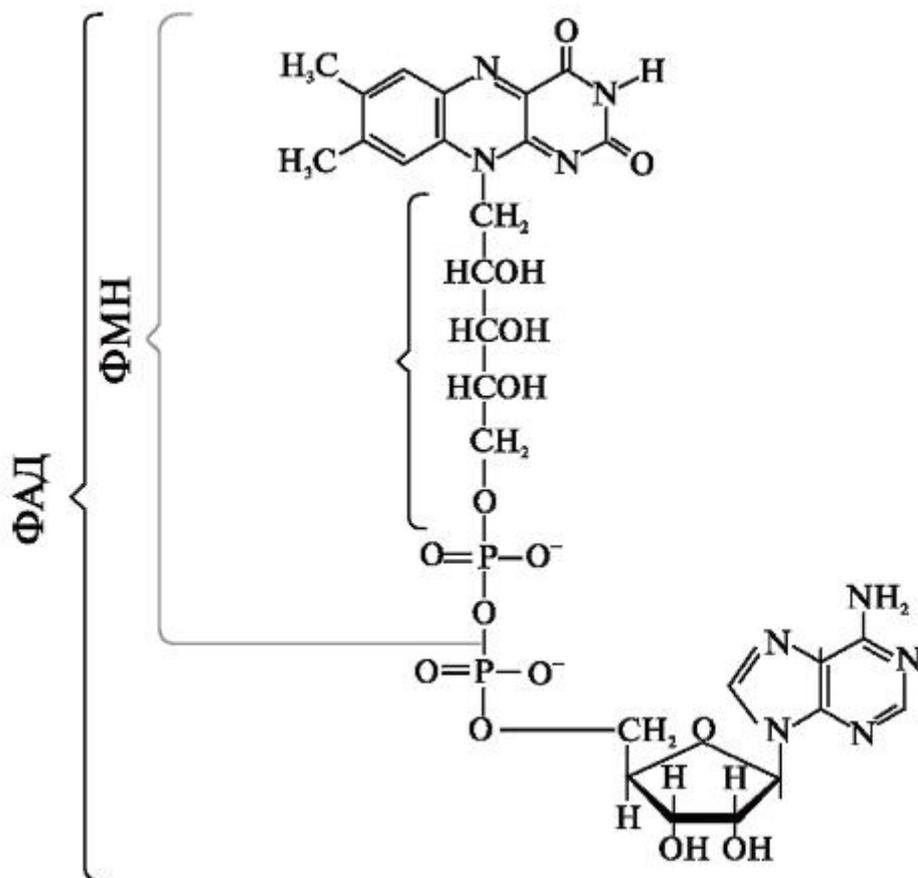


Рис. 5-13. Структурная формула флавиновых коферментов

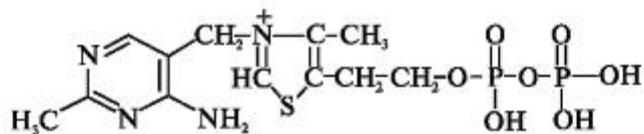
В организме человека есть немало ферментов, содержащих ФАД. Одним из них является сукцинатдегидрогеназа, катализирующая реакцию дегидрирования сукцината в митохондриях (рис. 5-14).



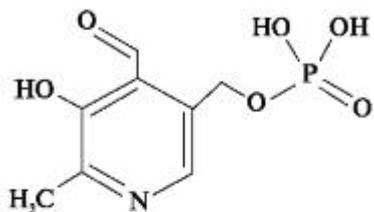
Рис. 5-14. Реакция дегидрирования сукцината в митохондриях

Формулы других важнейших коферментов, производных водорастворимых витаминов, приведены на рис. 5-15, а в табл. 5-1 - их основные биологические функции.

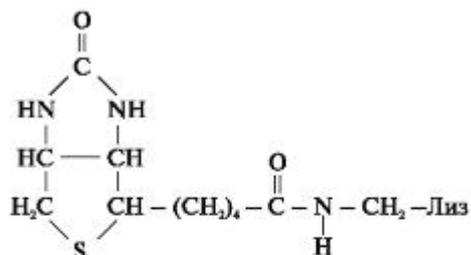
а



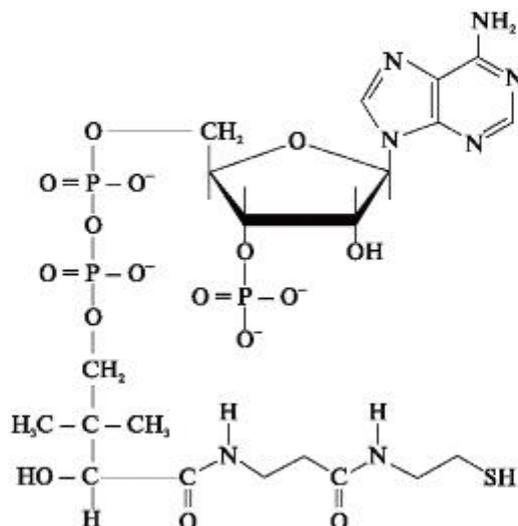
б



в



г



д

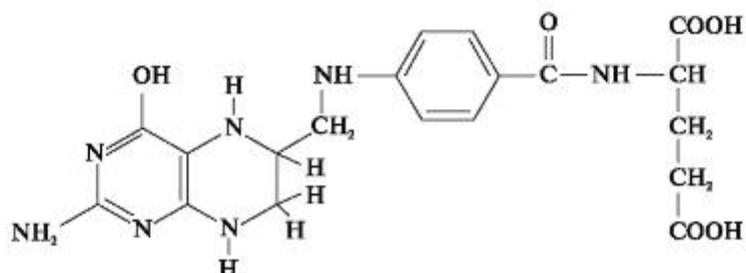


Рис. 5-15. Формулы коферментных форм водорастворимых витаминов: а - тиаминпирофосфат; б - пиридоксальфосфат; в - биотин; г - кофермент А; д - тетрагидрофолиевая кислота

Таблица 5-1. Коферменты - производные водорастворимых витаминов

Витамин	Коферментная форма	Примеры ферментативных реакций
Тиамин	Тиаминпирофосфат	Пируватдегидрогеназа (пируват-ацетил-КоА); пируватдекарбоксилаза (пируват-ацетальдегид); 2-оксо-глутаратдегидрогеназа; дегидрогеназа кетокислот с разветвленной цепью; транскетолаза
Рибофлавин	Флавинмононуклеотид и флавинадениндинуклеотид	Перенос электронов в окислительно-восстановительных реакциях
Пантотеновая кислота	Кофермент А	Активация и перенос ацильных групп
Ниацин, (амид никотиновой кислоты)	НАД <sup>+</sup> и НАДФ <sup>+</sup>	Перенос электронов в окислительно-восстановительных реакциях
Пиридоксин	Пиридоксальфосфат	Все реакции трансаминирования аминокислот. Декарбоксилирование аминокислот
Фолиевая кислота	Тетрагидрофолиевая кислота	Перенос одноуглеродных групп, за исключением CO <sub>2</sub>
Биотин	Биоцитин (комплекс биотин-в-аминогруппа остатка лизина в белке)	Реакции карбоксилирования, катализируемые ацетил-КоА-карбоксилазой, пируваткарбоксилазой
Витамин С	Аскорбиновая кислота	Гидроксилирование остатков пролина и лизина в проколлагене. Гидроксилирование дофамина
Витамин В <sub>12</sub>	Метилкобаламин, дезокси-аденозилкобаламин	Реакции изомеризации (5-метил-тетрагидрофолатгомоцистеини-

	зомераза). Перенос метильных групп (метилмалонилизомераза)
--	--

Кофакторы - модифицированные остатки аминокислот

В ряде ферментов органическими кофакторами могут быть модифицированные аминокислотные остатки, входящие в состав активного центра фермента. Они представляют собой окисленные радикалы остатков тирозина полипептидной цепи соответствующих ферментов. Например, кофактором лизилоксидазы - фермента, катализирующего реакцию окисления остатков лизина, участвующих в образовании поперечных сшивок в молекулах коллагенов и эластина, является лизил-тирозилхинон (рис. 5-16). Кофактором полиаминоксидаз - ферментов, осуществляющих метаболизм полиаминов, является ТОФА-хинон (хинон, образованный при окислении 2,4,5-триоксифенилаланина).

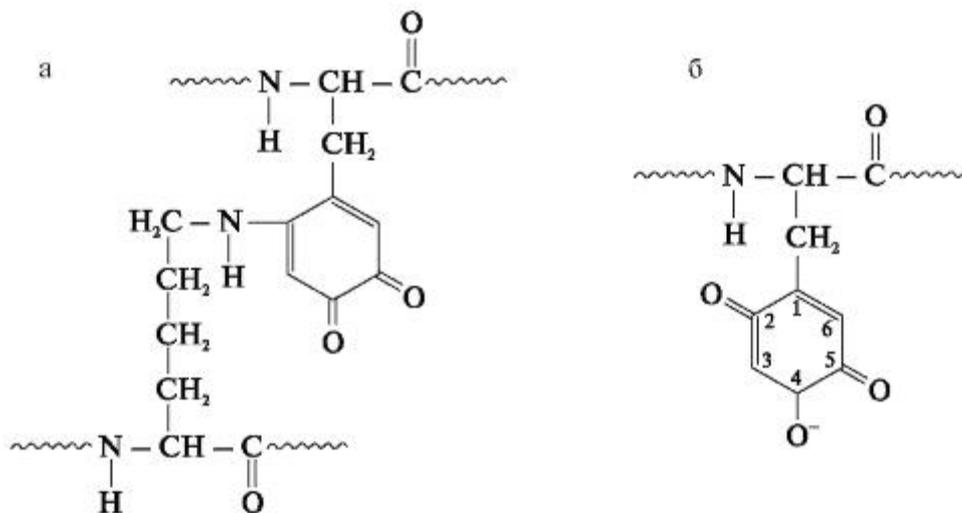


Рис. 5-16. Формулы кофакторов - модифицированных остатков аминокислот: а - лизилтирозилхинон; б - ТОФА-хинон

## ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

### Влияние температуры и рН на активность ферментов

Ранее уже отмечалось, что изменение рН влияет на степень ионизации функциональных групп аминокислотных остатков белка. Именно поэтому изменение рН обычно сопровождается изменением каталитической активности ферментов, хотя известны ферменты, сохраняющие свою активность в широком диапазоне рН (рис. 5-17).

Однако в большинстве случаев ферменты наиболее активны в узком диапазоне значений рН, получившем название оптимума рН, отклонение от которого сопровождается резким снижением их каталитической активности.

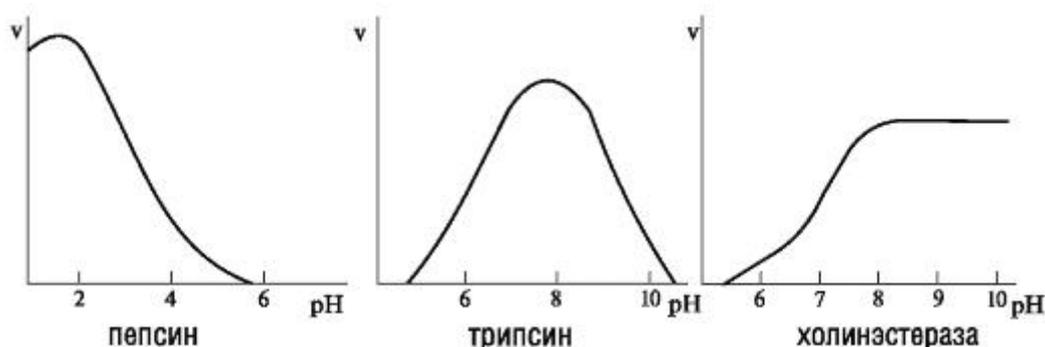


Рис. 5-17. Зависимость активности ферментов от значений рН

Чаще всего оптимум рН ферментов организма человека находится в области нейтральных значений, а также в слабощелочной (рН 7,0-8,0) или слабокислой (рН 5,0-6,0) среде (табл. 5-2).

Таблица 5-2. Значения оптимума рН для некоторых ферментов

Фермент	Локализация, место действия	Оптимум рН
Пепсин	Полость желудка	1,5-2,0
Трипсин	Просвет двенадцатиперстной кишки	7,5-8,0
Химотрипсин	Просвет двенадцатиперстной кишки	7,5-8,0
Амилаза	Слюна	6,8-7,0
Амилаза	Просвет двенадцатиперстной кишки	6,4-7,2
РНКаза А	Просвет двенадцатиперстной кишки	7,0-8,2
Аргиназа	Цитозоль клеток печени	9,5-9,9
Катепсин D	Лизосомы клеток	3,5-5,0

Вместе с тем в организме человека есть ферменты, оптимум рН которых находится в сильнокислой (пепсин) или щелочной (аргиназа и др.) среде. Однако если в процессе пищеварения рН желудочного сока может соответствовать оптимуму рН пепсина, то внутриклеточная среда далеко не всегда обеспечивает оптимум рН для работы ряда ферментов, например аргиназы. Именно поэтому в клетке ферменты могут функционировать в условиях, далеких от идеальных, а рН среды является важным фактором, влияющим на каталитическую активность ферментов.

*В записную книжку врача*

Нормацидной реакции желудочного сока соответствуют значения рН от 1,2 до 2,0. При снижении функции обкладочных клеток желудка, продуцирующих соляную кислоту, рН желудочного сока может достигать 5,0. Поскольку рН желудочного сока в таком случае намного выше оптимума рН фермента пепсина, происходит нарушение переваривания белков пищи в желудке. Именно поэтому при лечении гипоацидных состояний назначают разведенную соляную кислоту. Она нормализует рН желудочного сока, способствует активации пепсина и созданию оптимума рН работы этого фермента.

Зависимость активности ферментов от температуры

Подобно большинству химических реакций, скорость ферментативных реакций обычно повышается с увеличением температуры, достигая максимальных значений (рис. 5-18).

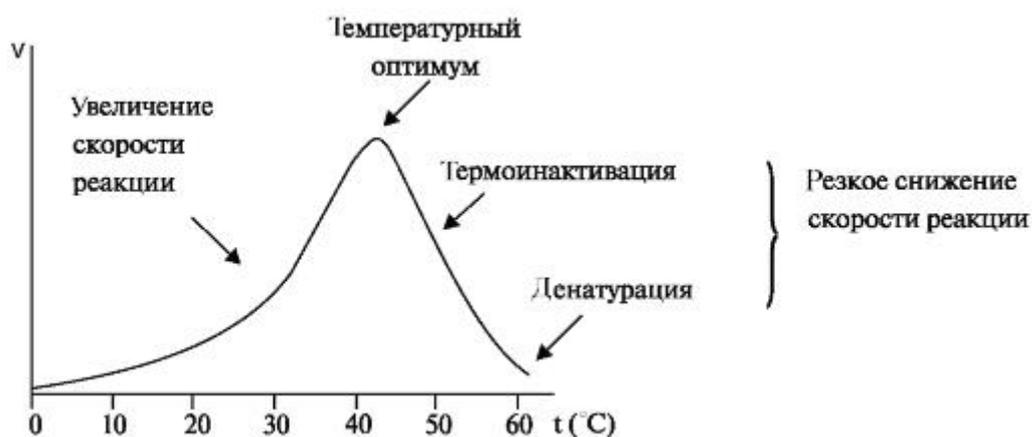


Рис. 5-18. Зависимость скорости ферментативной реакции (v) от температуры (t °C)

*Это температурный оптимум.* Однако при температурах выше 40- 45 °C активность ферментов начинает снижаться, что связано с тепловой инактивацией и денатурацией структуры белков при высоких температурах.

Несмотря на то что критической для человека считают 42 °C, ряд ферментов в пробирке могут выдержать и более высокую температуру. Такие ферменты называют термостабильными. Например, щелочная фосфатаза плаценты (но не других органов) выдерживает 60-минутное нагревание при температуре 60 °C без какой-либо потери каталитической активности. Знание такой закономерности позволяет дифференцировать при анализе активности щелочной фосфатазы крови плацентарный фермент от щелочной фосфатазы

печени и других органов. Это используют для дифференциальной диагностики заболеваний.

Выделенные в чистом виде ферменты наиболее стабильны при низких температурах, поэтому ферментные препараты, используемые в медицине, обычно хранят при температуре 2-8 °С.

## МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Высокая эффективность ферментативного катализа, реализуемая в мягких физиологических условиях внутриклеточной среды, определяется уникальным соответствием между ферментом и субстратом, которое возникает в ходе их взаимодействия.

Связывание субстрата в активном центре, в котором участвуют силы, стабилизирующие пространственную структуру белка (см. главу 1), вызывает значительные изменения в расположении каталитических групп фермента. Это, в свою очередь, оказывает влияние и на молекулу субстрата, структура которого деформируется, подстраиваясь под структуру активного центра. В процессе сложных взаимодействий исходный фермент-субстратный комплекс (ES) претерпевает ряд изменений, в результате которых активный центр становится комплементарен переходному состоянию субстрата (ES<sup>\*</sup>). При этом выделяется небольшое количество энергии, получившей название энергии связывания, которая и вносит основной вклад в достижение субстратом переходного состояния, необходимого для совершения химической реакции (рис. 5-19).

### Ход реакции

Рис. 5-19. Роль энергии связывания в ферментативном катализе. Энергия связывания вносит основной вклад в снижение энергии, которое происходит в результате ряда превращений фермент-субстратного комплекса (ES)→(ES<sup>\*</sup>) с малым энергетическим барьером, в результате чего и происходит большое снижение энергии активации. 1 и 2 - показывают изменения свободной энергии, характерные для некатализируемой и катализируемой реакции S→P соответственно

Рассмотренный механизм изменения структуры фермента и субстрата получил название индуцированного соответствия. Он позволяет объяснить

не только высокую каталитическую эффективность ферментов, но и природу специфичности их действия. Изменения в структуре активного центра, приводящие к определенной ориентации каталитических групп, могут быть вызваны только специфическими для данного фермента субстратами. В случае ферментов, проявляющих относительную субстратную специфичность, взаимные влияния фермента и субстрата в ходе преобразования фермент-субстратного комплекса будут различаться, поэтому эффективность каталитического превращения родственных субстратов тоже не будет одинаковой. Так, эффективность реакции дегидрирования одноатомных спиртов, катализируемой алкогольдегидрогеназой, зависит от структуры радикала и повышается с увеличением длины углеводородного скелета.

### РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Среди множества ферментов, катализирующих химические реакции в клетках, объектами регуляции являются немногие из них. Они получили название *регуляторных*, или *ключевых*. Как правило, ключевые ферменты:

- катализируют неравновесные (необратимые) реакции;
- находятся в самом начале метаболического пути и(или) на развилке нескольких путей;
- являются самыми медленными лимитирующими ферментами, определяющими скорость потока субстратов через весь метаболический путь.

Возможность изменения скорости ферментативной реакции под действием разнообразных веществ, влияющих на активность ферментов, является отличительной особенностью ферментов как биологических катализаторов. Такие вещества называют регуляторами, или эффекторами.

Все способы регуляции скорости ферментативных реакций в организме человека можно разделить на две большие группы, включающие:

- изменение каталитической активности «имеющихся в наличии» молекул фермента;
- изменение количества молекул фермента (или факторов, их регулирующих).

Первую группу относят к быстрым способам регуляции, позволяющим изменить активность ферментов в пределах считанных секунд, вторую - к более медленным, поскольку для ее реализации, как правило, необходимо изменить скорость биосинтеза белка. На это может уйти до нескольких часов или даже дней.

### Способы изменения активности фермента

Увеличение активности фермента называют активацией, а вещества, увеличивающие активность фермента, - активаторами. Торможение (снижение) активности называют ингибированием, а вещества, снижающие активность ферментов, - ингибиторами (рис. 5-20).



Рис. 5-20. Способы регуляции активности ферментов

При обратимой регуляции вещества, изменяющие активность фермента, могут связываться с молекулой фермента с помощью нековалентных или ковалентных связей. Последний вариант получил название химической (или ковалентной) модификации. Однако в обоих случаях регуляторы связываются с ферментом обратимо, поэтому ферментативная активность может вернуться в исходное состояние. При необратимой регуляции происходит необратимая модификация структуры фермента.

### Ингибирование активности ферментов

Необратимое ингибирование приводит к потере ферментативной активности в результате ковалентного связывания необратимого ингибитора с ферментом. Чаще всего такой способ регуляции активности является нефизиологическим. Он присущ разнообразным токсичным веществам и лекарственным средствам.

Неспецифическое ингибирование вызывают вещества, ковалентно связывающиеся с определенными аминокислотными остатками. Этим

определяется токсическое действие ионов ртути и свинца на организм. Например, п-хлормеркурибензоат вызывает инактивацию практически всех ферментов, в активный центр которых входят остатки цистеина (рис. 5-21).

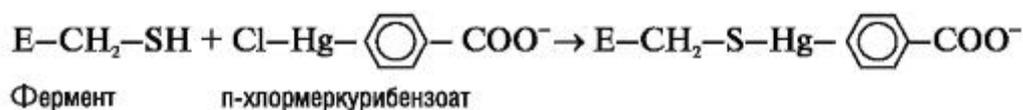


Рис. 5-21. Связывание п-хлормеркурибензоата с SH-группой фермента

При специфическом необратимом ингибировании ковалентной модификации подвергается один фермент. Чаще всего происходит так называемое механизм-активируемое (называемое также суицидным) ингибирование (рис. 5-22). В таком случае ингибитор (I) представляет собой субстрат-самоубийцу. Под действием фермента (E) он превращается в высокореакционноспособную молекулу ( $\text{Ir}^*$ ), которая не превращается в продукт (P), а ковалентно связывается в активном центре этого фермента, вызывая его необратимую инактивацию. Поскольку каждый фермент характеризуется определенной субстратной специфичностью, такой субстрат-самоубийца будет специфически ингибировать один определенный фермент.



Рис. 5-22. Необратимое механизм-активируемое ингибирование фермента (схема): E - фермент; I - механизм-активируемый ингибитор;  $\text{Ir}^*$  - реакционноспособный интермедиат, образованный в ходе ферментативного превращения механизм-активируемого ингибитора, ковалентно связывается в активном центре фермента

*В записную книжку врача*

Механизм-активируемые ингибиторы в лечении злокачественных опухолей

Для лечения злокачественных опухолей применяют аналог тимина фторурацил. Поступая в организм, он превращается в 2'-дезоксидифтор-УМФ - мощный механизм-активируемый ингибитор тимидилатсинтазы - фермента, катализирующего образование дезокситимидинмонофосфата (дТМФ). Благодаря присутствию фтора в пятом положении пиримидинового кольца, 2'-дезоксидифтор-УМФ не может ни превратиться в дТМФ, ни

диссоциировать от фермента. Это приводит к необратимой инактивации тимидилатсинтазы и в конечном итоге к ингибированию синтеза ДНК, необходимого для деления опухолевых клеток.

При обратимом ингибировании ингибитор связывается с ферментом нековалентными связями и легко диссоциирует от последнего. Существует несколько типов обратимого ингибирования: *конкурентное, неконкурентное, смешанное и бесконкурентное*. Ниже представлены первые два.

При *конкурентном ингибировании* ингибитор обладает структурным сходством с субстратом и конкурирует с ним за активный центр фермента. Именно поэтому выраженность конкурентного ингибирования будет определяться соотношением концентраций ингибитора и субстрата. Чем выше будет это соотношение, тем больше ингибирование фермента, и наоборот.

Примером конкурентного ингибирования может служить торможение ФАД-зависимого фермента цикла трикарбоновых кислот сукцинатдегидрогеназы (СДГ) малонатом (рис. 5-23). Сукцинатдегидрогеназа катализирует реакцию дегидрирования сукцината, в ходе которой два атома водорода переносятся от субстрата на простетическую группу фермента ФАД.

Структура малоната и субстрата этого фермента отличается всего на одну  $\text{CH}_2$ -группу. Однако фермент не способен катализировать реакцию дегидрирования малоната, который тем не менее может связываться в активном центре сукцинатдегидрогеназы и ингибировать реакцию дегидрирования сукцината.

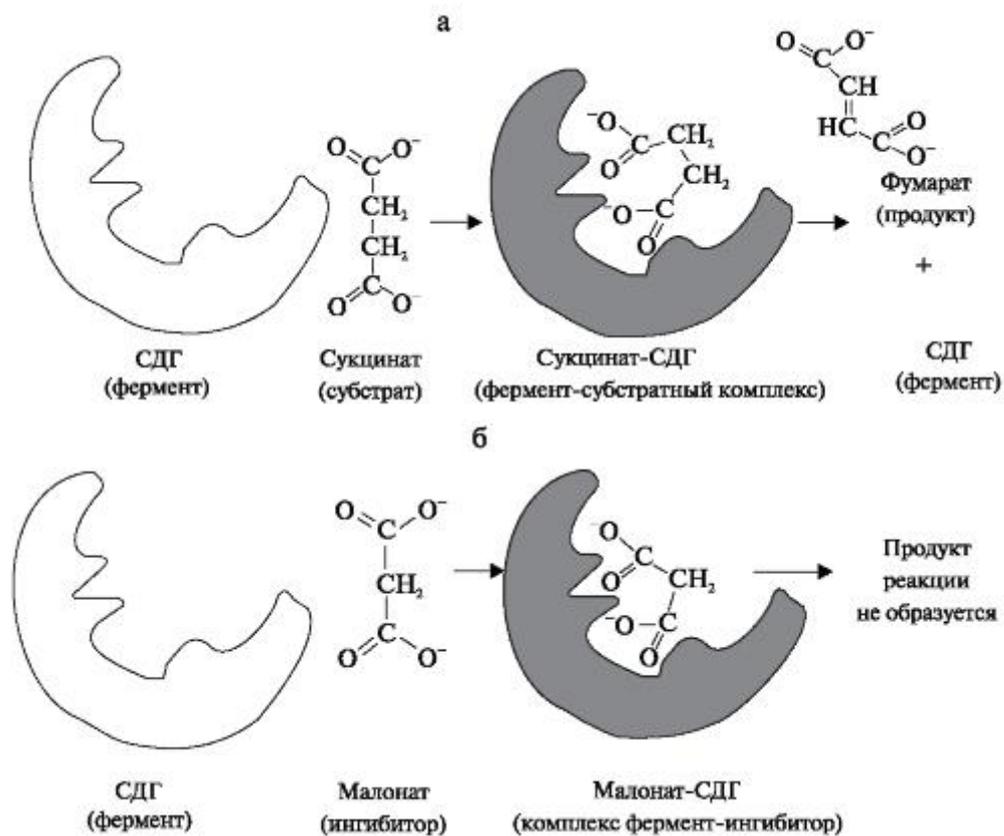


Рис. 5-23. Связывание сукцината (а) и малоната (б) в активном центре сукцинатдегидрогеназы

Кинетически конкурентное ингибирование характеризуется увеличением  $K_M$  при неизменном значении  $V_{\max}$  (рис. 5-24).

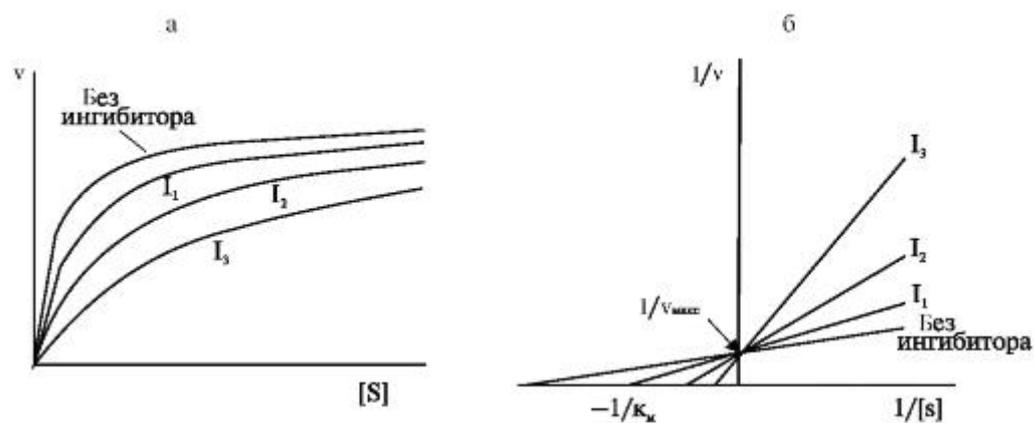


Рис. 5-24. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии возрастающих концентраций ( $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$ ) конкурентного ингибитора в координатах: а -  $v$  от  $[S]$ ; б -  $1/v$  от  $1/[S]$

В случае ферментов с относительной субстратной специфичностью, катализирующих превращение нескольких субстратов, один субстрат может выступать в качестве ингибитора для другого субстрата.

Например, фермент алкогольдегидрогеназа может катализировать реакцию дегидрирования как этилового спирта, так и метилового (рис. 5-25):

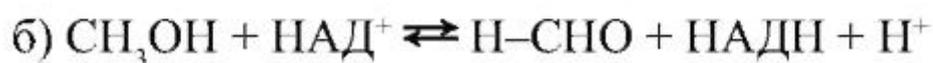
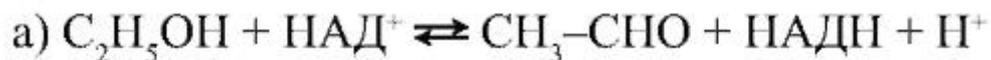


Рис. 5-25. Реакции дегидрирования алкогольдегидрогеназой этилового (а) и метилового спирта (б)

И если оба субстрата будут претендовать на активный центр алкогольдегидрогеназы, предпочтение будет отдано тому из них, концентрация которого будет больше. Иначе говоря, один субстрат будет выступать в качестве конкурентного ингибитора другого.

*В записную книжку врача*

Лечение отравления метиловым спиртом

Метиловый спирт (метанол) - сильный яд, к которому особенно чувствительна центральная нервная система. Прием даже небольшого количества метанола (30-50 мл) может привести к слепоте, парезам и параличам. Более высокие дозы смертельны для человека. Одним из способов лечения отравления метанолом считают введение (внутрь или внутривенно) большого количества этанола, что позволяет насытить все активные центры алкогольдегидрогеназы и, таким образом, затормозить метаболизм метанола. В результате этанол является конкурентным ингибитором алкогольдегидрогеназы по отношению к метанолу. Хотя взятые по отдельности оба вещества - субстраты одного фермента.

При *неконкурентном ингибировании* вещество, тормозящее скорость ферментативной реакции, не обладает структурным сходством с субстратом. Поэтому конкуренции ингибитора и субстрата за активный центр фермента не происходит, и неконкурентный ингибитор, как правило, связывается с молекулой фермента вне активного центра. Однако это вызывает такое

изменение структуры фермента, при котором нарушается нормальное взаимодействие активного центра с субстратом. При этом неконкурентные ингибиторы не влияют на связывание фермента с субстратом, а изменяют только  $V_{\text{макс}}$ . Поскольку неконкурентный ингибитор может связываться как с E, так и с ES, такое ингибирование нельзя уменьшить путем простого увеличения концентрации субстрата.

Кинетически неконкурентное ингибирование характеризуется снижением  $V_{\text{макс}}$  при неизменном значении  $K_M$  (рис. 5-26).

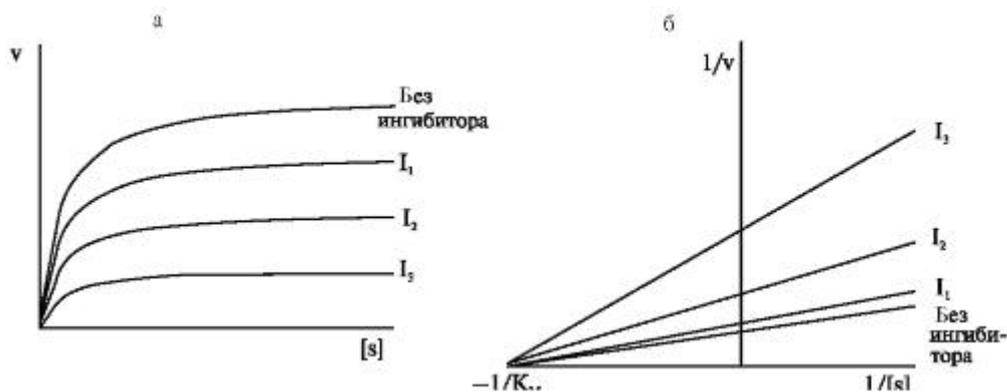


Рис. 5-26. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии возрастающих концентраций ( $I_1, I_2, I_3$ ) неконкурентного ингибитора в координатах: а -  $v$  от  $[S]$ ; б -  $1/v$  от  $1/[S]$

В табл. 5-3 суммированы основные отличия конкурентного и неконкурентного ингибирования.

Таблица 5-3. Основные отличия конкурентного и неконкурентного ингибирования

Особенности действия ингибитора	Конкурентное ингибирование	Неконкурентное ингибирование
Место действия	Активный центр	Любой участок молекулы
Сходство с субстратом	Есть	Нет
Комплексы с ферментом	ES, EI	ES, EI, ESI
Влияние на кинетические параметры	$\uparrow K_M, V = \text{CONST}$	$\downarrow V, K_M = \text{CONST}$

Стрелки показывают увеличение ( $\uparrow$ ) или снижение ( $\downarrow$ ), а знак равенства - отсутствие изменений кинетического параметра.

## Смешанное и бесконкурентное ингибирование

Неконкурентное ингибирование в чистом виде встречаются очень редко. Чаще наблюдают смешанное ингибирование, когда под действием ингибитора происходит не только снижение  $V_{\text{макс}}$ , но и изменение  $K_M$ .

В том случае, когда кинетика ингибирования активности фермента характеризуется снижением  $V_{\text{макс}}$  и увеличением  $K_M$ , а наклон кривой на графиках зависимости  $1/v$  от  $1/[S]$  в присутствии ингибитора не меняется, такой тип ингибирования называют бесконкурентным. Некоторые лекарственные препараты являются бесконкурентными ингибиторами ферментов. Например, ионы лития ( $\text{Li}^+$ ), используемые в психиатрии для лечения некоторых форм депрессии, - бесконкурентные ингибиторы миоинозитолфосфатазы.

## Аллостерическая регуляция

Этот тип регуляции свойственен ферментам, в структуре которых, помимо активного центра, есть еще один центр, называемый *аллостерическим* (от греч. *alios* - другой и *stereos* - пространственный). Он может находиться на значительном расстоянии от активного центра. Как правило, аллостерические центры обнаруживают у ферментов, обладающих четвертичной структурой. При этом аллостерический центр может располагаться на одной субъединице, а активный центр на другой. Регуляторы присоединяются к аллостерическому центру с помощью нековалентных связей. Это приводит к конформационным изменениям в структуре всей молекулы, в результате чего каталитическая активность фермента либо увеличивается, либо снижается. Например, фермент цАМФ-зависимая протеинкиназа катализирует реакцию фосфорилирования белка (рис. 5-27).



Рис. 5-27. Реакция фосфорилирования белка

Фермент представляет собой гетеротетрамер, состоящий из двух типов субъединиц: регуляторной (Р) и каталитической (К) (рис. 5-28). Регуляторная субъединица содержит 2 аллостерических центра, в которых связывается аллостерический активатор - цАМФ, а каталитическая - осуществляет собственно реакцию фосфорилирования (присоединения фосфата к

аминокислотным остаткам серина или треонина белка-субстрата). В отсутствие цАМФ фермент неактивен. При связывании цАМФ в аллостерических центрах происходит высвобождение каталитических субъединиц из тетрамерного комплекса, которые могут осуществлять реакцию фосфорилирования белков только в виде мономеров. При снижении концентрации свободного цАМФ в клетке он диссоциирует от регуляторных субъединиц, которые вновь соединяются с каталитическими субъединицами в функционально неактивный тетрамер.

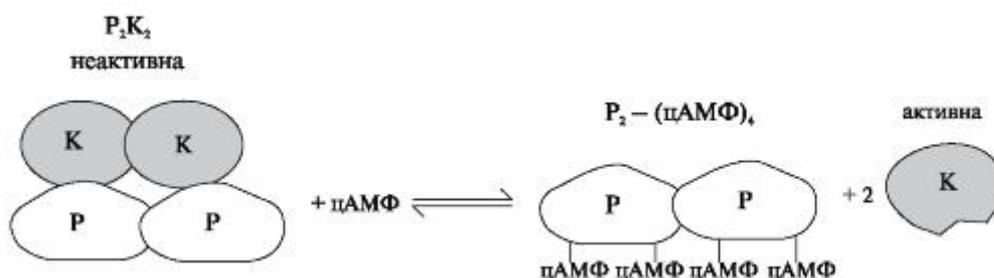


Рис. 5-28. Аллостерическая активация цАМФ-зависимой протеинкиназы под действием цАМФ (схема): P - регуляторные субъединицы; K - каталитические субъединицы

Однако чаще при аллостерической регуляции четвертичная структура белка не меняется, а происходит изменение конформации субъединиц, которое и приводит к изменению каталитической активности фермента. Например, цГМФ-зависимая протеинкиназа, катализирующая реакцию цГМФ-зависимого фосфорилирования белков, аллостерически активируется цГМФ без изменения своего олигомерного состава. Другой пример аллостерической регуляции - ингибирование аспартат-карбамоилтрансферазы - первого фермента биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов конечным продуктом данного метаболического пути, включающего несколько промежуточных стадий, цитидинтрифосфатом (ЦТФ).

Аллостерическое ингибирование конечным продуктом метаболического пути активности первого фермента - распространенный способ регуляции обмена веществ в клетке (рис. 5-29).

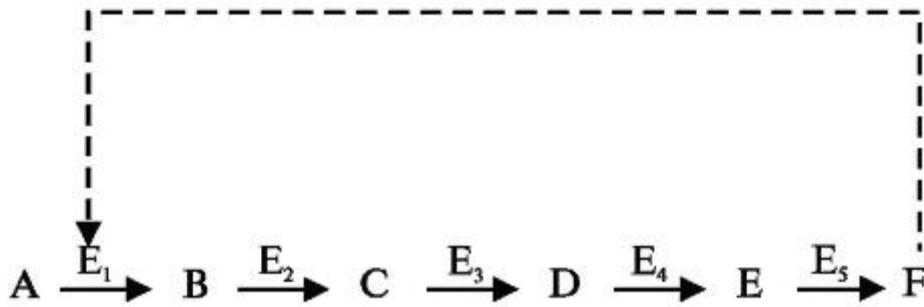


Рис. 5-29. Механизм регуляции активности фермента по принципу отрицательной обратной связи (схема). Конечный продукт метаболического пути (F) является аллостерическим ингибитором первого фермента этого пути ( $E_1$ )

Его еще называют механизмом *отрицательной обратной связи*. Он сигнализирует клетке о том, что количество синтезируемого вещества достигло определенного уровня, превышение которого нежелательно.

#### Ковалентная модификация

Еще один быстрый способ регуляции активности фермента - ковалентная модификация, в ходе которой к белку присоединяется определенная химическая группа. В предыдущем разделе уже говорилось о фосфорилировании - присоединении фосфата к аминокислотным остаткам белка-субстрата. Эту реакцию катализируют ферменты класса трансфераз - протеинкиназы. При физиологических значениях pH фосфатная группа несет отрицательный заряд. Именно поэтому присоединение при участии протеинкиназ одного или нескольких остатков фосфата изменяет третичную (четвертичную) структуру и каталитическую активность фосфорилированного фермента.

Ковалентная модификация ферментов, как правило, обратима. В клетках существуют ферменты, возвращающие ковалентно модифицированные белки в исходное состояние. Например, протеинфосфатазы катализируют реакцию дефосфорилирования белка (рис. 5-30).



Рис. 5-30. Реакция дефосфорилирования белка. Отщепление остатка фосфата возвращает структуру молекулы фермента и его каталитическую активность в исходное состояние

Фосфорилирование - не единственный способ обратимой ковалентной модификации ферментов в клетке. Другие виды обратимой химической модификации ферментов, имеющие важное регуляторное значение, приведены в табл. 5-4.

Таблица 5-4. Примеры обратимой ковалентной модификации ферментов (Е)

\* SAM - S-аденозилметионин, SAГ - аденозилгомоцистеин.

Помимо обратимой ковалентной модификации, в организме человека протекают и реакции необратимой ковалентной модификации ферментов. Физиологическое значение имеют реакции ограниченного протеолизанактивных предшественников протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта, которые приводят к образованию каталитически активных протеиназ: пепсина, трипсина, химотрипсина.

Например, активный пепсин - основной протеолитический фермент желудка, образуется в результате отщепления 42-членного N-концевого пептида от пепсиногена (состоящего из 370 аминокислотных остатков) и конформационных перестроек оставшейся части полипептидной цепи. Сначала процесс отщепления инициируется кислой средой, после чего он протекает автокаталитически, т.е. образовавшиеся молекулы активного пепсина участвуют в превращении пепсиногена в пепсин (рис. 5-31).

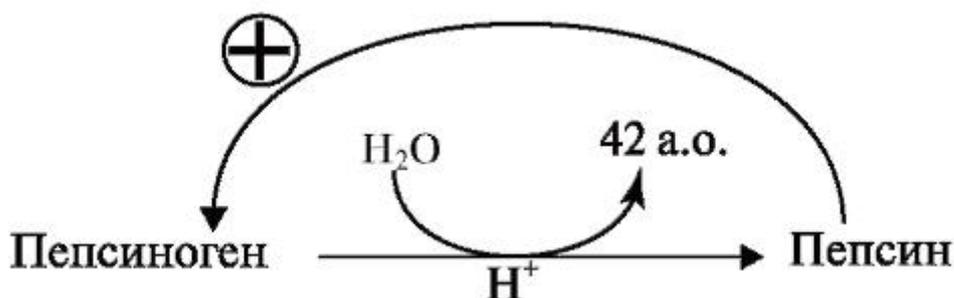


Рис. 5-31. Превращение пепсиногена в пепсин. а.о. - аминокислотные остатки

Таким образом, в результате ограниченного протеолиза происходит необратимая ковалентная модификация и фермент остается активированным в течение всего времени его жизни.

Изменение количества ферментов (или факторов, их регулирующих)

Изменение количества ферментов - самый медленный способ регуляции, который обычно затрагивает изменение биосинтеза белка или его метаболизма.

Определенная часть ферментов вырабатывается в организме человека постоянно, и скорость их синтеза избирательно не регулируется. Такие ферменты называют конститутивными.

Другие ферменты вырабатываются в необходимом количестве только в присутствии определенных индукторов. Такие ферменты называют индуцибельными. Индукцию может вызывать субстрат данного фермента.

К числу индуцибельных ферментов, синтез которых стимулируют субстраты, относят цитохром P450. Этот фермент катализирует реакцию гидроксилирования эндогенных (например, стероидов) и экзогенных соединений. Окисление таких веществ цитохромом P450 повышает их растворимость в воде и облегчает тем самым их выведение из организма. При попадании ксенобиотика (такого, например, как снотворное средство фенobarбитал) в печени многократно возрастает уровень цитохрома P450 за счет индукции его синтеза.

Индукторами ферментов могут быть и гормоны. Например, стероидные гормоны коры надпочечников - глюкокортикоиды индуцируют синтез ферментов глюконеогенеза. Глюконеогенез - синтез глюкозы из органических кислот, поэтому индукция ферментов этого метаболического пути приводит к увеличению концентрации глюкозы в крови.

Помимо изменения концентрации ферментов, клетка может регулировать количество факторов, контролирующих их активность. В тканях и биологических жидкостях человека содержатся белки-ингибиторы протеолитических ферментов. Считают, что деструкция ткани и другие патологические процессы возникают при нарушении соотношения протеиназа/ингибитор. Например, при дефиците  $\alpha_1$ -ингибитора протеиназ и  $\alpha_2$ -макроглобулина плазмы крови у людей отмечают развитие ряда деструктивных заболеваний, таких, как эмфизема легких. (Это заболевание характеризуется деструкцией альвеол легких.) Введение  $\alpha_1$ -ингибитора протеиназ таким больным позволяет затормозить развитие болезни.

## Изоферменты

Изоферментами называют каталитически сходные множественные формы фермента у организмов одного вида, отличающиеся по своим физико-химическим и иммунологическим свойствам.

Различают следующие изоферменты:

- Генетически независимые белки, кодируемые разными генами. Например, цитозольная и митохондриальная формы малатдегидрогеназы (МДГ), катализирующие обратимую реакцию дегидрирования малата:



- Олигомерные ферменты, состоящие из разных субъединиц. Например, фермент гликолиза лактатдегидрогеназа (ЛДГ) катализирует обратимую реакцию дегидрирования молочной кислоты (лактата):



Фермент является тетрамером, который может быть построен из двух типов субъединиц - Н и М. Они получили свое название по первым буквам органов, из которых были выделены (от англ. *heart* - сердце и *muscle* - мышца).

Субъединичный состав ЛДГ в разных тканях зависит от того, какие гены в них экспрессируются. В организме человека присутствует пять изоферментов ЛДГ, образованных Н- и М-субъединицами (табл. 5-5).

Таблица 5-5. Распределение изоферментов лактатдегидрогеназы в органах

Изофермент	Состав	Преимущественная локализация	Электрофоретическая подвижность
ЛДГ <sub>1</sub>	H <sub>4</sub>	Миокард > почки >> остальные органы	+++++
ЛДГ <sub>2</sub>	H <sub>3</sub> M <sub>1</sub>	Мозг ≥ эритроциты > миокард ≈ почки	++++
ЛДГ <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> M <sub>2</sub>	Лимфоциты > эритроциты > мозг	+++
ЛДГ <sub>4</sub>	H <sub>1</sub> M <sub>3</sub>	Печень > скелетные мышцы	++
ЛДГ <sub>5</sub>	M <sub>4</sub>	Печень > скелетные мышцы	+

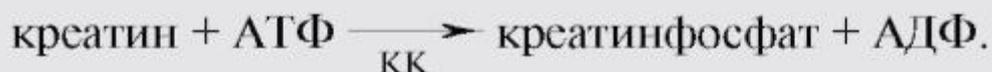
Изоферменты ЛДГ различают по оптимуму рН, сродству к субстратам реакции, электрофоретической подвижности.

Преобладание того или иного изофермента в определенных тканях имеет большое биологическое значение. Например, в тканях с преобладанием анаэробного метаболизма (скелетных мышцах, печени) присутствует ЛДГ<sub>5</sub>. Данный изофермент нечувствителен к ингибированию физиологическими концентрациями пирувата. Это способствует эффективному протеканию гликолиза (так называют процесс расщепления глюкозы до молочной кислоты, сопровождаемый образованием АТФ) в анаэробных условиях. ЛДГ<sub>1</sub> находится в тканях с преимущественно аэробным типом метаболизма. Активность этого фермента ингибирует пируват. Это препятствует накоплению лактата и создает условия для аэробного окисления пирувата.

*В записную книжку врача*

Креатинкиназа и ее диагностическое значение

Креатинкиназа (КК)-фермент, катализирующий обратимую реакцию переноса остатка фосфорной кислоты на молекулу креатина с образованием резервного макроэрга креатинфосфата:



Фермент представляет собой димер, в образовании которого могут участвовать два типа субъединиц: М (мышечный) и В (мозговой; от англ. *brain* - мозг). Именно поэтому существует три варианта изоферментов КК: ММ - мышечный, ВВ - мозговой, и МВ, который обнаруживают в основном в миокарде.

Активность КК миокарда и мозга составляет соответственно 13,3 и 6,7% активности КК скелетной мускулатуры. В других органах она намного меньше. Увеличение концентрации ММ-изофермента отмечают после тяжелой физической нагрузки, при травматическом повреждении мышц, мышечных дистрофиях. Повышение уровня ВВ-изофермента может возникать в крови после гипоксического поражения ткани мозга. Увеличение уровня МВ-изофермента характерно для первых суток после инфаркта миокарда

## ФЕРМЕНТЫ В МЕДИЦИНЕ

Медицинскую энзимологию подразделяют на два направления: *энзимодиагностику* и *энзимотерапию*.

## Энзимодиагностика

Исследование активности внутриклеточных ферментов в биоптатах тканей или форменных элементах крови позволяет обнаружить увеличение, снижение, а также полное их отсутствие в организме. В одних случаях изменение активности ферментов может является критерием предрасположенности человека или фактором риска развития определенных заболеваний, в других - позволяет диагностировать врожденные или приобретенные энзимопатии.

Например, повышение активности моноаминоксидазы (МАО) в тромбоцитах взрослых людей увеличивает, а снижение активности уменьшает риск развития болезни Паркинсона. Дефицит или полное отсутствие фермента аденозиндезаминазы в лимфоцитах наблюдают при врожденном иммунодефиците.

Большинство ферментативных реакций в организме протекает внутри клеток в определенных субклеточных компартментах. В биологические жидкости, в первую очередь в кровь, внутриклеточные ферменты попадают в результате гибели клеток или увеличения проницаемости клеточных мембран. Кроме того, в крови циркулируют секреторные ферменты, уровень которых при различных заболеваниях также может изменяться.

Наиболее информативным для диагностики считают определение активности внутриклеточных ферментов, поскольку в норме их активность в сыворотке (плазме) крови невысока или вообще не определяется (табл. 5-6).

Таблица 5-6. Ферменты, используемые при диагностике заболеваний некоторых органов и тканей

Орган/заболевание	Ферменты, определяемые в плазме или сыворотке крови
Инфаркт миокарда	Креатинкиназа (КК-МВ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ <sub>1</sub> , ЛДГ <sub>2</sub> )
Заболевание печени	Лактатдегидрогеназа (ЛДГ <sub>4</sub> , ЛДГ <sub>5</sub> ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), орнитинкарбамоилтрансфераза, уроканиназа, гистидаза, холинэстераза

Заболевания скелетных мышц	Креатинкиназа (КК-ММ), альдолаза, лактатдегидрогеназа (ЛДГ <sub>4</sub> , ЛДГ <sub>5</sub> )
----------------------------	--

Повышение активности внутриклеточных ферментов в крови могут быть как результатом некроза клеток (КК и АСТ при инфаркте миокарда), так и повышения проницаемости клеточных мембран (АЛТ и АСТ при вирусном гепатите, КК при мышечных дистрофиях).

С медицинской точки зрения знание преимущественной тканевой локализации изоферментов позволяет использовать их в дифференциальной диагностике заболеваний. Увеличение активности ЛДГ<sub>1</sub> и ЛДГ<sub>2</sub> отмечают в сыворотке крови в течение первых суток после возникновения инфаркта миокарда. Увеличение активности ЛДГ<sub>5</sub> наблюдают при поражениях печени (гепатите, интоксикациях, травматических повреждениях, циррозе).

Возможно и снижение активности секреторных ферментов по сравнению с нормальными величинами, которое может быть обусловлено:

- уменьшением числа клеток, секретирующих данный фермент (например, холинэстеразы при циррозе печени);
- недостаточным синтезом конкретного фермента (например, церулоплазмина при гепатолентикулярной дегенерации);
- увеличением в крови специфических ингибиторов (например,  $\alpha_1$ -протеиназного ингибитора,  $\alpha_2$ -макроглобулина и других плазменных ингибиторов).

*В записную книжку врача Энзимопатии*

Нарушение синтеза определенных ферментов обычно приводит к возникновению заболеваний, получивших название энзимопатий. Различают врожденные и приобретенные энзимопатии. Например, тяжелые врожденные заболевания развиваются при отсутствии ферментов, участвующих в обмене гликогена, а примером приобретенных энзимопатий может быть непереносимость лактозы, свойственная взрослым и пожилым людям.

Энзимотерапия

Энзимотерапия - использование ферментов и модуляторов действия ферментов (активаторов и ингибиторов) в качестве лекарственных средств. В одних случаях это может быть *заместительная терапия* - применение

ферментных препаратов, которые восполняют дефицит собственного фермента в организме. Примером такого рода лечения может быть назначение натурального желудочного сока или смеси соляной кислоты с пепсином при гастритах с пониженной секрецией или ферментов поджелудочной железы для улучшения пищеварения в кишечнике при энтероколитах.

В других случаях врачи используют ферментные препараты, основываясь на знании механизмов их действия. Для очистки гнойных ран, например, применяют протеолитические ферменты. Они эффективно расщепляют некротизированные ткани, не влияя на здоровые.

Фермент гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту. Это способствует увеличению проницаемости тканей. Именно поэтому коммерческие препараты гиалуронидазы (лидаза, ронидаза) используют в медицинской практике вместе с антибиотиками при лечении туберкулеза или с противовоспалительными средствами при ревматоидном артрите для повышения концентрации в очагах поражения.

*В записную книжку врача*

Применение ферментных препаратов в стоматологии

Апликации препаратов протеолитических ферментов (трипсина, химотрипсина) используют для обработки корневых каналов при периодонтите. Эти препараты способствуют расщеплению некротизированных тканей и белковых компонентов гноя и быстрому удалению из канала нежизнеспособных тканей.

Помимо энзимодиагностики и энзимотерапии ферменты служат важным инструментом ферментных методов анализа. Использование химических реакций, катализируемых ферментами, позволяет определить довольно много клинически важных метаболитов, таких, как глюкоза, мочевины, мочевая кислота, холестерол и др.

Например, для определения количества глюкозы в крови применяют реакцию ее окисления кислородом воздуха, которую катализирует фермент глюкозооксидаза (рис. 5-32).

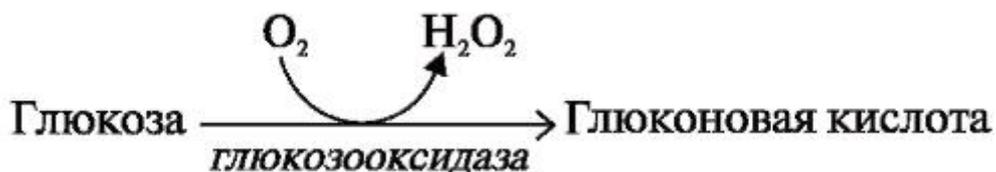


Рис. 5-32. Реакция окисления глюкозы кислородом воздуха

## ГЛАВА 6. РИБОЗИМЫ И АБЗИМЫ

### РИБОЗИМЫ

Рибозимы - каталитически активные молекулы РНК (рис. 6-1).

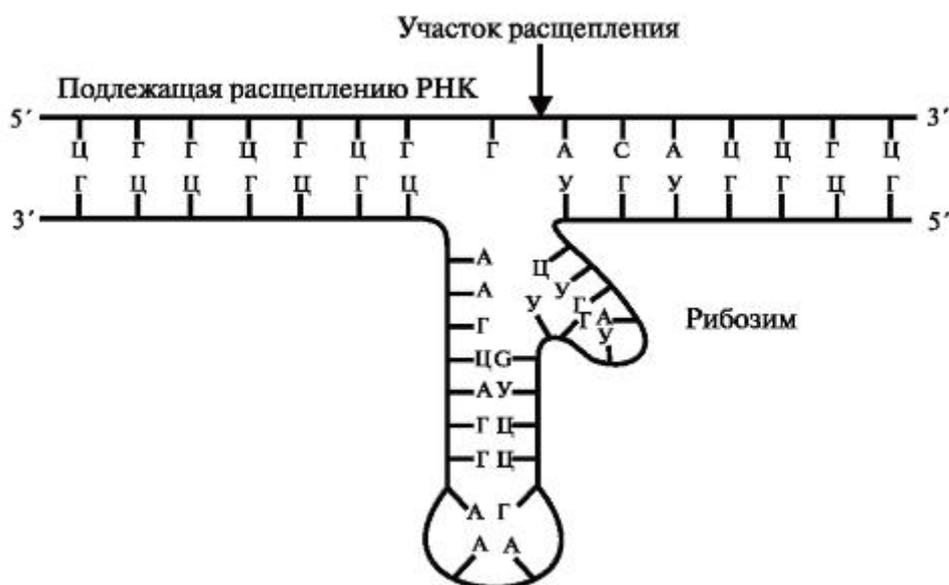


Рис. 6-1. Структура рибозима и его комплементарное связывание с РНК-субстратом

У низших организмов рибозимы осуществляют так называемый *самосплайсинг*, в процессе которого интроны, расположенные между кодирующими участками первичных транскриптов РНК, не только «выщепляют сами себя» из молекулы РНК, но и сшивают кодирующие последовательности с образованием зрелой мРНК. Отличительной особенностью таких каталитически активных интронов считают высокую специфичность в отношении фосфодиэфирных связей строго определенных участков полирибонуклеотидной последовательности. Во многих случаях скорости реакций, катализируемых рибозимами и ферментами, сопоставимы.

В клетках эукариот сплайсинг незрелых молекул мРНК осуществляет рибонуклеопротеиновый катализатор - *сплайсосома*. Она присоединяется в

ядре к первичному транскрипту РНК и катализирует отщепление интронов. В ходе исследований последних лет установлено, что именно молекулы малых ядерных РНК, входящих в состав сплайсосомы, узнают подлежащую удалению нуклеотидную последовательность интрона, способствуя сплайсингу РНК при отсутствии многочисленных белков сплайсосом.

*В записную книжку врача*

### Применение рибозимов в медицине

Терапевтический эффект рибозимов связывают с расщеплением специфических мРНК-мишеней (рис. 6-2). Связываясь с мРНК, рибозимы осуществляют их расщепление и деградацию, что приводит к нарушению биосинтеза соответствующего белка.

Одним из наиболее продвинутых в плане изучения клинического применения считают препарат *ангиозим<sup>®</sup> (Angiozyme)* - синтетический рибозим, вызывающий торможение ангиогенеза, который был разработан для комплексного лечения опухолей.

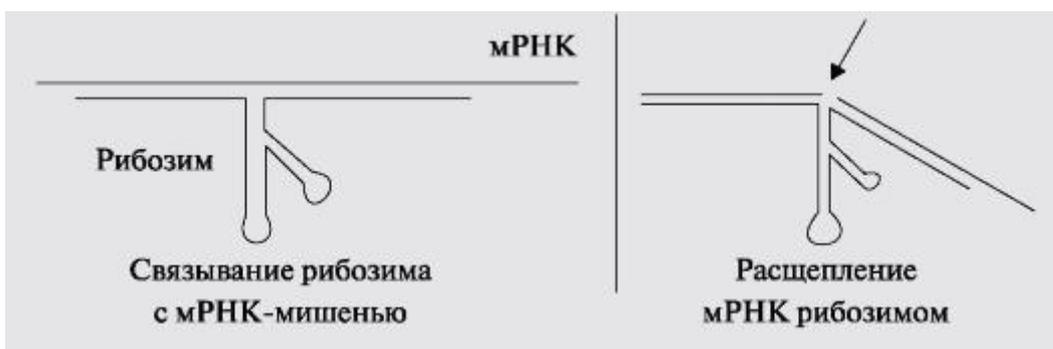


Рис. 6-2. Расщепление специфических мРНК-мишеней

Изучение каталитической функции рибозимов представляет не только теоретический интерес. Как показывают эксперименты на клетках животных и человека, некоторые сконструированные искусственным путем рибозимы могут подавлять репликацию вируса СПИДа. Введение таких рибозимов в иммунокомпетентные клетки приводило к возникновению длительной устойчивости таких клеток к заражению данным вирусом. По мнению ученых, в будущем рибозимы станут эффективным лекарственным средством для лечения этого заболевания.

Практически во всех клетках различных организмов, в том числе и человека, обнаружена *РНКаза Р* - это комплекс «РНК-белок», каталитическую

активность которого осуществляет именно рибонуклеотидный (300-400 оснований) компонент. РНКазы Р осуществляют процессинг различных молекул РНК, которые являются субстратами этого рибозима. В рибонуклеотидной последовательности РНКазы Р выделяют два домена: один отвечает за узнавание субстрата, а другой - рибозимный - осуществляет каталитическое превращение. Белковый компонент РНКазы Р, а также другие внутриклеточные белки осуществляют регуляцию рибозимной активности, при изменении которой нарушается процессинг незрелых молекул РНК (например, тРНК, рРНК). Еще одним примером каталитически активной РНК может быть рРНК, которая осуществляет пептидилтрансферазную реакцию в процессе биосинтеза белка на рибосомах.

## КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ АНТИТЕЛА (АБЗИМЫ)

Ученые давно обращали внимание на сходство механизмов высокоспецифичного узнавания антителом антигена и ферментом субстрата. В настоящее время окончательно установлено, что антитела, помимо связывания и удаления антигена, способны проявлять ферментативную активность. Такие антитела получили название абзимов (гибрид английских слов *antibody* и *enzyme*, буквально: антитело- фермент). Природные антитела могут проявлять протеолитическую, ДНКазную, РНКазную, фосфатазную, протеинкиназную активности. Абзимы обнаружены среди IgG и IgM крови и секреторных IgA женского молока.

Возникновение каталитически активных антител обнаружено при целом ряде пато- и физиологических состояний организма. Например, уровень абзимов сильно возрастает в молоке женщин, перенесших в период беременности вирусные или аллергические заболевания. По мнению ученых, каталитически активные антитела молока, гидролизуя чужеродные ДНК и РНК, могут вносить свой вклад в защиту новорожденного от вирусных и бактериальных инфекций.

Каталитически активные антитела обнаружены в крови больных с различными аутоиммунными заболеваниями, особенно в периоды их обострения. (Напомним, что аутоиммунными называют заболевания, при которых в организме вырабатываются антитела к собственным белкам

организма.) К числу таких заболеваний относят системную красную волчанку, ревматоидный артрит, аутоиммунное воспаление щитовидной железы (тиреоидит), бронхиальную астму. Каталитически активные антитела обнаружены также при рассеянном склерозе, миеломной болезни и некоторых вирусных заболеваниях, таких, как вирусный гепатит и СПИД. В то же время абзимы не обнаружены при многих заболеваниях, при которых отмечено изменение иммунного статуса организма (туберкулезе, пневмонии, тонзиллите, некоторых видах злокачественных опухолей). При этом каталитически активные антитела могут, по-видимому, играть как положительную, так и отрицательную роль в развитии болезни. Например, ДНК-гидролизующие антитела, выделенные из крови больных системной красной волчанкой и мочи больных миеломной болезнью, оказывают на клетки токсическое действие, которое может способствовать развитию этих заболеваний. В то же время абзимы, обладающие избирательной протеолитической активностью в отношении тиреоглобулина, рассматривают в качестве одного из факторов защиты организма при аутоиммунном тиреоидите. Расщепляя тиреоглобулин, такие абзимы могут способствовать снижению аутоиммунного ответа организма на этот белок.

## **ГЛАВА 8. ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ**

Вопросы по теме

- Пассивный мембранный транспорт (простая и облегченная диффузия).
- Активный (первичный и вторичный) транспорт.
- Унипорт и котранспорт.
- Транспортные белки и ионные каналы.

### **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА**

Главной функцией биомембран является избирательный транспорт различных веществ и ионов. Обмен между клеткой и внешней средой, а также между субклеточными компартментами предполагает трансмембранный перенос транспортируемых молекул. Липидная фаза мембран хорошо проницаема для ограниченного числа неполярных молекул, к числу которых относят стероиды, тиреоидные гормоны, жирные кислоты, а также газы  $O_2$  и  $NO$ . Такие вещества пересекают мембрану в

результате *простой диффузии* по концентрационному градиенту. Подавляющее большинство полярных и заряженных молекул переносится через мембрану с помощью различных транспортных белков.

Различают пассивные и активные транспортные системы. Первые осуществляют трансмембранный перенос веществ за счет концентрационного градиента. Поскольку в этом процессе транспортные белки играют роль своеобразных пор или каналов, по которым гидрофильные молекулы проходят через мембрану, такой перенос веществ называют *облегченной диффузией*. Так функционирует анионный канал в мембране эритроцита, обеспечивающий движение анионов  $\text{Cl}^-$  и  $\text{HCO}_3^-$  в противоположных направлениях (рис. 8-1).

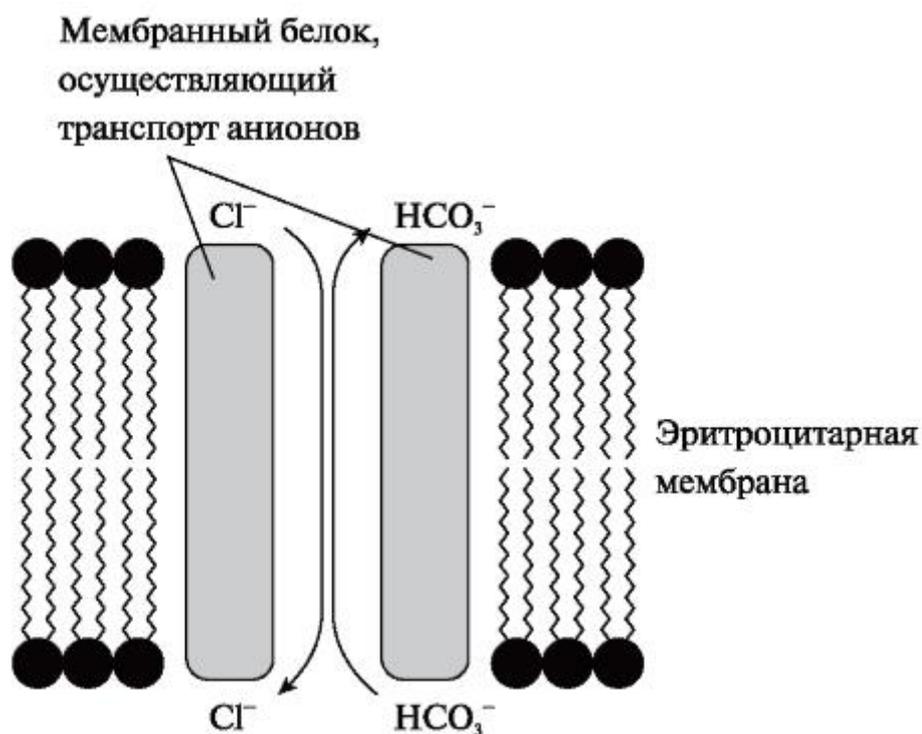


Рис. 8-1. Анионный канал мембраны эритроцитов. Хлорид- и бикарбонат-ионы двигаются в противоположных направлениях по градиентам концентраций

Другой вид трансмембранного переноса веществ против градиента концентраций совершается за счет внешнего источника энергии, которым является гидролиз АТФ. Его называют *активным транспортом*. Примером системы активного транспорта может быть  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза плазматических мембран клеток животных и человека. Этот фермент, состоящий из двух пар

идентичных субъединиц  $(\alpha\beta)_2$ , осуществляет трансмембранный перенос ионов  $\text{Na}^+$  из клетки наружу, а ионов  $\text{K}^+$  - в противоположном направлении:  
 $3\text{Na}^+(\text{вн}) + 2\text{K}^+(\text{нар}) + \text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{Na}^+(\text{нар}) + 2\text{K}^+(\text{вн}) + \text{АДФ} + \text{Фн}$ .

Каталитический цикл начинается со связывания трех ионов натрия с  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазой на цитоплазматической стороне мембраны (рис. 8-2а).

После этого происходит фосфорилирование фермента и изменение его конформации (рис. 8-2б). В результате вход с цитоплазматической стороны закрывается, а выход с наружной стороны мембраны открывается. В этот момент происходит высвобождение трех ионов натрия во внеклеточное пространство и связывание двух ионов внеклеточного калия. Связывание  $\text{K}^+$  активирует дефосфорилирование фермента. Это приводит к закрытию наружного выхода и открытию входа с цитоплазматической стороны мембраны, которое приводит к высвобождению  $\text{K}^+$  в цитоплазму (рис. 8-2в).

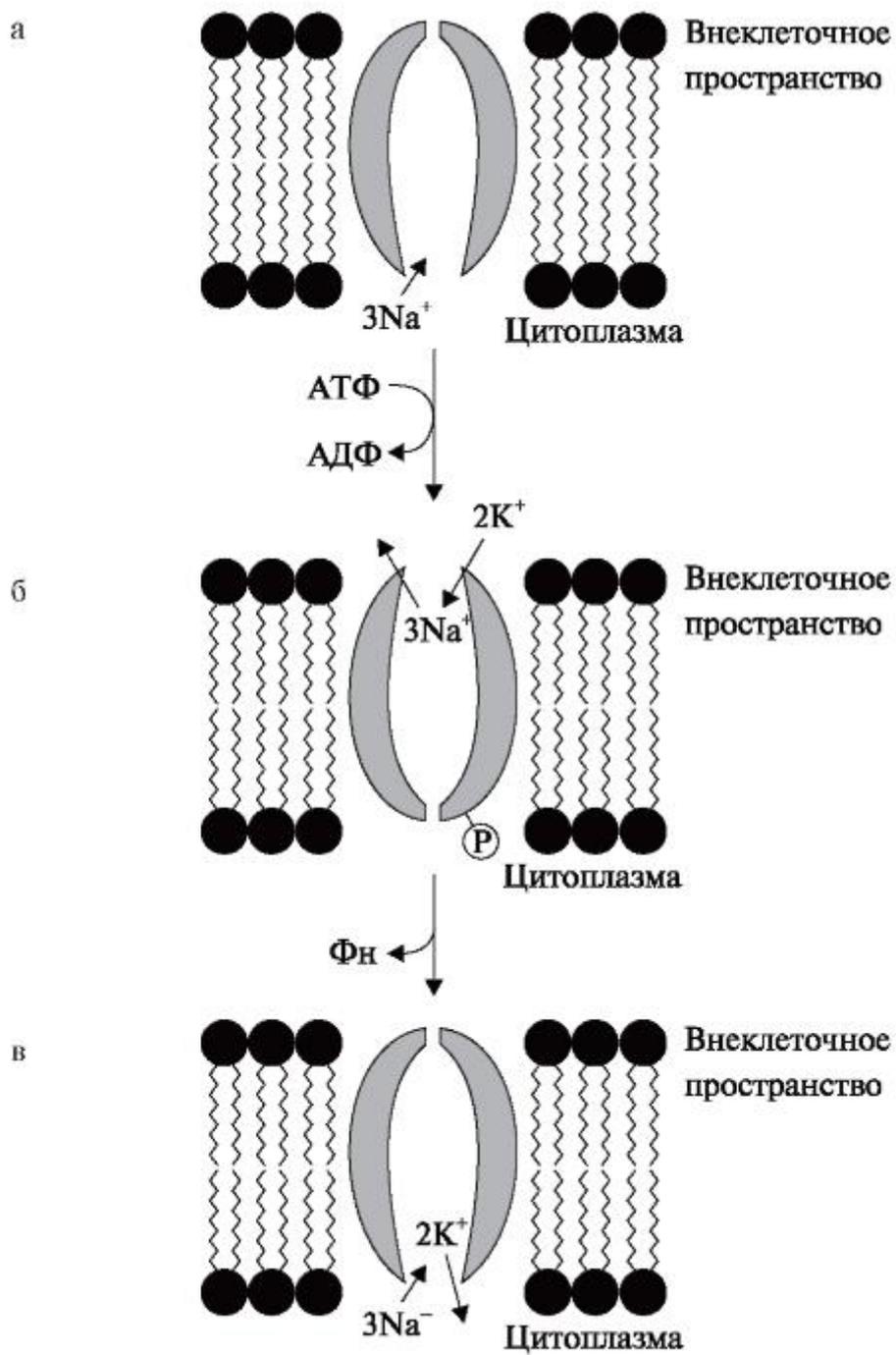


Рис. 8-2. Каталитический цикл Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы плазматических мембран (а-в)

## ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ ТРАНСПОРТЕРОВ

### Унипорт

Унипорт - перенос любых веществ (в том числе и ионов) с одной стороны мембраны на другую. Принцип такого переноса на примере транспортера глюкозы первого типа (ГЛЮТ1) представлен на рис. 8-3.



Рис. 8-3. Работа транспортера глюкозы первого типа в плазматической мембране клеток (упрощенная схема)

ГЛЮТ1 связывает молекулу глюкозы на внешней стороне плазматической мембраны. В результате последующей серии конформационных изменений ГЛЮТ1 молекула глюкозы продвигается по этому белку ко внутренней поверхности мембраны и в конце концов оказывается в цитозоле клетки. Считают, что по такому принципу действуют многие белки-переносчики, осуществляющие трансмембранный транспорт веществ.

### Симпорт

Этим термином обозначают совместный трансмембранный перенос двух веществ и более в одном направлении. Примером такого рода транспорта может быть совместный перенос глюкозы и ионов натрия в клетки кишечника (рис. 8-4). Одновременное связывание глюкозы и ионов натрия на внешней стороне мембраны (рис. 8-4, этап 1) вызывает такое изменение конформации молекулы белка-переносчика (рис. 8-4, этап 2), которое способствует поступлению этих веществ в цитозоль клетки (рис. 8-4, этап 3). После высвобождения глюкозы и ионов  $\text{Na}^+$  молекула переносчика возвращается в исходное состояние (рис. 8-4, этап 4).

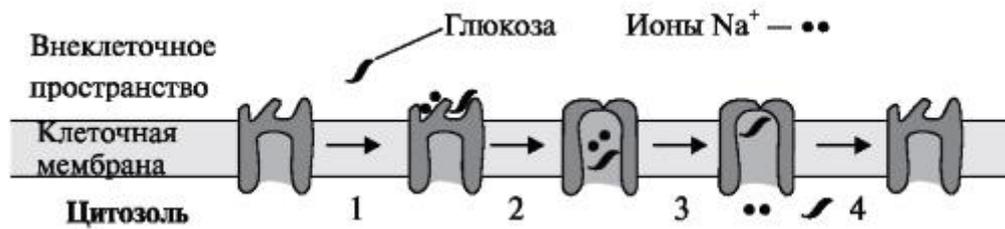


Рис. 8-4. Совместный транспорт глюкозы и ионов натрия в клетку (схема). Цифрами условно обозначены этапы трансмембранного переноса этих веществ с помощью белка-переносчика, осуществляющего симпорт двух ионов  $\text{Na}^+$  и одной молекулы глюкозы

Поскольку ионы натрия все время выкачиваются из клетки за счет работы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, то скоординированная работа симпортера  $\text{Na}^+$ Глюкозы и  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы создает ситуацию, при которой глюкоза может поступать в клетку против собственного градиента концентрации (за счет градиента концентрации ионов  $\text{Na}^+$ ). В силу того что градиент ионов  $\text{Na}^+$  обеспечивается за счет гидролиза АТФ, получается, что АТФ косвенно является движущей силой транспорта глюкозы. Такой вид транспорта называют вторично-активным (рис. 8-5).

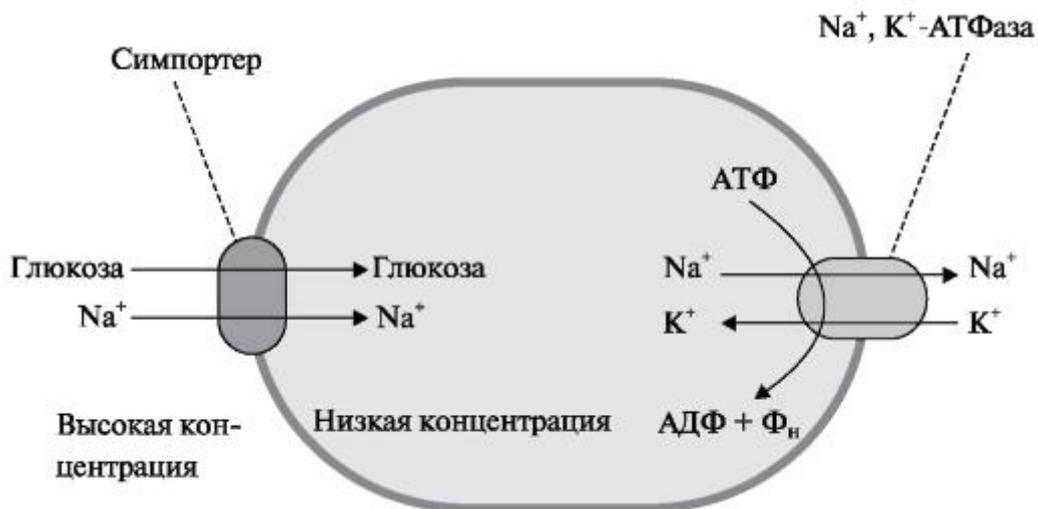


Рис. 8-5. Система совместного транспорта глюкозы и ионов натрия

Подобный механизм функционирует и в случае  $\text{Na}^+$ -зависимого всасывания аминокислот в кишечнике. Это способствует более эффективному всасыванию аминокислот, образовавшихся в ходе переваривания пищевых белков в желудочно-кишечном тракте.

Антипорт

Антипорт - совместный трансмембранный перенос двух веществ и более в противоположном направлении. Знакомясь с системами активного транспорта, уже был рассмотрен принцип работы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, которая осуществляет транспорт ионов натрия и калия в противоположных направлениях. Примером антипорта, который осуществляется без затрат энергии АТФ, может служить работа транслоказы адениновых нуклеотидов внутренней мембраны митохондрий (рис. 8-6).

### Транслоказа

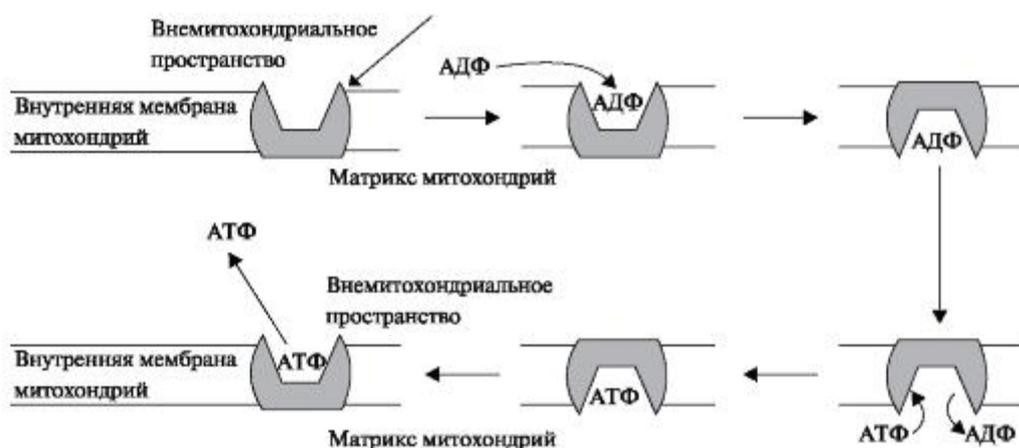


Рис. 8-6. Работа транслоказы адениновых нуклеотидов, которая осуществляет транспорт АДФ из межмитохондриального пространства в митохондрии, а АТФ - из митохондрий (схема)

Каналы - важный класс систем пассивного транспорта. В их образовании могут участвовать белки, специфичные для определенного типа клеток (например, анионный канал эритроцитов), водные и ионные каналы.

Водные каналы позволяют клетке регулировать свой объем и внутреннее осмотическое давление. В их образовании участвует особый мембранный белок *аквапорин*, который и определяет проницаемость мембран клеток для воды (рис. 8-7).

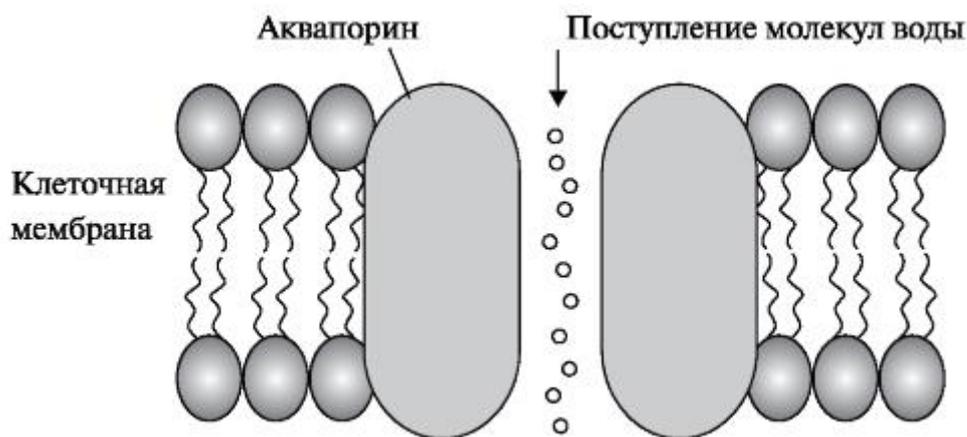


Рис. 8-7. Водный канал, образованный аквапорином

У человека обнаружено не менее 11 аквапориноподобных белков.

Физиологическая важность аквапоринов наиболее заметна в почках, где в течение суток при их непосредственном участии происходит реабсорбция воды из первичной мочи. Аквапорины также присутствуют в клетках слюнных желез.

Важными системами пассивного транспорта являются регулируемые каналы, пропускная способность которых зависит от поступления внешнего сигнала. В зависимости от типа сигнала различают *лиганд- и потенциал-зависимые ионные каналы*.

В первом случае сигналом для открытия канала служит лиганд (лигандом в биохимии называют различные по структуре молекулы, которые специфически связываются со своим рецептором). Связывание лиганда со своим мембранным рецептором способствует открытию канала в мембране. Так действует, например, ацетилхолиновый рецептор, представляющий собой лиганд-зависимый ионный канал (рис. 9-12).

### ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ПЕРЕНОС МАКРОМОЛЕКУЛ, НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ И ЧАСТИЦ

Помимо транспорта низкомолекулярных веществ, биологические мембраны осуществляют перенос различных макромолекул и крупных частиц. В зависимости от направления их движения различают *эндоцитоз*, т.е. поглощение веществ или частиц клеткой, и *экзоцитоз* - выделение (секрецию) веществ из клетки.

## Эндоцитоз

Это способ переноса внеклеточного материала внутрь клетки, при котором он помещается в особые везикулы, которые называют эндосомами.

Эндосомы, образуемые в результате инвагинации плазматической мембраны, отпочковываются от нее и поступают внутрь клетки (рис. 8-8).

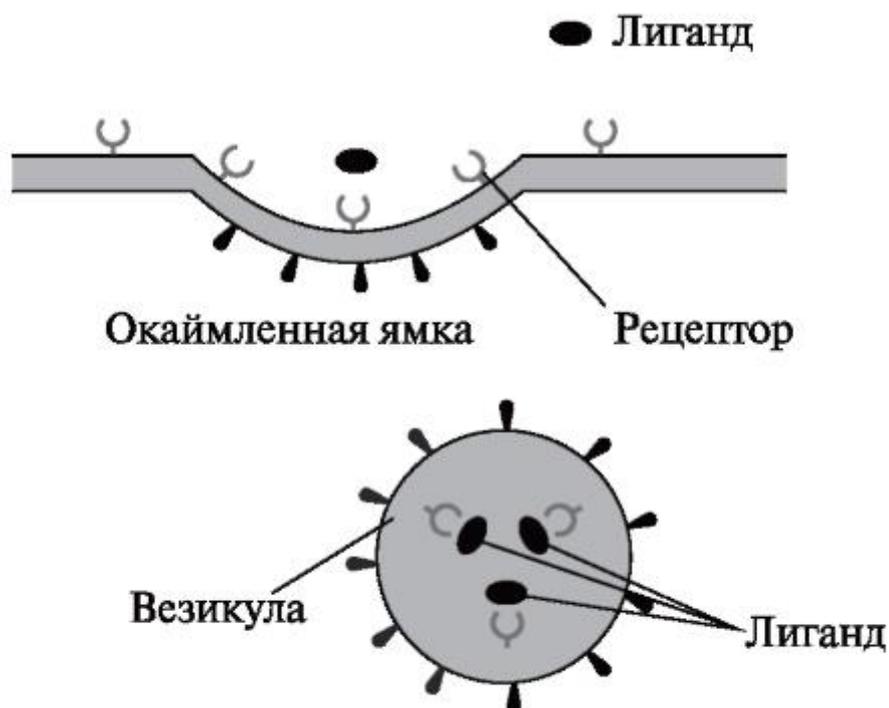


Рис. 8-8. Рецептор-опосредованный эндоцитоз

Выделяют несколько вариантов эндоцитоза: рецептор-опосредованный эндоцитоз, фагоцитоз и пиноцитоз.

*Рецептор-опосредованный эндоцитоз* - специфический способ переноса макромолекул внутрь клетки, при котором транспортируемое вещество (например, ЛПНП) взаимодействует со своим рецептором, расположенным на плазматической мембране. Образование лиганд-рецепторного комплекса сопровождается втягиванием (инвагинацией) этого участка мембраны и формированием везикулы (эндосомы), которая отпочковывается от плазматической мембраны и поступает внутрь клетки. В образовании эндосом участвуют особые участки плазматической мембраны, называемые окаймленными ямками. В них находится белок клатрин, который отвечает за формирование покрытых клатрином везикул и импорт рецепторов внутрь

клетки. Специфичность такого вида эндоцитоза определяется наличием соответствующих рецепторов на плазматической мембране.

### Фагоцитоз

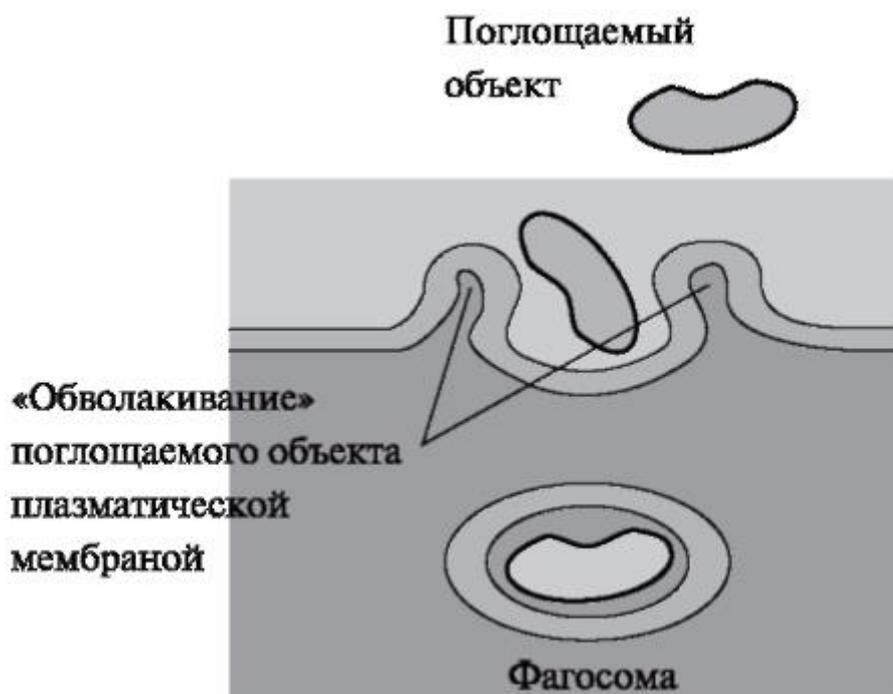


Рис. 8-9. Фагоцитоз

### Пиноцитоз

Процесс поглощения клеткой жидкости (с растворенными в ней веществами) из окружающей среды называют *пиноцитозом* (рис. 8-10). Он во многом сходен с фагоцитозом, и в фагоцитирующих клетках осуществляется теми же участками мембраны, которые участвуют в фагоцитозе.

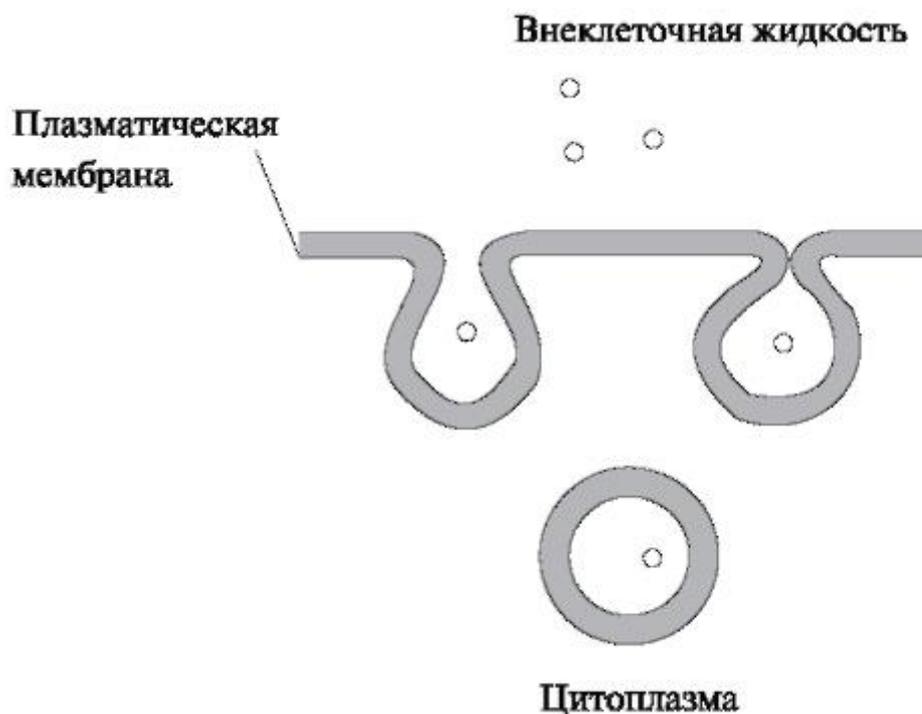


Рис. 8-10. Пиноцитоз

Захват и поглощение инородных частиц фагоцитирующими клетками или фагоцитами называют *фагоцитозом*. К фагоцитам относят нейтрофилы крови и макрофаги, присутствующие в разных тканях организма. Фагоциты прикрепляются своей плазматической мембраной к фагоцитируемому объекту и обволакивают его (рис. 8-9), а образующиеся эндосомы осуществляют перемещение внутрь клетки поглощаемой частицы.

#### Экзоцитоз

Экзоцитоз - выведение веществ из клетки. В ходе этого процесса экспортируемые молекулы упаковываются в секреторные везикулы или гранулы, которые двигаются по направлению к плазматической мембране, сливаются с ней, высвобождая содержимое во внеклеточное пространство. Таким образом осуществляются секреция пищеварительных ферментов, вырабатываемых клетками поджелудочной железы, высвобождение нейромедиаторов (например, норадреналина, ацетилхолина) нервными окончаниями и др. (рис. 8-11).

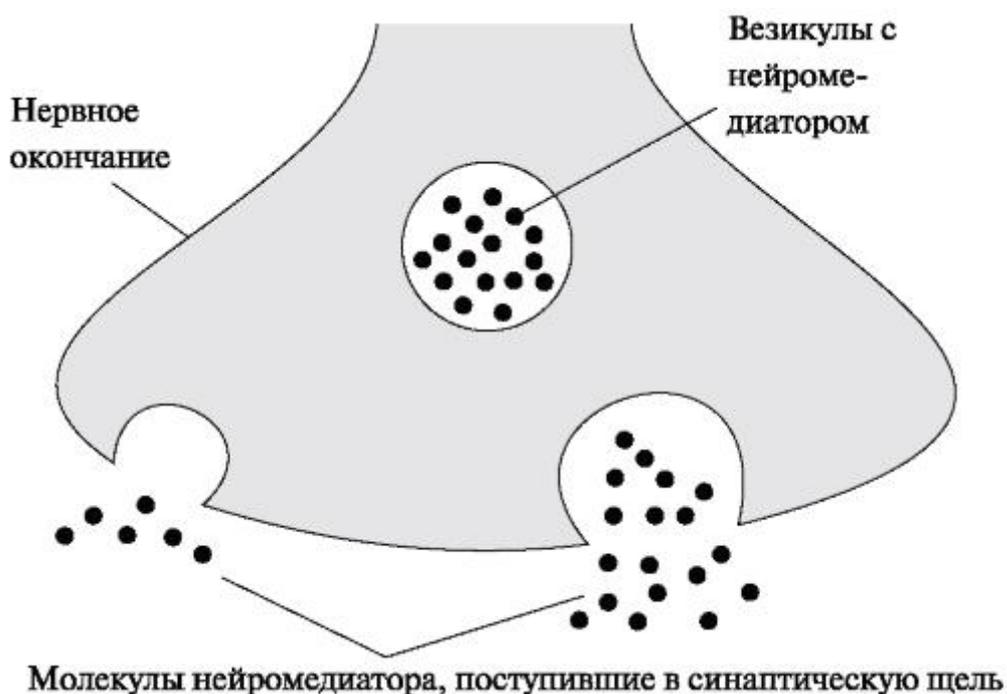


Рис. 8-11. Выделение молекул нейромедиатора в синаптическую щель как пример экзоцитоза

## ПАРАКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ

Помимо трансклеточного транспорта веществ, в котором задействованы различные клеточные поры, каналы и переносчики, электролиты, вода, а также некоторые другие низкомолекулярные вещества (например, мочевины) могут проникать через межклеточные контакты. Такой вид транспорта получил название *параклеточного* (рис. 8-12). Он играет особенно важную роль в эпителиальных тканях. Параклеточная проницаемость определяется состоянием многочисленных белков клеточной поверхности. Они образуют плотные контакты (за это отвечают такие белки, как окклюдины, клаудины), щелевые контакты (коннексины) и осуществляют межклеточную адгезию (кадгерины), участвуют в связывании с белками внеклеточного матрикса (интегрины) и белками цитоскелета. Эти белки связывают эпителиальные клетки друг с другом и контролируют проникновение веществ через межклеточное пространство.

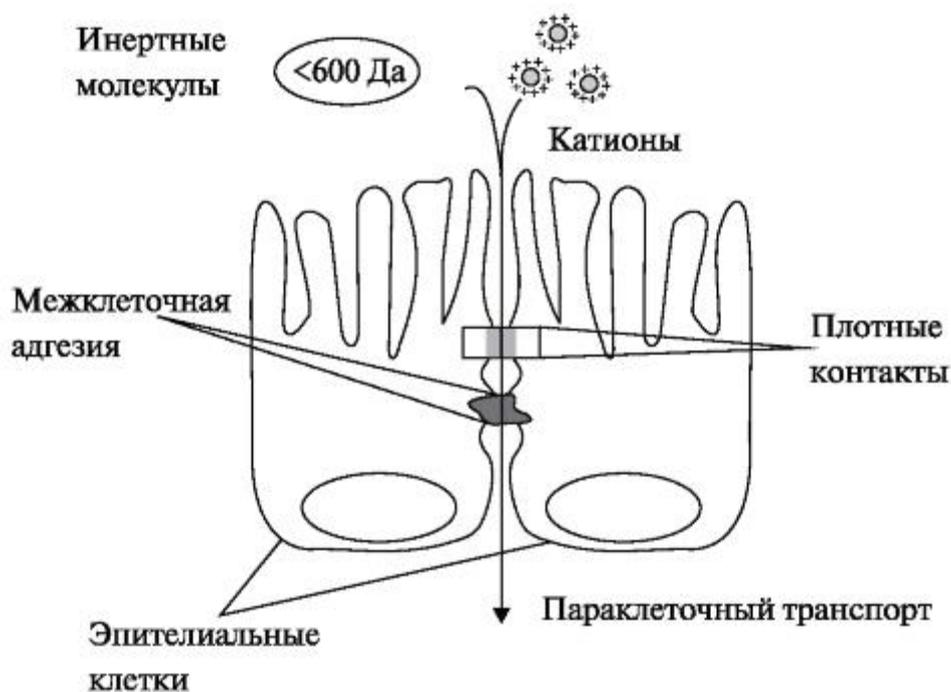


Рис. 8-12. Параклеточный транспорт

При изменении формы клеток, вызванном действием внешних или внутренних факторов, веществ, межклеточная проницаемость может увеличиваться.

*В записную книжку врача*

При снижении выработки аквапорина 5, осуществляющего трансклеточный транспорт воды в ацинарных клетках слюнных желез, происходит значительное повышение параклеточного транспорта воды.

## ГЛАВА 9. ПРИНЦИПЫ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ И ТРАНСМЕМБРАННАЯ ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА

Вопросы по теме

- Аденилатциклазная система.
- Инозитолфосфатная система.
- Рецепторы с гуанилатциклазной активностью, цитозольная гуанилатциклаза.
- Рецепторы с тирозинкиназной активностью. Передача сигнала с помощью внутриклеточных рецепторов.

## СТРУКТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ

Организм взрослого человека состоит из огромного количества клеток, жизнедеятельность которых подчинена интересам всего организма как единого целого. Такая четко координированная работа достигается постоянным обменом информации между ними и осуществляется с помощью различных химических сигналов. Эти химические сигналы, выделяемые одними (управляющими) клетками, действуют на другие, снабженные специальными рецепторами, которые воспринимают данный сигнал. Такие клетки называются *клетками-мишенями*. Они воспринимают химический сигнал, обеспечивают его преобразование и передачу внутриклеточным структурам, отвечающим за формирование специфического ответа клетке-мишени.

По типу межклеточного действия эндокринные сигнальные молекулы делятся:

- на *эндокринные молекулы* (гормоны), вырабатываемые эндокринными железами (или клетками), они поступают в кровь и с ее током разносятся по организму;
- *паракринные молекулы*, вырабатываемые одним типом клеток и действуют на близлежащие (так действуют нейромедиаторы, факторы роста и цитокины);
- *аутокринные молекулы*, вырабатываемые в той же клетке, на которую действуют (рис. 9-1).

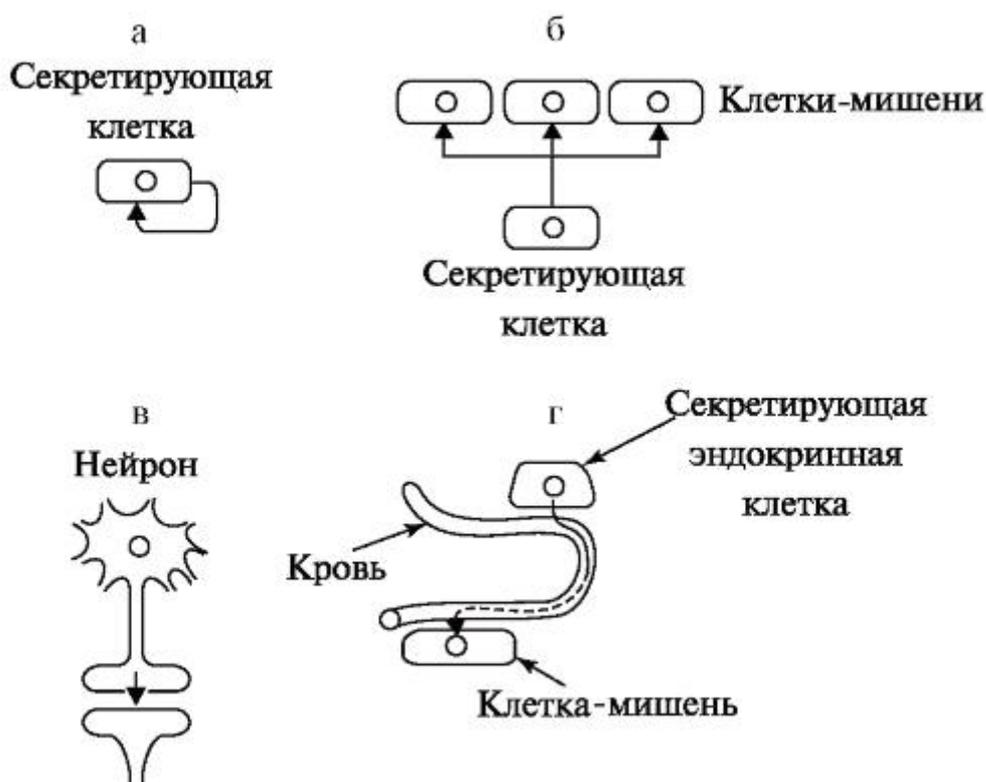


Рис. 9-1. Регуляция: а - аутокринная; б, в - паракринная; г - эндокринная (схема)

### Эндокринные сигнальные молекулы (гормоны)

Это наиболее изученная группа сигнальных молекул разнообразной химической природы. Гормоны образуются специализированными клетками, собранными в железы или рассеянными по организму. Они секретируют гормоны в кровь. Циркулируя по кровеносной системе, гормоны достигают своих клеток-мишеней, как правило, расположенных на значительном расстоянии от железистых клеток, выделивших их. В табл. 9-1 приведены сведения о важнейших гормонах и их основных функциях.

Таблица 9-1. Важнейшие гормоны и их функции

Орган	Гормон	Ткань-мишень	Функция
Гипоталамус	Рилизинг-гормоны (факторы)	Передний гипофиз	Стимулируют секрецию тропных гормонов
	Соматостатин (также и из поджелудочной железы)	Передний гипофиз	Тормозит выделение соматотропина

Передний гипофиз	Тиреотропный гормон	Щитовидная железа	Стимулирует выделение $T_3$ и $T_4$
	АКТГ	Кора надпочечников	Стимулирует выделение глюкокортикоидов
	Гонадотропины (лютеинизирующий и фолликулостимулирующий гормоны)	Яички и яичники	Стимулируют выделение половых гормонов и развитие клеток
	Соматотропин	Печень	Стимулирует синтез инсулиноподобных факторов роста I и II
	Пролактин	Молочная железа	Необходим для лактации
Задний гипофиз	Антидиуретический гормон (вазопрессин)	Почечные каналы	Способствует реабсорбции воды в почках
	Окситоцин	Гладкая мускулатура	Стимулирует сокращение матки
Щитовидная железа	Тироксин ( $T_4$ ) и трийодтиронин ( $T_3$ )	Печень, мышцы	Метаболическая стимуляция, регулируют рост и дифференцировку тканей
Паращитовидные железы	Паратиреоидный гормон	Костная ткань, почки, кишечник	Поддерживает уровень $Ca^{2+}$ в крови, стимулирует реабсорбцию в почках и захват пищевого $Ca^{2+}$

	Кальцитонин (также из щитовидной железы)	Костная ткань, почки	Ингибирует реабсорбцию $Ca^{2+}$ , снижает концентрацию $Ca^{2+}$ и фосфатов в крови
--	--	----------------------	--

Окончание табл. 9-1

Орган	Гормон	Ткань-мишень	Функция
Кора надпочечников	Глюкокортикоиды (кортизол)	Многие ткани	Регулируют углеводный, а также белковый обмен
	Минералокортикоиды (альдостерон)	Почки, слюнные железы	Поддерживает водно-солевой баланс
Мозговое вещество надпочечников	Катехоламины (адреналин, норадреналин)	Печень, мышцы, сердце	Мобилизуют жирные кислоты и глюкозу в кровотоки
Гонады	Половые гормоны (тестостерон из яичек, эстрадиол и прогестерон из яичников)	Репродуктивные органы	Способствуют созреванию и функционированию половых органов
Почки	Эритропоэтин	Костный мозг	Регулирует выработку эритроцитов
Печень	Соматомедины (инсулиноподобные факторы роста I и II)	Печень, костная ткань	Стимулируют рост тканей
Поджелудочная железа	Инсулин	Печень, мышцы	Стимулирует синтез гликогена, липогенез, синтез белка
	Глюкагон	Печень, почки, жировая ткань	Стимулирует распад гликогена,

			липидов, глюконеогенез
Предсердия и желудочки сердца	Натрийуретические факторы предсердий и мозга*	Сердечнососудиста я и центральная нервная система, почки	Стимулируют экскрецию ионов натрия, калия и воды, способствуют гипотензии
Жировая ткань	Лептин	Гипоталамус	Регулирует аппетит

\* Исходно натрийуретический фактор мозга был обнаружен в мозге, однако позднее установлено, что основным местом его образования являются желудочки сердца.

#### Паракринные сигнальные молекулы

К паракринным сигнальным молекулам относятся нейромедиаторы, факторы роста и цитокины.

Нейромедиаторы - сигнальные молекулы, образуемые в нервных клетках и выделяемые при передаче нервного импульса из нервных окончаний в синаптическую щель. *Возбуждающие нейромедиаторы*, к числу которых относят ацетилхолин, способствуют проведению сигнала нервного импульса через синапс. *Тормозные медиаторы* (гамма-аминомасляная кислота - ГАМК, глицин) оказывают противоположное действие.

Факторы роста - регуляторные белки, выделяемые клетками той же ткани, в пределах которой они и действуют, связываясь с рецепторами плазматических мембран. Первым был открыт тромбоцитарный фактор роста, который, как оказалось позднее, может образовываться и во многих других клетках. В настоящее время известно много разнообразных факторов роста.

Цитокинами называют те факторы, которые участвуют в формировании иммунного ответа. Например, лейкоциты продуцируют интерлейкины (ИЛ), которые влияют на рост и дифференцировку других лейкоцитов.

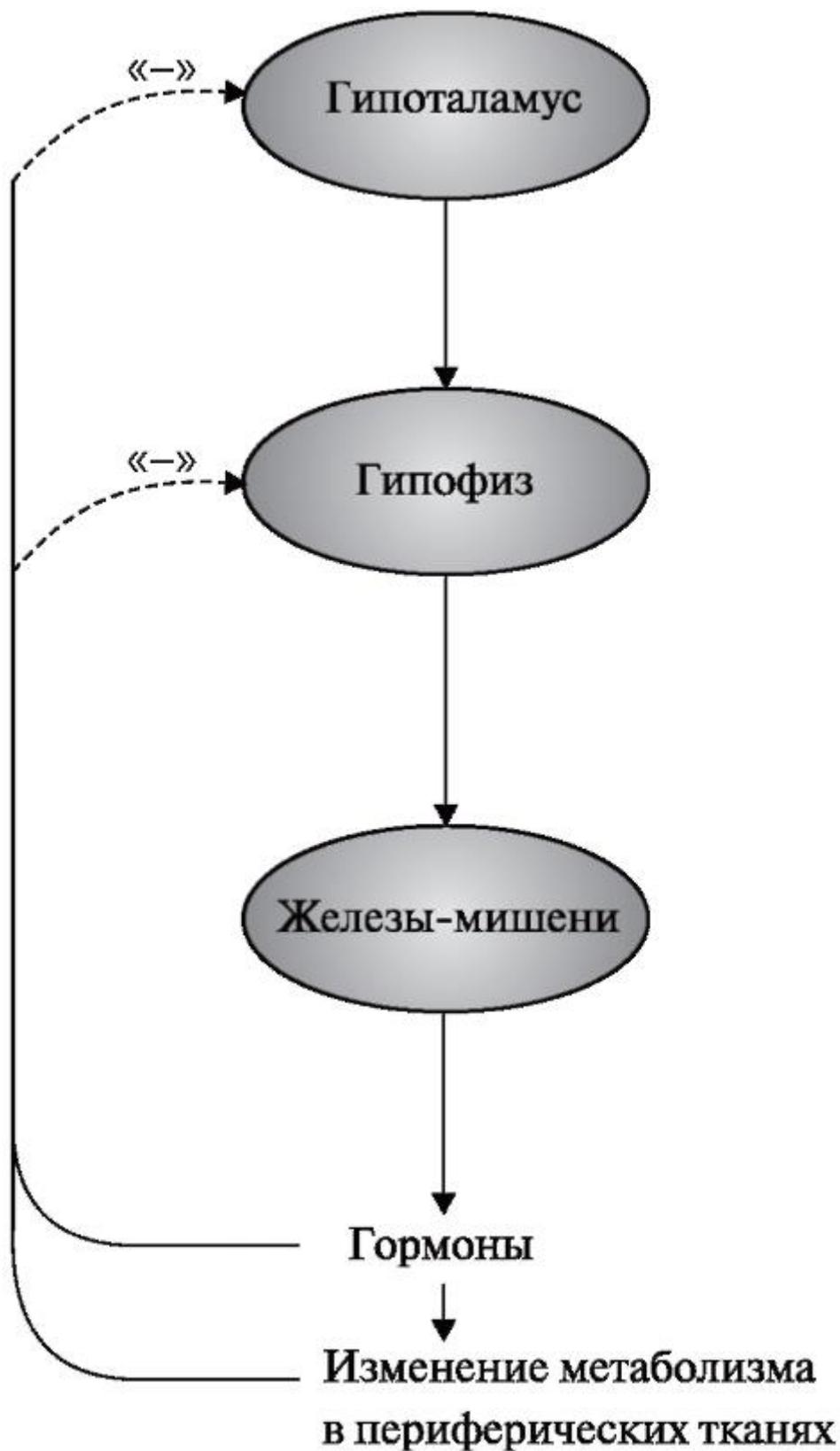
#### Аутокринные сигнальные молекулы

К числу аутокринных сигнальных молекул относят те же факторы роста и цитокины, которые осуществляют паракринную сигнализацию. Отличие заключается лишь в том, что выделившиеся сигнальные молекулы действуют на рецепторы плазматической мембраны собственных клеток. Таким образом, например, ИЛ-2 стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов. Возникновение аутокринной регуляции считают особенностью многих опухолевых клеток, которые, помимо аутокринных сигнальных молекул, синтезируют и рецепторы, специфически связывающие их. Например, многие опухоли головного мозга экспрессируют не только тромбоцитарный фактор роста, но и его рецептор. Такая самостимуляция позволяет опухолевым клеткам не только эффективно размножаться, но в ряде случаев и защищаться от лекарственных средств, назначаемых больным при химиотерапии.

## РЕГУЛЯЦИЯ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ

### Контроль за высвобождением гормонов

Работу многих (но не всех) эндокринных желез регулирует гипоталамо-гипофизарная система (рис. 9-2). Гипоталамус - отдел промежуточного мозга, который осуществляет связь между нервной и эндокринной системой.



В ответ на нервные или химические сигналы он выделяет пептидные гормоны, названные *рилизинг-факторами* (от англ. *release* - выделять, высвобождать). Рилизинг-факторы поступают в портальную кровеносную систему, связывающую гипоталамус с передней долей гипофиза, клетки

которой секретирует в кровь *тропные гормоны* (называемые также *тропинами*). Тропные гормоны действуют на периферические эндокринные железы: кору надпочечников, щитовидную и половые железы (яички или яичники). В ответ на действие тропных гормонов железы-мишени увеличивают синтез и секрецию периферических гормонов, повышение уровня которых является сигналом отрицательной обратной связи для гипоталамуса. В результате выделение рилизинг-факторов прекращается. Данная система «гипоталамус-гипофиз-периферические железы» включится вновь, когда гипоталамус получит сигнал о снижении уровня периферических гормонов в крови.

Следует отметить, что гипоталамус контролирует работу далеко не всех эндокринных желез и железистых клеток. Например, высвобождение инсулина и глюкагона из поджелудочной железы прямо зависит от уровня глюкозы в крови. А на синтез и секрецию натрийуретических пептидов влияют изменение объема циркулирующей крови и содержание ионов  $\text{Na}^+$ .  
*В записную книжку врача*

Последствия длительной терапии глюкокортикоидами

Глюкокортикоиды - эффективные лекарственные средства, применяемые для лечения многих заболеваний. При диффузных болезнях соединительной ткани, таких, как системная красная волчанка, склеродермия, дерматомиозит и др., глюкокортикоидные препараты (кортизон, гидрокортизон, преднизолон, триамцинолон и др.) применяют в течение длительного времени (месяцы и даже годы). Это приводит к тому, что высокие концентрации вводимых в организм глюкокортикоидных гормонов (или их синтетических аналогов) по механизму отрицательной обратной связи вызывают постоянное торможение активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Подобное длительное торможение вызывает гипотрофию, а иногда и атрофию надпочечников больных. При резком прекращении приема глюкокортикоидных препаратов может развиваться так называемый стероидный криз - острая недостаточность коры надпочечников, основные проявления которого - резкое падение артериального давления и потеря сознания. Подобная симптоматика может возникнуть и у больных, принимающих глюкокортикоиды, даже при незначительном оперативном вмешательстве, таком, например, как удаление зуба. Именно поэтому при длительном лечении глюкокортикоидами дозу препаратов снижают

постепенно, чтобы заставить кору надпочечников вырабатывать собственные гормоны. Если же функциональное состояние коры надпочечников полностью восстановить не удастся, больных переводят на так называемые поддерживающие дозы глюкокортикоидов. В таких случаях больным сначала необходимо повысить дозу гормонов и только после этого проводить хирургическое лечение.

#### Регуляция высвобождения факторов роста

Клетки выделяют факторы роста под действием различных стимулов. Например, повреждение интимы кровеносных сосудов приводит к разрыву тромбоцитов и выделению тромбоцитарного фактора роста, который стимулирует деление клеток и процессы репарации. Трансформирующий фактор роста- $\beta$  (ТФР- $\beta$ ) - регулятор метаболизма и пролиферации костной ткани, его выделение увеличивается в условиях механических воздействий на кости. В иммунной системе активация В- и Т-клеток вызывает выделение факторов роста (цитокинов), стимулирующих пролиферацию В- и Т-клеток.

#### Контроль за высвобождением нейромедиаторов

Нейромедиаторы хранятся в особых пузырьках (везикулах) отростков нервных клеток - аксонах. Под действием нервного импульса эти везикулы транспортируются к пресинаптической мембране и в результате слияния с ней выделяют содержимое в синаптическую щель (см. рис. 8.11).

## МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ

Важным условием восприятия клеткой эффекта сигнальной молекулы является наличие в ней рецепторов, которые осуществляют специфическое связывание сигнальных молекул и обеспечивают последующее преобразование их регуляторного сигнала. Гидрофобные сигнальные молекулы (стероиды, тироксин и NO) растворимы в липидах. Они могут проникнуть в клетку через липидный бислой, и поэтому их рецепторы локализованы внутри клетки. Гидрофильные сигнальные молекулы через липидный бислой не проникают. Они взаимодействуют со своими рецепторами, расположенными на наружной стороне плазматической мембраны.

## ЯДЕРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЛИПОФИЛЬНЫХ ГОРМОНОВ

Наиболее хорошо изучен механизм действия глюкокортикоидов, которые регулируют экспрессию специфических генов клеток-мишеней на уровне инициации транскрипции. Глюкокортикоидные гормоны легко проходят через липидный бислой в цитоплазму клетки, где взаимодействуют со своими рецепторами. При отсутствии гормона глюкокортикоидный рецептор находится в неактивном состоянии в комплексе с белками теплового шока. При взаимодействии гормона с рецептором происходит образование *гормон-рецепторного комплекса*, которое приводит к диссоциации белков теплового шока и транспорту гормон-рецепторного комплекса в ядро.

В ядре ДНК-связывающий участок рецептора находит глюкокортикоид-чувствительный элемент ДНК и связывается с ним (рис. 9-3). Это приводит к изменению транскрипции генов, регулируемых глюкокортикоидами. Подобным образом осуществляется передача сигналов других стероидных гормонов и тироксина - гормона щитовидной железы.

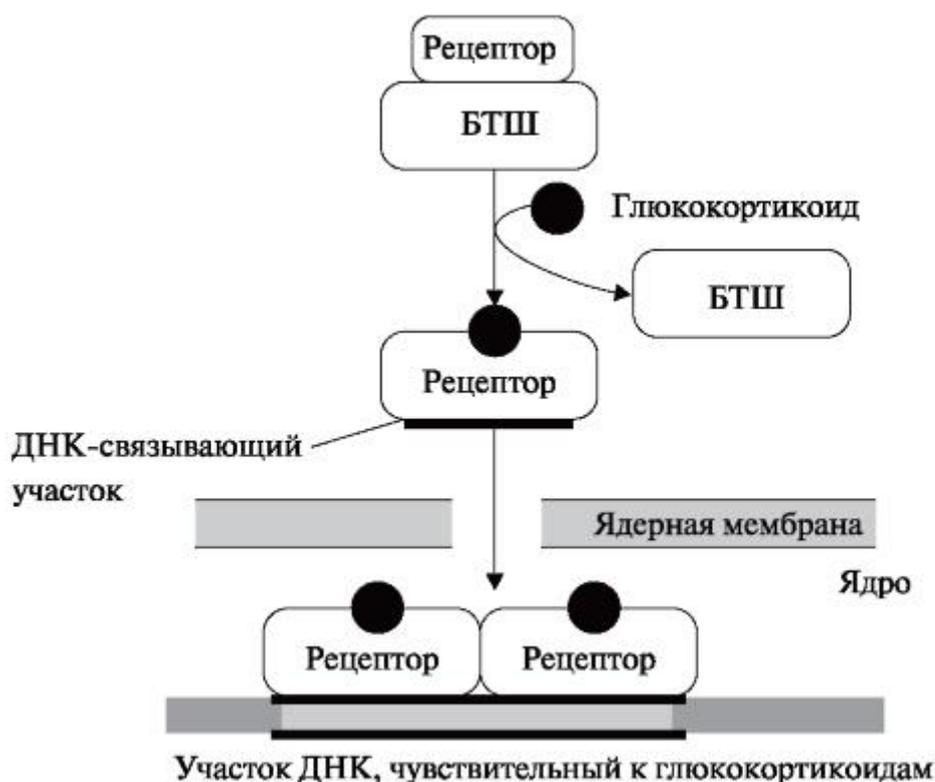


Рис. 9-3. Ядерный механизм действия стероидных гормонов: БТШ - белок теплового шока

## МЕХАНИЗМЫ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ СИГНАЛА ЧЕРЕЗ МЕМБРАННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Большинство сигнальных молекул через липидный бислой не проникает, поэтому их действие осуществляется посредством взаимодействия со специфическими рецепторами, расположенными на наружной стороне плазматической мембраны.

Это приводит к увеличению внутриклеточной концентрации *вторичных* посредников, наиболее известные из которых - цАМФ, цГМФ, ионы  $Ca^{2+}$  и инозитолтрисфосфат.

Внутриклеточные сигнальные пути, опосредуемые цАМФ

Многочисленные гормоны (*первичные посредники*), включая АКТГ, антидиуретический гормон, гонадотропины, тиреотропный гормон (ТТГ), глюкагон, катехоламины (адреналин/норадреналин) и другие сигнальные молекулы, используют в качестве вторичного посредника цАМФ.

В клетке цАМФ образуется из АТФ (рис. 9-4) под действием фермента аденилатциклазы, расположенного на внутренней стороне плазматической мембраны.

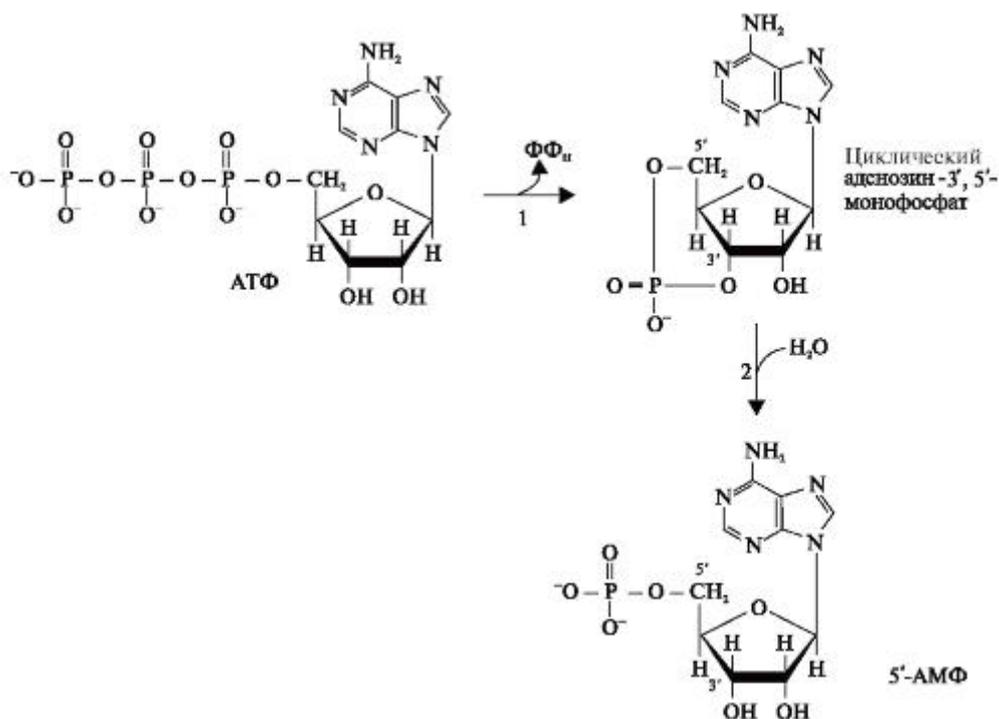


Рис. 9-4. Образование и распад циклического аденозин-3',5'-монофосфата: 1 - аденилатциклаза; 2 - фосфодиэстераза циклических нуклеотидов

С цитоплазматической поверхностью белка-рецептора связан гуанин-нуклеотидсвязывающий белок, который называют G-белком (рис. 9-5). Он является гетеротримером, состоящим из  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц. При отсутствии гормона  $\alpha$ -субъединица связана с ГДФ.

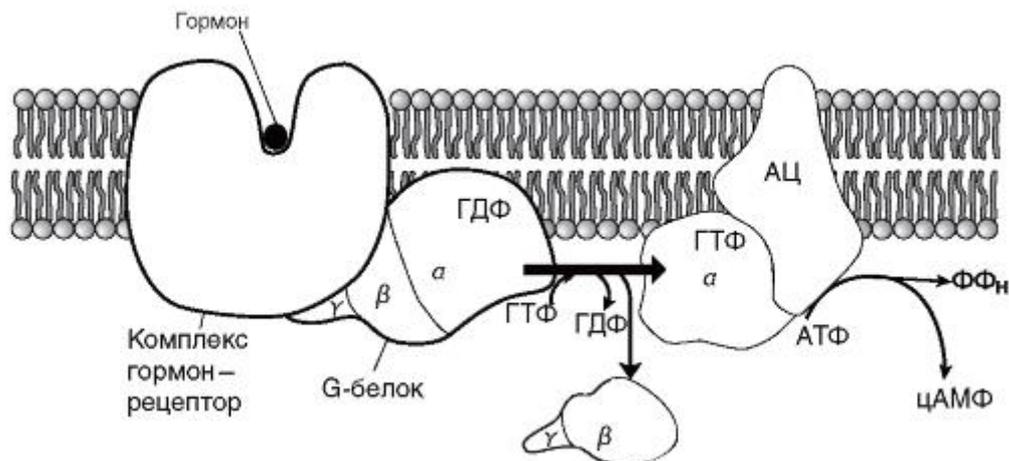


Рис. 9-5. Передача гормонального сигнала аденилатциклазной системой

Образование гормон-рецепторного комплекса сопровождается конформационными изменениями цитоплазматического домена рецептора, которые влияют и на конформацию G-белка. Это приводит к тому, что в  $\alpha$ -субъединице G-белка происходит обмен ГДФ на ГТФ, и от G-белка отсоединяется комплекс « $\alpha$ -субъединица-ГТФ», который связывается с молекулой аденилатциклазы и активирует ее. В результате увеличивается образование цАМФ. Поскольку G-белок увеличивает активность фермента, его обозначают с индексом «s» (первая буква от *stimulatory*) - Gs. Как и другие G-белки, он обладает ГТФазной активностью. В результате гидролиза ГТФ до ГДФ и  $\text{P}_i$ , который высвобождается,  $\alpha$ -субъединица со связанным с ней ГДФ диссоциирует от аденилатциклазы и вновь образует гетеротримерный комплекс с  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицами. При этом активность аденилатциклазы возвращается в исходное состояние. Образовавшийся комплекс «Gs-белок-ГДФ» вновь контактирует с рецептором. Если последний все еще связывает гормон, то весь описанный выше процесс повторяется.

Таким образом, для продолжения синтеза цАМФ  $\alpha$ -субъединица Gs-белка курсирует от рецептора к ферменту и обратно. Одна молекула связанного с рецептором гормона может последовательно активировать

несколько молекул Gs-белка, которые, в свою очередь, активируют ряд молекул аденилатциклазы.

*В записную книжку врача*

Влияние холерного токсина на G-белок

Клетки слизистой оболочки кишечника секретируют  $\text{Na}^+$  в просвет кишечника, и цАМФ стимулирует этот процесс. Холерный токсин вызывает инактивацию ГТФазной активности  $\alpha$ -субъединицы G-белка. В результате не может быть выключен гормональный стимул, активирующий аденилатциклазу. Последняя оказывается «заморожена» в состоянии  $\alpha$ -GTP. Продолжительное образование цАМФ приводит к массивной потере ионов  $\text{Na}^+$ , за которыми следуют молекулы воды, вызывая изнурительную диарею и возможную смерть от потери жидкости и электролитов.

Образуемый цАМФ активирует цАМФ-зависимую протеинкиназу, которую называют также протеинкиназой А (ПКА). Последняя осуществляет фосфорилирование белков-мишеней, изменяя тем самым их активность (рис. 9-6).

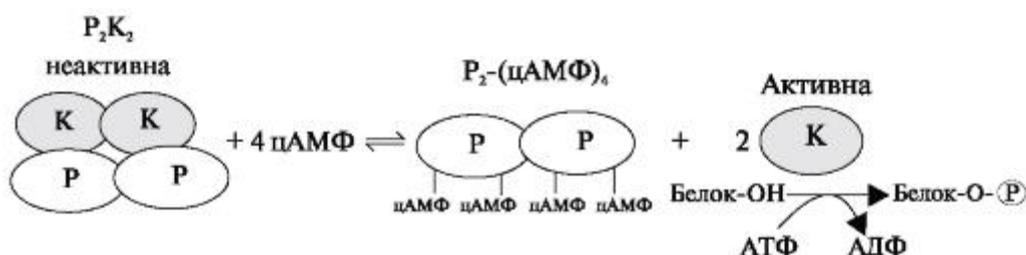


Рис. 9-6. Активация протеинкиназы А цАМФ

Рассмотренный механизм рецептор-опосредованной активации исходно был описан для  $\beta_2$ -адренорецептора. Однако оказалось, что катехоламины могут не только активировать аденилатциклазу (через  $\beta_2$ -адренорецепторы), но и через  $\alpha_2$ -адренорецепторы тормозить активность этого фермента и тем самым снижать уровень цАМФ в клетке.

Это происходит потому, что комплекс «гормон-рецептор» взаимодействует с ингибиторным G-белком (Gi-белком), который, связываясь с аденилатциклазой, снижает ее активность.

## ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, ОПОСРЕДУЕМЫЕ ЦГМФ

Несколько сигнальных молекул взаимодействуют со своими рецепторами и приводят к образованию циклического гуанозин-3',5'-монофосфата (цГМФ), катализируемого ферментом гуанилатциклазой (рис. 9-7).

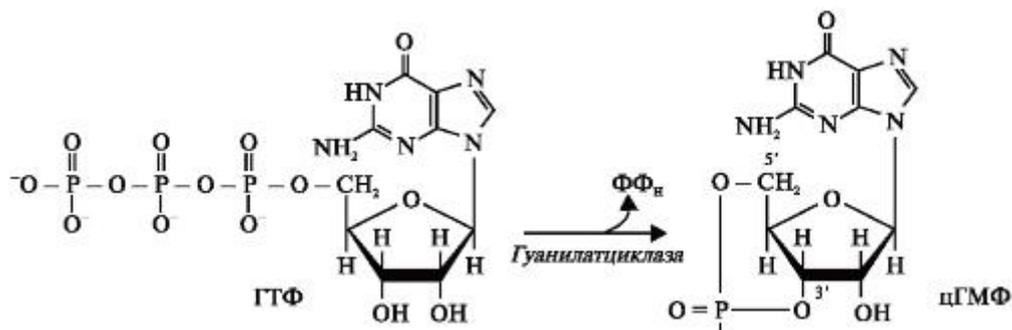


Рис. 9-7. Образование циклического гуанозин-3',5'-монофосфат гуанилатциклазой

В образовании цГМФ участвуют две рецепторные гуанилатциклазы. Одна из них представляет собой внутриклеточный каталитический домен рецепторов натрийуретических пептидов (рис. 9-8).

Связывание гормона с рецептором натрийуретических пептидов на наружной стороне плазматической мембраны приводит к изменению структуры рецепторного домена. Это, в свою очередь, вызывает изменение структуры остальных доменов, которое в конце концов передается каталитическому домену и вызывает увеличение образования циклического гуанозин-3',5'-монофосфата из ГТФ. Образовавшийся цГМФ действует на цГМФ-зависимую протеинкиназу (ПКГ), которая фосфорилирует различные белки-мишени, приводя к изменению функционального состояния клеток. Кроме действия на ПКГ, цГМФ может регулировать активность ионных каналов, а также фосфодиэстераз, которые осуществляют биологическую деградацию циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ) до 5'-АМФ и 5'-ГМФ.

Помимо мембраносвязанной гуанилатциклазы, в цитозоле многих клеток существует так называемая растворимая гуанилатциклаза, которая содержит гем в качестве простетической группы. Активатором этого фермента является NO. Эта хорошо растворимая в липидах молекула проходит сквозь липидный бислой и взаимодействует с гемом гуанилатциклазы, что приводит к активации фермента и увеличению выработки цГМФ.

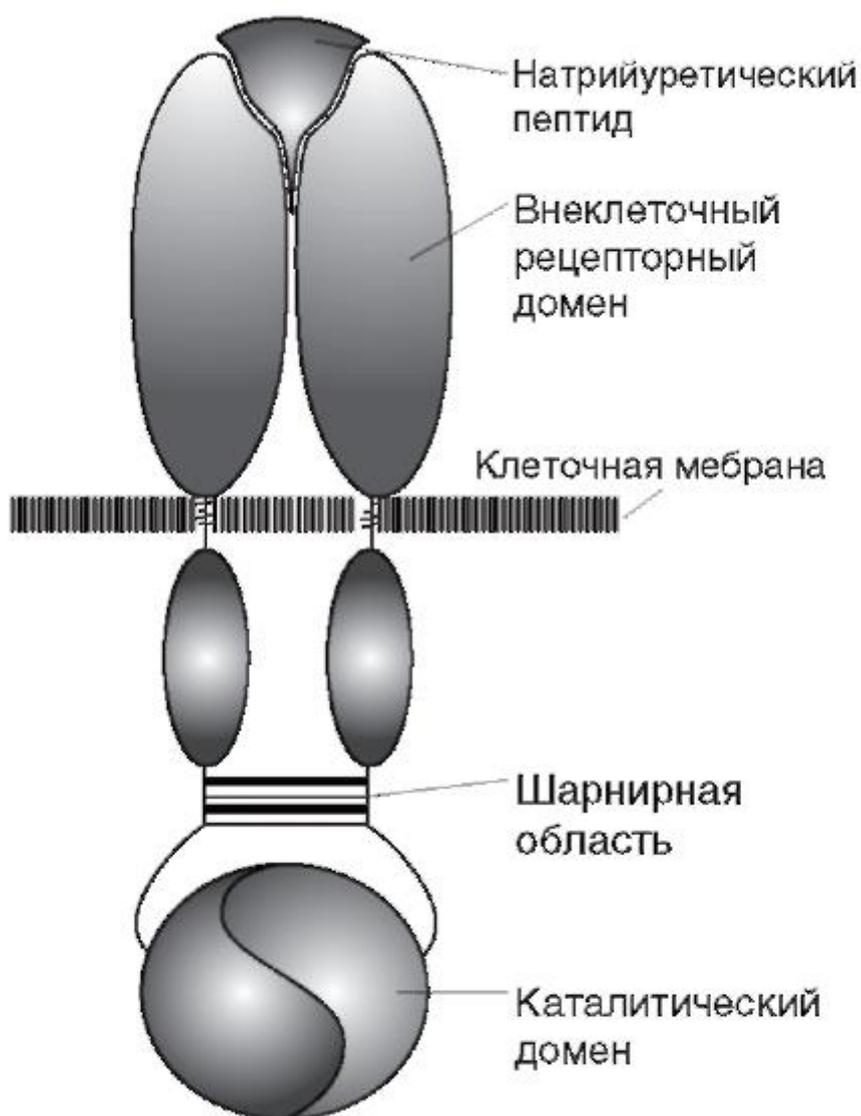


Рис. 9-8. Структура рецептора натрийуретических пептидов

*В записную книжку врача Оксид азота*

NO образуется в клетках эндотелиальной выстилки сосудистой системы из гуанидиновой группы аргинина под действием фермента синтазы оксида азота. NO диффундирует в мускулатуру кровеносных сосудов, вызывая образование цГМФ, который, в свою очередь, вызывает расслабление мышц и сосудов. Нитроглицерин - лекарственное средство, давно используемое для лечения стенокардии, медленно выделяет NO, способствуя расслаблению сосудов и уменьшению нагрузки на сердце. Поскольку за считанные секунды NO окисляется до  $\text{NO}_2$  и  $\text{NO}_3$ , его считают гормоном локального действия.

Будучи легко растворимым в липидах, NO легко выходит из продуцирующих его клеток и входит в соседние.

## СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ С УЧАСТИЕМ ДРУГИХ ВТОРИЧНЫХ ПОСРЕДНИКОВ

Связывание ряда сигнальных молекул со своими рецепторами плазматических мембран клеток, сопряженными с G-белками, приводит к активации регуляторных систем, в которых циклические нуклеотиды не участвуют. К таким посредникам относят инозитол-1,4,5-трисфосфат (ИФ<sub>3</sub>), диацилглицерол (ДАГ) и ионы кальция.

Вторичный посредник ИФ<sub>3</sub> образуется в мембране из фосфатидинозитол-4,5-бисфосфата (ФИФ<sub>2</sub>). Связывание гормона с рецептором вызывает у особого G-белка, называемого также Gq-белком, обмен ГДФ на ГТФ. Комплекс «Gq-ГТФ» активирует мембраносвязанный фермент фосфолипазу С, который расщепляет ФИФ<sub>2</sub> на ИФ<sub>3</sub> и ДАГ (рис. 9-9).

Действие ИФ<sub>3</sub> на ЭПР приводит к открытию лигандзависимых Ca<sup>2+</sup>-каналов в мембране ЭПР и высвобождение Ca<sup>2+</sup> (рис. 9-10). Таким образом, взаимодействие гормона с рецептором, связанным с фосфоинозитидным каскадом, приводит к увеличению внутриклеточного ДАГ и Ca<sup>2+</sup>.

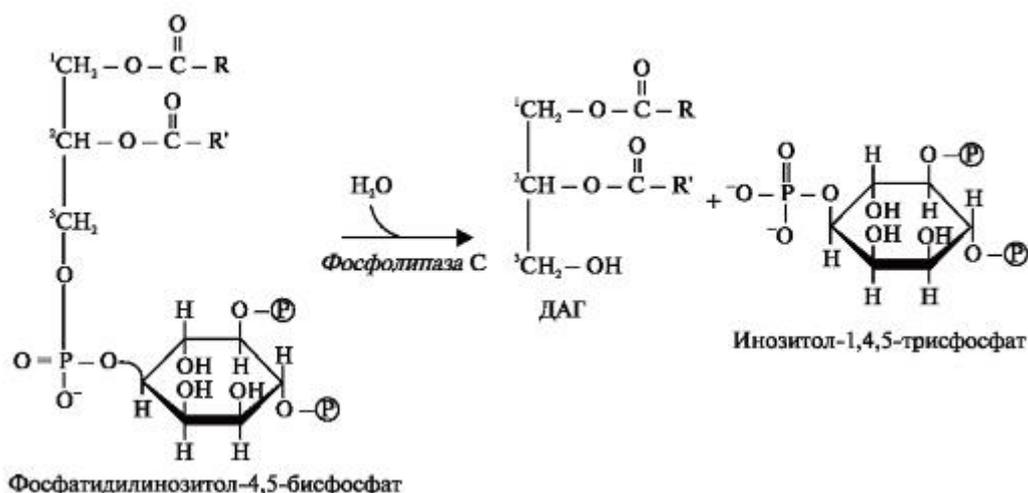


Рис. 9-9. Гидролиз фосфатидинозитол-4,5-бисфосфата до диацилглицерола и инозитол-1,4,5-трисфосфата, катализируемый фосфолипазой С

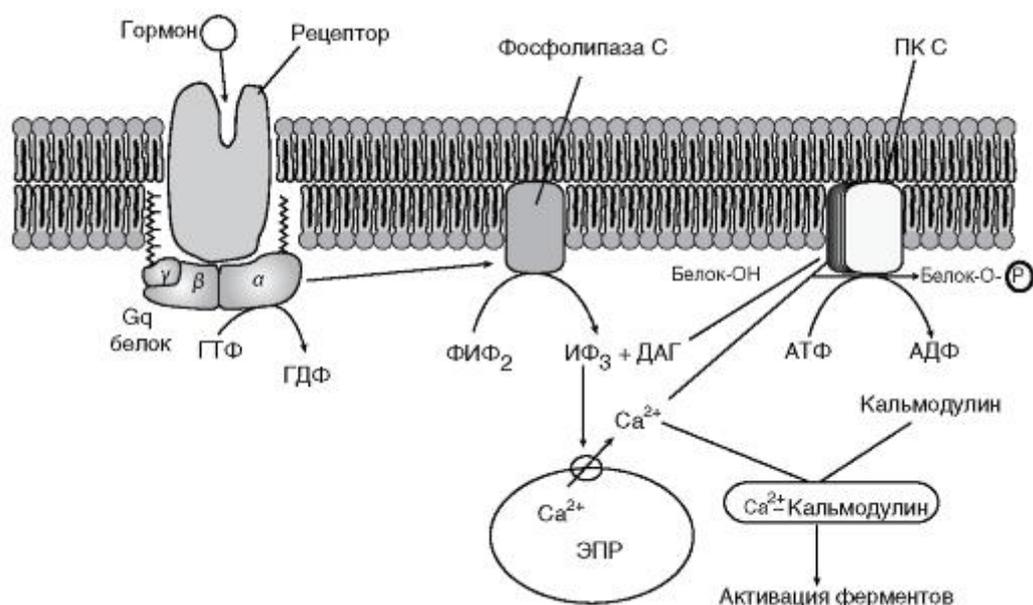


Рис. 9-10. Фосфатидилинозитидный каскад с DAG, ИФ<sub>3</sub> и Ca<sup>2+</sup> в качестве вторичных посредников: α-субъединица Gq-белка связывается с фосфолипазой С только в комплексе с ГТФ, при гидролизе которого до ГДФ и Ф<sub>н</sub> происходит диссоциация комплекса «Gq-белок-фосфолипаза С»

Ионы кальция связываются с белком *кальмодулином*. Кальмодулин имеет четыре участка связывания для ионов Ca<sup>2+</sup>. Он может находиться как в свободном состоянии в цитоплазме клеток, так и в виде субъединиц олигомерных белков. Связывание ионов Ca<sup>2+</sup> вызывает конформационное изменение, приводящее к изменению функциональной активности белка, с которым связан кальмодулин. В случае свободного кальмодулина связывание Ca<sup>2+</sup> способствует взаимодействию этого белка со своими мишенями. К числу ферментов, регулируемых таким способом, относят Ca<sup>2+</sup>-кальмодулин-активируемую протеинкиназу.

Диацилглицерол является физиологическим активатором протеинкиназы С (ПКС), для максимальной активации которой также необходимы ионы Ca<sup>2+</sup>. Протеинкиназа С, связанная с молекулами фосфатидилсерина цитозольной стороны клеточной мембраны, фосфорилирует различные белки-мишени.

## ПРОТЕИНКИНАЗЫ

Все рассмотренные выше протеинкиназы (ПКА, ПКГ, ПКС) фосфорилируют белки по остаткам серина или треонина. Именно поэтому их так и называют - протеинкиназы серин/треонинового типа.

Однако существует особая группа рецепторов, которые обладают *тирозинкиназной активностью*. Это тип рецепторов, активирующих особые сигнальные пути. К их числу относят рецепторы инсулина. Рецептор инсулина - тетрамерный белок, состоящий из двух пар субъединиц:  $\alpha_2\beta_2$  (рис. 9-11). Внеклеточные  $\alpha$ -субъединицы ответственны за связывание гормона. Они соединены с трансмембранными  $\beta$ -субъединицами и между собой с помощью дисульфидных связей.

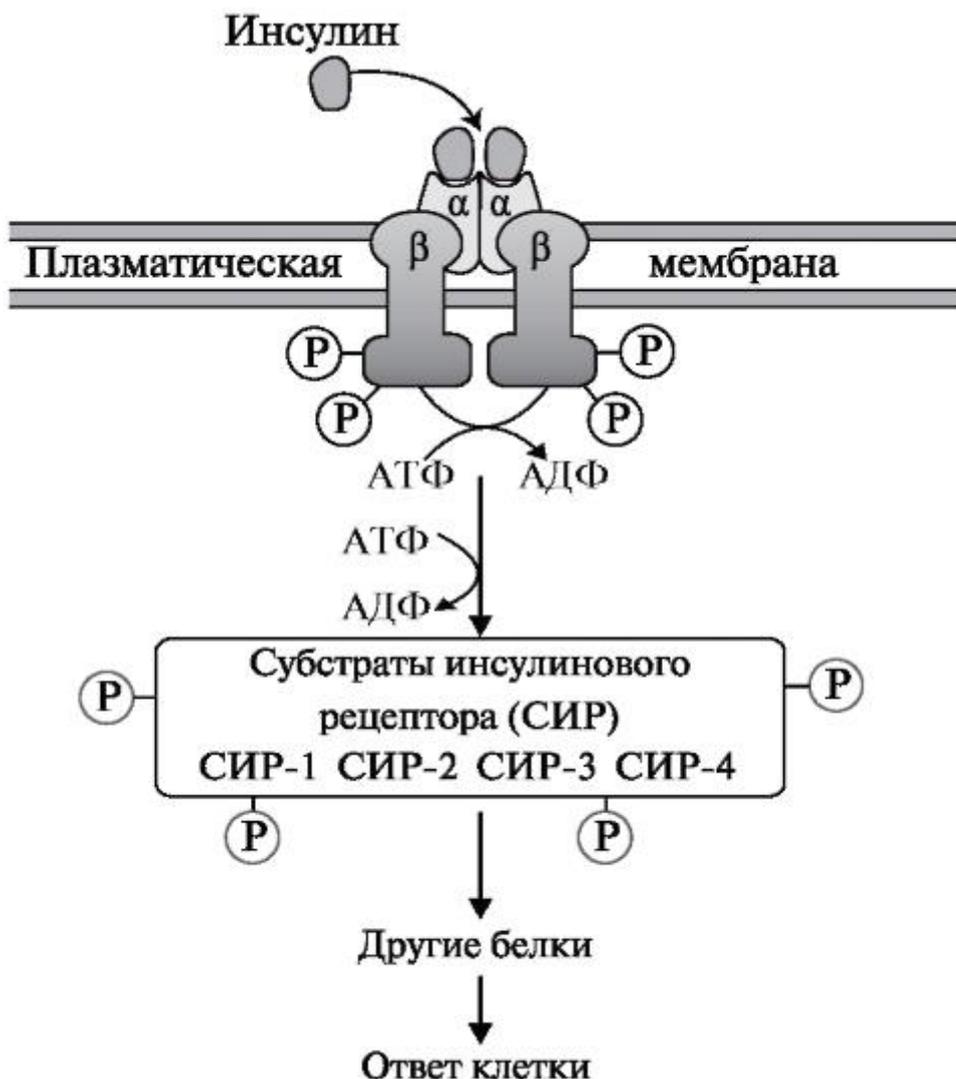


Рис. 9-11. Работа инсулинового рецептора (схема)

Цитоплазматические каталитические домены  $\beta$ -субъединиц обладают тирозинкиназной активностью. При связывании инсулина внеклеточными  $\alpha$ -субъединицами происходит димеризация рецептора инсулина, и каталитические домены фосфорилируют друг друга по остаткам тирозина. Это аутофосфорилирование приводит к увеличению тирозинкиназной активности рецептора. Последний осуществляет фосфорилирование белков-

субстратов инсулинового рецептора (СИР), которые, в свою очередь, действуют на другие белки, способствуя формированию ответа клетки на действие инсулина.

## ЛИГАНДЗАВИСИМЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ

Помимо рассмотренных механизмов трансмембранной передачи регуляторных сигналов, в организме существует особый тип регуляции, при котором связывание сигнальной молекулы (лиганда) с мембранным рецептором вызывает открытие ионных каналов в мембране.

Одним из хорошо изученных ионных каналов такого рода является рецептор ацетилхолина. Он представляет собой олигомер, образованный несколькими типами субъединиц. Последние формируют пентамерный комплекс, в центре которого расположен лиганд-зависимый  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -канал. В отсутствие ацетилхолина канал закрыт (рис. 9-12). При связывании ацетилхолина происходит открытие канала и поступление  $\text{Na}^+$  в клетку, а  $\text{K}^+$  - из нее. Вследствие более высокого концентрационного градиента ионы  $\text{Na}^+$  входят в клетку быстрее, чем ионы  $\text{K}^+$  из нее выходят. Это приводит к локальной деполяризации мембраны вблизи ацетилхолиновых рецепторов синапса.

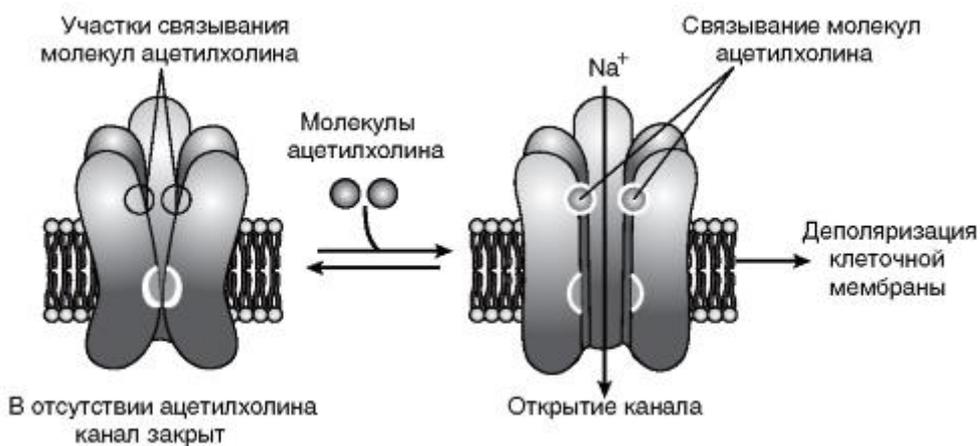


Рис. 9-12. Лиганд-зависимый канал на примере рецептора ацетилхолина (схема)

## ПУТИ ВЫКЛЮЧЕНИЯ РЕЦЕПТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ

Сущность физиологической регуляции заключается в ее обратимости. В организме обратимость действия сигнальных молекул достигается различными путями.

### Удаление сигнальных молекул

Многие сигнальные молекулы подвергаются метаболической деградации. Например, циркулирующие в крови натрийуретические пептиды расщепляются под действием нейтральной пептидазы. Нейромедиаторы, выделенные в синаптическую щель, могут подвергаться обратному захвату и депонированию. Ацетилхолинэстераза осуществляет расщепление ацетилхолина. Катехоламины подвергаются окислительному дезаминированию при участии моно-аминоксидазы (МАО) и О-метилированию под действием катехол-О-метилтрансферазы.

Если уровень сигнальных молекул остается высоким, у клеток-мишеней развивается снижение чувствительности к ним. Это может быть связано с уменьшением числа рецепторов или снижением их чувствительности.

### Деградация вторичных посредников

Деградация сигнальных молекул сопровождается распадом вторичных посредников (например, цАМФ и цГМФ под действием фосфодиэстераз) или их обратным депонированием (ионы  $Ca^{2+}$  под действием  $Ca^{2+}$ -АТФазы). Кофеин (рис. 9-13) и другие вещества из группы метилксантинов ингибируют активность фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов. Это приводит к увеличению внутриклеточного содержания цАМФ. Подобно катехоламинам, он стимулирует центральную нервную систему, способствует сокращению скелетной мускулатуры, влияет на артериальное давление и частоту сердечных сокращений. Подобно гистамину, кофеин также увеличивает секрецию желудочного сока.

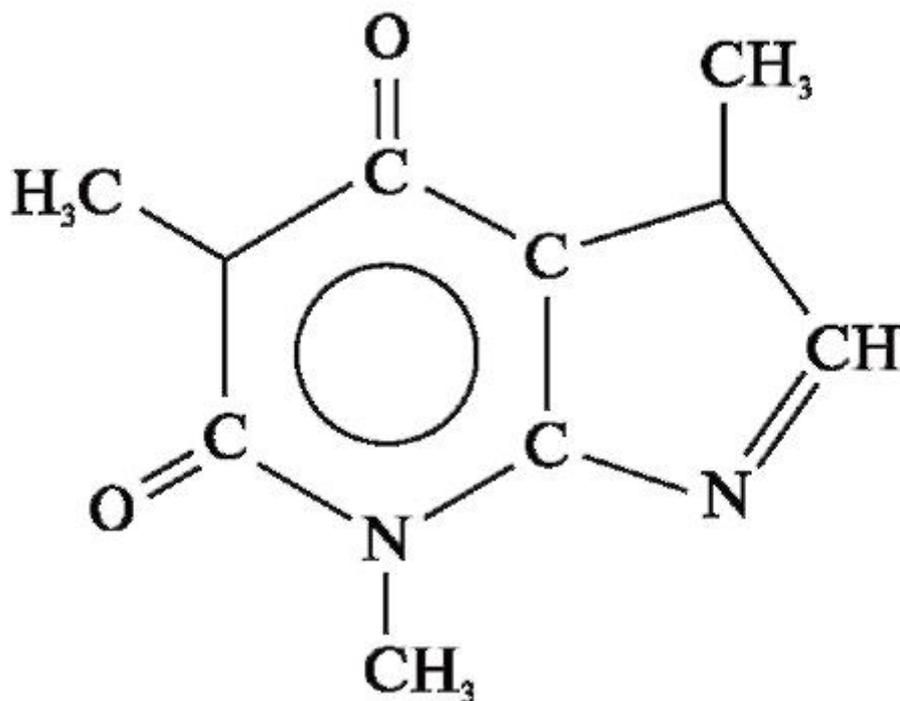


Рис. 9-13. Формула кофеина

*В записную книжку врача*

Лекарственные препараты - модуляторы межклеточной сигнализации

Многие лекарственные препараты влияют на процессы межклеточной сигнализации. Так, ингибиторы МАО способствуют повышению уровня важнейших медиаторных моноаминов (серотонина, дофамина, норадреналина). Именно поэтому эти препараты используют для лечения разных видов депрессивных состояний, характеризуемых снижением уровня моноаминов в центральной нервной системе. Аналогичный эффект оказывают ингибиторы обратного захвата нейромедиаторов. Например, при введении флуоксетина (прозака<sup>®</sup>) - ингибитора обратного захвата серотонина, повышается концентрация серотонина в синаптической щели.

Обратная модификация внутриклеточных белков-мишеней

Модифицированные в процессе формирования ответа клетки на действие сигнальных молекул белки претерпевают обратную модификацию. Например, фосфорилированные под действием различных сигналь-регулируемых протеинкиназ (ПКА, ПКО, ПКС и др.) белки при участии протеинфосфатаз подвергаются дефосфорилированию (рис. 9-14).



Рис. 9-14. Обратная модификация белков. Протеинкиназы осуществляют фосфорилирование белков, а протеинфосфатазы - дефосфорилирование

## ЧАСТЬ II. ВВЕДЕНИЕ В ОБМЕН ВЕЩЕСТВ. БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ.

### ГЛАВА 10. ПОНЯТИЕ О МЕТАБОЛИЗМЕ. ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

*Анаболические превращения* протекают в противоположном направлении, и из ограниченного числа исходных соединений синтезируются разнообразные продукты, процессы образования которых, как правило, включают реакции восстановления и протекают с затратами энергии.

Хотя катаболические и анаболические пути различаются во многих отношениях, они представляют собой взаимосвязанные (сопряженные), взаимодополняющие процессы. Взаимосвязь катаболизма и анаболизма осуществляется через общие метаболиты, восстановительные эквиваленты и источники энергии.

Процесс, объединяющий катаболизм и анаболизм за счет использования перечисленных выше компонентов, называют *амфиболическим*, или двойственным, а совокупность катаболических, анаболических и амфиболических процессов - *промежуточным обменом*.

Образующиеся в результате распада белков, жиров и углеводов мономеры в процессе унификации превращаются в метаболиты, которые переносятся в матрикс митохондрий и поступают в цикл трикарбонных кислот (ЦТК), или

цикл лимонной кислоты, называемый также *циклом Кребса* (по имени ученого Ганса Кребса, его открывшего).

### ПРЕВРАЩЕНИЕ ПИРУВАТА В АЦЕТИЛ-КОА

Непосредственно в ЦТК включаются ацетил-КоА, оксалоацетат и 2-оксоглутарат. Для получения молекулы ацетил-КоА пировиноградная кислота (ПВК, пируват) подвергается реакции окислительного декарбоксилирования (рис. 10-2).



Рис. 10-2. Суммарная реакция окислительного декарбоксилирования пирувата

Эту реакцию катализирует сложный пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК), который часто называют просто пируватдегидрогеназой. Он включает три фермента и 5 коферментов - тиаминпирофосфат, липоевая кислота, кофермент А (HS-КоА), ФАД и НАД<sup>+</sup>. Последовательность реакций, в ходе которых происходит превращение пирувата, показана на рис. 10-3.

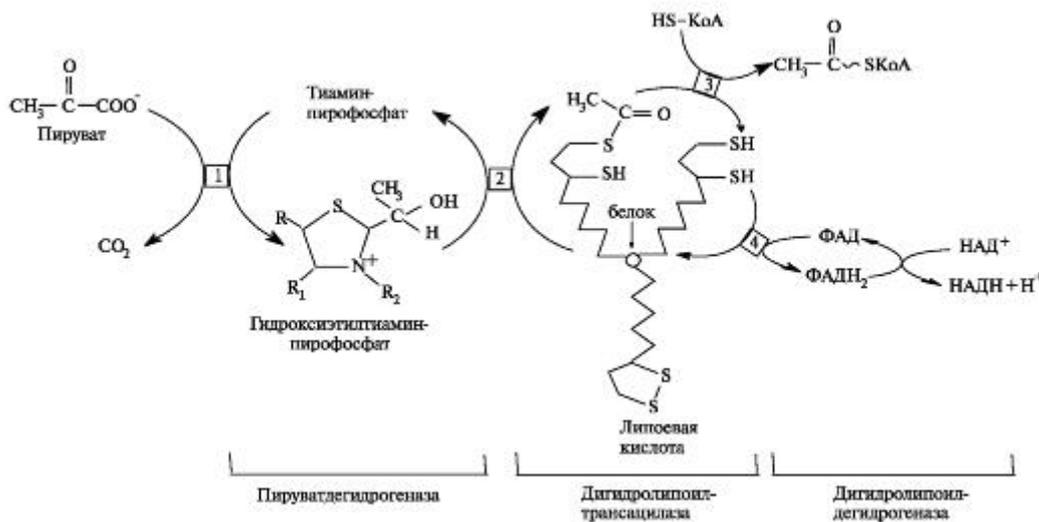


Рис. 10-3. Последовательность реакций при участии ферментов пируватдегидрогеназного комплекса. Этапы: 1 - декарбоксилирование пирувата с образованием гидроксиэтилтиаминпирофосфата; 2 - перенос

двухуглеродной единицы на липоевую кислоту; 3 - образование ацетил-КоА;  
4 - восстановление липоевой кислоты

### ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Последовательность реакций цикла Кребса показана на рис. 10-4. В ходе серии окислительно-восстановительных превращений восстановительные эквиваленты субстратов используются для восстановления НАД<sup>+</sup> и ФАД.

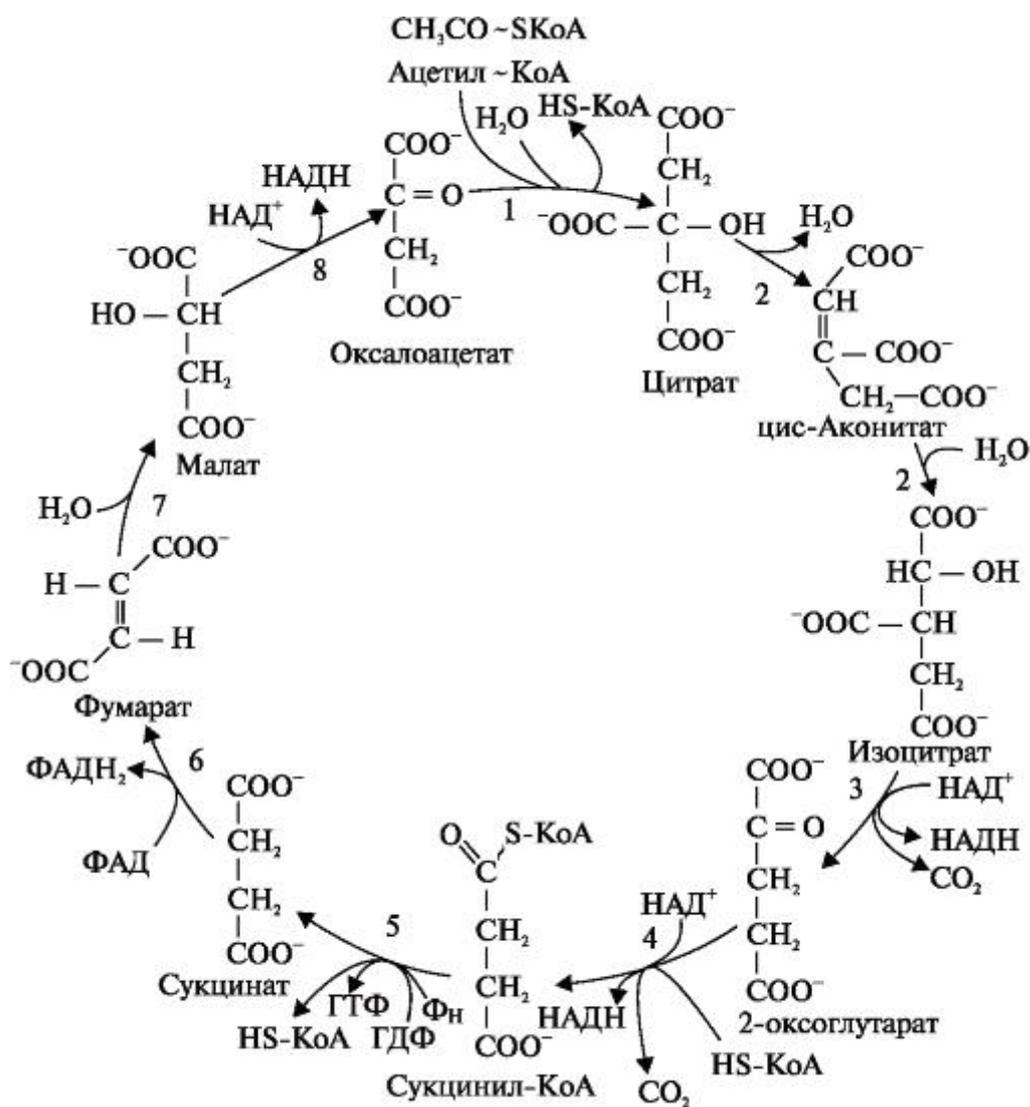
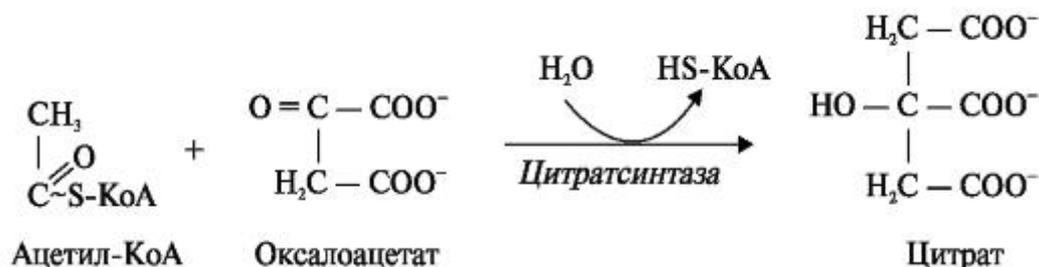


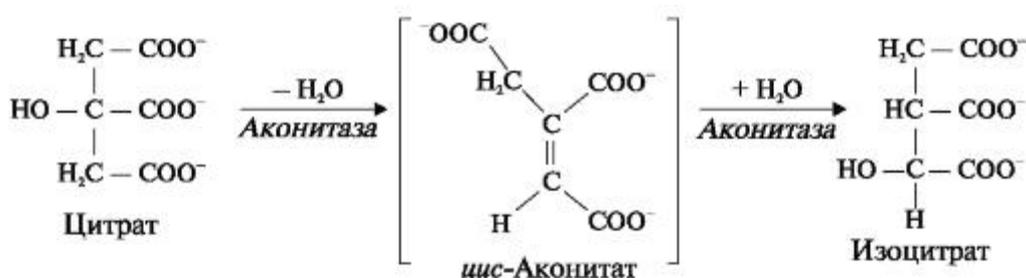
Рис. 10-4. Реакции цикла трикарбонных кислот. Ферменты: 1 - цитратсинтаза; 2 - аконитаза; 3 - изоцитратдегидрогеназа; 4 - 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс; 5 - сукцинил-КоА-синтетаза; 6 - сукцинатдегидрогеназа; 7 - фумараза; 8 - малатдегидрогеназа

Ацетил-КоА вступает в цикл, взаимодействуя с оксалоацетатом, в результате чего образуется молекула цитрил-КоА, которая затем превращается в цитрат

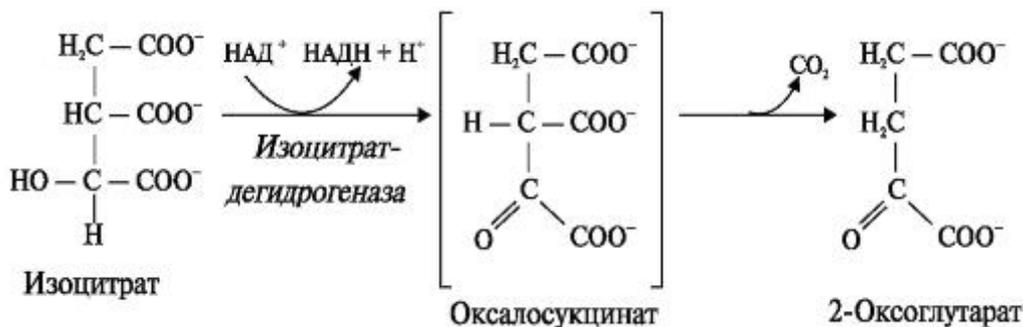
(анион лимонной кислоты). Эту реакцию катализирует фермент *цитратсинтаза*.



В следующей реакции, которую катализирует фермент *аконитаза*, цитрат сначала превращается в *цис*-аконитат и далее в изоцитрат.



Образовавшийся изоцитрат под действием фермента *изоцитратдегидрогеназы* подвергается окислительному декарбоксилированию с образованием молекулы 2-оксоглутарата.



В ходе последующей реакции окислительного декарбоксилирования 2-оксоглутарат превращается в сукцинил-КоА. Эту реакцию катализирует *2-оксоглутаратдегидрогеназа* - ферментный комплекс, напоминающий пируватдегидрогеназу, в состав которого включены также 5 коферментов (тиаминпирофосфат, липоевая кислота, кофермент А, ФАД, НАД<sup>+</sup>). В результате этой реакции в молекуле сукцинил-КоА формируется макроэргическая фосфатная связь.



Последующее превращение молекулы сукцинил-КоА в сукцинат катализирует фермент *сукцинил-КоА-синтетаза*, и энергия, высвобождающаяся при расщеплении макроэргической связи сукцинил-КоА, идет на образование молекулы ГТФ из ГДФ и  $\text{P}_n$ .

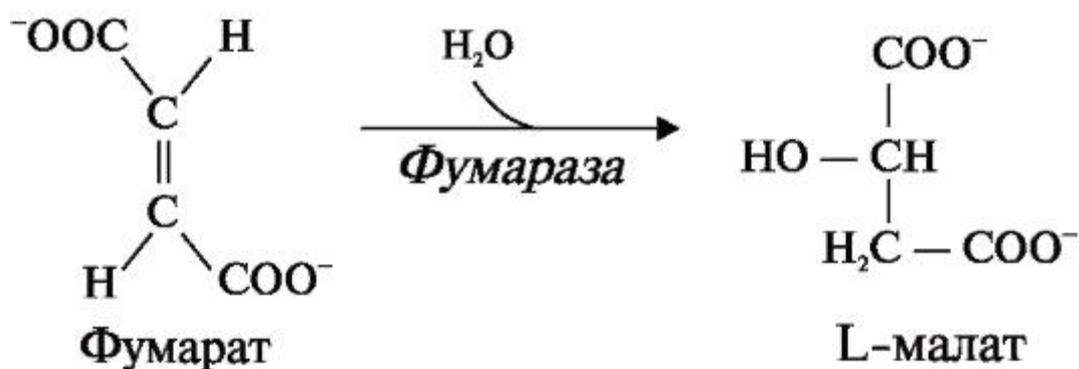
Данная реакция получила название реакции *субстратного фосфорилирования*. Молекула ГТФ легко отдает концевую фосфатную группу АДФ в реакции, катализируемой ферментом нуклеозиддифосфаткиназой ( $\text{ГТФ} + \text{АДФ} \rightarrow \text{ГДФ} + \text{АТФ}$ ).

Молекула сукцината далее дегидрируется с участием *сукцинатдегидрогеназы*. В результате этой реакции образуется молекула фумарата, а атомы водорода переносятся на простетическую группу фермента-ФАД.

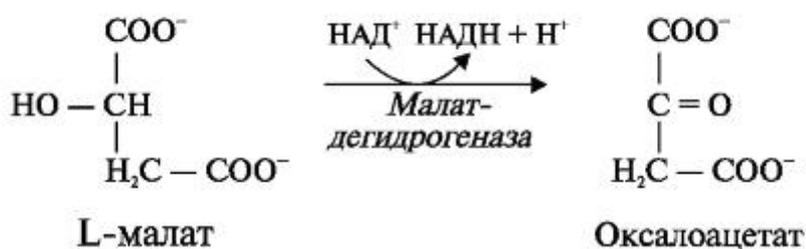
В отличие от остальных ферментов ЦТК, которые находятся в матриксе, сукцинатдегидрогеназа локализуется во внутренней мембране митохондрий.



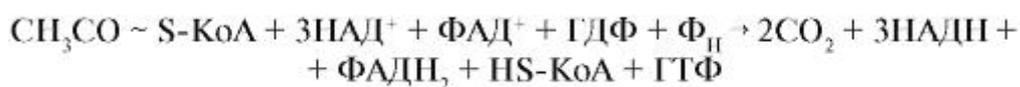
В ходе следующей реакции, катализируемой ферментом *фумаразой* (*фумаратгидратазой*), молекула фумарата превращается в малат.



В заключительной реакции цикла малат дегидрируется при участии *малатдегидрогеназы*, и высвобождаемая молекула оксалоацетата вновь соединяется с молекулой ацетил-КоА.



Уравнение суммарной реакции, подводящее итоги работы цикла, следующее:



#### АМФИБОЛИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

ЦТК связывает катаболические и анаболические процессы через общие для них метаболиты. Часть метаболитов образуется в цитратном цикле, а другие включаются в него и являются начальными продуктами других метаболических путей (глюконеогенеза, трансаминирования, дезаминирования и др.).

*Анаболическая роль ЦТК* (рис. 10-5) заключается в том, что из промежуточных метаболитов этого процесса могут синтезироваться другие вещества.



Рис. 10-5. Амфиболическая роль цикла трикарбоновых кислот

- Цитрат, 2-оксоглутарат, сукцинил-КоА, фумарат в ЦТК превращаются в оксалоацетат, а из оксалоацетата может образоваться глюкоза.
- Цитрат участвует в переносе ацетильных групп ацетил-КоА в цитоплазму для синтеза липидов.
- Цитрат способен связывать ионы кальция и участвовать в процессах их переноса и отложения (минерализации).
- В реакции трансаминирования из оксалоацетата образуется аспарагиновая кислота, а из 2-оксоглутарата - глутаминовая кислота.
- Сукцинил-КоА участвует в синтезе порфиринов (гема).
- Сукцинил-КоА является донором HS-КоА в реакции превращение ацетоацетата, в активную форму - ацетоацетил-КоА.

*Катаболическая роль ЦТК* заключается в образовании конечного продукта метаболизма -  $\text{CO}_2$  и наработке восстановленных молекул НАД и ФАД, поставляющих восстановительные эквиваленты в дыхательную цепь.

## РЕГУЛЯЦИЯ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Скорость протекания реакций в ЦТК определяется соотношением количества АТФ/АДФ и НАДН/НАД<sup>+</sup> и регуляции активности ключевых ферментов, к которым относят:

- *цитратсинтазу* - первый фермент данного метаболического пути, активность которого определяется доступностью оксалоацетата. АТФ и НАДН. Цитрат ингибирует этот фермент, а молекула АДФ является аллостерическим активатором цитратсинтазы;
- *изоцитратдегидрогеназу* - фермент аллостерически активируется АДФ и ионами  $Ca^{2+}$  и ингибируется НАДН.

## ГЛАВА 11. ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ МИТОХОНДРИЙ

Комплекс II - сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза - осуществляет перенос восстановительных эквивалентов от ФАДН<sub>2</sub> (простетической группы сукцинатдегидрогеназы, восстановленной в ходе окисления сукцината) на убихинон через FeS-центры (рис. 11-2).

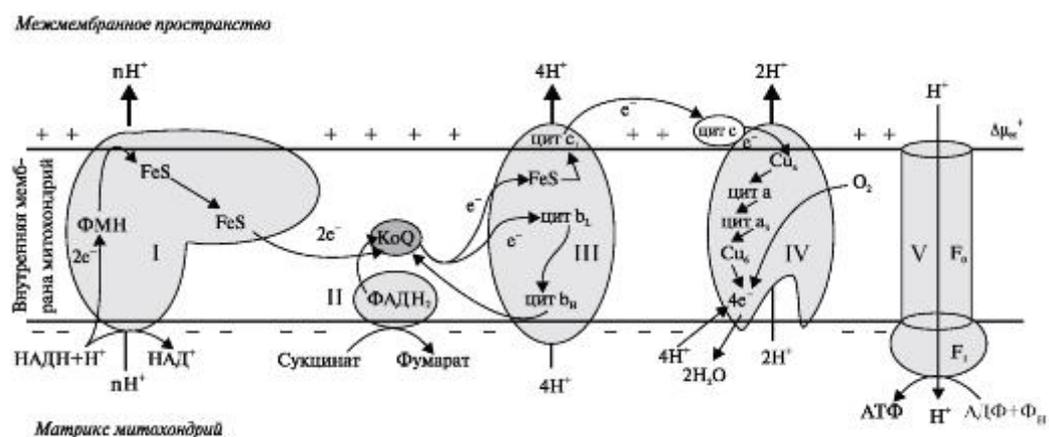


Рис. 11-1. Дыхательная цепь митохондрий (схема): КоQ - убихинон; цит - цитохром; ФАД - флавинадениндинуклеотид; ФМН - флавинмононуклеотид; НАД<sup>+</sup> - никотинамидадениндинуклеотид окисленный; НАДН + H<sup>+</sup> - никотинамидадениндинуклеотид восстановленный; FeS - железосерные белки; I-V - комплексы дыхательной цепи

Восстановленный убихинон выступает в качестве переносчика электронов на цитохромы.

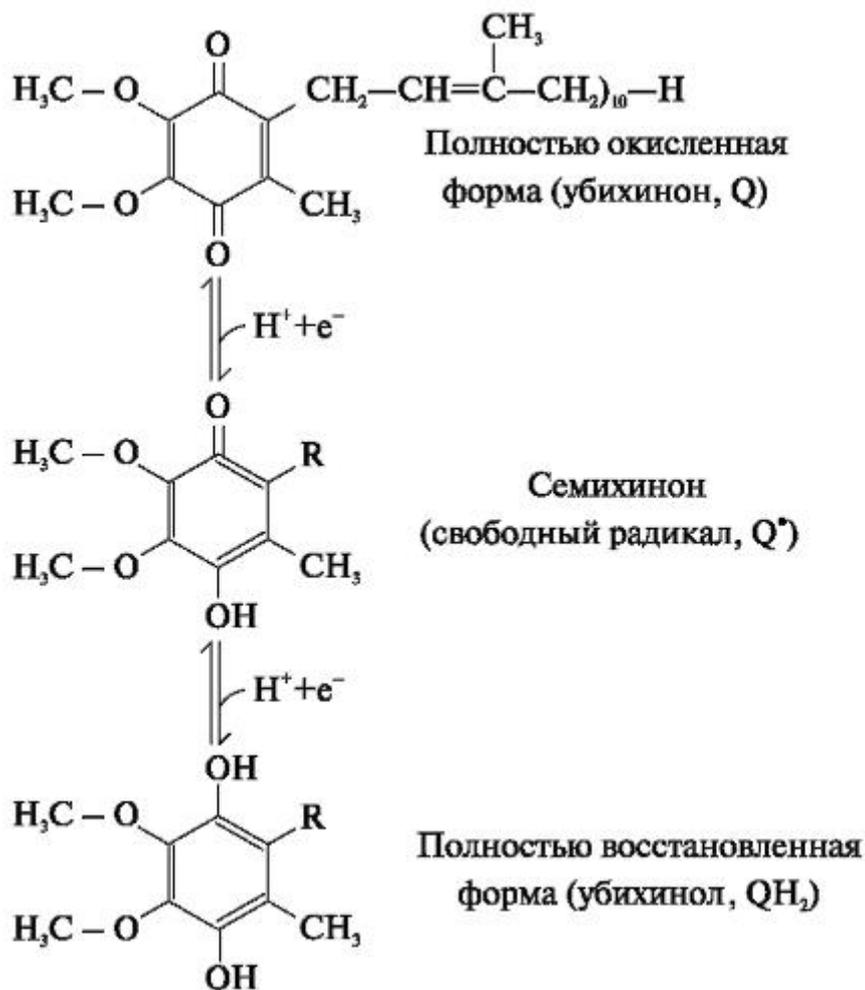


Рис. 11-2. Участие убихинона в переносе восстановительных эквивалентов

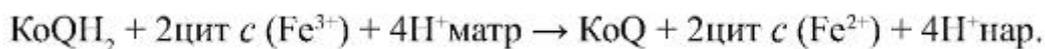
Восстановленный убихинон (QH<sub>2</sub>) диффундирует во внутренней митохондриальной мембране от комплексов I и II к комплексу III.

Комплекс III - убихинонцитохром с-оксидоредуктаза (называемый также комплексом цитохромов bc<sub>1</sub>) осуществляет перенос электронов от убихинона на цитохром с. Цитохромы - это гемопротейны, отличающиеся по строению апобелка и боковых цепей порфиринового кольца гема. В ходе окислительно-восстановительных реакций, протекающих с их участием, происходит изменение валентности железа:



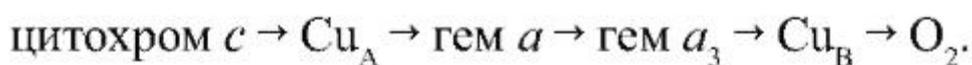
Различают 5 типов цитохромов: *b*, *c*, *c*<sub>1</sub>, *a* и *a*<sub>3</sub>. Гемовые группы цитохромов связаны с белковой частью донорно-акцепторными связями между ионом железа и соответствующими аминокислотными остатками.

Процесс передачи электронов от *двухэлектронного переносчика* убихинона к *одноэлектронным переносчикам* цитохромам осуществляется в сложной цепи реакций, названных Q-циклом. Благодаря его функционированию полное окисление одной молекулы QH<sub>2</sub> сопровождается восстановлением двух молекул цитохрома *c* и переносом четырех протонов из матрикса (матр) митохондрий наружу (нар):



Цитохром *c* - растворимый белок межмембранного пространства. После принятия электрона от комплекса III цитохром *c* движется к комплексу IV и отдает электроны атому меди этого комплекса.

М Комплекс IV - цитохромоксидаза - катализирует реакцию окисления восстановленного цитохрома смолекулярным кислородом, сопряженную с трансмембранным переносом протонов. Этот сложный олигомерный белок имеет в своем составе два гема (*a* и *a*<sub>3</sub>) и два атома Си, обозначаемых как Cu<sub>A</sub> и Cu<sub>B</sub>. Электрон, полученный от цитохрома *c*, переносится на Cu<sub>A</sub>. Двигаясь в направлении от цитоплазматической поверхности вглубь мембраны, электрон переносится от Cu<sub>A</sub> к гему *a* и далее к гему *a*<sub>3</sub> и Cu<sub>B</sub>, последнему компоненту дыхательной цепи, восстанавливающему O<sub>2</sub>:



Присоединение четырех электронов к молекуле кислорода приводит к полному его восстановлению с образованием эндогенной воды, а транспорт восстановительных эквивалентов по дыхательной цепи сопровождается трансмембранным переносом протонов из матрикса митохондрий во внемитохондриальное пространство (рис. 11-3).

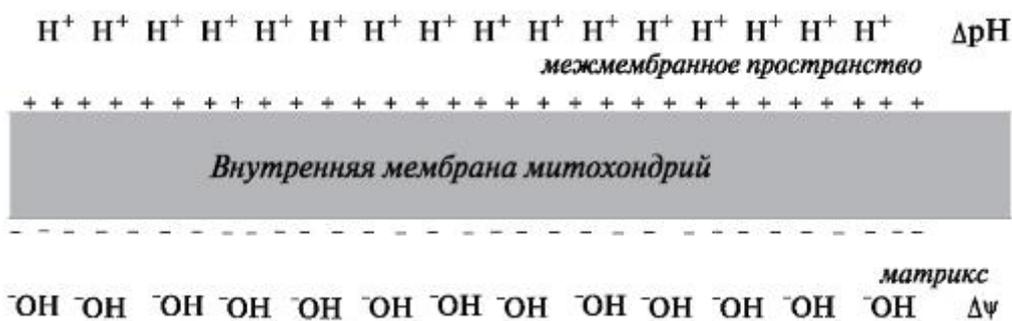


Рис. 11-3. Образование трансмембранной разности электрохимических потенциалов ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) в результате транспорта восстановительных эквивалентов по дыхательной цепи (схема)

Вследствие выкачивания протонов из матрикса митохондрий на внутренней мембране возникает разность электрического потенциала (минус внутри), т.е. электрический градиент ( $\Delta\psi$ ) и разность концентраций протонов  $\text{H}^+$  (рН выше внутри), т.е. концентрационный ( $\Delta\text{pH}$ ) градиент. Вместе они составляют так называемый электрохимический потенциал ионов водорода, обозначаемый как  $\Delta\mu\text{H}^+$ .

### МЕХАНИЗМ СИНТЕЗА АТФ В ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ

Комплекс V - *F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub>-АТФ-синтаза* - трансмембранный ферментативный комплекс, состоящий из двух компонентов: факторов  $\text{F}_0$  и  $\text{F}_1$ . Первый компонент отвечает за транспорт протонов, а второй - за синтез (или гидролиз) АТФ (рис. 11-4). Этот АТФ-синтазный комплекс настолько велик, что выдается далеко вглубь матрикса митохондрий, образуя на внутренней стороне мембраны так называемые грибовидные выросты.

Использование  $\Delta\mu\text{H}^+$  в ходе трансмембранного переноса субстратов

Синтезированные молекулы АТФ находятся в матриксе митохондрий, и их необходимо отправить потребителям в другие компартменты клетки (рис. 11-5). В свою очередь, для синтеза АТФ в митохондриях необходимы молекулы АДФ и Фн, а также субстраты, питающие цикл Кребса. Эти, а также ряд других процессов происходят с затратой  $\Delta\mu\text{H}^+$ .

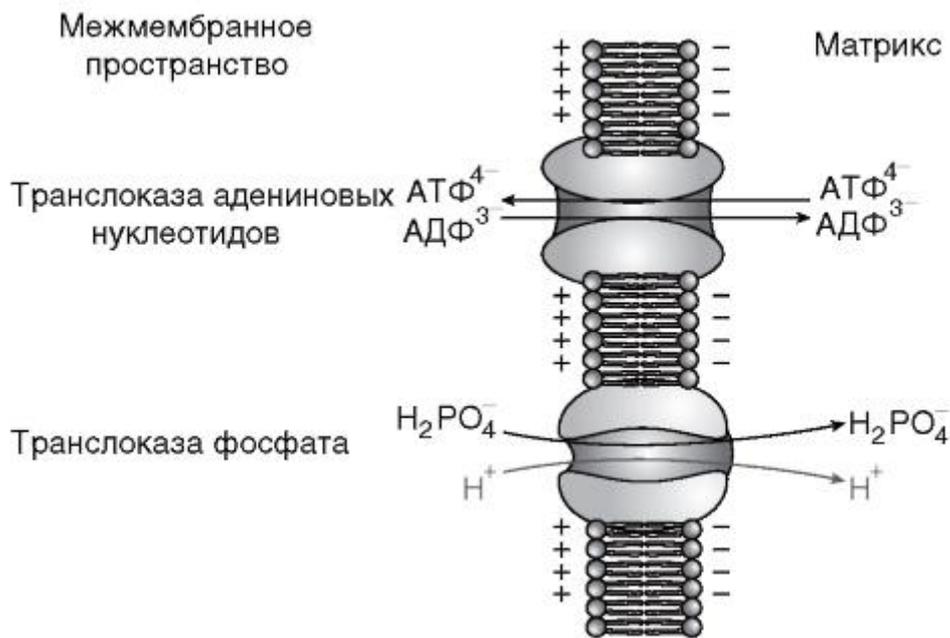


Рис. 11-5. Транспортные системы внутренней мембраны митохондрий, использующие энергию  $\Delta\mu\text{H}^+$

Митохондриальная адениннуклеотидтранслоказа (называемая также АТФ/АДФ-антипортер) - специальный белок-переносчик внутренней мембраны митохондрий, который осуществляет обмен (антипорт) одной молекулы внутримитохондриального АТФ на одну молекулу немитохондриального АДФ (см. также рис. 8.6). АТФ (при нейтральном значении рН) несет на один отрицательный заряд больше, чем АДФ ( $\text{ATP}^{4-} > \text{ADP}^{3-}$ ), поэтому в результате такого обмена происходит снижение  $\Delta\psi$ .

В транспорте в митохондриях неорганического фосфата (Фн) - другого субстрата для синтеза АТФ, задействованы несколько переносчиков. Один из них осуществляет совместный перенос (симпорт) аниона  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  и иона  $\text{H}^+$ . Этот переносчик так и называют -  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{H}^+$ -симпортер. Захватывая снаружи анион  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  и ион  $\text{H}^+$ , этот белок осуществляет электронеutralный транспорт фосфата в митохондриях. Движущей силой этого процесса является  $\Delta\text{pH}$ .

Благодаря симпорту  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  и  $\text{H}^+$  число положительных и отрицательных зарядов по обе стороны внутренней мембраны митохондрий (а значит, и  $\Delta\psi$ ) не изменяется, а концентрация протонов в матриксе увеличивается.

Считают, что на обмен АТФ на АДФ и транспорт фосфата в митохондриях расходуется до 1/3 свободной энергии, высвобождаемой при транспорте

электронов по дыхательной цепи, и лишь 2/3 энергии идет непосредственно на синтез АТФ.

## РАЗОБЩЕНИЕ ДЫХАНИЯ И ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Синтез АТФ в комплексе V дыхательной цепи происходит в том случае, если трансмембранный перенос протонов внутрь митохондрий происходит по протонпроводящему пути (фактору  $F_0$ ) АТФ-синтазы. Если же протоны поступают в митохондрии, минуя  $F_0$ , синтеза АТФ не происходит. Нарушение синтеза АТФ в дыхательной цепи, вызванное снижением  $\Delta\mu\text{H}^+$  без нарушения транспорта восстановительных эквивалентов по дыхательной цепи, получило название разобщение дыхания и фосфорилирования (или разобщение окисления и фосфорилирования). Вещества, способствующие этому процессу, называют *разобщителями*. В результате разобщения энергия  $\Delta\mu\text{H}^+$  не трансформируется в энергию химических связей АТФ и рассеивается в виде тепла.

Разобщители вызывают увеличение проницаемости внутренней мембраны митохондрий для протонов и других ионов. Известен ряд веществ, способствующих трансмембранному переносу протонов. Их называют *протонофорами*. Эти гидрофобные соединения, например анионы жирных кислот, свободно перемещаются в липидном бислое, обратимо связывают протоны, транспортируя их внутрь митохондрий (рис. 11-6). Такое перемещение приводит к снижению  $\Delta\mu\text{H}^+$ -компонента протонного потенциала и, следовательно,  $\Delta\mu\text{H}^+$ .

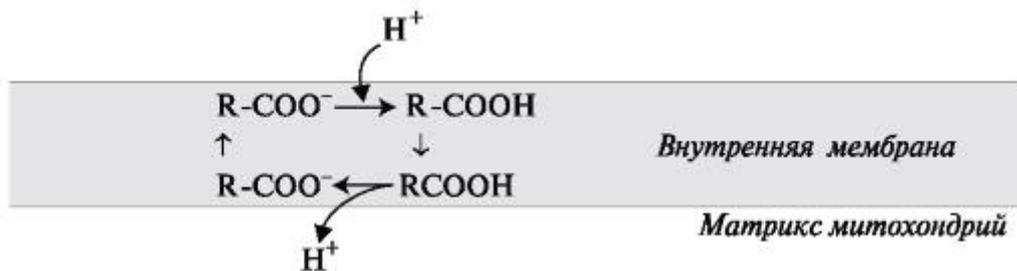


Рис. 11-6. Роль анионов жирных кислот в транспорте протонов в митохондриях (схема)

В бурой жировой ткани и скелетных мышцах во внутренней мембране митохондрий есть специальные белки-разобщители, которые также

способствуют поступлению протонов в матрикс в обход V комплекса, вызывая разобщение дыхания и фосфорилирования (рис. 11-7). Эти белки играют важную роль в терморегуляции.

В настоящее время известно целое семейство таких белков-разобщителей (UCP; от англ. *Uncoupling Protein* - буквально: разобщающий белок), в котором насчитывают 4 типа белков. Белок-разобщитель первого типа (UCP<sub>1</sub>), который также называют термогенином, экспрессируется в бурой жировой ткани. Термогенин обеспечивает альтернативный путь для обратного поступления  $H^+$  в матрикс, минуя комплекс V. В результате АТФ не синтезируется, а вся энергия  $\Delta\mu H^+$  рассеивается в виде тепла.

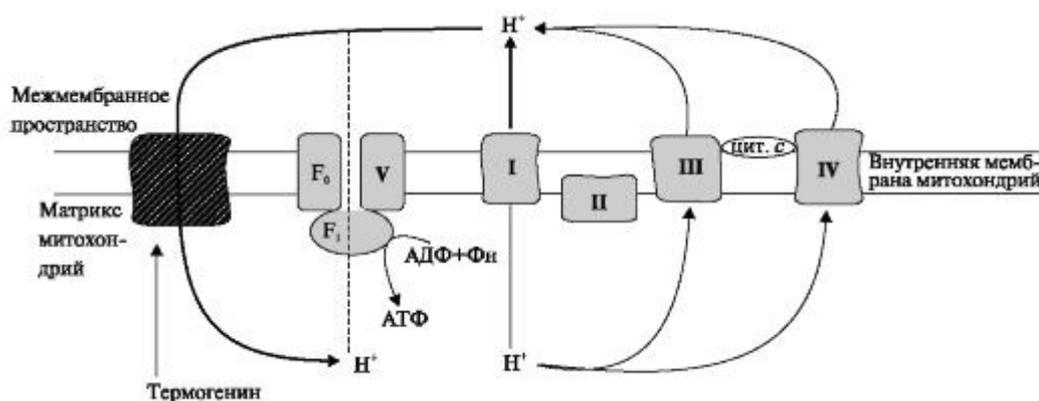


Рис. 11-7. Действие термогенина (схема). Дыхательная цепь митохондрий бурой жировой ткани осуществляет обычный перенос восстановительных эквивалентов, сопряженный с трансмембранным переносом  $H^+$  из матрикса наружу (в межмембранное пространство), а термогенин способствует поступлению  $H^+$  в матрикс, минуя комплекс V

Аналогичным образом действуют и другие вещества - ионофоры, осуществляющие транспорт в матрикс митохондрий других положительно заряженных ионов (но не  $H^+$ ), например  $K^+$  (рис. 11-8). Это приводит к нейтрализации относительного отрицательного заряда в матриксе, снижению  $\Delta\psi$ -составляющей протонного потенциала и, следовательно, рассеиванию и нарушению синтеза АТФ. Так действует ряд антибиотиков: валиномицин, нигерицин и др. Грамицидин С и амфотерицин В образуют в мембране каналы, проницаемые для нескольких ионов, таких, как  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ .

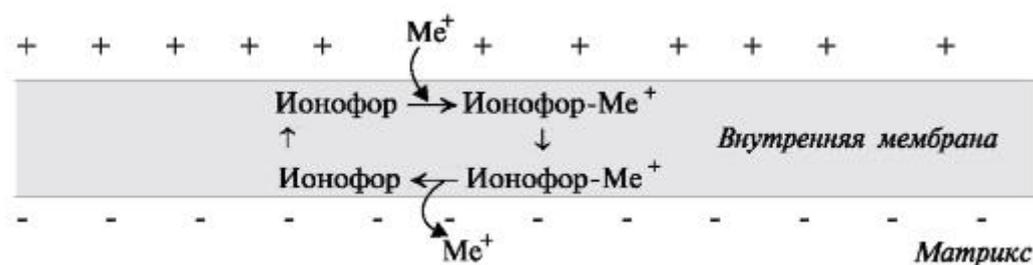


Рис. 11-8. Роль ионофоров в трансмембранном переносе катионов металлов ( $Me^+$ )

*В записную книжку врача*

### Применение ионофоров в медицине

Ионофоры нарушают барьерную функцию мембран и синтез АТФ, что приводит к сдвигам в энергообеспечении клеток. Некоторые ионофоры используют в медицинской практике для лечения инфекционных заболеваний. Так, грамицидин С применяют для местного лечения гнойных ран, гнойничковых заболеваний кожи, пролежней и ранений, но его ни в коем случае нельзя вводить внутривенно, так как он может вызвать нарушение проницаемости мембран клеток человека, в первую очередь клеток крови. Другой каналобразующий ионофор - амфотерицин В, эффективен для лечения грибковых заболеваний.

### ИНГИБИТОРЫ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ

Синтез АТФ в дыхательной цепи не происходит и в том случае, если нарушен транспорт электронов. Известен ряд ингибиторов, действующий в определенных участках электронтранспортной цепи митохондрий. Ротенон, амитал, барбитураты блокируют транспорт электронов в комплексе I, антимицин А - в комплексе III, цианиды и угарный газ блокируют перенос электронов на кислород, осуществляемый комплексом IV дыхательной цепи (рис. 11-9).

Помимо ингибиторов транспорта восстановительных эквивалентов по электронтранспортной цепи митохондрий, синтез АТФ нарушают и ингибиторы АТФ-синтазного комплекса: антибиотик олигомицин<sup>^</sup>и дициклогексилкарбодиимид. Эти вещества блокируют поступление протонов через фактор  $F_0$  к фактору  $F_1$ .

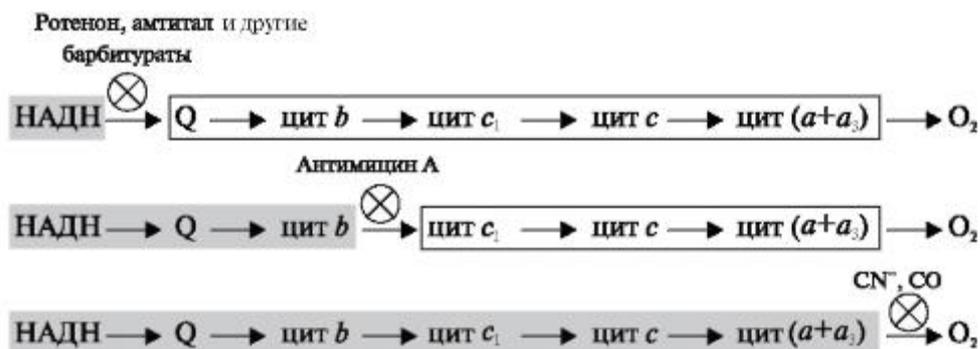


Рис. 11-9. Ингибиторы электронтранспортной цепи

В записную книжку врача Пестициды

Ротенон - ингибитор первого комплекса дыхательной цепи, нередко используют в качестве природного пестицида. При длительном воздействии ротенон опасен для человека, так как вызывает развитие болезни Паркинсона.

## ПАТОЛОГИИ ПРИ НАРУШЕНИИ ТРАНСПОРТА ЭЛЕКТРОНОВ ПО ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ

Нарушения транспорта электронов по дыхательной цепи бывают врожденными и приобретенными.

Врожденные нарушения дыхательной цепи

Известен ряд наследственных дефектов компонентов электронтранспортной цепи митохондрий. В ряде случаев они несовместимы с жизнью, и новорожденные умирают в первые недели после рождения.

При дефиците *цитохрома c* преобладают признаки подострой некротической энцефалопатии (синдром Ли): развиваются симметричные некрозы в головном и спинном мозге, что ведет к атаксии, судорогам, задержке умственного развития и гипотензии. Дефицит *цитохромоксидазы* имеет аутосомно-рецессивное наследование и проявляется миопатией (слабостью мышц, утомляемостью, миоглобинурией, судорогами при симметричном вовлечении преимущественно проксимальных мышечных групп) и дыхательной недостаточностью. Поражаются и высокоэнергоёмкие процессы реабсорбции в почечных канальцах (развивается сопутствующий синдром де Тони-Дебре-Фанкони).

Дефект комплекса III дыхательной цепи сопровождается развитием тяжелой формы миопатии (заболевания мышечной системы, которая характеризуется прогрессирующей слабостью, а в ряде случаев и атрофией мышц).

Улучшение состояния пациента с таким дефектом было достигнуто с помощью инъекций викасола (аналога витамина  $K_1^*$ ) и аскорбиновой кислоты. Проводимое лечение обеспечивало электронами дыхательную цепь в обход дефектного комплекса (рис. 11-10). Этот пример наглядно демонстрирует возможность применения биоэнергетической терапии в клинической практике.

Рис. 11-10. Питание дыхательной цепи электронами в обход дефектного комплекса

#### Приобретенные нарушения дыхательной цепи

У наркоманов, употреблявших кустарно изготовленный аналог наркотика меперидина, был описан МФТП-индуцированный паркинсонизм, характерными признаками которого являются снижение общей двигательной активности, тремор рук, нарушение координации движений.

Проведенные исследования показали, что в процессе приготовления меперидина происходит образование побочного продукта - МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,6-тетрагидроперидин), который при попадании в организм накапливается в мозге и превращается в активный нейротоксин МФП<sup>+</sup> (ион 1-метил-4-фенилпиридиния). Последний ингибирует комплекс I, подобно ротенону. Нарушается окислительное фосфорилирование, и снижается уровень АТФ в клетках черной субстанции мозга. В конечном итоге гибнут клетки черной субстанции моза и развивается клиническая картина паркинсонизма.

#### *В записную книжку врача Яды*

Отравления мочевиной, фторотаном, сероводородом и сульфитами также протекают с ингибированием тканевого дыхания. Классический яд детективов - цианистый калий - эффективно блокирует систему цитохромов, вызывая картину острой тканевой гипоксии, прежде всего в миокарде (что вызывает синдром стенокардии) и мозге (что характеризуется потерей сознания и остановкой дыхания).

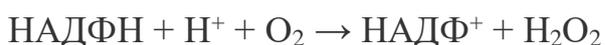
## ГЛАВА 12. СВОБОДНОЕ ОКИСЛЕНИЕ. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ, ИСПОЛЬЗУЮЩИХ КИСЛОРОД В КАЧЕСТВЕ АКЦЕПТОРА ЭЛЕКТРОНОВ

Помимо окислительного фосфорилирования, в различных компартментах клетки протекает большое количество реакций с участием кислорода, которые не связаны с синтезом АТФ. Их объединяют термином «свободное окисление».

#### Оксидазы

Хотя почти во всех клетках большая часть всего потребляемого кислорода восстанавливается с участием цитохромоксидазы дыхательной цепи, возможно частичное восстановление кислорода с образованием пероксида водорода. Так действуют НАДФН-оксидазы плазматической мембраны фагоцитирующих лейкоцитов:



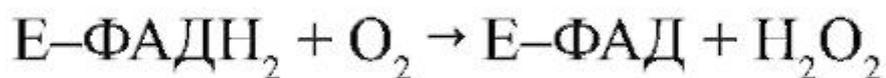
Образующийся пероксид водорода способствует уничтожению поглощенных лейкоцитами бактерий.

*Флавинсодержащие моноаминоксидазы (МАО)* катализируют окислительное дезаминирование биологически активных моноаминов, таких, как норадреналин, дофамин, серотонин и др. Реакция протекает в две стадии. На первой стадии происходит дегидрирование амина с восстановлением протетической группы фермента (Е-ФАД) и образованием имина:



Во второй стадии имин, реагируя с водой, спонтанно превращается в альдегид с выделением аммиака, а восстановленный фермент окисляется кислородом с образованием пероксида водорода:





Биологическая функция MAO заключается в защите организма от избытка нейромедиаторных моноаминов. При недостатке фермента в центральной нервной системе накапливаются норадреналин, дофамин, серотонин, что может привести к развитию агрессивного поведения и ряда нервно-психических расстройств.

### Оксигеназы

Оксигеназные реакции организма катализируют две группы ферментов: *монооксигеназы* (называемые также гидроксилазами) и *диоксигеназы*. К первым относят систему цитохрома P450, монооксигеназы, катализирующие гидроксилирование ароматических аминокислот (Три, Фен и Тир), дофамина, остатков пролина и лизина при созревании коллагена.

### Диоксигеназы

Включение двух атомов кислорода в молекулу субстрата  $R + O_2 - RO_2$  катализируют ферменты *диоксигеназы*. Данная реакция характерна для превращения молекул, содержащих ароматические кольца, например, при окислении гомогентизиновой кислоты. В другой реакции молекула  $\beta$ -каротина при действии диоксигеназы разделяется на две молекулы ретиналя.

## МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ

В мембранах эндоплазматического ретикулума гепатоцитов очень активна цепь свободного окисления, включающая НАДФН-цитохром P450-редуктазу и цитохром P450 (рис. 12-1). После разрушения клеток в ходе выделения субклеточных органелл *in vitro* эти мембраны формируют микросферы - микросомы. Именно поэтому такой вид окисления называют микросомальным.

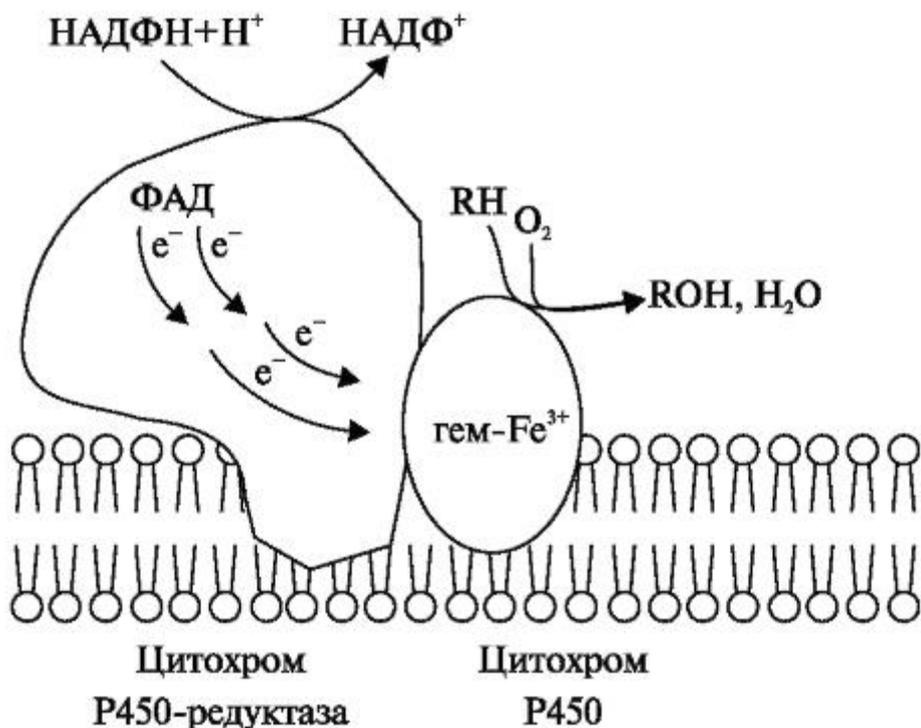
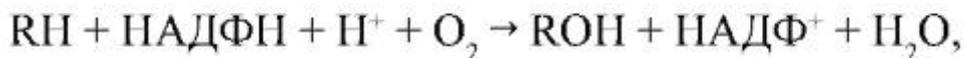


Рис. 12-1. Расположение белков монооксигеназной системы в мембране эндоплазматического ретикула гепатоцитов

По типу катализируемых реакций цитохром P450 относят к монооксигеназам смешанного типа. В присутствии доноров электронов (НАДФН+Н<sup>+</sup>) цитохром P450 активирует молекулярный кислород, один атом которого внедряется в молекулу субстрата (RH), а другой восстанавливается до воды.

Суммарную реакцию микросомального окисления можно описать следующим образом:

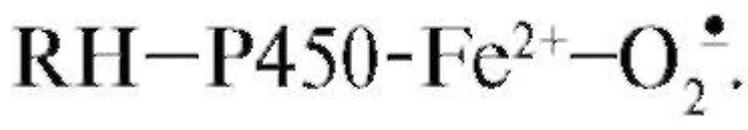


где RH - гидрофобный субстрат; НАДФН + Н<sup>+</sup> - донор электронов; РОН - гидроксилированный продукт.

Полный цикл гидроксилирования гидрофобного вещества с участием цитохрома P450 и цитохром P450-редуктазы представлен на рис. 12-2.

Весь каталитический процесс микросомального окисления можно разбить на несколько стадий:

- I - гидрофобное вещество (RH) взаимодействует с окисленной формой цитохрома P450 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) с образованием фермент-субстратного комплекса  $\text{RH-P450-Fe}^{3+}$ . Трехвалентное железо не может связать кислород.
- II - два электрона с участием цитохром P450 - редуктазы переносятся от  $\text{НАДФН} + \text{H}^+$ , при этом один электрон связывается с комплексом  $\text{RH-P450-Fe}^{3+}$  и переводит его в  $\text{RH-P450-Fe}^{2+}$ .
- III - восстановленный фермент-субстратный комплекс взаимодействует с молекулой кислорода с образованием оксигенированного фермент-субстратного комплекса  $\text{RH-P450-Fe}^{2+}\text{-O}_2$ .
- IV - за счет второго электрона происходит восстановление кислорода и превращение его в свободный радикал



- V - образовавшийся восстановленный комплекс подвергается внутримолекулярным превращениям с высвобождением молекулы воды и гидроксигенированного субстрата -  $\text{ROH}$ . При этом цитохром P450 возвращается в исходное состояние и готов к взаимодействию со следующей молекулой гидрофобного субстрата.

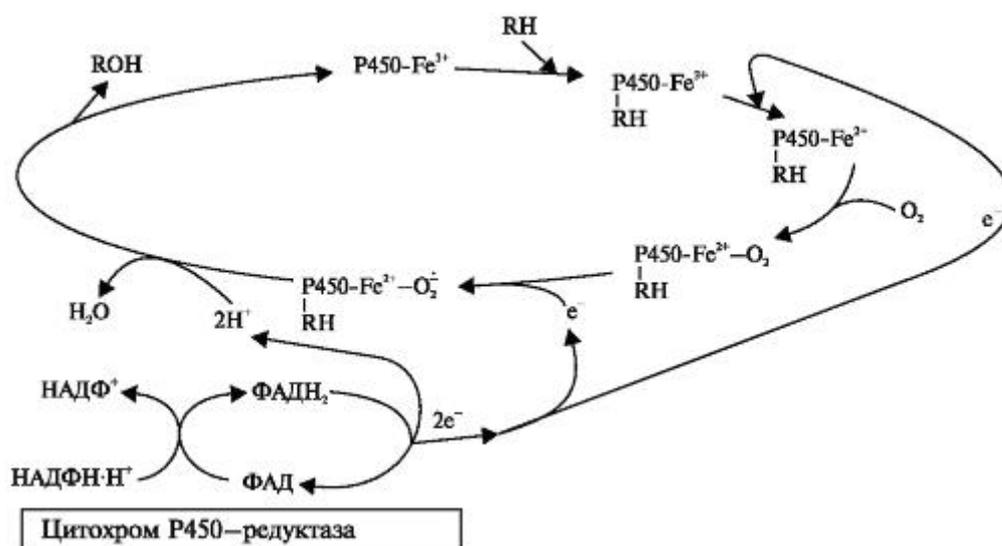


Рис. 12-2. Гидроксигенирующий цикл в микросомах гепатоцитов с участием цитохрома P450

Микросомальный гидроксилазный цикл цитохрома P450 в печени необходим для окисления ксенобиотиков (от греч. *xenos* - чужой и *bios* - жизнь), к числу которых относят лекарственные средства, яды, продукты промышленного загрязнения, пестициды, канцерогены и т.д. В результате гидроксирования растворимость ксенобиотиков в воде возрастает, что облегчает их выведение из организма с мочой. Помимо обезвреживания ксенобиотиков, цитохром P450 играет важную роль в окислении многочисленных эндогенных соединений - стероидов, желчных и жирных кислот, в синтезе простагландинов, лейкотриенов.

*В записную книжку врача*

Иногда приходится увеличивать дозу лекарственных препаратов

Многие лекарственные вещества (например, барбитураты) способны индуцировать синтез цитохрома P450, что способствует метаболизму фармакологических препаратов и снижению эффективности их действия. Именно поэтому при длительном приеме барбитуратов часто приходится увеличивать дозы других вводимых лекарственных средств.

### СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ

Под свободными радикалами понимают молекулы или их части, имеющие неспаренный электрон на внешней атомной орбите. Свободные радикалы, стремясь захватить недостающий электрон, становятся реакционноспособными. Для того чтобы восстановить свою пару электронов на внешней орбите, свободный радикал забирает электрон у соседней молекулы. Однако теперь уже другая молекула несет неспаренный электрон и становится свободным радикалом. По цепной реакции электрон передается от одной молекулы к другой, нарушая «установленные законы и порядок» в клетке. Результатом этих действий становится повреждение клетки.

Главный источник свободных радикалов - дыхательная цепь. Утечка электронов происходит из комплексов I и II в реакциях с убихиноном.

Неполное восстановление кислорода приводит к образованию свободных супероксидных радикалов. Ионы меди ( $\text{Cu}^+$ ) и железа ( $\text{Fe}^{2+}$ ) катализируют



образование опасных гидроксильных радикалов

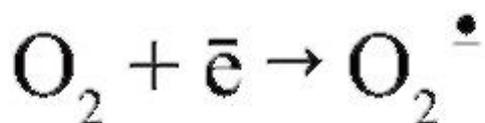
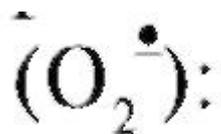
из

пероксида водорода.

## АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

Полное восстановление молекулы кислорода ( $O_2$ ) происходит при присоединении 4 электронов. Продукты неполного восстановления кислорода получили название *активных форм кислорода* (АФК).

При одноэлектронном восстановлении кислорода происходит образование реакционно-способного супероксидного анион-радикала



Супероксидный анион-радикал, принимая еще один  $\bar{e}$ , превращается в пероксидный анион ( $O_2^{2-}$ ), полное протонирование которого приводит к образованию пероксида водорода ( $H_2O_2$ ). Сам по себе пероксид водорода проявляет токсичное действие при довольно высоких для клеток человека и животных концентрациях (порядка 2050 мкМ).

Образование *гидроксильных* радикалов происходит при взаимодействии  $O_2$  с ионами двухвалентного железа ( $Fe^{2+}$ ) и меди ( $Cu^+$ ), которые инициируют радикальные реакции.

В реакции Фентона пероксид водорода разлагается с образованием гидроксильного радикала ( $^*OH$ ) - сильнейшего окислителя, повреждающего практически любой компонент клетки:



В водной среде супероксид может выступать в качестве *основания*, которое является акцептором протона, при этом образуется *гидроксипероксидный* радикал ( $HO_2^*$ ).

Гидроксипероксидный и гидроксильный радикалы инициируют реакции перекисного окисления органических соединений, в частности полиненасыщенных жирных кислот мембранных фосфолипидов.

К активным формам кислорода также относят оксид азота ( $\text{NO}^*$ ), пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ) и озон. Сведения о свойствах активных форм кислорода и их биологической роли представлены в табл. 12-1.

Таблица 12-1. Свойства и биологическая роль активных форм кислорода

Наименование	Обозначение	Биологическая роль
Супероксидный радикал	$\text{O}_2^*$	Мягкий окислитель/восстановитель с ограниченной биологической активностью; восстанавливает комплексы железа, способствуя, таким образом, образованию гидроксильного радикала в реакции Фентона; инактивирует железосерные белки; обладает небольшой способностью проникать через биологические мембраны
Гидроксильный радикал	$^*\text{OH}$	Короткоживущий радикал, обладающий исключительно высокой реакционной способностью, взаимодействует с большинством биологических макромолекул; вызывает модификацию ДНК и появление в ней разрывов, инактивирует ферменты, способствует перекисному окислению липидов
Синглетный кислород	$^1\text{O}_2$	Молекулярный кислород с более высокой энергией, чем в основном, триплетном состоянии; реагирует с рядом биологических молекул, включая мембранные липиды, инициируя перекисное окисление
Гипохлорная кислота	$\text{HOCl}$	Сильный окислитель нерадикальной природы, способный к избирательному (по сравнению с гидроксильным радикалом) взаимодействию с биологическими молекулами; предпочтительными мишенями его действия являются тиолы и тиоэфиры; превращает амины в хлорамины, хлорирует фенолы и соединения с ненасыщенными связями; вызывает поперечные сшивки в белках, проникает через биомембраны
Оксид азота	$\text{NO}^*$	Быстро реагирует с супероксидом с образованием пероксинитрита; образует комплексы с гемопroteинами; инактивирует железосерные центры и образует нитрозотиолы
Пероксинитрит	$\text{ONOO}^-$	Сильный короткоживущий окислитель, по свойствам схож с гидроксильным радикалом; осуществляет гидроксילирование и нитрование ароматических соединений, быстро реагирует с тиолами

## ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ

Перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот (ПОЛ) начинается с отщепления атома водорода от  $-CH_2-$ , расположенного между двойными связями с образованием радикала жирной кислоты ( $L^*$ ) (рис. 12-3). Образовавшийся свободный радикал  $\cdot CH_2$  присоединяет молекулу кислорода и превращается в пероксидный радикал жирной кислоты ( $LOO^*$ ). Этот свободный радикал атакует следующую интактную молекулу полиненасыщенной жирной кислоты ( $LH$ ), отщепляет  $H$  и способствует дальнейшему развитию процесса ПОЛ.

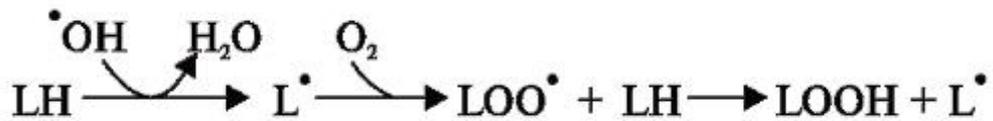
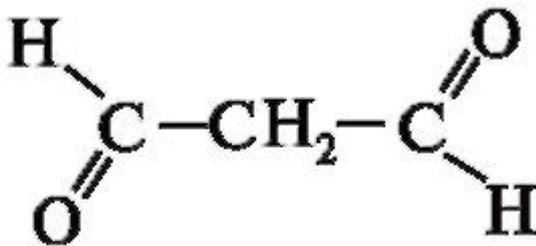


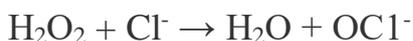
Рис. 12-3. Перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот

Пероксиды нестабильны и распадаются с образованием конечного продукта ПОЛ малонового диальдегида:



Помимо ПОЛ, активные формы кислорода вызывают химическую модификацию нуклеиновых кислот, белков, в первую очередь, сульфгидрильных групп ферментов.

Огедует отметить, что ряд свободнорадикальных реакций имеет особое значение для нормальной жизнедеятельности организма. Например, фагоцитирующие клетки активно выделяют супероксид, пероксид водорода и гидроксильные радикалы, которые оказывают бактерицидное действие. Нейтрофилы содержат фермент миелопероксидазу, катализирующий образование гипохлорит-аниона в реакции:



Гипохлорит-анион может окислять многие биологические молекулы, особенно SH-группы в них, и оказывать прямое токсическое действие на бактерии. Взаимодействие гипохлорит-аниона с пероксидом водорода в щелочной среде приводит к образованию синглетного кислорода:



*В записную книжку врача*

Применение активных форм кислорода в медицине

Для антибактериальной обработки ран и глубоких кариозных полостей применяют 0,2% раствор хлоргексидина и 3% раствор пероксида водорода. Эти препараты в химических реакциях образуют активные формы кислорода, в том числе гипохлорит. В стоматологической практике также нередко используют гидроксикарбамид и пероксид водорода для процедуры отбеливания зубов, которая основана на инициировании выделения атомарного кислорода из пероксидных соединений. В избыточных количествах указанные соединения могут оказывать повреждающее действие на эмаль, дентин и клетки пульпы зуба, что проявляется в виде микропористости твердых тканей и гиперстезии зубов.

## ЗАЩИТА ОТ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

Избыточное образование активных форм кислорода может быть губительным для клеток, поэтому в организме существует так называемая эшелонированная оборона от активных форм кислорода.

Ферменты-антиоксиданты. Существует несколько ферментов, катализирующих реакцию обезвреживания супероксид-аниона:



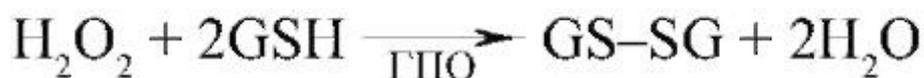
Наиболее активен фермент *супероксиддисмутаза (СОД)*. Различают цитозольную и митохондриальную формы СОД. Цитозольная СОД содержит в каталитическом центре ионы меди ( $\text{Cu}^{2+}$ ) и цинка ( $\text{Zn}^{2+}$ ), а в митохондриях присутствует магнийсодержащая ( $\text{Mg}^{2+}$ ) СОД.

Поскольку молекула пероксида водорода может быть предшественником \*ОН-радикалов, то клетка стремится контролировать количество H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В деградации молекул H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> участвуют несколько ферментов.

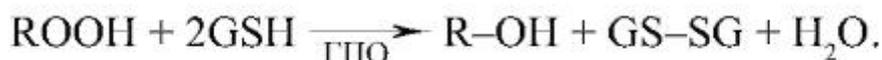
- *Каталаза* катализирует реакцию разложения пероксида водорода с образованием воды и молекулярного кислорода:



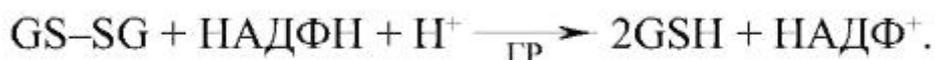
- *Глутатионпероксидазы* (ГПО) для утилизации пероксида водорода используют восстановленный глутатион (GSH):



Помимо пероксида водорода, ГПО может катализировать деградацию и других пероксидов (например, гидропероксиды линолевой и линоленовой кислот, прогестерон-17 $\alpha$ -гидропероксид), при этом восстанавливаются в спирты:



Окисленный глутатион (GS-SG) в следующей реакции восстанавливается при участии фермента глутатионредуктазы (ГР):



Неферментативные антиоксиданты. Неферментативная защита включает природные и синтетические комплексоны, связывающие металлы - этилендиаминтетрауксусная кислота, водорастворимые вещества - витамин С, мочевая кислота, ароматические амины, соединения содержащие сульфгидрильные группы, дипептиды - карнозин и анзерин; соединения, растворимые в липидной фазе, жирорастворимые витамины А и Е,  $\beta$ -каротин. *Секвестрация ионов металлов.* Ионы металлов с переменной валентностью участвуют во многих свободнорадикальных реакциях, способствуя образованию более реакционных молекул из менее реакционных (табл. 12-2).

Таблица 12-2. Роль металлов с переменной валентностью в образовании реакционных молекул

Исходное вещество	Металлы	Образуемые продукты
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fe/Cu	•OH
Пероксиды липидов	Fe/Cu	Перокси- и алкоксирадикалы, цитотоксические альдегиды
Тиолы (R-SH)	Fe/Cu	O <sub>2</sub> <sup>*</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , RS <sup>*</sup> , •OH
Аскорбиновая кислота	Fe и Cu	Семидегидроаскорбат

В связанном с белком состоянии эти металлы неактивны. Поэтому транспорт ионов металлов с переменной валентностью в плазме крови осуществляют специальные белки-переносчики. Белок-переносчик *трансферрин* насыщен железом всего на 20-30%, что сводит к нулю содержание в плазме крови ионизированного железа. Белок плазмы крови *гаптоглобин* связывается с гемоглобином. Такое комплексообразование предотвращает стимуляцию перекисного окисления липидов и образование гидроксильного радикала. Медьсодержащий белок плазмы крови *церулоплазмин* не только транспортирует медь, но и играет важную роль в метаболизме железа. Обладая ферроксидазной активностью, он окисляет двухвалентное железо в трехвалентное и таким образом ингибирует железозависимое ПОЛ. *Альбумин* может связывать ионы меди и тормозить медь-зависимое ПОЛ и образование •OH-радикалов. Взаимодействуя с NOCl, альбумин защищает нативный α<sub>1</sub>-антитрипсин - белковый ингибитор протеиназ плазмы крови.

В цитозоле многих клеток эукариот (особенно в печени, почках и кишке) присутствуют низкомолекулярные, богатые цистеином белки - *металлотioneины*, которые могут связывать ионы цинка, меди, кадмия, ртути.

*Витамин С*. Аскорбат быстро реагирует с



При взаимодействии с



он превращается в семидегидроаскорбат, который затем при участии дегидроаскорбатредуктазы и двух молекул восстановленного глутатиона восстанавливается.

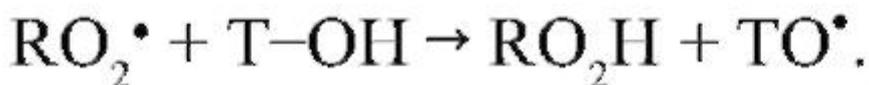
*Глутатион.* Помимо субстратной поддержки ферментов, метаболизирующих  $\text{H}_2\text{O}_2$  и восстанавливающих витамин С, глутатион может быть перехватчиком гидроксильных радикалов и синглетного кислорода. Благодаря высокой концентрации в клетке, восстановленный глутатион нередко участвует в восстановлении окисленных сульфгидрильных групп белков.

*Мочевая кислота.* Мочевая кислота является мощным перехватчиком

синглетного кислорода, пероксильных  $(\text{RO}_2\cdot)$  и гидроксильных  $\cdot\text{OH}$  радикалов. При ее взаимодействии с  $\cdot\text{OH}$  образуются пероксильные  $\cdot\text{OH}$  радикалы мочевой кислоты, которые менее активны, чем

*Витамин Е.* Витамин Е ( $\alpha$ -токоферол) присутствует во многих

биологических мембранах. Он реагирует с  $\cdot\text{OH}$ -радикалами и способен защищать мембраны от синглетного кислорода. Основное антиоксидантное действие токоферола (Т-ОН) - защита биологических мембран от ПОЛ, где он, выступая в качестве донора водорода, реагирует с перокси- и алкоксирадикалами липидов.



Это способствует прекращению цепной реакции ПОЛ, поскольку образуемый токоферильный радикал ( $\text{TO}\cdot$ ) не может продолжать свободнорадикальные цепные реакции.

*В записную книжку врача*

Роль восстановленного глутатиона

Нарушение синтеза GSH в клетках приводит к серьезным последствиям, таким, например, как гемолиз (распад эритроцитов). При избыточном образовании  $H_2O_2$  и гидроксильных радикалов может происходить накопление окисленного глутатиона (GS-SG). В отличие от GSH, окисленный глутатион может оказывать ряд нежелательных эффектов, таких, например, как окисление SH-групп ферментов.

### ЧАСТЬ III. ОСНОВНЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ.

## ГЛАВА 13. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Вопросы по теме

- Переваривание углеводов в желудочно-кишечном тракте.
- Аэробный и анаэробный распад глюкозы.
- Глюконеогенез.
- Обмен гликогена.
- Пентозофосфатный путь распада глюкозы.
- Обмен галактозы и фруктозы.
- Патология углеводного обмена.

### ПЕРЕВАРИВАНИЕ УГЛЕВОДОВ

На долю углеводов приходится около 75% массы пищевого суточного рациона (более 50% суточного количества необходимых организму калорий). При сбалансированном питании соотношение между поступающими с пищей белками, липидами и углеводами составляет 1:1:4. Обычно считают необходимым сохранять в пищевом рационе человека не менее 100 г углеводов. Главным углеводом, имеющим питательную ценность, является *крахмал*, большое количество которого содержат зерна пшеницы, риса, ячменя, ржи, кукурузы, а также клубни картофеля. В продуктах животного происхождения содержится его аналог - *гликоген*. С пищей поступают также полисахарид целлюлоза, дисахариды - сахароза, лактоза, мальтоза, а также небольшое количество глюкозы, фруктозы и других моносахаридов.

Переваривание в полости рта. В полости рта при участии  $\alpha$ -амилазы слюны молекулы крахмала и гликогена расщепляются по  $\alpha$ -(1-4)-гликозидным связям до олигосахаридов различной длины (декстринов). Поскольку оптимум pH этого фермента составляет 6,8-7,0, действие  $\alpha$ -амилазы слюны прекращается в желудке в ходе пропитывания пищевого комка желудочным соком.

Гидролиз углеводов в тонком кишечнике. Основным местом расщепления углеводов является тонкая кишка, где они гидролизуются  $\alpha$ -амилазой поджелудочной железы и содержащимися на поверхности энтероцитов кишечника различными дисахаридазами. Огонная и панкреатическая  $\alpha$ -амилаза расщепляют  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидные связи, но не гидролизуют  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-гликозидные связи в амилопектине. Дальнейший гидролиз  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидных связей в полисахаридах и декстринах приводит к высвобождению олигосахаридов, а именно трисахаридов (мальтотриозы) и дисахаридов - мальтозы и изомальтозы.

Гидролиз дисахаридов в кишечнике. Образующиеся в процессе расщепления полисахаридов мальтоза и изомальтоза, а также поступившие с пищей лактоза и сахароза гидролизуются специфическими дисахаридазами кишечника. Эти ферменты синтезируются в энтероцитах в виде белковых комплексов, которые пронизывают цитоплазматическую мембрану клеток и выступают в просвет кишечника. *Сахарозо-изомальтазный комплекс* гидролизует изомальтозу, мальтозу и мальтотриозу до остатков глюкозы, а сахарозу до глюкозы и фруктозы. *Гликоамилазный комплекс* расщепляет  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидные связи в олигосахаридах, а также мальтозе, т.е. действует как мальтаза.  *$\beta$ -Гликозидазный комплекс* (лактаза) гидролизует в лактозе  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидные связи между галактозой и глюкозой. Общая схема гидролиза углеводов представлена на рис. 13-1.

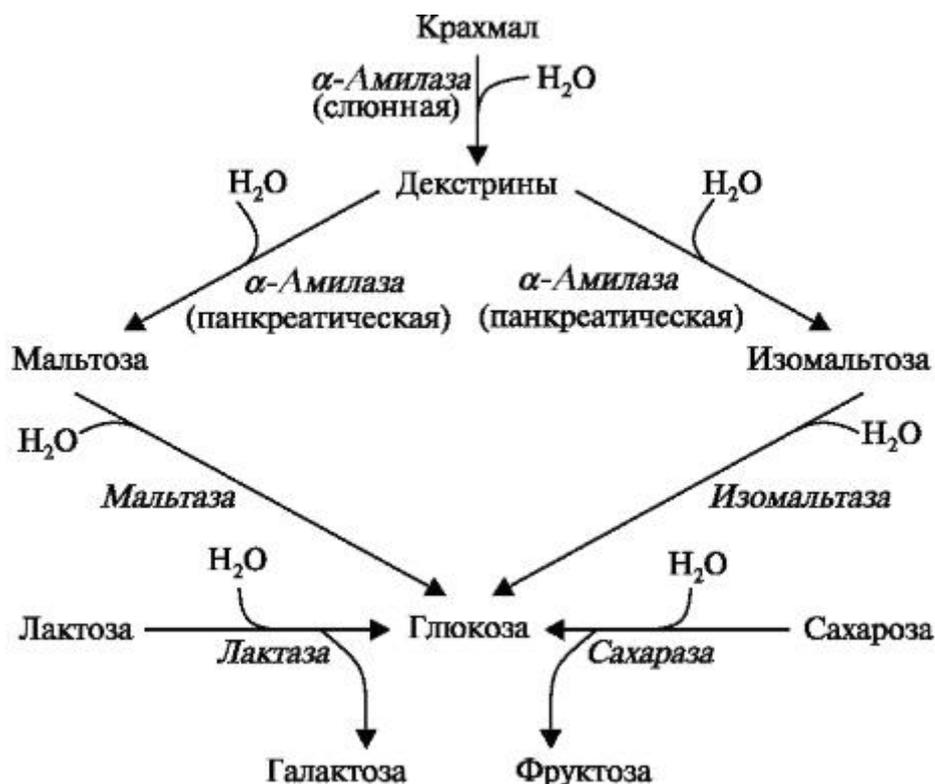


Рис. 13-1. Гидролиз поли- и олигосахаридов в желудочно-кишечном тракте (схема)

### В записную книжку врача Дисахаридозы

Врожденная или приобретенная недостаточная активность дисахаридаз приводит к нарушению переваривания ди- и олигосахаридов. Симптомы наследственных форм дефицита дисахаридаз проявляются уже после первых кормлений ребенка молоком или добавления в рацион сахарозы.

Приобретенные формы недостаточности дисахаридаз развиваются в результате снижения экспрессии фермента (например, лактазы) в онтогенезе, а также вследствие кишечных заболеваний. Нерасщепленные дисахариды, поступая в дистальные отделы кишечника, изменяют осмотическое давление содержимого кишечника. Они также подвергаются ферментативному гидролизу микроорганизмами с высвобождением органических кислот,  $\text{CO}_2$  и других газов. В результате увеличивается количество воды в кишечнике, усиливается перистальтика и развивается диарея.

### Всасывание моносахаридов в кишечнике

Моносахариды, образовавшиеся в процессе гидролиза биополимеров в кишечнике, всасываются и попадают в кровь. Если скорость всасывания глюкозы принять за 100%, то всасывание основных пищевых моносахаридов

можно расположить в следующем порядке: галактоза (110) > глюкоза (100) > фруктоза (43) > манноза (19) > ксилоза (15).

Манноза и пентозы проникают через эпителий только путем облегченной диффузии с участием специальных переносчиков. Перенос галактозы и глюкозы включает механизм вторично-активного транспорта, рассмотренный в главе 8.

Гидролиз углеводов в толстой кишке

В толстом кишечнике присутствует большое количество бактерий и целлюлоза гидролизуется бактериальными ферментами целлюлазой и целлобиазой (рис. 13-2).

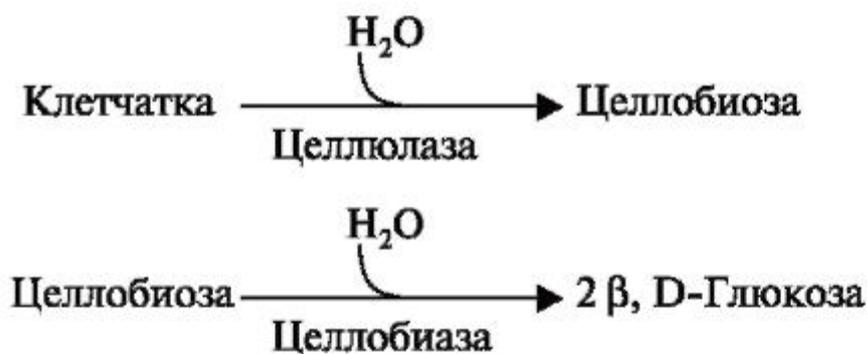


Рис. 13-2. Гидролиз клетчатки в толстой кишке

Следует отметить, что целлюлоза, хотя и не является источником глюкозы, выполняет ряд важных функций:

- как балластное вещество, придает пище дополнительный объем;
- способна связывать токсичные вещества и ионы в толстой кишке;
- участвует в формировании каловых масс.

Одна часть продуктов гидролиза целлюлозы всасывается, а другая расходуется на питание микроорганизмов. Целлюлоза также стимулирует перистальтику кишечника и секрецию пищеварительных соков и, таким образом, способствует пищеварению.

*В записную книжку врача*

Дефицит клетчатки в питании

Недостаточный прием с пищей целлюлозы может привести к развитию заболеваний прямой кишки, в том числе и рака. Для стимуляции перистальтики кишечника и профилактики развития рака прямой кишки в питание пациентов нередко вводят биологические добавки, содержащие большое количество целлюлозы.

#### Транспорт глюкозы в клетки

Концентрация глюкозы в плазме крови в норме составляет 3,35,5 ммоль/л. В цитоплазме большинства животных клеток содержание свободной глюкозы значительно меньше. Именно поэтому поступление глюкозы из крови в клетки осуществляется по градиенту концентрации при участии специальных белков-переносчиков ГЛЮТ (от англ. *GLU*ucose *Tran*sporter - транспортер глюкозы). Глюкоза связывается с полярным доменом транспортера на внешней стороне мембраны, после чего конформация белка изменяется и глюкоза оказывается связанной с белком в участке, обращенном внутрь клетки (см. рис. 8-3). Затем глюкоза отсоединяется от транспортера, переходя внутрь клетки.

В тканях человека известно пять типов транспортеров глюкозы.

- ГЛЮТ1 обнаружен в эритроцитах и клетках многих тканей. Он обеспечивает поступление глюкозы при небольших ее концентрациях в крови с относительно постоянной скоростью.
- ГЛЮТ2 присутствует в гепатоцитах, энтероцитах, проксимальных тубулярных клетках почек и  $\beta$ -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы. Он обеспечивает быстрый захват глюкозы клетками печени при высокой ее концентрации в плазме крови и стимулирует секрецию инсулина клетками поджелудочной железы.
- ГЛЮТ3 обнаружен во многих тканях, включая мозг, плаценту и почки. Обладает высоким сродством к глюкозе, что позволяет обеспечить ее поступление в мозг в условиях гипогликемии.
- ГЛЮТ4 содержится в инсулинозависимых тканях - мышечной и жировой. При отсутствии инсулина ГЛЮТ практически полностью находится в цитозольных везикулах (рис. 13-3а). Связывание инсулина с тирозинкиназным рецептором приводит к перемещению везикул к плазматической мембране, слиянию с ней и встраиванию транспортеров в

мембрану (рис. 13-3б). После этого возможен облегченный транспорт глюкозы в эти клетки (рис. 13-3в). При понижении концентрации инсулина в крови ГЛЮТ4 вновь перемещается в цитоплазму, и поступление глюкозы в клетку прекращается.

- ГЛЮТ5 синтезируется эпителиальными клетками кишечника и обеспечивает вторично-активный транспорт глюкозы, образовавшейся в результате переваривания углеводов.

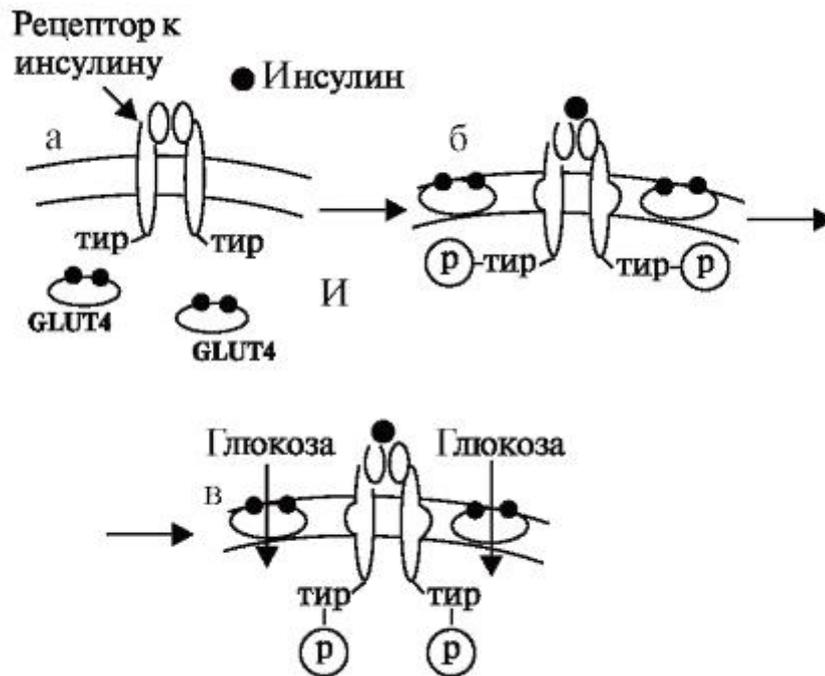


Рис. 13-3. Перемещение транспортера глюкозы (ГЛЮТ4) под влиянием инсулина из цитозоля к цитоплазматической мембране (а-в)

*В записную книжку врача*

Одна из причин сахарного диабета 2-го типа.

Наследственный дефект белков-транспортеров глюкозы может быть причиной развития сахарного диабета 2-го типа.

## ОБМЕН ГЛЮКОЗЫ В КЛЕТКАХ

### Общие пути превращения глюкозы в клетках

Поступившая в клетку глюкоза подвергается фосфорилированию с образованием глюкозо-6-фосфата. Донором фосфорильной группы в этой реакции является молекула АТФ.

Реакцию образования глюкозо-6-фосфата во всех тканях катализирует фермент гексокиназа. Он обладает высоким сродством к глюкозе ( $K_M < 0,1$  ммоль/л) и катализирует практически необратимую реакцию (рис. 13-4). В различных тканях организма существуют разные изоферменты гексокиназы. Они различаются по физико-химическим свойствам и все они ингибируются глюкозо-6-фосфатом. Гексокиназа способна также фосфорилировать не только глюкозу, но и другие гексозы - маннозу и фруктозу.



Рис. 13-4. Реакция фосфорилирования глюкозы

При увеличении в плазме крови концентрации глюкозы свыше 4 ммоль/л большое ее количество начинает поступать в печень, поэтому содержание глюкозы в гепатоцитах может превышать 10 ммоль. Это сопровождается увеличением активности другого печеночного фермента, фосфорилирующего глюкозу, - глюкокиназы. Она отличается от гексокиназы не только высоким значением  $K_M$  для глюкозы (около 10 ммоль/л), но и отсутствием ингибирования глюкозо-6-фосфатом.

Образование глюкозо-6-фосфата имеет большой биологический смысл. Мембраны клеток непроницаемы для отрицательно заряженной молекулы глюкозо-6-фосфата, что исключает выход последнего в кровь. Фосфорилирование также уменьшает количество свободной глюкозы в клетке, что способствует переносу ее новых порций через мембрану.

Глюкозо-6-фосфат - активная форма глюкозы, и именно в этом виде она вступает во все основные пути обмена (рис. 13-5).

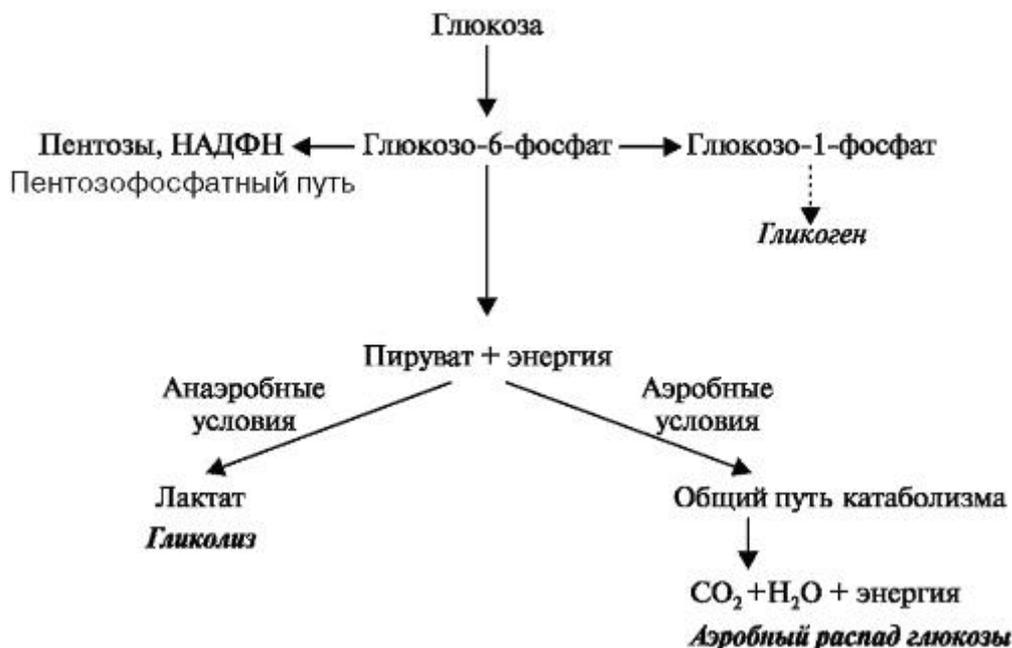


Рис. 13-5. Метаболические превращения глюкозо-6-фосфата в клетке (схема)  
Гликолиз

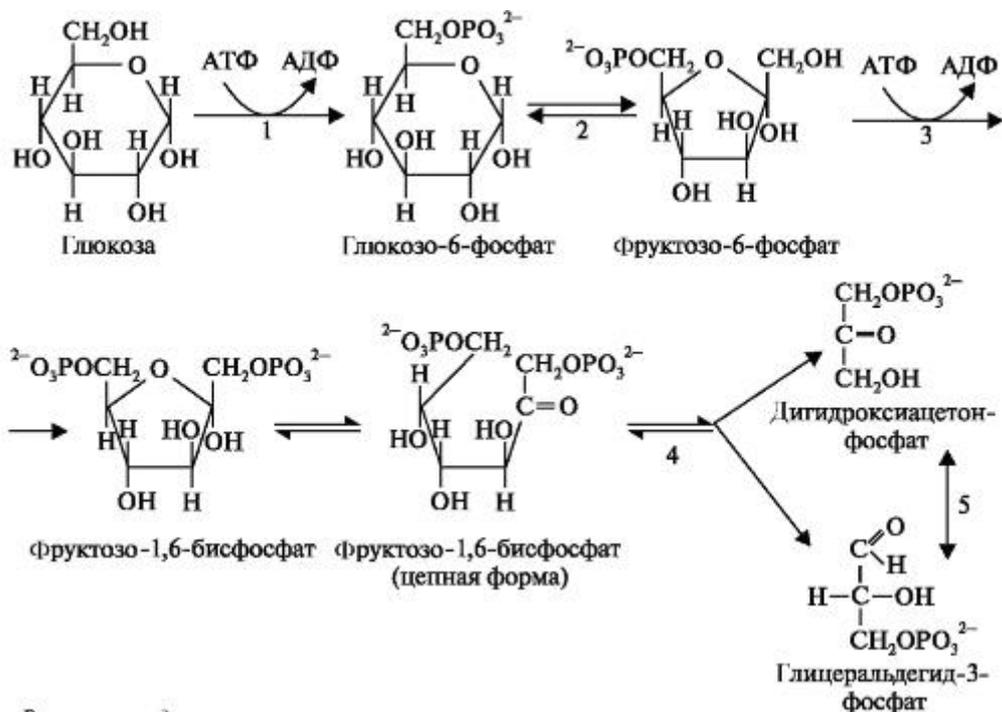
В растворимой части цитоплазмы клетки молекула глюкозо-6-фосфата подвергается расщеплению с высвобождением *двух молекул пировиноградной кислоты*.

В бескислородных (анаэробных) условиях молекулы пировиноградной кислоты восстанавливаются с образованием молочной кислоты. Этот процесс анаэробного расщепления глюкозы называют *гликолизом*. Гликолиз широко распространен в природе и играет важную роль в метаболизме живых организмов, поскольку обеспечивает клетку энергией в условиях недостаточного снабжения кислородом. У облигатных (анаэробных) микроорганизмов, а также в некоторых клетках животных и человека (например, в зрелых эритроцитах) гликолиз - единственный процесс, поставляющий энергию.

В аэробных условиях распад глюкозы до пирувата считается необходимой стадией для дальнейшего получения в матриксе митохондрий молекул ацетил-КоА, поступление которых в цикл трикарбоновых кислот и приводит к высвобождению основного количества энергии (см. главы 10, 11) и конечных продуктов метаболизма - *воды и углекислого газа*.

В процессе гликолиза выделяют две стадии (рис. 13-6).

*Первая стадия*



*Вторая стадия*

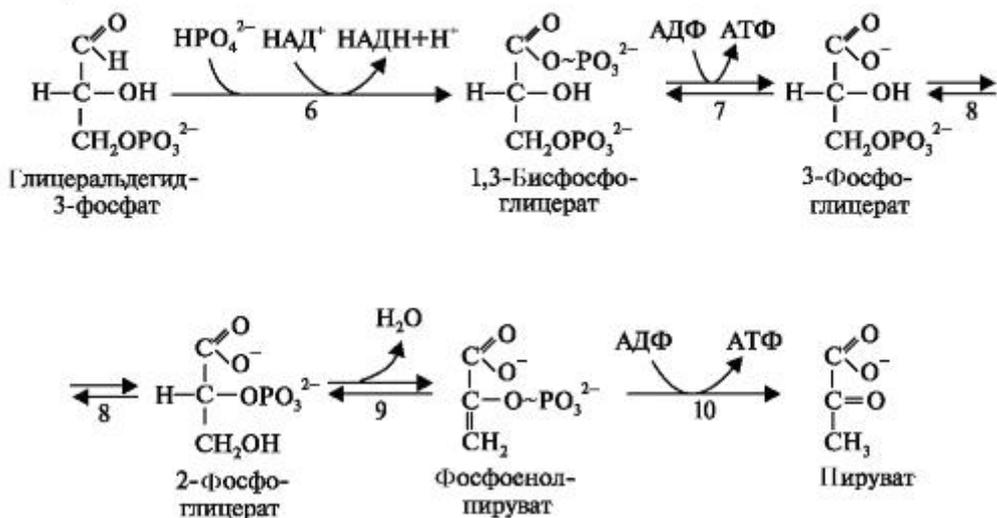


Рис. 13-6. Реакции гликолиза. Ферменты: 1 - гексокиназа; 2 - фосфогексоизомераза; 3 - фосфотриозкиназа I; 4 - фруктозо-1,6-бисфосфатальдолоаза; 5 - триозофосфатизомераза; 6 - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; 7 - фосфоглицераткиназа; 8 - фосфоглицератмутаза; 9 - енолаза; 10 - пируваткиназа

На *первой (подготовительной) стадии* после фосфорилирования глюкозы происходит последующая изомеризация образовавшейся молекулы глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат. Молекула фруктозо-6-фосфата в

следующей реакции подвергается фосфорилированию по первому атому углерода, и образующийся фруктозо-1,6-бисфосфат при участии фермента альдолазы расщепляется на две молекулы фосфотриоз: глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат. Дигидроксиацетонфосфат при участии триозофосфатизомеразы превращается в глицеральдегид-3-фосфат, поэтому первая фаза распада глюкозы заканчивается образованием из одной молекулы глюкозы двух молекул глицеральдегид-3-фосфата. На этой стадии затрачиваются две молекулы АТФ.

На *второй (основной) стадии* гликолиза две молекулы глицеральдегид-3-фосфата претерпевают серию последовательных превращений, в ходе которых образуются две молекулы пирувата (ионизированная форма пировиноградной кислоты), а выделяемая энергия запасается в виде АТФ. Сначала в реакции НАД<sup>+</sup>-зависимого окисления в присутствии неорганического фосфата глицеральдегид-3-фосфат превращается в 1,3-бисфосфоглицерат. Затем в реакции субстратного фосфорилирования происходит перенос фосфорильной группы с 1,3-бисфосфоглицерата на АДФ с образованием молекулы АТФ.

Продукт этой реакции - 3-фосфоглицерат в дальнейшем подвергается изомеризации в 2-фосфоглицерат. Далее в результате реакции дегидратации (отщепления молекулы воды) из 2-фосфоглицерата образуется фосфоенолпируват, фосфатная группа которого в процессе еще одной реакции субстратного фосфорилирования используется для образования АТФ. Всего на этом этапе в реакциях субстратного фосфорилирования образуется 4 молекулы АТФ, но за вычетом затраченных на подготовительном этапе двух молекул АТФ энергетическая ценность гликолиза оценивается в две молекулы АТФ.

Большинство реакций гликолиза обратимы. Исключение составляют реакции, катализируемые *гексокиназой*, *фосфофруктокиназой* и *пируваткиназой*. Наличие трех необратимых реакций обеспечивает протекание реакций гликолиза в одном направлении.

#### Гликолитическая оксидоредукция

Во второй стадии распада глюкозы в реакции окисления глицеральдегид-3-фосфата происходит восстановление молекулы НАД<sup>+</sup> до НАДН. Накопление НАДН в цитоплазме прерывает дальнейшие реакции распада глюкозы,

поскольку нарушается регенерация молекул окисленного НАД<sup>+</sup>, необходимых для окисления вновь образующихся молекул глицеральдегид-3-фосфата, а накопление протонов в цитоплазме сдвигает рН среды, что также сказывается на активности цитоплазматических ферментов. В анаэробных условиях образующиеся молекулы НАДН окисляются при участии фермента лактатдегидрогеназы (рис. 13-7).

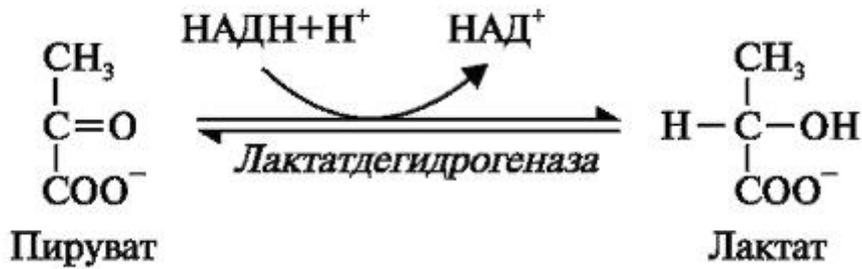


Рис. 13-7. Реакция окисления молекул НАДН

Совокупность двух окислительно-восстановительных реакций, протекающих в цитоплазме в процессе анаэробного распада глюкозы, называют *гликолитической оксидоредукцией* (рис. 13-8).

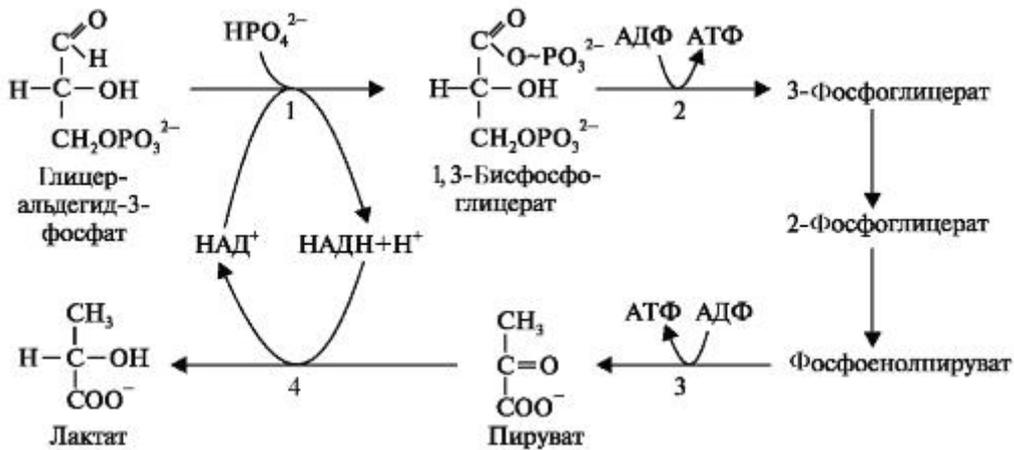


Рис. 13-8. Гликолитическая оксидоредукция. Ферменты: 1 - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; 2 - фосфоглицераткиназа; 3 - пируваткиназа; 4 - лактатдегидрогеназа

Образовавшиеся в анаэробных условиях гликолиза молекулы молочной кислоты проходят через цитоплазматическую мембрану и, покидая клетку, попадают в плазму крови.

Гликолитическая оксидоредукция при отсутствии кислорода не только обеспечивает регенерацию НАД<sup>+</sup> в цитоплазме и последующий распад

глюкозы в клетке, но и синтез молекул АТФ в реакциях субстратного фосфорилирования.

*В записную книжку врача*

Метаболизм углеводов в зубном налете

В ротовой полости присутствуют как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы, участвующие в формировании зубного налета. Количество поступающего кислорода в зубном налете по мере его роста уменьшается, а анаэробные сообщества микроорганизмов увеличиваются. Они содержат набор различных гликозидаз, расщепляющих олиго- и дисахариды. Высвобождаемая глюкоза распадается до молочной кислоты. Помимо лактата, в реакциях брожения из глюкозы образуются муравьиная, уксусная, пропионовая и другие кислоты. Накопление органических кислот в зубном налете приводит к локальному снижению рН на поверхности зуба. В водной среде накопление большого количества протонов, способных замещать кальций в структуре гидроксиапатита эмали, сопровождается разрушением кристаллов гидроксиапатитов, а затем и белковой матрицы. Это в конечном итоге ведет к деструкции твердых тканей зубов.

Аэробный распад глюкозы

Аэробный распад глюкозы - основной путь ее катаболизма. В этом процессе можно выделить следующие стадии:

- распад молекулы глюкозы до двух молекул пирувата в цитоплазме (эту стадию иногда также называют аэробным гликолизом);
- перенос молекул пировиноградной кислоты и восстановленных эквивалентов из цитоплазмы в матрикс митохондрий;
- окислительное декарбоксилирование пирувата в матриксе митохондрий с образованием ацетил-КоА и включение молекул ацетил-КоА в ЦТК;
- транспорт восстановительных эквивалентов от цитоплазматического и митохондриального НАДН и ФАДН<sub>2</sub> в дыхательную цепь.

В результате этих превращений в аэробных условиях молекула глюкозы распадается до СО<sub>2</sub> и эндогенной воды, а высвобождаемая энергия используется на синтез молекул АТФ. Общая схема аэробного распада глюкозы представлена на рис. 13-9.

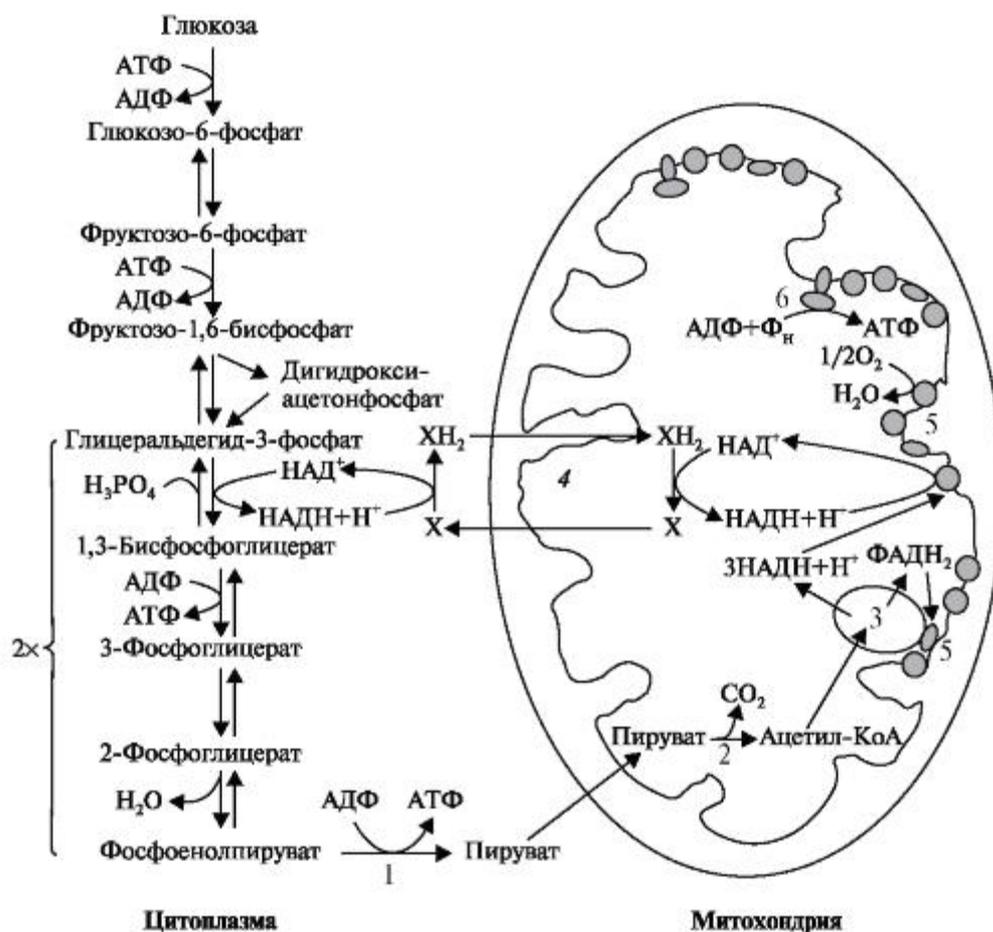


Рис. 13-9. Аэробный распад глюкозы (схема): 1 - распад глюкозы в цитоплазме; 2 - окислительное декарбоксилирование пирувата; 3 - цикл трикарбоновых кислот; 4 - челночный механизм; 5 - цепь переноса электронов; 6 - синтез АТФ в реакции окислительного фосфорилирования

### Окисление цитоплазматического НАДН. Челночные механизмы

Цитоплазматические молекулы НАДН в условиях обеспеченности кислородом окисляются путем переноса электронов в дыхательную цепь, расположенную во внутренней мембране митохондрий. Однако молекулы НАДН не могут самостоятельно проникнуть внутрь митохондрий, и поэтому для переноса электронов существуют две системы, которые функционируют с помощью специальных переносчиков, так называемых челноков. Челночная малатаспартатная система переносит атомы водорода от цитоплазматического НАДН к митохондриальному НАД<sup>+</sup>.

На первом этапе цитоплазматическая малатдегидрогеназа осуществляет реакцию НАДН-зависимого восстановления оксалоацетата в малат (реакция 1, рис. 13-10). Последний с помощью специального переносчика поступает в

матрикс митохондрий где окисляется митохондриальной малатдегидрогеназой с восстановлением уже митохондриального НАД (реакция 2, рис. 13-10), который и поступает в дыхательную цепь (см. главу 11). Молекула оксалоацетата также не может самостоятельно покинуть митохондрию, поэтому в ходе реакции трансаминирования она превращается в молекулу аспартата, а та в свою очередь с помощью переносчика *аспартат-глутамат-транслоказы* транспортируется в цитоплазму (реакции 3, 6, рис. 13-10). Поступивший в цитоплазму аспартат в следующей реакции трансаминирования превращается в оксалоацетат (реакция 4, рис. 13-10). Образующийся в матриксе митохондрий 2-оксоглутарат с помощью малат-2-оксоглутарат-транслоказы переносится в цитоплазму (реакция 5, рис. 13-10).

Митохондриальные мембраны



Рис. 13-10. Малат-аспартатный челночный механизм. Ферменты: 1 - малатдегидрогеназа цитоплазматическая; 2 - малатдегидрогеназа митохондриальная; 3 - аспартатаминотрансфераза митохондриальная; 4 - аспартатаминотрансфераза цитоплазматическая; 5 - малат-2-оксоглутарат-транслоказа; 6 - аспартат-глутамат-транслоказа

Малат-аспартатная челночная система наиболее активна в клетках *печени, почек и сердца*. Энергетическая ценность окисления цитоплазматического НАДН в этой системе составляет около трех молекул АТФ.

В скелетных мышцах и мозге функционирует *глицеролфосфат-ный челночный механизм*. При расщеплении молекулы фруктозо-

1,6-бисфосфата образуется молекула дигидроксиацетонфосфата, на которую при участии глицерол-3-фосфатдегидрогеназы от цитоплазматического НАДН передается водород. Образовавшийся глицерол-3-фосфат свободно проходит через внешнюю митохондриальную мембрану и достигает внутренней, где встроенная в мембрану ФАД-содержащая глицерол-3-фосфатдегидрогеназа передает атомы водорода от молекул глицерол-3-фосфата в митохондриальную цепь переноса электронов (рис. 13-11).

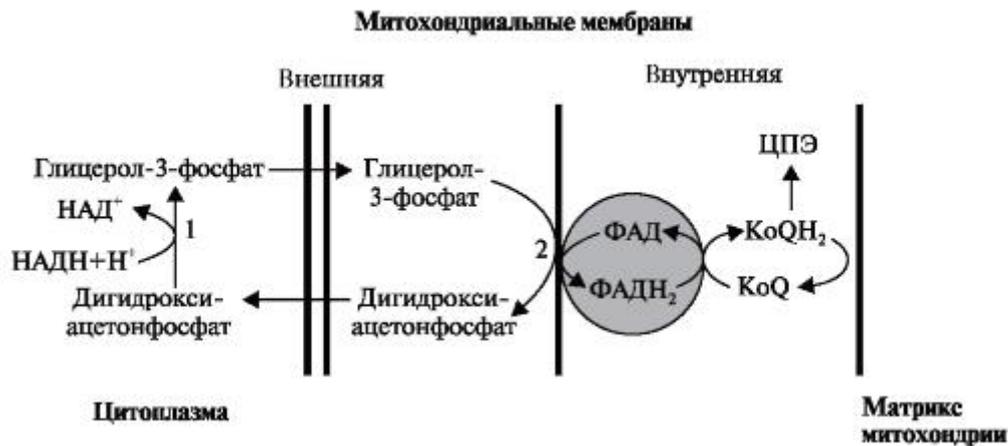


Рис. 13-11. Глицеролфосфатный челночный механизм (схема). Ферменты: 1 - глицерол-3-фосфатдегидрогеназа цитоплазматическая; 2 - глицерол-3-фосфатдегидрогеназа митохондриальная. ЦПЭ - цепь переноса электронов, включающая комплексы III и IV

Энергетическая эффективность аэробного распада глюкозы

Процесс аэробного распада глюкозы сопровождается высвобождением большого количества энергии (2880 кДж/моль), при этом только около 40% свободной энергии запасается в молекулах АТФ.

Большая часть энергии аккумулируется в молекулах НАДН и ФАДН<sub>2</sub>, которые затем отдают электроны в дыхательную цепь. Исходя из этого, основная часть молекул АТФ при аэробном распаде глюкозы образуется в реакции окислительного фосфорилирования и только 4 молекулы АТФ - в реакциях субстратного фосфорилирования. Данные о количестве АТФ, образовавшегося в процессе аэробного распада глюкозы, представлены в табл. 13-1.

Таблица 13-1. Количество АТФ, образуемого в процессе аэробного распада глюкозы

Реакции	Количество АТФ*, моль
Глюкоза - 2 пирувата. Субстратное фосфорилирование (4АДФ+4ФН)	4
Перенос электронов от цитоплазматического НАДН + Н <sup>+</sup> : малат-аспартатный челночный механизм, акцептор НАД <sup>+</sup> митохондриальный (3АДФ+3Ф <sub>н</sub> ) x 2 или глицеролфосфатный челночный механизм, акцептор убихинон (2АДФ + 2Ф <sub>н</sub> ) x 2	6 или 4
Окислительное декарбоксилирование пирувата: 2 пируват - 2 ацетил-КоА+СО <sub>2</sub> +2НАДН+2Н <sup>+</sup> (3АДФ+3Ф <sub>н</sub> ) x 2	6
Цитратный цикл: субстратное фосфорилирование (ГДФ+Ф <sub>н</sub> -ГТФ-АТФ) x 2; окислительное фосфорилирование (11 АДФ+11 Ф <sub>н</sub> ) x 2	2 22
Фосфорилирование глюкозы и фруктозо-6-фосфата	-2
Итого	38 или 36

\* Примечание. Количество АТФ рассчитано, исходя из того, что при окислении НАДН и ФАДН<sub>2</sub> в дыхательной цепи образуется 3 и 2 молекулы АТФ, соответственно.

Все реакции, связанные с синтезом АТФ, происходят после расщепления молекулы глюкозы на 2 молекулы фосфотриоз. Поэтому полученную величину следует умножать на 2, т.е. на 1 моль распадающейся глюкозы синтезируется около 40 или 38 моль АТФ (в зависимости от вида челночного механизма). В реакциях фосфорилирования глюкозы и фруктозо-6-фосфата затрачивается 2 моль АТФ. Таким образом, после их вычитания получается чистый выход - около 38 моль (36) АТФ на 1 моль глюкозы. Это максимально возможная эффективность использования высвобождаемой энергии при распаде глюкозы. Реальная же эффективность может быть существенно ниже (см. главу 11).

### ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ

Глюконеогенезом (от лат. neo - новый и genesis - образование) называют процесс биосинтеза новых молекул глюкозы из неуглеводных предшественников: пирувата, лактата, глицерола, аминокислот и

промежуточных метаболитов цитратного цикла, которые превращаются в оксалоацетат.

Мозг и мышцы, которым требуется очень много глюкозы, практически неспособны ее синтезировать, и большая часть реакций глюконеогенеза происходит в печени (90%) и корковом веществе почек (10%).

Синтезируемая в этих органах глюкоза выходит в кровь, а затем используется клетками мозга, сердечной, скелетных мышц, эритроцитами для своих метаболических нужд.

Исходным продуктом, из которого в ходе глюконеогенеза образуется глюкоза, является пируват. Последовательность превращений в глюконеогенезе противоположна гликолизу, поэтому эти два процесса включают ряд общих реакций, в которых участвуют одни и те же ферменты. Однако из-за трех необратимых реакций гликолиза в глюконеогенезе в обход их протекают другие реакции, свойственные только глюконеогенезу и катализируемые иными ферментами.

У млекопитающих глюконеогенез начинается в митохондриях с реакции АТФ-зависимого карбоксилирования пирувата, которую катализирует фермент *пируваткарбоксилаза*. Ее субстратами служат пируват, АТФ и бикарбонат, связанный с биотином - коферментом пируваткарбоксилазы (рис. 13-12).

**Матрикс митохондрии**

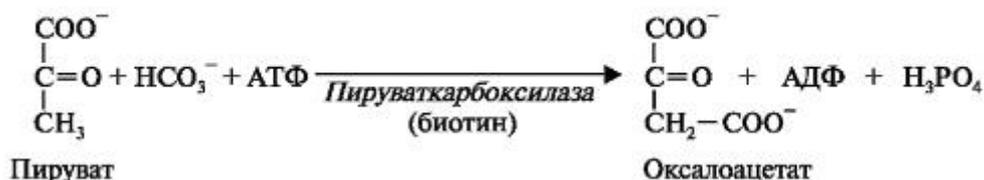


Рис. 13-12. Образование оксалоацетата в матриксе митохондрий

Образовавшийся в ходе этой реакции оксалоацетат превращается в малат, который затем транспортируется из матрикса митохондрий в цитозоль (рис. 13-13).

В цитоплазме под действием цитоплазматической малатдегидрогеназы происходит обратное превращение малата в оксалоацетат, а он, в свою очередь, при участии фосфоенолпируваткарбоксикиназы и ГТФ превращается в фосфоенолпируват (рис. 13-14).

Образование высокоэнергетического соединения фосфоенолпирувата в реакции карбоксилирования оксалоацетата необходимо для дальнейших реакций глюконеогенеза, в которых две молекулы фосфоенолпирувата в шести обратимых реакциях гликолиза превращаются во фруктозо-1,6-бисфосфат.

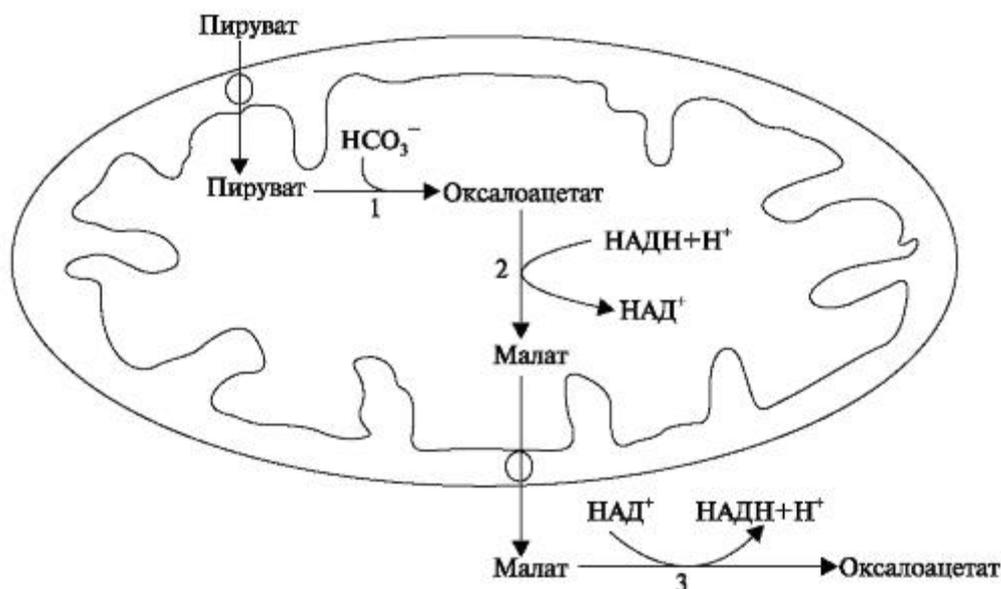


Рис. 13-13. Образование оксалоацетата в матриксе митохондрий и его транспорт в цитоплазму. Ферменты: 1 - пируваткарбоксилаза; 2 - малатдегидрогеназа митохондриальная; 3 - малатдегидрогеназа цитоплазматическая



Рис. 13-14. Реакция превращения оксалоацетата в фосфоенолпируват

Молекула фруктозо-1,6-бисфосфата при участии *фруктозо-1,6-бисфосфатазы* гидролизуетсся с образованием фруктозо-6-фосфата. Фруктозо-6-фосфат в еще одной обратимой реакции гликолиза изомеризуется в глюкозо-6-фосфат, из молекулы которого при участии глюкозо-6-фосфатазы высвобождается глюкоза (рис. 13-15а,б).

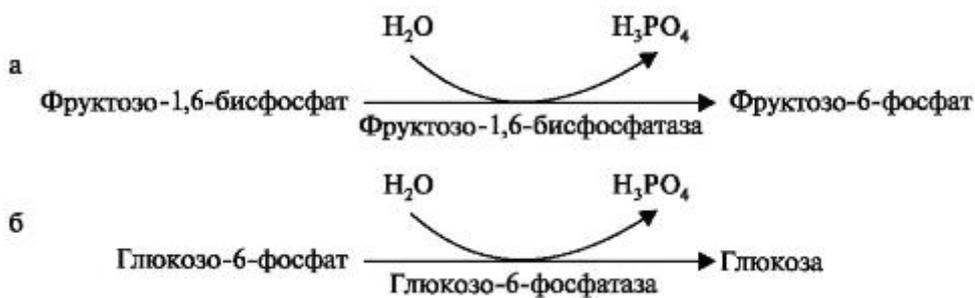


Рис. 13-15. Фосфатазные реакции в глюконеогенезе (а, б)

Глюкозо-6-фосфатаза локализована в мембране ЭПР клеток печени и почек. Высвободившиеся молекулы глюкозы в ЭПР упаковываются в везикулы, которые доставляются к плазматической мембране. В плазматической мембране везикула растворяется и глюкоза высвобождается в кровоток (рис. 13-16).

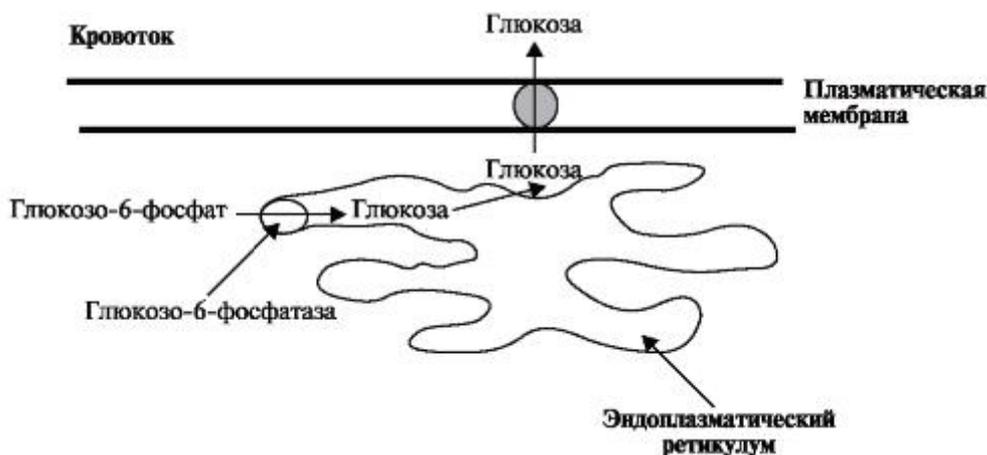
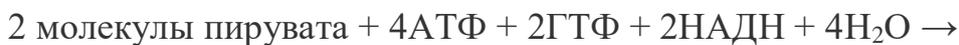


Рис. 13-16. Превращение глюкозо-6-фосфата в глюкозу в эндоплазматическом ретикулуме, транспорт глюкозы в кровоток

Суммарно процесс глюконеогенеза можно описать следующим образом:



Из приведенной суммарной реакции следует, что на синтез одной молекулы глюкозы из пирувата затрачивается молекулы АТФ и 2 молекулы ГТФ.

Синтез глюкозы из лактата

В интенсивно работающей мышце при недостаточном поступлении кислорода основным источником молекул АТФ становится гликолиз. Образовавшийся в гликолизе цитоплазматический НАДН окисляется в

лактатдегидрогеназной реакции. Лактат из мышц поступает в кровь и захватывается печенью, где большая часть превращается вначале в пируват, а затем в глюкозу. Образованная в печени глюкоза током крови возвращается в работающую мышцу. Этот процесс получил название *глюкозо-лактатного цикла*, или *цикла Кори*, названного по имени супругов Кори, его открывших. Суммарный процесс образования глюкозы из лактата выглядит следующим образом (рис. 13-17).

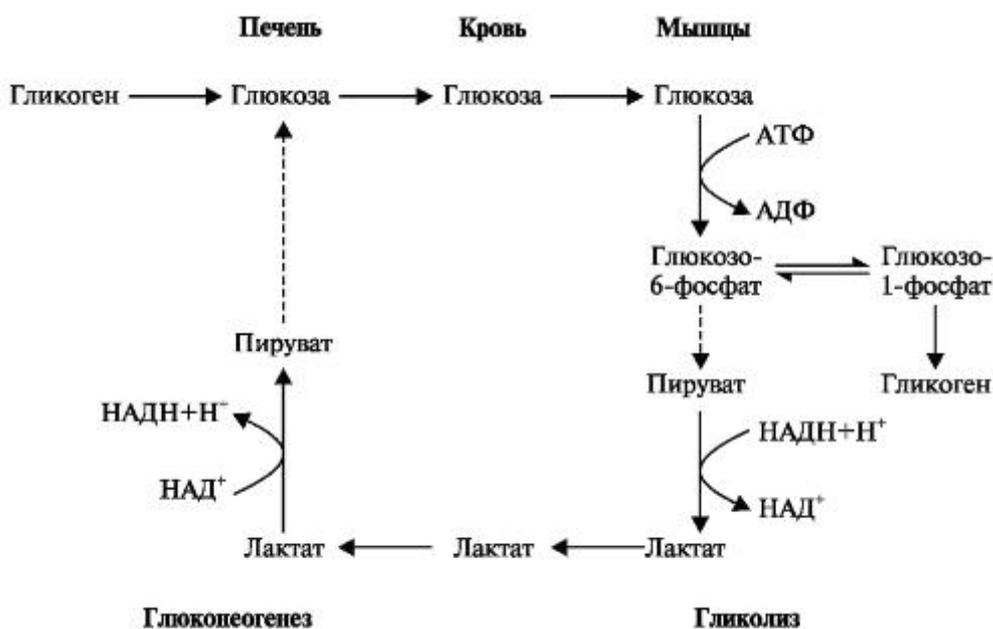


Рис. 13-17. Цикл Кори

Цикл Кори считают адаптационно-приспособительным механизмом, который в анаэробных условиях позволяет защитить мышечные клетки от накопления в них восстановительных эквивалентов и лактата, а также обеспечить их новыми молекулами глюкозы для получения АТФ.

#### Синтез глюкозы из аланина

После истощения запасов гликогена в работающих мышцах основным источником пирувата становятся аминокислоты. Большая часть этих аминокислот представлена аланином.

Аланин покидает клетки и током крови доставляется в печень, где при участии аланинаминотрансферазы превращается в пируват, а из него синтезируется глюкоза. Глюкоза из гепатоцитов с током крови возвращается в мышцы. Этот процесс называют *глюкозо-аланиновым циклом* (рис. 13-18).



Рис. 13-18. Глюкозо-аланиновый цикл. ОПК - общие пути катаболизма (окислительное декарбоксилирование пирувата, ЦТК и дыхательная цепь)

### Синтез глюкозы из глицерола

При внутриклеточном гидролизе ТАГ помимо жирных кислот в кровь транспортируются молекулы глицерола. Поступивший в клетки печени глицерол фосфорилируется при участии глицеролкиназы до глицерол-3-фосфата, который затем окисляется до дигидроксиацетонфосфата. Часть образовавшихся молекул дигидроксиацетонфосфата с помощью триозофосфатизомеразы превращается в глицеральдегид-3-фосфат. Соединение молекул дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата в реакции, катализируемой альдозазой, сопровождается образованием фруктозо-1,6-бисфосфата, молекула которого в последующем превращается в глюкозу (рис. 13-19).

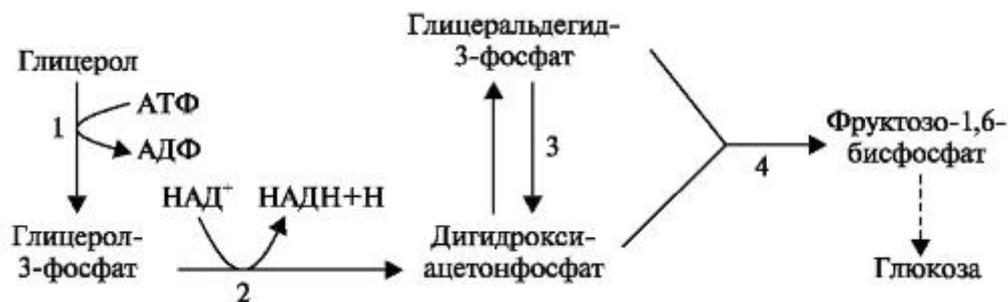


Рис. 13-19. Синтез глюкозы из глицерола. Ферменты: 1 - глицеролкиназа; 2 - глицерол-3-фосфатдегидрогеназа; 3 - триозофосфатизомераза; 4 - альдозаза

Аминокислоты и глицерол для синтеза глюкозы используются в основном при голодании. Образовавшаяся молекула глюкозы поступает преимущественно в мозг и эритроциты. Другие ткани получают энергию за счет окисления жирных кислот.

### Регуляция гликолиза и глюконеогенеза

Почти все реакции гликолиза и глюконеогенеза протекают в цитозоле, и без соответствующего метаболического контроля эти два процесса будут происходить одновременно со значительным и бесполезным расходом АТФ. Именно поэтому в случае уменьшения энергии активируется распад глюкозы (гликолиз), и наоборот, при увеличении молекул АТФ пируват и другие метаболиты начинают превращаться в клетках печени и коры почек в ходе глюконеогенеза в глюкозу.

В печени регулируются оба процесса, а в других тканях - только гликолиз.

Лимитирующей скоростью гликолиза является реакция, которую катализирует фосфофруктокиназа I. Активность этого фермента стимулируют фруктозо-2,6-бисфосфат, АМФ и НАД<sup>+</sup>, а тормозят - АТФ и цитрат. Пируваткиназу аллостерически ингибирует фруктозо-1,6-бисфосфат, количество которого увеличивается в клетке после приема пищи.

В роли главного аллостерического регулятора гликолиза и глюконеогенеза выступает фруктозо-2,6-бисфосфат. Уровень фруктозо-2,6-бисфосфата контролирует бифункциональный фермент (БИФ), который обладает двумя активностями: киназной (фосфофруктокиназа II) и гидролазной (фруктозо-2,6-бисфосфатаза) (рис. 13-20).

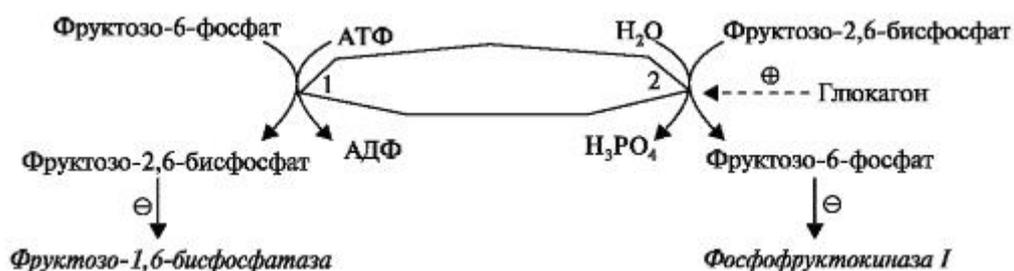


Рис. 13-20. Образование и распад фруктозо-2,6-бисфосфата при участии бифункционального фермента: 1 - фосфофруктокиназа II; 2 - фруктозо-2,6-бисфосфатаза

Фруктозо-2,6-бисфосфатазная активность БИФ проявляется, когда фермент находится в фосфорилированной форме. И наоборот, фосфофруктокиназная активность характерна для дефосфорилированной формы. Таким образом, в зависимости от состояния фермента (фосфорилированного и дефосфорилированного) одна из двух каталитических активностей оказывается заторможенной.

В случае уменьшения количества глюкозы глюкагон (гормон, секретируемый  $\alpha$ -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы) через систему внутриклеточной сигнализации, включающую образование циклического аденозин-3',5'-монофосфата, активирует протеинкиназу А, которая осуществляет фосфорилирование БИФ

(рис. 13-21).

Активная фруктозо-2,6-бисфосфатаза расщепляет фруктозо-2,6-бисфосфат до фруктозо-6-фосфата, который, в свою очередь аллостерически ингибирует фосфофруктокиназу I. В результате реакции гликолиза замедляются, а глюконеогенеза активируются.

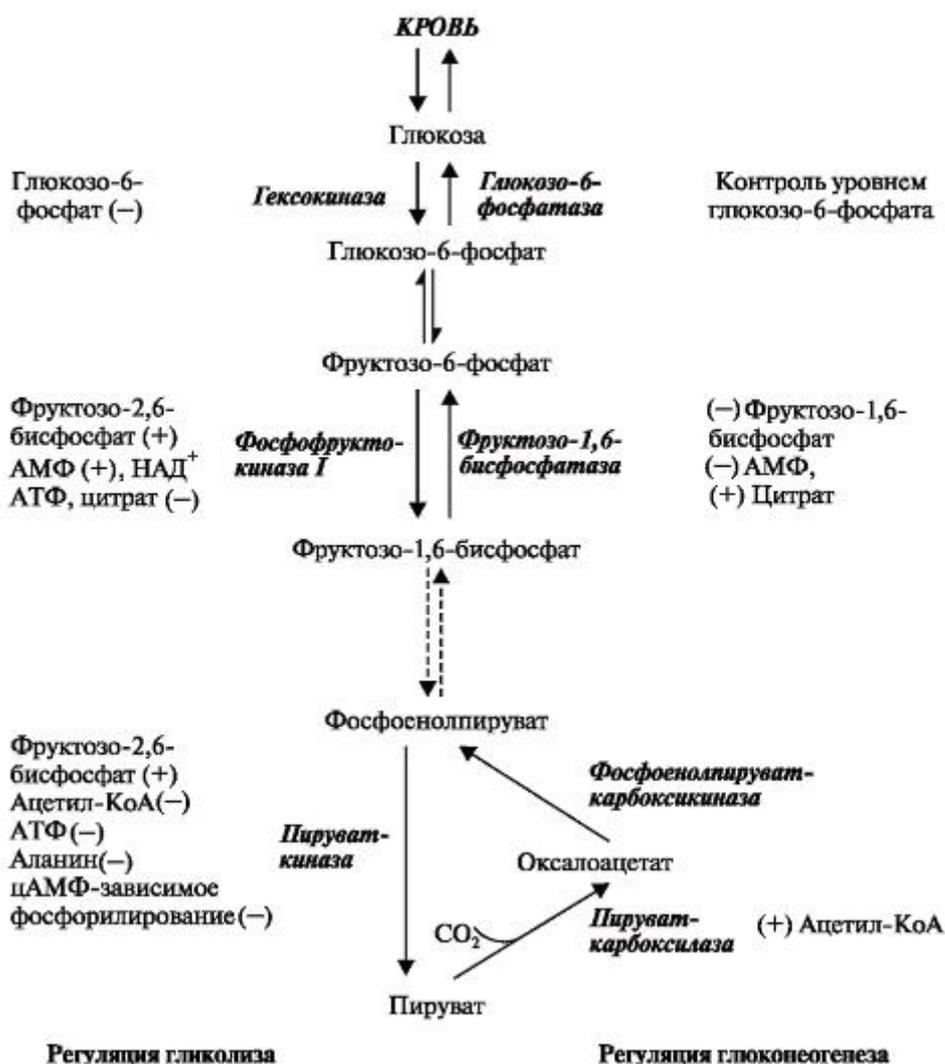


Рис. 13-21. Основные механизмы регуляции гликолиза и глюконеогенеза в печени: «+» - активация; «-» - ингибирование

Глюкагон и катехоламины оказывают разное действие на гепатоциты и мышечные клетки. Они не влияют на активность ферментов гликолиза в мышцах, а в печени через образование неактивной фосфорилированной формы пируваткиназы ингибируют гликолиз, при этом реакции глюконеогенеза активируются.

В роли главного аллостерического регулятора гликолиза и глюконеогенеза выступает фруктозо-2,6-бисфосфат. Уровень фруктозо-2,6-бисфосфата контролирует бифункциональный фермент (БИФ), который обладает двумя активностями: киназной (фосфофруктокиназа II) и гидролазной (фруктозо-2,6-бисфосфатаза) (рис. 13-20).

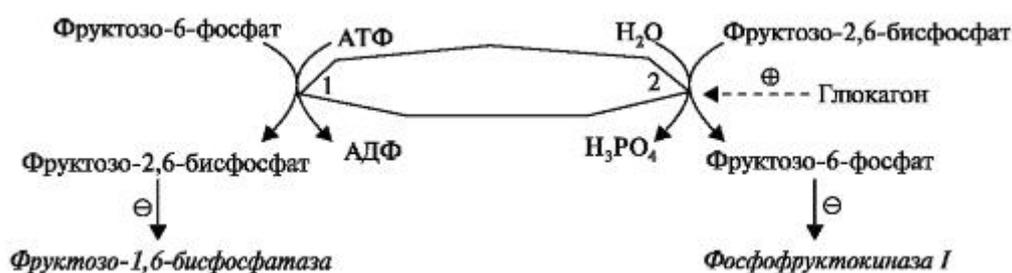


Рис. 13-20. Образование и распад фруктозо-2,6-бисфосфата при участии бифункционального фермента: 1 - фосфофруктокиназа II; 2 - фруктозо-2,6-бисфосфатаза

Фруктозо-2,6-бисфосфатазная активность БИФ проявляется, когда фермент находится в фосфорилированной форме. И наоборот, фосфофруктокиназная активность характерна для дефосфорилированной формы. Таким образом, в зависимости от состояния фермента (фосфорилированного и дефосфорилированного) одна из двух каталитических активностей оказывается заторможенной.

В случае уменьшения количества глюкозы глюкагон (гормон, секретируемый  $\alpha$ -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы) через систему внутриклеточной сигнализации, включающую образование циклического аденозин-3',5'-монофосфата, активирует протеинкиназу A, которая осуществляет фосфорилирование БИФ

(рис. 13-21).

Активная фруктозо-2,6-бисфосфатаза расщепляет фруктозо-2,6-бисфосфат до фруктозо-6-фосфата, который, в свою очередь аллостерически ингибирует

фосфофруктокиназу I. В результате реакции гликолиза замедляются, а глюконеогенеза активируются.

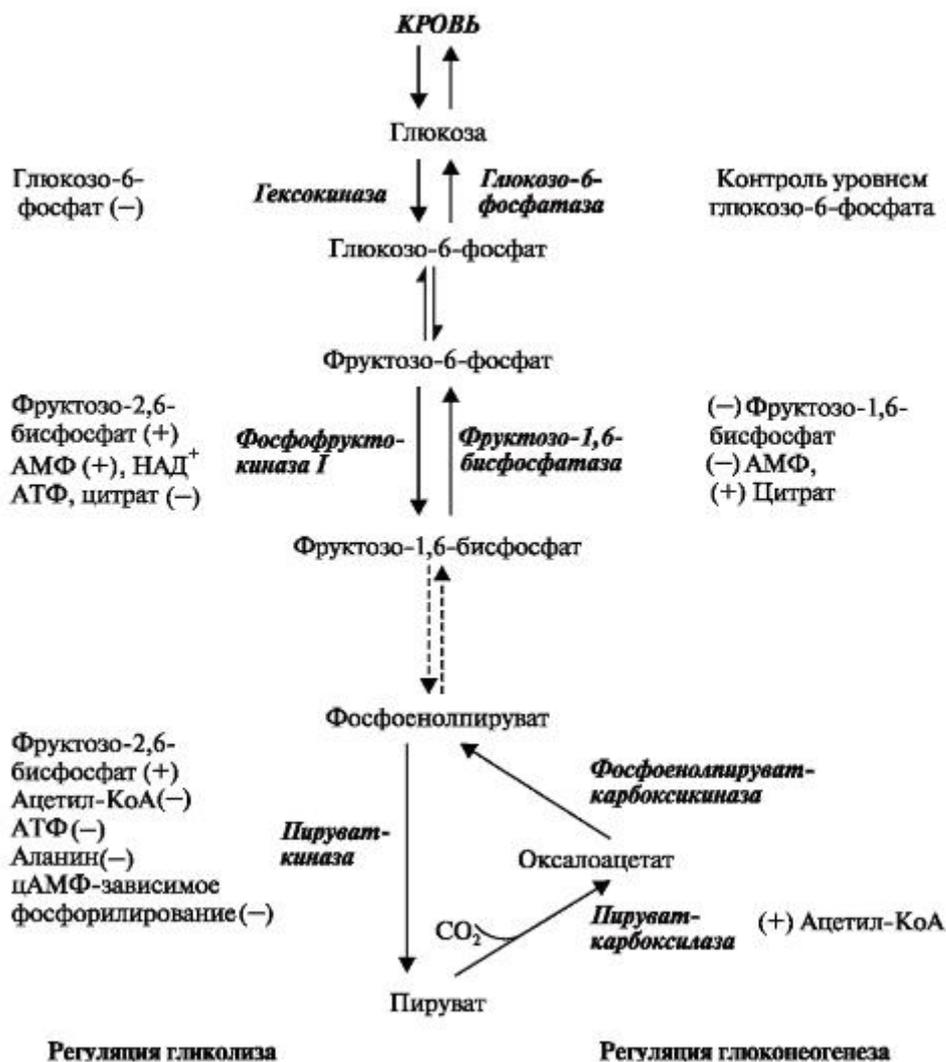


Рис. 13-21. Основные механизмы регуляции гликолиза и глюконеогенеза в печени: «+» - активация; «-» - ингибирование

*Глюкагон* и *катехоламины* оказывают разное действие на гепатоциты и мышечные клетки. Они не влияют на активность ферментов гликолиза в мышцах, а в печени через образование неактивной фосфорилированной формы пируваткиназы ингибируют гликолиз, при этом реакции глюконеогенеза активируются.

Другой гормон - *инсулин*, секретируемый  $\beta$ -клетками поджелудочной железы, активирует фермент протеинфосфатазу, при участии которой происходят дефосфорилирование БИФ и активация фосфофруктокиназы II, что сопровождается увеличением количества фруктозо-2,6-бисфосфата. Молекулы фруктозо-2,6-бисфосфата ингибируют фруктозо-1,6-бисфосфатазу

и активируют фосфофруктокиназу I, т.е. реакции глюконеогенеза тормозятся и включается гликолитический процесс. Этому также способствует образование активной (дефосфорилированной) формы пируваткиназы.

Не менее важным аллостерическим регулятором гликолиза и глюконеогенеза является ацетил-КоА, который ингибирует фермент *пируваткиназу* и активирует *пируваткарбоксилазу*. Ацетил-КоА также ингибирует *пируватдегидрогеназу* - фермент пируватдегидрогеназного комплекса, участвующего в окислительном декарбоксилировании пирувата (см. главу 10). Именно поэтому метаболическая судьба ацетил-КоА зависит от уровня этого метаболита.

Метаболические превращения оксалоацетата, образовавшегося из пирувата в коде гликолиза, в свою очередь, определяются количеством АТФ в клетке. При понижении уровня АТФ оксалоацетат включается в ЦТК, и наоборот, при накоплении АТФ оксалоацетат используется в реакциях глюконеогенеза. Одновременно высокий уровень АТФ ингибирует ключевые ферменты гликолиза: *фосфофруктокиназу I* и *пируваткиназу*.

С увеличением количества АТФ цикл трикарбоновых кислот замедляется и происходит накопление цитрата. Последний выходит в цитоплазму и аллостерически ингибирует фосфофруктокиназу I, что приводит к снижению скорости гликолиза. Увеличение концентрации цитрата в клетке сигнализирует о том, что при уменьшении активности ЦТК пируват должен использоваться либо в реакциях глюконеогенеза, либо окислительного декарбоксилирования. Образующиеся при этом молекулы ацетил-КоА используются в печени для синтеза липидов.

#### Распад гликогена

При понижении содержания глюкозы в крови, стрессе, мышечной работе и других состояниях, когда клеткам необходима энергия, начинается распад гликогена. Большая его часть расщепляется в реакции *фосфоролиза*. Эта реакция протекает при участии гликогенфосфорилазы, которая катализирует разрыв  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидных связей нередуцирующих концов линейных участков гликогена путем присоединения молекул неорганического фосфата (рис. 13-24). Когда ветвь гликогена укорачивается до четырех остатков глюкозы, фрагмент из трех молекул глюкозы под

действием *гликогендеветвящего* фермента переносится на концевой остаток глюкозы другой, более длинной цепи.

Затем этот же фермент гидролизует  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-гликозидную связь в точке ветвления с высвобождением остатка свободной глюкозы, т.е. деветвящий фермент обладает двумя активностями - олиго-( $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 или  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6)-трансферазной и  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-гликозидазной.

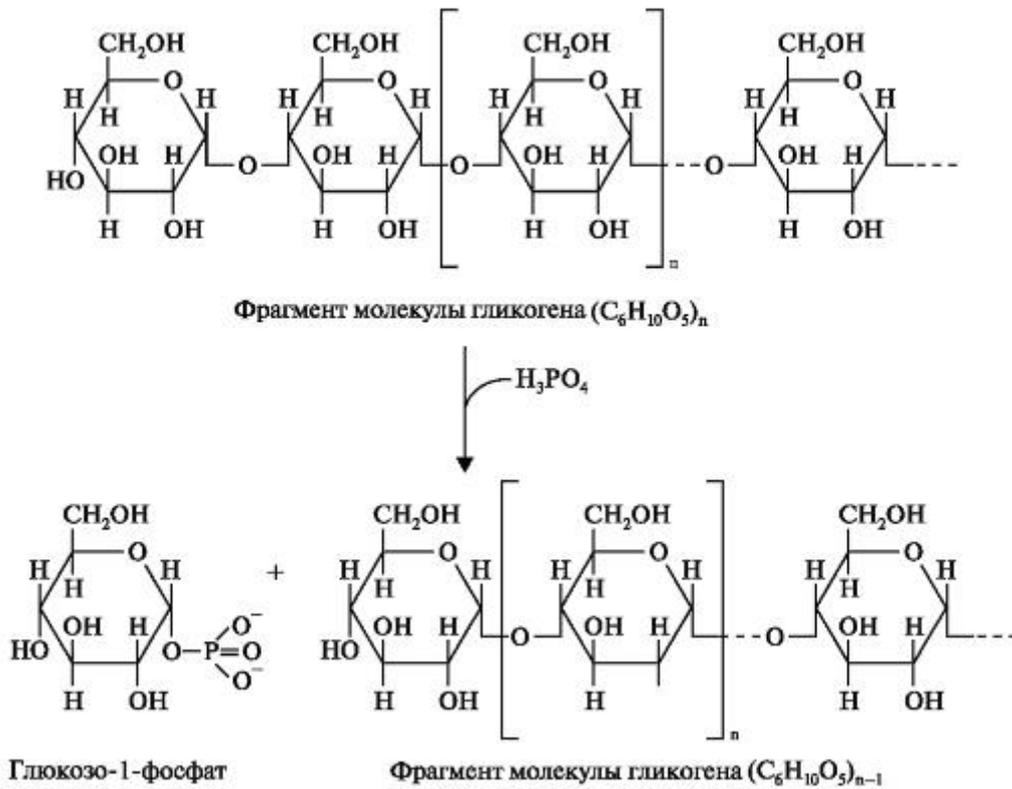


Рис. 13-24. Распад гликогена до молекул глюкозо-1-фосфата

Молекула глюкозо-1-фосфата, образовавшаяся при фосфоролитическом расщеплении гликогена, при участии фермента фосфоглюкомутазы, превращается в глюкозо-6-фосфат. В свою очередь, молекула глюкозо-6-фосфата включается в реакции гликолиза или превращается в свободную глюкозу. Процесс высвобождения в печени глюкозы из гликогена еще называют *мобилизацией* гликогена (рис. 13-25).

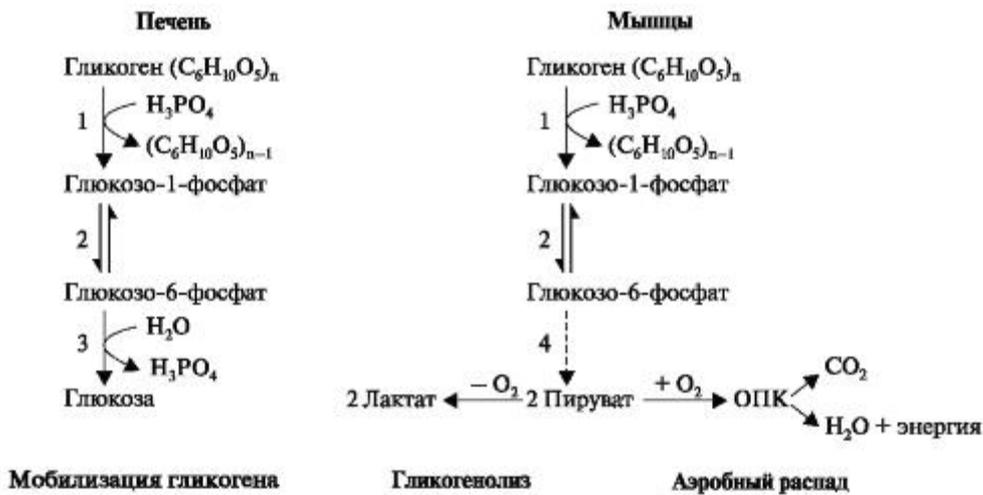


Рис. 13-25. Распад гликогена в печени и мышцах. Ферменты: 1 - гликогенфосфорилаза; 2 - фосфоглюкомутаза; 3 - глюкозо-6-фосфатаза; 4 - последовательность реакций гликолиза, ведущих к образованию пирувата. ОПК - общий путь катаболизма

Голодание в течение 24 ч сопровождается практически полным исчезновением гликогена в клетках печени. В мышцах, клетках мозга, где отсутствует глюкозо-6-фосфатаза, глюкозо-6-фосфат используется только в реакциях метаболизма глюкозы. Распад гликогена в анаэробных условиях называют еще *гликогенолизом*.

Меньшая часть гликогена может распадаться гидролитическим путем с участием лизосомного фермента *α-гликозидазы*.

Регуляция синтеза и распада гликогена

Гликоген является важным энергетическим резервом и источником глюкозы для метаболических нужд организма. Именно поэтому синтез и распад гликогена тщательно контролируются. Контроль за метаболизмом гликогена осуществляется через реципрокную регуляцию активности гликогенфосфорилазы и гликогенсинтазы, при этом активация гликогенфосфорилазы тесно связана с ингибированием гликогенсинтазы, и наоборот.

*Гликогенфосфорилаза* - первый фермент распада гликогена - существует в двух формах, одна из которых (фосфорилаза *a*) активна, а другая (фосфорилаза *b*) - неактивна. Ингибируют активность гликогенфосфорилазы (как в мышцах, так и в печени) АТФ и глюкозо-6-фосфат. Неактивная фосфорилаза *b* частично активируется АМФ, действующим в качестве

аллостерического эффектора. Превращение гликогенфосфорилазы *b* в активную гликогенфосфорилазу *a* осуществляется фосфорилированием этого белка в реакции, катализируемой ферментом киназой фосфорилазы *b* (рис. 13-26).

Гормон (глюкагон, адреналин)

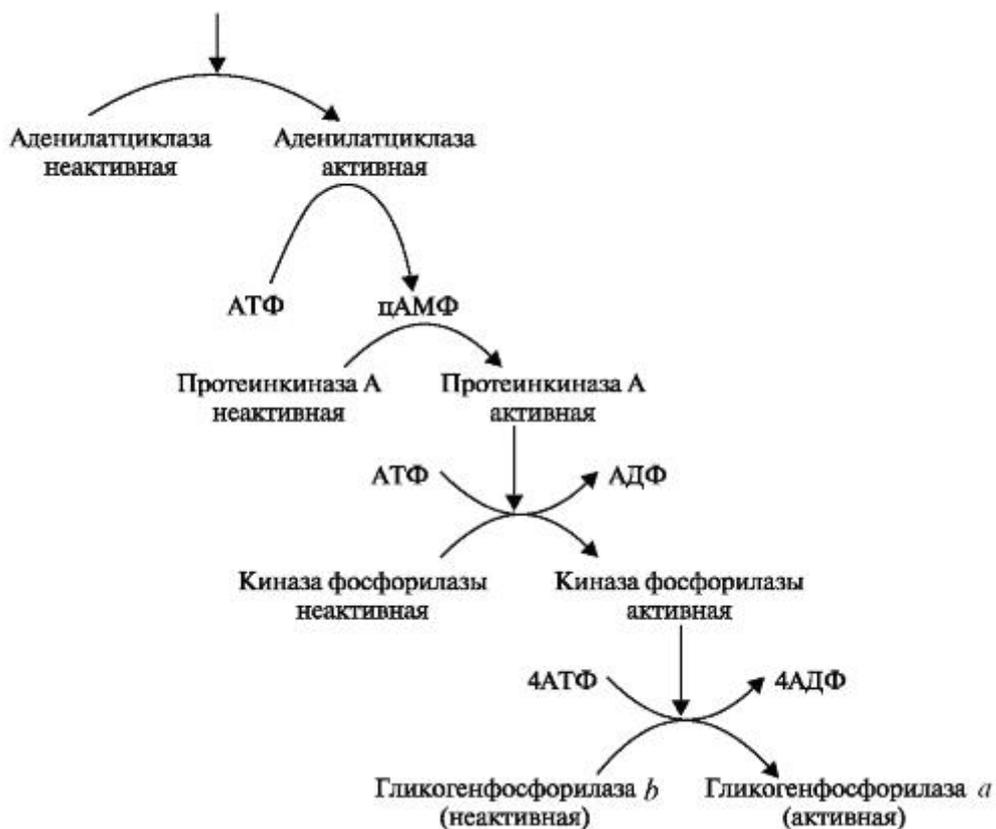


Рис. 13-26. Каскадный механизм регуляции гликогенфосфорилазы

Гормоны (глюкагон или адреналин), связываясь со своими рецепторами, стимулируют аденилатциклазу; это приводит к увеличению уровня цАМФ, который, активируя протеинкиназу А, запускает каскад реакций фосфорилирования с образованием множества активных молекул гликогенфосфорилазы.

В регуляции гликогенолиза в скелетной мышце также участвуют ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , которые, образуя комплекс с белком кальмодулином, активируют киназу гликогенфосфорилазы. Такая многоуровневая активация гликогенфосфорилазы в скелетных мышцах обеспечивает быстрое образование молекул АТФ, необходимых для мышечного сокращения.

Поскольку реакции неокислительной части обратимы, то молекула рибозо-5-фосфата может быть получена из промежуточных продуктов гликолиза - фруктозо-6-фосфата и глицеральдегид-3-фосфата. Образовавшийся рибозо-5-фосфат используется в синтезе нуклеотидов, являющихся составными частями нуклеиновых кислот, нуклеотидных коферментов и макроэргов - АТФ и ГТФ.

Восстановленный в ходе окисления глюкозы НАДФ используется в восстановительных реакциях синтеза жирных кислот, холестерина и других соединений. Кроме того, молекулы НАДФН необходимы для реакций обезвреживания ряда токсичных веществ, получения пероксида водорода, при фагоцитозе (см. главу 12).

## ОБМЕН ДРУГИХ МОНОСАХАРИДОВ

Наряду с глюкозой из кишечника по воротной вене в печень поступают и другие моносахариды, преимущественно фруктоза и галактоза. В печени галактоза и фруктоза при участии галактокиназы и фруктокиназы, соответственно фосфорилируются по первому углеродному атому и превращаются в *галактозо-1-фосфат* и *фруктозо-1-фосфат*.

### Обмен фруктозы

Фосфорилированная в печеночных клетках молекула фруктозы под действием фруктозо-1-фосфатальдолазы расщепляется на дигидроксиацетонфосфат и глицериновый альдегид, который затем фосфорилируется глицеральдегидкиназой (рис. 13-30).

В дальнейшем образованные триозофосфаты метаболизируются в реакциях либо гликолиза, либо глюконеогенеза.

В кровотоке содержание свободной фруктозы крайне низкое, но она может захватываться из плазмы крови клетками жировой, мышечной и других тканей. В них, в отличие от гепатоцитов, отсутствует фруктокиназа, и фруктоза в этих тканях фосфорилируется по шестому углеродному атому. Образовавшийся фруктозо-6-фосфат включается в дальнейшие метаболические превращения.

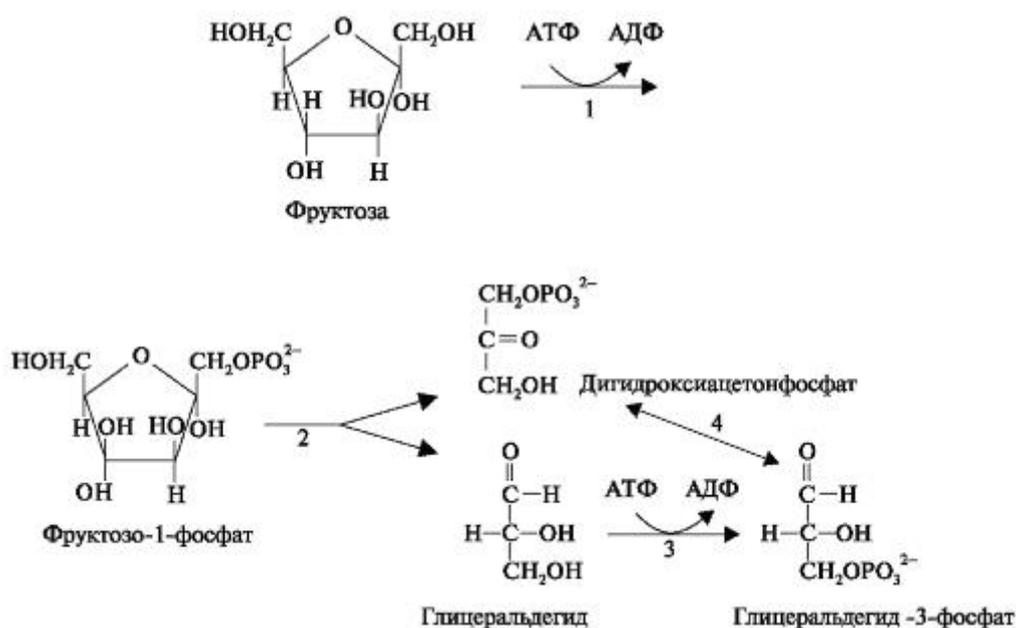


Рис. 13-30. Обмен фруктозы в печени. Ферменты: 1 - фруктокиназа; 2 - фруктозо-1-фосфатальдолаза; 3 - глицеральдегидкиназа; 4 - триозофосфатизомераза

*В записную книжку врача*

### Нарушение обмена фруктозы

С наследственной недостаточностью фруктозо-1-фосфатальдолазы связана врожденная непереносимость фруктозы. В тканях накапливается фруктозо-1-фосфат, который ингибирует ключевой фермент распада гликогена - гликогенфосфорилазу, а также фермент гликолиза и глюконеогенеза - альдолазу фруктозо-1,6-бисфосфата. Это приводит к снижению глюкозы в плазме крови после приема пищи, содержащей фруктозу. Болезнь проявляется приступом рвоты и судорог после вскармливания пищей, содержащей сахарозу и фруктозу. В тяжелых случаях развивается цирроз печени. При отсутствии другого фермента обмена фруктозы - фруктокиназы, не происходит фосфорилирования фруктозы, поэтому она не метаболизируется в клетках печени, а накапливается в крови, т.е. развивается фруктоземия. При увеличении концентрации фруктозы в крови более 0,73 ммоль/л она появляется в моче (фруктозурия). Клинических проявлений эта патология не имеет, и поэтому ее называют доброкачественной фруктозурией.

## Обмен галактозы

Обмен галактозо-1-фосфата в гепатоцитах грудных детей и взрослых имеет свои особенности. В печени взрослых людей из галактозо-1-фосфата и УДФ образуется УДФ-галактоза. Затем УДФ-галактоза в реакции эпимеризации превращается в УДФ-глюкозу. У детей в печени галактозо-1-фосфат при участии фермента галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы вступает в реакцию с УДФ-глюкозой и образуются два метаболита: глюкозо-1-фосфат и УДФ-галактоза (рис. 13-31). Молекула глюкозо-1-фосфата под действием фосфоглюкомутазы превращается в глюкозо-6-фосфат. После отщепления фосфата свободная глюкоза транспортируется в кровь. Молекула УДФ-галактозы в УДФ-глюкозо-4-эпимеразной реакции превращается в УДФ-глюкозу, которая вновь включается в метаболизм галактозо-1-фосфата или синтез гликогена и гликоконъюгатов.

Рис. 13-31. Обмен галактозы в печени у грудных детей. Ферменты: 1 - галактокиназа; 2 - галактозо-1-фосфатуридилтрансфераза; 3 - УДФ-глюкозо-4-эпимераза; 4 - фосфоглюкомутаза; 5 - глюкозо-6-фосфатаза

*В записную книжку врача*

## Нарушение обмена галактозы

Галактоземия обусловлена недостаточностью фермента галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы. В клетках печени и других тканей накапливается галактозо-1-фосфат, что сопровождается развитием цирроза печени и психических расстройств. Вследствие превращения галактозы в галактотиловый спирт и накопления его в тканях глаза происходит помутнение хрусталика.

## Регуляция уровня глюкозы в крови

Концентрация глюкозы в крови зависит от приемов пищи, стресса, гормонального статуса.

Переваривание углеводов в желудочно-кишечном тракте заканчивается приблизительно через 1,5-2 ч, а повышение уровня глюкозы в плазме крови начинается через 20-30 мин от начала пищеварения. Высокий уровень глюкозы способствует увеличению ионов кальция в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы, что сопровождается закрытием АТФ-

чувствительных калиевых каналов и секрецией из  $\beta$ -клеток гранул, содержащих инсулин, низкомолекулярный белок *амилин* и *C-пептид*. Помимо стимулированной секреции инсулина существует его базальная секреция, т.е. та, которая существует при отсутствии каких-либо экзогенных стимулов. Роль базальной секреции инсулина заключается в снижении базальной продукции глюкозы печенью и уровня свободных жирных кислот.

Инсулин, связываясь со своими тирозинкиназными рецепторами, активирует поглощение клетками глюкозы в инсулинзависимых тканях, ускоряет гликолиз и активирует окислительное декарбоксилирование пирувата. Образующийся из пирувата ацетил-КоА участвует в синтезе липидов, которые накапливаются в адипоцитах или используются другими клетками. Инсулин также повышает синтез белка и ингибирует процессы глюконеогенеза, распада гликогена.

Рис. 13-31. Обмен галактозы в печени у грудных детей. Ферменты: 1 - галактокиназа; 2 - галактозо-1-фосфатуридилтрансфераза; 3 - УДФ-глюкозо-4-эпимераза; 4 - фосфоглюкомутаза; 5 - глюкозо-6-фосфатаза

*В записную книжку врача*

Нарушение обмена галактозы

Галактоземия обусловлена недостаточностью фермента галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы. В клетках печени и других тканей накапливается галактозо-1-фосфат, что сопровождается развитием цирроза печени и психических расстройств. Вследствие превращения галактозы в галактотиловый спирт и накопления его в тканях глаза происходит помутнение хрусталика.

Регуляция уровня глюкозы в крови

Концентрация глюкозы в крови зависит от приемов пищи, стресса, гормонального статуса.

Переваривание углеводов в желудочно-кишечном тракте заканчивается приблизительно через 1,5-2 ч, а повышение уровня глюкозы в плазме крови начинается через 20-30 мин от начала пищеварения. Высокий уровень глюкозы способствует увеличению ионов кальция в  $\beta$ -клетках

поджелудочной железы, что сопровождается закрытием АТФ-чувствительных калиевых каналов и секрецией из  $\beta$ -клеток гранул, содержащих инсулин, низкомолекулярный белок *амилин* и *C-пептид*. Помимо стимулированной секреции инсулина существует его базальная секреция, т.е. та, которая существует при отсутствии каких-либо экзогенных стимулов. Роль базальной секреции инсулина заключается в снижении базальной продукции глюкозы печенью и уровня свободных жирных кислот.

Инсулин, связываясь со своими тирозинкиназными рецепторами, активирует поглощение клетками глюкозы в инсулинзависимых тканях, ускоряет гликолиз и активирует окислительное декарбоксилирование пирувата. Образующийся из пирувата ацетил-КоА участвует в синтезе липидов, которые накапливаются в адипоцитах или используются другими клетками. Инсулин также повышает синтез белка и ингибирует процессы глюконеогенеза, распада гликогена.

Рис. 13-31. Обмен галактозы в печени у грудных детей. Ферменты: 1 - галактокиназа; 2 - галактозо-1-фосфатуридилтрансфераза; 3 - УДФ-глюкозо-4-эпимераза; 4 - фосфоглюкомутаза; 5 - глюкозо-6-фосфатаза

*В записную книжку врача*

Нарушение обмена галактозы

Галактоземия обусловлена недостаточностью фермента галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы. В клетках печени и других тканей накапливается галактозо-1-фосфат, что сопровождается развитием цирроза печени и психических расстройств. Вследствие превращения галактозы в галактотиловый спирт и накопления его в тканях глаза происходит помутнение хрусталика.

Регуляция уровня глюкозы в крови

Концентрация глюкозы в крови зависит от приемов пищи, стресса, гормонального статуса.

Переваривание углеводов в желудочно-кишечном тракте заканчивается приблизительно через 1,5-2 ч, а повышение уровня глюкозы в плазме крови начинается через 20-30 мин от начала пищеварения. Высокий уровень

глюкозы способствует увеличению ионов кальция в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы, что сопровождается закрытием АТФ-чувствительных калиевых каналов и секрецией из  $\beta$ -клеток гранул, содержащих инсулин, низкомолекулярный белок *амилин* и *C-пептид*. Помимо стимулированной секреции инсулина существует его базальная секреция, т.е. та, которая существует при отсутствии каких-либо экзогенных стимулов. Роль базальной секреции инсулина заключается в снижении базальной продукции глюкозы печенью и уровня свободных жирных кислот.

Инсулин, связываясь со своими тирозинкиназными рецепторами, активирует поглощение клетками глюкозы в инсулинзависимых тканях, ускоряет гликолиз и активирует окислительное декарбоксилирование пирувата. Образующийся из пирувата ацетил-КоА участвует в синтезе липидов, которые накапливаются в адипоцитах или используются другими клетками. Инсулин также повышает синтез белка и ингибирует процессы глюконеогенеза, распада гликогена.

Вопросы по теме

- Переваривание липидов в желудочно-кишечном тракте.
- Транспорт липидов.
- Тканевый липолиз.
- Обмен насыщенных жирных кислот.
- Обмен полиненасыщенных жирных кислот.
- Обмен триацилглицеролов.
- Обмен глицерофосфолипидов.
- Биосинтез холестерина.
- Патология липидного обмена.

## ПЕРЕВАРИВАНИЕ ЛИПИДОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ

Основными пищевыми липидами являются триацилглицеролы, и человек потребляет их в количестве от 70 до 100 г/сут в зависимости от возраста, физической нагрузки, климатических условий. С пищей, помимо триацилглицеролов, также поступают фосфолипиды (до 2,0 г/сут), холестерол и его эфиры (0,3-0,5 г/сут).

Для переваривания липидов в желудочно-кишечном тракте необходимы следующие условия:

- наличие активных липаз;
- определенные значения рН среды (6,5-7,5);
- присутствие поверхностно-активных веществ, участвующих в эмульгировании липидов для создания мелкодисперсной эмульсии.

Гидролиз липидов в тонком кишечнике

Факторы, необходимые для переваривания липидов, присутствуют в просвете двенадцатиперстной кишки, куда поступают из поджелудочной железы панкреатическая липаза, а в составе желчи - желчные кислоты. Именно поэтому переваривание липидов у взрослого человека начинается в двенадцатиперстной кишке. Оптимальные условия (щелочную среду) для действия панкреатической липазы создают бикарбонаты панкреатического сока и желчи.

*В записную книжку врача* Лингвальная липаза

В полости рта, на слизистой оболочке корня языка, имеются железы фон Эбнера, которые выделяют так называемую лингвальную липазу. Однако, попадая в желудок взрослого человека, лингвальная липаза неактивна, так как ее рН-оптимум выше рН желудочного сока. Активность этого фермента проявляется только в желудке младенцев, поскольку они получают уже эмульгированный жир молока, готовый для расщепления, и рН желудочного сока у них выше, чем у взрослого человека.

Желчь, поступившая в двенадцатиперстную кишку и перемешанная с химусом, содержит натриевые соли желчных кислот. Соли желчных кислот растворимы в воде и являются активным детергентом для эмульгирования липидов.

Желчные кислоты образуются в печени из холестерина. В реакциях их синтеза происходит восстановление 5,6-двойной связи, внедрение и встраивание гидроксильных групп в 7 $\alpha$ - или 12 $\alpha$ -положение и окисление С-24 в карбоксильную группу. Образующиеся желчные кислоты (холевая и хенодезоксихолевая), соединенные с таурином или глицином, получили название *первичных желчных кислот* (рис. 14-1).

В кишечнике под действием бактерий таурин и глицин отщепляются, и образуются *вторичные желчные кислоты*: из холевой кислоты - дезоксихолевая, а из хенодезоксихолевой - литохолевая. Сульфатированную форму литохолевой кислоты относят к *третичным желчным кислотам*.

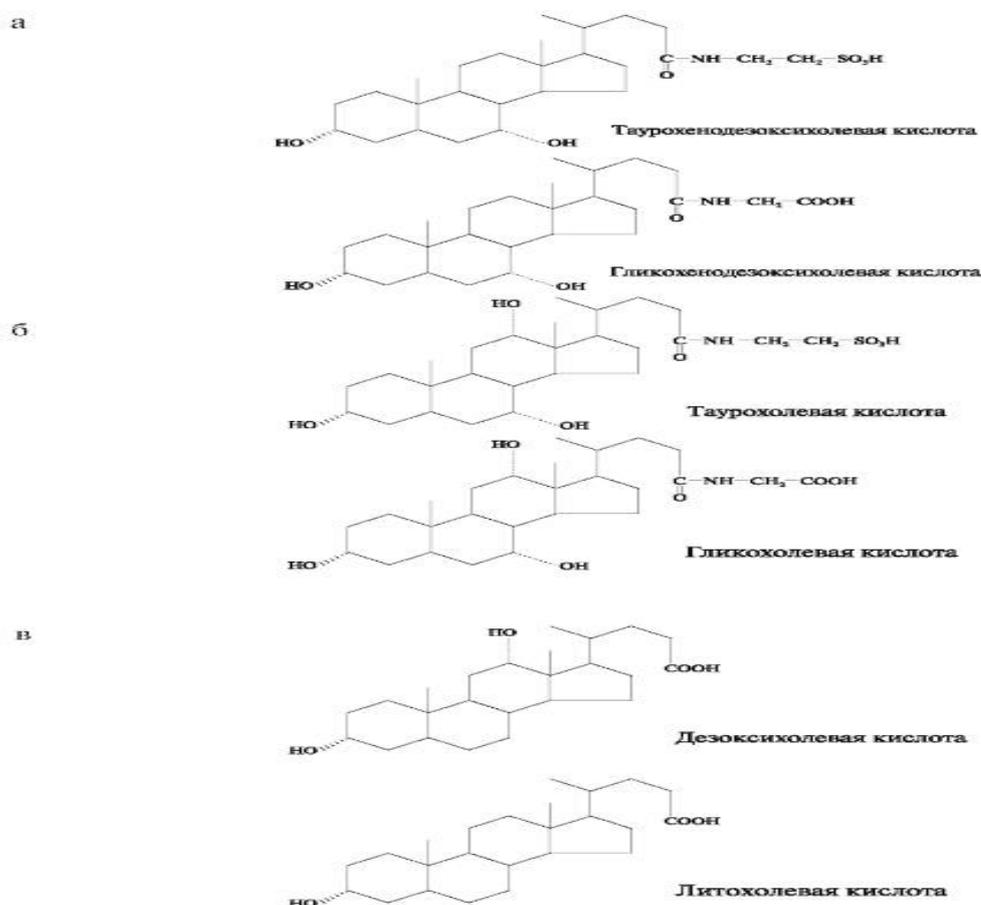


Рис. 14-1. Желчные кислоты: а, б - первичные; в - вторичные

*В записную книжку врача Стеаторея*

Отсутствие желчных кислот в желудочно-кишечном тракте, которое имеет место при закупорке желчевыводящих путей, приводит к нарушению гидролиза пищевых липидов и всасывания липидов, в том числе и жирорастворимых витаминов. В этом случае все липиды, поступившие с

пищей, выделяются с фекалиями. Выделение липидов с фекалиями получило название *стеатореи*

Эмульгированные липиды подвергаются действию *панкреатической липазы*, которая катализирует расщепление сложноэфирных связей в триацилглицеролах с высвобождением жирных кислот и глицерола (рис. 14-2).

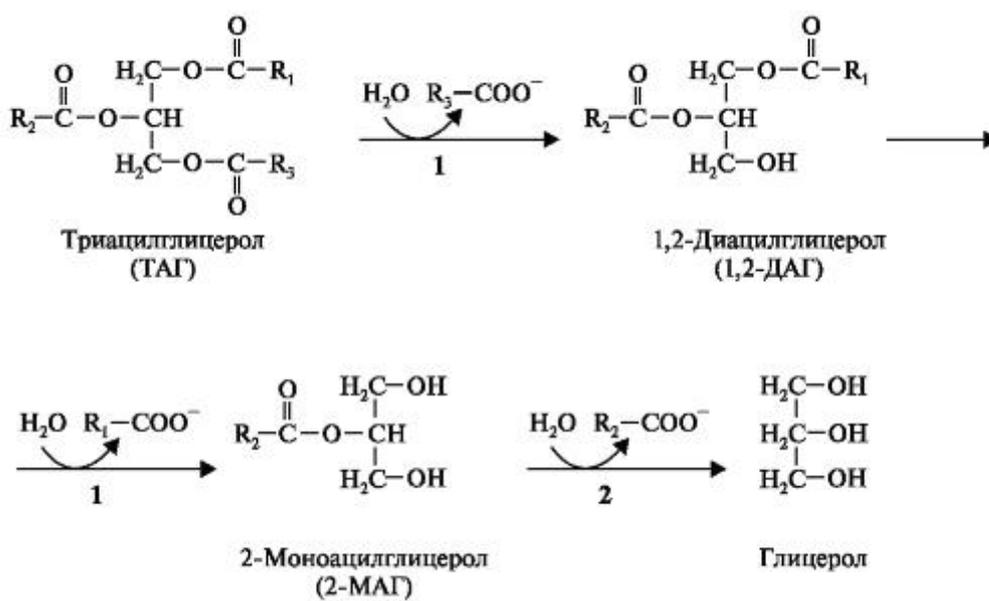


Рис. 14-2. Реакции гидролиза триацилглицеролов в тонком кишечнике. Ферменты: 1 - липаза панкреатическая; 2 - липаза кишечная

Панкреатическая липаза поступает в просвет двенадцатиперстной кишки одновременно с небольшим белком колипазой и трипсином. Ограниченный протеолиз колипазы трипсином облегчает присоединение этого белка к С-концу панкреатической липазы, происходит изменение конформации белковой молекулы фермента с формированием активного центра.

Все липопротеины отличаются по размеру, количественному составу белков и липидов (рис. 14-6; табл. 14-1).

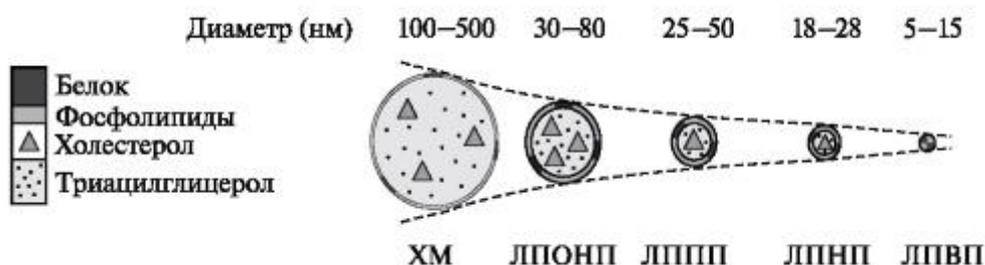


Рис. 14-6. Размеры и состав липопротеиновых частиц

Таблица 14-1. Состав липопротеинов плазмы крови

Класс липопротеинов	Состав, %			
	Белок	Холестерол	Фосфолипиды	Триацил-глицеролы
ЛПВП	33	30	29	8
ЛПНП	25	50	21	4
ЛППП	18	29	22	31
ЛПОНП	10	22	18	50
ХМ	1-2	8	7	84

ХМ и ЛПОНП осуществляют транспорт липидов в различные ткани, в том числе жировую. Их синтез происходит в клетках эпителия кишечника. Следует отметить, что большая часть ЛПОНП на самом деле синтезируется в гепатоцитах. Синтезированные липопротеины в энтероцитах кишечника транспортируются в лимфатические сосуды, после чего попадают в кровь. В процессе их циркуляции в крови на незрелые ХМ с липопротеинов высокой плотности переносятся апо С-II и апо Е, что заканчивается появлением зрелых ХМ (рис. 14-7).

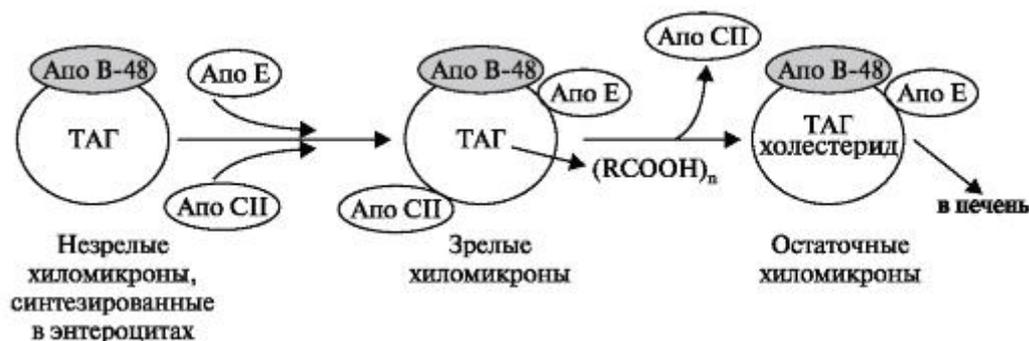


Рис. 14-7. Превращение хиломикронов в плазме крови

Как только зрелые ХМ и ЛПОНП попадают в кровоток, они под действием фермента *липопротеинлипазы*, присутствующей в эндотелии капилляров различных органов (сердечной мышцы, аорты, лактирующей молочной железы и др.), постепенно теряют ТАГ. Сначала ТАГ в составе липопротеинов превращаются в диацилглицеролы, а затем в МАГ, которые далее расщепляются на глицерол и свободные жирные кислоты. Часть жирных кислот, поступающих в кровоток, связывается с альбумином плазмы крови и транспортируется в другие органы. Постепенно в циркулирующих в крови ХМ уменьшается количество ТАГ и образуются остаточные хиломикроны. Остаточные ХМ, содержащие апо Е и этерифицированный

холестерол, полученный от ЛПВП путем переноса с белком апо D, поглощаются гепатоцитами.

О необходимости забора крови для анализа натошак

Исследования крови проводят в утренние часы натошак. После приема пищи начинается активный синтез ХМ и ЛПОНП. Их концентрация в плазме крови повышается, поэтому в течение 4-5 ч плазма приобретает белесоватый цвет (хилезная плазма). В этот период нежелательно забирать кровь для переливания, а также исследовать количество лейкоцитов, поскольку крупные молекулы липопротеинов могут скапливаться в капиллярах, а лейкоциты выходят из своих депо для поглощения жирных кислот и других мономеров, поступающих из желудочно-кишечного тракта. Вследствие мутного вида плазмы крови невозможно проводить также спектрофотометрическое определение активности ферментов и содержания метаболитов.

Вследствие гидролиза молекул ТАГ в ЛПОНП возрастает относительное содержание свободного холестерина, его эфиров и белка. Как следствие, происходят увеличение плотности и уменьшение размеров липопротеиновых частиц. Молекулы ЛПОНП вначале превращаются в липопротеины промежуточной плотности (ЛППП), а затем - в липопротеины низкой плотности. Именно ЛПНП распознаются рецепторами периферических тканей и являются поставщиками в клетки этих тканей свободного холестерина.

## ТКАНЕВЫЙ ЛИПОЛИЗ

Источником жирных кислот наряду с пищевыми липидами являются внутриклеточные триацилглицеролы. Распад внутриклеточных ТАГ, получивший название *тканевого липолиза*, катализируют три *тканевые липазы* (рис. 14-8): *триацилглицероллипаза* (ТАГ-липаза), *диацилглицероллипаза* (ДАГ-липаза) и *моноацилглицероллипаза* (МАГ-липаза). Наиболее активно процесс тканевого липолиза протекает в жировой ткани.

Запускает процесс тканевого липолиза фермент ТАГ-липаза, катализирующая отщепление остатка жирной кислоты у первого атома углерода ТАГ. Далее при участии ДАГ-липазы отщепляется остаток жирной кислоты у третьего атома углерода диацилглицерола, а затем под действием

МАГ-липазы отщепляется третий остаток жирной кислоты. Таким образом, в процессе липолиза высвобождаются три молекулы свободных жирных кислот и одна молекула глицерола.

Вопросы по теме

- Переваривание липидов в желудочно-кишечном тракте.
- Транспорт липидов.
- Тканевый липолиз.
- Обмен насыщенных жирных кислот.
- Обмен полиненасыщенных жирных кислот.
- Обмен триацилглицеролов.
- Обмен глицерофосфолипидов.
- Биосинтез холестерина.
- Патология липидного обмена.

## ПЕРЕВАРИВАНИЕ ЛИПИДОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ

Основными пищевыми липидами являются триацилглицеролы, и человек потребляет их в количестве от 70 до 100 г/сут в зависимости от возраста, физической нагрузки, климатических условий. С пищей, помимо триацилглицеролов, также поступают фосфолипиды (до 2,0 г/сут), холестерол и его эфиры (0,3-0,5 г/сут).

Для переваривания липидов в желудочно-кишечном тракте необходимы следующие условия:

- наличие активных липаз;
- определенные значения рН среды (6,5-7,5);
- присутствие поверхностно-активных веществ, участвующих в эмульгировании липидов для создания мелкодисперсной эмульсии.

Гидролиз липидов в тонком кишечнике

Факторы, необходимые для переваривания липидов, присутствуют в просвете двенадцатиперстной кишки, куда поступают из поджелудочной железы панкреатическая липаза, а в составе желчи - желчные кислоты. Именно поэтому переваривание липидов у взрослого человека начинается в двенадцатиперстной кишке. Оптимальные условия (щелочную среду) для действия панкреатической липазы создают бикарбонаты панкреатического сока и желчи.

*В записную книжку врача* Лингвальная липаза

В полости рта, на слизистой оболочке корня языка, имеются железы фон Эбнера, которые выделяют так называемую лингвальную липазу. Однако, попадая в желудок взрослого человека, лингвальная липаза неактивна, так как ее рН-оптимум выше рН желудочного сока. Активность этого фермента проявляется только в желудке младенцев, поскольку они получают уже эмульгированный жир молока, готовый для расщепления, и рН желудочного сока у них выше, чем у взрослого человека. желчных кислот. Соли желчных кислот растворимы в воде и являются активным детергентом для эмульгирования липидов.

Желчные кислоты образуются в печени из холестерина. В реакциях их синтеза происходит восстановление 5,6-двойной связи, внедрение и встраивание гидроксильных групп в 7 $\alpha$ - или 12 $\alpha$ -положение и окисление С-24 в карбоксильную группу. Образующиеся желчные кислоты (холевая и хенодезоксихолевая), соединенные с таурином или глицином, получили название *первичных желчных кислот* (рис. 14-1).

В кишечнике под действием бактерий таурин и глицин отщепляются, и образуются *вторичные желчные кислоты*: из холевой кислоты - дезоксихолевая, а из хенодезоксихолевой - литохолевая. Сульфатированную форму литохолевой кислоты относят к *третичным желчным кислотам*.

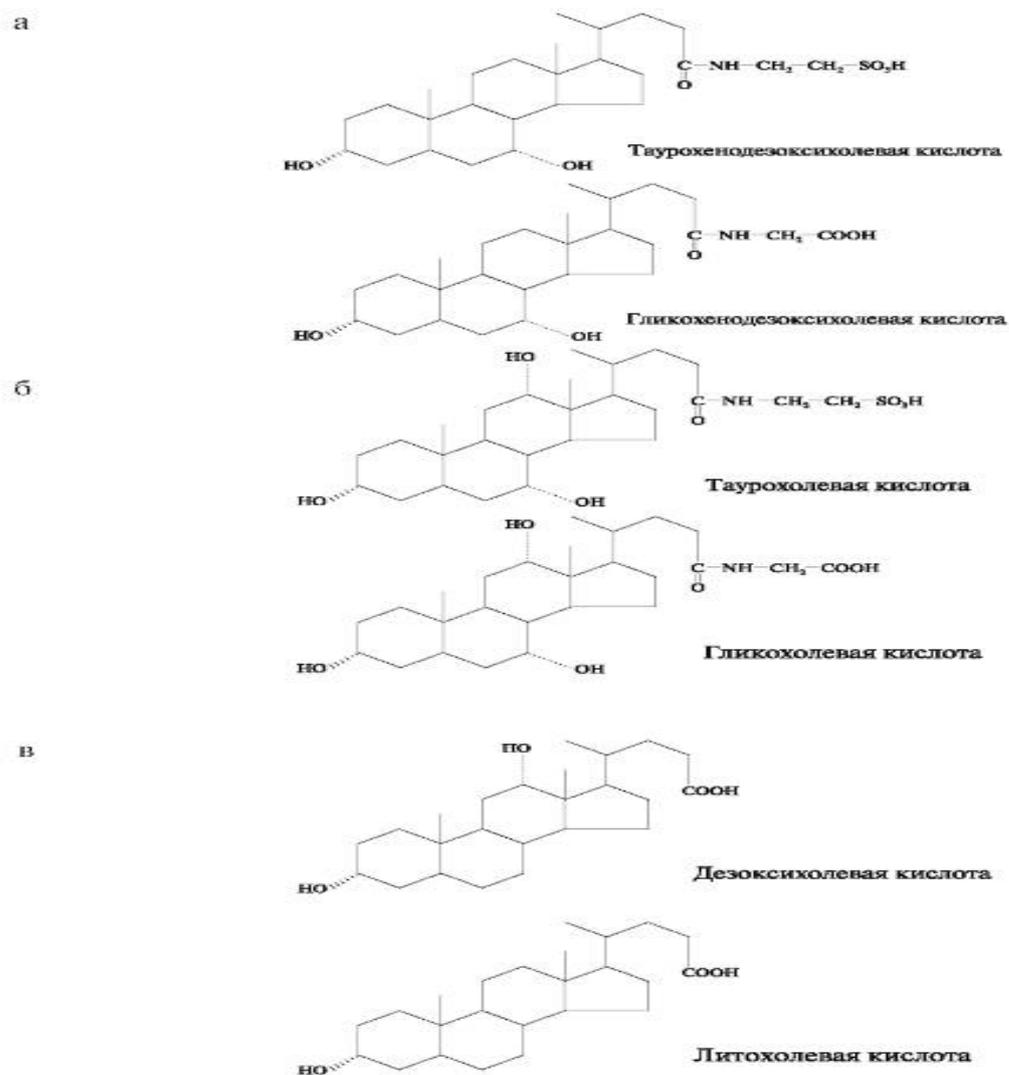


Рис. 14-1. Желчные кислоты: а, б - первичные; в - вторичные

*В записную книжку врача* Стеаторея

Отсутствие желчных кислот в желудочно-кишечном тракте, которое имеет место при закупорке желчевыводящих путей, приводит к нарушению гидролиза пищевых липидов и всасывания липидов, в том числе и жирорастворимых витаминов. В этом случае все липиды, поступившие с пищей, выделяются с фекалиями. Выделение липидов с фекалиями получило название *стеатореи*

Эмульгированные липиды подвергаются действию *панкреатической липазы*, которая катализирует расщепление сложноэфирных связей в триацилглицеролах с высвобождением жирных кислот и глицерола (рис. 14-2).

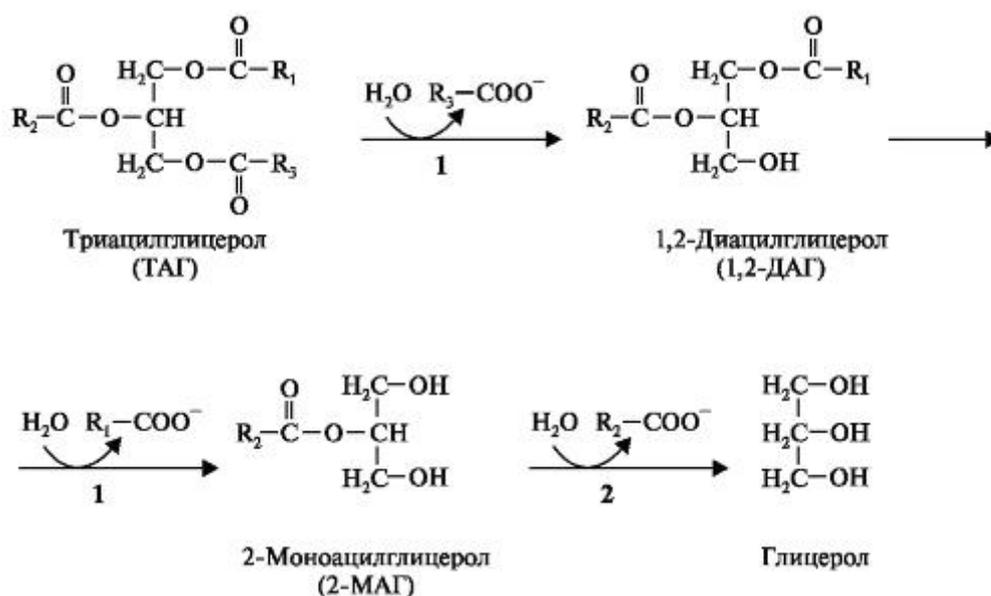


Рис. 14-2. Реакции гидролиза триацилглицеролов в тонком кишечнике. Ферменты: 1 - липаза панкреатическая; 2 - липаза кишечная

Панкреатическая липаза поступает в просвет двенадцатиперстной кишки одновременно с небольшим белком колипазой и трипсином. Ограниченный протеолиз колипазы трипсином облегчает присоединение этого белка к С-концу панкреатической липазы, происходит изменение конформации белковой молекулы фермента с формированием активного центра.

Все эти вещества в просвете кишечника образуют смешанные *мицеллы*, в гидрофобном ядре которых расположены липофильные продукты расщепления жиров, а на периферии - желчные кислоты и полярные головки фосфолипидов. Мицеллы перемещаются к всасывающей поверхности кишечного эпителия, а затем внутри клеток они распадаются на составные компоненты (рис. 14-4). Высвободившиеся жирные кислоты соединяются с цитоплазматическим белком кишечника I-FABP (от *англ. Intestinal Fatty Acid Binding Protein* -кишечный белок, связывающий жирные кислоты). Образование комплексов жирных кислот с белками не только повышает растворимость жирных кислот, но и защищает клетку от их детергентного действия.

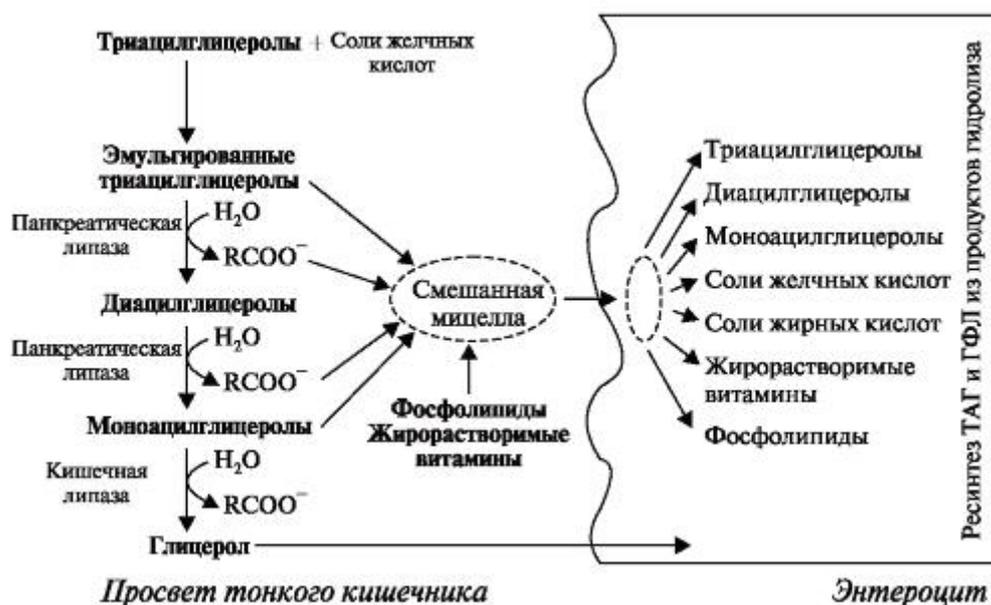


Рис. 14-4. Переваривание липидов и транспорт продуктов гидролиза в энтероциты (схема)

Всосавшиеся продукты ресинтеза липидов в энтероцитах - молекулы жирных кислот и 2-моноацилглицеролов - в эпителиальных клетках кишечника соединяются в ТАГ. Этот процесс образования получил название *ресинтеза* ТАГ. Поскольку свободные жирные кислоты метаболически неактивны, то реакции ресинтеза начинаются с активации анионов жирных кислот, которые затем последовательно присоединяются к молекуле 2-моноацилглицерола при участии моноацилглицерол- и диацилглицеролтрансфераз.

В реакциях ресинтеза ТАГ, как правило, участвуют разные пищевые жирные кислоты, поэтому ресинтезированные ТАГ хотя и сходны с пищевыми, но все-таки отличаются от исходно поступивших с различными продуктами.

Желчные кислоты, оставшиеся в просвете кишечника и не вошедшие в состав мицелл, выводятся с калом. Другие желчные кислоты, поступившие из мицелл в энтероциты, с кровью по воротной вене возвращаются обратно в печень. В этом случае имеет место постоянная циркуляция желчных кислот между печенью и кишечником. Данный процесс получил название *кишечно-печеночной циркуляции желчных кислот*.

А

Все липопротеины отличаются по размеру, количественному составу белков и липидов (рис. 14-6; табл. 14-1).

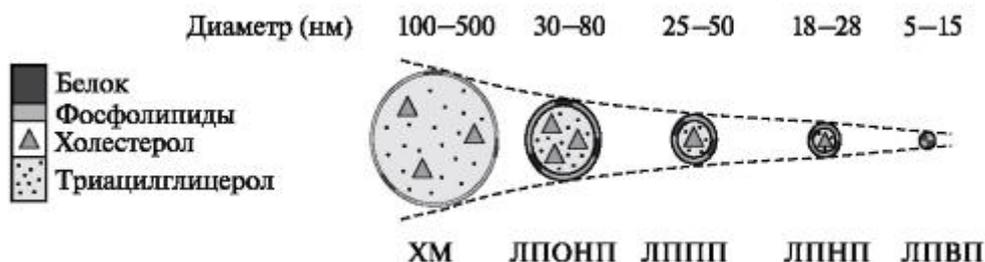


Рис. 14-6. Размеры и состав липопротеиновых частиц

Таблица 14-1. Состав липопротеинов плазмы крови

Класс липопротеинов	Состав, %			
	Белок	Холестерол	Фосфолипиды	Триацил-глицеролы
ЛПВП	33	30	29	8
ЛПНП	25	50	21	4
ЛППП	18	29	22	31
ЛПОНП	10	22	18	50
ХМ	1-2	8	7	84

ХМ и ЛПОНП осуществляют транспорт липидов в различные ткани, в том числе жировую. Их синтез происходит в клетках эпителия кишечника. Следует отметить, что большая часть ЛПОНП на самом деле синтезируется в гепатоцитах. Синтезированные липопротеины в энтероцитах кишечника транспортируются в лимфатические сосуды, после чего попадают в кровь. В процессе их циркуляции в крови на незрелые ХМ с липопротеинов высокой плотности переносятся апо С-II и апо Е, что заканчивается появлением зрелых ХМ (рис. 14-7).

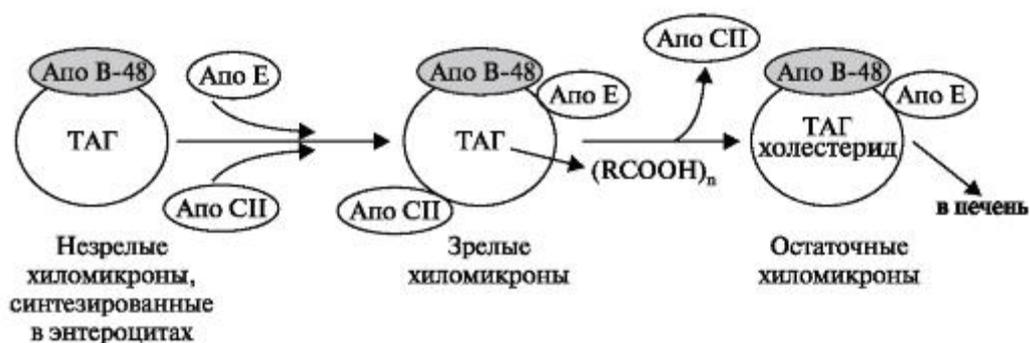


Рис. 14-7. Превращение хиломикронов в плазме крови

Как только зрелые ХМ и ЛПОНП попадают в кровоток, они под действием фермента *липопротеинлипазы*, присутствующей в эндотелии капилляров различных органов (сердечной мышцы, аорты, лактирующей молочной железы и др.), постепенно теряют ТАГ. Сначала ТАГ в составе

липопротеинов превращаются в диацилглицеролы, а затем в МАГ, которые далее расщепляются на глицерол и свободные жирные кислоты. Часть жирных кислот, поступающих в кровоток, связывается с альбумином плазмы крови и транспортируется в другие органы. Постепенно в циркулирующих в крови ХМ уменьшается количество ТАГ и образуются остаточные хиломикроны. Остаточные ХМ, содержащие апо Е и этерифицированный холестерол, полученный от ЛПВП путем переноса с белком апо D, поглощаются гепатоцитами.

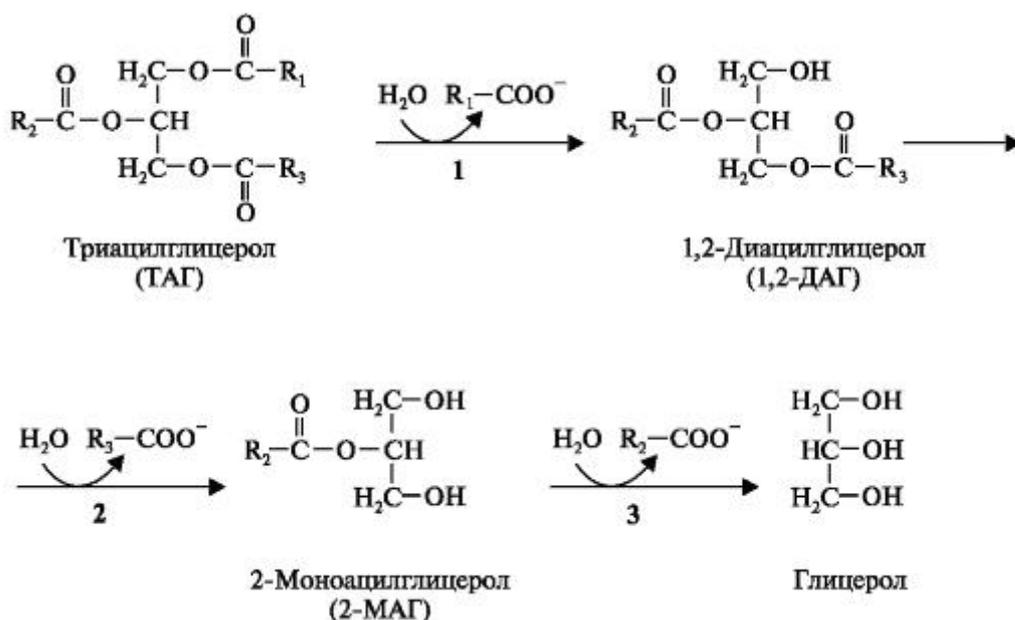


Рис. 14-8. Гидролиз триацилглицерола в адипоцитах. Ферменты: 1 - триацилглицероллипаза; 2 - диацилглицероллипаза; 3 - моноацилглицероллипаза

### РЕГУЛЯЦИЯ ТКАНЕВОГО ЛИПОЛИЗА

Ключевым ферментом тканевого липолиза является ТАГ-липаза. Ее активность повышают адреналин, норадреналин и глюкагон. Они через образование вторичного посредника цАМФ активируют протеинкиназу А, которая фосфорилирует ТАГ-липазу, что приводит к активации этого фермента (рис. 14-9).

Дефосфорилирование ТАГ-липазы под действием протеинфосфатазы, активируемой инсулином, возвращает фермент в исходное неактивное состояние. Гормоны коры надпочечников - глюкокортикоиды, увеличивая синтез ТАГ-липазы, также способствуют распаду тканевых липидов.

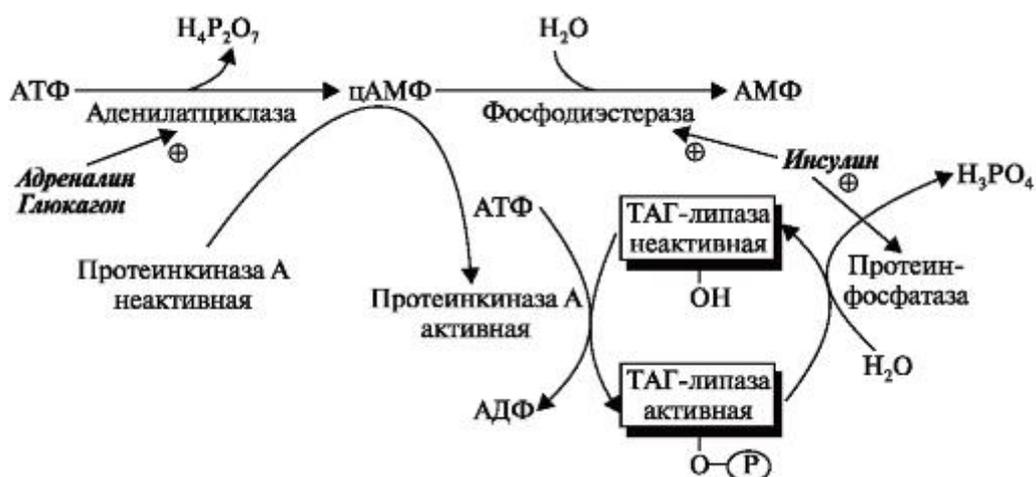


Рис. 14-9. Регуляция активности тканевой триацилглицероллипазы (схема): «+» - повышение активности или количества фермента

### ОБМЕН ГЛИЦЕРОЛА

Высвободившийся в процессе липолиза глицерол практически не используется в жировой ткани, поэтому он поступает в плазму крови и с ее током транспортируется в печень. В гепатоцитах молекула глицерола фосфорилируется при участии глицеролкиназы и затрате одной молекулы АТФ. Образовавшийся глицерол-3-фосфат используется на синтез ТАГ, глицерофосфолипидов или дегидрируется с образованием дигидроксиацетонфосфата. Триозофосфаты, источником которых является и глицерол, либо метаболизируются в реакциях гликолиза, либо вовлекаются в процесс синтеза глюкозы (рис. 14-10).

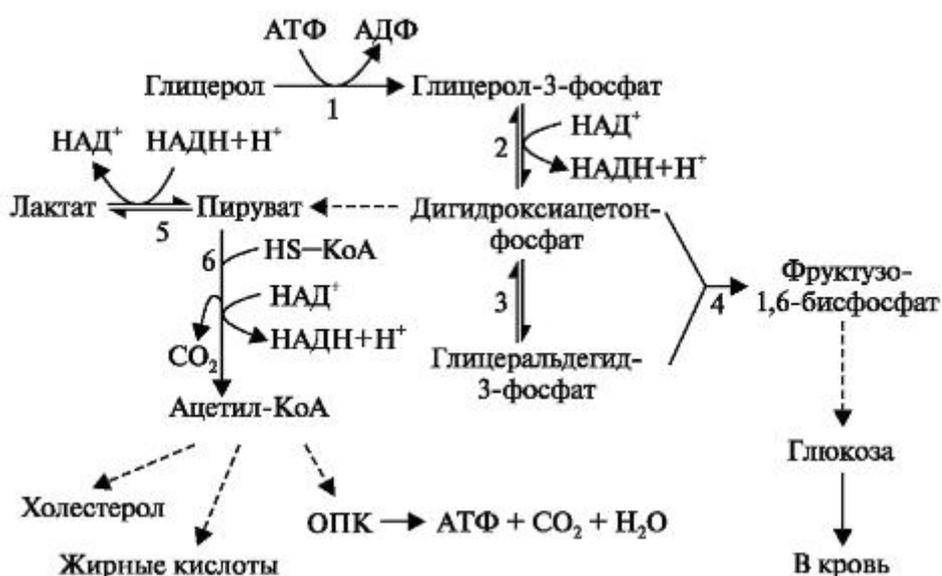


Рис. 14-10. Метаболические превращения глицерола в печени (схема). Ферменты: 1 - глицеролкиназа; 2 - глицеролфосфатдегидрогеназа; 3 - триозофосфатизомераза; 4 - альдолаза; 5 - лактатдегидрогеназа; 6 - пируватдегидрогеназный комплекс

Реакции  $\beta$ -окисления насыщенных жирных кислот с четным числом атомов углерода в матриксе митохондрий

Ферменты, катализирующие реакции окисления длинноцепочечных жирных кислот, связаны с внутренней мембраной митохондрий. Другая часть ферментов, катализирующих реакции окисления средне- и короткоцепочечных жирных кислот, локализована в матриксе митохондрий. Общая схема  $\beta$ -окисления жирной кислоты представлена на рис. 14-13.

$\beta$ -Окисление насыщенной жирной кислоты включает четыре повторяющиеся реакции. Сначала при участии фермента *ацил-КоА-дегидрогеназы* происходит отщепление двух атомов водорода у 2( $\alpha$ )- и 3( $\beta$ )-углеродных атомов, которые переносятся на молекулу ФАД. В свою очередь, электроны от молекулы ФАДН<sub>2</sub> поступают на электронтранспортный белок и далее на коэнзим Q (убихинон) дыхательной цепи.

В ходе следующей реакции  $\beta$ -окисления под действием фермента *еноил-КоА-гидратазы* по месту двойной связи присоединяется молекула воды. Образовавшийся 3 ( $\beta$ )-гидроксиацил-КоА в третьей реакции подвергается дегидрированию при участии фермента *3 ( $\beta$ )-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы*. Акцептором электронов в этой реакции окисления выступает молекула НАД<sup>+</sup>. В четвертой реакции в образовавшейся молекуле 3 ( $\beta$ )-кетоацил-КоА разрывается связь между  $\alpha$ - и  $\beta$ -углеродами, и высвобождаются молекула ацетил-КоА и новая молекула ацил-КоА, укороченная на два атома углерода. Эту реакцию катализирует фермент  *$\beta$ -кетоацил-КоА-тиолаза*. Образующийся укороченный на два углерода ацил-КоА вновь поступает в цикл  $\beta$ -окисления.

Реакции повторяются до тех пор, пока не образуется четырехуглеродное соединение - ацетоацетил-КоА, который, в свою очередь, расщепляется  $\beta$ -кетоацил-КоА-тиолазой до двух молекул ацетил-КоА. На этом процесс окисления жирной кислоты завершается.

Синтез кетонových тел происходит в матриксе митохондрий печеночных клеток. Вначале из двух молекул ацетил-КоА образуется ацетоацетил-КоА. В следующей реакции при участии фермента ГМГ-КоА-синтазы происходит присоединение третьей молекулы ацетил-КоА и образуется молекула 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА (ГМГ-КоА). При последующем отщеплении ацетил-КоА от ГМГ-КоА высвобождается молекула ацетоацетата, которая при участии  $\beta$ -гидроксibuтиратдегидрогеназы восстанавливается до 3(- $\beta$ -) гидроксимасляной кислоты ( $\beta$ -гидроксibuтирата) (рис. 14-16).

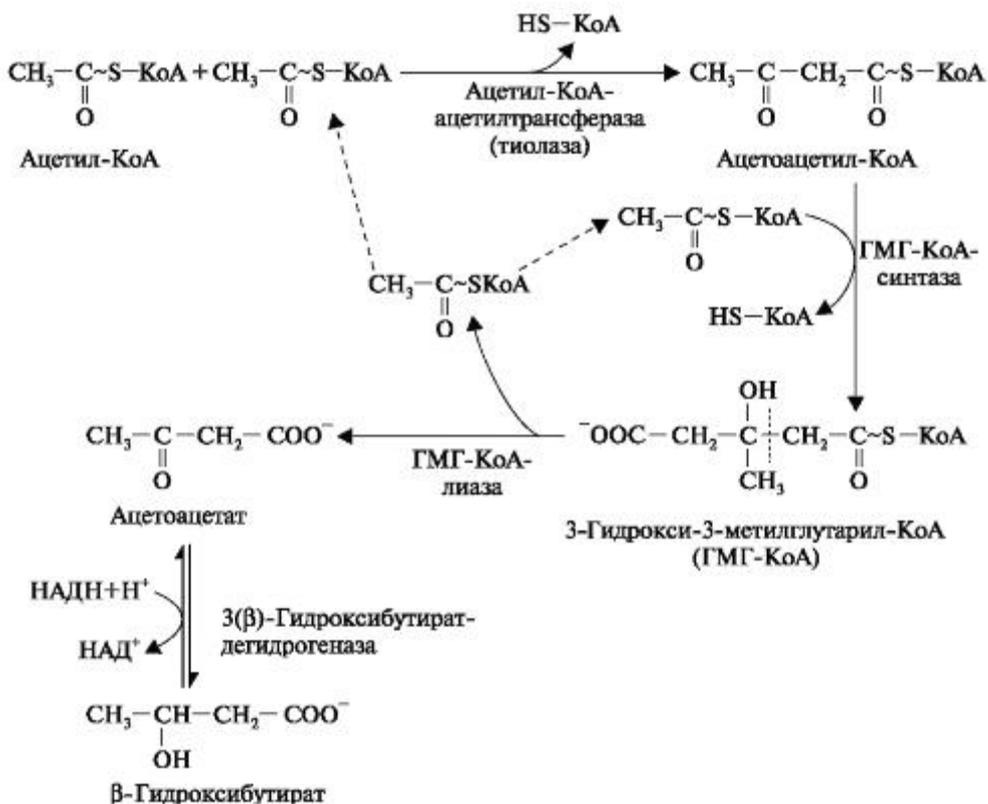


Рис. 14-16. Реакции синтеза кетонových тел в митохондриях гепатоцитов

Молекулы  $\beta$ -гидроксibuтирата и ацетоацетата из печени с током крови транспортируются в другие органы и ткани, где молекулы гидроксibuтирата вначале окисляются до ацетоацетата. Метаболизм ацетоацетата начинается с превращения его в активную молекулу. Это может проходить двумя путями:

- присоединением HS-КоА с затратой энергии молекулы АТФ;
- транспортом HS-КоА от молекулы сукцинил-КоА (рис. 14-17).

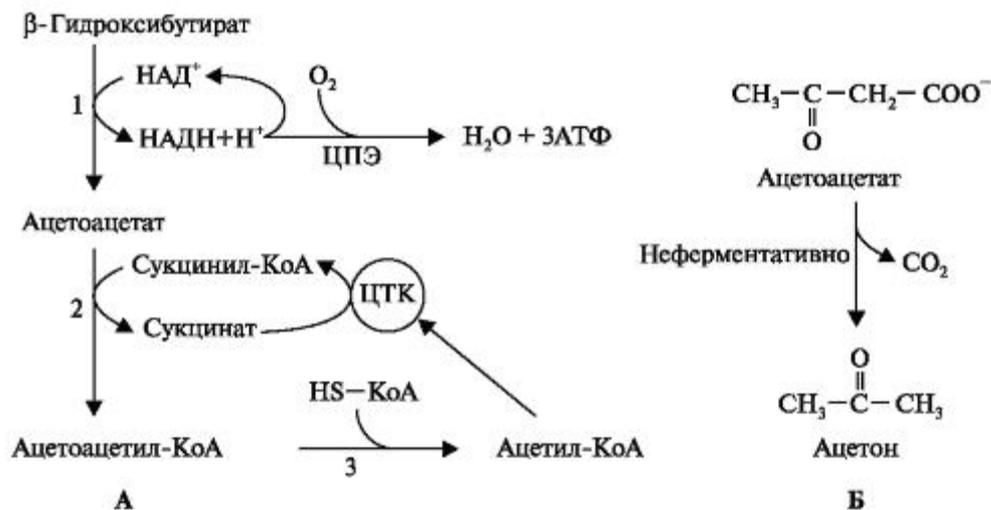


Рис. 14-17. Метаболизм кетоновых тел во внепеченочных тканях (А) и образование ацетона (Б). Ферменты: 1 -  $\beta$ -гидроксибутиратдегидрогеназа; 2 -  $\beta$ -кетоацил-КоА-трансфераза; 3 - кетотиолаза

В случае невозможности использования кетоновых тел в тканях происходит их накопление. При этом ацетоацетат неферментативно декарбоксилируется и образуется летучее вещество - *ацетон*, он удаляется из организма с потом и выдыхаемым воздухом.

*В записную книжку врача*

Увеличение кетоновых тел в организме человека

При сахарном диабете и длительном голодании в клетки не поступает глюкоза, поэтому они испытывают энергетический голод. Такое состояние для организма - стресс, и надпочечники начинают выделять в большом количестве адреналин и глюкокортикоиды. Они активируют липолиз в жировой ткани. Высвободившиеся жирные кислоты в печени подвергаются  $\beta$ -окислению. В последующем молекулы ацетил-КоА превращаются в кетоновые тела. Однако метаболизм ацетоацетата в периферических тканях снижен, так как оксалоацетат используется на синтез глюкозы и активность ЦТК уменьшается. Снижение уровня АТФ также не способствует активации ацетоацетата путем присоединения  $\text{HS-CoA}$ . Накопление в клетках органических кислот (ацетоацетата и 3-гидроксибутирата) приводит к снижению рН и развитию метаболического ацидоза.

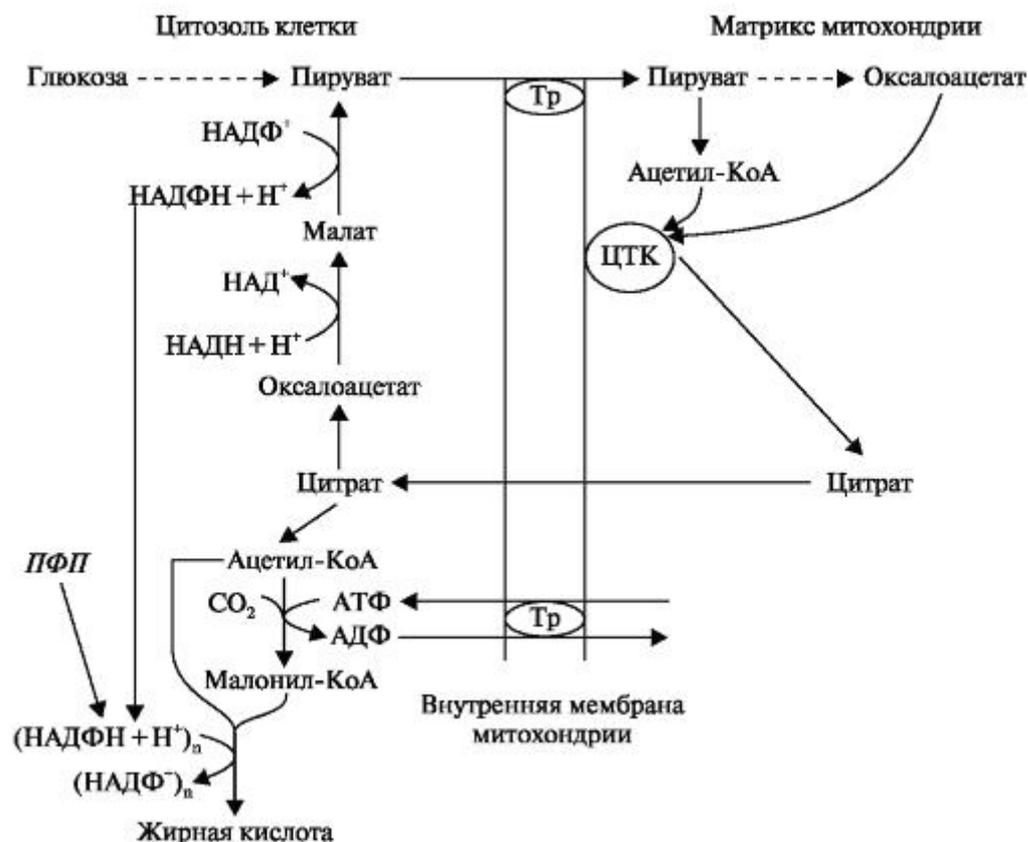


Рис. 14-18. Источники атомов углерода, водорода и энергии для синтеза жирной кислоты в адипоцитах, гепатоцитах и других клетках. В переносе метаболитов через внутреннюю мембрану митохондрий участвуют транслоказы (Tr). ПФП - пентозофосфатный путь превращения глюкозы

Цепочки жирной кислоты строятся путем последовательного прибавления двухуглеродных ацетатных единиц, источником которых являются молекулы малонил-КоА.

Образование молекул малонил-КоА. Ацетил-КоА в АТФ-зависимой реакции карбоксилирования, которую катализирует фермент ацетилкарбоксилаза, превращается в малонил-КоА. Реакция протекает в 2 этапа. На первом -  $\text{CO}_2$  связывается в активном центре с биотином, а на втором этапе -  $\text{CO}_2$  переносится на молекулу ацетил-КоА (рис. 14-19).

Пальмитатсинтаза (синтаза жирной кислоты). Синтез жирных кислот у млекопитающих осуществляет мультиферментный комплекс, который состоит из двух идентичных мультифункциональных полипептидов. Каждый из них содержит по 7 субдоменов (ферментов), которые распределены в трех участках (доменах), а также ацилпереносящий белок (АПБ). АПБ выполняет функцию переносчика ацильных групп. В составе АПБ присутствует

фосфорилированная форма пантотеновой кислоты (4-фосфопантетеин), она связана с белком через остаток серина.

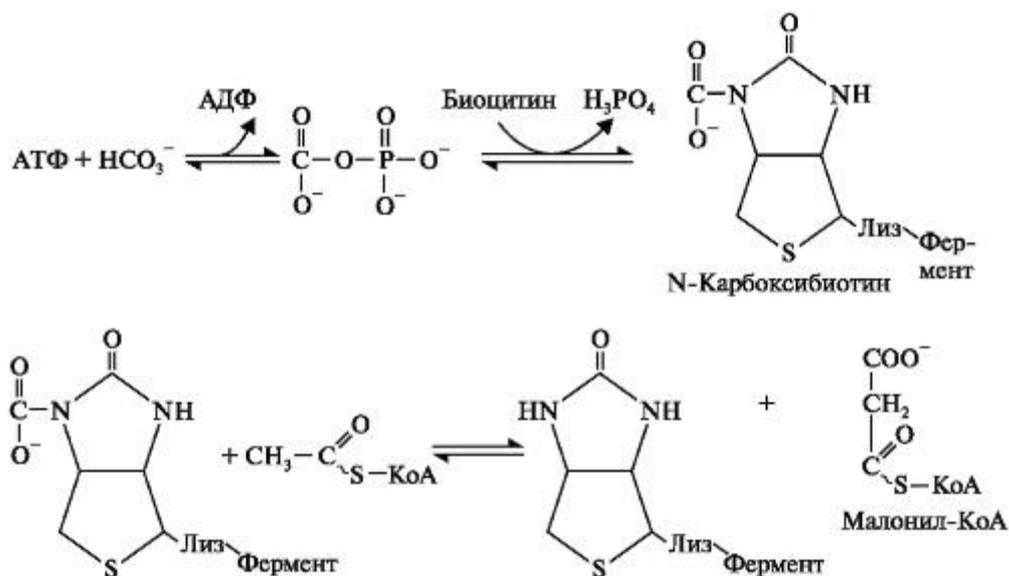


Рис. 14-19. Синтез малонил-КоА при участии ацетил-КоА-карбоксилазы

В мультиферментном комплексе каждая субъединица расположена таким образом, что против первого домена одной субъединицы находится третий домен другой (рис. 14-20).

В *первом домене* происходит присоединение молекул ацетил-КоА и малонил-КоА при участии ферментов *ацетилтрансферазы* и *малонилтрансферазы*. В связывании этих двух молекул участвует фермент  $\beta$ -кетоацилсинтаза. Ферменты *второго домена* катализируют восстановление промежуточного соединения, полученного в первом домене. Здесь расположены кетоацилредуктаза, дегидратаза, еноилредуктаза, а также АПБ.

В *третьем домене* находится фермент тиюэстераза. Он высвобождает синтезированную пальмитиновую кислоту (C16:0).

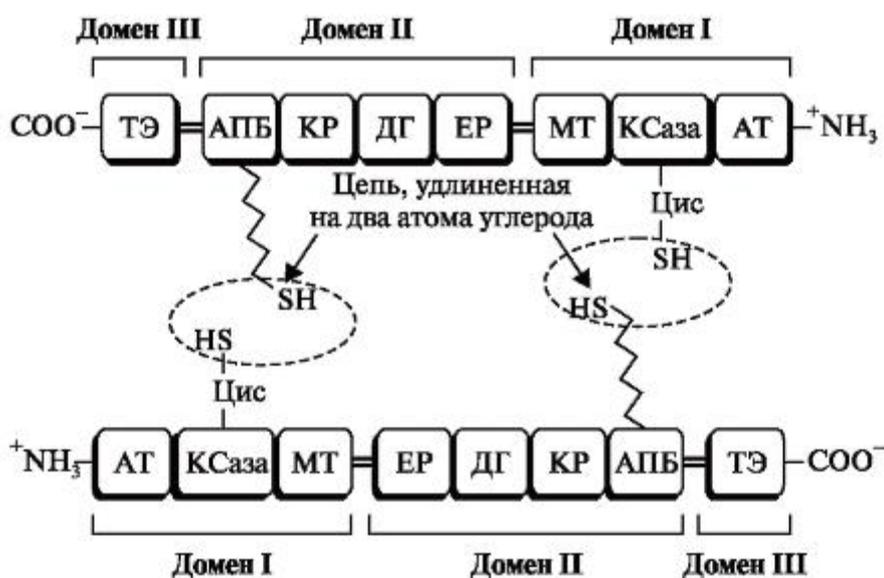


Рис. 14-20. Структура мультиферментного пальмитатсинтазного комплекса. Субдомены: ТЭ - тиоэстераза; АПБ - ацилпереносящий белок; КР - кетоацилредуктаза; ДГ - дегидратаза; ЕР - еноил-АПБ-редуктаза; МТ - малонилтрансфераза; КСаза - кетоацилсинтаза; АТ - ацетилтрансфераза

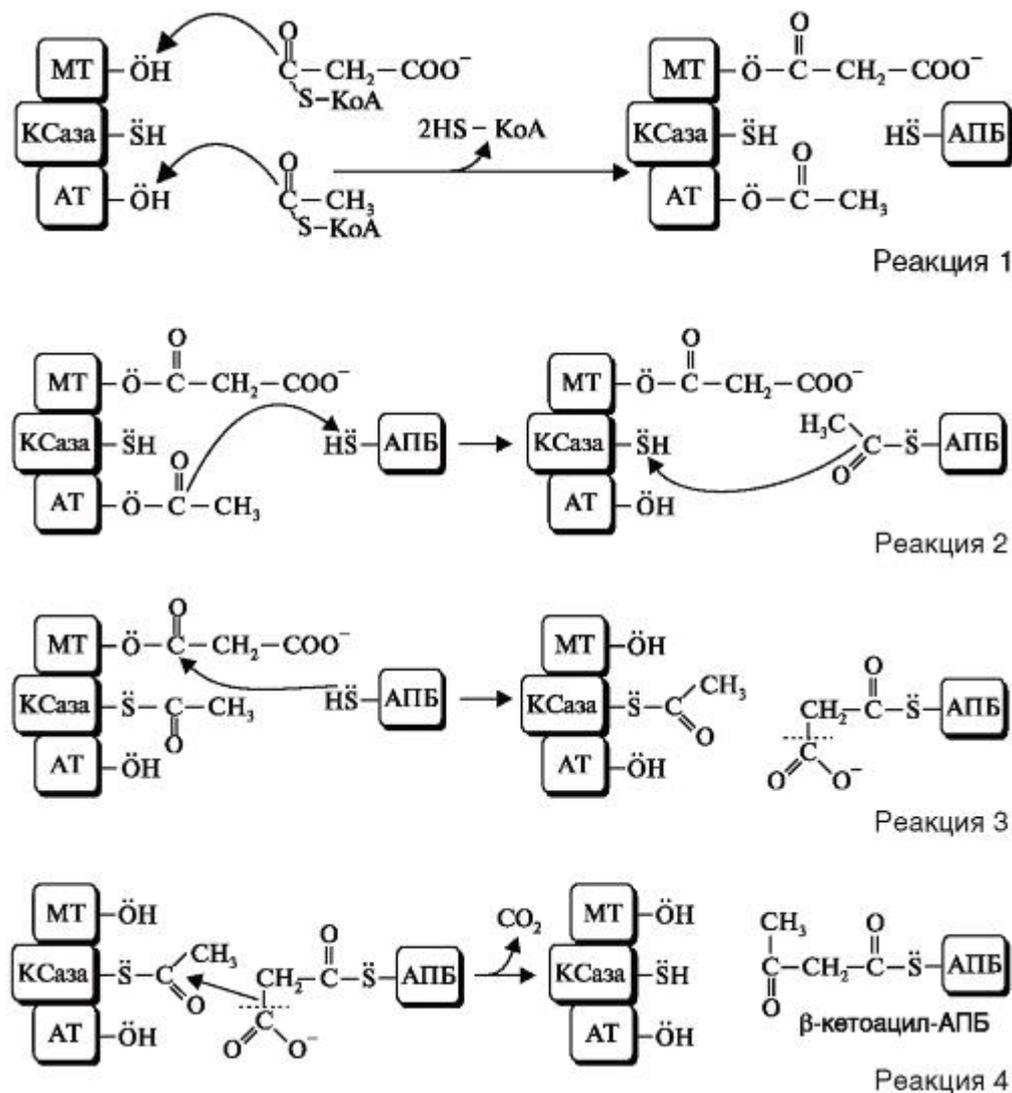
Реакции синтеза пальмитиновой кислоты. В синтезе молекулы пальмитиновой кислоты участвуют одновременно обе субъединицы пальмитатсинтазы. На первом этапе синтеза жирной кислоты в первом домене одной субъединицы происходит присоединение ацетил-КоА к остатку серина ацетилтрансферазы (рис. 14-21). В сходной реакции образуется второй промежуточный интермедиат между малонил-КоА и остатком серина малонилтрансферазы (реакция 1).

Затем ацетильная группа от ацетилтрансферазы переносится на SH-группу 4-фосфопантетеина АПБ, находящегося в составе второго домена другой субъединицы пальмитатсинтазы (реакция 2).

На следующем этапе ацетильный остаток перемещается на SH-группу цистеина  $\beta$ -кетосинтазы, а свободная SH-группа АПБ атакует малонилтрансферазу и связывает малонильный остаток (реакция 3).

Далее при участии  $\beta$ -кетоацилсинтазы происходит конденсация малонильного и ацетильного остатков с одновременным отщеплением карбонильной группы от малонила. В результате образуется  $\beta$ -кетоацил, связанный с АПБ (реакция 4).

Возникающая связь между  $\beta$ -кетоацилом и SH-группой 4'-фосфоантетеина АПБ позволяет в последующих реакциях перемещать промежуточные метаболиты от одного каталитического субдомена к другому (рис. 14-22).



М

Рис. 14-21. Механизм удлинения углеводородной цепи в процессе синтеза пальмитиновой кислоты: реакция 1 - присоединение молекул малонил-КоА и ацетил-КоА к ферментам первого домена одной цепи; реакция 2 - перенос ацетата на АПБ второго домена второй субъединицы; реакция 3 - перемещение ацетильного остатка в активный центр кетоацилсинтазы и перенос малонильного остатка на АПБ; реакция 4 - конденсация малонильного и ацетильного фрагментов с образованием  $\beta$ -кетоацила; МТ - малонилтрансфераза; КСаза -  $\beta$ -кетоацилсинтаза; АТ - ацетилтрансфераза - ферменты первого домена одной субъединицы пальмитатсинтазы; АПБ - ацилпереносящий белок второго домена другой субъединицы пальмитатсинтазы

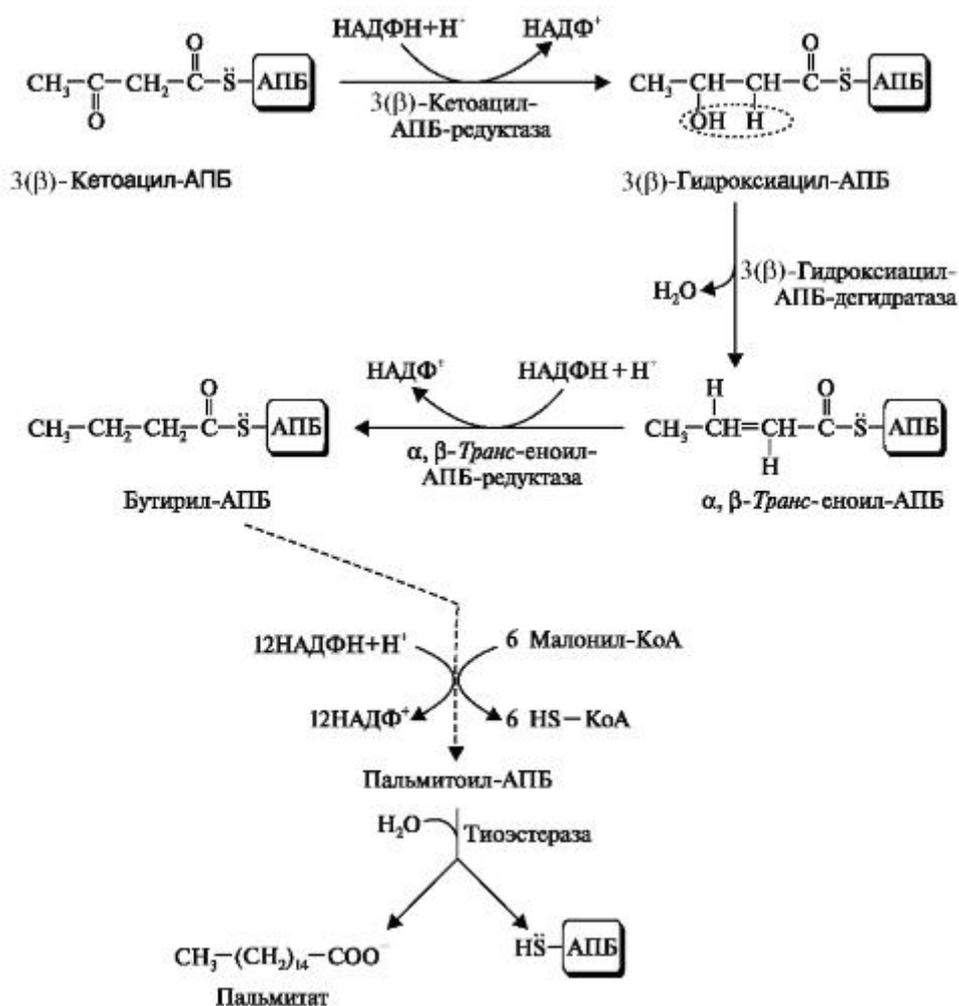


Рис. 14-22. Превращение β-кетоацила во втором домене пальмитатсинтазного комплекса и дальнейшие этапы синтеза пальмитиновой кислоты

Во втором домене молекула β-кетоацил-АПБ последовательно подвергается восстановлению, отщеплению молекулы воды от β-гидроксиацильного фрагмента с образованием двойной связи между α- и β-углеродными атомами и восстановлению двойной связи в α,β-транс-еноил-АПБ. В результате всех реакций образуется остаток кислоты, состоящий из четырех атомов углерода, - бутирил-АПБ.

К образованной молекулы бутирил-АПБ присоединяется новый малонильный остаток, и далее цикл снова повторяется. После семи оборотов цикла образуется молекула пальмитоил-АПБ. Пальмитоилэстераза в третьем домене гидролизует тиоэфирную связь в молекуле пальмитоил-АПБ, и свободная пальмитиновая кислота высвобождается из пальмитатсинтазного комплекса.

Последующее удлинение углеводородной цепи может происходить в эндоплазматическом ретикулуле или матриксе митохондрий путем присоединения в первом случае молекулы малонил-КоА, а во втором случае ацетил-КоА (рис. 14-23). Помимо стеариновой кислоты, в ткани мозга человека в ограниченном количестве могут образовываться жирные кислоты и с более длинной углеводородной цепью (C 22:0, C 24:0).

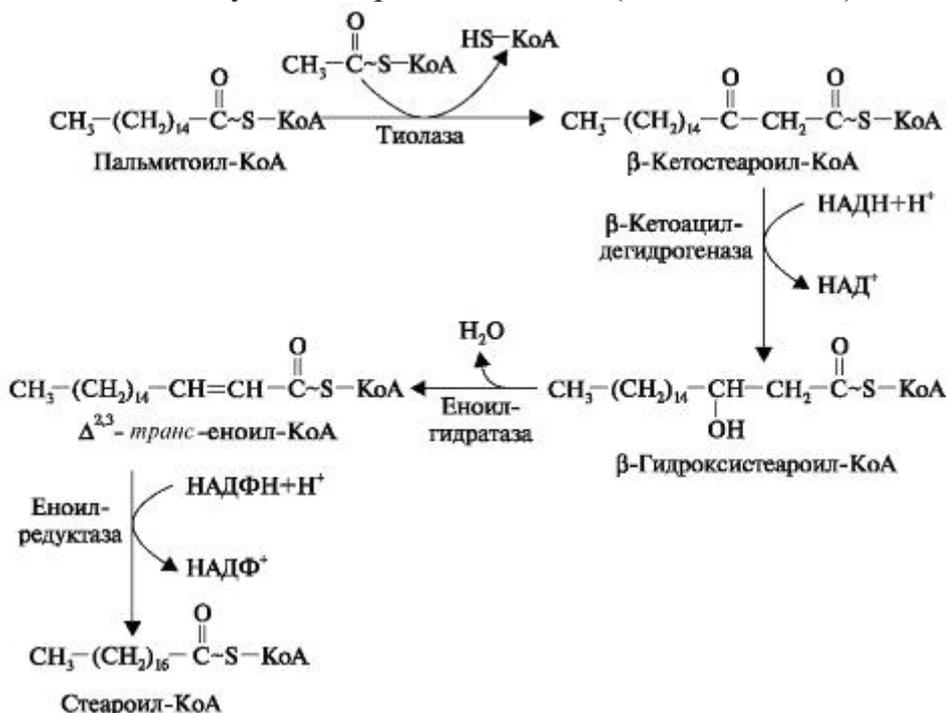


Рис. 14-23. Реакции удлинения углеводородной цепи жирной кислоты в матриксе митохондрий

### Регуляция биосинтеза и $\beta$ -окисления жирных кислот

Биосинтез жирных кислот и их распад находятся под контролем гормонов, промежуточных и конечных продуктов реакций. Соотношение скорости ферментативных реакций и их переключение с одного процесса на другой определяется в первую очередь количеством в клетке молекул АТФ и цитрата.

Как только в клетке возникает потребность в энергообеспечении, так включается  $\beta$ -окисление жирных кислот, и наоборот, при достаточном количестве молекул АТФ ацетил-КоА в составе цитрата покидает митохондрию. В цитоплазме цитрат вызывает объединение протомеров ацетил-КоА-карбоксилазы, что приводит к формированию активной формы фермента. Синтезированные новые молекулы мало-нил-КоА участвуют в синтезе жирной кислоты, а также ингибируют фермент

карнитинацилтрансферазу I. Транспорт жирных кислот в матрикс митохондрий прекращается, и их окисление становится невозможным. Однако при уменьшении количества молекул малонил-КоА перенос жирных кислот в матрикс митохондрий активируется, и затем начинается их распад. В то же время вновь синтезированная молекула пальмитоил-КоА по принципу обратной связи вызывает диссоциацию протомеров ацетилкарбоксилазы, и фермент становится неактивным (рис. 14-24).



Рис. 14-24. Регуляция биосинтеза и  $\beta$ -окисления жирных кислот

Активность ацетил-КоА-карбоксилазы также регулируется путем реакции фосфорилирования и дефосфорилирования. Под влиянием глюкагона или адреналина фермент фосфорилируется и становится неактивным. Под действием инсулина ацетилкарбоксилаза при участии протеинфосфатазы превращается в активную форму.

### ОБМЕН ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Полиненасыщенные жирные кислоты - линолевая (C 18:2) и линоленовая (C 18:3) - не синтезируются в организме человека. Эти кислоты, а также арахидоновая кислота (C 20:4) поступают в организм с продуктами питания, преимущественно с растительными маслами. Данные кислоты являются составной частью глицерофосфолипидов, участвующих в организации липидного бислоя мембран клеток.

#### Обмен арахидоновой кислоты

Арахидоновая кислота (эйкозотетраеновая) высвобождается из глицерофосфолипидов при действии фермента фосфолипазы A<sub>2</sub>, а также образуется из линолевой кислоты. Преобразование начинается в реакции

десатурации, затем в реакции элонгации образуется дигомо-γ-линолевая кислота (C 20:3 Δ8, 11, 14) и уже из нее - арахидоновая кислота.

Из полиненасыщенных жирных кислот, содержащих 20 углеродных атомов, образуются биологически активные вещества, получившие название эйкозаноидов (от *эйкозо* - двадцать). Они синтезируются во всех клетках, за исключением эритроцитов. К эйкозаноидам относят простагландины, простациклины, тромбоксаны, лейкотриены и липоксины. Различают 3 серии эйкозаноидов: из *дигомо-γ-линолевой кислоты* синтезируются простагландины первой серии, из *арахидоновой кислоты* - второй, а из *эйкозопентаеновой* (C 20:5) - третьей серии. Все простагландины относятся к гормонам местного действия. Они влияют на метаболические процессы клетки либо по аутокринному механизму (внутри клетки), либо по паракринному механизму, оказывая действие на окружающие клетки через образование вторичных посредников (см. главу 9).

В превращении арахидоновой кислоты в эйкозаноиды участвуют два основных фермента: *циклооксигеназа* (простагландин Н-синтаза) и *липоксигеназа*. При окислении эйкозотетраеновой кислоты циклооксигеназой синтезируются простагландины. В случае окисления арахидоновой кислоты липоксигеназой вначале образуются 5-, 12- или 15-гидроксиэйкозотетраеновые кислоты, служащие предшественниками про- и противовоспалительных эйкозаноидов (рис. 14-25).

Синтез лейкотриенов, липоксинов и гепоксилинов

Другая группа эйкозаноидов - лейкотриены синтезируются клетками белой крови, легких, селезенки, мозга, сердца (рис. 14-27). Первые две реакции в превращении арахидоновой кислоты в лейкотриены катализирует железосодержащий фермент - *5-липоксигеназа*.

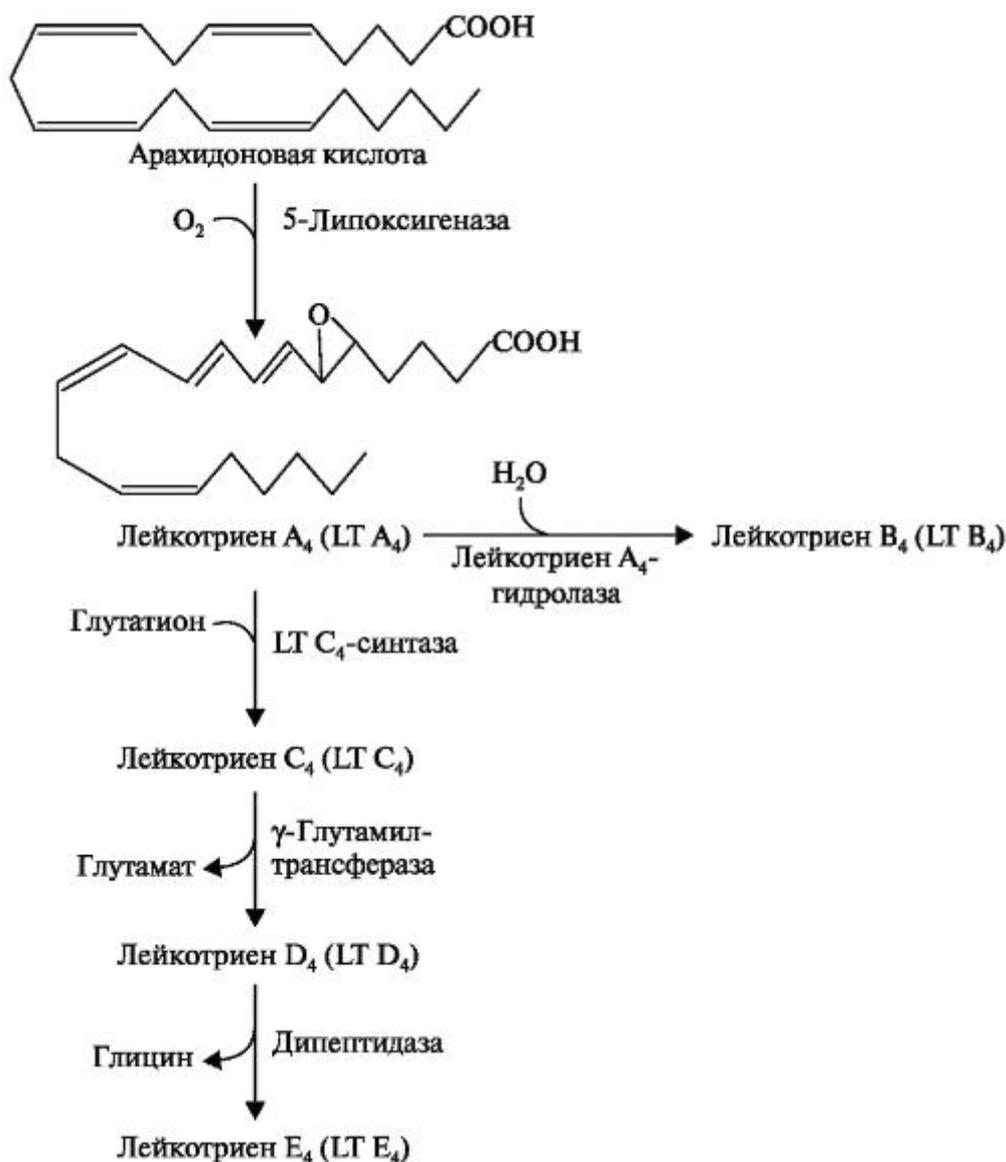


Рис. 14-27. Синтез различных лейкотриенов (схема)

Образующийся в этой реакции интермедиат - 5-гидропероксиэйкозотетраеновая кислота превращается затем в лейкотриен A<sub>4</sub>. В свою очередь, лейкотриен A<sub>4</sub> в реакции, катализируемой лейкотриен C<sub>4</sub>-синтазой и глутатион-S-трансферазой, превращается в пептидолейкотриен C<sub>4</sub>. Из лейкотриена C<sub>4</sub> в γ-глутамилтрансферазной реакции образуется лейкотриен E<sub>4</sub>. Он после отщепления глицина превращается в лейкотриен B<sub>4</sub>. Именно лейкотриен B<sub>4</sub> вызывает хемотаксис белых клеток крови к очагу воспаления.

В эндотелиальных и эпителиальных клетках из арахидоновой кислоты при участии ферментов 15-липоксигеназы и глутатионпероксидазы образуется 15-гидроксипероксиэйкозотетраеновая кислота. Включение молекулы воды в

ее структуру сопровождается появлением молекулы 15-липоксина A<sub>4</sub>. Все липоксины действуют как противовоспалительные субстанции.

#### *В записную книжку врача Лейкотриены*

Пептидолейкотриены C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> и E<sub>4</sub> являются компонентами так называемой медленно реагирующей субстанции анафилаксии. Эти вещества действуют в очень низкой концентрации и вызывают сокращение гладких мышц сосудов, дыхательных путей, тонкого кишечника. Их действие в 10 000 раз сильнее гистамина - известного стимулятора аллергических реакций. В дыхательной системе пептидолейкотриены вызывают не только сокращение бронхов, но и повышают секрецию слизи и, таким образом, выступают в качестве медиаторов в развитии бронхиальной астмы.

#### Окисление полиненасыщенных жирных кислот

Окисление полиненасыщенных жирных кислот происходит в митохондриях. Первые реакции сходны с процессом β-окисления насыщенных жирных кислот. После укорочения углеводородной цепи на 6 углеродов образуется молекула Δ<sup>3,4,6,7</sup>-цисеноил-КоА. Перемещение двойной связи под действием 3,4-цис-2,3-транс-изомеразы приводит к образованию молекулы Δ<sup>2,3</sup>-транс-еноил-КоА (рис. 14-28). В следующей реакции гидратации появляется молекула β-D-гидроксиацил-КоА, которую НАД<sup>+</sup>-зависимая ацил-КоА-дегидрогеназа не может использовать в качестве субстрата. Именно поэтому превращение β-D-гидроксиацил-КоА в L-изомер катализирует второй дополнительный фермент - эпимераза. Далее продолжаются реакции собственно β-окисления с высвобождением молекул ацетил-КоА.

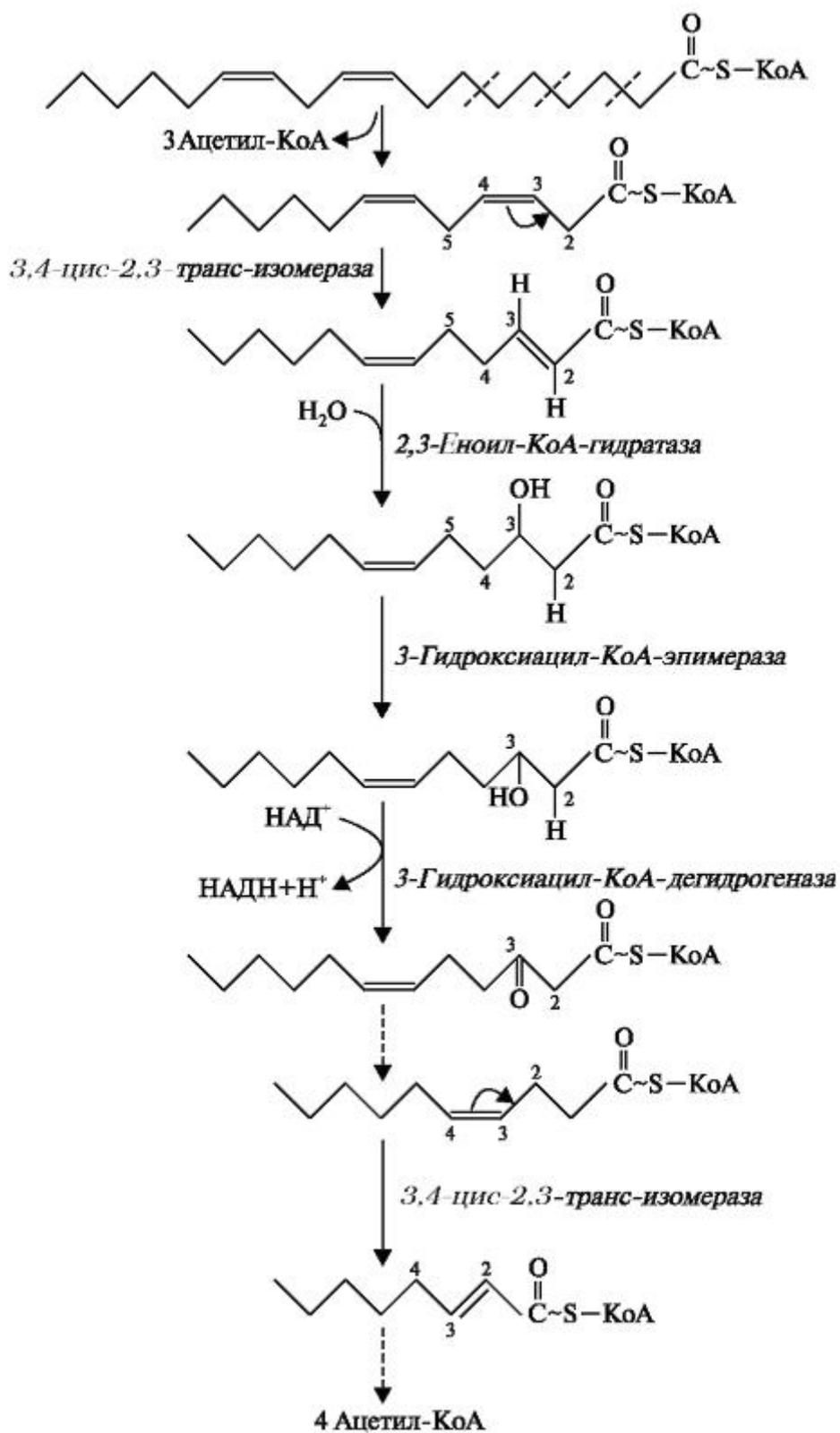


Рис. 14-28. Реакции окисления линолевой кислоты

## СИНТЕЗ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРОЛОВ

Синтез ТАГ наиболее активно происходит при избыточном поступлении в организм углеводов. Они синтезируются в цитоплазме адипоцитов, гепатоцитов, клеток лактирующих молочных желез и др. Вначале образуется молекула глицерол-3-фосфата, к которой затем присоединяются два активированных остатка жирных кислот. К первому углеродному атому глицерол-3-фосфата в большинстве случаев присоединяется насыщенная жирная кислота, а ко второму углеродному атому переносится остаток насыщенной или ненасыщенной жирной кислоты. В результате образуются молекулы фосфатидной кислоты (рис. 14-29).

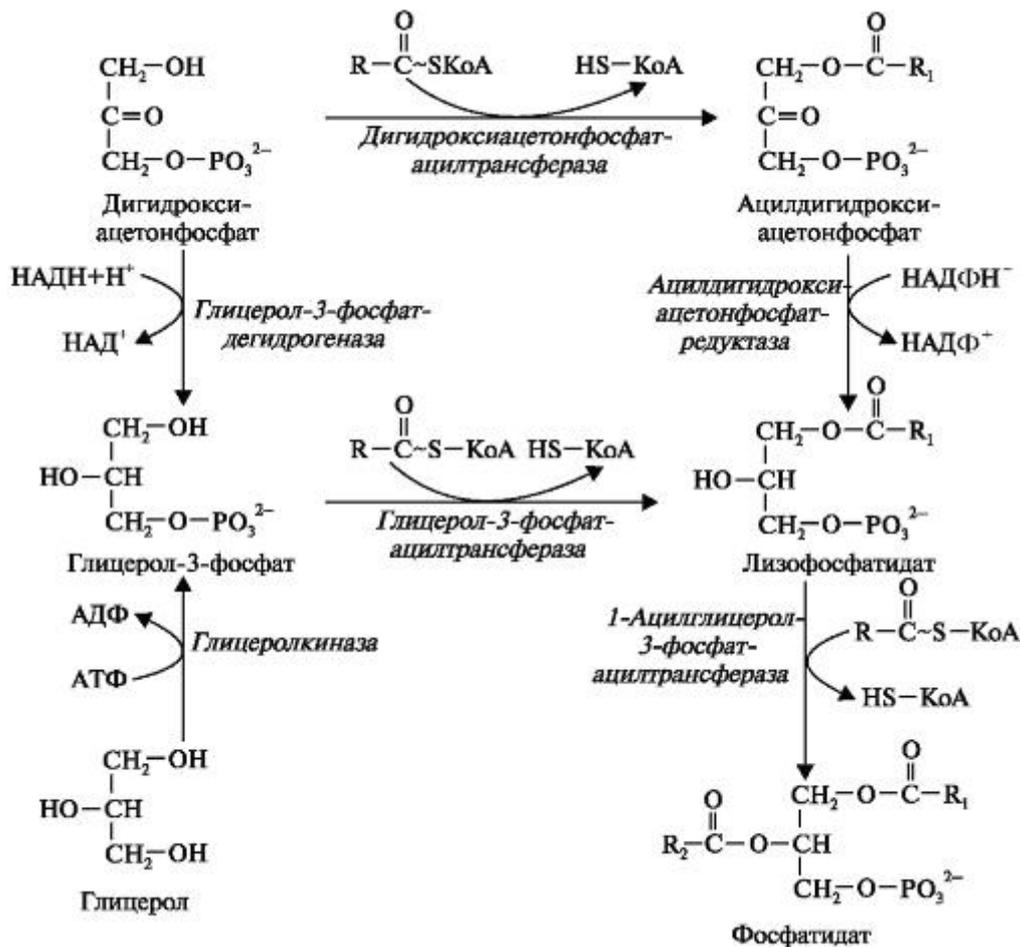


Рис. 14-29. Реакции синтеза фосфатидной кислоты

В клетках жировой ткани для синтеза ТАГ используется только промежуточный метаболит гликолиза - дигидроксиацетонфосфат, который при участии глицерол-3-фосфатдегидрогеназы восстанавливается до глицерол-3-фосфата. Кроме того, возможен перенос остатка жирной кислоты

непосредственно на молекулу дигидроксиацетонфосфата. В этом случае образуется ацилгидроксиацетонфосфат, который затем восстанавливается в реакции, катализируемой НАДФН-зависимой редуктазой. Далее к молекуле лизофосфатидной кислоты присоединяется второй остаток жирной кислоты, а в следующей реакции молекула фосфатидной кислоты дефосфорилируется и образуется молекула 1,2-диацилглицерола. С присоединением третьего остатка жирной кислоты синтез молекулы ТАГ завершается (рис. 14-30).

Рис. 14-30. Синтез триацилглицерола из молекулы фосфатидной кислоты

*В записную книжку врача Ожирение*

Жировая ткань у мужчин составляет 15-20% общей массы тела, а у женщин - 20-25%. При повышенном синтезе ТАГ наблюдается отложение жиров в подкожной клетчатке, вокруг внутренних органов. Такое состояние обозначают термином «ожирение». Различают первичное и вторичное ожирение. Первичное ожирение развивается вследствие генетических дефектов, повышенного потребления питательных веществ - углеводов и липидов, а также низкой физической активности. Вторичное ожирение чаще всего развивается в результате основного соматического заболевания, главным образом вследствие поражения эндокринной системы.

В регуляции массы тела участвует множество гормонов, одним из которых является белок лептин (молекулярная масса - 16 кДа), вырабатываемый в жировых клетках. Его уровень повышается с увеличением массы тела. Снижение массы тела на 10% приводит к уменьшению уровня лептина на 53%. Напротив, увеличение массы тела на 10% сопровождается повышением концентрации лептина в крови на 300%. Высокий уровень лептина объясняют неспособностью этого белка проникать в гипоталамус, где он связывается со специфическими рецепторами и подавляет секрецию нейропептида Y, вызывающего чувство голода и потребность в приеме пищи.

## ОБМЕН ФОСФОЛИПИДОВ

Фосфолипиды, представленные глицерофосфолипидами и сфинголипидами, в организме человека выполняют пластические функции. Они определяются преимущественно, в составе биологических мембран и липопротеинов плазмы крови.

## Синтез глицерофосфолипидов

Синтез глицерофосфолипидов, как и ТАГ, проходит через образование фосфатидной кислоты. Затем в ходе отщепления фосфата от фосфатидной кислоты образуется 1,2-диацилглицерол.

Для синтеза фосфатидилэтаноломинов, фосфатидилсеринов и фосфатидилхолинов, помимо молекул 1,2-диацилглицерола, нужны активные формы холина, серина и этаноламина в виде ЦДФ-производных.

Образование ЦДФ-этаноломина, а также ЦДФ-холина или ЦДФ-серина начинается с реакции фосфорилирования молекул этаноламина, серина, холина, а затем образовавшиеся фосфоэтанолмин, фосфосерин или фосфохолин переносятся на молекулы ЦТФ. Далее этаноламин, серин или холин от молекул ЦДФ-этаноломина, ЦДФ-холина или ЦДФ-серина переносятся на молекулу 1,2-диацилглицерола, и процесс завершается образованием соответствующего глицерофосфолипида (рис. 14-31).

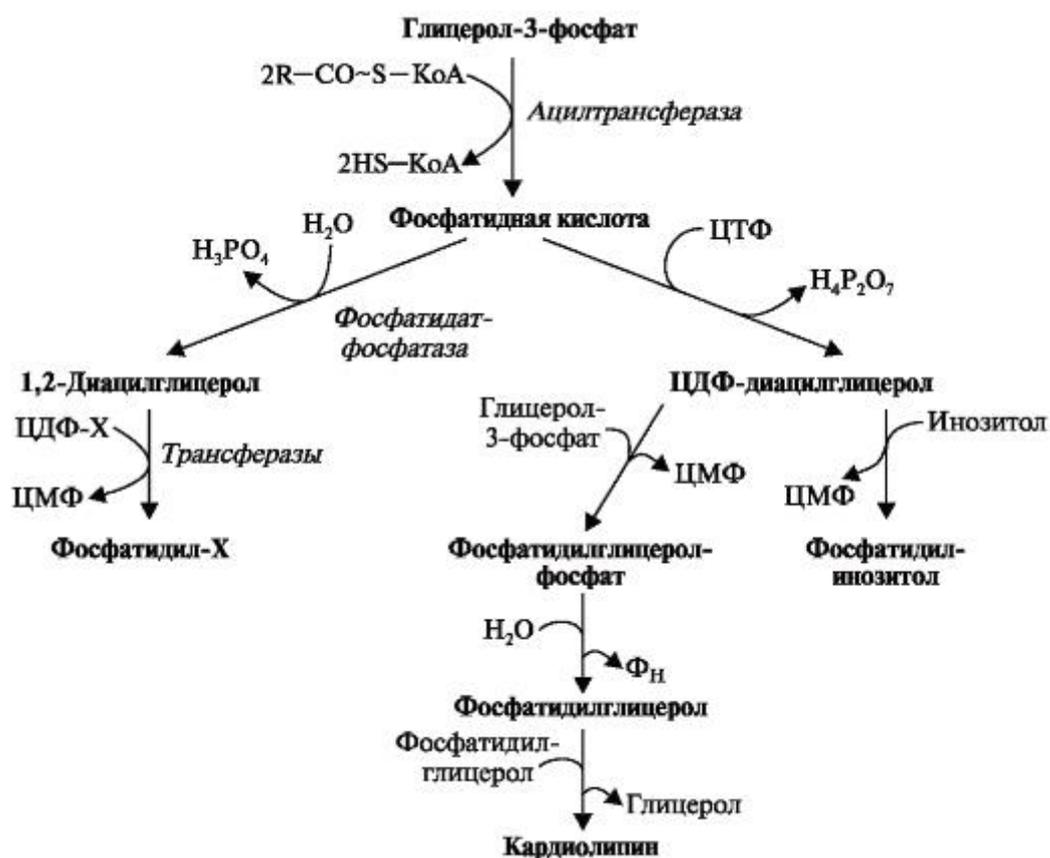


Рис. 14-31. Синтез глицерофосфолипидов (схема). Фосфатидил-X соответствует либо фосфатидилэтанолмину, либо фосфатидилсерину, либо фосфатидил-холину

В свою очередь, синтезированная молекула фосфатидилэтаноламина может выступать в качестве предшественника фосфатидилхолина. В этом случае образование фосфатидилхолина происходит путем метилирования с использованием метальных групп S-аденозилметионина. В другой реакции замена этаноламина остатком серина приводит к образованию фосфатидилсерина. В свою очередь, декарбоксилирование серина в реакции, катализируемой пиридоксальфосфатзависимой декарбоксилазой, сопровождается образованием фосфатидилэтаноламина (рис. 14-32).

Реакция обмена серина и этаноламина позволяет образовывать цикл, в котором постоянно поддерживается уровень фосфатидилэтано-ламина, необходимого для синтеза фосфатидилхолина.

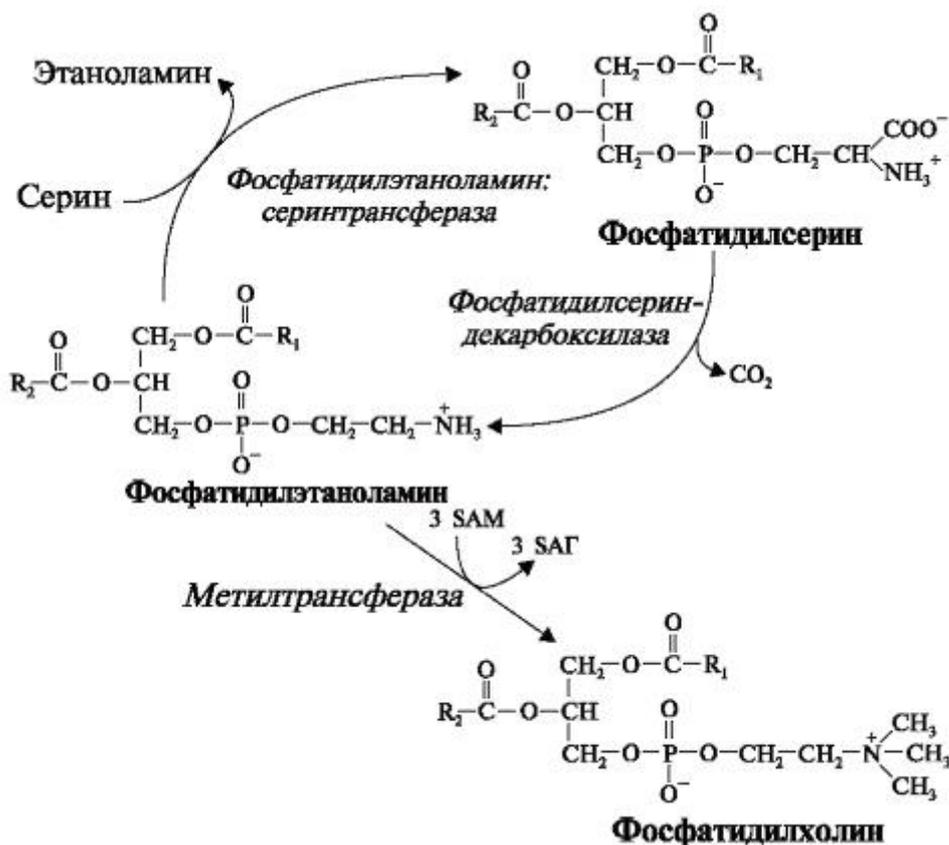


Рис. 14-32. Синтез фосфатидилсеринов, фосфатидилэтанолламинов, фосфатидилхолинов. SAM-S-аденозилметионин, SAH-S-аденозилгомоцистин

*В записную книжку врача*

### Жировая инфильтрация печени

В случае недостаточного количества в гепатоцитах метионина, фосфосерина, фосфоэтаноламина, витамина В<sub>12</sub> и фолиевой кислоты, снижения активности

ферментов вследствие поражения печени этанолом, четыреххлористым углеродом, перенесенного гепатита активно синтезируется ТАГ, а не глицерофосфолипиды. Это не позволяет сформироваться везикулам в аппарате Гольджи, ТАГ не покидают печень и остаются в цитоплазме гепатоцитов.

Вещества, участвующие в синтезе глицерофосфолипидов, называют липотропными факторами, поскольку они препятствуют жировой инфильтрации печени.

*В записную книжку врача*

Липопротеины плазмы крови и атеросклероз

Установлено, что атеросклероз и связанные с ним заболевания протекают при значительном повышении содержания в плазме крови фракций ЛПОНП и ЛПНП. Сами по себе нативные ЛПНП и ЛПОНП атерогенностью не обладают. Атерогенность у этих классов липопротеинов возникает только тогда, когда их аполипопротеины подвергаются перекисному окислению. Химически измененные липопротеины называют окисленными. В отличие от ЛПНП и ЛПОНП, ЛПВП выполняют антиатерогенную функцию, поскольку они участвуют в образовании этерифицированных холестерина и передают их на другие липопротеины. Именно поэтому чем выше уровень ЛПВП в крови, тем меньше вероятность развития атеросклероза. Присутствующие в артериальной стенке окисленные ЛПНП быстро и бесконтрольно захватываются макрофагами. Макрофаги, захватившие модифицированные липопротеины или иммунные комплексы («липопротеинантитело»), накапливают в цитоплазме чрезвычайно высокие концентрации этерифицированного и свободного холестерина 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 холестерол. Последующие пролиферация гладких мышечных клеток, синтез фибробластами коллагена и эластина и образование соединительнотканной (фиброзной) капсулы направлены на изоляцию холестериновых отложений. В развитии атеросклеротических бляшек также большая роль принадлежит матриксным металлопротеиназам (ММП), участвующим в деградации белков межклеточного матрикса, а также высокие количества глюкозы, синтез дефектных коллагенов.

Для оценки риска развития рассчитывают коэффициент атерогенности (КА).

$$\text{КА} = \frac{\text{Холестерол общий} - \text{Холестерол ЛПВП}}{\text{Холестерол ЛПВП}} \leq 3$$

В норме КА менее, равен 3,0. По мере развития атеросклеротического процесса данный коэффициент увеличивается.

## ГЛАВА 15. КАТАБОЛИЗМ БЕЛКОВ

Вопросы по теме

- Протеолитические ферменты желудочно-кишечного тракта и их активация.
- Гидролиз белков в желудочно-кишечном тракте.
- Гниение белков.
- Внутриклеточный протеолиз.
- Ограниченный протеолиз.
- Регуляция активности тканевых протеиназ.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ПИЩЕВЫХ БЕЛКОВ

У взрослого человека суточное потребление белка составляет в среднем 80-120 г. Оно определяется характером деятельности (меньше для лиц умственного труда и больше для людей, занятых физической работой) и пищевой ценностью белков. Различают полноценные и неполноценные пищевые белки. Полноценные белки состоят из заменимых и незаменимых аминокислот, которые должны обязательно поступать с пищей. В состав белков входит 21 аминокислота, 8 из них - абсолютно незаменимые (валин, лейцин, изолейцин, треонин, фенилаланин, лизин, метионин и триптофан), а 2 - условно незаменимые (аргинин и гистидин). В белках важно также соотношение заменимых и незаменимых аминокислот. Поступающие с пищей белки должны полностью подвергаться гидролизу в пищеварительной системе.

## ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ

Расщепление пищевых белков в полости рта невозможно, так как отсутствуют гидролизующие их ферменты. Оно начинается в желудке, где соляная кислота, вырабатываемая обкладочными клетками, создает оптимальные значения pH, необходимые для активации и работы гидролизующего белки фермента пепсина. В этих клетках присутствует большое количество митохондрий, где образуются молекулы эндогенной воды и  $\text{CO}_2$ . Механизм секреции соляной кислоты схематично показан на рис. 15-1. Сначала при участии активной (фосфорилированной формы) карбоангидразы происходит гидратация молекулы  $\text{CO}_2$  с образованием угольной кислоты. Далее в ходе диссоциации молекул  $\text{H}_2\text{CO}_3$  высвобождаются  $\text{HCO}_3^-$  и протоны. С помощью мембранной  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы протоны транспортируются в просвет желудка. Ионы  $\text{HCO}_3^-$  в обмен на ионы хлора по анионным каналам удаляются в плазму крови, а хлорид-ионы из клетки переносятся в просвет желудка по  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ -транспортеру. В результате действия всех транспортных систем концентрация протонов в желудочном соке возрастает в несколько раз, что и обеспечивает его подкисление до уровня pH 1,5-2,5.

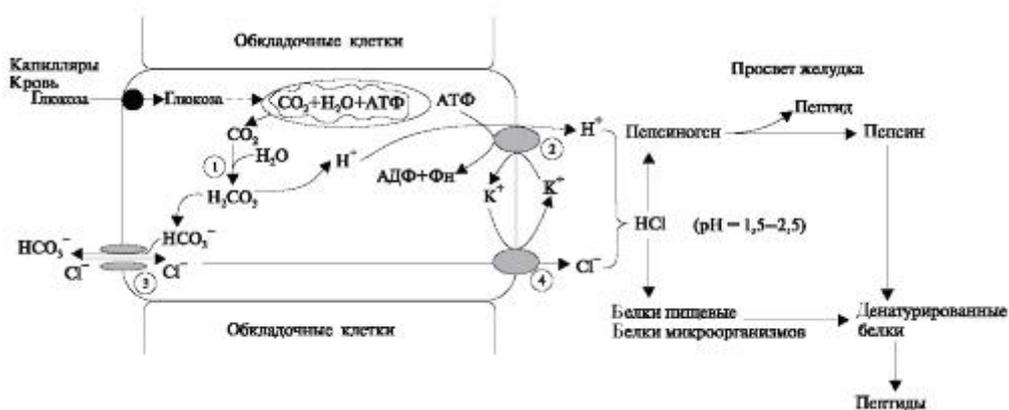


Рис. 15-1. Секреция и действие соляной кислоты в желудке: 1 - карбоангидраза; 2 -  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза; 3 - анионный канал; 4 -  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ -транспортер

В полости желудка соляная кислота вызывает денатурацию пищевых белков, что облегчает их распад, поскольку вследствие тепловой и кислотной обработки в развернутой белковой молекуле увеличивается доступ протеиназам к пептидным связям в глубине белка. Кроме того, соляная кислота оказывает бактерицидное действие и создает оптимальное значение pH для проявления активности протеолитических ферментов в желудке, регулирует поступление пищевой массы из желудка в просвет

двенадцатиперстной кишки. Она необходима для активации фиксированного на энтероцитах фермента энтерокиназы. В случае отсутствия HCl не образуется гликопротеин (внутренний фактор Касла), необходимый для всасывания витамина B<sub>12</sub>. От воздействия соляной кислоты слизистую оболочку желудка защищают высокополимерные гликопротеины - *муцины*, образующие сильно гидратированный слой слизи. Эти белки выделяются *добавочными клетками* желудочного эпителия.

*Главные клетки* слизистой оболочки желудка секретируют основной протеолитический фермент - *пепсиноген*. Активный центр пепсиногена закрыт N-концевым фрагментом, состоящим из 42 аминокислотных остатков. Под действием HCl, вследствие конформационной перестройки белка, происходит разблокировка активного центра, и далее образовавшийся активный пепсин начинает отщеплять от молекулы пепсиногена мешающий N-концевой пептид. Образовавшиеся молекулы активного пепсина катализируют превращение новых порций пепсиногена в активную форму - пепсин. Данная реакция получила название *аутокатализ*. Под действием пепсина, осуществляющего расщепление внутренних пептидных связей, происходит фрагментация молекул белка на пептоны, которые поступают в

начальном отделе тонкого кишечника (в двенадцатиперстной кишке) ферменты, выделившиеся из поджелудочной железы, продолжают дальнейший гидролиз белков. Эти ферменты также вырабатываются в виде неактивных предшественников - трипсиногена, химотрипсиногена и др. Активация проферментов поджелудочной железы начинается с превращения трипсиногена в трипсин при участии энтеропептидазы, удаляющей с N-конца молекулы пептид из 6 аминокислотных остатков.

Активный трипсин, в свою очередь, активирует все другие проферменты поджелудочной железы, в том числе и новые порции трипсиногена (рис. 15-2).

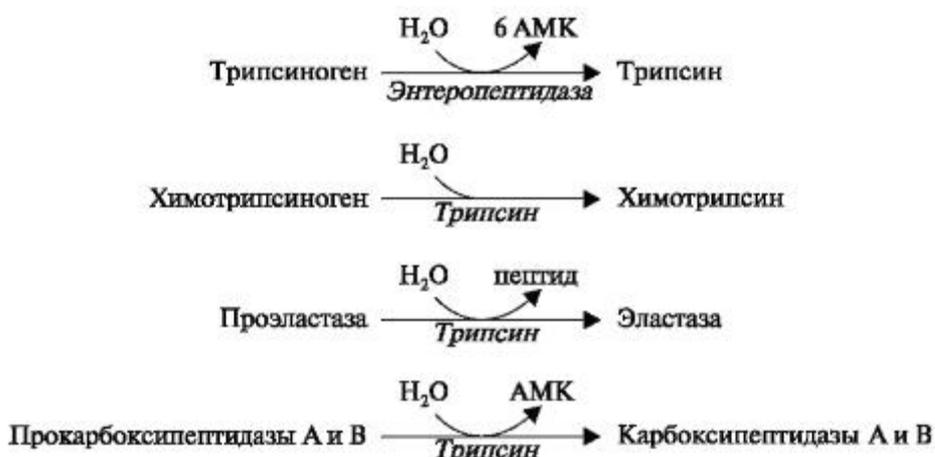
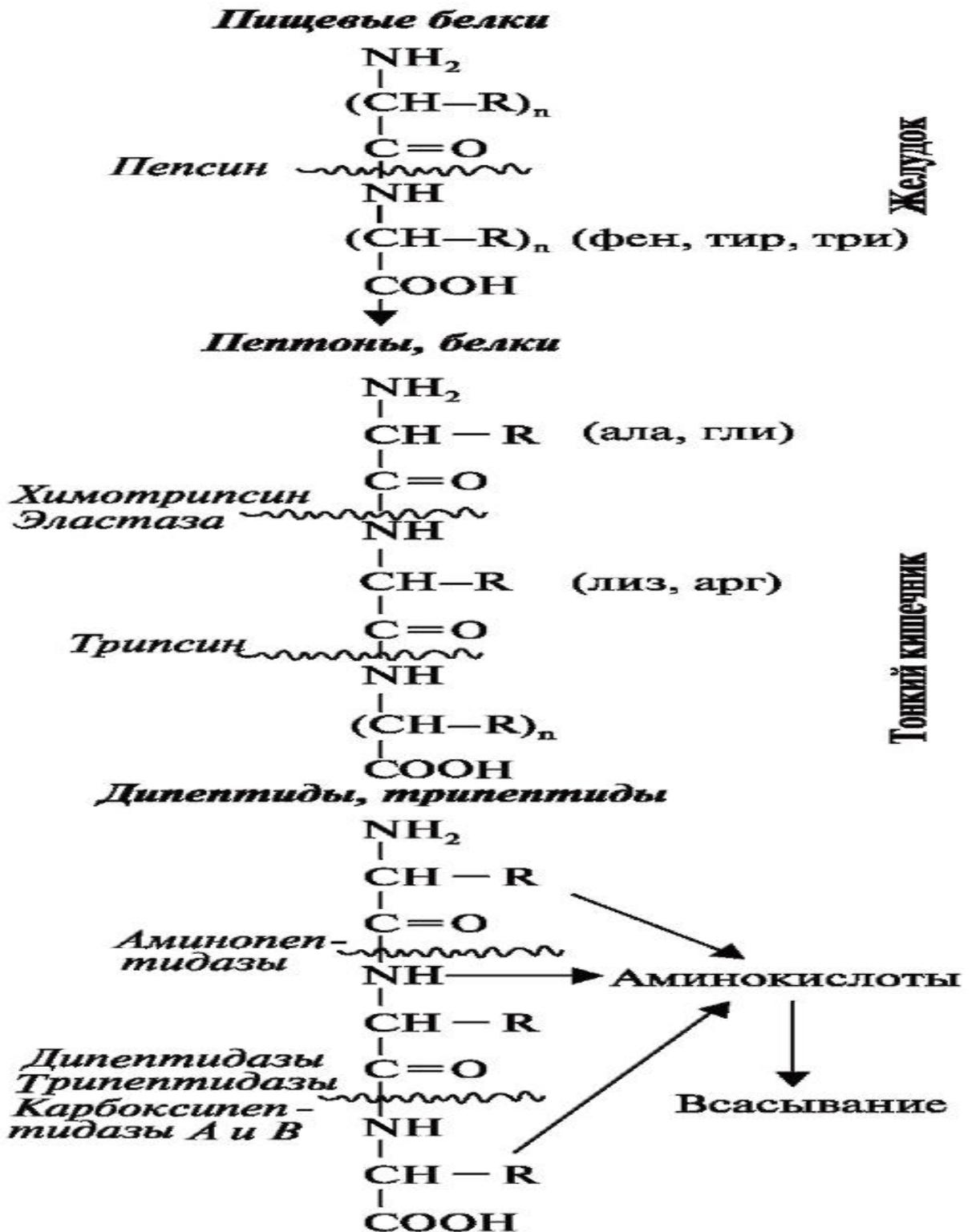


Рис. 15-2. Образование активных форм протеолитических ферментов в двенадцатиперстной кишке



*Химотрипсиноген* под действием трипсина расщепляется на отдельные фрагменты, в результате образуются активный химотрипсин. Остальные проферменты - *проэластаза* и *прокарбоксипептидазы А и В* также активируются трипсином путем ограниченного протеолиза с образованием эластазы и карбоксипептидаз А и В.

*Активный трипсин* гидролизует в пищевых белках связи, в образовании которых участвуют карбоксильные группы лизина или аргинина, а химотрипсин расщепляет пептидные связи, образованные при участии карбоксильных групп аминокислот с гидрофобными радикалами.

*Активная эластаза* - единственный фермент, способный расщеплять эластин и коллаген в желудочно-кишечном тракте. Кроме того, она может гидролизировать и другие белки, содержащие в своем составе глицин, аланин и серин. Панкреатические карбоксипептидазы представлены карбоксипептидазой А, отщепляющей от белковой молекулы с С-конца аминокислоты с гидрофобными радикалами, и карбоксипептидазой В, удаляющей с С-конца остатки лизина или аргинина.

Из двенадцатиперстной кишки пищевой химус поступает в тощую, далее в подвздошную кишку, где происходит дальнейший гидролиз пептонов. Процесс переваривания белков завершается при участии активных аминопептидаз, отщепляющих аминокислоты с N-конца, а также ди- и трипептидаз. Образующиеся аминокислоты всасываются в тонком кишечнике.

#### Всасывание аминокислот

Всасывание аминокислот в тонком кишечнике обеспечивается несколькими системами. Аминокислоты пересекают две мембраны энтероцитов: апикальную и базолатеральную. Каждую группу аминокислот переносят в эпителиальные клетки специальные транспортные системы, включая  $\text{Na}^+$ -зависимый симпорт (см. главу 8). В плазматических мембранах клеток слизистой оболочки тощей кишки обнаружено не менее пяти специфических белков-транспортёров, которые переносят определенные группы аминокислот. Часть всосавшихся аминокислот поступает в лимфу, а остальные - в кровь. Помимо аминокислот, в энтероциты может транспортироваться небольшое количество ди- и олигопептидов, которые гидролизуются внутриклеточными пептидазами.

## Белковая недостаточность

*Алиментарный фактор.* Нарушения обмена белков в первую очередь встречаются вследствие дефицита белка в пище, возникающего при полном или частичном голодании, однообразном питании с преобладанием белков растительного происхождения. Причинами белкового голодания также являются нарушения усвоения белков, связанные с патологией желудочно-кишечного тракта и хроническими заболеваниями, которым сопутствует понижение аппетита. Дефицит белка в организме сопровождается развитием отрицательного азотистого баланса, гипопроотеинемией (снижением количества белка в плазме крови до 30 г/л) и нарушением коллоидно-осмотического и водно-солевого обмена.

В целом белковая недостаточность приводит к системным метаболическим нарушениям, опосредованным снижением скорости обновления белков, дисрегуляции синтеза и активности ферментов. В результате нарушения синтеза ферментов страдает не только белковый, но и липидный, и углеводный обмен. Все вышеперечисленные изменения в обмене белков сопровождаются повышением в плазме крови количества свободных аминокислот, и их экскреция с мочой достигает до 20-30 г/сут (при норме 10 г/сут). В плазме крови и моче при этой патологии определяют также снижение количества мочевины.

*В записную книжку врача* Квашиоркор

При тяжелой форме пищевой недостаточности возникает заболевание, названное «квашиоркор» (в переводе с этнического языка африканского племени Га - недоедание). В этом случае клинически диагностируют поражение печени, подавление иммунитета, атрофию мышц и появление отеков. Случаи квашиоркора чаще встречаются в тропических странах, где пища (главным образом, плоды и овощи) не богата белками.

Распад аминокислот под действием микроорганизмов

Процесс бактериального разложения аминокислот в толстой кишке называют *гниением*. При отщеплении карбоксильной группы от аминокислот лизина и орнитина образуются активные диамины - *кадаверин* и *путресцин* (рис. 15-3).

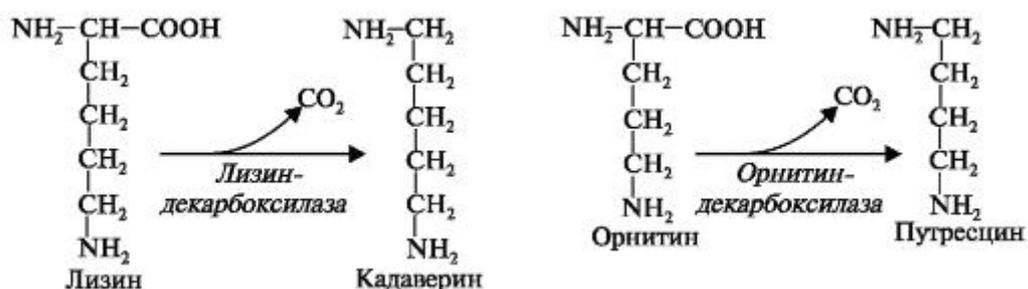


Рис. 15-3. Образование диаминов в толстой кишке

Из цистина, цистеина и метионина при бактериальном разложении высвобождаются *сероводород* ( $\text{H}_2\text{S}$ ), *метилмеркаптан* ( $\text{CH}_3\text{SH}$ ) и другие соединения. В ряде последовательных реакций тирозин преобразуется в *крезол* и *фенол*, а триптофан - в *скатол* и *индол* (рис. 15-4).

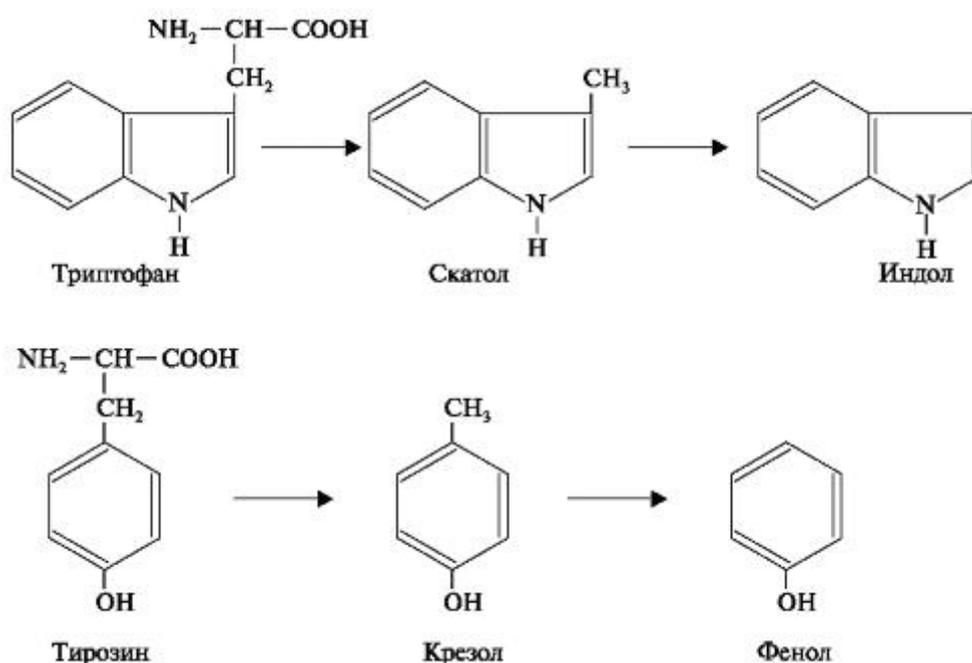


Рис. 15-4. Превращение ароматических аминокислот в толстом кишечнике при участии бактериальных ферментов

#### *В записную книжку врача*

В ротовой полости и желудке в норме отсутствуют условия для развития гнилостной микрофлоры. Однако при воспалении тканей пародонта (пародонтите) формируются патологические пародонтальные карманы, содержащие в большом количестве разнообразную микрофлору (зубной налет). В зубном налете из аминокислот в анаэробных условиях образуются  $\text{H}_2\text{S}$ , аммиак, крезол, фенол, метилмеркаптан, индол, скатол,

низкомолекулярные органические кислоты, летучие альдегиды и кетоны. Они придают неприятный запах дыханию (галитоз). Сходные изменения происходят и в желудке в случае отсутствия в желудочном соке соляной кислоты.

#### Обезвреживание продуктов гниения

Продукты гниения обладают токсическими свойствами. Обезвреживание большинства этих токсических соединений происходит в печени в реакции конъюгации (от лат. *conjugatio* - соединение), т.е. связывания с серной или глюкуроновой кислотами с образованием нетоксичных парных кислот (рис. 15-5). В качестве донора глюкуроновой кислоты выступает УДФ-глюкуроновая кислота, а серной кислоты - 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат (ФАФС).

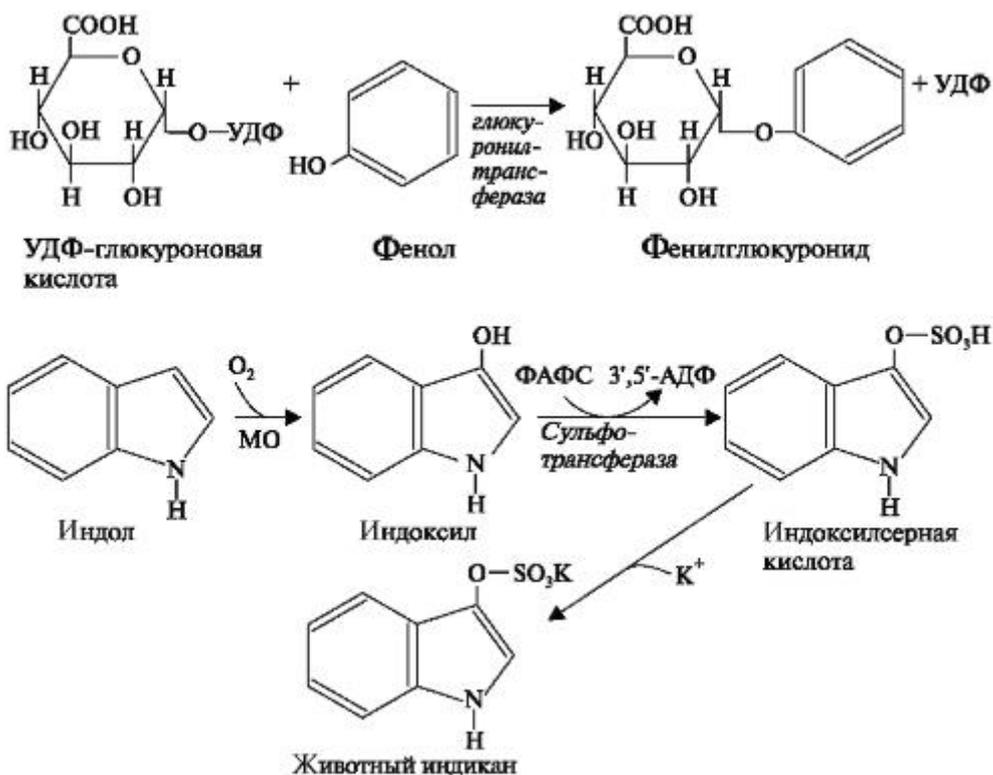


Рис. 15-5. Обезвреживание продуктов гниения в гепатоцитах. МО - микросомальное окисление; УДФ - уридиндифосфат; ФАФС - 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат

Индол и скатол вначале окисляются с образованием соответственно индоксила и скатоксила, и только затем они подвергаются конъюгации. Конъюгированные соединения переносятся из печени в кровь и через почки

выводятся с мочой. Калиевую соль индоксилсерной кислоты называют *животным индиканом*.

Бензойная кислота, образующаяся из фенилаланина, в печени связывается с глицином. Реакция протекает с затратой АТФ в присутствии HS-КоА. Конечный продукт реакции - гиппуровая кислота, также выделяется с мочой (рис. 15-6).

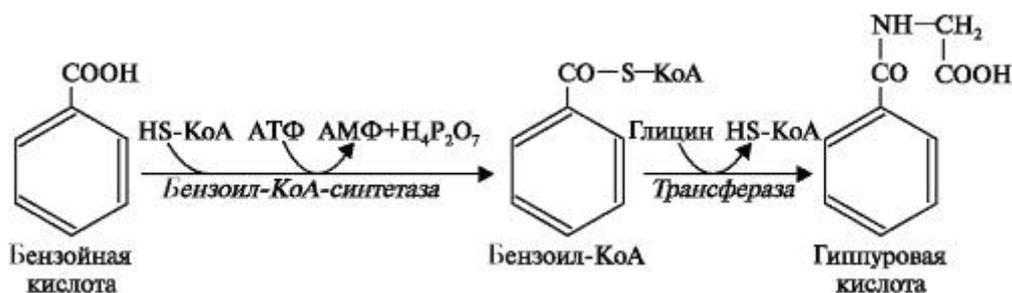


Рис. 15-6. Обезвреживание бензойной кислоты в печени

#### *В записную книжку врача*

Обезвреживающую функцию гепатоцитов оценивают по количеству гиппуровой кислоты в моче

Количество животного индикана в моче увеличивается при воспалении слизистой оболочки толстого кишечника и активации процессов гниения.

По скорости образования и выделения гиппуровой кислоты с мочой (в норме составляет 0,7 г/сут) после приема бензойной кислоты в дозе 1 г (проба Квика-Пытеля) обычно судят об обезвреживающей функции гепатоцитов.

#### Распад тканевых белков

Белки организма непрерывно подвергаются обновлению с заменой отживших свой срок молекул вновь синтезированными. Об этом процессе судят по так называемому периоду полусуществования (или времени полужизни), т.е. времени, необходимому для обновления половины имеющихся белковых молекул. Наиболее медленно (до 6 мес) обновляются структурные белки - мышечные, коллаген и др. Белки плазмы крови и гепатоцитов обновляются в течение 7-14 сут, а регуляторные белки - за очень короткое время (часы и даже минуты).

Распад тканевых белков обозначают термином «*тканевый протеолиз*». В деградации белковых молекул тканей и жидкостей участвуют ферменты

класса гидролаз протеиназы и пептидазы. Протеиназы (называемые также эндопептидазами) катализируют реакцию гидролиза внутренних пептидных связей, пептидазы (экзопептидазы) - внешних. По строению активного центра протеиназы разделяют на несколько групп:

- *сериновые* протеиназы, у которых в каталитическом центре присутствуют аминокислотные остатки серина, гистидина или глутамата;
- *цистеиновые*, или *тиоловые*, протеиназы, в активном центре этих ферментов находятся остатки цистеина;
- *аспартильные* протеиназы, каталитический центр которых включает два остатка аспарагиновой кислоты;
- *металлопротеиназы*, получившие свое название из-за нахождения в активном центре фермента ионов  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ . Они присутствуют в межклеточном матриксе соединительной ткани.

#### Распад белков в лизосомах

Белки, подлежащие расщеплению, поглощаются гепатоцитами из плазмы крови путем эндоцитоза. В первую очередь это белки, лишенные галактозы, сиаловых кислот, а также содержащие аминокислотные остатки, подвергшиеся свободно-радикальному окислению. Распад белков в гепатоцитах происходит преимущественно в лизосомах при участии лизосомальных пептидаз. Среди них преобладают аспартильные эндопептидазы (катепсин D) и цистеиновые протеиназы (катепсины B, L, H и др.), которые гидролизуют пептидные связи внутри белковой молекулы. Все эти ферменты активны только в кислой среде (pH 3,8-6,0), и каждый из этих ферментов обладает довольно широкой субстратной специфичностью по отношению к гидролизуемым пептидным связям, что позволяет расщеплять белки до относительно коротких пептидов. Дальнейший гидролиз этих пептидов происходит в цитоплазме под действием олиго-, ди- и экзопептидаз. Катепсины локализованы не только в лизосомах гепатоцитов, но и в гранулах клеток крови - гранулоцитах.

*В записную книжку врача*

## Распад белков при патологии

Усиленный распад белковых молекул наблюдают при раневых инфекциях, остеомиелите, длительных незаживающих язвах, травмах, гипоксии и других состояниях.

## Гидролиз белка в протеасомах

В цитоплазме клеток расположены особые мультикаталитические надмолекулярные комплексы - *протеасомы*. Они участвуют в деградации отслуживших свой срок (состарившихся) и аномальных белков.

В составе протеасомы имеется эндопептидазный комплекс - полая цилиндрическая структура, внутри которой и происходит расщепление белков. Она образована 28 субъединицами и характеризуется константой седиментации 20S, поэтому ее и называют 20S протеасома. К каждому концу ее цилиндра присоединены два регуляторных 19S комплекса, «запирающих» цилиндрическую структуру 20S (рис. 15-7). Протеасома поочередно отщепляет от попадающего в ее полость белка пептиды длиной от 3 до 22 аминокислотных остатков.

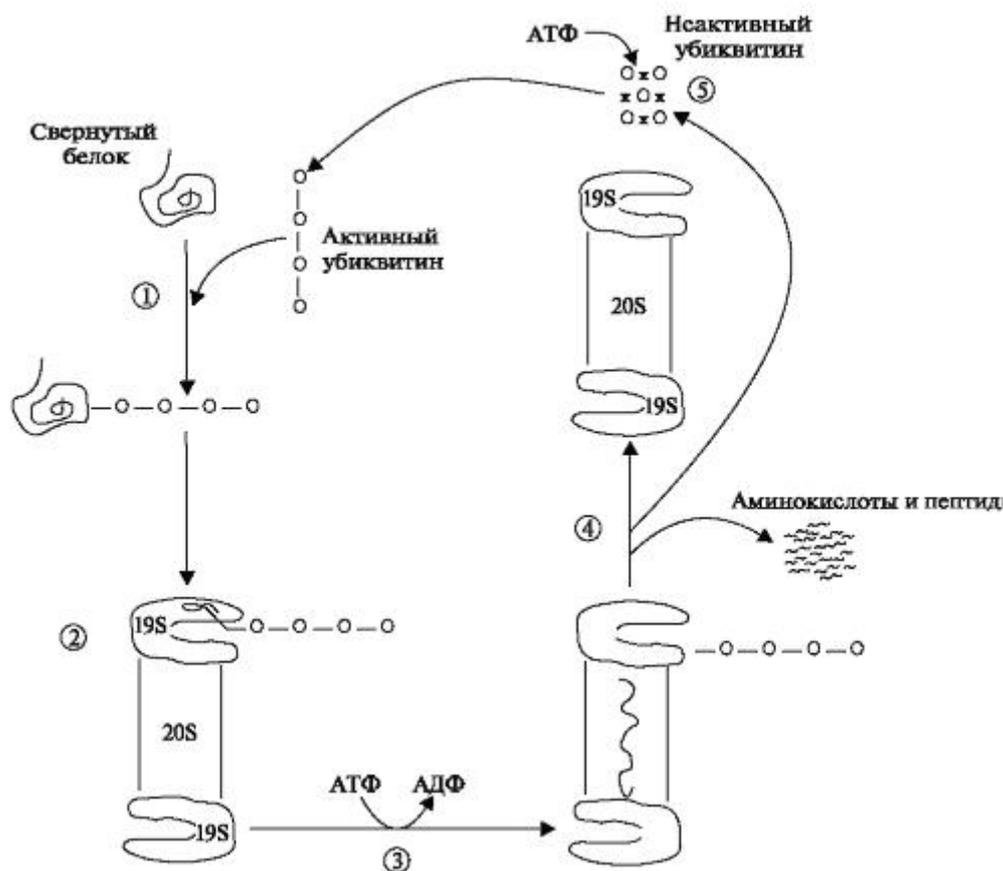


Рис. 15-7. Гидролиз белка в протеасомах. Этапы распада белка: 1 - связывание белка с убиквитином; 2 - связывание убиквитированного белка с протеасомой; 3 - развертывание убиквитированного белка; 4 - гидролиз белка в 20 S-протеасоме и высвобождение продуктов деградации белка (пептидов и аминокислот); 5 - активация убиквитина

Белки, подлежащие протеасомной деградации, предварительно ковалентно связываются с небольшим белком убиквитином (от англ. *ubiquitous* - «вездесущий»), найденным практически во всех эукариотических клетках. Прикрепленный убиквитин является своеобразным пропуском в полость протеасомы, а также способствует развертыванию белковой глобулы, что облегчает гидролиз внутренних пептидных связей в белке-мишени. Процесс убиквитинирования протекает в несколько стадий. Вначале в АТФ-зависимой реакции происходит активация убиквитина, катализируемая убиквитин-активирующим ферментом, а затем с помощью двух ферментов (убиквитин-конъюгирующего и убиквитинлигазы) формируется пептидная связь между концевой карбоксильной группой убиквитина и  $\epsilon$ -аминогруппой лизина белка-мишени. Убиквитированные белковые молекулы попадают вовнутрь ядра (20 S), где они и расщепляются. Убиквитин при этом не разрушается и используется повторно.

Катаболизм белков межклеточного матрикса

В катаболизме белков клеток и межклеточного матрикса соединительной ткани основная роль принадлежит матриксным металлопротеиназам (ММП, матриксины). Известны более 20 различных металлопротеиназ, которые на основании структурной организации и субстратной специфичности разделены на четыре основных подсемейства:

- *коллагеназы* - запускающие гидролиз спиральной области коллагенов I, II и III типа;
- *желатиназы* - гидролизующие коллаген базальных мембран;
- *стромелизины* - расщепляющие коровые белки протеогликанов и целый ряд адгезивных белков межклеточного матрикса;
- *металлоэластазы* - расщепляющие пептидные связи в эластине.

Ограниченный протеолиз белков

Ограниченным протеолизом называют процесс расщепления одной или нескольких пептидных связей в молекуле белка.

Он необходим не только для активации протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта. В плазме крови присутствуют белки системы свертывания крови, фибринолиза, комплемента, предшественники вазоактивных пептидов и др. Как правило, образование активных молекул в этих системах происходит в виде *каскадного протеолиза*. Вначале определенное вещество запускает ограниченный протеолиз первого участника (белка), что приводит к образованию активной протеиназы. Она, в свою очередь, участвует в ограниченном протеолизе другого белка и появляется новая активная протеиназа. На конечном этапе в результате каскадного протеолиза образуется конечный продукт, который и выполняет определенную функцию.

В клетках ограниченный протеолиз - одна из наиболее общих форм посттрансляционной модификации новосинтезированных полипептидных цепей (см. главу 21). Ограниченный протеолиз играет важную роль в образовании различных гормонов из белков предшественников. Например, в результате ограниченного протеолиза белка гипофиза препроопиомеланокортина образуется целое семейство пептидных гормонов (см. главу 21), а отщепление С-пептида из проинсулина приводит к образованию инсулина.

*В записную книжку врача* Апоптоз клеток

*Апоптоз клеток* - запрограммированная гибель клеток, позволяющая удалить состарившиеся клетки или клетки с поврежденным геномом. Процесс запускается либо под влиянием внутренних факторов (цитохрома *c*, апоптозиндуцирующего фактора - АИФ и др.), либо после связывания определенных пептидов и белков (фактора некроза опухоли, фактора роста нервов и др.) с рецепторами на поверхности клетки. Апоптоз протекает с фрагментацией ядер и распадом макромолекул клетки. Данный процесс невозможен без участия специфических аспартатцистеиновых протеиназ, названных каспазами (от англ. аббревиатуры *caspase* - cysteine-dependent aspartate specific protease). Апоптотический сигнал приводит к активации прокаспаз-8 и -9, а образуемые из них активные каспазы активируют другие, так называемые эффекторные протеиназы - каспазы-3, -6, -7.

## Регуляция активности протеиназ

В клетках организма при физиологических условиях активность протеолитических ферментов незначительна, так как существует целый ряд регуляторных механизмов, защищающих белки от их воздействия. Известно:

- количество протеиназ зависит от уровня экспрессии кодирующих их генов.
- протеиназы пространственно изолированы от тех белков, на которые могут подействовать протеиназы. Например, кислые пептидазы заключены в лизосомах, а нейтральные - в цитоплазматических гранулах.
- клеточные протеиназы и ММП синтезируются в виде проферментов. Во всех этих белках-предшественниках активный центр экранирован фрагментом полипептидной цепи. Активация профермента происходит путем последовательного отщепления части белковой молекулы.
- активность протеиназ подавляется эндогенными белковыми ингибиторами. Они присутствуют как в клетках, так и в плазме крови и других биологических жидкостях.

Кроме того, защите белка-субстрата способствует включение в его молекулу дополнительных групп, прикрывающих пептидные связи внутри белковой молекулы. Например, в процессе посттрансляционной модификации белки подвергаются гликозилированию. Расположенные на поверхности белка олиго- и полисахаридные цепи затрудняют доступ протеиназ к пептидным связям. Защита белков может обеспечиваться присоединением к их свободным аминогруппам остатков уксусной кислоты (ацетилирование), амидирования карбоксильной группы белка или фосфорилирования радикалов серина и тирозина.

## Белковые ингибиторы протеиназ

Эндогенные ингибиторы протеиназ - особые белки или пептиды, вырабатываемые различными клетками, которые могут связываться с протеиназами и блокировать их активность. Эти ингибиторы обладают специфичностью к определенному классу протеиназ. Так, активность *цистеиновых протеиназ* подавляется низкомолекулярными белками семейства цистатинов, которые в клетках печени представлены *стефинами*, а в слюне - слюнными цистатинами. Активность ММП регулируется тканевыми ингибиторами матриксных металлопротеиназ

(ТИМП). ТИМП способны связываться как с активными, так и неактивными формами ММП. В плазме крови распространены ингибиторы *сериновых протеиназ* -  $\alpha_1$ -антитрипсин,  $\alpha_1$ -антихимотрипсин, антитромбин и антиплазмин. Универсальным ингибитором, способным инактивировать многие протеиназы всех 4-х групп, является  $\alpha_2$ -макроглобулин. Из-за своей особенности строения активного центра, он может «заманивать» протеиназы. Расщепляя пептидные связи активного центра ингибитора, протеиназа попадает в «ловушку». Комплекс ингибитора с ферментом поглощается макрофагами или другими клетками, где и подвергается протеолизу.

*В записную книжку врача*

При воспалении гранулоциты, лизосомы и другие клетки высвобождают большое количество протеолитических ферментов. Это приводит к нарушению структуры и функции белковых молекул, а также незапрограммированному распаду (некрозу) клеток.

## ГЛАВА 16. ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ

Вопросы по теме

- Транспорт аминокислот в клетку.
- Трансаминирование и дезаминирование аминокислот.
- Биосинтез мочевины в печени.
- Обмен безазотистого остатка аминокислот. Гликогенные и кетогенные аминокислоты.
- Декарбоксилирование аминокислот.
- Обмен глицина и серина.
- Обмен метионина и его роль в реакциях метилирования.
- Роль лизина, пролина и аргинина в обменных процессах.
- Обмен фенилаланина и тирозина.
- Патология обмена отдельных аминокислот.

### ТРАНСПОРТ АМИНОКИСЛОТ В КЛЕТКУ

В результате распада пищевых и тканевых белков, синтеза заменимых аминокислот создается пул свободных L-аминокислот. Часть из них метаболизируется по месту распада белков, другая - попадает в кровь, а затем захватывается клетками. Транспорт аминокислот внутрь клетки происходит

чаще всего как симпорт аминокислоты и ионов натрия. Известно шесть транспортных систем (транслоказ), которые осуществляют перенос близких по строению аминокислот:

- нейтральных аминокислот с небольшим радикалом - аланина, серина, триптофана;
- гидрофобных и ароматических аминокислот - валина, лейцина, изолейцина, метионина, фенилаланина, тирозина;
- отрицательно заряженных аминокислот - аспарагиновой и глутаминовой;
- положительно заряженных аминокислот - лизина, аргинина;
- пролина;
- $\beta$ -аминокислот -  $\beta$ -аланина и таурина.

Известен и другой механизм активного транспорта аминокислот через плазматическую мембрану -  $\gamma$ -глутамильный цикл (рис. 16-1). Роль переносчика в этом цикле выполняют трипептид глутатион и фермент  $\gamma$ -глутамилтрансфераза (транспептидаза), который локализуется в цитоплазматической мембране.

АМК

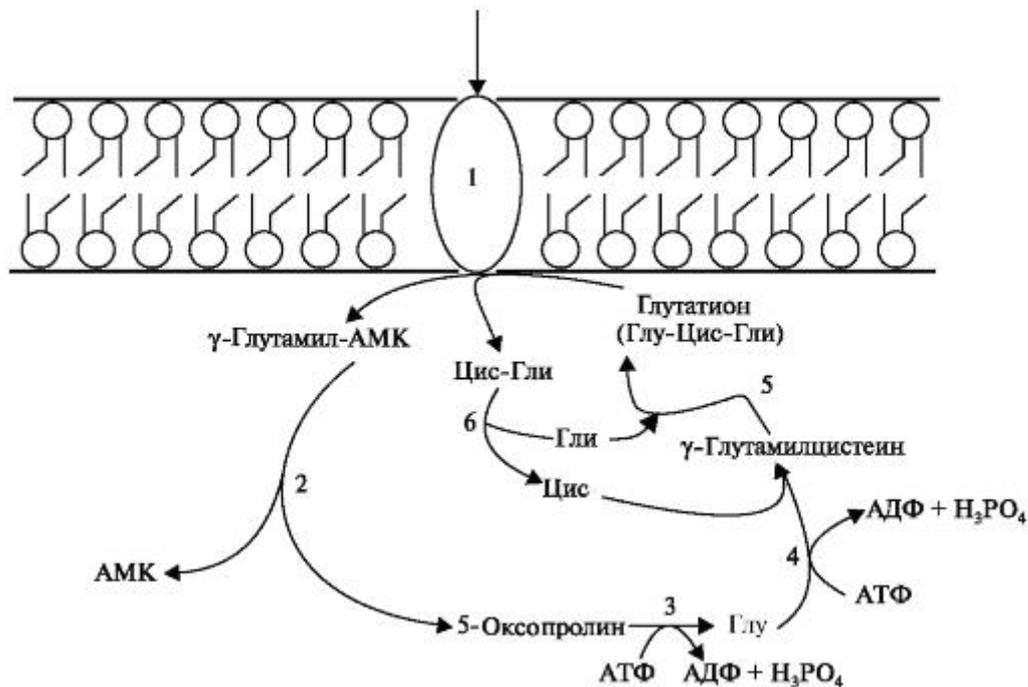


Рис. 16-1.  $\gamma$ -Глутамильный цикл. Ферменты: 1 -  $\gamma$ -глутамилтрансфераза; 2 -  $\gamma$ -глутамилциклотрансфераза; 3 - 5-оксипролиназа; 4 -  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетаза; 5 - глутатионсинтетаза; 6 - пептидаза. АМК - аминокислота

Под действием этого фермента от внутриклеточного трипептидаглутатиона, состоящего из глутаминовой кислоты, цистеина и глицина на внеклеточную аминокислоту переносится  $\gamma$ -глутамильная группа. Затем внутри клетки  $\gamma$ -глутамил-аминокислота распадается на свободную аминокислоту и 5-оксопролин, который в АТФ-зависимой реакции превращается в глутаминовую кислоту. В последующих трех реакциях, протекающих с затратой АТФ, вновь образуется глутатион, участвующий в поступлении новых порций аминокислот.

*В записную книжку врача*

Определение активности  $\gamma$ -глутамилтрансферазы в клинической практике

Токсическое поражение клеток мозга, печени, кишечника алкоголем и другими соединениями сопровождается выходом  $\gamma$ -глутамил-трансферазы в плазму крови. Определение активности этого фермента в плазме крови используют в клинической практике для оценки степени повреждения клеток, в том числе гепатоцитов.

## МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ

Одна часть аминокислот в клетке расходуется на синтез белков и пептидов, а другая - на образование таких небелковых соединений, как гем, азотистые основания, глюкоза, липиды и др. (рис. 16-2).

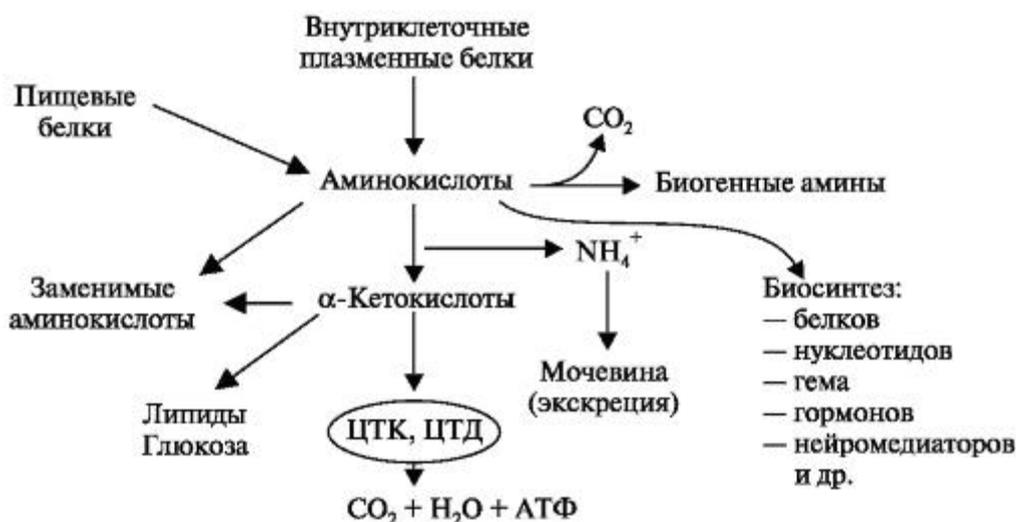


Рис. 16-2. Метаболические превращения аминокислоты в клетке (схема): ЦТК - цикл трикарбоновых кислот; ЦТД - цепь тканевого дыхания

Следует отметить, что аминокислоты в свободном виде не запасаются и в норме превращаются в общие промежуточные метаболиты, такие, как пируват, оксалоацетат, ацетил-КоА и 2-оксоглутарат.

Существуют общие реакции катаболизма аминокислот, в которых затрагивается только общая часть молекулы (амино- и карбоксильные группы), а также специфические реакции распада аминокислоты, связанные с превращением ее радикала.

#### Дезаминирование аминокислот

Катаболизм аминокислоты начинается с дезаминирования, т.е. отщепления аминогруппы в виде молекулы аммиака. В результате этой реакции высвобождаются  $\alpha$ -кетокислоты или другие метаболиты, которые включаются в общие пути метаболизма. Дезаминирование бывает прямым и непрямым. Следует отметить, что большинство аминокислот подвергается непрямому дезаминированию, и лишь глицин, серин, треонин, гистидин, глутамат и цистеин дезаминируются прямым путем.

#### Прямое дезаминирование

Прямым называют дезаминирование, в котором отщепление аммиака происходит в одну реакцию. Прямое дезаминирование бывает окислительным и неокислительным.

Окислительное дезаминирование начинается с дегидрирования субстрата с образованием иминокислоты, которая в присутствии воды распадается на аммиак и  $\alpha$ -кетокислоту. Таким образом, в организме человека дезаминируется глутаминовая кислота.

Окислительное дезаминирование глутаминовой кислоты происходит в матриксе митохондрий гепатоцитов с большой скоростью с участием фермента глутаматдегидрогеназы. В качестве акцептора водорода выступает НАД<sup>+</sup>. Эта реакция обратима, поэтому при увеличении в клетке количества аммиака возможно его связывание с 2-оксоглутаровой кислотой, и реакция сдвигается в сторону образования глутамата (рис. 16-3).

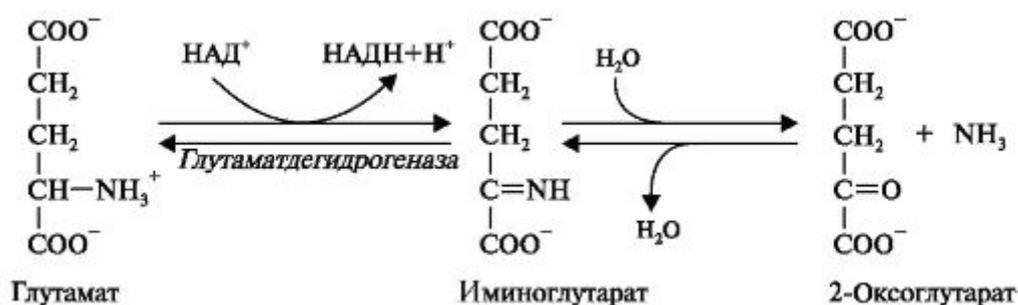


Рис. 16-3. Реакция окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты

*Регуляция активности глутаматдегидрогеназы.* Молекула

глутаматдегидрогеназы представляет собой олигомер, состоящий из шести субъединиц. В качестве аллостерических регуляторов глутаматдегидрогеназы выступают АДФ, ГДФ и НАДН, которые ингибируют активность фермента, а высокие концентрации АДФ, ГДФ и НАД<sup>+</sup>, наоборот, повышают. Фермент выполняет важную регуляторную функцию не только в распаде аминокислот, но и энергетическом обмене, так как образовавшийся 2-оксоглутарат используется в качестве субстрата цикла трикарбоновых кислот.

Окислительное дезаминирование других аминокислот. В окислительном дезаминировании других аминокислот могут участвовать оксидазы природных, протеиногенных L-изомеров аминокислот, но они имеют оптимум рН действия в щелочной среде (рН 10,0), а при физиологических значениях рН среды их активность снижается в 10 раз. Именно поэтому прямого окислительного дезаминирования L-аминокислот с участием оксидаз, за исключением глицина (рис. 16-4), не происходит.

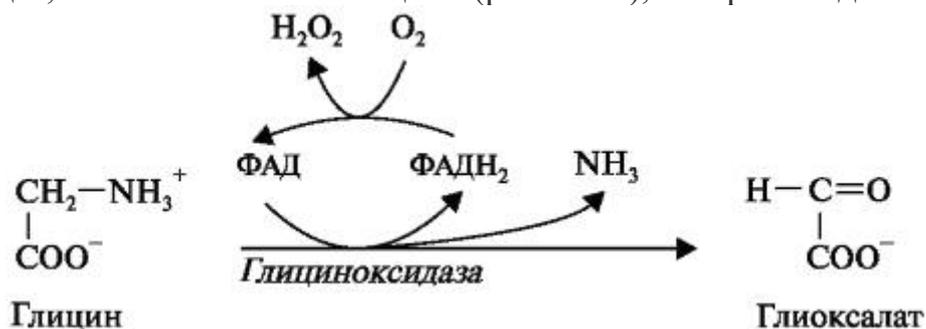


Рис. 16-4. Реакция окислительного дезаминирования глицина

*В записную книжку врача* Оксидазы аминокислот

В белках организма человека отсутствуют D-аминокислоты, но при физиологических значениях рН активны их оксидазы. Предполагают, что эти

ферменты необходимы для метаболических превращений D-аминокислот, попавших в организм с вирусами, бактериальными или опухолевыми клетками.

Неокислительное дезаминирование. Неокислительному дезаминированию подвергаются серин, треонин, цистеин и гистидин. В удалении аминогруппы из молекулы гистидина участвует гистидаза (гистидинаммиаклиаза). Реакция происходит путем внутримолекулярной перестройки молекулы без участия воды (рис. 16-5).

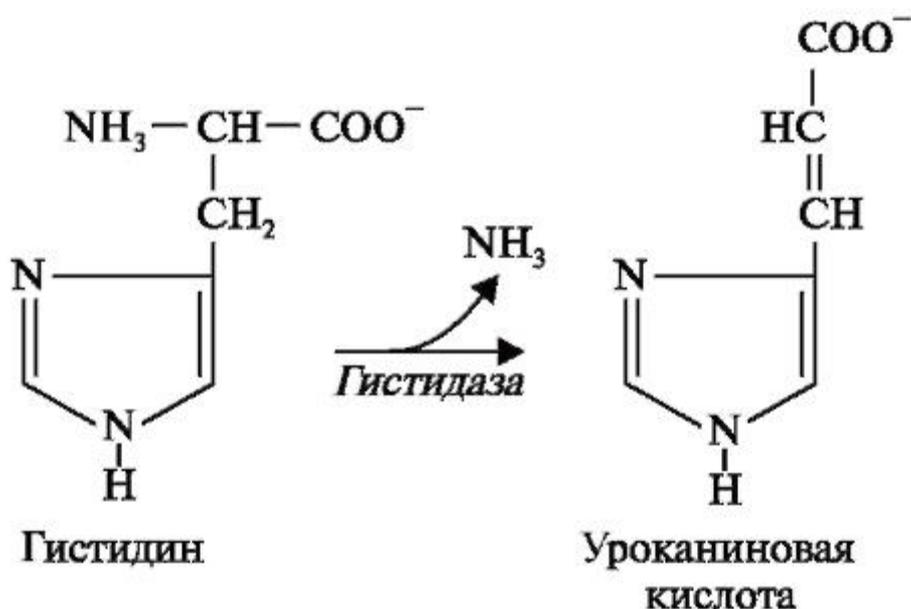


Рис. 16-5. Неокислительное внутримолекулярное дезаминирование гистидина

Дезаминирование серина и треонина катализирует серинтреонин-дегидратаза (рис. 16-6). Лишь в первой стадии фермент катализирует реакцию дегидратации, а превращение аминокриловой кислоты в пируват происходит без участия катализатора.

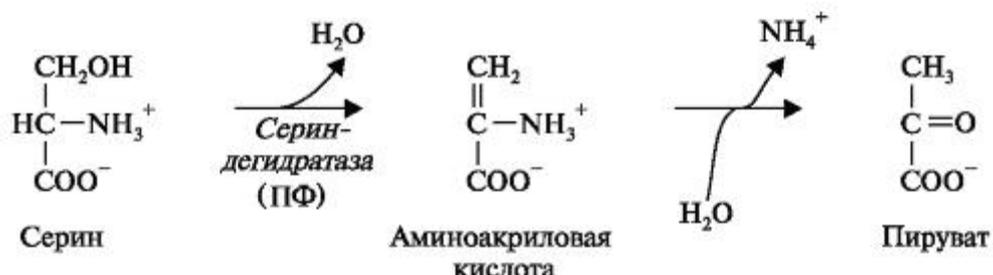


Рис. 16-6. Неокислительное дезаминирование серина. ПФ - пиридоксальфосфат

*В записную книжку врача*

Гистидаза присутствует только в гепатоцитах и клетках кожи.

Образовавшаяся в реакции уроганиновая кислота находится в секрете потовых желез и способна подвергаться изомеризации под воздействием ультрафиолетовых лучей. Поглощая энергию ультрафиолетовых лучей, уроганиновая кислота тем самым защищает кожный покров от повреждающего действия ультрафиолета. В норме гистидаза в плазме крови отсутствует и определяется в ней только при поражении печени.

Трансаминирование аминокислот

Реакции трансаминирования считают универсальными для всех живых организмов. В них осуществляется межмолекулярный перенос аминогруппы от аминокислоты на  $\alpha$ -кетокислоту без промежуточного высвобождения свободного аммиака. Они протекают при участии специфических цитозольных и митохондриальных ферментов, называемых *аминотрансферазами* либо *трансаминазами*. Все трансаминазы отличаются по своей специфичности к различным аминокислотам.

В реакциях трансаминирования участвуют почти все аминокислоты, исключение составляют лизин, треонин и пролин. Наиболее активно трансаминированию подвергаются аланин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты, содержание которых в тканях значительно выше остальных аминокислот. Основные  $\alpha$ -кетокислоты, участвующие в трансаминировании, - пируват, оксалоацетат и 2-оксоглутарат. В активном центре трансаминаз присутствует пиридоксаль-5-фосфат (активная форма витамина В<sub>6</sub>), прочно связанный с лизином.

*Механизм пиридоксаль-зависимого трансаминирования* предложили отечественные ученые А.Е. Браунштейн и М.М. Шемякин, а также американский биохимик Э. Снелл. Согласно этому механизму, трансаминирование протекает в две стадии. Вначале активная альдегидная группа пиридоксальфосфата взаимодействует с аминогруппой аминокислоты с образованием иминной связи - шиффова основания.

В результате аминокислота дезаминируется с образованием  $\alpha$ -кетокислоты, а кофермент переходит в форму пиридоксаминфосфата. Вторая стадия начинается с образования шиффова основания между пиридоксаминфосфатом и  $\alpha$ -кетокислотой - акцептором  $\text{MN}_2$ -группы. Эта

стадия является обратной первой стадии и завершается образованием из  $\alpha$ -кетокислоты соответствующей аминокислоты и регенерацией пиридоксальфосфата.

*Значение трансаминирования.* В организме человека наиболее активны две трансаминазы - аланинаминотрансфераза (АЛТ) и аспартатамино-трансфераза (АСТ) (рис.16-7). При участии трансаминаз из  $\alpha$ -кетокислот синтезируются необходимые организму заменимые аминокислоты, а также происходит перераспределение аминного азота в органах и тканях. Функциональное значение трансаминирования в различных тканях неодинаково. Так, значительная часть азота аминокислот работающей мышцы приходится на аминокислоту аланин, которая синтезируется в реакциях трансаминирования пирувата, образуемого из глюкозы. Затем аланин поступает в кровь и поглощается печенью, где вновь в реакции трансаминирования превращается в пируват, а он, в свою очередь, вовлекается в процесс глюконеогенеза. Таким образом, аланин выступает главной транспортной формой азота из мышц, а в печени является ключевым предшественником глюкозы аминокислотного происхождения.

Рис. 16-7. Реакции дезаминирования аланина и аспартата с участием аланинаминотрансферазы (а) и аспартатамино-трансферазы (б); ПФ - пиридоксальфосфат

Одна и та же реакция трансаминирования в разных отсеках одной клетки может протекать в противоположных направлениях. Например, реакция трансаминирования, катализируемая АСТ и составляющая часть малатаспартатного челночного механизма, протекает в противоположных направлениях в матриксе митохондрий и цитоплазме.

*В записную книжку врача*

Диагностическое исследование трансаминаз

В медицинской практике для оценки состояния печени и миокарда определяют активность АСТ и АЛТ. В норме активность АЛТ и АСТ в сыворотке крови составляет около 40 МЕ/л, а соотношение АСТ/АЛТ (коэффициент де Ритиса) равно  $1,33 \pm 0,4$ . При заболеваниях печени наблюдают резкое повышение активности АЛТ (АСТ/АЛТ  $< 0,6$ ), а при

инфаркте миокарда наибольшие изменения выявляют в активности АСТ (АСТ/АЛТ >2).

Реакции трансаминирования также являются частью непрямого дезаминирования аминокислот, которое наиболее интенсивно протекает в печени и мышцах.

### Непрямое дезаминирование аминокислот

В отличие от глутаминовой кислоты, серина, треонина, гистидина, цистеина и глицина, аминогруппа других аминокислот в гепатоцитах превращается в аммиак в результате последовательного действия аминотрансфераз (трансаминирования) и глутаматдегидрогеназы (рис. 16-8). Такой способ дезаминирования аминокислот называется *непрямым*.

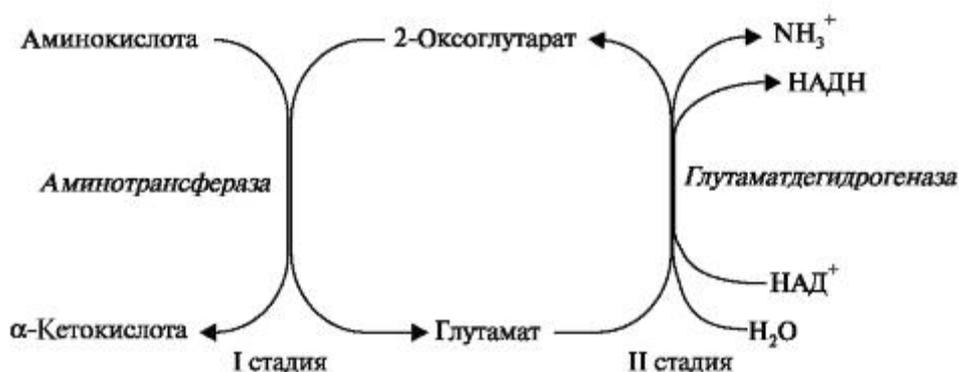


Рис. 16-8. Непрямое дезаминирование аминокислот в печени (схема)

Еще один путь непрямого дезаминирования аминокислот включает перенос аминогруппы от аминокислоты вначале на глутамат, затем на аспаргат и далее на инозинмонофосфат (ИМФ) с образованием АМФ (рис. 16-9). В конечной реакции АМФ дезаминируется и высвобождается молекула аммиака. Этот многоэтапный путь дезаминирования активно протекает в мышечных тканях и клетках мозга, где содержится мало глутаматдегидрогеназы.



Рис. 16-9. Непрямое дезаминирование аминокислот с участием цикла ИМФ-АМФ. Ферменты: 1 - трансаминазы; 2 - аспартатаминотрансфераза; 3 - аденилосукцинатсинтетаза и аденилосукцинатлиаза; 4 - дезаминаза

Отщепляемый на ранних стадиях катаболизма азот аминокислот включается в общий метаболический пул. В зависимости от потребностей организма он может реутилизироваться в анаболических процессах. Однако чаще азот является составной частью конечного продукта обмена - мочевины, в составе которой он и экскретируется из организма.

*В записную книжку врача*

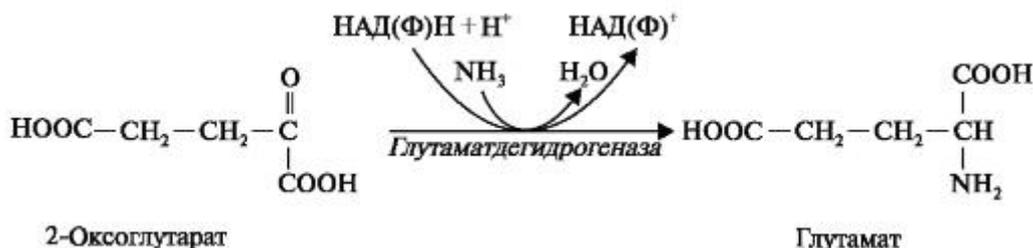
Изменение обмена аминокислот при голодании

При длительном голодании активируется распад альбумина, а далее - тканевых белков, что приводит в ряде случаев к необратимым изменениям в организме. Образующиеся свободные аминокислоты в печени подвергаются окислительному дезаминированию, о чем свидетельствует рост активности глутаматдегидрогеназы.

## ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ АММИАКА

Восстановительное аминирование

Аммиак высвобождается в тканях не только при катаболизме аминокислот, но и пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, биогенных аминов. Это вещество очень токсично и подлежит быстрому обезвреживанию. Одной из форм связывания аммиака является восстановительное аминирование. Реакция протекает в матриксе митохондрий, где  $\text{NH}_3$  присоединяется к метаболиту ЦТК - 2-оксоглутарату.



Следует отметить, что использование 2-оксоглутарата на обезвреживание аммиака сопровождается нарушением работы цикла трикарбоновых кислот с последующим развитием *гипоэнергического состояния*.

## Синтез глутамина и аспарагина

Универсальным механизмом *временного обезвреживания* аммиака, который происходит во всех органах и тканях организма, считают синтез глутамина при участии глутаминсинтетазы. Реакция протекает с затратой одной молекулы АТФ (рис. 16-10). Образовавшийся глутамин с током крови поступает в печень и почки.

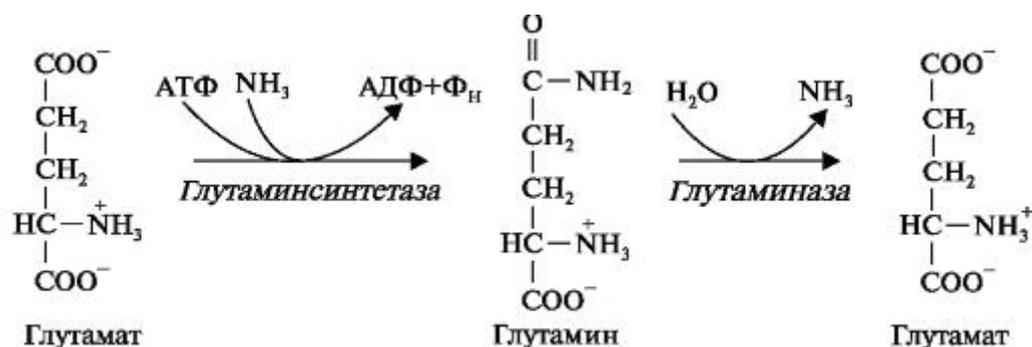


Рис. 16-10. Синтез и гидролиз глутамина

Из глутамина молекула аммиака высвобождается в реакции гидролиза при участии фермента глутаминазы, изоферменты которой присутствуют в энтероцитах, клетках печени, почек.

Из центральной нервной системы аммиак выводится не только в составе глутамина, но и аспарагина, синтезируемого при участии аспарагинсинтетазы (рис. 16-11). Функции аспарагина и глутамина в некоторой степени сходны, так как эти аминокислоты осуществляют транспорт аммиака в крови в нетоксичной форме и являются источником азота в анаболических реакциях.

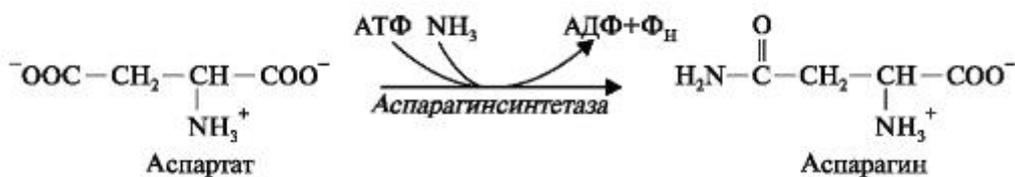


Рис. 16-11. Синтез аспарагина

Высвободившийся аммиак, связывая протон, превращается в ион аммония ( $\text{NH}_4^+$ ), что делает невозможным обратное поступление аммиака в клетки. В почках, в просвете почечных канальцев образовавшийся в результате глутаминазной реакции аммиак нейтрализует органические кислоты. Это, в свою очередь, обеспечивает удержание катионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в организме и

поддерживает кислотно-основное равновесие. Аммиак выводится с мочой в виде ионов аммония, образующих соли с анионами щавелевой, фосфорной и мочевой кислот, т.е. их солей - оксалатов, фосфатов, уратов и т.п. В сутки с мочой из организма выделяется около 1,2 г аммонийных солей. Однако большая часть аммиака из организма человека (90%) выводится в составе мочевины.

## БИОСИНТЕЗ МОЧЕВИНЫ

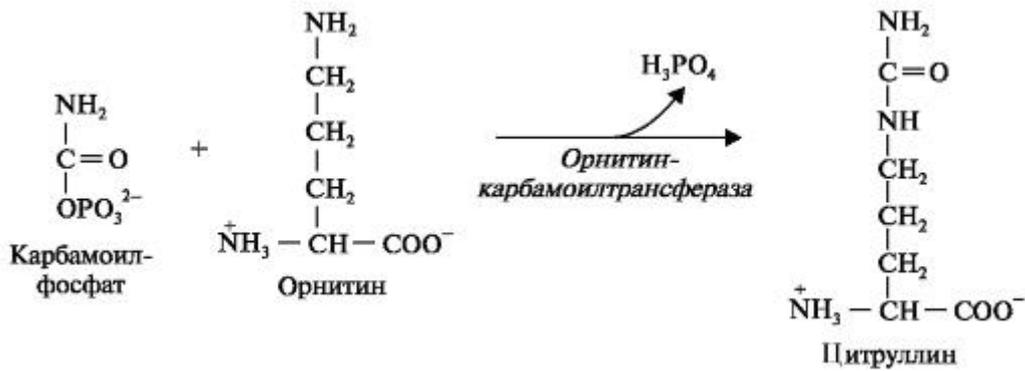
Мочевина или амид угольной кислоты, синтезируется в печени и представляет собой водорастворимое нетоксичное соединение. В молекуле мочевины содержатся два атома азота, источником одного из них является аммиак, а другого - аспарагиновая кислота. Мочевина выводится почками, и в сутки при нормальном питании человека ее экскреция достигает 25-30 г. Последовательность реакций синтеза мочевины предложили Г. Кребс и К. Гензелейт, поэтому эти реакции получила название *орнитинового цикла Кребса-Гензелейта*.

Цикл синтеза мочевины протекает в три этапа.

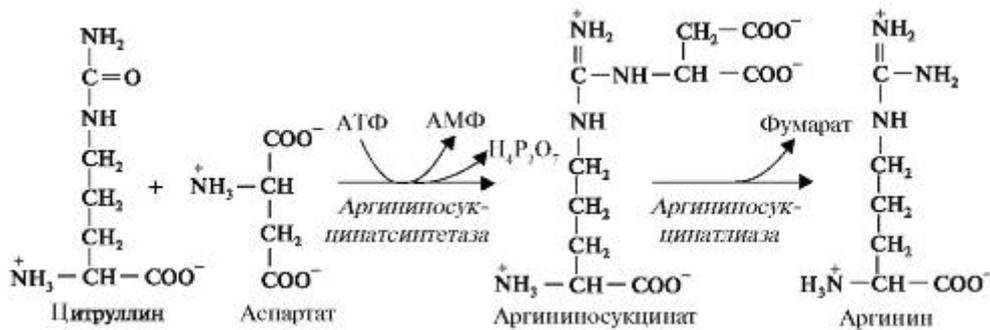
*Первый этап* синтеза мочевины начинается в матриксе митохондрий, где присутствуют молекулы  $\text{NH}_3$  и  $\text{CO}_2$ . Источником молекул  $\text{NH}_3$  обычно служит глутаматдегидрогеназная реакция, а  $\text{CO}_2$  освобождается в цикле трикарбоновых кислот Кребса. Молекулы  $\text{CO}_2$  и  $\text{NH}_3$  соединяются с образованием карбамоилфосфата с затратой двух молекул АТФ при участии фермента *карбамоилфосфатсинтетазы I*.



Карбамоилфосфат для перемещения из матрикса митохондрий в цитоплазму соединяется с аминокислотой орнитином и в составе цитруллина пересекает внутреннюю мембрану митохондрий. Образование цитруллина катализирует фермент *орнитинкарбамоилтрансфераза*.



Второй этап протекает в цитоплазме и включает присоединение к цитруллину второй молекулы азота из аспартата. Реакция требует затраты молекулы АТФ, и ее катализирует *аргининосукцинатсинтетаза*.



Образовавшаяся молекула аргининосукцината при участии фермента *аргининосукцинатлиазы* распадается на фумаровую кислоту и аргинин. Затем аргинин гидролизуется до мочевины и орнитина.

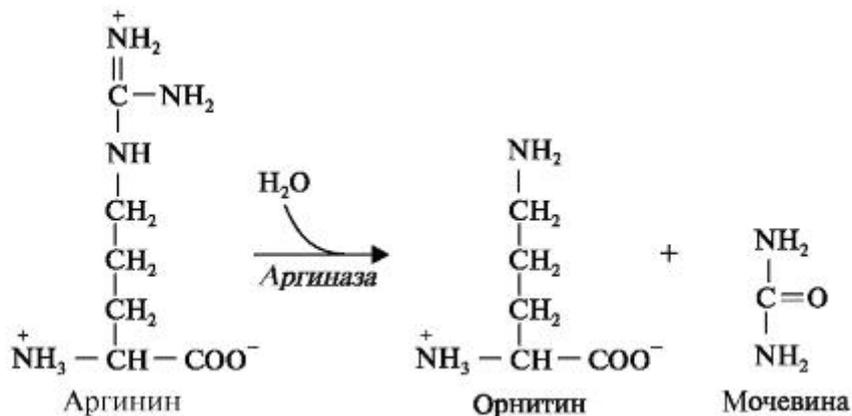


Рис. 16-12. Синтез мочевины

Освободившийся орнитин возвращается в матрикс митохондрий за новой молекулой карбамоилфосфата, и цикл замыкается.

Мочевина по градиенту концентрации поступает в кровь, а затем в почки и выделяется с мочой. В почках в транспорте мочевины участвуют белки-транспортеры - аквапорины-3, -7, -9.

*В записную книжку врача*

### Нарушение синтеза мочевины

Нарушение синтеза мочевины может быть связано с недостаточной активностью любого из пяти ферментов, участвующих в этом процессе, но ключевыми ферментами являются карбамоилфосфатсинтетаза, орнитинкарбамоилтрансфераза и аргиназа. Приобретенное снижение их активности (при гепатите и циррозе печени) сопровождается накоплением аммиака в тканях и плазме крови, а врожденное отсутствие карбамоилфосфатсинтетазы I приводит к гибели новорожденных в течение первых 24-48 ч после рождения.

Для снижения концентрации аммиака в крови рекомендуется уменьшение потребления белка с пищей, а также стимулируют выведение аммиака в обход нарушенных реакций путем введения в качестве пищевой добавки аргинина, фенилацетата, бензойной кислоты, которые в составе гипшуровой кислоты выводятся с мочой.

### Взаимосвязь синтеза мочевины и цитратного цикла Кребса

Фумарат после перемещения в матрикс митохондрий включается в цикл трикарбоновых кислот и через стадию образования малата может превращаться в оксалоацетат, который в дальнейшем используется в синтезе глюкозы или подвергается трансаминированию с образованием аспарагиновой кислоты, отдающей свою аминогруппу на синтез мочевины. Включение фумарата в ЦТК осуществляет сложные взаимосвязи двух циклов. Скорость реакции находится в зависимости от энергетических потребностей клетки и концентрации конечных продуктов катаболизма.

### Регуляция мочевинообразования

Главным регулятором синтеза мочевины является количество аммиака, которое может увеличиваться как вследствие избыточного потребления белков, так и их повышенного распада при длительном голодании, тиреотоксикозе, тяжелой физической нагрузке и других условиях.

Увеличение скорости распада белков сопровождается индукцией синтеза карбамоилфосфатсинтетазы I. Этот фермент аллостерически активируется молекулами N-ацетилглутамата, которые образуются в митохондриях гепатоцитов из глутамата и ацетил-КоА (рис. 16-13).

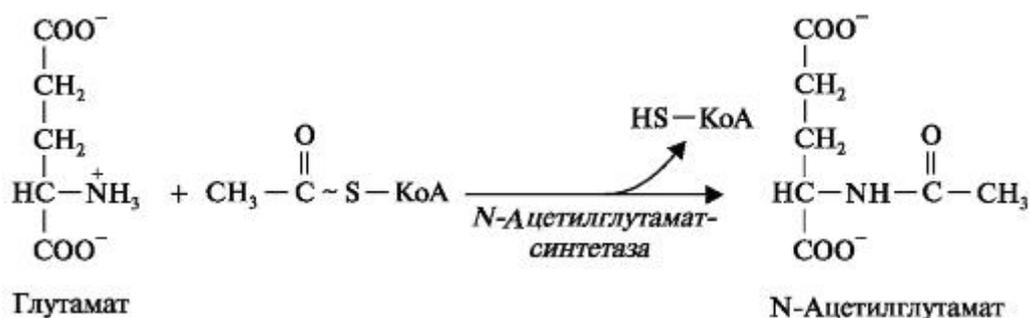


Рис. 16-13. Образование N-ацетилглутамата

Удержание N-ацетилглутамата и карбамоилфосфата также увеличивается в случае повышения количества аргинина в гепатоцитах. Вместе с тем высокие концентрации орнитина и лизина, являющихся структурными аналогами аргинина, ингибируют активность аргиназы.

### ПРЕВРАЩЕНИЕ УГЛЕРОДНОГО СКЕЛЕТА АМИНОКИСЛОТ

Из аминокислот аланина, цистеина и серина в процессе дезаминирования высвобождается пировиноградная кислота. Другие аминокислоты превращаются в промежуточные метаболиты цитратного цикла.

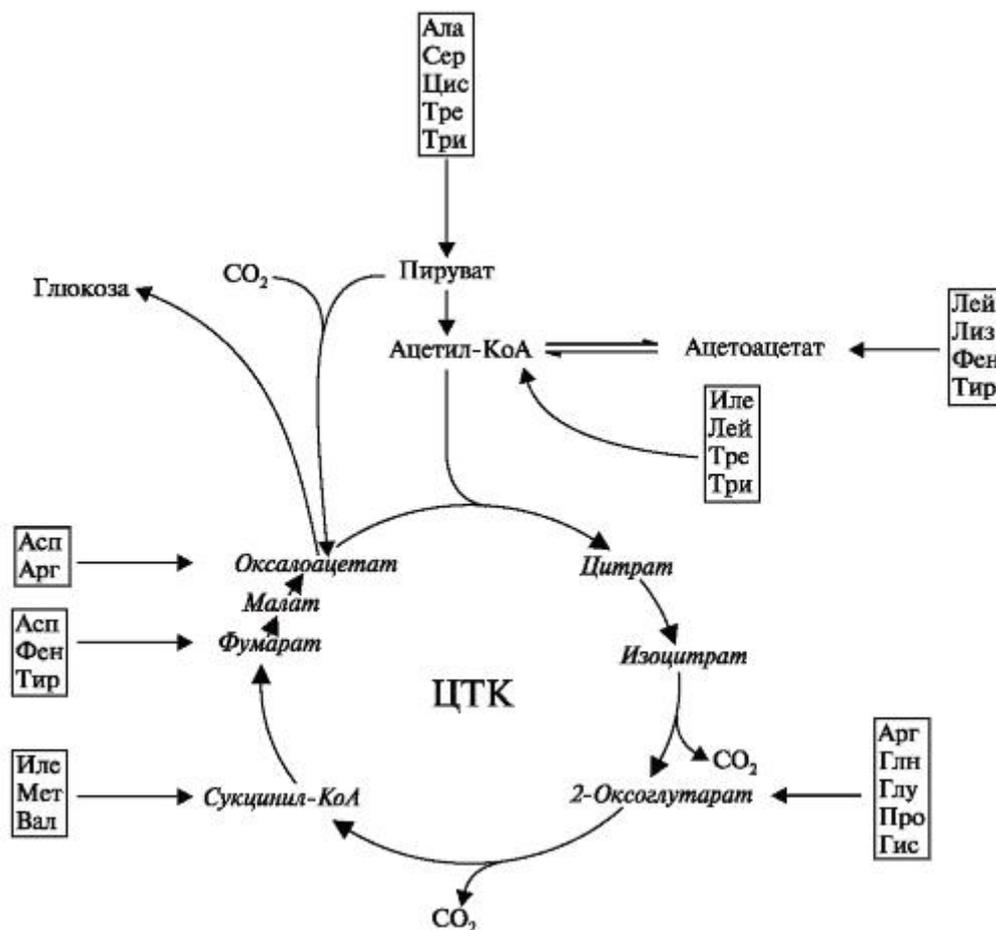


Рис. 16-14. Метаболиты, образующиеся из углеродных скелетов аминокислот

Углеродный остаток этих аминокислот покидает ЦТК в составе оксалоацетата. Оксалоацетат далее превращается в фосфоенолпируват и затем в глюкозу. Из оксалоацетата также может образовываться малат, который при участии декарбоксилирующей малатдегидрогеназой (малик-фермента) превращается в пировиноградную кислоту. В свою очередь, пируват после окислительного декарбоксилирования превращается в молекулу ацетил-КоА (рис. 16-14). Аминокислоты, безазотистые остатки которых способны превращаться в реакциях глюконеогенеза в молекулу глюкозы, получили название *гликогенных (глюкогенных)*.

Распад лейцина и лизина сопровождается превращением углеродного скелета в ацетоуксусную кислоту и ацетил-КоА. Синтез углеводов в данном случае невозможен, и эти аминокислоты называют *кетогенными*.

К группе аминокислот, безазотистые остатки которых способны превращаться как в предшественников углеводов, так и в ацетоацетат,

относят ароматические аминокислоты - фенилаланин, тирозин, триптофан, а также изолейцин.

При распаде аминокислот в случае избыточного образования ацетил-КоА и достаточного количества АТФ и НАДФН в клетке возможен синтез жирных кислот и холестерина.

### ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Другой путь распада аминокислот - отщепление карбоксильной группы. Эти необратимые реакции и катализируют фермент декарбоксилазы. Функцию кофермента в этих реакциях выполняет пиридоксальфосфат (рис. 16-15). В тканях млекопитающих декарбоксилированию подвергаются преимущественно тирозин, валин, серин, гистидин, аргинин, триптофан и 5-окситриптофан, глутаминовая и  $\gamma$ -оксиглутаминовая кислоты, цистеин.

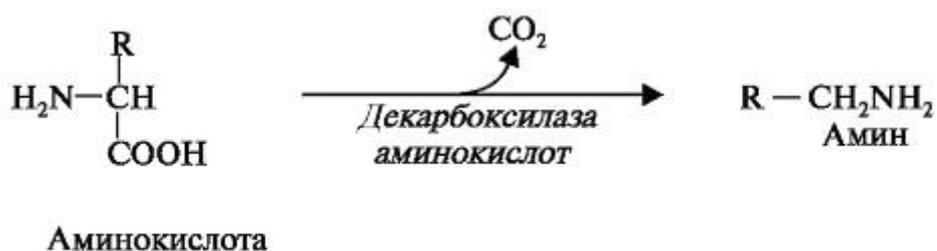


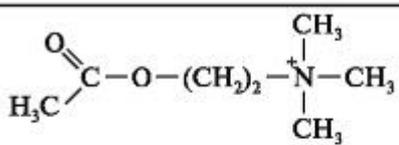
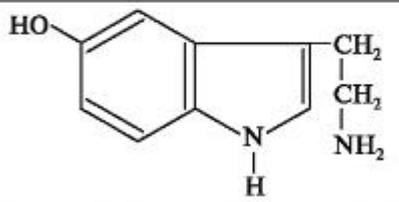
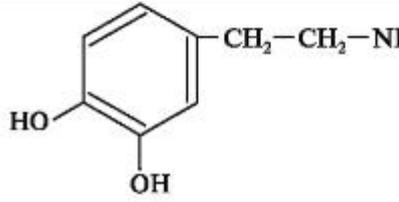
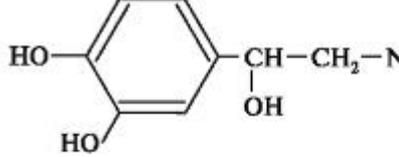
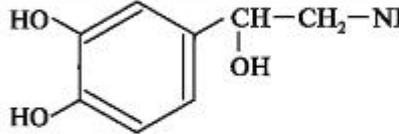
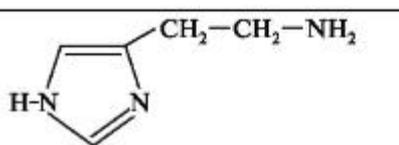
Рис. 16-15. Реакция декарбоксилирования аминокислоты

Образовавшиеся в реакции декарбоксилирования *биогенные амины* оказывают, как правило, регуляторное действие на физиологические функции организма. К биогенным аминам относят катехоламины - дофамин, норадреналин и адреналин, которые образуются изначально из аминокислоты тирозина, а также образующиеся из триптофана серотонин, мелатонин, триптамин, диамины (кадаверин, путресцин), полиамины (спермин, спермидин) и др. Источники некоторых биогенных аминов приведены в табл. 16-1.

Роль биогенных аминов в реализации внутриклеточных процессов

В живом организме многие биогенные амины выполняют роль гормонов и нейромедиаторов (см. главу 9).

Таблица 16-1. Источники биогенных аминов

Аминокислоты	Биологически активные амины	Структурная формула биогенного амина
Серин	Ацетилхолин	
Триптофан	Серотонин	
Тирозин	Дофамин	
	Адреналин	
	Норадреналин	
Глутаминовая кислота	γ-Аминомасляная кислота	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
Гистидин	Гистамин	

Катехоламины дофамин и норадреналин участвуют в синаптической передаче нервных импульсов. Гормон мозгового слоя надпочечников адреналин регулирует распад биологических молекул в целях высвобождения энергии, сокращение мышц, синтез секретов в пищеварительных железах (слюны в ацинарных клетках, соляной кислоты в обкладочных клетках желудка).

Физиологически активные формы биогенных аминов, циркулируя в кровотоке, являются сигнальными молекулами и связываются со специфическими рецепторами плазматических мембран, оказывая различные регуляторные эффекты. Например, действуя через  $H_1$ -рецепторы, гистамин

вызывает сокращение гладкой мускулатуры бронхов, а через H<sub>2</sub>-рецепторы стимулирует секрецию желудочного сока.

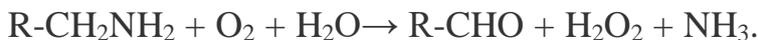
Серотонин также может превращаться в гормон мелатонин, который участвует в регуляции суточных и сезонных изменений метаболизма организма и репродуктивной функции.

Спермидин, спермин и путресцин входят в состав хроматина ядра и участвуют в репликации ДНК, а также стимулируют процессы транскрипции и трансляции. В нервных клетках γ-аминомасляная кислота (ГАМК) является основным тормозным медиатором высших отделов мозга.

#### Инактивация биогенных аминов

Одним из механизмов инактивации биогенных аминов является их окислительное дезаминирование с образованием альдегида и молекулы аммиака. Эти реакции катализируют моно- и диаминоксидазы (МАО и ДАО), присутствующие во всех органах и тканях живых организмов. Коферментом МАО является ФАД, а ДАО - ТОФА-хинон.

Суммарное уравнение реакции, катализируемой этими ферментами, сходно:



Окислительное дезаминирование с участием МАО протекает в две стадии. На первой стадии молекула амина без участия кислорода дегидрируется и дезаминируется с образованием альдегида, а кофермент моноаминоксидазы ФАД восстанавливается до ФАДН<sub>2</sub>. В дальнейшем альдегиды окисляются до органических кислот при участии фермента альдегиддегидрогеназы. Вторая стадия протекает в аэробных условиях, при этом происходит регенерация молекулы окисленного ФАД при участии O<sub>2</sub> с образованием пероксида водорода.

#### *В записную книжку врача* Аминоксидазы

Аминоксидазы присутствуют во всех клетках, кроме эритроцитов, и локализируются на поверхности мембран митохондрий и микросом. Они осуществляют барьерные функции на внеклеточном уровне, блокируют действие диаминов и полиаминов и контролируют уровень гистамина в крови. Описывается их участие в апоптозе, иммуносупрессии, цитотоксичности, росте и пролиферации клеток.

## СИНТЕЗ ЗАМЕНИМЫХ АМИНОКИСЛОТ

В организме млекопитающих в необходимых физиологических количествах синтезируются заменимые аминокислоты. Исходными соединениями для синтеза заменимых аминокислот являются метаболиты распада углеводов, цикла трикарбоновых кислот и незаменимые аминокислоты.

Выделяют три основных пути биосинтеза заменимых аминокислот:

- реакции трансаминирования;
- прямое аминирование  $\alpha$ -кетокислот или ненасыщенных органических кислот;
- ферментативные взаимопревращения отдельных аминокислот.

В реакциях трансаминирования из пировиноградной кислоты образуется аланин, из оксалоацетата - аспартат, из 2-оксоглутарата - глутамат. Серин образуется из 3-фосфоглицерата - промежуточного продукта гликолиза, а из серина синтезируется глицин. Глутамат способен превращаться в пролин и глутамин (рис. 16-16).

Неспособность организма синтезировать незаменимые аминокислоты связана как с отсутствием определенных кетокислот, так и с невозможностью синтеза именно этих углеродных цепей. Однако в небольших количествах синтезируются две частично заменимые аминокислоты: аргинин (в реакциях орнитинового цикла) и гистидин (из АТФ и рибозы).

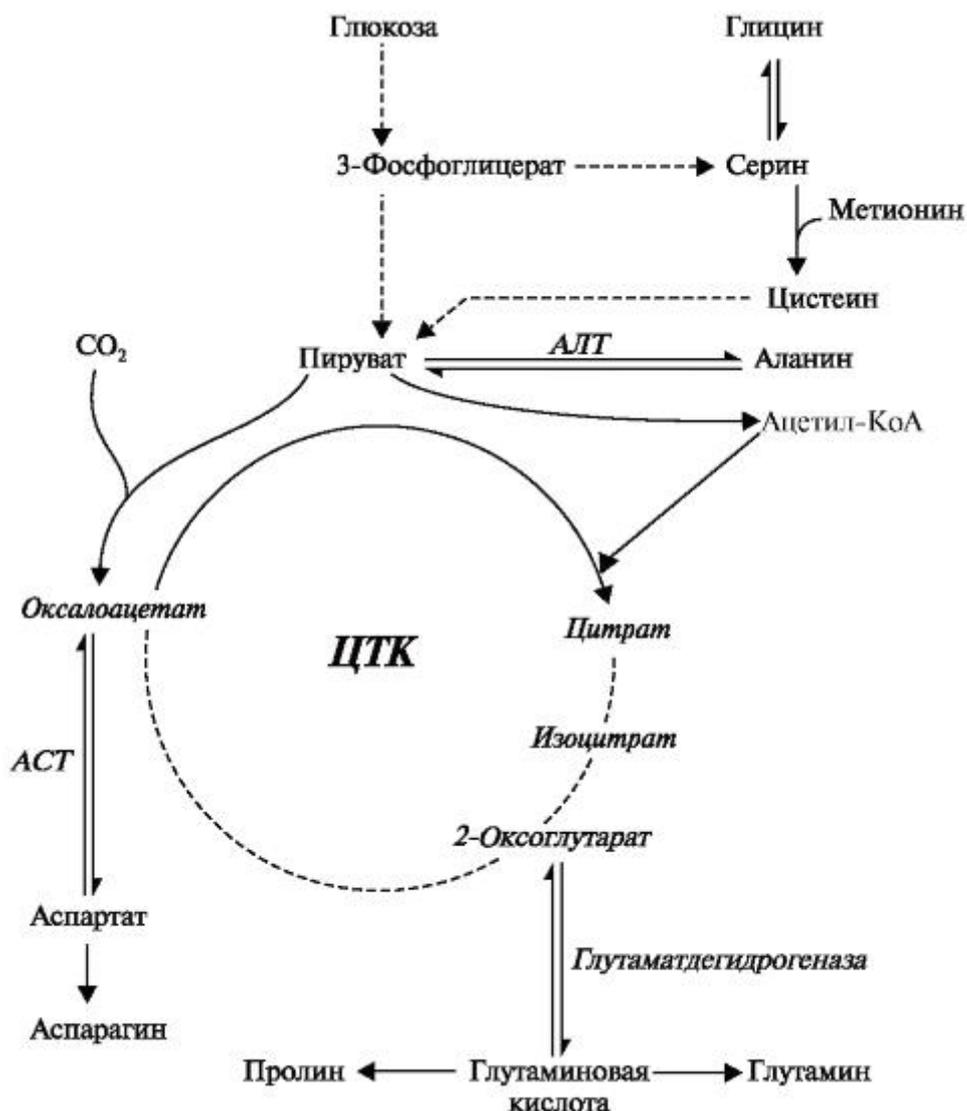


Рис. 16-16. Пути синтеза заменимых аминокислот

## ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ОТДЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Метаболизм каждой конкретной аминокислоты обусловлен, главным образом, строением радикала. Структурное сходство некоторых радикалов в определенной мере сближает пути их обмена и взаимопревращений. Это позволяет выделить группы аминокислот, сходных по метаболическим превращениям, хотя такое разделение весьма условно.

### Обмен серина и глицина

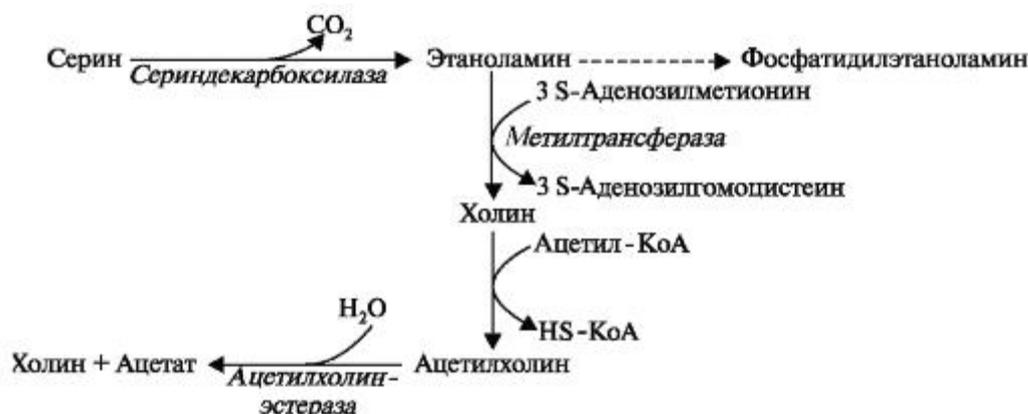
Эти две аминокислоты очень распространены в белках. В радикале серина присутствует гидроксильная группа, способная легко связывать остаток фосфорной кислоты с образованием фосфосерина. Данное соединение также синтезируется из промежуточного продукта гликолиза - 3-фосфоглицерата

(рис. 16-17). Фосфосерин способен связывать ионы кальция в минерализованных тканях (дентине, кости и др.) и нередко выступает в качестве нуклеатора при образовании кристаллов апатитов.

Рис. 16-17. Биосинтез серина из 3-фосфоглицерата

Образовавшийся фосфосерин легко дефосфорилируется при участии фосфатаз. Реакции фосфорилирования серина и дефосфорилирования фосфосерина лежат в основе регуляции активности белков, в том числе и ферментов.

В реакции неокислительного дезаминирования при участии сериндегидратазы серин превращается в пируват, из которого путем транс-аминирования образуется аланин. Аланин поглощается гепатоцитами и превращается в пируват, который используется в реакциях глюконеогенеза (см. главу 13). Серин необходим для образования глицерофосфолипидов, а также является предшественником ацетилхолина.



Серин также может превращаться в глицин. Синтез глицина (рис. 16-18) начинается с переноса  $\beta$ -углеродного атома серина на тетрагидрофолиевую кислоту при участии фермента серингидрок-симетилтрансферазы, простетической группой которого является пиридоксальфосфат.

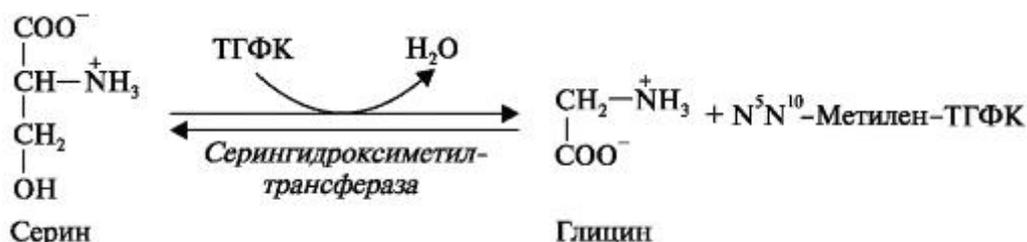


Рис. 16-18. Биосинтез глицина из серина

Глицин участвует в синтезе пуриновых азотистых оснований, гема, креатина, парных желчных кислот, глутатиона, конъюгации ксенобиотиков, присутствует в белках эмали - амелогенинах и энамелинах. До 33% этой аминокислоты встречается в составе коллагеновых белков; в меньшем количестве глицин содержится в эластине и альбумине (рис. 16-19). Эту аминокислоту нередко обнаруживают в активном центре ферментов.



Рис. 16-19. Биологическая роль глицина

Глицин может также подвергаться окислительной деградации в митохондриях гепатоцитов. Отщепление карбоксильной группы от молекулы глицина сопровождается распадом остальной части молекулы на  $\text{NH}_3$  и  $-\text{CH}_2-$ . Последняя включается в состав  $\text{N}^5-$ ,  $\text{N}^1^0$ -метилентетрагидро-фолиевой кислоты.

#### Обмен метионина

В тканях метионин превращается в активную форму - *S*-аденозилметионин, который выступает в качестве донора метильных групп для многих синтетических процессов. Метильная группа легко отщепляется от положительно заряженного атома серы *S*-аденозилметионина и при участии метилтрансфераз переносится на метилируемый субстрат. Отдавая метильные группы, *S*-аденозилметионин превращается в *S*-аденозилгомоцистеин, который, в свою очередь, распадается до аденозина и *L*-гомоцистеина (рис. 16-20).

Рис. 16-20. Образование *S*-аденозилметионина и регенерация метионина

Реакции метилирования при участии S-аденозилметионина обеспечивают превращение норадреналина в адреналин, синтез холина (составной части ацетилхолина и фосфатидилхолинов), карнитина и креатина, метилирование ряда соединений, в том числе азотистых оснований в процессе репликации и биогенных аминов в случае их катаболизма.

### Синтез креатина

В синтезе креатина участвуют три аминокислоты: аргинин, глицин и S-аденозилметионин. Синтез начинается в почках. В первой трансферазной реакции амидиновая группа от аргинина переносится на глицин (рис. 16-21). Образовавшийся гуанидинацетат с током крови транспортируется в печень, где подвергается метилированию с образованием креатина. Из плазмы крови креатин захватывается клетками различных органов, но главным образом клетками мозга, сердечной и скелетных мышц. В них из креатина при участии *креатинкиназы* образуется макроэргическое соединение - *креатинфосфат*, содержание которого в мышце в состоянии покоя в несколько раз превышает количество АТФ.

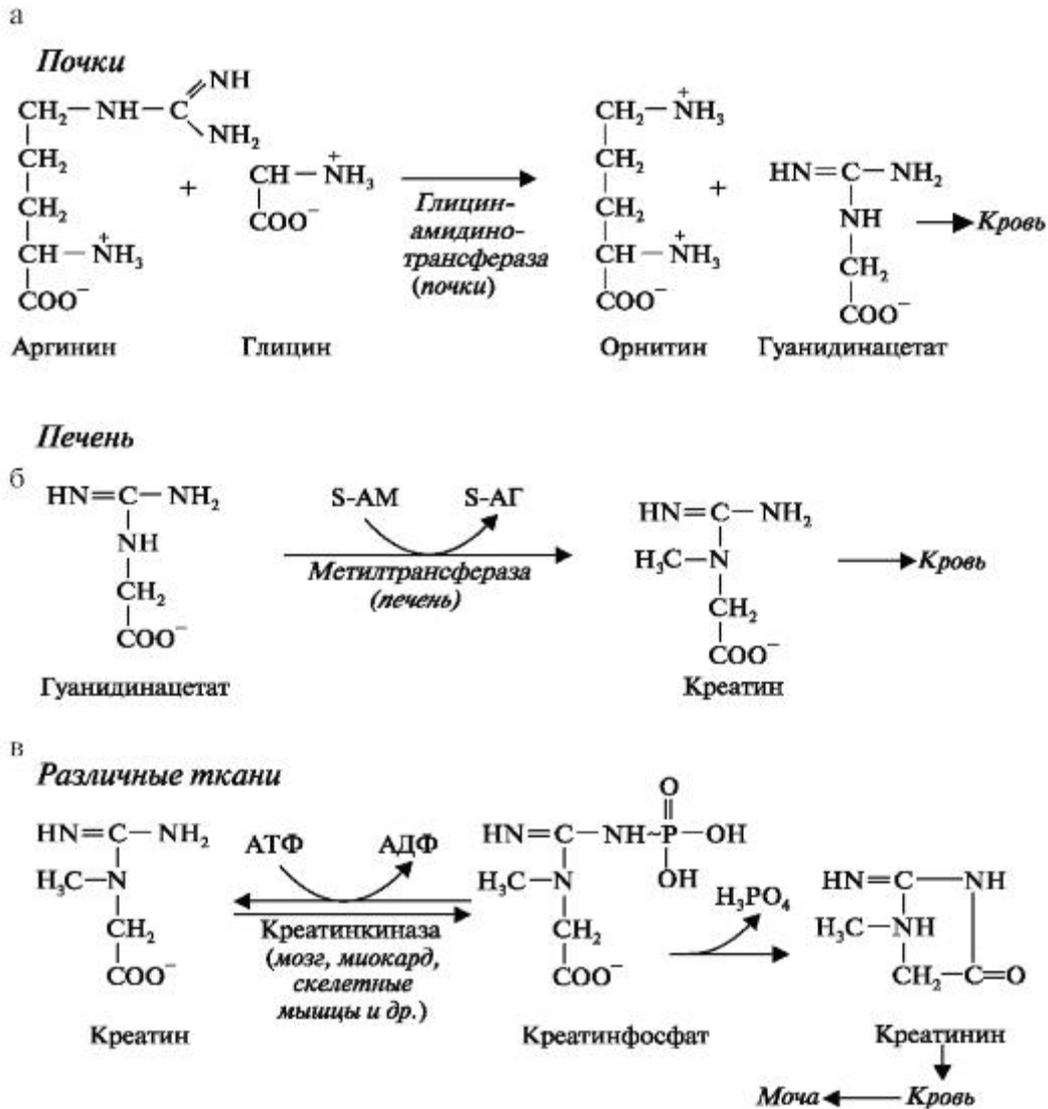


Рис. 16-21. Синтез креатина и образование креатинина: а - почки; б - печень; в - различные ткани; S-AM - S-аденозилметионин; S-AG - S-аденозилгомоцистеин

Креатинфосфат является резервным макроэргом, который клетка использует для регенерации АТФ. После дефосфорилирования (реакция необратима) креатинфосфат превращается в креатинин, выделяемый с мочой.

*В записную книжку врача*

Определение количества креатина и креатинина

В плазме крови количество креатина невелико и в основном присутствует креатинин (от 50 до 175 мкмоль/л). Сниженное количество креатинина в плазме крови наблюдают при мышечной дистрофии, тяжелых формах поражения мозга. В этих случаях креатин определяется в моче. При почечной

недостаточности вследствие нарушения клубочковой фильтрации, количество креатинина в плазме крови возрастает до 1000 мкмоль/л. При данной патологии слюнные железы берут на себя экскреторную функцию почек, и количество креатинина наряду с мочевиной в смешанной слюне увеличивается в 5-10 раз.

#### Преращения аргинина

Аргинин - положительно заряженная, условно незаменимая аминокислота. Совместно с лизином он участвует в поддержании кислотно-основного равновесия в плазме крови, слюне и других биологических жидкостях. Синтез и распад аргинина неразрывно связаны с орнитиновым циклом образования мочевины.

В организме человека при участии сложного  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого ферментного комплекса *NO-синтазы* из аргинина образуется важный регулятор - оксид азота (NO). Функционирование этого комплекса обеспечивает образование физиологических концентраций NO в нервной ткани и сосудистом эндотелии, необходимых для поддержания различных физиологических процессов: эректильной функции, вазодилатации, агрегации тромбоцитов и др.

#### Обмен лизина

Лизин - незаменимая диаминомонокрбонная аминокислота. Благодаря наличию  $\epsilon$ -аминогруппы в радикале, лизин обеспечивает положительный заряд на поверхности белка. В белках соединительной ткани (коллагене и эластине) лизин подвергается гидроксигированию с образованием 5-гидроксигизина, а также окислительному дезаминированию.

Образовавшиеся при окислительном дезаминировании остатков лизина альдегиды участвуют в формировании поперечных сшивок (десмозина и изодесмозина) и также лизиннорлейцина в эластиновых и коллагеновых белках. В минерализованных тканях  $\epsilon$ -аминогруппа может фосфорилироваться с образованием фосфоамидной связи. Фосфорилированные остатки лизина способны связывать ионы кальция. В белках мышечной ткани лизин подвергается N-метилированию, и N-метиллизин определяют в составе миозина. Лизин является предшественником карнитина, который участвует в транспорте жирных кислот в матрикс митохондрий для последующего их окисления. Однако в

синтезе карнитина участвует не свободный лизин, а триметиллизин, свойственный только определенным белкам. Лизин не подвергается трансаминированию, и распад молекулы начинается с отщепления аминогруппы. Конечным продуктом катаболизма лизина является ацетоацетил-КоА.

*В записную книжку врача* Нарушение обмена лизина

При врожденной патологии, обусловленной недостаточностью ферментов, участвующих в удалении  $\epsilon$ -аминогруппы из молекулы лизина, появляются тошнота, рвота и развивается коматозное состояние. Состояние больных улучшается при употреблении пищи с уменьшенным содержанием лизина.

Обмен пролина

Пролин относится к заменимым гликогенным аминокислотам, он синтезируется из глутаминовой кислоты (рис. 16-22). В больших количествах пролин содержится в коллагене, эластине, белках эмали (амелогенинах).

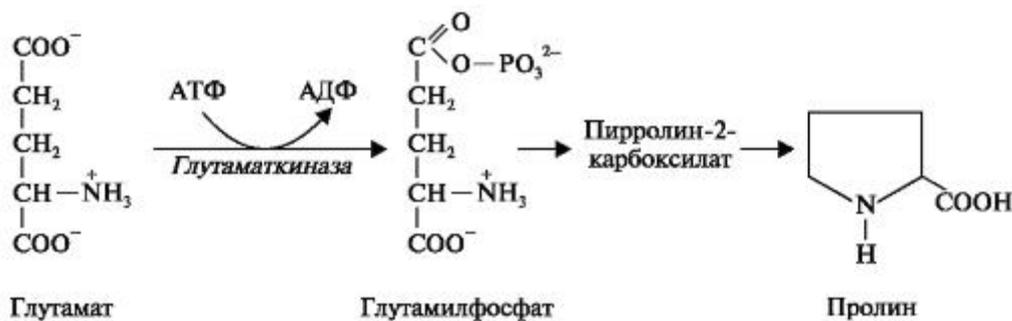


Рис. 16-22. Синтез пролина

В процессе синтеза коллагеновой молекулы пролин гидроксилируется с образованием 3- или 4-гидроксипролина, что необходимо для созревания коллагеновых белков. Избыток пролина в белках препятствует образованию внутрицепочечных водородных связей, так как единственный атом водорода иминогруппы затрачивается на образование пептидной связи.

Распад пролина начинается в митохондриях с реакции дегидрирования. Образовавшийся пирролин-4-гидрокси-2-карбоксилат связывает молекулу воды и превращается в  $\gamma$ -гидроксиглутаматполуальдегид, который в последующих реакциях трансаминирования, окисления или декарбоксилирования распадается до пирувата и малата, а они выступают в качестве предшественников глюкозы.

## Обмен фенилаланина

Фенилаланин относится к незаменимым протеиногенным аминокислотам, необходимым для синтеза тканевых белков. Поскольку избыток этой аминокислоты оказывает токсическое действие на клетки, то до 90% фенилаланина под действием фенилаланингидроксилазы превращается в тирозин (рис. 16-23).

Кофермент фенилаланингидроксилазы - ТГБП (5,6,7,8-тетрагидробиоптеридин) является косубстратом и окисляется до ДГБП (7,8-дигидробиоптеридина). Восстановление ДГБП происходит при участии дигидробиоптеридинредуктазы с использованием молекулы НАДФН.

### Рис. 16-23. Превращения фенилаланина в тирозин

В норме небольшая часть фенилаланина (около 10%) в гепатоцитах подвергается трансаминированию с образованием фенилпировиноградной кислоты. Образовавшийся фенилпируват либо восстанавливается до фениллактата, либо декарбоксилируется до фенилацетата, из которого образуется фенилацетилглутамин (рис. 16-24). Оба конечных продукта - фениллактат и фенилацетилглутамин - попадают из печени в кровь, а затем экскретируются почками. В норме эти вещества в плазме крови практически отсутствуют.

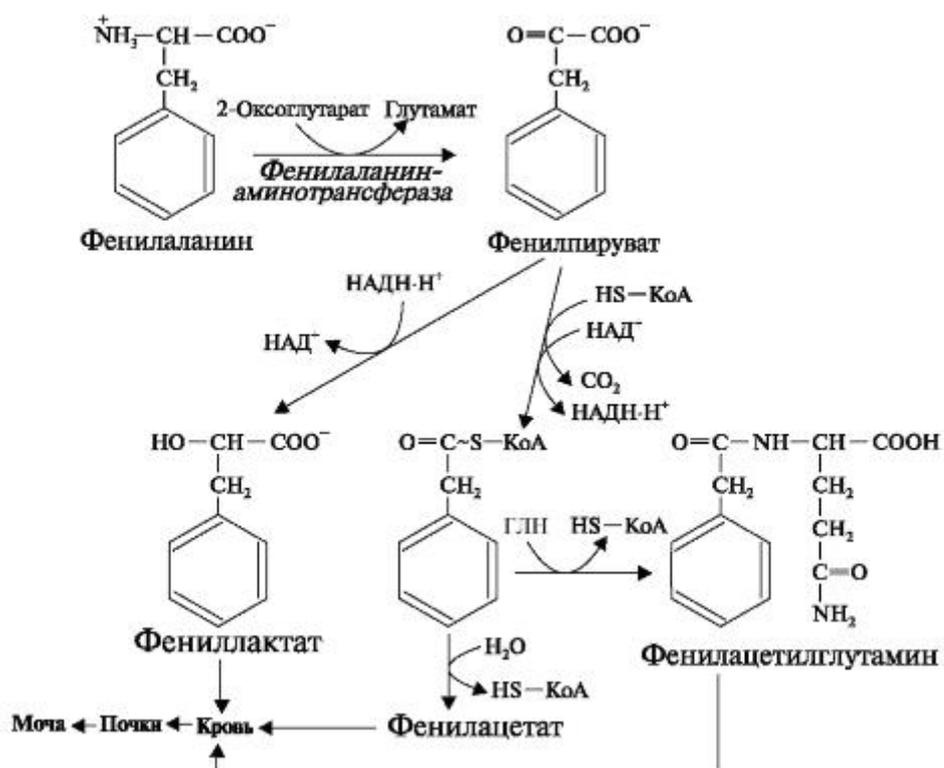


Рис. 16-24. Альтернативные пути превращения фенилаланина

*В записную книжку врача*

### Фенилпировиноградная олигофрения

При генетическом дефекте синтеза фенилаланингидроксилазы в тканях накапливается фенилаланин, а в печени в повышенных количествах образуются фенилпироват и его производные, которые появляются в моче (фенилкетонурия). Высокие концентрации этих веществ блокируют транспорт через гематоэнцефалитический барьер других аминокислот - триптофана и тирозина, что сопровождается нарушением синтеза нейромедиаторов. У таких больных задерживается умственное и физическое развитие, снижается образование меланина. Дети с наследственной патологией обмена фенилаланина имеют светлый кожный и волосяной покров и бледно-голубой цвет глаз. Без лечения и ограничения приема фенилаланина больные погибают в молодом возрасте.

### Обмен тирозина

Поскольку тирозин образуется из фенилаланина, то его относят к условно-незаменимым аминокислотам. Наличие гидроксильной группы в молекуле тирозина, присутствующего в составе белков, обеспечивает возможность его

фосфорилирования при участии тирозиновых протеинкиназ, активируемых факторами роста и гормонами. В разных тканях тирозин используется для синтеза многих биологически активных соединений. Распад тирозина происходит в печени.

### Обмен тирозина в печени

Распад тирозина в печени начинается с реакции трансаминирования при участии тирозинаминотрансферазы. Образующийся п-гидроксифенилпируват в следующей реакции декарбоксилируется с одновременным перемещением боковой группы, что сопровождается появлением молекулы гомогентизиновой кислоты (рис. 16-25).

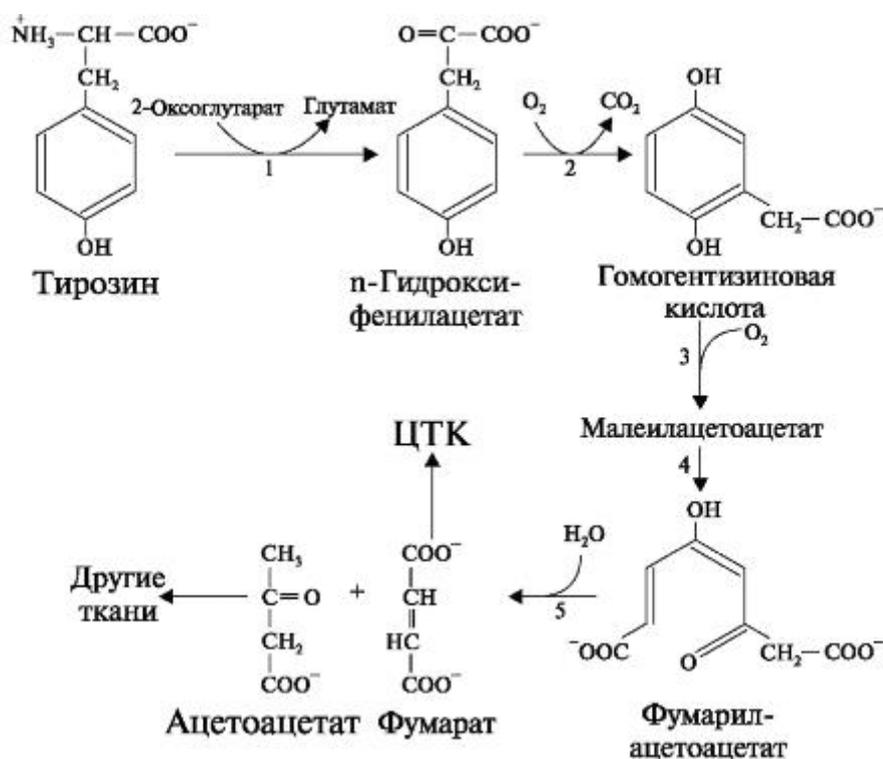


Рис. 16-25. Обмен тирозина. Ферменты: 1- тирозинаминотрансфераза; 2 - п-гидроксифенилпируватдиоксигеназа; 3 - диоксигеназа; 4 - изомераза; 5 - фумарилацетатгидролаза

Данную реакцию катализирует фермент п-гидроксифенилпируватдиоксигеназа (кофакторы - витамин С и Fe<sup>2+</sup>). В дальнейшем гомогентизиновая кислота окисляется при участии диоксигеназы, и происходит расщепление ароматического кольца. Вначале образуются молекула малеилацетоацетата, а из нее фумарилацетоацетата, которая, в свою очередь, распадается на фумаровую кислоту и ацетоацетат. Фумаровая кислота включается в цикл трикарбоновых кислот, и

образующийся оксалоацетат в реакциях глюконеогенеза превращается в глюкозу. Молекула ацетоацетата (кетонное тело) окисляется в периферических тканях до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  с высвобождением энергии.

*В записную книжку врача*

### Тирозинемия и алкаптонурия

При генетически обусловленной недостаточности *p*-гидроксифенилпируватдиоксигеназы у детей развивается *тирозинемия* с нарастанием экскреции тирозина. При этом наследственном расстройстве больные погибают в возрасте 6-8 мес, а у детей, которые выживают, обнаруживают хронические дегенеративные изменения в печени и почках. Вследствие дефекта гена диоксигеназы гомогентизиновой кислоты нарушается ее окисление в гепатоцитах. Кислота попадает в кровоток, затем в мочу или накапливается в хрящевой ткани. При окислении кислородом гомогентизиновой кислоты образуются алкаптоны - темные пигменты, поэтому заболевание получило название «*алкаптонурия*». Клинически алкаптонурия проявляется в виде артритов, артрозов и появлением темных пятен в хрящах крыльев носа, ушных раковин, склеры глаз (охроноз), а также характеризуется изменением цвета мочи, приобретающей при стоянии коричневый цвет.

### Обмен тирозина в меланоцитах

В пигментных клетках (меланоцитах) кожи, волос, радужки глаза тирозин превращается в пигменты (меланины). Синтез меланинов происходит в несколько этапов и начинается с гидроксилирования тирозина при участии тирозиназы, в активном центре которой присутствует ион меди ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Образовавшийся 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА) затем превращается в меланины разных типов (рис. 16-26). Меланоциты способны поглощать световую энергию света и используют ее на изомерное превращение меланинов. Таким образом осуществляется защита структур клеток, в частности молекул нуклеиновых кислот, от воздействия ультрафиолетовых лучей.

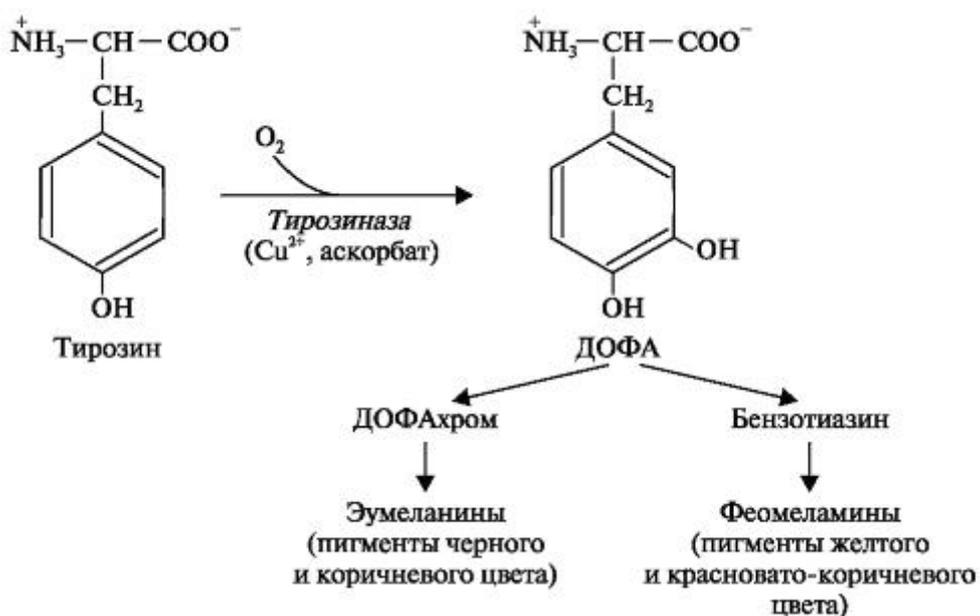


Рис. 16-26. Образование из тирозина меланинов в меланоцитах

*В записную книжку врача*

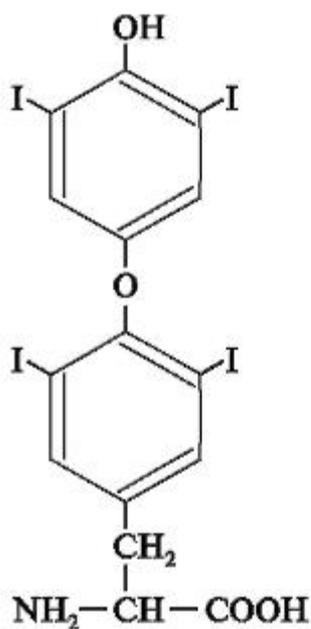
#### Патология тирозиназы в меланоцитах

Дефект гена тирозиназы и других ферментов синтеза меланинов проявляется в виде отсутствия пигментов в коже, волосах, радужной оболочке глаза.

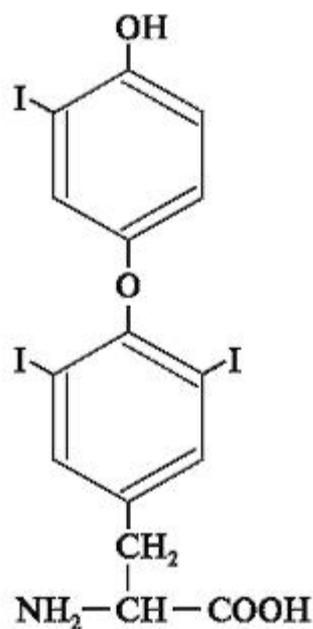
Данная патология получила название «альбинизм». Для заболевания характерны светобоязнь, ожоги кожи от солнечных лучей, снижение остроты зрения. Увеличенная экспрессия гена тирозиназы, повышение уровня этого фермента (в том числе и в крови) обнаруживаются при злокачественной опухоли - меланоме.

#### Обмен тирозина в клетках щитовидной железы

В щитовидной железе синтезируется белок тиреоглобулин, содержащий до 10% тирозина. Остатки тирозина в составе тиреоглобулина йодируются с последующим высвобождением йодсодержащих гормонов - 3-, 3'-, 5'-трийодтиронина ( $T_3$ ) и 3-, 5-, 3'-, 5'-тетрайодтиронина ( $T_4$ -тироксина). По химической структуре  $T_3$  и  $T_4$  представляют собой конденсированные йодированные остатки тирозина (рис. 16-27).



**Тироксин**



**Трийодтиронин**

Рис. 16-27. Строение йодсодержащих гормонов щитовидной железы тироксина и трийодтиронина

*В записную книжку врача*

#### Нарушение синтеза йодтиронинов

Нарушение синтеза йодтиронинов наблюдают при аутоиммунном поражении тиреоцитов, уменьшении количества йода или удалении щитовидной железы. У детей уменьшение количества T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> приводит к нарушению умственного и физического развития, а у взрослых - к слизистому отеку, сухости кожи, снижению температуры тела и др. В первом случае патология получила название «*кретинизм*», а во втором - «*микседема*».

#### Обмен тирозина в надпочечниках и нервной ткани

Тирозин в нервной ткани и мозговом слое надпочечников является предшественником катехоламинов - дофамина, норадреналина и адреналина. Превращение тирозина в этих тканях начинается с гидроксирования ароматического кольца при участии тирозингидроксилазы. В качестве кофермента и кофактора в реакции участвуют тетрагидробиоптеридин и ионы железа (Fe<sup>2+</sup>). Затем образовавшийся диоксифенилаланин (ДОФА) декарбоксилируется ДОФА-декарбоксилазой (кофермент - пиридоксаль-5-фосфат), а дофамин при участии дофамингидроксилазы превращается в

норадреналин. Этой реакцией завершается синтез катехоламинов в нервной ткани (рис. 16-28).

В клетках мозгового слоя надпочечников аминогруппа норадреналина подвергается в последующем N-метилированию с образованием адреналина. Источником метильных групп является S-аденозилметионин.

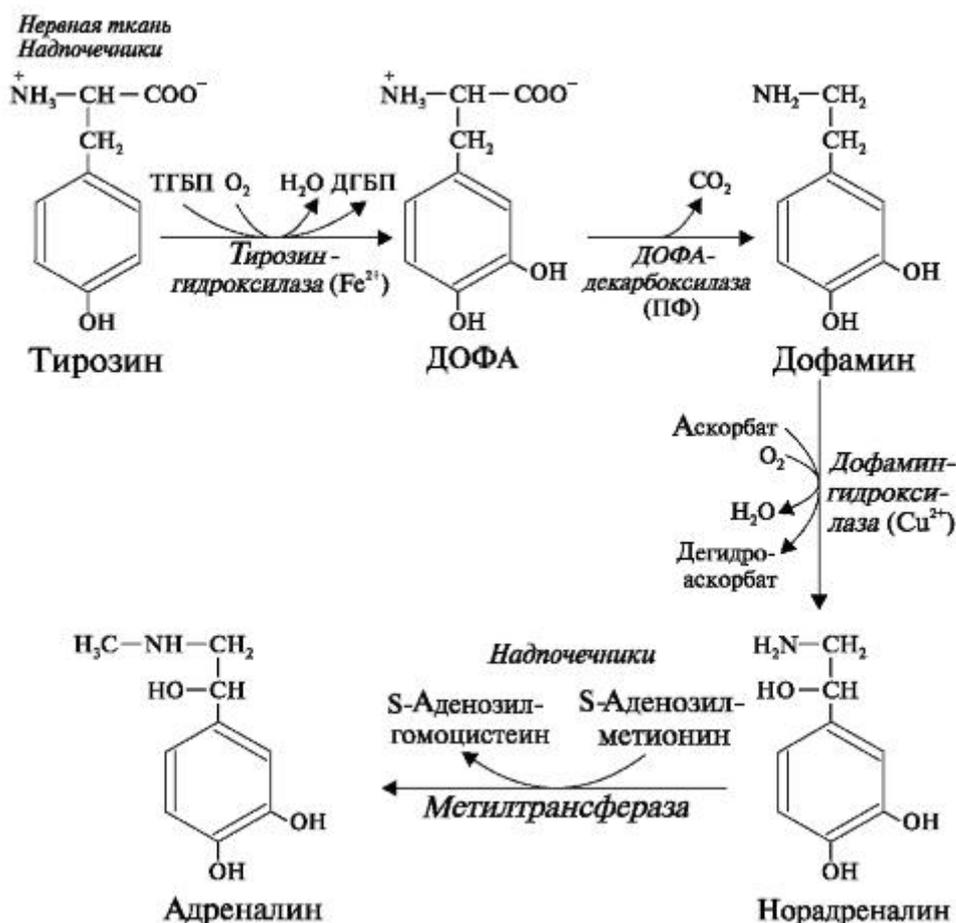


Рис. 16-28. Синтез катехоламинов

Регуляторный фермент в синтезе катехоламинов - тирозингидроксилаза, поэтому при стрессе вследствие под влиянием гормона кортизола ее количество возрастает.

Инактивация катехоламинов происходит либо в реакции окислительного дезаминирования при участии MAO, либо O-метилирования при участии фермента катехол-O-метилтрансферазы. Образующиеся окисленные продукты хорошо растворимы в воде и выводятся из организма почками. Метиладреналин в печени подвергается конъюгации с глюкуроновой или серной кислотой, и растворимые в воде конъюгаты также выводятся из организма.

*В записную книжку врача*

Нарушение синтеза катехоламинов

У пожилых людей при снижении активности тирозингидроксилазы или ДОФА-декарбоксилазы уменьшается количество дофамина в черной субстанции мозга, что приводит к развитию болезни Паркинсона. Для лечения этой патологии в целях заместительной терапии используют производные ДОФА, а также ингибиторы MAO для торможения инактивации дофамина. Гиперсекреция дофамина в височной доле мозга обнаружена при шизофрении. При опухоли мозгового слоя надпочечников (феохромцитоме) в моче определяется повышенное количество конечных продуктов распада катехоламинов - метанефрина и 3-метокси-4-гидроксиминдальной кислоты.

Патология обмена отдельных аминокислот

*Гипераминоацидурия* (увеличение количества аминокислот в моче) встречается при болезни Вильсона-Коновалова, когда нарушается синтез медьсодержащего белка - церулоплазмينا.

При врожденном нарушении обмена триптофана развивается болезнь Хартнупа. Сдвиги в обмене триптофана приводят к снижению синтеза НАД<sup>+</sup>, появлению пеллагроподобных поражений кожного покрова, психических расстройств. В случае повышенного окисления триптофана по серотониновому пути наблюдают избыток образования и выделения с мочой индолилуксусной кислоты. Последнее встречается при поражении кишечника злокачественными новообразованиями.

*Гистидинемия* развивается на фоне недостаточного синтеза фермента гистидазы, обеспечивающей превращение гистидина в печени и коже в уроганиновую кислоту. В результате гистидин трансаминируется с образованием имидазолпировиноградной кислоты, появляющейся в моче одновременно с избыточным количеством гистидина. При нарушении обмена *гистидина* активируются процессы декарбоксилирования этой аминокислоты. Образующееся повышенное количество гистамина участвует в развитии аллергических и воспалительных реакций.

*Цистинурия* - распространенная аномалия, связанная с нарушением реабсорбции аминокислоты цистина (дисульфидцистеина) в почках, которая характеризуется появлением ее в моче. Накопление кристаллов цистина в

почках сопровождается образованием камней. Цистинурию часто определяют у людей с хроническими заболеваниями почек.

*Болезнь кленового сиропа* вызвана дефицитом дегидрогеназы  $\alpha$ -кето-кислот с разветвленной цепью, вследствие чего в крови и моче происходит накопление аминокислот с разветвленной углеродной цепью (лейцина, изолейцина и валина) и токсичных продуктов их метаболизма. Заболевание характеризуется наличием сладкого запаха (аналогичного запаху кленового сиропа) мочи у маленьких детей. Данная патология вызывает серьезные поражения головного мозга, которые могут привести к смерти ребенка.

*В записную книжку врача*

Токсическое действие имидазолпировиноградной кислоты

Имидазолпировиноградная кислота, образуемая в реакции трансаминирования гистидина, ингибирует синтез ферментов, катализирующих реакции образования нейромедиатора серотонина из триптофана, и тем самым оказывает повреждающее действие на центральную нервную систему.

## ГЛАВА 17. ОБМЕН ГЕМОПРОТЕИНОВ

Вопросы по теме

- Структура гема.
- Биосинтез гема.
- Нарушения синтеза гема.
- Распад гема.
- Обмен железа.
- Транспорт кислорода и диоксида углерода. Полиморфные формы гемоглобина человека. Гемоглобинопатии.

Гемопротейны - сложные белки, содержащие в качестве небелкового компонента гем. Различия в строении и функции гемопротейнов обусловлены именно белковой частью. Белки этого семейства - гемоглобин, миоглобин и другие, обеспечивают обратимое связывание кислорода,

цитохромы - транспорт электронов в реакциях биологического окисления, а также включение атома кислорода в субстраты.

## СТРУКТУРА ГЕМА

Гем - органическое соединение, основу которого составляет порфириновое кольцо, образованное четырьмя пиррольными гетероциклами, которые расположены в одной плоскости и объединены метильными мостиками. Центральное место в геме занимает атом железа, соединенный со всеми четырьмя атомами азота пиррольных колец. Замещенные пирролы содержат 4 метильные группы ( $-\text{CH}_3$ ), 2 винильные ( $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) и 2 остатка пропионовой кислоты ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) (рис. 17-1).

В белках - *гемоглобине* и *миоглобине*, осуществляющих связывание и транспорт кислорода, железо находится в восстановленной форме ( $\text{Fe}^{2+}$ ). В случае последовательного переноса электронов от окисляемых веществ на конечный акцептор - кислород, железо в гемопротеинах (например, цитохромах) меняет свою валентность. Принимая электрон, железо восстанавливается до  $\text{Fe}^{2+}$ , а отдавая его на очередной цитохром или молекулу  $\text{O}_2$ , вновь переходит в окисленное состояние ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

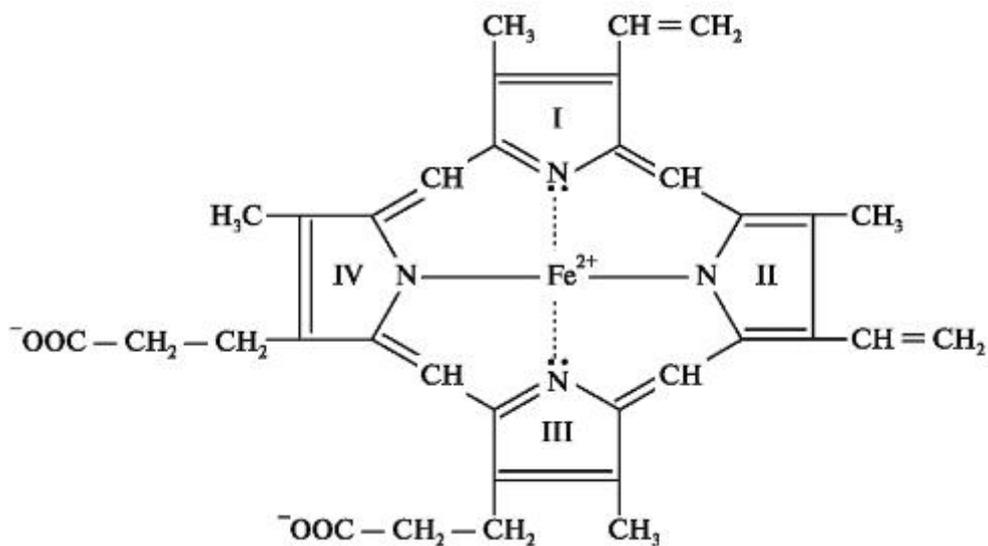


Рис. 17-1. Структура гема

## БИОСИНТЕЗ ГЕМОПРОТЕИНОВ

Синтез гемопротеинов активно протекает в эритроидных клетках, а также гепатоцитах. Образование молекулы гемопротеина и включение железа возможно только после синтеза порфиринового кольца, который начинается в матриксе митохондрий реакцией конденсации молекулы сукцинил-КоА с глицином. Эту реакцию катализирует пиридоксальфосфатзависимый фермент - *5-аминолевулинатсинтаза* (рис. 17-2).

Рис. 17-2. Реакция синтеза 5-аминолевулиновой кислоты в матриксе митохондрий. ПФ - пиридоксальфосфат

После перехода 5-аминолевулиновой кислоты в цитоплазму в реакции конденсации две молекулы этого метаболита объединяются в пя-тичленный цикл *порфобилиногена* (рис. 17-3)

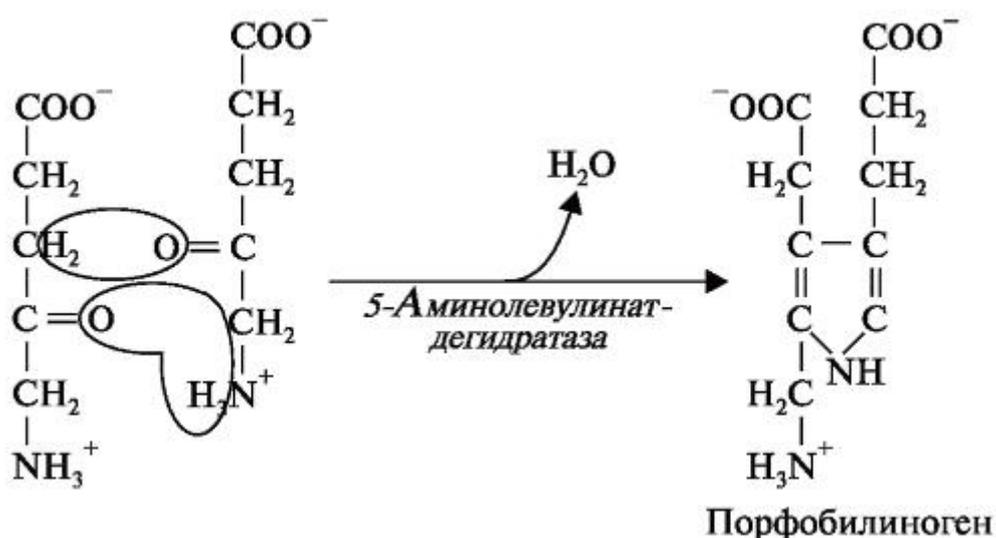


Рис. 17-3. Реакция конденсации двух молекул 5-аминолевулината с образованием порфобилиногена

На следующем этапе происходит поочередное соединение четырех молекул порфобилиногена. Замыканию колец в порфириновую структуру предшествует изомеризация кольца IV, в результате которой остатки уксусной и пропионовой кислот меняются местами. Заканчивается этот этап формированием порфириновой структуры - уропорфириногена III.

Процесс катализируют два фермента

- *порфобилиногендезаминаза* и *уропорфириноген-III-косинтаза*. Далее

происходит декарбоксилирование ацетатных групп боковых цепей с превращением их в метильные группы. Образовавшийся копропорфириноген III возвращается в матрикс митохондрий, где в результате ряда последовательных реакций декарбоксилирования и дегидрирования происходит образование протопорфирина IX - предшественника гемма. Заключительную реакцию синтеза гема - включение атома железа ( $Fe^{2+}$ ) в протопорфирин IX - катализирует фермент *феррохелатаза* (рис. 17-4), а источником железа служит белок ферритин.

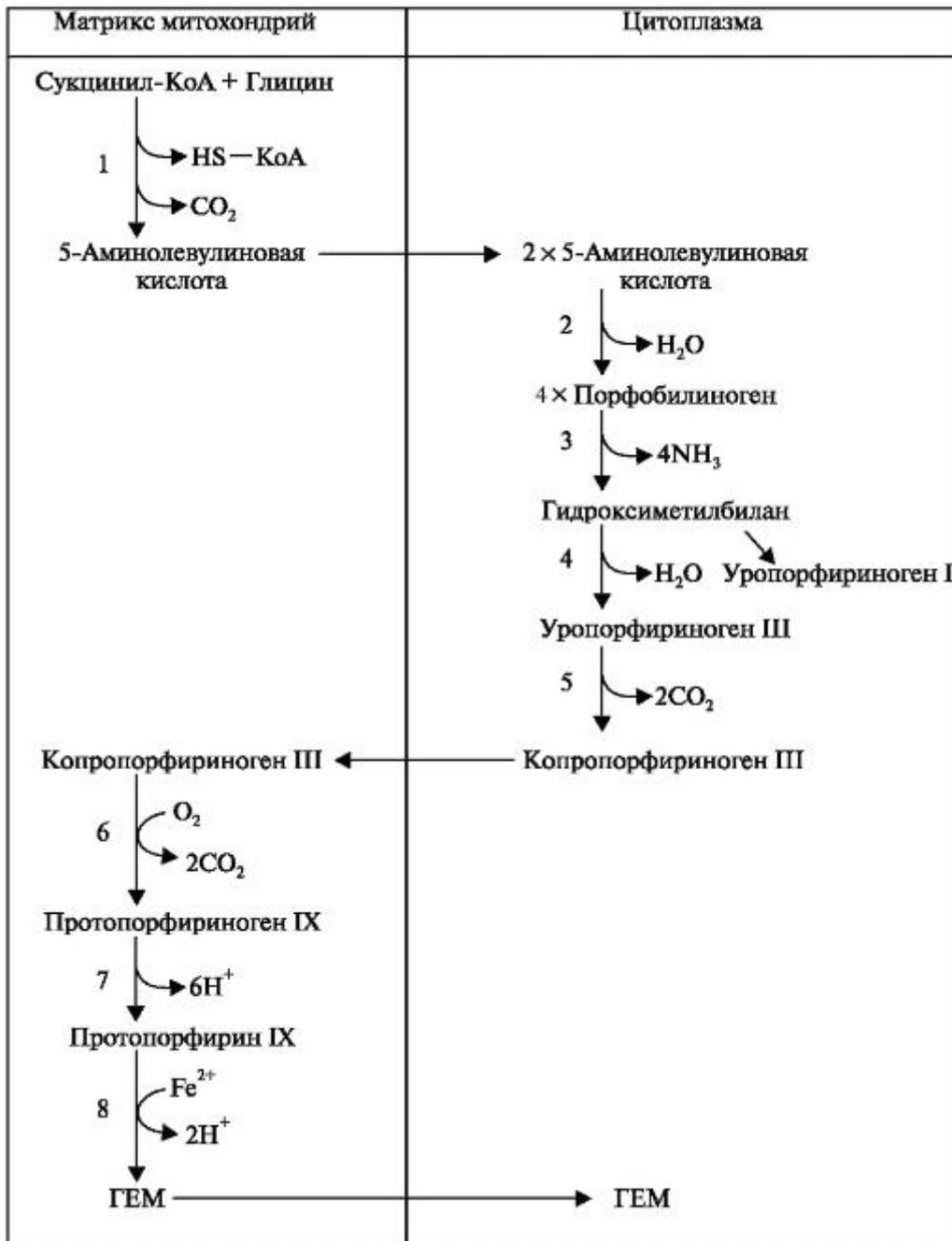


Рис. 17-4. Биосинтез гема. Ферменты: 1 - 5-аминолевулинатсинтаза; 2 - 5-аминолевулинатдегидратаза; 3 - порфобилиногендезаминаза; 4 - уропорфириноген-III-косинтаза; 5 - уропорфириногендекарбоксилаза; 6 - копропорфириногеноксидаза; 7 - протопорфириногеноксидаза; 8 - феррохелатаза

Предшественники гема (порфирины) в норме определяются в моче в небольшом количестве. Повышенная их экскреция почками возникает при нарушении биосинтеза гема. Такие состояния обозначают термином «порфирии». Они бывают врожденными или приобретенными. Частыми проявлениями болезни вследствие отложения порфиринов в коже бывают повышенная чувствительность к свету и образование трудно заживающих волдырей, невротические расстройства. В моче и фекалиях определяют повышенное количество 5-аминолевулината и побочных продуктов синтеза гема - уро- и копропорфиринов.

*В записную книжку врача*

#### Фотодинамическая терапия

Фотодинамическая терапия (ФДТ) - метод лечения, основанный на избирательной доставке в ткань-мишень фотосенсибилизатора - препарата, повышающего чувствительность тканей к свету. При лазерном облучении опухоли в результате фотохимической реакции происходит возбуждение фотосенсибилизатора, приводящее к образованию свободных радикалов кислорода, вызывающих гибель клеток.

В качестве основных сенсibilizаторов, применяемых в ФДТ, используются порфирины, их предшественники или производные. Для ФДТ опухолей поверхностной локализации используют 5-аминолевулиновую кислоту. Сама по себе 5-аминолевулиновая кислота фотосенсибилизатором не является, это предшественник эндогенного фотосенсибилизатора протопорфирина IX. ФДТ эффективна при лечении злокачественных опухолей в случае невозможности использования традиционных методов лечения (из-за тяжелых сопутствующих заболеваний или неоперабельной опухоли), доброкачественных и злокачественных кожных заболеваний. ФДТ также используют при обработке кариозных полостей зубов.

#### Регуляция биосинтеза гемопротеинов

Синтез гемопротеинов в печени и эритроидных клетках регулируется по-разному. Вместе с тем имеются и общие закономерности.

- Регуляторными ферментами являются 5-аминолевулинатсинтаза и феррохелатаза. Их активность зависит от уровня железа и количества гема. Избыток синтезированного гема замедляет синтез 5-аминолевулинатсинтазы и ингибирует активность феррохелатазы.
- В эритропоэтических клетках активность 5-аминолевулинатсинтазы в условиях гипоксии возрастает, в то время как в печени гипоксия не влияет на активность этого фермента.
- В гепатоцитах синтез 5-аминолевулинатсинтазы индуцируют инсектициды, канцерогены, барбитураты и другие токсичные соединения. Для их обезвреживания требуется большое количество цитохрома P450.
- Гем влияет на синтез на рибосомах белковой части гемопротеинов. Он происходит только в присутствии гема, и при низкой концентрации гема синтез глобина замедляется. Следовательно, синтез гема и апопротеинов происходит координированно, и ни один из этих составляющих не образуется в избыточном или недостаточном количестве.

#### Аномальные гемоглобины

Точечные мутации в одном из генов, кодирующих синтез  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -и  $\delta$ -цепей, сопровождаются появлением аномальных гемоглобинов. Выявлено около 300 различных аномальных гемоглобинов. Они описываются формулой, в которой указываются место замены, замещенная аминокислота и аминокислота-«заместитель». Гемоглобин S (HbS) характеризуется заменой глутаминовой кислоты в шестом положении  $\beta$ -цепей глобина на валин ( $\beta$ Глу<sup>6</sup>  $\beta$ Вал<sup>6</sup>). Гемоглобин M (HbM) появляется в случае замены в  $\beta$ -цепях остатка гистидина-87, участвующего в связывании глобина с железом гема на другие аминокислоты, чаще тирозин.

### КАТАБОЛИЗМ ГЕМОПРОТЕИНОВ

Распад гемопротеинов начинается, как правило, с отделения гема. Белковая часть молекулы подвергается протеолизу, и высвобождаемые аминокислоты реутилизируются. Железо, высвобождаемое в процессе распада гема, также вновь используется или запасается. Только порфириновое кольцо гема подвергается деградации.

Большинство молекул гема (до 70%), подлежащих катаболизму, поставляют эритроциты. В крови они находятся 110-120 сут и затем поглощаются ретикулоэндотелиальными клетками селезенки, костного мозга, печени, где подвергаются основному распаду. Под действием микросомального фермента *гемоксигеназы* разрываются связи между I и II пиррольными кольцами с удалением соединявшего их углерода в виде молекулы  $\text{CO}_2$ , и образуется вердоглобин. Далее высвобождаются глобин и железо в окисленной форме ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Порфириновое кольцо преобразуется в линейный тетрапиррол биливердин - пигмент зеленого цвета (рис. 17-5). Восстановление метинового мостика между III и IV пиррольными кольцами НАДФН-зависимой биливердинредуктазой сопровождается появлением пигмента - билирубина. Образовавшийся билирубин нерастворим в воде и обладает токсичными свойствами. Покидая клетку, в плазме крови он обратимо связывается с альбумином. Этот билирубин получил название *непрямого*, или *неконъюгированного* (свободного).

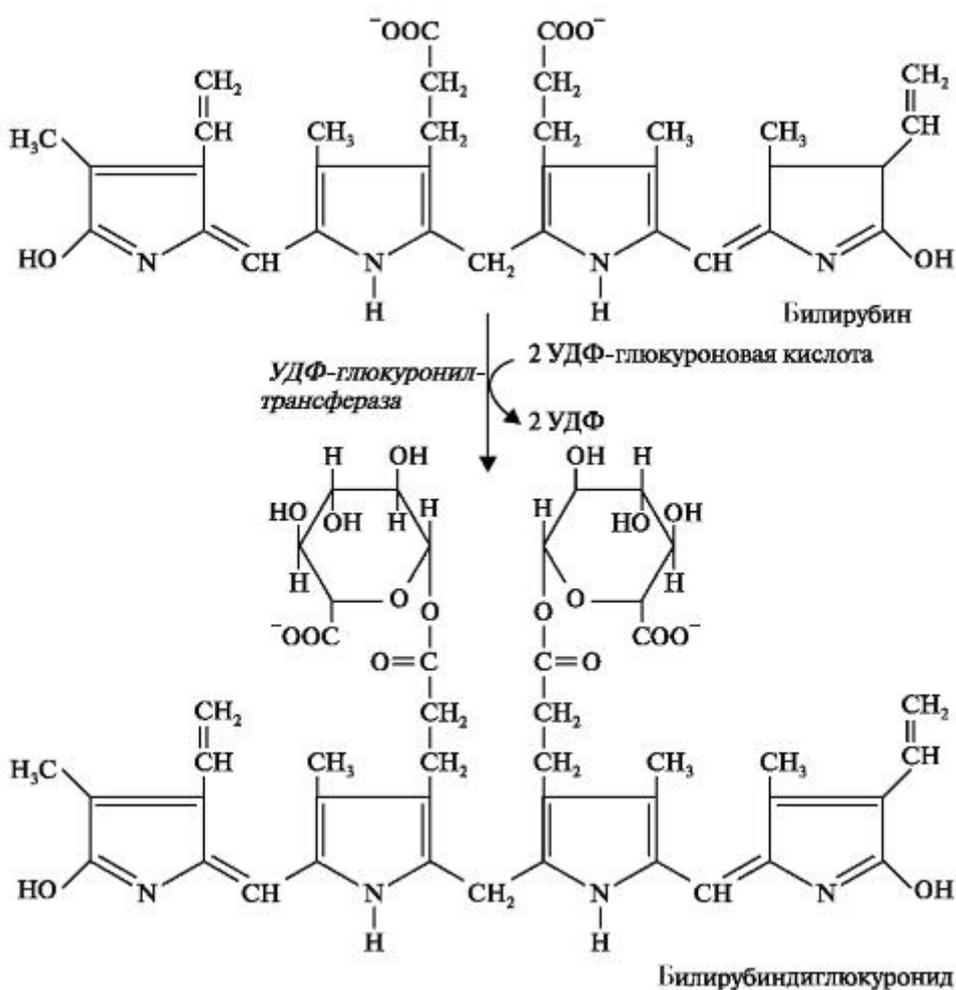


Рис. 17-5. Реакция конъюгации билирубина с глюкуроновой кислотой в печени

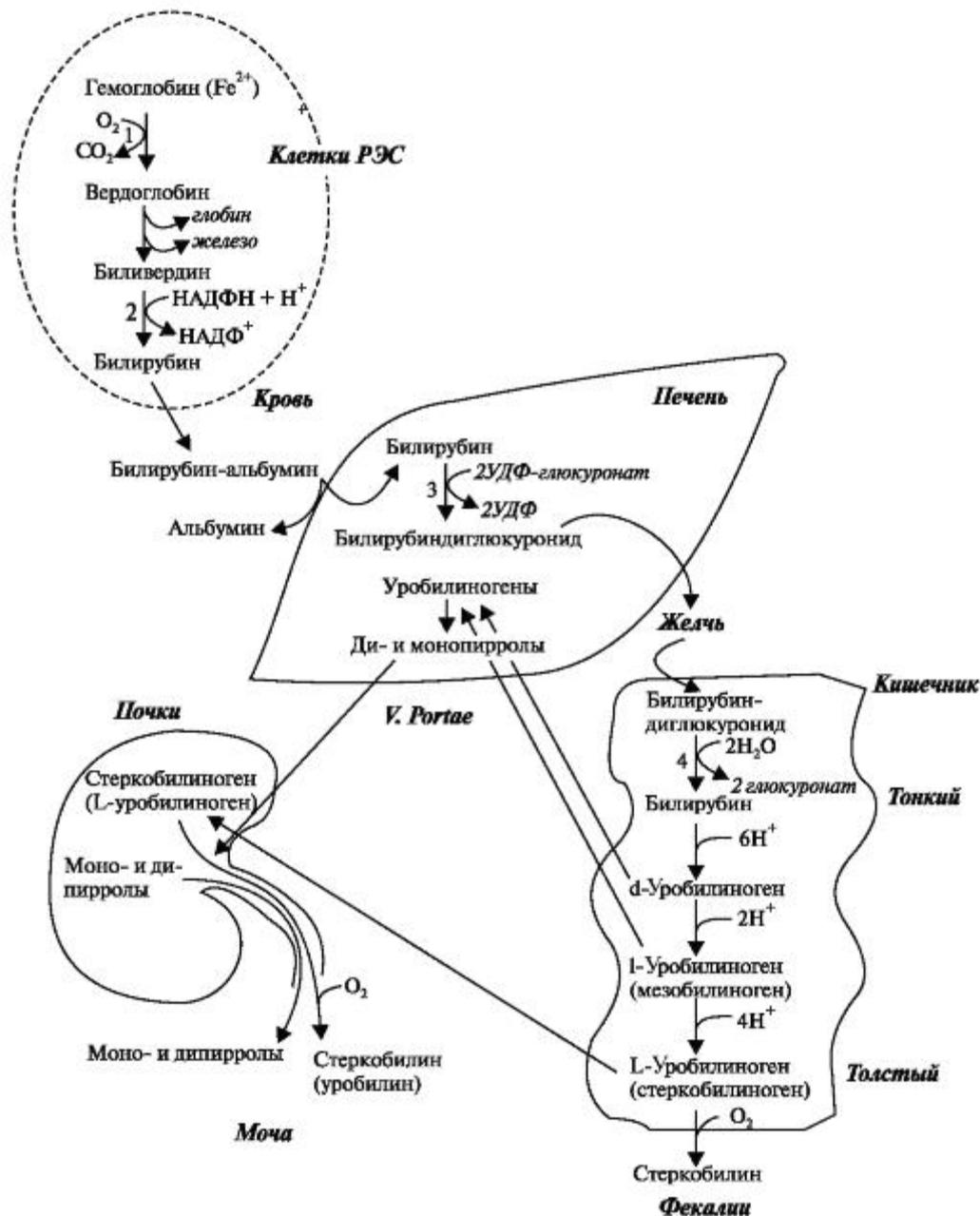


Рис. 17-6. Распад гемоглобина. Ферменты: 1 - гемоксигеназа; 2 - биливердин-редуктаза; 3 - УДФ-глюкуронилтрансфераза; 4 - β-глюкуронидаза. РЭС - ретикулоэндотелиальная система

На поверхности гепатоцитов комплекс распадается, и высвободившийся билирубин попадает в клетку путем облегченной диффузии с помощью белка-переносчика. В ЭПР гепатоцитов на карбоксильную группу вначале одного, а затем второго остатка пропионовой кислоты билирубина переносится остаток глюкуроновой кислоты от УДФ-глюкуроновой кислоты. Эту реакцию катализирует фермент УДФ-глюкуронилтрансфераза (рис. 17-6).

Образующийся билирубин-диглюкуронид хорошо растворяется в воде и получил название *конъюгированного (связанного) билирубина*. Этот

билирубин дает прямую реакцию с реактивом Эрлиха, и поэтому его еще называют *прямым* билирубином.

Часть конъюгированного билирубина попадает в плазму крови, однако большая его часть секретируется в желчь и поступает в тонкий кишечник, где при участии  $\beta$ -глюкуронидазы происходит отщепление глюкуроновой кислоты.

Образовавшийся свободный билирубин восстанавливается кишечной микрофлорой до уробилиногенов (d, I, L). Часть уробилиногенов всасывается и через воротную вену поступает в печень, где разрушается до моно- и дипирролов. Основная же часть уробилиногенов в толстой кишке под действием кишечной микрофлоры восстанавливается до стеркобилиногена. Всего в кишечнике в сутки образуется до 300 мг стеркобилиногена). Выделяясь с фекалиями, L-стеркобилиноген окисляется кислородом воздуха до стеркобилина - пигмента коричневого цвета. Часть кишечного стеркобилиногена по системе нижней полой вены всасывается в кровь, достигает почек и выделяется с мочой. В процессе окисления этого стеркобилиногена образуется уробилин.

*В записную книжку врача Гематома*

При разрыве сосудов из крови в окружающие ткани выходят эритроциты, из них освобождается гемоглобин, что приводит к формированию гематомы - синяка красно-синего цвета. По мере превращения гемоглобина в желчные пигменты гематома меняет цвет от зеленого до желтого вследствие образования желчных пигментов.

## БИЛИРУБИНЕМИИ

В сыворотке крови взрослого человека в норме содержится 5,0- 24,2 мкмоль/л общего билирубина, 25% которого составляет конъюгированный (прямой) билирубин и 75% - неконъюгированный (непрямой).

Повышение содержания билирубина в крови более 35 мкмоль/л ведет к отложению его в тканях, в том числе в коже и слизистых оболочках, которые окрашиваются в желтый цвет. Такое состояние называют желтухой, и оно может быть вызвано разными причинами. Различают несколько видов желтух.

- *Гемолитическая* (надпеченочная) *желтуха* - развивается при усиленном распаде эритроцитов в случае переливания несовместимой крови, инфекционных заболеваний, при врожденных и приобретенных дефектах метаболических процессов в эритроцитах. При данной форме в крови

увеличивается содержание общего билирубина за счет неконъюгированного. В моче билирубин отсутствует, а каловые массы содержат избыточное количество стеркобилина.

- *Физиологическая желтуха новорожденных* - особый вариант гемолитической желтухи, связанный с заменой фетального гемоглобина (HbF) гемоглобином A<sub>1</sub>, присутствующим у взрослого человека. У новорожденных в печени наблюдаются низкую активность УДФ-глюкуронилтрансферазы и недостаточный синтез УДФ-глюкуроновой кислоты. Вследствие этого не происходит конъюгации свободного билирубина, и его количество в плазме крови может достигать 200 мкмоль/л. Длительное значительное повышение непрямого билирубина у новорожденных в крови оказывает токсическое воздействие на развивающийся мозг, что проявляется судорогами или другими тяжелыми расстройствами (билирубиновая энцефалопатия).

- *Печеночная (паренхиматозная) желтуха* - обусловлена повреждением клеток печени вирусами, токсическими препаратами. На начальных этапах процесс присоединения глюкуроновой кислоты к билирубину сохраняется, но образовавшийся прямой билирубин частично попадает в большой круг кровообращения. Экскреция желчи также нарушена, и в кишечник билирубина попадает меньше, чем в норме. Меньше обычного образуется мезобилиногена, но и это небольшое его количество не распадается в печени, поэтому мезобилиноген попадает в кровь, а затем выделяется с мочой, что предопределяет положительную реакцию на уробилиноген. Количество образующегося стеркобилиногена снижается, и фекалии обесцвечиваются, т.е. становятся гипоили ахоличными. В плазме крови при паренхиматозной желтухе в начале определяется повышенное количество общего билирубина в основном за счет конъюгированного. По мере нарушения детоксикационной функции печени в плазме крови накапливается значительное количество неконъюгированного билирубина.

- *Механическая (обтурационная, подпеченочная) желтуха* - связана с прекращением поступления желчи в кишечник при остром воспалении желчевыводящих протоков, их закупоркой камнями (желчнокаменная болезнь), наличием опухоли головки поджелудочной железы, сдавливающей общий выводной проток. Нарушение оттока желчи в кишечник сопровождается выходом конъюгированного билирубина в кровь, а затем и в

мочу. Фекалии обесцвечены. При обтурационной желтухе в плазме крови повышено количество общего билирубина за счет конъюгированного, и в моче определяется высокий уровень прямого билирубина. При длительно сохраняющейся механической желтухе функции печени нарушаются, и в этом случае гепатоциты не захватывают свободный билирубин, что приводит к накоплению и свободного билирубина в крови.

Таблица 17-1. Клинико-лабораторные показатели при различных типах желтух

Тип желтухи	Плазма крови	Моча	Фекалии
Гемолитическая	Общий билирубин повышен за счет непрямого	Пигментирована стеркобилином (уробилином)	Густо пигментированы стеркобилином
Паренхиматозная	Общий билирубин повышен вначале за счет прямого, а затем и непрямого билирубина	Пигментирована прямым билирубином, определяются уробилин и уробилиноген	Слабо пигментированы или бесцветные
Обтурационная	Общий билирубин повышен вначале за счет прямого, при длительно сохраняющейся желтухе и за счет непрямого билирубина	Пигментирована прямым билирубином	Бесцветные

### ОБМЕН ЖЕЛЕЗА

В организме взрослого человека содержится 4,5-5,5 г железа, большая часть которого присутствует в клетках: 2,6 г (57%) - в эритроцитах в составе гемоглобина, 0,4 г (9%) - в составе мышечного белка миоглобина и 1,5 г (около 33%) приходится на негемовые запасы в составе белков - ферритина и трансферрина. В сыворотке крови и лимфе железо практически полностью связано с белками.

В организм человека поступление железа, преимущественно в виде ферриона ( $\text{Fe}^{3+}$ ), осуществляется с пищей и зависит от характера питания (рис. 17-7).



Рис. 17-7. Источники железа, его всасывание в кишечнике и транспорт к клеткам

При попадании желудочного содержимого в кишечник pH пищевого комка повышается, что сопровождается образованием нерастворимых солей железа.

В этих условиях только муцин способен поддерживать феррион в растворимом состоянии. Всасывание железа происходит в тонком кишечнике и особенно интенсивно в энтероцитах двенадцатиперстной кишки, где существуют *трансферриноподобные системы*, осуществляющие транспорт пищевого железа в кровь.

В плазме крови железо к клеткам различных органов и тканей переносится другим белком - *трансферрином*. Одна молекула трансферрина способна связывать две молекулы железа. В клетку комплекс «железотрансферрин»

попадает после связывания его с трансферриновым рецептором. После распада железо-белкового комплекса трансферрин возвращается в плазму крови. Высвободившееся внутриклеточное железо участвует в синтезе различных гемопroteинов, а в эритроидных клетках используется для синтеза гемоглобина.

Железо запасается в селезенке, печени и костном мозге в составе белка *ферритина*, который может содержать до 2500 ионов железа в виде кристаллов  $FeO_2H$ . Скорость синтеза ферритина в печени и селезенке регулируется внутриклеточным содержанием железа.

Часть образованного ферритина попадает в кровь, а избыток его откладывается в виде аморфных кристаллов в лизосомах клеток печени и селезенки, микроскопически его идентифицируют как *гемосидерин*.

Определенное количество железа высвобождается из гема при распаде эритроцитов и может использоваться повторно клетками при синтезе гемопroteинов.

*В записную книжку врача*

Организмом в сутки теряется около 1 мг железа. Недостаточное поступление железа с пищей, нарушение его всасывания, длительные кровопотери приводят к развитию *железодефицитной анемии*.

## ГЛАВА 18. МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕОТИДОВ

### БИОСИНТЕЗ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Большинство клеток может синтезировать пуриновые азотистые основания *de novo* из низкомолекулярных предшественников. При этом основания в свободном виде не синтезируются, а пуриновый цикл (рис. 18-1) собирается путем последовательного присоединения необходимых компонентов к рибозо-5-фосфату. При завершении сборки цикла образуется готовый нуклеотид.

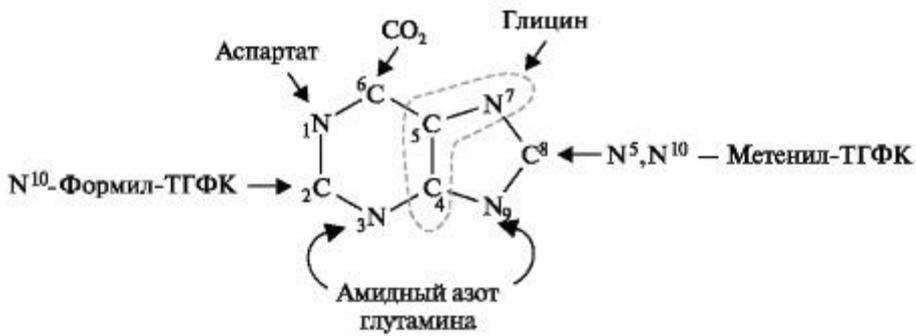


Рис. 18-1. Источники атомов пуринового цикла

Механизм присоединения к рибозо-5-фосфату получил название *риботилирования* (рис. 18-2). В этом процессе участвует активная форма рибозо-5-фосфата - 5-фосфорибозил-1-пирофосфат (ФРПФ), который образуется в результате пирофосфорилирования рибозо-5-фосфата под действием рибозофосфатпирофосфокиназы.

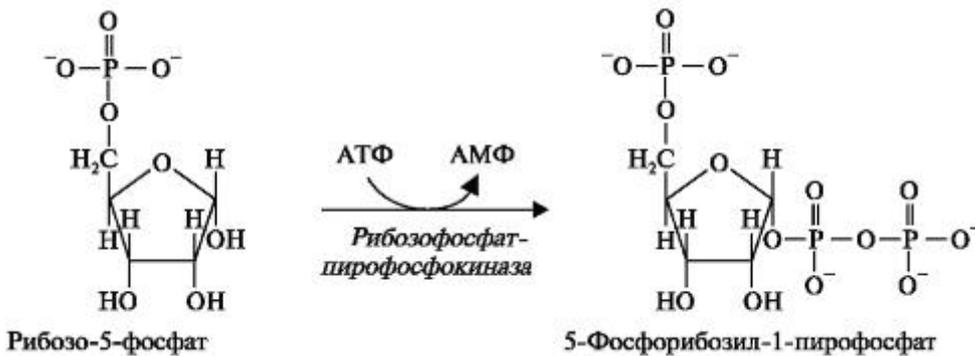


Рис. 18-2. Риботилирование

Первой реакцией в синтезе пуриновых нуклеотидов *de novo* является присоединение аминогруппы, донором которой является глутамин, к первому атому углерода молекулы ФРПФ (рис. 18-3).

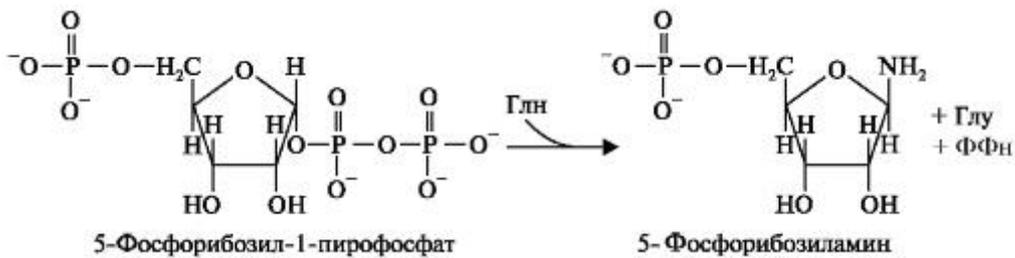


Рис. 18-3. Первая реакция в синтезе пуриновых нуклеотидов

В течение последующих 9 реакций на молекуле 5-фосфорибозиламина происходит сборка пуринового кольца. В результате первым пуриновым

нуклеотидом является инозинмонофосфат (ИМФ), основанием которого служит гипоксантин (рис. 18-4).

Далее гипоксантин в две реакции может превратиться либо в аденин (с образованием аденозинмонофосфата), либо в гуанин (с образованием гуанозинмонофосфата). Нуклеозидмонофосфаты-ИМФ, а также АМФ и ГМФ - конечные продукты данного метаболического пути - являются ингибиторами реакции образования 5-фосфорибозиламина.

На синтез одной молекулы пуринового нуклеотида затрачивается 6 молекул АТФ, поэтому в целях экономии организм все-таки использует свободные пуриновые азотистые основания, которые образуются в результате внутриклеточной деградации нуклеотидов.

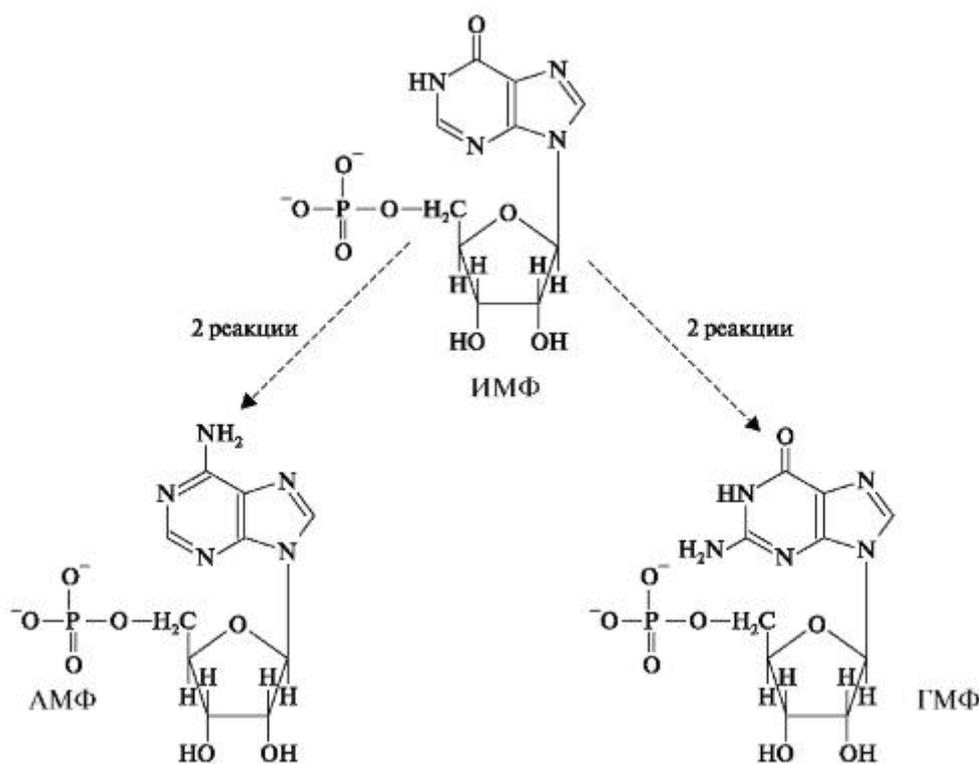


Рис. 18-4. Образование аденозинмонофосфата и гуанозинмонофосфата из инозинмонофосфата в ходе биосинтеза пуриновых нуклеотидов

Этот путь получил название *реутилизации пуриновых оснований*. В нем участвуют два фермента: аденинфосфорибозилтрансфераза (АФРТ) и гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза (ГГФРТ), которые катализируют перенос свободного пуринового основания на ФРПФ (рис. 18-5):

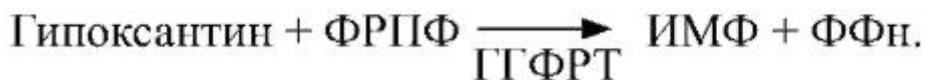
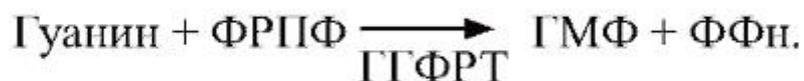
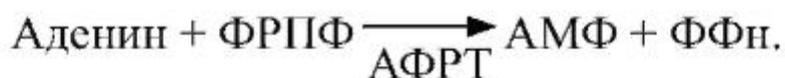


Рис. 18-5. Реакции реутилизации пуриновых оснований

Этот путь позволяет клеткам сэкономить энергию для других целей.

Некоторые клетки, например эритроциты, не могут синтезировать пуриновые нуклеотиды *de novo* и потому используют только уже имеющиеся основания. Значение реутилизации пуриновых нуклеотидов для организма особенно наглядно демонстрирует генетическое заболевание - синдром Леша-Найхана, обусловленное отсутствием ГГФРТ.

*В записную книжку врача* Синдром Леша-Найхана

Это заболевание характеризуется умственной отсталостью, нарушением координации движений и агрессивностью, направленной против самого себя. Такие больные часто повреждают себе пальцы, губы (особенно нижнюю) и ткани ротовой полости, что приводит к образованию ран. Поэтому больным с синдромом Леша-Найхана приходится удалять зубы или проводить резекцию коронковой части зубов. Поскольку в головном мозге синтез пуриновых нуклеотидов *de novo* выражен довольно слабо, мозг особенно чувствителен к нарушениям процесса реутилизации оснований. В связи с отсутствием фермента ГГФРТ у таких больных усиливается биосинтез пуриновых нуклеотидов *de novo* в печени, а в результате неспособности повторно использовать пуриновые азотистые основания последние превращаются в мочевую кислоту. Поэтому другими характерными признаками синдрома Леша-Найхана являются урикемия и отложение солей мочевой кислоты (уратов) в почках и суставах.

Образование пуриновых нуклеозидтрифосфатов

Синтезированные *de novo* пуриновые нуклеозидмонофосфаты под действием соответствующих нуклеозидмонофосфаткиназ превращаются в

нуклеозиддифосфаты, а те, в свою очередь, фосфорилируются нуклеозиддифосфаткиназами с образованием нуклеозидтрифосфатов (рис. 18-6):



Рис. 18-6. Реакции образования нуклеозидтрифосфатов

### Регуляция синтеза пуриновых нуклеотидов

Объектом аллостерической регуляции по типу отрицательной обратной связи является фермент рибозофосфатпирофосфокиназа, активность которого ингибируют АМФ, АДФ, ГМФ и ГДФ. Эти нуклеотиды тормозят также и образование 5-фосфорибозиламина и регулируют пути превращения ИМФ.

### Катаболизм пуринов

Отличительная особенность катаболизма пуринов у человека - окисление пуринового цикла без нарушения его целостности. Сначала пуриновые нуклеотиды АМФ и ГМФ под действием 5'-нуклеотидазы превращаются в нуклеозиды аденозин и гуанозин. Затем аденозин под действием аденозиндезаминазы превращается в инозин. Далее нуклеозидфосфорилаза расщепляет гуанозин и инозин с образованием гуанина, гипоксантина и рибозо-1-фосфата (рис. 18-7).

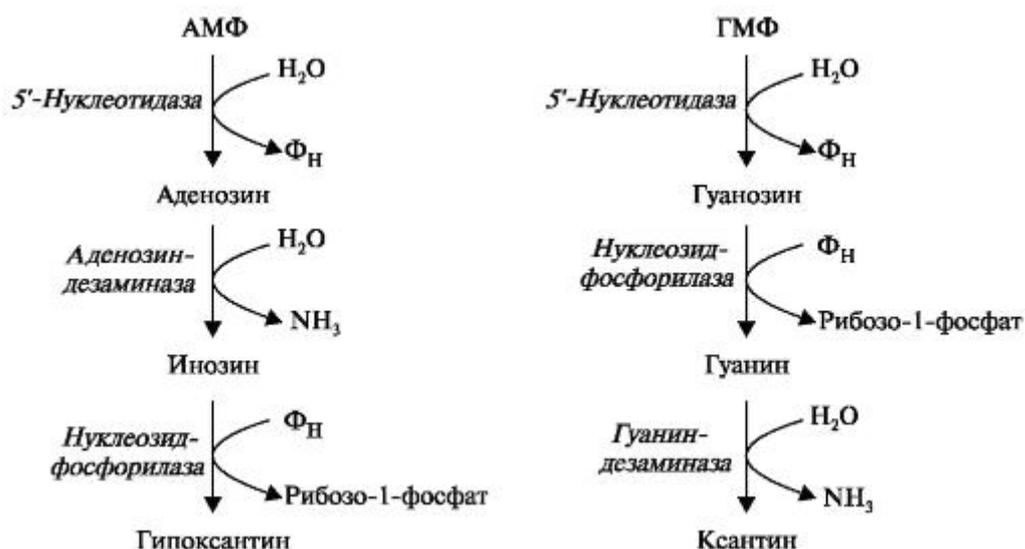


Рис. 18-7. Образование свободных пуриновых оснований при деградации нуклеотидов (схема)

Гуанин под действием гуаниндезаминазы превращается в ксантин.

Дальнейшие превращения осуществляет фермент ксантиноксидаза (рис. 18-8).



Рис. 18-8. Реакции, катализируемые ксантиноксидазой

Ксантиноксидаза особенно активна в клетках печени и слизистой оболочки кишечника. Она катализирует последовательное превращение гипоксантина в ксантин и ксантина в мочевую кислоту. Мочевая кислота плохо растворима в воде, и при ее избыточном образовании развивается заболевание «подагра».

*В записную книжку врача Подагра*

Это заболевание обусловлено отложением кристаллов солей мочевой кислоты в синовиальной оболочке суставов, хрящевой ткани, а также в почках и мочевыводящих путях. Именно поэтому основными клиническими проявлениями подагры считают артрит и мочекаменную болезнь. Для лечения подагры используют ингибиторы ксантиноксидазы, такие, например, как аллопуринол. Аллопуринол - механизм-активируемый ингибитор этого фермента. Он представляет собой структурный аналог гипоксантина, который под действием ксантиноксидазы превращается в аллоксантин (рис. 18-9). Последний необратимо связывается с ксантиноксидазой, вызывая, таким образом, самоинактивацию этого фермента. В результате происходит снижение образования мочевой кислоты и накопление ксантина и гипоксантина. Эти продукты лучше растворимы в воде и поэтому гораздо эффективнее выводятся из организма.

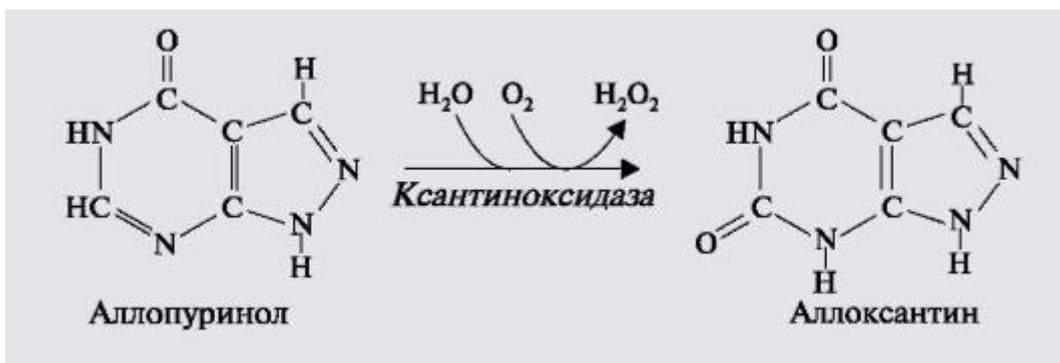


Рис. 18-9. Превращение аллопуринола в аллоксантин

## МЕТАБОЛИЗМ ПИРИМИДИНОВЫХ АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ

В отличие от пуриновых азотистых оснований катаболизм пиримидиновых азотистых оснований включает раскрытие пиримидинового кольца.

Конечные продукты катаболизма пиримидиновых азотистых оснований: углекислый газ, аммиак, мочевины,  $\beta$ -аланин и (в случае тимина)  $\beta$ -аминоизомасляная кислота -  $\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COO}^-$ .

### Синтез пиримидиновых нуклеотидов

Особенность синтеза пиримидиновых нуклеотидов *de novo* заключается в том, что сначала происходит сборка циклической структуры - оротовой кислоты, которая затем взаимодействует с ФРПФ и превращается в нуклеотид, из которого образуется уридин-5'-монофосфат (УМФ).

Синтез оротовой кислоты начинается с реакции образования карбамоилфосфата, которую катализирует цитозольная карбамоилфосфатсинтетаза II (рис. 18-10). В отличие от митохондриальной карбамоилфосфатсинтетазы I, участвующей в орнитинном цикле, донором азота для цитозольного фермента является глутамин.

Рис. 18-10. Реакция образования карбамоилфосфата

Далее в реакции карбамоилфосфата с аспаратом, которую катализирует аспараткарбамоилтрансфераза (аспартаттранскарбамоилаза), образуется N-карбамоиласпартат (рис. 18-11).

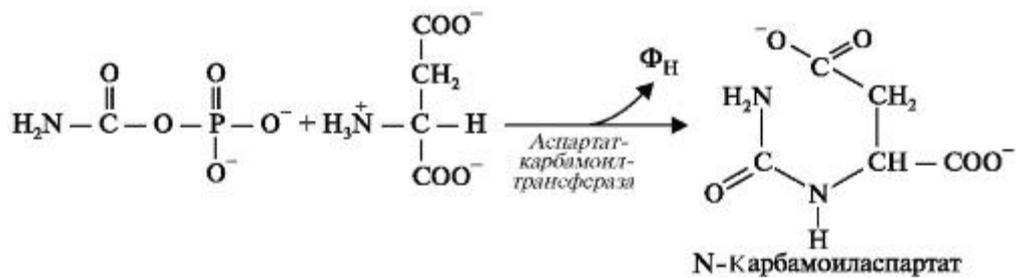


Рис. 18-11. Реакция образования N-карбамоиласпартата

В ходе следующей реакции, при участии дигидрооротазы, происходит формирование циклической структуры - дигидрооротовой кислоты (рис. 18-12).

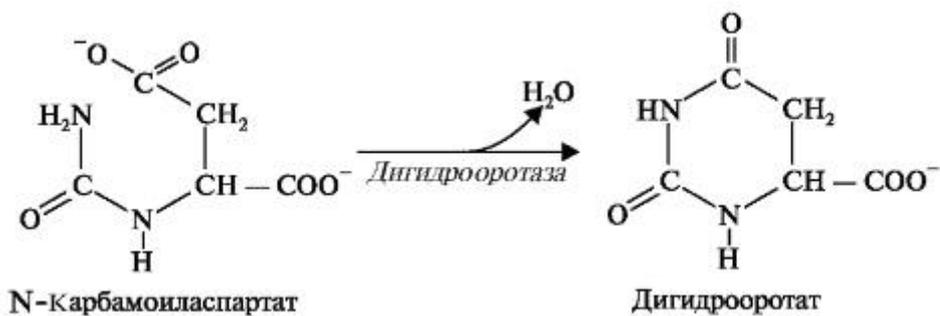


Рис. 18-12. Формирование дигидрооротовой кислоты

Далее дигидрооротовая кислота окисляется митохондриальной дигидрооротатдегидрогеназой с образованием оротовой кислоты (рис. 18-13).

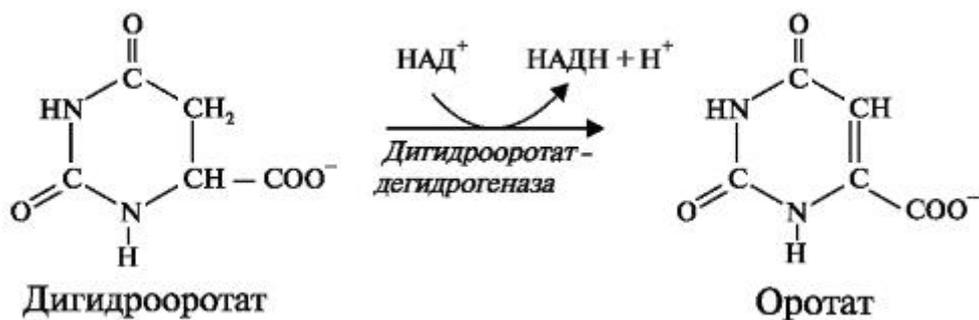


Рис. 18-13. Реакция окисления дигидрооротовой кислоты

У эукариот катализ всех трех рассмотренных выше реакций (синтез карбамоилфосфата, образование N-карбамоиласпартата и дигидрооротовой кислоты) осуществляет один многофункциональный КАД-белок, в котором заключены три ферментативные активности: карбамоилфосфатсинтетазная, аспартаткарбамоилтрансферазная и дигидрооротазная. Этот гомотримерный белок состоит из трех идентичных полипептидных цепей, каждой из которых

свойственны все три ферментативные активности, обеспечивающие образование дигидрооротовой кислоты.

Затем в результате реакции оротовой кислоты с ФРПФ (рис. 18-14), которую катализирует оротатфосфорибозилтрансфераза, образуется оротидин-5'-монофосфат (ОМФ).

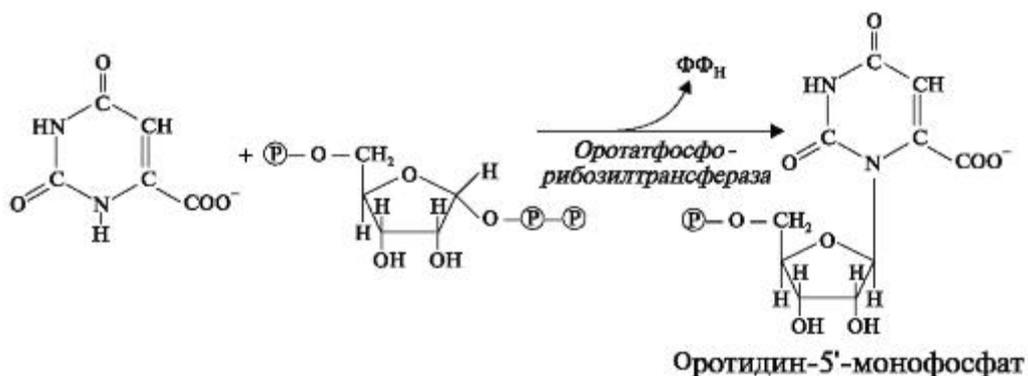


Рис. 18-14. Реакция оротовой кислоты с 5-фосфорибозил-1-пирофосфатом

При декарбоксилировании ОМФ под действием оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазы образуется УМФ (рис. 18-15).

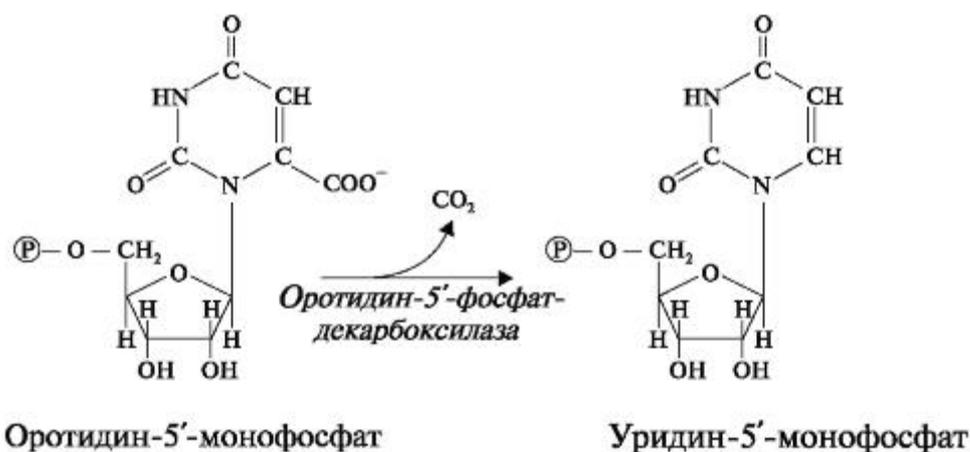


Рис. 18-15. Образование уридин-5'-монофосфата

У человека и животных две заключительные реакции, ведущие к образованию УМФ, катализирует белок, который объединяет активность оротатфосфорибозилтрансферазы и ОМФ-декарбоксилазы. Он получил название *УМФ-синтазы*.

*В записную книжку врача*

Ингибиторы УМФ-синтазы

УМФ-синтаза - полифункциональный белок, представленный одной полипептидной цепью, в которой выделяют домены, проявляющие оротатфосфорибозилтрансферазную и ОМФ-декарбоксилазную активность. Активность УМФ-синтазы выше в быстроделющихся клетках (в том числе и злокачественных). При отсутствии субстратов УМФ-синтаза находится преимущественно в виде мономера, при связывании субстратов и различных регуляторов происходит образование димеров. Ингибиторы УМФ-синтазы (6-азауридин, пирузофуридин) используют в химиотерапии злокачественных опухолей.

#### Образование пиримидиновых нуклеозидтрифосфатов

УТФ образуется в результате последовательных реакций, катализируемых соответствующей нуклеозидмонофосфаткиназой, а затем нуклеозиддифосфаткиназой (рис. 18-16):

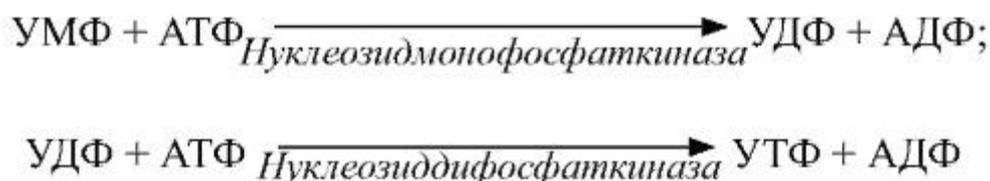


Рис. 18-16. Образование уридинтрифосфата

ЦТФ образуется из УТФ в результате реакции амидирования пиримидинового цикла.

#### Образование дезоксирибонуклеотидов

Образование пуриновых и пиримидиновых дезоксирибонуклеотидов происходит в результате восстановления остатка рибозы рибонуклеотиддифосфатов (АДФ, ГДФ, ЦДФ, УДФ) до дезоксирибозы (рис. 18-17). Эту реакцию катализирует рибонуклеозиддифосфатредуктаза (рибонуклеотидредуктаза).

Исходным источником восстановительных эквивалентов для этой реакции является НАДФН. Однако их перенос, необходимый для образования дезоксирибозы, происходит в результате сложных окислительно-восстановительных превращений, в которых участвуют сульфгидрильные группы небольшого белка тиоредоксина.

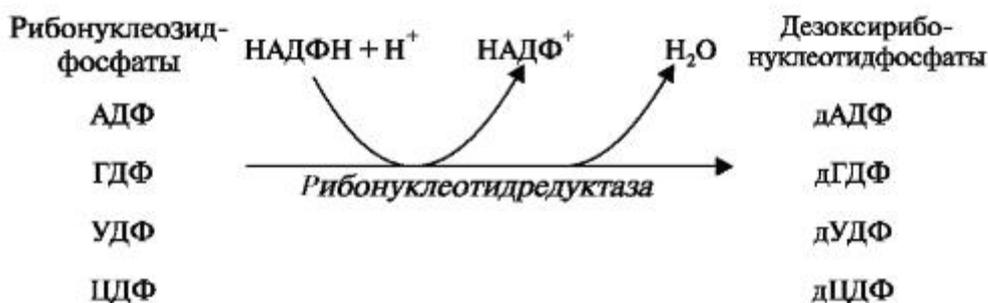
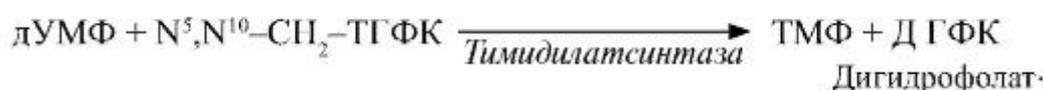


Рис. 18-17. Образование пуриновых и пиримидиновых дезоксирибонуклеотидов

Тимидиновые нуклеотиды образуются из дЦДФ и дУМФ. Превращение дУМФ в дТМФ (ТМФ) катализирует фермент тимидилатсинтаза, для работы которого необходим метилентетрагидрофолат (N<sub>5</sub>,N<sub>10</sub>-CH<sub>2</sub>-ТГФК):



Поскольку тимин входит только в состав ДНК, приставку дезокси-или букву «д», ее обозначающую, перед тимидиновыми нуклеотидами обычно не ставят. Дигидрофолат затем восстанавливается под действием другого фермента - дигидрофолатредуктазы.

Небольшое количество ТМФ может образовываться в результате реутилизации тимидина, которую осуществляет фермент тимидинкиназа:



Дальнейшее образование тимидиндифосфатов и тимидинтрифосфатов протекает по сценарию, рассмотренному выше.

*В записную книжку врача*

Дигидрофолатредуктаза и ее ингибиторы

Дигидрофолатредуктаза катализирует реакцию восстановления дигидрофолиевой кислоты (ДГФК) в тетрагидрофолиевую (ТГФК).

Ингибирование дигидрофолатредуктазы приводит к торможению биосинтеза дТМФ и в конечном счете - биосинтеза ДНК, прежде всего в быстропролиферирующих тканях.

## ЧАСТЬ IV. ХРАНЕНИЕ И РЕАЛИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ.

### ГЛАВА 19. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ РЕПЛИКАЦИИ И РЕПАРАЦИИ ДНК У ЭУКАРИОТ

Вопросы по теме

- Понятие о матричных биосинтезах.
- Репликация ДНК.
- Процесс репарации ДНК.
- Патология репарации и ее последствия.

#### ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ РЕПЛИКАЦИИ ДНК У ЭУКАРИОТ

Каждый раз в процессе деления клетки происходит удвоение молекул ДНК. Этот процесс получил название репликации (от позднелат. *replicatio* - повторение). В клетках эукариот репликация приурочена к S-фазе клеточного цикла (от англ. *Synthetic phase* - фаза синтеза), которой предшествует G<sub>1</sub>-фаза (от англ. *Gap in DNA synthesis* - промежуток в синтезе ДНК).

Репликация ДНК происходит полуконсервативным способом. В процессе репликации две материнские цепи разъединяются, и каждая из них является матрицей для синтеза новой цепи, которую называют дочерней. В результате каждая новая двойная спираль содержит одну материнскую и одну дочернюю цепь (рис. 19-1).

В основе процесса репликации лежит комплементарность пар азотистых оснований, стабилизированных водородными связями (A=T и G=C), поэтому последовательность азотистых оснований материнской цепи определяет последовательность оснований в дочерней цепи.

Репликация начинается в определенной точке, называемой точкой начала репликации. В клетках эукариот одновременно возникает много (до тысячи и более) таких точек, в каждой из которых образуются две репликационные вилки, движущиеся в противоположных направлениях (рис. 19-2).

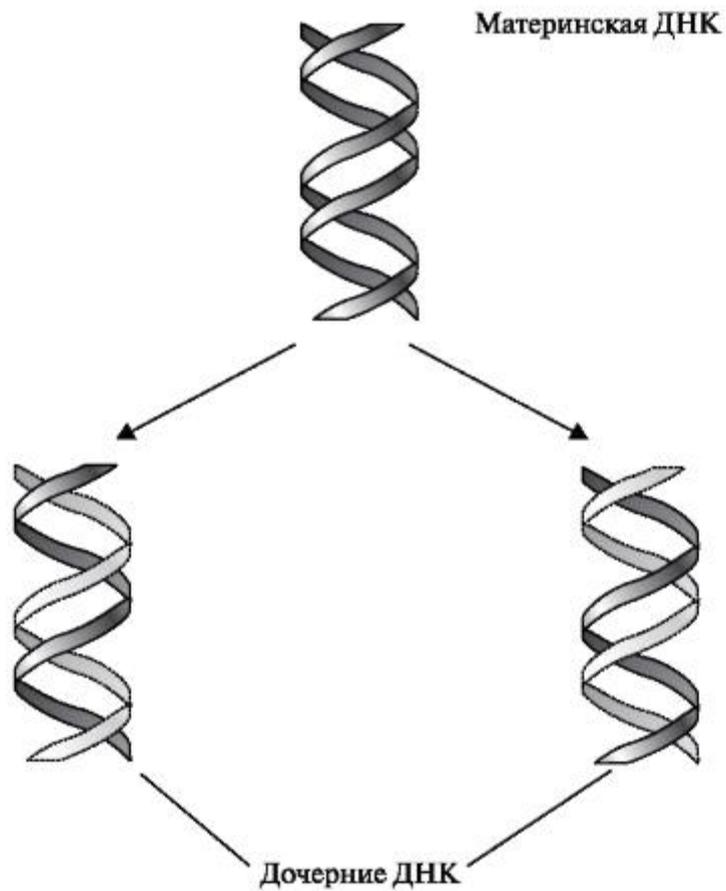


Рис. 19-1. Полуконсервативная репликация материнской молекулы ДНК, из которой образуются две молекулы, каждая из которых содержит по одной материнской и дочерней (новосинтезированной) цепи (схема)

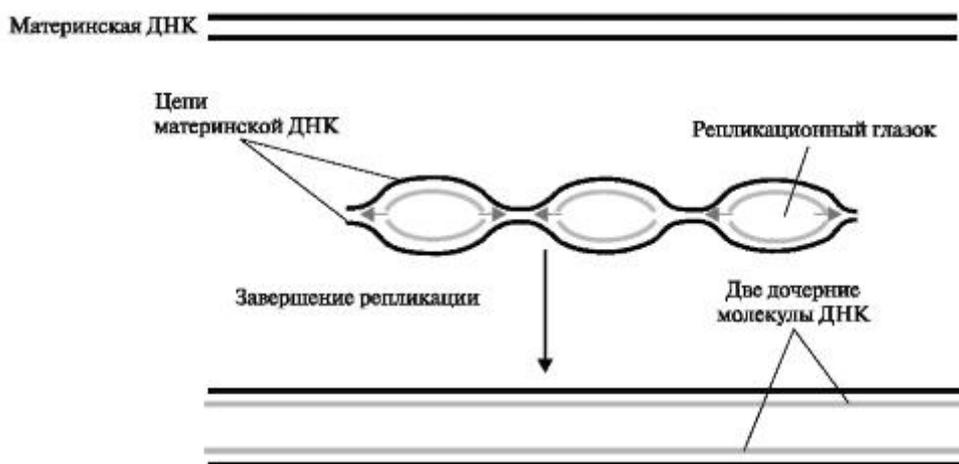


Рис. 19-2. Образование репликационных вилок в эукариотической ДНК (схема)

## РАСПЛЕТЕНИЕ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК

Разъединение цепей ДНК осуществляет фермент хеликаза. Поскольку размеры молекулы ДНК очень велики, то ее концы не могут свободно вращаться. Именно поэтому разделение цепей в репликационной вилке сопровождается суперспирализацией (сжатием) двойной спирали ДНК перед репликационной вилкой (рис. 19-3). Это препятствует дальнейшему расплетанию ДНК и, в конце концов, может привести к остановке репликации.

Из-за громадных размеров молекулы ДНК ее концы оказываются зафиксированными и не могут свободно вращаться

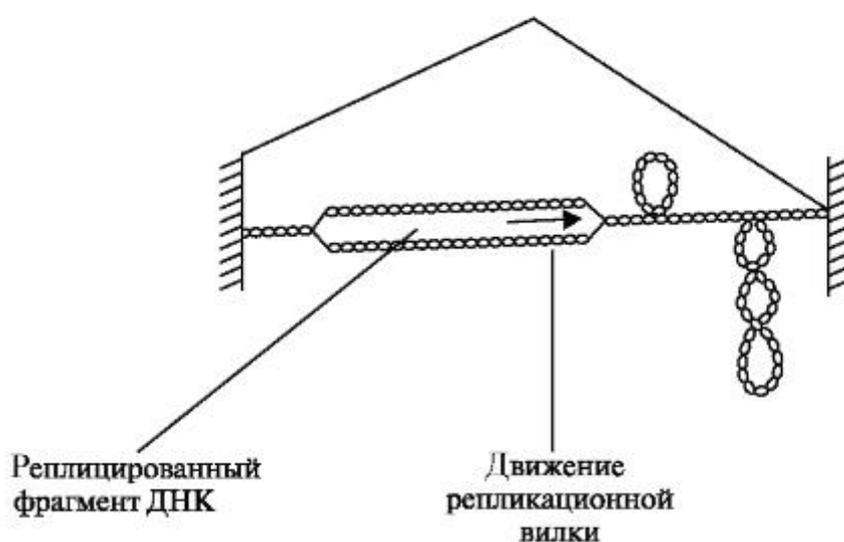


Рис. 19-3. Суперспирализация ДНК перед репликационной вилкой в процессе разделения цепей (схема)

Решением этой проблемы заняты ферменты *топоизомеразы*, которые вносят кратковременные разрывы в полинуклеотидную цепь перед репликационной вилкой, ослабляя суперспирализацию ДНК. Существуют два типа топоизомераз (рис. 19-4).

*Топоизомераза I* расщепляет одну полинуклеотидную цепь, образуя временную связь с фосфатом ДНК. Это позволяет двойной спирали вращаться вокруг одной фосфодиэфирной связи противоположной цепи и ослаблять суперспирализацию (рис. 19-5). При этом фермент не гидролизует фосфодиэфирную связь, которую атакует, а переносит связь от 3'-ОН-группы дезоксирибозы к -ОН-группе одного из остатков тирозинов. После снятия

суперспирализации фермент восстанавливает целостность двойной спирали. *Топоизомераза II* катализирует АТФ-зависимое расщепление обеих цепей, образуя временные белок-фосфатные связи.

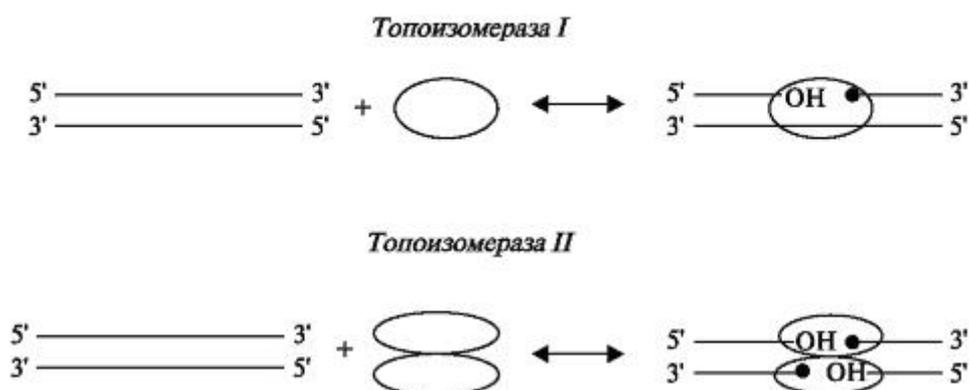


Рис. 19-4. Реакции, катализируемые топоизомеразой I и II (схема): OH - гидроксильная группа дезоксирибозы, образованная после расщепления фосфо-диэфирной связи; темный кружок - фосфатная группа

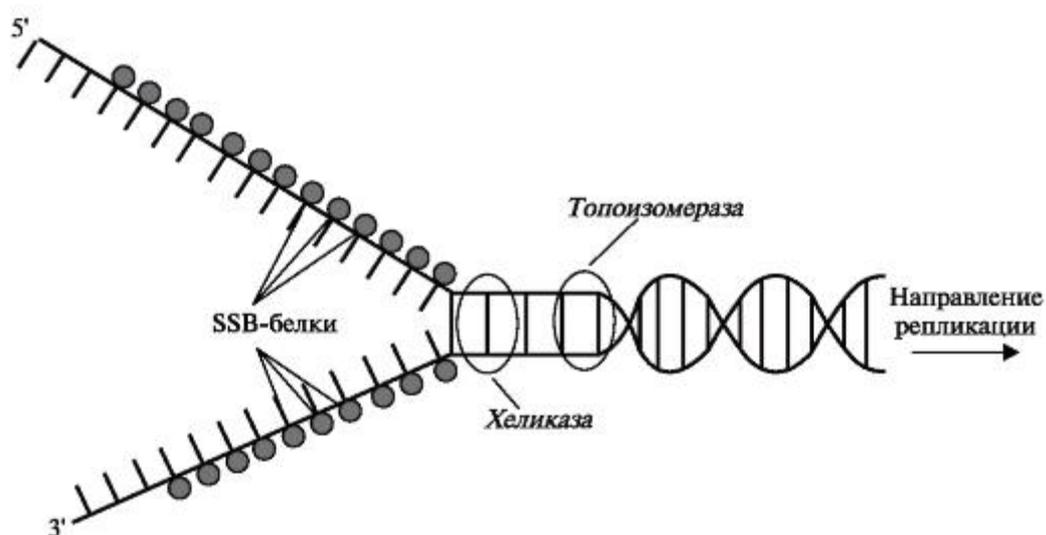


Рис. 19-5. Под действием хеликазы происходит раскручивание двойной спирали, а топоизомеразы уменьшают суперспирализацию ДНК

В поддержании цепей ДНК в раскрученном состоянии участвуют так называемые SSB-белки (от англ. *Single Strand Binding Proteins*), т.е. белки, связывающиеся с одной цепью ДНК. Эти белки связываются с одноцепочечной ДНК по всей длине разделившихся нитей, препятствуя их смыканию, но не мешая считыванию информации. После того как полинуклеотидная цепь материнской ДНК используется в качестве матрицы

для синтеза дочерней, SSB-белки удаляются. Синтез новой цепи ДНК катализируют *ДНК-полимеразы*.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК ПОЛИМЕРАЗ ЭУКАРИОТ

Субстратами ДНК-полимеразы являются четыре дезоксинуклеозидтрифосфата - дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ.

Используя в качестве матрицы одноцепочечную (материнскую) ДНК, фермент переписывает по принципу комплементарности информацию на новую (дочернюю) цепь ДНК: А на матрице переписывается в Т в новой цепи, Ц - в Г, Т - в А, Г - в Ц.

ДНК-полимераза катализирует образование фосфодиэфирных связей в реакции:



где дНТФ - любой из четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов, используемых для построения новой цепи ДНК.

При этом ДНК-полимераза может только элонгировать (удлинять) уже существующую нить, называемую праймером. *Праймер* - короткий олигорибонуклеотид длиной от 2 до 10 нуклеотидов, без которого синтез ДНК невозможен. ДНК-полимераза не может инициировать начало цепи, поскольку она не может соединить два свободных нуклеотида.

ДНК-полимераза удлиняет нуклеотид в направлении 5'→3' (рис. 19-6).

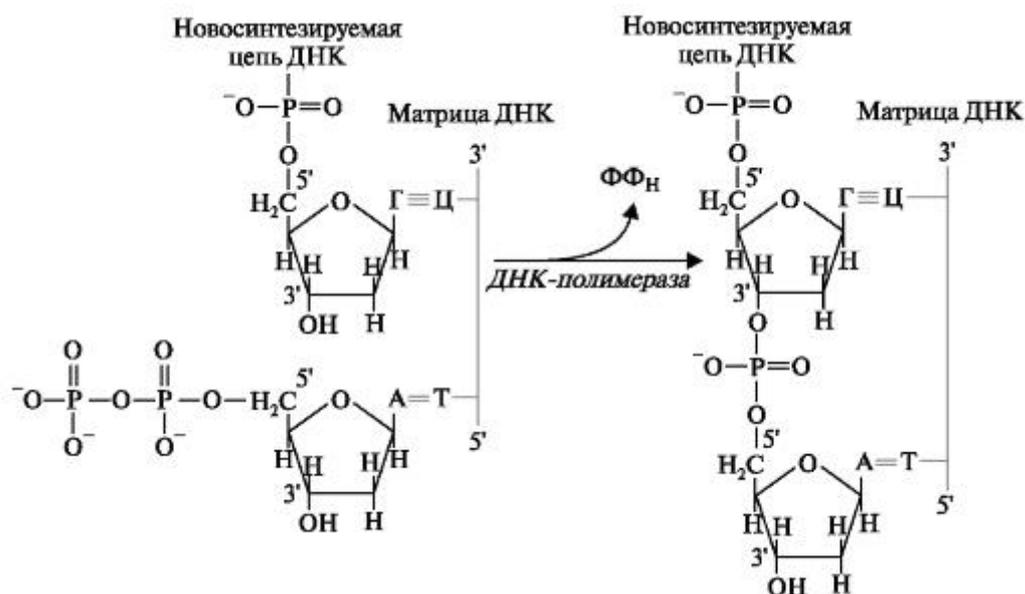


Рис. 19-6. Реакция, катализируемая ДНК-полимеразой (схема). Добавление аденинового дезоксирибонуклеотида к 3'-концу растущей цепи ДНК. Выбор добавляемого нуклеотида определяется комплементарным взаимодействием азотистых оснований ДНК матрицы и добавляемого к новосинтезируемой (дочерней) цепи нуклеотида

Фермент катализирует добавление дезоксирибонуклеотида к свободному 3'-концу. Азотистые основания материнской цепи определяют, какой из четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов ДНК-полимераза добавит к цепи дочерней.

Инициация синтеза новых цепей ДНК

Инициацию дочерней цепи осуществляет РНК-полимераза, называемая *праймазой*. Этот фермент осуществляет синтез праймера - короткого рибонуклеотида на матрице ДНК. После этого ДНК-полимераза начинает присоединять дезоксирибонуклеотиды к праймеру.

Элонгация. Фрагменты Оказаки

ДНК-полимераза может осуществлять элонгацию дочерней цепи только в направлении 5'→3', считывая информацию с материнской цепи, которая идет в направлении 3'→5'. Это означает, что синтез только одной дочерней цепи - ее называют лидирующей цепью - может совпадать с движением репликационной вилки.

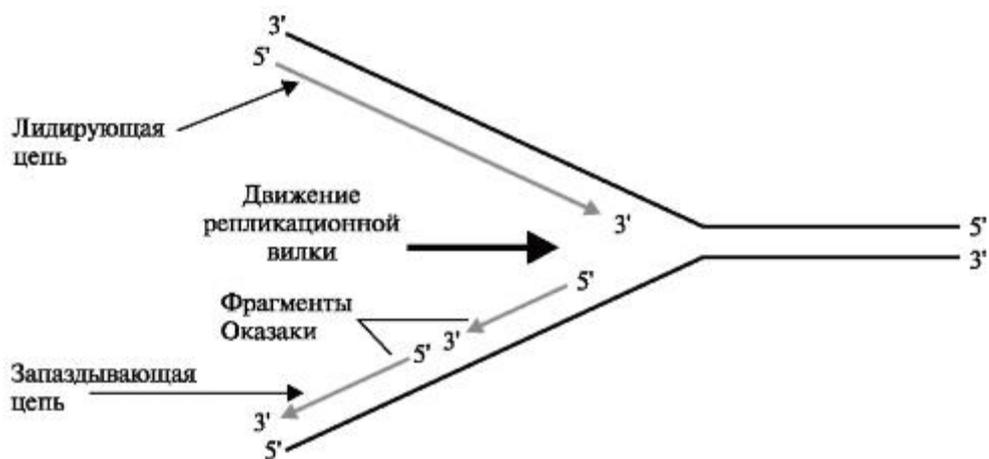


Рис. 19-7. Синтез лидирующей и запаздывающей цепи ДНК

Другая дочерняя цепь синтезируется в виде коротких фрагментов Оказаки, названных в честь японского ученого, их открывшего. Ее синтез происходит следующим образом: после разделения цепей материнской ДНК на материнской цепи с направлением  $5' \rightarrow 3'$  происходит множественный синтез РНК-праймеров, к каждому из которых ДНК-полимераза добавляет нуклеотиды, катализируя образование фосфодиэфирных связей в направлении  $5' \rightarrow 3'$  (рис. 19-7).

После отщепления РНК-праймеров ДНК-полимераза достраивает образовавшиеся пробелы, после чего фрагменты Оказаки сшиваются между собой в непрерывную дочернюю цепь (рис. 19-8). Этот процесс, получивший название *лигирования*, катализирует фермент *ДНК-лигаза*. Поскольку на синтез этой второй дочерней цепи затрачивается больше времени, ее называли *запаздывающей цепью*.

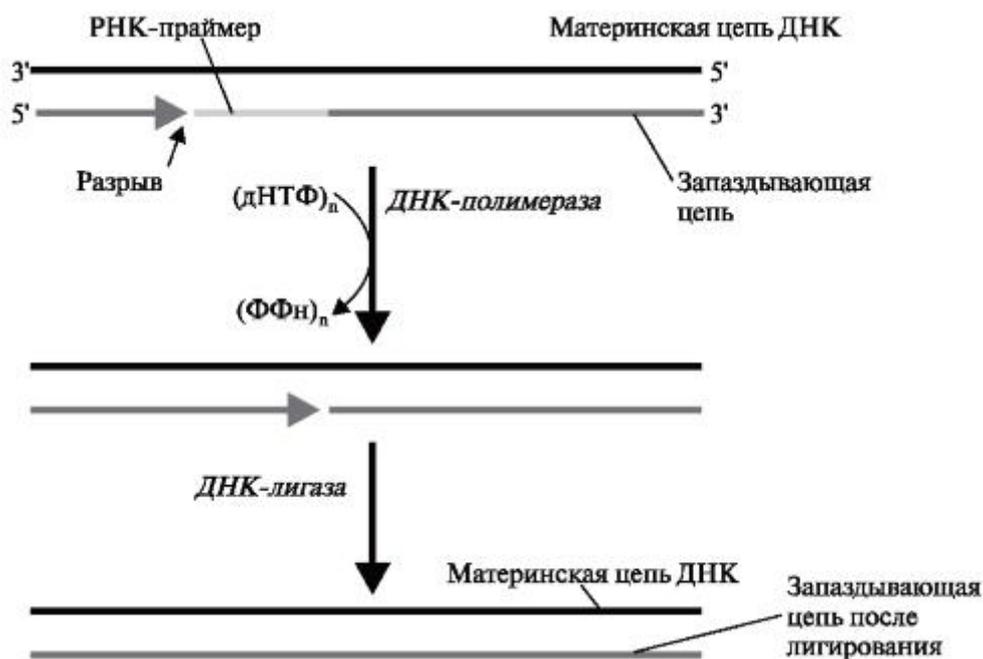


Рис. 19-8. Завершение синтеза запаздывающей цепи ДНК

Таким образом, ДНК-полимераза осуществляет синтез лидирующей и запаздывающей цепей, катализируя и в том и в другом случае образование  $5' \rightarrow 3'$  фосфодиэфирных связей. При этом совпадает направление движения фермента и репликационной вилки только при синтезе лидирующей цепи. Возникает закономерный вопрос: может ли один фермент двигаться одновременно в двух противоположных направлениях, выполняя одновременно несколько важных функций?

#### Типы ДНК-полимераз эукариот

У эукариот обнаружены 5 типов ДНК-полимераз, которые обозначают буквами греческого алфавита:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$ .

- ДНК-полимераза- $\alpha$  обладает праймазной активностью для лидирующей и запаздывающей цепей. Этот фермент синтезирует на РНК-праймерах обеих дочерних цепей короткие последовательности ДНК (около 30 дезоксирибонуклеотидов), которые затем удлиняет ДНК-полимераза- $\delta$ .
- ДНК-полимераза- $\delta$  обладает также экзонуклеазной активностью.
- ДНК-полимеразы- $\beta$  и - $\epsilon$  участвуют в репарации ДНК.
- ДНК-полимераза- $\gamma$  участвует в репликации митохондриальной ДНК.

#### Репликация концов ДНК

В процессе удвоения молекулы ДНК 5'-концевая область лидирующей цепи реплицируется полностью (рис. 19-9). Однако в ходе синтеза запаздывающей цепи при удалении РНК-праймера, расположенного на 3'-конце, остается нереплицированный участок. ДНК-полимеразы достроить его не могут, поскольку не катализируют образование 3'→5' фосфодиэфирных связей (см. рис. 19-9).

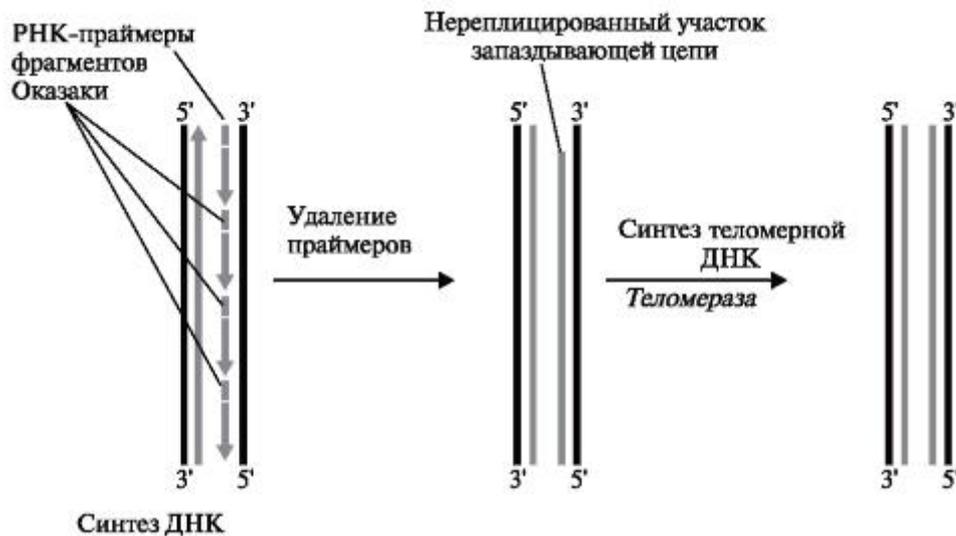


Рис. 19-9. Укорочение запаздывающей цепи ДНК и роль теломеразы в восстановлении ее размеров (схема)

На помощь приходит особый фермент *теломераза*, который присоединяет так называемую теломерную ДНК к нереплицированному концу ДНК. Теломерная ДНК человека состоит из коротких, многократно повторяемых гексануклеотидных последовательностей ТТАГГТ, которые теломераза последовательно добавляет к 3'-концу предсуществующей ДНК. Этот фермент содержит встроенную РНК-матрицу, с помощью которой он взаимодействует с концом ДНК и удлиняет его, последовательно присоединяя нуклеотид за нуклеотидом.

Теломераза обнаружена в быстроделящихся (в том числе эмбриональных и раковых) клетках, что необходимо для компенсации укорочения хромосом, происходящего в ходе каждого деления клетки. В медленно делящихся (соматических) клетках этот фермент не обнаружен. Ученые предполагают, что соматические клетки получают однократную порцию теломерной ДНК, которая и определяет продолжительность жизни соматических клеток и их потомства.

Репарация ДНК

Как бы аккуратно и точно ни работала репликационная машина, в дочернюю цепь ДНК могут быть присоединены нуклеотиды, не соответствующие принципу комплементарности азотистых оснований. Если эта ошибка установлена сразу же после присоединения неправильного нуклеотида, то ДНК-полимеразы- $\delta$  или - $\epsilon$ , обладающие экзонуклеазной активностью, вырезают его и заменяют правильным нуклеотидом, комплементарным соответствующему нуклеотиду матрицы.

Если же ошибочный нуклеотид не был своевременно удален, это приводит к деформации двойной спирали (рис. 19-10) и включению других механизмов исправления ошибок.

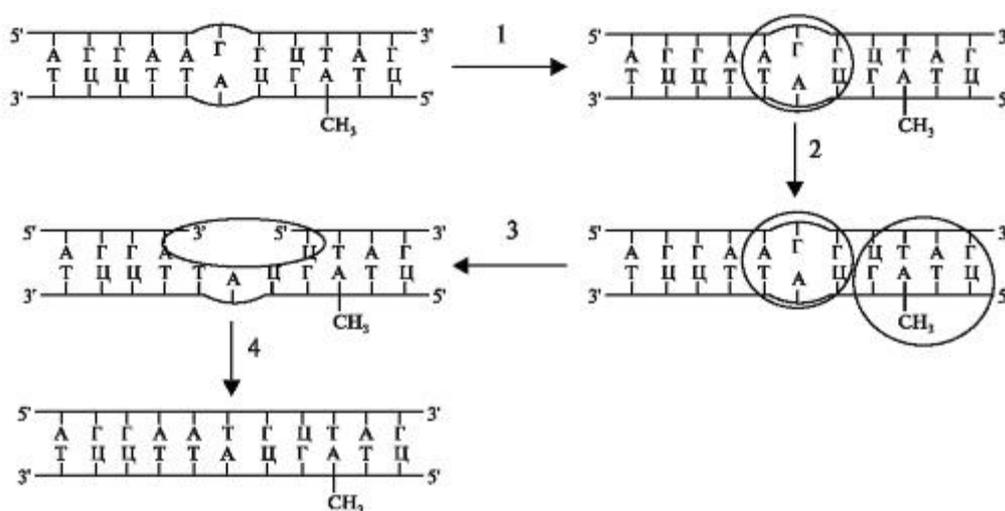


Рис. 19-10. Деформация двойной спирали при включении в дочернюю цепь ДНК некомплементарного нуклеотида и метилзависимое исправление этой ошибки: 1 - нахождение деформации двойной спирали; 2 - идентификация родительской цепи ДНК по метилированной последовательности ГАТЦ и разрыв дочерней цепи; 3 - удаление участка новосинтезированной цепи ДНК, содержащего ошибочный нуклеотид; 4 - восполнение образовавшейся брешы и лигирование цепи

Однако для этого нужно определить, какая из двух цепей молекулы ДНК вновь синтезированная. После завершения процесса репликации материнская цепь, прошедшая проверку ранее, отличается от дочерней тем, что в последовательности ГАТЦ аденин метилирован. В клетках *E. coli* реакцию метилирования аденина в последовательности ГАТЦ катализирует фермент Dam-метиلاза. Важно отметить, что метилирование аденина не нарушает комплементарного спаривания азотистых оснований.

В ходе проверки дочерней цепи ДНК особые белки узнают нарушение спирали ДНК, в месте ошибки находят неметилованную последовательность ГАТЦ и разрывают дочернюю цепь в этом месте. Оно может находиться на значительном (до нескольких тысяч оснований) расстоянии от места ошибки. Затем при совместном действии хеликазы, SSB-белков и экзонуклеазы происходит удаление всех нуклеотидов от разрыва до места ошибки. После этого ДНК-полимераза- $\beta$  восполняет образованную брешь ДНК, а ДНК-лигаза соединяет ДНК по месту разрыва.

#### Репарация поврежденной ДНК

Несмотря на исключительно важную роль ДНК как хранителя генетической информации, во всем остальном ДНК является обычной молекулой, в которой время от времени могут происходить различные химические изменения. Некоторые из них возникают спонтанно. Например, гликозидная связь, соединяющая пуриновые и в меньшей степени пиримидиновые основания с остатками дезоксирибозы, достаточно нестабильна. Едва ли не каждый день в клетках человека от молекулы ДНК могут отщепляться пуриновые или (реже) пиримидиновые азотистые основания. Эти процессы получили название *апуринизации* и *апиримидизации*. Кроме того, цитозин и аденин могут подвергаться дезаминированию с образованием соответственно урацила и гипоксантина. Наконец, ДНК может подвергаться действию ионизирующей радиации, канцерогенов, ультрафиолетового облучения, которые способны вызывать мутации.

Чаще всего возникающие повреждения затрагивают одну из цепей молекулы ДНК, что оставляет шанс исправить поврежденную часть, используя комплементарную цепь в качестве матрицы.

Существует несколько типов репарирующих систем.

**Прямая репарация.** Алкильные группы азотистых оснований, образовавшиеся под действием некоторых мутагенов, могут прямо удаляться под действием так называемого фермента-самоубийцы. Последний принимает на себя эти группы, подвергаясь дальнейшему разрушению.

**Эксцизия нуклеотида.** Облучение ДНК ультрафиолетовым светом может вызывать ковалентное сшивание двух расположенных рядом тиминового оснований одной и той же цепи с образованием Т-димеров (рис. 19-11).

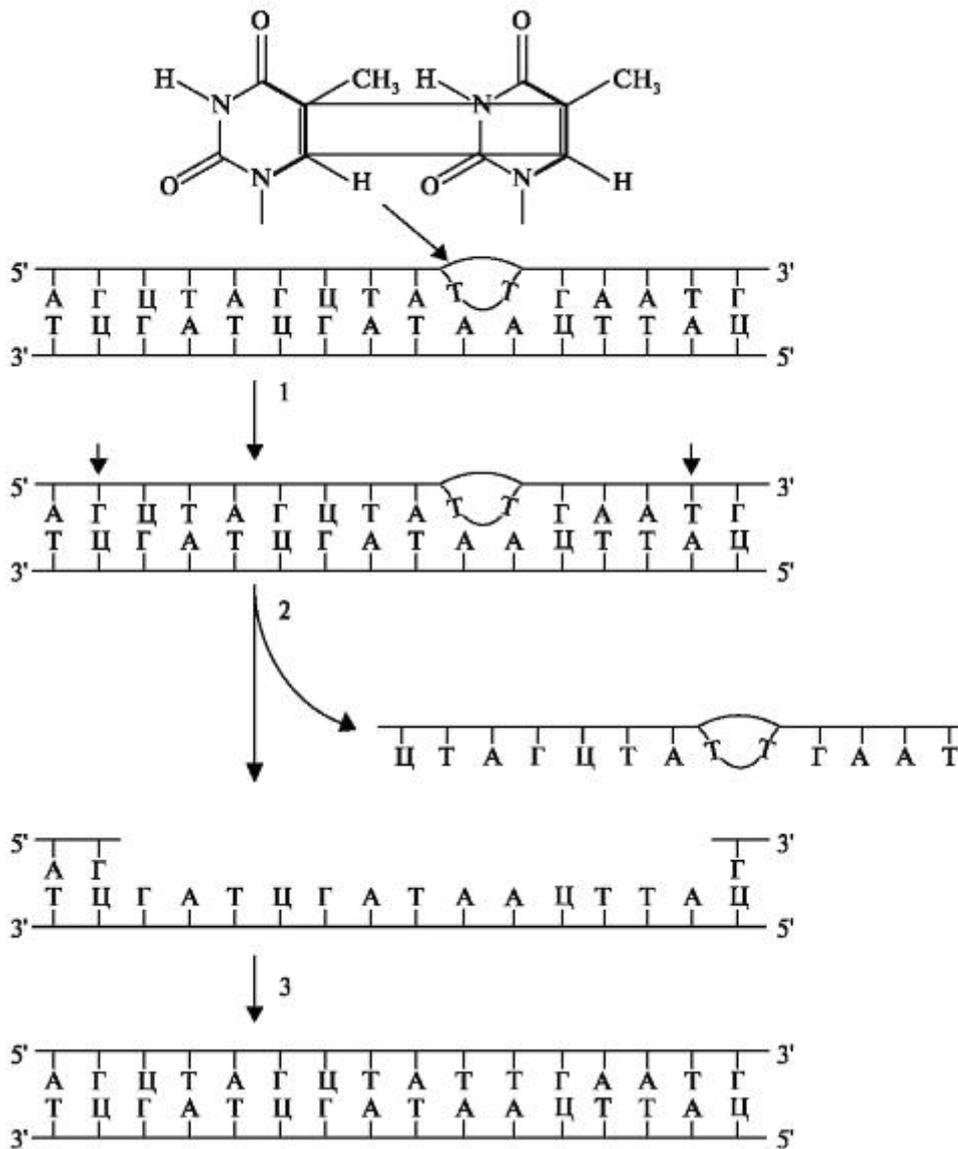


Рис. 19-11. Структура тиминового димера и этапы репарации ДНК путем удаления нуклеотидов: 1 - нахождение деформации двойной спирали и надрезание поврежденной цепи ДНК по обе стороны от места повреждения; 2 - удаление фрагмента цепи ДНК (12-13 нуклеотидов); 3 - восполнение образовавшейся брешы и восстановление целостности цепи ДНК

Повреждения, искажающие двойную спираль, такие, как Т-димеры, могут подвергаться репарации путем вырезания эндонуклеазой коротких нуклеотидных последовательностей, содержащих поврежденный участок. Образовавшуюся брешь ликвидирует ДНК-полимераза-β, а ДНК-лигаза соединяет разрыв.

Репарация с эксцизией основания и репарация апуринового (апиримидинового) участка. При возникновении в результате дезаминирования нехарактерного основания ДНК-гликозидаза узнает и

отщепляет его. Затем эндонуклеаза расщепляет фосфодиэфирную связь, соединяющую лишенную основания дезоксирибозу, а экзонуклеаза вырезает этот поврежденный участок. Далее ДНК-полимераза- $\beta$  ликвидирует образовавшуюся брешь, а ДНК-лигаза восстанавливает целостность полинуклеотидной цепи (рис. 19-12).

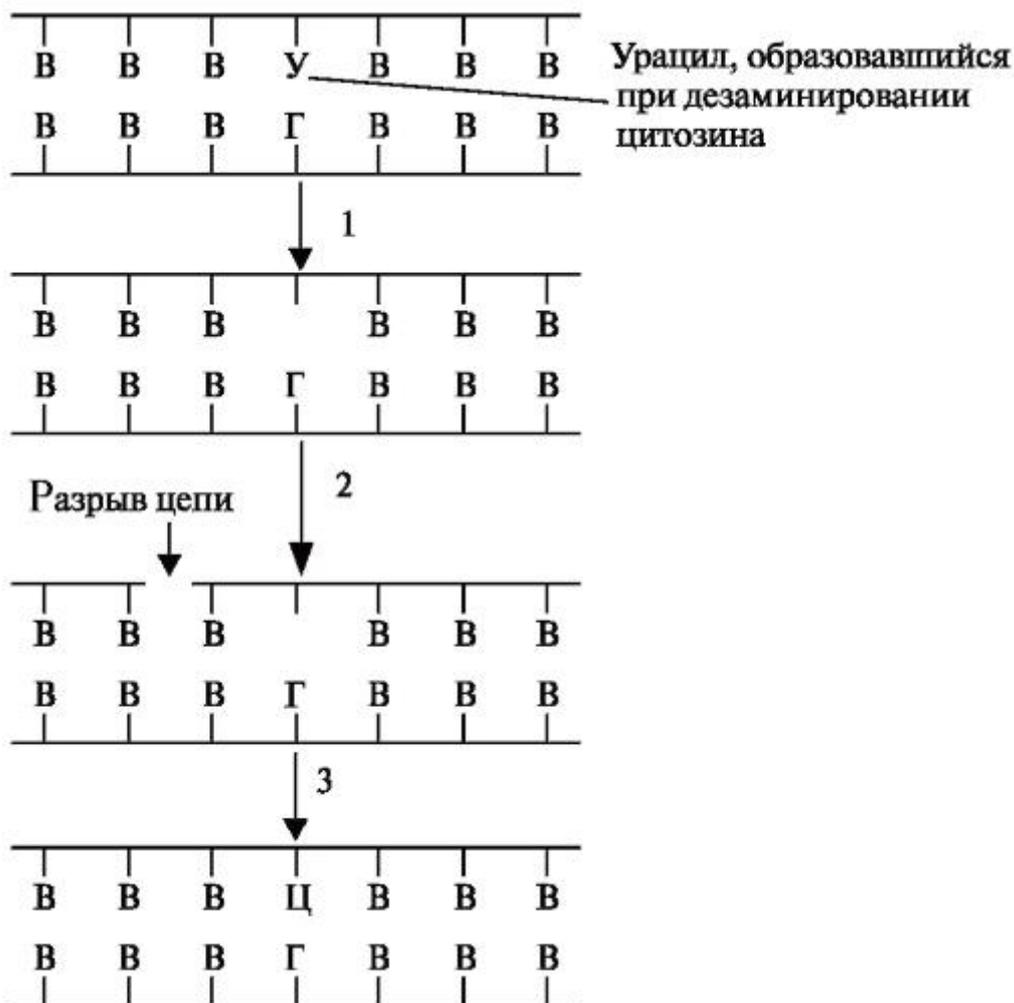


Рис. 19-12. Образование и этапы репарации апуринового или апириимидинового участка (AP-сайта) [схема]: 1 - удаление урацила под действием ДНК-гликозидазы; 2 - разрыв цепи, содержащей AP-сайт, под действием эндонуклеазы и вырезание поврежденного участка под действием экзонуклеазы; 3 - восполнение образовавшейся брешки и восстановление целостности цепи ДНК; В - азотистые основания (за исключением гуанина, цитозина и урацила)

Системы репарации у эукариот играют большую роль в сохранении целостности генома. По мнению ученых, развитие процесса старения может

быть связано с возрастным снижением функциональной активности систем репарации, что неминуемо ведет к увеличению частоты мутаций.

*В записную книжку врача*

Нарушения систем репарации ДНК и болезни человека

Генетические дефекты в системе репарации ДНК путем вырезания нуклеотида вызывают развитие *пигментной ксеродермы*. Это наследственное заболевание характеризуется неспособностью клеток осуществлять эксцизию пиримидиновых димеров, образуемых под действием ультрафиолетовых лучей. Кожа таких больных очень чувствительна к действию солнечных лучей, которые вызывают появление пигментных пятен на лице и других открытых частях тела. Кожа становится сухой, на ней возникают атрофические участки. По мере накопления дефектов в ДНК клеток эпидермиса увеличивается риск развития *рака кожи*. Другое заболевание - *наследственный неполипозный колоректальный рак* - развивается при мутациях в генах, кодирующих белки-ферменты, которые участвуют в исправлении ошибок репликации у человека. Это приводит к 100- и даже 1000-кратному увеличению числа мутаций, способствующих раннему (в возрасте 45 лет) развитию колоректального рака.

## ГЛАВА 20. ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНОВ ЭУКАРИОТ

Вопросы по теме

- Транскрипция.
- Факторы, необходимые для осуществления процесса транскрипции.
- Посттранскрипционная модификация молекулы мРНК.

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ

Единицей наследственности является ген. Он представляет участок молекулы ДНК, в нуклеотидной последовательности которого закодирована информация об аминокислотной последовательности полипептидной цепи. Сам ген в биосинтезе белка непосредственно не участвует, а выступает в качестве матрицы, на которой происходит синтез мРНК. Процесс считывания информации с гена и образования мРНК получил название *транскрипции* (от лат. *transcriptio* - переписывание).

Транскрипция - первый этап реализации генетической информации, в котором матрицей является только одна цепь ДНК, поэтому ее и называют *матричной*, или *некодирующей*. Другую, комплементарную ей

цепь ДНК называют *кодирующей*, потому что именно последовательность азотистых оснований этой цепи несет информацию об аминокислотной последовательности белка, которая переписывается (транскрибируется) на мРНК (с заменой тимина урацилом).

### Структура гена

Поскольку ген - участок ДНК, то он содержит две цепи. Однако структуру гена и его «географические координаты» обозначают по кодирующей цепи, которой и соответствует последовательность азотистых оснований транскрибируемой РНК. (Помимо генов, отвечающих за образование молекул мРНК, в геноме есть гены, кодирующие рибосомные и транспортные РНК).

В гене выделяют 5'- и 3'-концы (рис. 20-1). Кодированная область начинается со стартовой точки транскрипции - 5'-конца гена. Все последующие азотистые основания правее этой точки (в направлении 3'-конца гена) нумеруют цифрами со знаком «+»; они транскрибируются в молекулу РНК. Примыкающий к 5'-концу гена участок ДНК называют *промотором*, а азотистые основания левее стартовой точки транскрипции нумеруются цифрами со знаком «-»; в РНК они не транскрибируются. Промотор обеспечивает связывание различных регуляторных белков, узнавание РНК-полимеразой стартовой точки, что необходимо для правильной инициации процесса транскрипции. Важную роль в этом играют короткие нуклеотидные последовательности, такие, как ТАТА-бокс, обычно расположенный в положении -25- 35 пар оснований, ЦААТ-бокс, расположенный в положении -80 пар оснований относительно стартовой точки, и так называемый ГЦ-бокс.

Рис. 20-1. Структура эукариотического гена. Для простоты показан только один регуляторный элемент промотора - ТАТА-бокс; п.о - пары азотистых оснований

Участки промотора генов, отвечающих на регуляторные воздействия, называют *чувствительными элементами*. Например, промоторные области генов, отвечающих на активирующее влияние глюкокортикоидных гормонов, содержат определенную нуклеотидную последовательность - так называемый глюкокортикоидчувствительный элемент, с которым связывается активированный гормоном стероидный рецептор.

Противоположный 3'-конец гена содержит терминаторную область - последовательность азотистых оснований, необходимых для терминации транскрипции. В РНК эта область тоже не транскрибируется.

В гене участки нуклеотидной последовательности, кодирующие информацию о первичной структуре белка, -экзоны - разделены участками, которые не несут информации об аминокислотной последовательности белка (рис. 20-2). Последние получили название интронов. Длина экзонов и интронов может варьировать в довольно широких пределах - от 40-60 до 1000 пар оснований (а у интронов - и более 10 000). В генах человека количество интронов варьирует от 2 до 50. Хотя интроны обычно не несут никакой информации, известно, что некоторые из них содержат регуляторные последовательности, свойственные энхансерам.



Рис. 20-2. Экзонинтронная организация гена (схема). Экзоны обозначены цифрами 1-6, интроны (И1-И5) выделены цветом

Общая характеристика процесса транскрипции у эукариот

Строительным материалом для синтеза мРНК являются рибонуклеозидтрифосфаты АТФ, ГТФ, ЦТФ и УТФ.

В процессе участвуют три РНК-полимеразы, обозначаемые римскими цифрами I, II и III. Все эти ферменты локализованы в ядре клетки. РНК-полимераза I осуществляет транскрипцию генов, кодирующих основные рибосомные РНК. РНК-полимераза II транскрибирует гены, кодирующие белки и, таким образом, отвечает за синтез мРНК. РНК-полимераза III осуществляет транскрипцию генов, кодирующих тРНК, некоторые виды рибосомной РНК, а также так называемые малые РНК, часть которых участвует в процессинге мРНК.

Все эти ферменты катализируют реакцию полимеризации рибонуклеозидтрифосфатов:



Их последовательность задается матричной (некодирующей) цепью гена (рис. 20-3).

Процессы синтеза РНК и ДНК во многом схожи: азотистое основание входящего рибонуклеотида комплементарно основанию на матрице ДНК. Как и в случае репликации, процесс транскрипции всегда осуществляется в

направлении 5'→3'. Нуклеотиды присоединяются к 3'-ОН-группе, и поэтому элонгация цепи происходит в направлении 5'→3'.

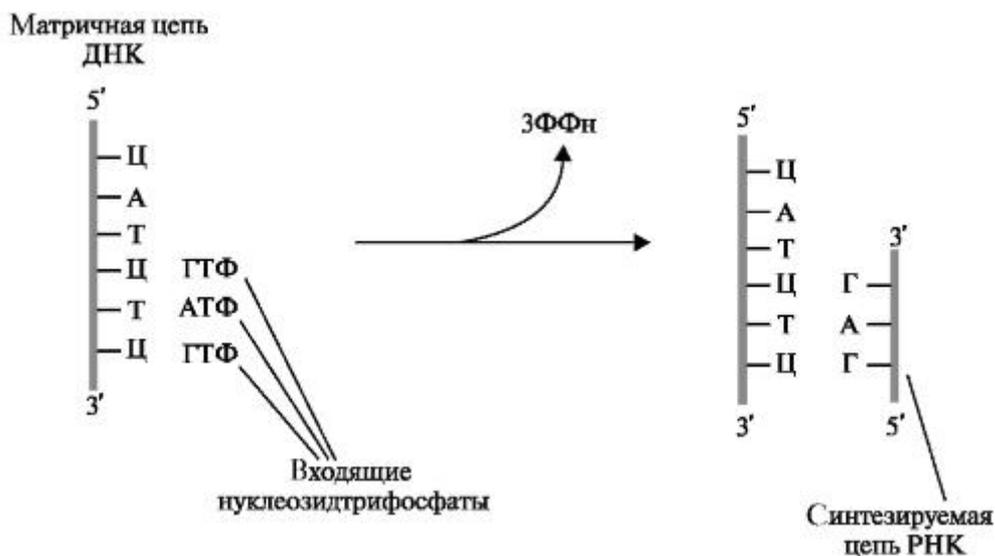


Рис. 20-3. Синтез РНК на матрице ДНК. Нематричная (кодирующая) цепь ДНК не показана

Важная особенность РНК-полимераз в том, что, в отличие от ДНК-полимераз, этот фермент может сам иницировать синтез новых цепей, и для этого ему не нужен праймер. Если есть матрица ДНК, фермент РНК-полимеразы может осуществить транскрипцию всей молекулы РНК.

В процессе транскрипции различают три этапа: инициацию, элонгацию и терминацию.

### Инициация транскрипции

Это самый сложный этап, в ходе которого РНК-полимеразы должна правильно «сориентироваться на местности», связаться с матричной цепью гена, найти стартовую точку транскрипции и начать синтез РНК с точно определенного нуклеотида на матрице.

В решении этих задач участвуют *общие транскрипционные факторы*, обеспечивающие образование инициаторного комплекса (рис. 20-4). Именно с помощью этих факторов и происходит точная «посадка» РНК-полимеразы на матрице.

Общие транскрипционные факторы - белки, присутствующие во всех клетках. К ним относят ТВР-белок (от англ. *TATA-Binding Protein*), который взаимодействует с ТАТА-боксами промотора. С этим белком связаны так

называемые TAF-белки (от англ. TBP-Associated Factors) - факторы, связанные с TBP-белком. Все вместе они образуют фактор транскрипции D для полимеразы II, который сокращенно называют TFIID-комплексом (от англ. *Transcriptional Factor D for polymerase II*) - фактор транскрипции D для РНК-полимеразы II. С этим фактором и связывается РНК-полимераза II, а также другие белки, необходимые для завершения образования *стабильного инициаторного комплекса*.

Все эти ферменты катализируют реакцию полимеризации рибонуклеозидтрифосфатов:



Их последовательность задается матричной (некодирующей) цепью гена (рис. 20-3).

Процессы синтеза РНК и ДНК во многом схожи: азотистое основание входящего рибонуклеотида комплементарно основанию на матрице ДНК. Как и в случае репликации, процесс транскрипции всегда осуществляется в направлении 5'→3'. Нуклеотиды присоединяются к 3'-ОН-группе, и поэтому элонгация цепи происходит в направлении 5'→3'.

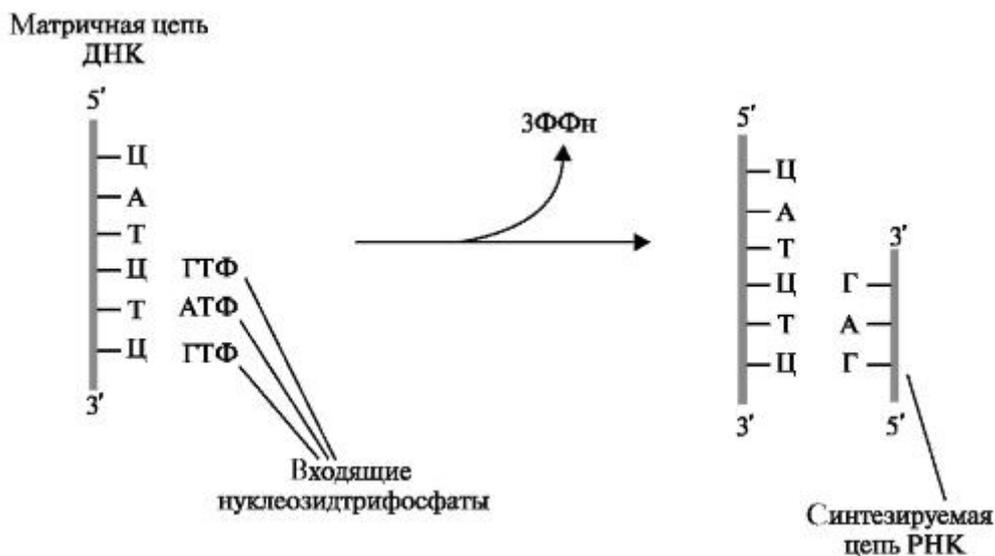


Рис. 20-3. Синтез РНК на матрице ДНК. Нематричная (кодирующая) цепь ДНК не показана

Важная особенность РНК-полимераз в том, что, в отличие от ДНК-полимераз, этот фермент может сам инициировать синтез новых цепей, и для

этого ему не нужен праймер. Если есть матрица ДНК, фермент РНК-полимераза может осуществить транскрипцию всей молекулы РНК.

В процессе транскрипции различают три этапа: инициацию, элонгацию и терминацию.

### Инициация транскрипции

Это самый сложный этап, в ходе которого РНК-полимераза должна правильно «сориентироваться на местности», связаться с матричной цепью гена, найти стартовую точку транскрипции и начать синтез РНК с точно определенного нуклеотида на матрице.

В решении этих задач участвуют *общие транскрипционные факторы*, обеспечивающие образование инициаторного комплекса (рис. 20-4). Именно с помощью этих факторов и происходит точная «посадка» РНК-полимеразы на матрице.

Общие транскрипционные факторы - белки, присутствующие во всех клетках. К ним относят ТВР-белок (от англ. *TATA-Binding Protein*), который взаимодействует с ТАТА-боксами промотора. С этим белком связаны так называемые ТАФ-белки (от англ. *ТВР-Associated Factors*) - факторы, связанные с ТВР-белком. Все вместе они образуют фактор транскрипции D для полимеразы II, который сокращенно называют TFIID-комплексом (от англ. *Transcriptional Factor D for polymerase II*) - фактор транскрипции D для РНК-полимеразы II. С этим фактором и связывается РНК-полимераза II, а также другие белки, необходимые для завершения образования *стабильного инициаторного комплекса*.

Рис. 20-4. Формирование стабильного инициаторного комплекса (упрощенная схема): TFIID - транскрипционный фактор D для РНК-полимеразы II; ТВР - белок, связывающийся с ТАТА-боксом (*TATA-binding protein*). Кодированная (нематричная) цепь не показана

В случае генов, транскрибируемых РНК-полимеразами I и III, собираются другие стабильные инициаторные комплексы, которые обеспечивают точную ориентацию соответствующей РНК-полимеразы относительно стартовой точки транскрипции.

После завершения образования стабильного инициаторного комплекса РНК-полимераза может разделить цепи ДНК и инициировать синтез РНК. Формируется транскрипционный глазок разделенных цепей ДНК (рис. 20-5), благодаря которому азотистые основания матричной цепи становятся доступными для спаривания с поступающими нуклеозидтрифосфатами. Из нуклеозидтрифосфатов фермент синтезирует несколько первых фосфодиэфирных связей. Так завершается процесс инициации, за которым следует элонгация.

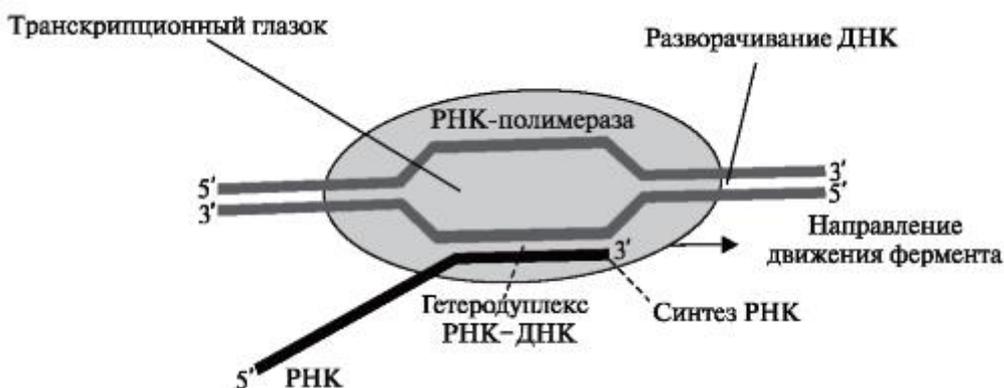


Рис. 20-5. Транскрипция гена РНК-полимеразой II (схема). Фермент раскручивает участок ДНК длиной около 17 пар оснований, образуя транскрипционный глазок, который продвигается вдоль ДНК. Синтезированная РНК образует с ДНК гибридную двойную спираль (гетеродуплекс РНК-ДНК) протяженностью около 12 пар оснований

Для транскрипции гена необходимо временное разделение двойной спирали ДНК, которое первоначально происходит в участках с высоким содержанием А и Т (и потому с более слабыми водородными связями). ДНК раскручивается впереди полимеразы и закручивается позади нее. Таким образом, временно раскрученный глазок двигается вдоль гена вместе с полимеразой. На коротком участке вновь синтезированная молекула РНК спаривается с матричной цепью, но затем происходит разъединение цепей ДНК и РНК.

Терминация транскрипции

Когда РНК-полимераза II достигает 3'-ОН-конца гена, она синтезирует последовательность АЛУААА, кодируемую матричной цепью, продолжая транскрибировать и после этой точки, после чего процесс транскрипции завершается. Особый фермент отщепляет транскрипт РНК на коротком расстоянии за пределами уже упомянутой последовательности, а затем

другой фермент, независимый от матрицы, осуществляет полиаденилирование, присоединяя примерно 200 адениновых нуклеотидов (используя АТФ) с образованием поли-А-хвоста, который обеспечивает стабильность мРНК в клетке.

### Процессинг мРНК

Образовавшийся в ходе транскрипции *первичный транскрипт* подвергается модификации, которая, помимо рассмотренного выше полиаденилирования, включает также кэпирование и сплайсинг (рис. 20-6).

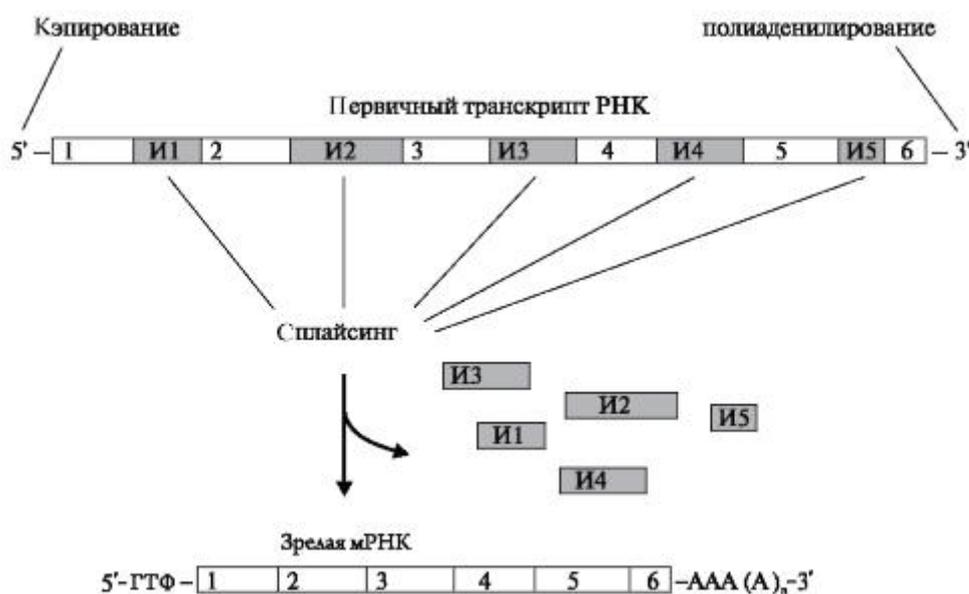


Рис. 20-6. Процессинг мРНК (схема). Отдельные стадии этого процесса (кэпирование) начинаются сразу после инициации транскрипции

Кэпирование. Процессинг мРНК начинается сразу же после инициации синтеза РНК. Первичный транскрипт РНК гена эукариот претерпевает модификацию с 5'-конца, которую называют «кэпирование».

На 5'-конце РНК есть свободная трифосфатная группа (самый первый нуклеозидтрифосфат, включенный в РНК, «принимает» второй нуклеотид на свою 3'-ОН-группу, а собственная трифосфатная группа остается неизменной). Концевой фосфат этой группировки удаляется, а его место занимает остаток ГМФ, переносимый от ГТФ. После этого гуанин метилируется в положении N-7, а также в положении 2'-ОН второго и иногда третьего нуклеотида (рис. 20-7).

Кэп защищает конец мРНК от действия экзонуклеаз и участвует в инициации трансляции.

Сплайсинг. Первичный транскрипт содержит чередующиеся последовательности нуклеотидов, несущих (экзоны) или не несущих (интроны) информацию о первичной структуре белка. Процесс удаления интронов из первичного транскрипта и объединение экзонов с образованием зрелой молекулы мРНК называют *сплайсингом*.

Рис. 20-7. Структура 5'-кэпа мРНК эукариот: А.О. - азотистые основания второго и третьего нуклеотида мРНК, 2'-ОН-группы которых метилированы (выделены цветом)

У большинства эукариот реакцию сплайсинга в ядре катализируют сложные рибонуклеопротеиновые частицы - сплайсосомы. Молекулы РНК этих частиц обозначают мяРНК - малая ядерная РНК. Эти мяРНК образуют гибридные молекулы с первичным транскриптом РНК и определяют местоположение интронов, а белки сплайсосом осуществляют собственно удаление интронов.

У простейших *Tetrahymena* точный сплайсинг осуществляется самим РНК-транскриптом, без помощи белков (рис. 20-8). До этого полагали, что такие функции свойственны только белкам. Данное открытие усиливает позиции сторонников теорий, согласно которым рибозимный катализ (см. главу 6) - самый древний вид биокатализа, который в ходе эволюции был заменен в большинстве реакций метаболизма ферментативным катализом.

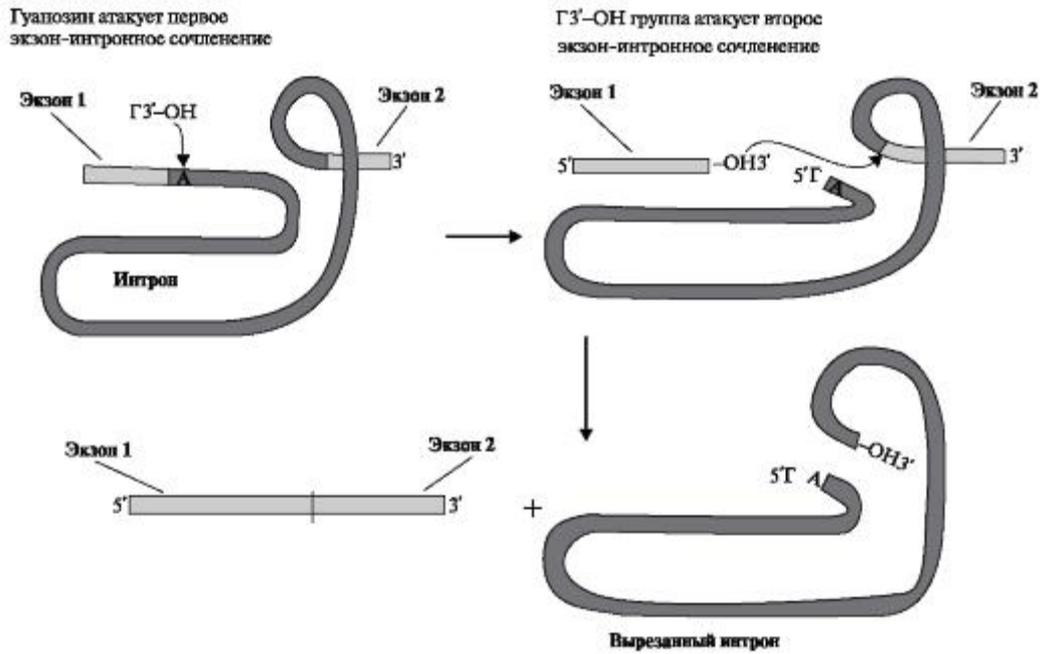


Рис. 20-8. Механизм самосплайсинга, в котором участвует гуанозин интрона (Г-ОН) (схема)

Альтернативный сплайсинг. При типичном сплайсинге все экзоны первичного транскрипта РНК попадают в зрелую мРНК, что в конечном итоге приводит к образованию одного единственного белка. Однако во многих других случаях сплайсинг может происходить по разным схемам, так что одна группа экзонов образует одну мРНК, а другая группа того же транскрипта гена - другую мРНК. Процесс, при котором в результате удаления интронов из первичного транскрипта образуется несколько мРНК, содержащих разный набор экзонов, получил название *альтернативного сплайсинга*.

Альтернативный сплайсинг позволяет получить в результате транскрипции одного гена несколько различных форм белка. Часто это связано с тканевыми особенностями экспрессии генов. Считают, что от 30 до 40% генов человека подвергаются альтернативному сплайсингу.

Наглядным примером может служить альтернативный сплайсинг первичного транскрипта гена кальцитонина (см. рис. 20-9), который содержит 6 экзонов.

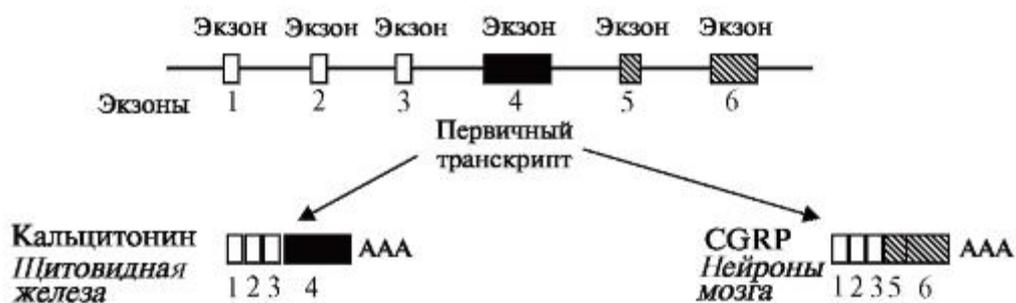


Рис. 20-9. Альтернативный сплайсинг первичного транскрипта гена кальцитонина в щитовидной железе и нейронах мозга приводит к синтезу двух пептидов, выполняющих разные функции в организме. Экзон, кодирующий кальцитонин, выделен цветом, а экзоны, кодирующие CGRP-пептид, - штриховкой

В результате альтернативного сплайсинга в клетках щитовидной железы образуется зрелая мРНК, в которой присутствуют экзоны 1, 2, 3 и 4. К последнему, кодирующему кальцитонин экзону присоединен полиадениловый хвост (AAA). Зрелая мРНК кодирует кальцитонин-пептидный гормон, состоящий из 32 аминокислотных остатков, который вызывает торможение опосредуемой остеокластами резорбции кости. В нейронах гиппокампа и некоторых других отделов мозга в результате альтернативного сплайсинга образуется зрелая мРНК, в которой присутствуют экзоны 1, 2, 3, 5 и 6. Два последних кодируют так называемый CGRP-пептид, состоящий из 37 аминокислотных остатков (от англ. *Calcitonin Gene Related Protein*), - так называемый родственный пептид гена кальцитонина, мощный вазодилататор и нейромедиатор сенсорных ганглиев. Таким образом, альтернативный сплайсинг первичного транскрипта гена кальцитонина в щитовидной железе и мозге привел к синтезу двух полипептидов, имеющих разные функции в организме.

В результате модификаций первичный транскрипт кодирующего белок гена эукариот превратился в молекулу зрелой мРНК, которая покидает ядро и выходит в цитоплазму.

## РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ. РАСПАКОВЫВАНИЕ ДНК

ДНК эукариот - громадная макромолекула, которую нужно компактно упаковать для размещения в ядре. В таком состоянии переписать информацию с ДНК нельзя, поэтому в процессе транскрипции происходит локальное распаковывание нуклеосомной структуры этой макромолекулы в

тех ее участках, которые будут транскрибироваться в данный момент времени.

Рис. 20-10. Модификация гистонов (схема): а - нуклеосомная сердцевина; б - гистонацетилтрансферазы и гистонкиназы. Ацетильные группы выделены цветом. ® - фосфатные группы; Н - гистоны (от англ. *Histone*). Ферменты: 1 - гистонацетилтрансфераза; 2 - гистонкиназа

Процесс локального распаковывания транскрибируемого участка эукариотической ДНК включает модификацию гистоновой нуклеосомной сердцевины под действием гистонацетилтрансферазы (рис. 20-10). Этот фермент осуществляет реакцию N-ацетилирования ε-аминогрупп остатков лизина в гистонах, используя ацетил-КоА в качестве донора ацетильных групп. N-ацетилирование приводит к нейтрализации положительного заряда гистонов. Эту нейтрализацию осуществляют также гистонкиназы, катализирующие реакцию фосфорилирования остатков серина молекул гистонов. Модификация гистонов путем ацетилирования и фосфорилирования ослабляет их взаимодействие с отрицательно заряженной ДНК.

Такое изменение структуры нуклеосом облегчает взаимодействие РНК-полимеразы II с промотором транскрибируемого гена.

## ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ

### Индукция и репрессия гена

В активации конкретного гена могут участвовать различные факторы транскрипции. К ним относят белки, способные связываться с боксами ГЦ и ЦААТ, расположенными на расстоянии 100-200 нуклеотидов левее стартовой точки. Такие факторы присутствуют во всех клетках и обеспечивают *конститутивную экспрессию* генов (т.е. экспрессию, которая происходит в клетке постоянно и не зависит от регуляторных воздействий). *Энхансеры* расположены на расстоянии тысяч нуклеотидов от регулируемого гена. Они связывают белки, ускоряющие транскрипцию. Такие транскрипционные факторы содержат два функционально важных участка. Один участок отвечает за связывание с энхансерной последовательностью ДНК, а другой - за связывание с белками, участвующими в формировании транскрипционного комплекса (рис. 20-11).

Рис. 20.11. Схема, иллюстрирующая участие транскрипционных факторов в инициации транскрипции

В ходе упаковки длинной молекулы ДНК могут образовываться петли. Именно поэтому энхансерные элементы оказываются сближенными в пространстве со своим геном на расстояние, достаточное для связывания транскрипционного фактора и с энхансерным элементом, и с белками инициаторного комплекса.

При отсутствии факторов транскрипции гены находятся в неактивном, *репрессированном* состоянии. Избирательная стимуляция экспрессии генов - *индукция* - осуществляется с помощью транскрипционных факторов, которые связываются со специфическими участками ДНК. Многие транскрипционные факторы, участвующие в экспрессии *индуцибельных* генов, находятся в клетке в неактивном состоянии, и их активация происходит под действием различных внешних сигналов. На рис. 20-12 показаны примеры активации транскрипционных факторов под действием гормонов и их внутриклеточных посредников.

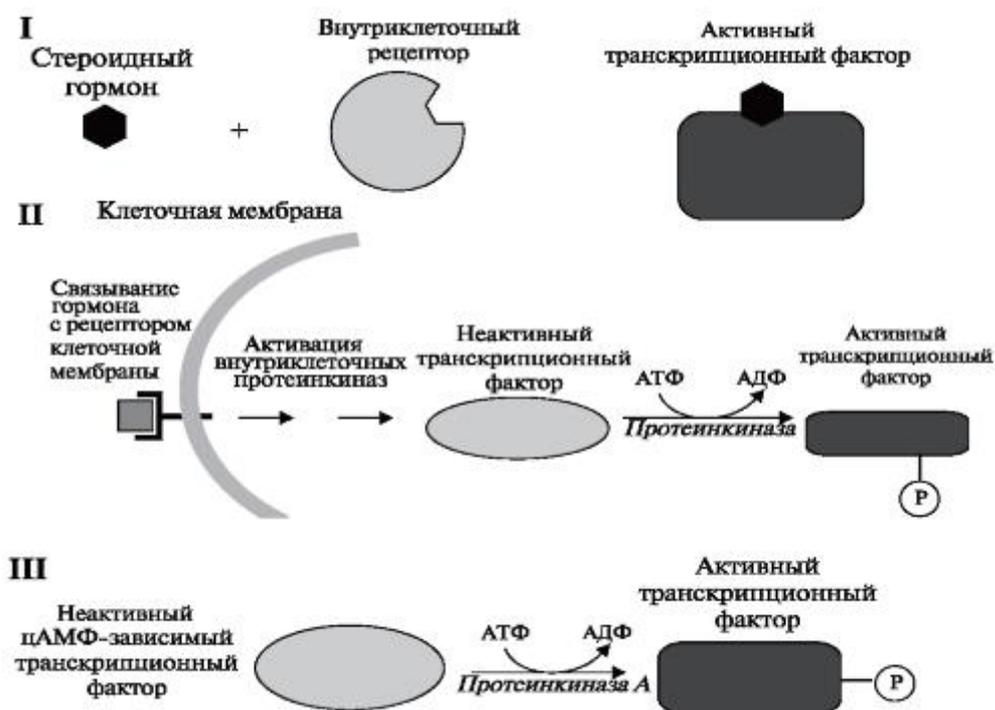


Рис. 20-12. Активация транскрипционных факторов гормонами и их внутриклеточными посредниками

## ДНК-связывающие белки

Помимо общих транскрипционных факторов, существуют многочисленные факторы транскрипции, участвующие в дифференциации, эмбриональном развитии и контроле генов. Проявление их действия зависит от того, могут ли они узнавать и связываться с определенными последовательностями ДНК. Основными семействами этих белков считают белки лейциновой молнии, типа «цинковые пальцы» и др.

Как правило, ДНК-связывающие белки связываются с двухцепочечной ДНК в виде гомодимеров. Специфическое связывание в определенном участке происходит благодаря образованию слабой связи между боковыми цепями аминокислотных остатков белка и оснований ДНК. В дополнительной стабилизации образующегося комплекса «ДНК-белок» может участвовать и сахарофосфатный скелет нуклеиновой кислоты.

## Стабильность мРНК

Уровень мРНК в клетках определяется соотношением скорости синтеза и деградации. О стабильности молекулы мРНК судят по времени ее полужизни. Чем дольше время полужизни, тем дольше будет использоваться эта молекула в качестве матрицы для синтеза соответствующего белка и, следовательно, тем больше молекул данного белка будет синтезировано.

У млекопитающих (включая человека) время полужизни мРНК варьирует от нескольких минут до 1-2 сут. мРНК регуляторных белков относится к числу короткоживущих, а мРНК глобина ( $t_{1/2}$  около 10 ч) является одной из самых стабильных.

## *В записную книжку врача*

### Ингибиторы РНК-полимераз

Активность бактериальных РНК-полимераз избирательно тормозят некоторые антибиотики, например рифампицин - полусинтетический антибиотик широкого спектра действия, который используют для лечения туберкулеза и ряда других заболеваний. РНК-полимеразы II высокочувствительны к действию циклического октапептида  $\alpha$ -аманитина, содержащегося в яде бледной поганки. И рифампицин, и аманитин ингибируют элонгацию растущей цепи РН

## ГЛАВА 21. БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

Вопросы по теме

- Генетический код, его свойства.
- Молекула тРНК, строение и функции.
- Реакция образования аминоацил-тРНК.
- Трансляция.
- Этапы и факторы трансляции.
- Посттрансляционная модификация и фолдинг полипептидных цепей.
- Влияние антибиотиков и токсинов на биосинтез белка.

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

Биосинтез белка, называемый также трансляцией (от лат. *translatio* - передача), представляет следующий за транскрипцией этап реализации генетической информации.

В ходе трансляции информация о первичной структуре белка, закодированная в виде полинуклеотидной последовательности мРНК, переводится в соответствии с генетическим кодом в определенную последовательность аминокислотных остатков синтезированного белка.

### ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ ФАКТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

Генетический код и его свойства

В широком смысле генетический код - система записи наследственной информации, которая определяет последовательность включения аминокислот в полипептидную цепь в соответствии с нуклеотидной последовательностью каждого конкретного гена.

В узком смысле генетический код представляет собой «словарь» кодонов мРНК, кодирующих аминокислоты и знаки пунктуации процесса трансляции.

Генетический код *триплетен*, т.е. каждую аминокислоту кодирует триплет азотистых оснований полинуклеотидной цепи мРНК. Это минимальная комбинация четырех видов азотистых оснований, с помощью которой можно закодировать информацию о 20 аминокислотах. Из 64 комбинаций триплетов ( $4^3=64$ ) 61 триплет кодирует 20 аминокислот (рис. 21-1), два из трех оставшихся триплетов у эукариот аминокислоты не кодируют и являются так называемыми стоп-кодонами, ответственными за прекращение процесса трансляции. Еще один кодон (УГА), выполняющий функцию стоп-кодона, при определенных условиях может кодировать 21-ю аминокислоту - селеноцистеин.

Поскольку число кодирующих кодонов в 3 раза превышает количество кодируемых аминокислот, это означает, что одну аминокислоту кодируют несколько различных кодонов. Данное явление известно как вырожденность кода. Только две аминокислоты - метионин и триптофан - имеют по одному кодону. Остальные аминокислоты имеют два кодона и более (у лейцина их 6).

Триплеты азотистых оснований, кодирующих одну и ту же аминокислоту, как правило, отличаются по одному, третьему основанию (сравните, например, четыре кодона аланина или аргинина). Кроме того, кодоны для структурно сходных аминокислот также схожи между собой (сравните кодоны аминокислот лейцина и изолейцина). Это позволяет свести к минимуму риск возможных мутаций. Очень часто замена одного азотистого основания другим не влияет на аминокислотную последовательность синтезируемого белка (например изменение триплета ГЦУ на ГЦГ или ГЦЦ не окажет влияния на кодируемую аминокислоту: во всех этих случаях кодоны соответствуют аланину). Если же происходит замена одной аминокислоты другой, структурно похожей (изменение ГАУ на ГАГ, например, приводит к замене аспарагиновой кислоты глутаминовой), то такая замена может не оказывать никакого влияния на функцию белка.

Последовательность оснований читается с определенной стартовой точки, определяемой иницирующим кодоном, и в мРНК нет запятых - азотистых оснований, не входящих в последовательность азотистых оснований кодонов.

Генетический код неперекрывается. Это означает, что одно и то же азотистое основание полинуклеотидной цепи мРНК не может одновременно входить в два триплета.

### Генетический код

УУУ	Фен	УАУ	Тир	УГУ	Цис	УЦУ	Сер
УУА	Лей	УАА	Стоп	УГА	Стоп	УЦА	Сер
УУГ	Лей	УАГ		УГГ	Три	УЦГ	Сер
УУЦ	Фен	УАЦ	Тир	УГЦ	Цис	УЦЦ	Сер
АУУ	Иле	ААУ	Асн	АГУ	Сер	АЦУ	Тре
АУА	Иле	ААА	Лиз	АГА	Арг	АЦА	Тре
АУГ	Мет	ААГ	Лиз	АГГ	Арг	АЦГ	Тре
АУЦ	Иле	ААЦ	Асн	АГЦ	Сер	АЦЦ	Тре
ГУУ	Вал	ГАУ	Асп	ГГУ	Гли	ГЦУ	Ала
ГУА	Вал	ГАА	Глу	ГАА	Гли	ГЦА	Ала
ГУГ	Вал	ГАГ	Глу	ГГГ	Гли	ГЦГ	Ала
ГУЦ	Вал	ГАЦ	Асп	ГГЦ	Гли	ГЦЦ	Ала
ЦУУ	Лей	ЦАУ	Гис	ЦГУ	Арг	ЦЦУ	Про
ЦУА	Лей	ЦАА	Гли	ЦГА	Арг	ЦЦА	Про
ЦУГ	Лей	ЦАГ	Гли	ЦГГ	Арг	ЦЦГ	Про
ЦУЦ	Лей	ЦАЦ	Гис	ЦГЦ	Арг	ЦЦЦ	Про

Рис. 21-1. Генетический код

Наконец, генетический код универсален. За редким исключением кодонам свойственны одни и те же функции для всех представителей растительного и животного мира.

Геномы некоторых низших эукариот, прокариот и митохондрий характеризуются рядом отличий от стандартного генетического кода.

В митохондриях, например, стоп-кодон УГА кодирует триптофан, а триплет АГА, обычно кодирующий аминокислоту аргинин, - в митохондриях позвоночных выполняют функцию стоп-кодона.

*В записную книжку врача* Универсальность кода

Универсальные коды позволяют внедрять генетический материал человека в микроорганизмы и использовать их белоксинтезирующую машину для производства белков (например, инсулина), применяемых в медицине.

### Транспортные РНК

Транспортные РНК содержат три неспаренных основания, которые формируют антикодон и гибкий отросток - 3'-ЦЦА, к которому присоединяется аминокислота. Антикодон - триплет оснований, комплементарный кодону. Поскольку аминокислоты кодирует 61 кодон, можно ожидать, что для трансляции необходима 61 молекула различных тРНК, каждая со своим антикодоном, комплементарным одному кодону, и принимающая одну аминокислоту, представленную ее кодоном. В действительности число тРНК меньше, чем 61, и некоторые молекулы тРНК могут узнавать несколько кодонов (табл. 21-1).

Таблица 21-1. Особенности спаривания первого основания антикодона и третьего основания кодона

Основание антикодона	Основания, узнаваемые на кодоне
У	А, Г
Ц	Г
А	У
Г	У, Ц
Г	У, Ц, А

При этом кодоны, узнаваемые одной тРНК, кодируют одну и ту же аминокислоту. Такое узнавание некоторыми молекулами тРНК нескольких кодонов оказалось возможным благодаря механизму неоднозначного соответствия («качания»), в основе которого лежит некомплементарное спаривание первого основания антикодона с третьим основанием кодона.

Антипараллельное спаривание достигается за счет «переворачивания» молекулы тРНК. Вот почему структура тРНК с 5'-концом, расположенным слева, в спаренной форме находится в перевернутом виде (мРНК записывается таким образом, что 5'-конец находится слева). В показанном примере тРНК может спариваться с кодонами ГЦЦ и ГЦУ, каждый из которых кодирует аланин. Поскольку в обоих случаях ГЦЦ и ГЦУ кодируют

аминокислоту аланин, такое спаривание не изменяет аминокислотной последовательности синтезированного белка, но способствует тому, что одна тРНК может транслировать несколько кодонов (рис. 21-2). Все это позволяет клетке синтезировать меньшее количество молекул тРНК.

Рис. 21-2. Спаривание оснований антикодона молекулы тРНК с кодоном мРНК (схема)

Минорное азотистое основание гипоксантин может спариваться с тремя азотистыми основаниями кодона, поэтому именно гипоксантин часто является первым основанием антикодона.

В тех случаях, когда речь идет об определенных тРНК, ответственных за перенос определенных аминокислот, при написании таких тРНК используют уточняющее трехбуквенное обозначение конкретной аминокислоты.

Например, аланиновую тРНК записывают следующим образом: тРНК<sup>Ала</sup>.

Присоединение аминокислоты к тРНК

Присоединение аминокислот к тРНК катализируют ферменты аминоацил-тРНК-синтетазы. В каждой клетке должно быть по меньшей мере 20 различных видов этих ферментов, каждый из которых присоединяет определенную кислоту к соответствующей тРНК.

Процесс присоединения аминокислоты к тРНК протекает в две стадии.

1. Аминокислота + АТФ - аминоацил-АМФ + ФФн.
2. Аминоацил-АМФ + тРНК - аминоацил-тРНК + АМФ. Образовавшийся на первой стадии аминоациладенилат (аминоацил АМФ) не покидает фермент.

Аминокислота присоединяется с помощью эфирной связи к концевой 3'-ОН-группе триплета нуклеотидов ЦЦА молекулы тРНК. Для обозначения тРНК, нагруженных своими аминокислотами, перед тРНК записывают трехбуквенным обозначением присоединенную аминокислоту. Так, например, нагруженную аланином тРНК<sup>Ала</sup> записывают следующим образом: Ала-тРНК<sup>Ала</sup>. Двухстадийной процесс уменьшает риск неправильного присоединения аминокислоты к чужой тРНК.

*Присоединение селеноцистеина.* Селеноцистеин - аналог цистеина, в котором атом серы замещен атомом селена, в свободном виде его в организме не

встречают. Образование этой аминокислоты происходит на особой селеноцистеиновой тРНК - тРНК<sup>Sec</sup>, которая узнает кодон УГА. Сначала фермент серил-тРНК-синтетаза присоединяет остаток серина к тРНК<sup>Sec</sup>, затем серил-тРНК<sup>Sec</sup> подвергается реакции фосфорилирования с образованием о-фосфосерил-тРНК<sup>Sec</sup>. На заключительном этапе О-фосфосерил-тРНК<sup>Sec</sup> взаимодействует с селенофосфатом (Se=PO<sub>3</sub><sup>3-</sup>) с образованием селеноцистеинил-тРНК<sup>Sec</sup>. В таком виде селеноцистеин и поступает к месту синтеза белка на рибосомы.

### Рибосомы

Рибосомы - нуклеопротеиновые частицы, присутствующие в большом количестве в клетках. Они состоят из двух субчастиц: большой и малой (рис. 21-3), которые образуют А- и Р-центры. В А-центре (от англ. *Aminoacyl*) происходит связывание нагруженной аминокислотой тРНК, а в Р-центре (от англ. *Peptidyl*) расположена тРНК, несущая синтезируемую аминокислотную последовательность.

Размеры рибосом велики. Их оценивают по скорости оседания при ультрацентрифугировании и выражают в единицах Сведберга (Svedberg). Последние сокращенно обозначают заглавной буквой S.

Размер эукариотической рибосомы составляет 80S, а большой и малой субчастиц - 60S и 40S соответственно. На долю белков приходится 40% массы рибосом, 60% составляют рибосомные РНК, сокращенно обозначаемые рРНК. В состав большой субчастицы входят 49 полипептидов, в состав малой - 33. В малой субчастице присутствует 18 S рРНК, в большой - 28 S, 5 и 5,8 S рРНК.



Рис. 21-3. Структура рибосом

18S участвует в формировании А-центра малой субчастицы, где происходит проверка правильности взаимодействия «кодон-антикодон». Кроме того, рРНК обеспечивают взаимодействие большой и малой субчастиц, а также *транслокацию* - передвижение рибосомы вдоль мРНК в процессе трансляции.

#### Белковые факторы

Помимо рассмотренных выше факторов, необходимых для осуществления процесса трансляции, на каждом этапе синтеза белка на рибосомах участвует ряд цитоплазматических белков, ответственных за инициацию, элонгацию и терминацию биосинтеза белка. Эукариотические факторы инициации обозначают буквами eIF (от англ. *eukaryotic Initiation Factor* - эукариотический фактор инициации), элонгации - eEF (от англ. *eukaryotic Elongation factor* - эукариотический фактор элонгации). В терминации участвуют три различных фактора высвобождения белка, обозначаемых буквами RF (от англ. *Release Factor* - фактор высвобождения).

Факторы инициации, элонгации и терминации относят к семейству G-белков, проявляющих свойства ГТФазы. Они могут функционировать только в связанном с ГТФ состоянии. На рибосоме они осуществляют медленный гидролиз ГТФ с образованием ГДФ и Фн, высвобождение которого вызывает в этих белках конформационные изменения. В связанном с ГДФ состоянии

белковые факторы отсоединяются от рибосомы; в цитоплазме происходит обмен ГДФ на ГТФ, после чего эти факторы вновь готовы к работе.

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССА ТРАНСЛЯЦИИ

В сильно упрощенном виде схема синтеза белка выглядит следующим образом. Рибосома присоединяется у 5'-конца мРНК и двигается вдоль нее по направлению к 3'-концу, присоединяя по мере движения в полипептидную цепь аминокислотные группы нагруженных молекул тРНК в соответствии с последовательностью кодонов. В конце рибосома встречает стоп-кодон; в этой точке полипептидная цепь высвобождается, рибосома отсоединяется и диссоциирует на субъединицы.

В процессе синтеза белка выделяют 3 этапа: инициацию, элонгацию и терминацию.

#### Инициация трансляции

Точность трансляции зависит от того, удалось ли рибосоме узнать первый триплет кодирующей последовательности мРНК. Именно поэтому от того, как прошла инициация, зависит весь процесс биосинтеза белка. Что может произойти, если трансляция нуклеотидной последовательности мРНК в белок начнется в двух разных точках, иллюстрирует пример, приведенный на рис. 21-4.



Рис. 21-4. Сдвиг рамки считывания всего на одно основание приводит к синтезу другого пептида

Инициация трансляции начинается со сборки так называемого 48S-инициаторного комплекса, в образовании которого участвуют мРНК, малая (40S) субчастица рибосом, инициаторная РНК, нагруженная одной

аминокислотой, ГТФ, ряд белковых факторов инициации и кэп-белков, взаимодействующих с кэпированным 5'-концом мРНК (рис. 21-5).

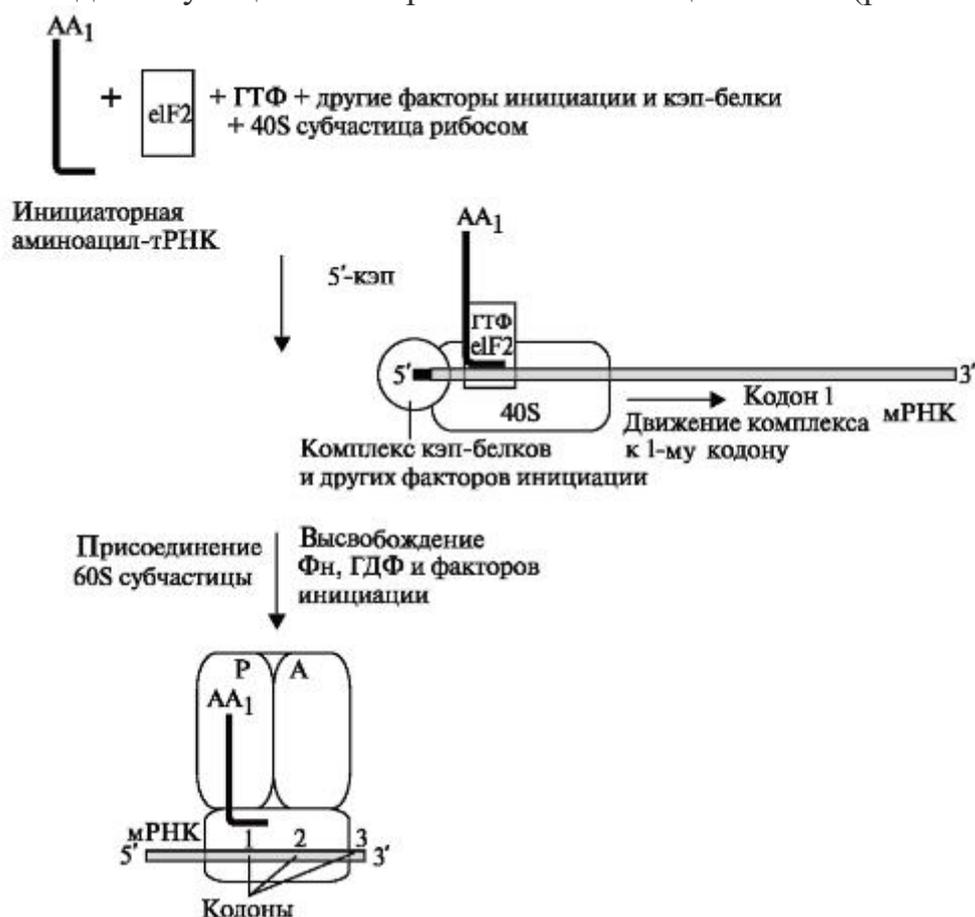


Рис. 21-5. Инициация трансляции у эукариот: eIF2 - эукариотический фактор инициации; AA<sub>1</sub> - первая аминокислота

Образовавшийся комплекс с помощью АТФ-зависимого механизма движется по мРНК до тех пор, пока не достигнет первого триплета. После этого происходит присоединение 60S-субчастицы, образование 80S-инициаторного комплекса, и процесс инициации, сопровождающийся гидролизом ГТФ, завершается.

В результате на мРНК находится полная 80S-рибосома, в которой сформированы два центра - Р и А. В первом из них расположена нагруженная аминокислотой тРНК, антикодон которой спарен с первым кодоном, А-центр остается свободным.

Точное узнавание инициаторного кодона рибосомой определяет выбор не только первой (N-концевой) аминокислоты, но и всю последующую разбивку мРНК на триплеты нуклеотидов и, в конце концов, правильную

последовательность аминокислотных остатков в синтезируемой полипептидной цепи.

### Элонгация

На стадии элонгации (рис. 21-6) в работу включаются факторы элонгации EF1 и EF2. В задачу первого входит доставка нагруженной аминокислотой тРНК к рибосоме, а второй фактор осуществляет транслокацию рибосомы вдоль мРНК в направлении 5'→3' к следующему кодону (после того, как аминокислотная группа оказывается у растущего пептида).

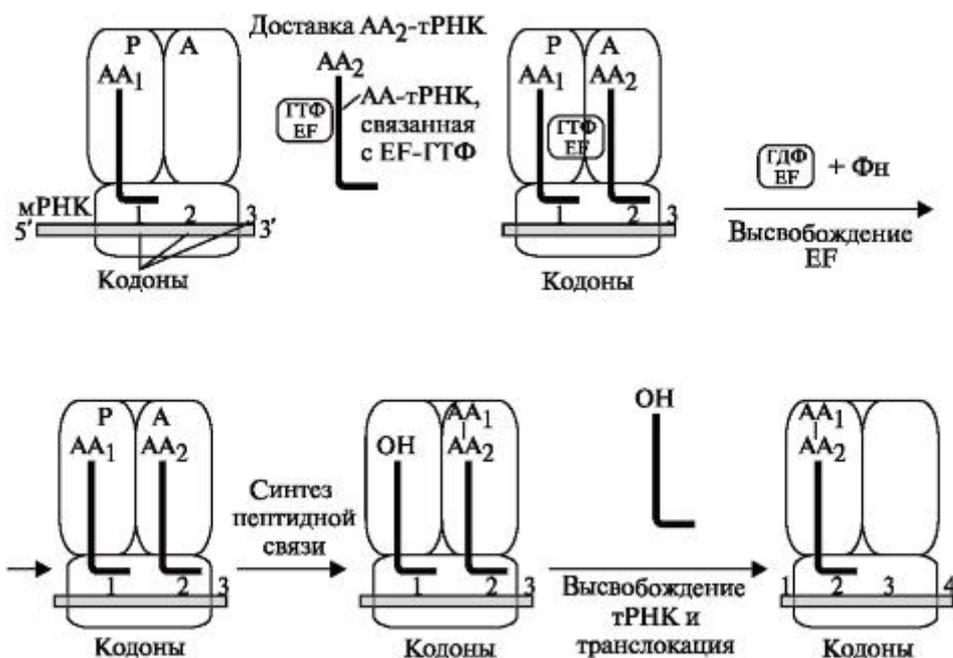


Рис. 21-6. Упрощенная схема процесса элонгации: AA<sub>1</sub> и AA<sub>2</sub> - первая и вторая аминокислоты соответственно

Эти два фактора поочередно двигаются по рибосоме в связанном с ГТФ состоянии. Они выполняют свои функции и отделяются от рибосомы после гидролиза ГТФ, чтобы после обмена ГДФ на ГТФ повторно участвовать в следующих раундах элонгации. Нагруженная своей аминокислотой вторая тРНК с помощью фактора элонгации EF1 поступает в А-центр. Ее антикодон спаривается с комплементарным кодоном. В это время на факторе EF1 происходит гидролиз ГТФ до ГДФ и Фн. В результате EF1-ГДФ покидает рибосому, а первая аминокислота переносится со своей тРНК на свободную аминогруппу аминокислот-тРНК в А-центре и образуется дипептид, соединенный со второй тРНК (пептидил-тРНК). Эта пептидилтрансферазная реакция происходит при участии 28S рРНК.

В результате синтеза первой пептидной связи А-центр заполнен пептидил-тРНК, а Р-центр содержит ненагруженную тРНК. Далее рибосома с помощью фактора элонгации eEF2 передвигается на один ко-дон вдоль мРНК. Этот процесс, для которого необходим гидролиз ГТФ, называют *транслокацией*. Пустая тРНК покидает рибосому. Поскольку факторы элонгации, отвечающие за доставку очередной аминоацил-тРНК и транслокацию, связываются с рибосомой поочередно, синтез пептида и его транслокация также происходят поочередно.

В результате передвижения рибосомы по мРНК пептидил-тРНК оказывается в Р-центре, а А-центр, расположенный у третьего кодона, остается свободным. Элонгация полипептидной цепи представляет собой повторные циклы одного и того же процесса. Аминоацил-тРНК, образующая комплекс с eEF1-ГТФ, доставляется в А-центр. Пептидильная группа переносится на нее с Р-центра, а высвободившаяся тРНК покидает рибосому. Последняя перемещается из центра А в центр Р, а рибосома перемещается на один кодон в направлении от 5'-конца к 3'-концу мРНК, в результате чего пептидил-тРНК оказывается уже в Р-центре, и весь процесс повторяется вновь. Растущая полипептидная цепь оказывается присоединенной к тРНК, доставившей на рибосому последнюю аминокислоту.

Точность трансляции определяется взаимодействием «кодон-антикодон», которое в конечном итоге и обеспечивает поступление правильной аминоацил-тРНК в А-центр и удлинение полипептидной цепи, которая синтезируется с N-конца. Последняя присоединяемая аминокислота образует С-конец полипептидной цепи.

#### Терминация трансляции

В конце мРНК находится, по крайней мере, один из трех стоп-кодонов, для которых не существует тРНК - УАГ, УАА и УГА. Когда рибосома достигает одного из стоп-кодонов, особый цитоплазматический фактор высвобождения белка вызывает высвобождение синтезированного белка от тРНК за счет изменения пептидилтрансферазы таким образом, что фермент гидролизует эфирную связь между -СООН белка и -ОН 3'-концевого нуклеотида. Рибосома отсоединяется от мРНК и диссоциирует на субчастицы, готовые к следующей инициации.

## СИНТЕЗ БЕЛКА В МИТОХОНДРИЯХ

Митохондрии содержат собственную ДНК и белоксинтезирующий аппарат, с помощью которого эти органеллы синтезируют ограниченное количество различных белков. Многие белки митохондрий закодированы генами ядерной ДНК. Рибосомы митохондрий, подобно прокариотам, для инициации используют формилметионин и особую тРНК, осуществляющую перенос этой аминокислоты. Вследствие упрощенных взаимодействий кодона и антикодона митохондрии млекопитающих могут обходиться 22 видами тРНК.

### ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ И ТОКСИНОВ НА СИНТЕЗ БЕЛКА

Антибиотики - продукты жизнедеятельности микроорганизмов, обладающие способностью в малых количествах оказывать избирательное токсическое действие на другие микроорганизмы и клетки злокачественных опухолей.

У прокариот стрептомицин нарушает инициацию, а эритромицин и хлорамфеникол ингибируют пептидилтрансферазу, фузидовая кислота тормозит транслокацию.

Дифтерийный токсин ингибирует eEF2-транслоказу эукариот. Рицин - токсин клещевины обыкновенной - обладает N-гликозидазной активностью.

Катализируемое рицином удаление аденина из одной из рРНК эукариот вызывает инактивацию большой субчастицы рибосом. Попадание всего одной молекулы рицина может вызвать гибель целой клетки, содержащей тысячи рибосом.

### ФЕРМЕНТЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ФОЛДИНГЕ БЕЛКА

В сворачивании новосинтезированной полипептидной цепи участвуют ферменты и молекулярные шапероны. Роль последних в фолдинге была рассмотрена в первой главе.

Фермент *протеиндисульфидизомераза* осуществляет перемещение -S-S-связи в полипептидной цепи. В случае формирования ошибочной дисульфидной связи этот фермент осуществляет коррекцию сворачивания белка. Этого фермента много в ЭПР, где происходит сворачивание многих секреторных белков, имеющих дисульфидные связи.

Другой фермент - *пептидилпролизиомераза* осуществляет изомеризацию пептидной связи, образованной пролином. Этот фермент катализирует *цис*-, *транс*-изомеризацию пептидных связей пролина, что способствует формированию правильной конформации белковой молекулы.

Гликозилирование белков в просвете эндоплазматического ретикулума

Многие белки (особенно мембранные и секреторные) содержат в своем составе присоединенный комплекс олигосахаридов. Присоединение углеводных компонентов осуществляется путем образования O- и N-гликозидных связей, в формировании которых участвуют амидный азот остатка аспарагина (N-гликозилирование) или -ОН группа остатков серина и треонина (O-гликозилирование). Присоединение углеводного компонента осуществляется в несколько этапов. Сначала внутри ЭПР происходит N-гликозилирование, затем в аппарате Гольджи происходит O-гликозилирование. Другие виды посттрансляционных модификаций были рассмотрены в главе «Ферменты».

Деградация белков

В процессе трансляции неизбежно образуются полипептиды, содержащие ошибочные аминокислоты. Это может привести к возникновению аномальных белков. Следовательно, такие белки должны быть уничтожены. Они расщепляются в протеасомах после их модификации белком убиквитином (см. рис. 15-8).

*В записную книжку врача*

Нарушения убиквитин-протеасомной системы

Нарушения убиквитин-протеасомной системы сопровождается сдвигами в утилизации дефектных белков. Образовавшиеся нерастворимые белковые агрегаты оказывают токсическое действие на клетки, вызывая развитие нейродегенеративных и сердечных протеинопатий. С другой стороны, при химиотерапии злокачественных опухолей специально достигают искусственного нарушения работы убиквитин-протеасомной системы. В этом случае ингибиторы протеасом вызывают остановку клеточного цикла и гибель клеток. В клинической практике широко применяют ингибитор протеасом *бортезомиб*, используемый для лечения множественной миеломы.

## ЧАСТЬ V. ЧАСТНАЯ БИОХИМИЯ.

### ГЛАВА 22. МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Вопросы по теме

- Организация межклеточного матрикса соединительной ткани.
- Коллаген. Структура, свойства. Синтез и распад.
- Эластин. Структура, свойства. Синтез и распад.
- Адгезивные белки межклеточного матрикса.
- Протеогликаны. Структура, синтез и распад протеогликанов.
- Обмен гиалуроновой кислоты.

#### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

В живом организме самая распространенная ткань-соединительная. Ее основу составляет межклеточный матрикс, в котором на большом расстоянии рассредоточены клетки.

Виды соединительной ткани:

- *волокнистая (плотная)* - присутствует в сетчатом слое дермы, сухожилиях, связках;
- *рыхлая* - представлена в пульпе зуба, образует строму различных органов, собственную пластинку и подслизистую основу слизистых оболочек и др.;
- *минерализованная* - составляет основу дентина, цемента зуба, костной ткани, ее особенность - наличие в межклеточном веществе кристаллов апатитов.

Клетки, участвующие в формировании межклеточного матрикса

Обменные процессы в соединительной ткани обеспечиваются резидентными или структурными клетками (*властными клетками*), а защита от воздействия факторов внешней и внутренней среды формируется клетками неспецифической и специфической защиты. Кооперативное взаимодействие всех клеток обеспечивает постоянство состава межклеточного матрикса, которое складывается из разрушения имеющейся структуры и последующего ее восстановления.

В стадии восстановления бластные клетки активно поглощают молекулы глюкозы и кислорода, что сопровождается высвобождением большого количества АТФ, ГТФ. Макроэрги используются для энергообеспечения синтеза белков, работы транспортных систем, регуляции активности ферментов. Вновь синтезированные белки подвергаются посттрансляционной модификации (гидроксилированию аминокислотных остатков, карбоксилированию глутамата, гликозилированию и фосфорилированию белковых молекул). Далее они упаковываются в пузырьки (везикулы) и выводятся из клетки. По мере старения клеток и увеличения межклеточного матрикса поступление кислорода в клетки уменьшается. Именно поэтому клетки переключаются на энергообеспечение за счет реакций гликолиза и гликогенолиза.

В механизмах неспецифической защиты участвуют *макрофаги, моноциты* и в меньшей мере *нейтрофилы*. Макрофаги и моноциты в определенных условиях сливаются и формируют *кластные клетки*. Последние способны узнавать и поглощать микроорганизмы, трансформированные и поврежденные клетки, измененные макромолекулы и минеральные кристаллы. Действие кластных клеток также начинается с усиленного поглощения кислорода, активации ферментов пентозофосфатного пути утилизации глюкозы с высвобождением большого количества НАДФН и интенсивной выработки активных форм кислорода. В окружающую среду из клеток выделяются гидролитические ферменты и метаболиты.

Межклеточное сообщение разных клеток реализуется путем прямого контакта или посредством химических молекул (цитокинов). *Цитокины* - небольшие пептиды и гликопротеины с молекулярной массой от 5 до 30 кДа. К ним относят интерлейкины (ИЛ), интерфероны (ИФН), различные факторы роста - эпидермальный (ЭФР), трансформирующий (ТФР), колониестимулирующий (КСФ), фактор некроза опухоли (ФНО) и др.

Действие цитокинов очень кратковременно, а эффективность чрезвычайно высока. Связываясь с рецепторами клеток, в низких концентрациях ( $10^{-9}$ - $10^{-12}$  М), многие цитокины (ИЛ-8, ИЛ-15, ИЛ-16 и др.) вызывают избирательное движение клеток, регулируют экспрессию определенных генов и управляют дифференцировкой клеток.

## ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Межклеточный матрикс - трехмерная упорядоченная структура, сформированная коллагеновыми и неколлагеновыми белками. В составе межклеточного матрикса, помимо коллагена присутствуют различные гликопротеины, протеогликаны и гиалуроновая кислота.

### Коллагеновые белки

Гликопротеины участвуют не только в межклеточных взаимодействиях, но и в формировании и поддержании формы клеток. Наибольшее количество гликопротеинов в межклеточном матриксе представлено семейством коллагеновых белков, отличительной особенностью которых является преобладание остатков *глицина, пролина и гидроксипролина*. В настоящее время описано до 28 вариантов коллагеновых  $\alpha$ -цепей, отличающихся по аминокислотному составу, которые кодируются более чем 40 генами. Сочетание одинаковых или разных  $\alpha$ -цепей ( $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ ) позволяет формировать различные типы коллагена. Тип коллагена обозначают римскими, а  $\alpha$ -цепи - арабскими цифрами с добавлением в скобках римской цифры, указывающей на тип коллагенового белка.

Общим для всех коллагенов считают наличие участков с последовательностью Гли-Про-Х, где в качестве Х присутствует остаток какой-либо аминокислоты (Ала, Лиз и др.), а часть остатков пролина и лизина гидроксильированы.

### *В записную книжку врача* Мутации коллагенов

Описаны около 400 мутаций разных коллагенов, приводящих к системным заболеваниям человека. Они проявляются в виде хондродисплазий, некоторых форм остеопороза и остеоартритов, заболеваний почек (синдром Альпорта) и др.

Все типы коллагенов в зависимости от структуры делят на следующие группы:

- фибриллообразующие;
- ассоциированные с фибриллами коллагена;
- сетевидные;
- микрофибриллярные;
- заякоренные.

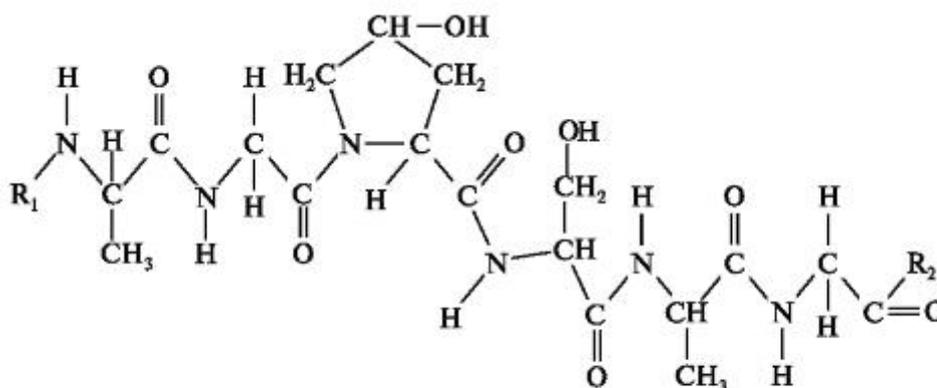
Более 90% всего коллагена высших организмов приходится на коллагены I, II, III и IV типа (табл. 22-1).

Таблица 22-1. Основные типы коллагеновых белков

Тип	Формула	Характеристика	Локализация
I — фибриллообразующий	$[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$ или $[\alpha_1(I)]_3$	33% — Гли, 13% — Про, 1% — ОН-Лиз и малое количество углеводов	Кость, дентин, пульпа зуба, цемент, периодонтальные волокна. Участвует в процессах минерализации
II — фибриллообразующий	$[\alpha_1(II)]_3$	Небольшое количество 5-ОН-Лиз (менее 1%) и высокое содержание углеводов (более 10%)	Хрящ и нехрящевая ткань на ранних стадиях развития
III — фибриллообразующий	$[\alpha_1(III)]_3$	Наличие большого количества ОН-Про. В составе $\alpha$ -цепей присутствует цистеин, а сама молекула коллагена мало гликозилирована	Стенки кровеносных сосудов
IV — сетевидный	$[\alpha_1(IV)]_2\alpha_2(IV)$	Имеет повышенное содержание ОН-Про (135 остатков), ОН-Лиз (56 остатков) на 1000 аминокислотных остатков; содержит цистеин и малое количество аргинина	Базальные мембраны
V — фибриллообразующий	$[\alpha_1(V) \alpha_2(V) \alpha_3(V)]$	Содержит фибриллярные и глобулярные домены, 4-ОН-Про (10%), 11% — Про, 32% — Гли, 9% — Глу	Кровеносные сосуды, мягкие ткани

## Структура молекулы фибриллярного коллагена

Молекула фибриллярного коллагена представляет собой правозакрученную спираль из трех  $\alpha$ -цепей. Первичная структура  $\alpha$ -цепей характеризуется высоким содержанием глицина, малым количеством серосодержащих аминокислот и отсутствием триптофана (рис. 22-1). Основным признаком считают содержание модифицированных аминокислот: 3- и 4-гидроксипролинов, а также 5-гидроксилизина. Одна треть аминокислотных остатков в коллагене представлена глицином,  $\frac{1}{5}$  часть - пролином, а также 3- и 4- гидроксипролином.



R<sub>1</sub>-аланил-глицил-4-гидроксипролил-серил-аланил-глицил-R<sub>2</sub>  
R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> — N- и C- концевые аминокислоты

Рис. 22-1. Фрагмент первичной структуры  $\alpha$ -цепи коллагена. В области расположения остатка пролина формируется пролиновый излом. Глицин необходим для формирования фибриллярной структуры, так как радикал любой другой аминокислоты в тройной спирали не помещается.

Единственным источником конформационных изменений в длинной полипептидной цепочке является вращение вокруг  $\alpha$ -углеродного атома. Однако пролин и гидроксипролин ограничивают вращение полипептидной цепи. Поэтому, в отличие от  $\alpha$ -спирали, возникает равномерная левовращающая спираль вытянутого типа, в которой на один виток спирали приходится 3,3 аминокислотных остатка. Она не подвергается стабилизации межцепочечными водородными связями. С-концевой пептид спирали отличается по аминокислотному составу и имеет форму гофрированного (складчатого) листа.

Три  $\alpha$ -цепи закручиваются вокруг общей оси. Данное образование известно под названием *тропоколлаген*. Тропоколлаген - структурная единица

коллагенового волокна, представляющая палочковидное образование длиной около 300 нм и толщиной порядка 1,5 нм с молекулярной массой 300 кДа. Все три цепочки удерживаются водородными связями. В среднем в тропоколлагене с участием гидроксильной группы гидроксипролина образуется 1,7 водородной связи на каждые три аминокислотных остатка. Образование водородных связей в разных участках молекулы тропоколлагена может отличаться, так как первичная структура, за исключением встречаемости глицина на каждой третьей позиции, не располагает к повторным последовательностям.

Важное свойство молекул тропоколлагена - способность образовывать высокоорганизованные волокнистые структуры в межклеточном пространстве. Полярные и гидрофобные взаимодействия между цепями сопровождаются образованием микрофибриллы, состоящей из пяти тройных спиралей тропоколлагена. Формируя фибриллы, молекулы тропоколлагена располагаются ступенчато, смещаясь относительно друг друга на одну четверть длины, что придает фибриллам характерную исчерченность. Сформированные фибриллы коллагена стабилизируются ковалентными поперечными связями, в образовании которых участвуют радикалы лизина и гидроксизина.

*В записную книжку врача*

Изменения в структуре коллагена

Структура коллагена меняется во время роста и регенерации, эмбрионального развития и при патологических состояниях. По мере старения человека в коллагеновых фибриллах постепенно увеличивается количество внутри- и межмолекулярных поперечных связей, соединяющих молекулы тропоколлагена в сплошную полимерную сеть, что сказывается на свойствах белка.

Биосинтез коллагеновых белков

Уникальность синтеза коллагена в том, что некоторые стадии этого процесса происходят вначале в клетке, а остальные - в межклеточном пространстве.

Внутриклеточные стадии синтеза коллагена

- На рибосомах синтезируются препроколлагеновые  $\alpha$ -цепи. На N-конце синтезируемой пре-про<sup>^</sup>-цепи находится гидрофобный сигнальный пептид из

100 аминокислотных остатков, необходимый для перемещения белковой молекулы в просвет эндоплазматического ретикулума (ЭПР).

- В просвете ЭПР остатки пролина и лизина, включенные в про- $\alpha$ -цепь, подвергаются гидроксигированию с образованием гидроксипролина и гидроксилизина. Реакции происходят с участием лизил-5-гидроксилазы, пролил-4-гидроксилазы и пролил-3-гидроксилазы (рис. 22-2). Все три фермента содержат атомы  $Fe^{2+}$ , для поддержания которых в восстановленной форме необходима аскорбиновая кислота.

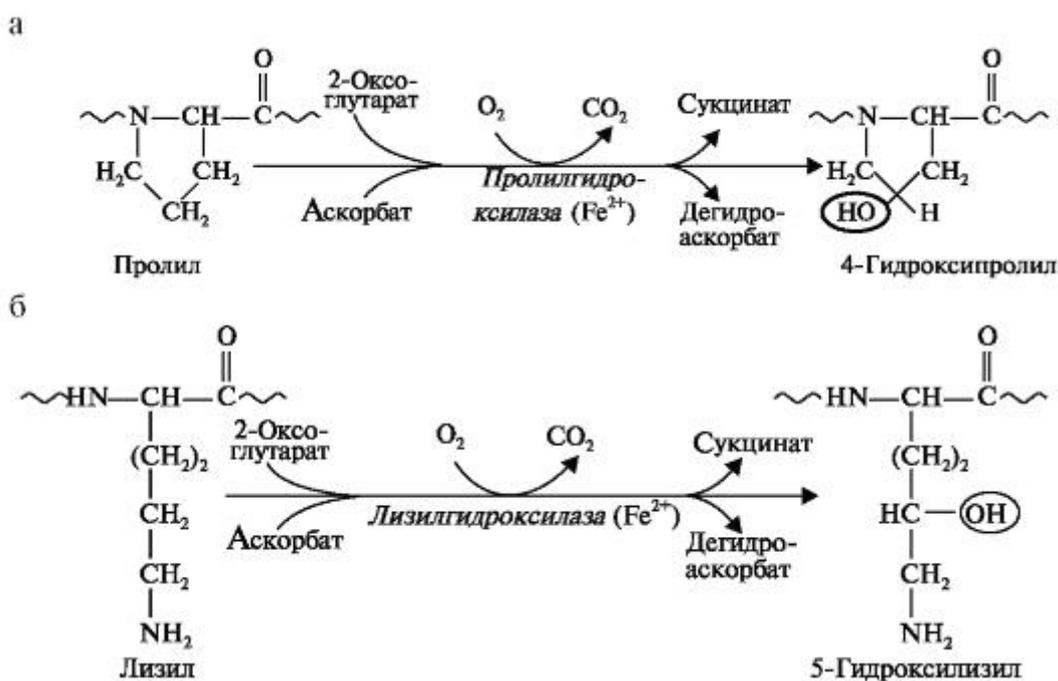


Рис. 22-2. Реакции гидроксигирования пролина и лизина (а, б)

*В записную книжку врача Цинга*

Нарушение гидроксигирования аминокислот из-за дефицита аскорбиновой кислоты лежит в основе основных симптомов цинги. Заболевание проявляется в снижении иммунитета, кровоизлияний на коже и во внутренних органах, кровоточивости десен, расшатывании зубов и множественным кариесом.

- Другой посттрансляционной реакцией является гликозилирование остатков аспарагина и гидроксилизина при участии гликозилтрансфераз (рис. 22-3). В процессе гликозилирования к гидроксилизину  $\alpha$ -(I)-цепей костного коллагена присоединяются остатки галактозы, а к  $\alpha$ -(III)-цепей коллагена дермы - дисахарид  $\alpha$ -глюкозидо-(1,2)-галактоза.

### Рис. 22-3. Реакция гликозилирования остатков гидроксизина

- По завершении синтеза полипептидной цепи процессы гидроксирования и гликозилирования прекращаются. Отщепляется сигнальный пептид, и про- $\alpha$ -цепи, способные к спонтанному объединению, формируют трехспиральную молекулу проколлагена.
- На N- и C- концах такой спирали присутствуют пропептиды. В составе C-концевого пропептида содержится 7-8 остатков цистеина, которые участвуют в образовании дисульфидных связей. Они необходимы для благоприятного сплетения про- $\alpha$ -цепей в жгутовидную структуру
- Образовавшиеся молекулы проколлагена попадают в секреторные пузырьки и затем выделяются из клетки в межклеточный матрикс.

### Внеклеточные стадии синтеза коллагена

- Внеклеточный этап начинается с отщепления пептидазами пропептидов от молекулы проколлагена. В результате образуются молекулы тропоколлагена, готовые к самосборке коллагеновых микрофибрилл.
- Самосборка в микрофибриллы происходит без участия ферментов. Молекулы укладываются по типу «голова к хвосту» с разделением молекул тропоколлагена с промежутком 35 нм и смещением почти на 1/4 длины каждой молекулы. Это объясняется тем, что участки аминокислот с заряженными радикалами чередуются со скоплением аминокислот с незаряженными радикалами.
- По ходу формирования микрофибрилл часть остатков лизина и 5-гидроксизина подвергается окислительному дезаминированию. Появляются их альдегидные аналоги - аллизин и 5-гидроксиаллизин. Реакцию катализирует фермент протеин-L-лизил-6-оксидаза, содержащий в активном центре ион меди

(рис. 22-4).

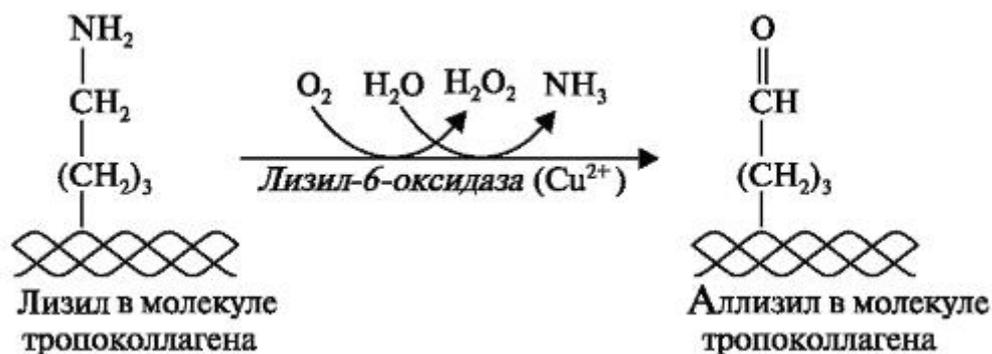


Рис. 22-4. Окислительное дезаминирование, катализируемое ферментом протеин-L-лизил-6-оксидазой

- Между молекулами тропоколлагена образуются ковалентные связи. Они формируются неферментативно между остатками высокореакционных аллизинов и близко расположенными радикалами лизина соседней молекулы тропоколлагена, т.е. наблюдается альдиминная (если участвует аллизин) или кетоиминная (если реагирует 5-гидроксиаллизин) конденсация (рис. 22-5). В результате две молекулы тропоколлагена связываются цепочкой либо лизиннорлейцина, или лизин-5-кетонорлейцина, либо гидроксизиннорлейцина, либо гидроксизин-5-кето-норлейцина. Такого рода межмолекулярные связи принято называть поперечными *бифункциональными* сшивками. Они характерны для фибриллообразующих коллагенов и придают им высокую прочность.
- По мере созревания ткани возникают связи между микрофибриллами. Они формируются путем взаимодействия кетоиминной сшивки с одной микрофибриллой и аллизином, расположенным в другой микрофибрилле. Сформированные межфибрилярные сшивки обеспечивают прочные ковалентные соединения микрофибрилл в составе коллагенового волокна.

Коллаген кожи содержит мало гидроксиаллизина, поэтому преобладают гидроксизиннорлейциновые связи. В костях и хрящах высока доля гидроксизино-5-кетонорлейцина, и их количество увеличивается в период кальцификации.

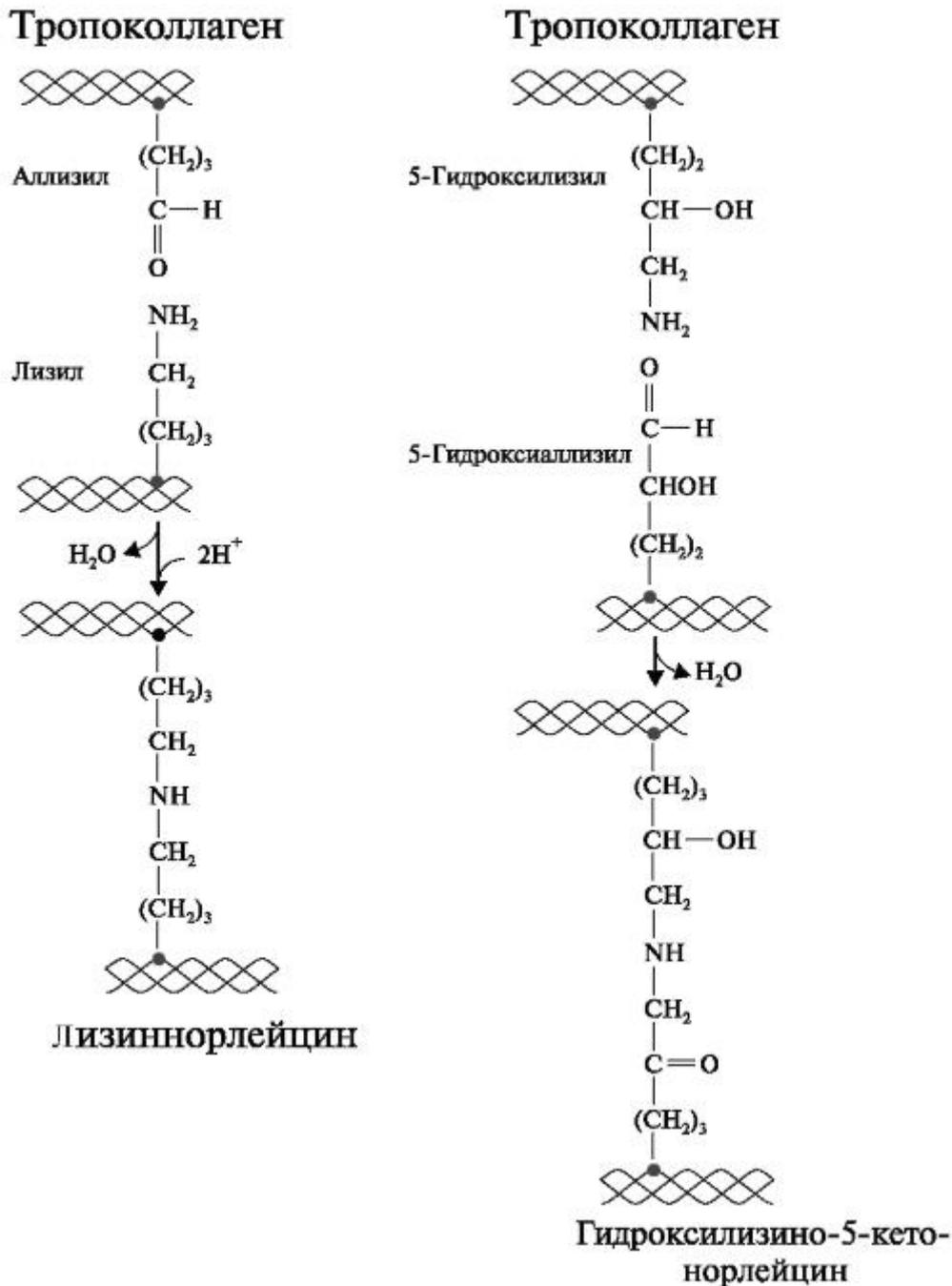


Рис. 22-5. Типы ковалентных связей между молекулами тропоколлагена, образующихся в результате альдиминной или кетоиминной конденсации

*В записную книжку врача*

Структура коллагена при сахарном диабете

При сахарном диабете вследствие неспособности клеток захватывать глюкозу из плазмы крови нарушается процесс внутриклеточного гликозилирования проколлагеновых  $\alpha$ -цепей. При попадании проколлагена

во внутриклеточное пространство присоединение углеводов происходит неферментативным путем, что также нарушает структуру коллагеновых фибрилл и неколлагеновых белков. Развивается тяжелая форма пародонтита, плохо поддающаяся лечению. У детей, которые родились от матерей, страдающих сахарным диабетом 1-го типа, диагностируют системные гипоплазии твердых тканей зуба.

#### Распад коллагеновых белков

Гидролиз молекул коллагена осуществляют преимущественно металлопротеиназы (ММП) ММП-1, -8, -13 (их еще называют коллагеназами), а также ММП-2 и -9 (желатиназы). Коллагеназы расщепляют пептидную связь в тройной суперспирали, образованную остатками *Тли-Пей* или *Тли-Илей* в С-концевой области нативного и денатурированного коллагена, а желатиназы гидролизуют обычно отдельные  $\alpha$ -цепи. В расщеплении коллагена участвует также и эластаза нейтрофилов. В отличие от коллагеназ,  $\alpha$ -эластаза гидролизует пептидные связи, образованные с участием карбоксильной группы валина или аланина.

*В записную книжку врача*

#### Патологии, связанные с нарушением обмена коллагена

Чрезмерный синтез протеиназ клетками соединительной ткани и их активация под влиянием цитокинов лежат в основе целого ряда патологических процессов. Это развитие различных форм артритов, эндогенных кист, острого и хронического пародонтита, формирование атеросклеротических бляшек, инвазия и метастазирование опухолевых клеток.

О распаде коллагена судят по количеству в моче и плазме крови гидроксипролина и продуктов деградации коллагена I типа - N- и C-концевых телопептидов. Наряду с продуктами распада коллагена в моче утром натошак растет количество кальция. О нарушении созревания коллагена свидетельствует рост количества пролина в плазме крови.

#### Эластиновые волокна

В межклеточном веществе стенок кровеносных сосудов, в периодонте, в подслизистом слое губ и щек, легких, кожи в большом количестве присутствуют эластиновые волокна, которые и обеспечивают эластичность

этих тканей. Выделенный из эластиновых волокон белок получил название эластина.

Эластин - гликопротеин, содержащий около 27% глицина, 19% аланина, 10% валина, 4,7% лейцина. Присутствие в эластине большого количества глицина, валина и лейцина способствует организации  $\beta$ -поворотов. В молекуле тропоэластина появляется вторичная структура, обозначаемая как  $\beta$ -спираль. Наряду с  $\beta$ -спирализацией, которая составляет почти 50%, еще 10% полипептидной цепи укладывается в  $\alpha$ -спирали. В остальной части молекулы белка присутствуют варианты нерегулярной структуры. Большое количество гидрофобных радикалов препятствует созданию стабильной глобулы, а относительно небольшие, почти сферические молекулы, соединены в волокнистые тяжи с помощью жестких бифункциональных поперечных сшивок - десмозина и изодесмозина, а также лизиннорлейцина. В образовании лизиннорлейцина участвуют два остатка лизина (рис. 22-б). Десмозин и изодесмозин формируются остатками лизина, принадлежащими, по крайней мере, двум цепям. Однако они могут быть образованы также остатками лизина, находящимися в трех и четырех цепях.

Рис. 22-б. Поперечные сшивки в структуре эластина: а - десмозин, образованный четырьмя остатками лизина; б - лизиннорлейцин, образованный двумя остатками лизина

В образовании тетрафункциональных поперечных сшивок участвуют 4 остатка лизина, 3 из которых при участии лизилоксидазы предварительно окисляются до соответствующих альдегидов.

Ковалентные сшивки между пептидными цепями эластина с неупорядоченной конформацией позволяет сети волокон эластина растягиваться и сжиматься во всех направлениях.

#### Синтез эластина

Синтез эластина начинается в фибробластах, хондроцитах и гладкомышечных клетках с образования тропоэластина. Тропоэластин - растворимый мономер, гидрофильные участки которого обогащены остатками лизина. Молекулы тропоэластина откладываются на особых микрофибриллах, основу которых составляет белок *фибриллин*. Способствует отложению тропоэластина *гликопротеин, ассоциированный с*

*микрофибриллами*, - MAGP (Microfibril Associated Glycoprotein). По мере расположения на поверхности микрофибрилл молекул тропоэластина происходит окисление остатков лизина до аллизина при участии лизилоксидазы. Присутствующие остатки аллизина и лизина образуют межмолекулярные сшивки - лизиннорлейциновые, десмозиновые и изодесмозиновые. Появившиеся сдвиги в молекуле эластина обеспечивают неплотное ее прилегание к поверхности микрофибриллы, что позволяет отслужившим свой срок молекулам эластина легко заменяться молекулами тропоэластина. Отличительной особенностью синтеза эластических новых волокон является и то, что они формируются только в развивающихся тканях и почти не синтезируются во взрослых организмах.

В составе эластиновых волокон, помимо эластина, присутствует белок *фибулин*. Этот белок взаимодействует не только с MAGP, фибриллином и эластином, но и с другими белками межклеточного матрикса - фибронектином, ламинином и нидогеном.

*В записную книжку врача*

Изменения в структуре эластина при патологических процессах

Нарушения структуры эластина могут приводить к развитию аневризм с последующими разрывами аорты, дефектам клапанов сердца, частым пневмониям и эмфиземе легких. Нередко это связано с дефектом образования десмозинов, изодесмозинов и лизин-норлейцина вследствие снижения активности лизилоксидазы при наследственных и приобретенных заболеваниях, дефиците меди.

Распад эластиновых волокон

В расщеплении эластина участвуют эластазы, в частности эластаза полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПЯЛ). Данный протеолитический фермент расщепляет связи, образованные карбоксильными группами алифатических аминокислот, и гидролизует во внеклеточном пространстве не только эластин, но и другие гликопротеины. Активность эластазы ингибирует белок -  $\alpha_1$ -антитрипсин. Его еще называют  $\alpha_1$ -ингибитором протеиназ.

*В записную книжку врача*

Эластаза

В тканях десны эластаза неактивна. При развитии воспаления увеличивается количество ПЯЛ, и они становятся источником эластазы. Активация эластазы происходит на фоне неизмененного или сниженного содержания  $\alpha_1$ -антитрипсина. Поэтому при гингивите и пародонтите наблюдают деструкцию эластических волокон в тканях пародонта.

#### Адгезивные гликопротеины

Белки адгезии (от лат. *adhaesio* - прилипание) обеспечивают «склеивание» клеток и компонентов межклеточного матрикса. В соединительной ткани присутствуют следующие адгезивные белки: фибронектин, ламинины, интегрины, нидоген, витронектин и др.

*Фибронектин* является основным адгезивным гликопротеином соединительной ткани. Его молекула состоит из двух сходных субъединиц, соединенных двумя дисульфидными связями в С-концевой области (рис. 22-7). Каждая субъединица представлена доменами (модулями), которые являются центрами узнавания различных макромолекул. На N-конце расположены домены, обладающие высоким сродством к гепарансульфату, белку-нидогену. В средней части субъединицы содержится участок связывания с коллагеном, а также RGD-центры (аминокислотная последовательность Асп-Гли-Арг) для связывания с клетками. Три С-концевых домена формируют центр присоединения фибрина.

Рис. 22-7. Модель молекулы фибронектина. Домены, связывающие: 1 - гепарин; 2 - клетки; 3 - коллаген; 4 - другие молекулы

Фибронектин кодируется только одним геном. Вместе с тем в разных клетках (фибробластах, эндотелиоцитах, эпителиоцитах и др.) мРНК подвергается разным вариантам альтернативного сплайсинга, поэтому молекулы фибронектина, в зависимости от типа клеток, значительно различаются по структуре и функциональной активности.

*Интегрины* представляют собой гетеродимерные белки, расположенные на плазматической мембране клеток и состоящие из двух нековалентно связанных трансмембранных  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц (рис. 22-8).

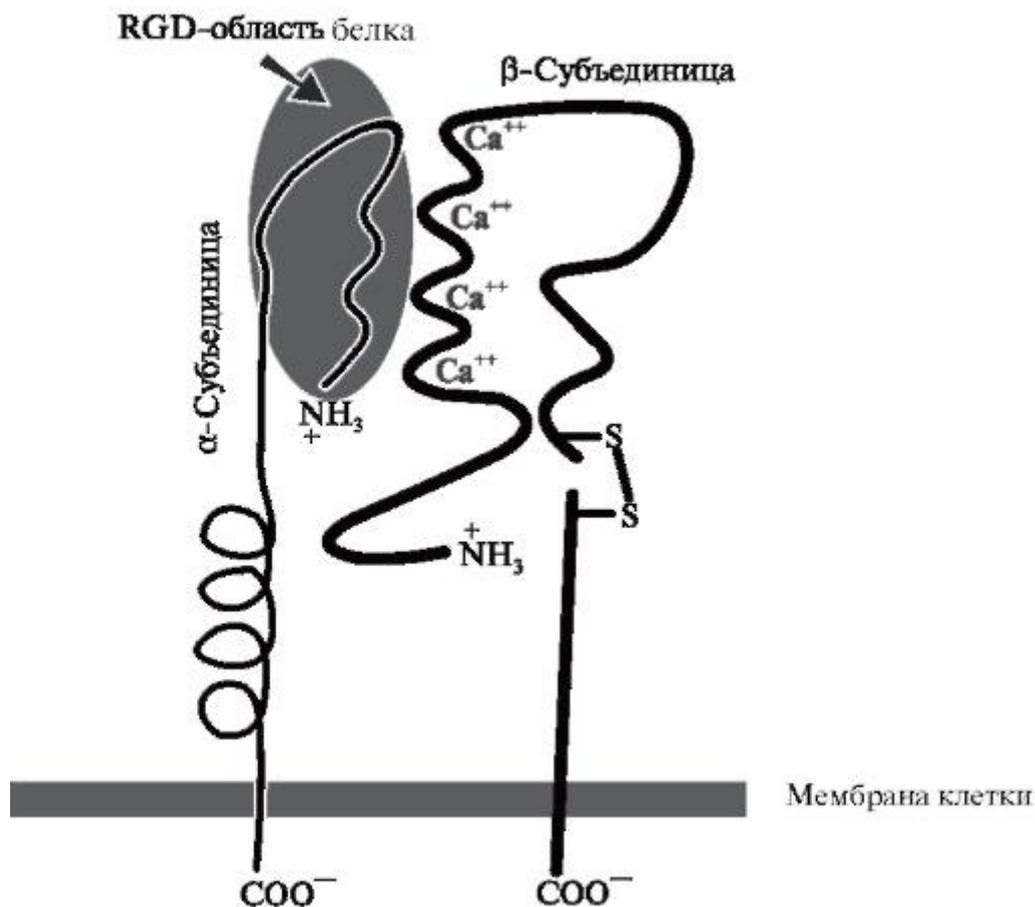


Рис. 22-8. Схема строения молекулы интегрина

Семейство интегринов включает 20 видов рецепторов с разной специфичностью; для функционирования интегринов необходимо присутствие ионов кальция или магния и именно они позволяют N-концевым участкам  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц соединяться друг с другом. Каждая цепь интегрина пересекает мембрану один раз. Каждая цепь интегрина имеет большие внеклеточные домены, способные связываться с RGD-последовательностями различных белков.

Благодаря трансмембранной ориентации интегринины передают сигналы от межклеточного матрикса к цитоскелету и обратно, что и обеспечивает двустороннюю передачу сигнала. Взаимодействие интегринов с белками межклеточного матрикса в некоторых случаях препятствует апоптозу клеток.

*Ламинины* - адгезивные гликопротеины, характерные для базальных мембран. Молекула ламинина представляет собой большой гибкий комплекс, состоящий из длинных  $\alpha$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -полипептидных цепей (рис. 22-9).

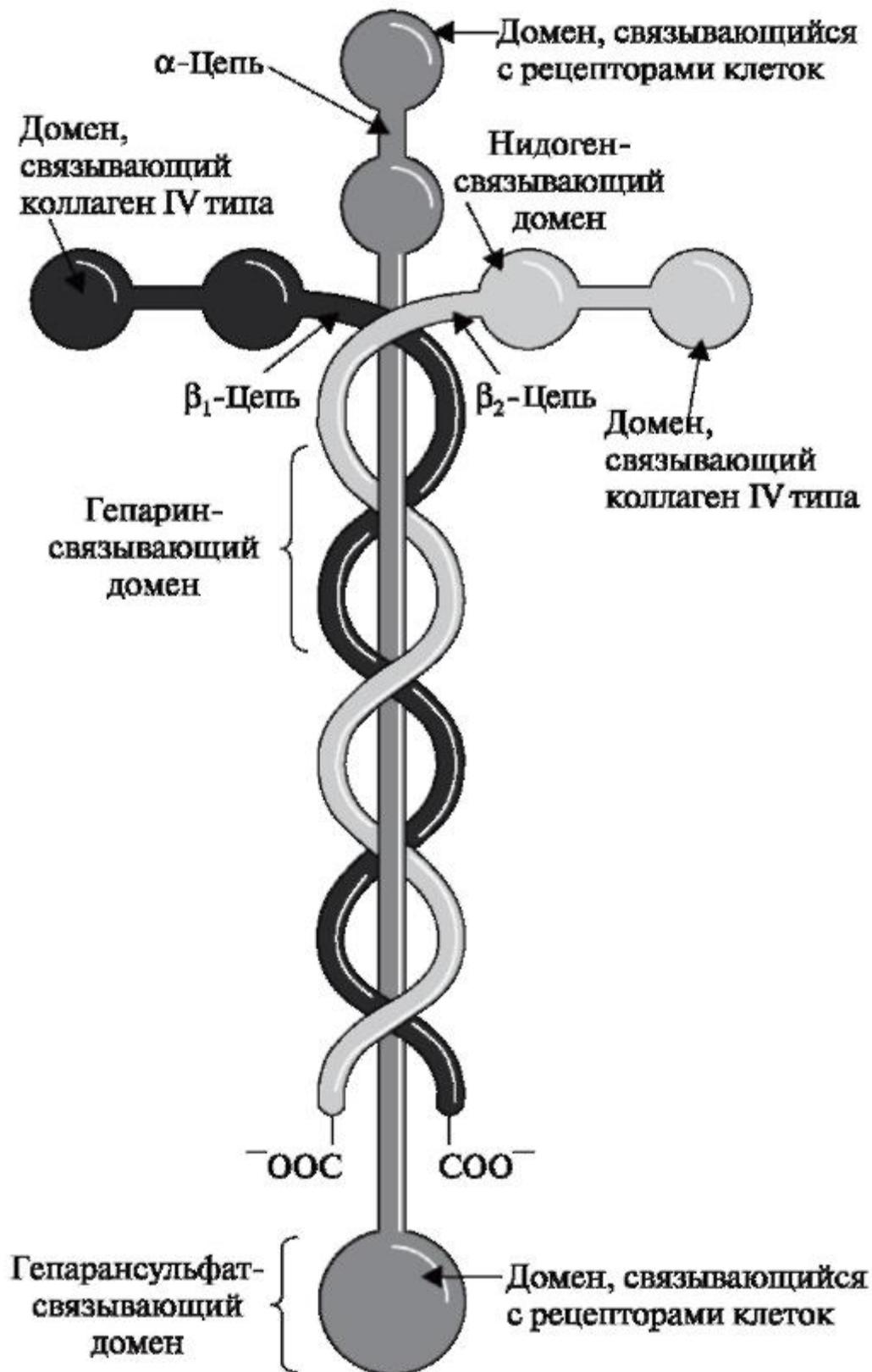


Рис. 22-9. Схема строения молекулы ламинина

Полипептидные цепи ассоциированы в форме асимметричного креста, удерживаемых вместе с помощью дисульфидных связей. α и β-цепи содержат

несколько функциональных доменов, способных связываться с коллагеном IV типа, гепарансульфатом, энтактином (нидогеном) и рецепторами на клеточной поверхности. Ламинины склеивают эпителиальные клетки с базальной мембраной, обеспечивают миграцию клеток эпителия, а также связывают компоненты межклеточного матрикса.

У белка *нидогена* в N-концевой области расположены два глобулярных домена, один из которых связывается с коллагеном IV типа и коровым белком протеогликана *перлекана*, а C-концевые домены формирует комплекс с  $\beta_2$ -цепью ламинина.

*Витронектин* - адгезивный белок межклеточного матрикса, который циркулирует в плазме крови в растворимой форме. Он может связываться со многими различными типами белков, таких, как коллагены, интегрины, факторы свертывания крови и факторы, обуславливающие лизис клеток, а также с внеклеточными протеиназами.

При повреждении тканей витронектин способствует образованию кровяного сгустка. Для того чтобы обеспечить доставку в ткани факторов свертывания крови, витронектин должен перейти из растворимой формы в нерастворимую, способную связать эти факторы.

*В записную книжку врача* Патология интегринов

Утрата клетками некоторых интегринов при раке молочной и предстательной желез, толстой кишки или их избыток при меланоме, плоскоклеточном раке тканей полости рта, носоглотки, гортани сопряжены с высокой степенью злокачественности опухоли.

*Факторы роста* - небольшие пептиды, которые стимулируют или ингибируют деление и дифференцировку определенных клеток. Как правило, они действуют на другие клетки (паракринно), а иногда на те, которые их и секретируют, т.е. аутокринно (см. главу 9). Факторы роста связываются со специфическими для них рецепторами, локализованными на поверхности клеточных мембран своих клеток-мишеней. Внутриклеточная реализация сигнала большинства факторов роста происходит через активацию тирозиновых протеинкиназ, и только  $\beta$ -ТФР активировать протеинкиназы серин/треонинового типа.

## ПРОТЕОГЛИКАНЫ

Состояние межклеточного матрикса зависит от соотношения коллагена и протеогликанов. Благодаря полярной природе и сильному отрицательному заряду протеогликанов связывают катионы и основную часть воды.

### Структура и функции протеогликанов

*Протеогликаны* - семейство сложных макромолекул, состоящих из белкового компонента (корового белка) и ковалентно присоединенных к нему через N- или O-гликозидные связи сульфатированных гликозаминогликанов (см. главу 2). Наличие гликозаминогликанов является основным отличием протеогликанов от гликопротеинов. По своему внешнему виду протеогликанов напоминают *бутылочный ершик*, в котором коровый белок играет роль стержня, а гликозаминогликаны служат ворсинками (рис. 22-10).

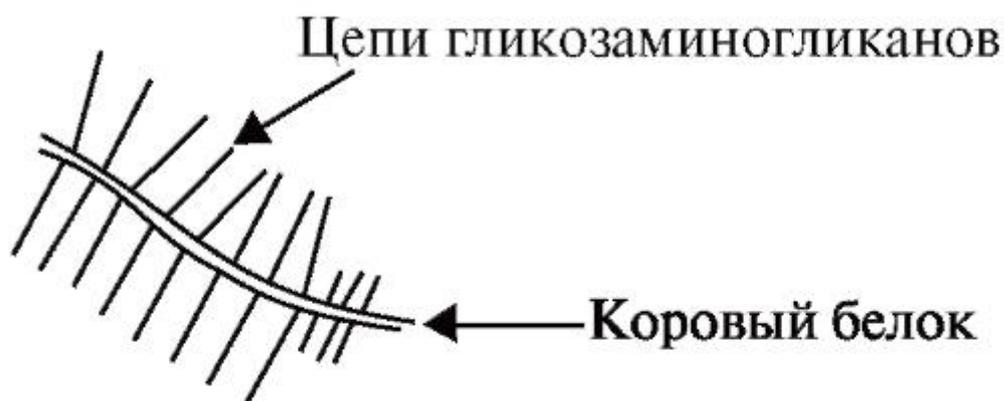


Рис. 22-10. Модель строения протеогликана

Необычное строение протеогликанов способствует их функционированию в качестве структурного каркаса, поддерживающего форму тканей, в то же время цепи гликозаминогликанов задерживают бактерии и вирусы во внеклеточной среде. Протеогликаны выполняют роль рецепторов при сборке белков межклеточного матрикса, облегчают прикрепление клеток и регулируют процессы их роста. Они способны образовывать комплексы с определенными белками, например факторами роста. Эти комплексы выступают в качестве резервуаров факторов роста, которые при высвобождении приобретают способность проявлять свою биологическую активность. В этих комплексах факторы роста надежно защищены от действия протеолитических ферментов.

Различают 4 семейства протеогликанов:

- гиалектаны;
- малые протеогликаны, богатые лейцином;
- протеогликаны базальных мембран;
- протеогликаны, встроенные в цитоплазматическую мембрану.

В зависимости от молекулярной массы выделяют большие и малые протеогликаны. *Большие протеогликаны - агрекан, версикан, нейрокан, бревикан*, содержат свыше 100 цепей гликозаминогликанов. Они способны связываться с коллагенами, гиалуроновой кислотой и образовывать протеогликановые агрегаты. *Малые протеогликаны* (богатые лейцином, ассоциированные с клетками, базальными мембранами) имеют небольшой коровий белок, к которому присоединены одна или две цепи гликозаминогликанов. Одни протеогликаны (серглицин, матриксный протеогликан хряща, декорин, версикан и др.) находятся в растворимом состоянии и локализуются в межклеточном матриксе, а другие (синдекан и др.) являются трансмембранными интегральными белками.

#### Биосинтез протеогликанов

Синтез протеогликана начинается с биосинтеза корового белка на полирибосомах. Синтезированный белок транспортируется в аппарат Гольджи, где происходит его гликозилирование. Весь процесс полисахаридной цепи можно условно разделить на 2 этапа. Рис. 22-11(а-в) отражает единый процесс синтеза протеогликана. Вначале к остатку серина через О-гликозидную связь присоединяется связующий триса-харид «ксилоза-галактоза-галактоза». Углеводы, источником которых являются их УДФ-производные, переносятся с помощью соответствующих гликозилтрансфераз (см. рис. 22-11а).

Синтез дисахаридных единиц хондроитинсульфата, входящего в состав протеогликана, происходит путем последовательного присоединения к связывающему трисахариду остатков глюкуроновой кислоты и N-ацетилгалактозамина (см. рис. 22-11б).

Окончательной реакцией синтеза цепи хондроитинсульфата является сульфатирование, т.е. присоединение сульфата к четвертому или шестому атому углерода N-ацетилгалактозамина. Он переносится на молекулу-

акцептор с помощью специфических сульфотрансфераз. Донором сульфатной группы выступает ФАФС (см. рис. 22-11в).

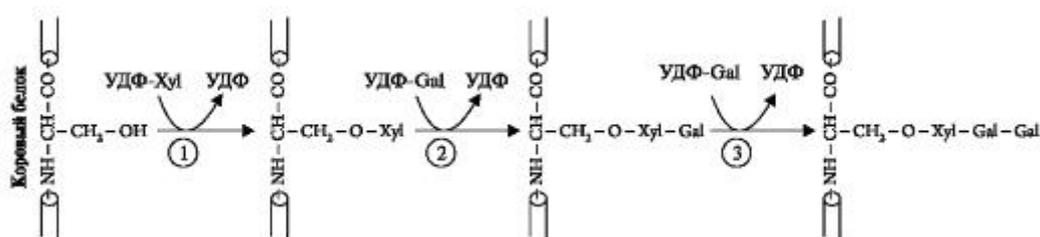


Рис. 22-11а. Синтез связывающего трисахарида на коровом белке. Ферменты: 1 - ксилозилтрансфераза; 2 - галактозилтрансфераза I; 3 - галактозилтрансфераза II; УДФ - уридиндифосфат; Xyl - ксилоза; Gal - галактоза

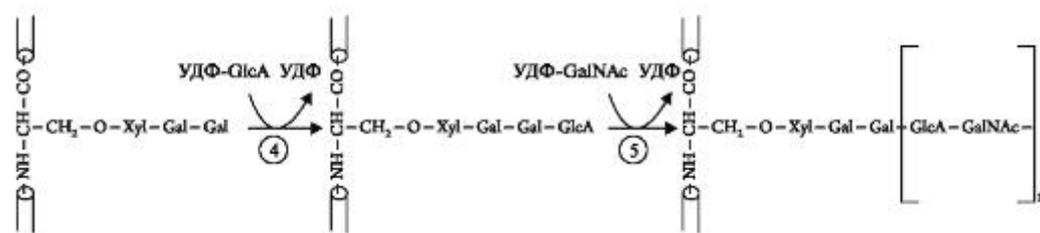


Рис. 22-11б. Синтез дисахаридных единиц гликозаминогликанов. Ферменты: 4 - глюкуронилтрансфераза; 5 - N-ацетил-галактозаминтрансфераза. УДФ - уридиндифосфат; Xyl - ксилоза; Gal - галактоза; GlcA - глюкуроновая кислота; GalNAc - N-ацетилгалактозамин

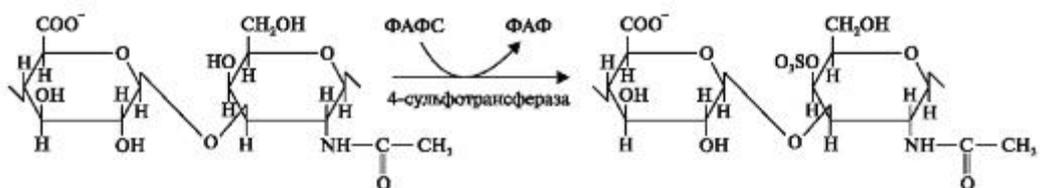


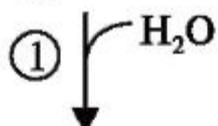
Рис. 22-11в. Реакция сульфатирования С-4 N-ацетилгалактозамина в растущей цепи гликозаминогликана

В случае синтеза дерматансульфата после завершения образования углеводных цепей происходит их модификация - эпимеризация D-глюкуроновой кислоты в L-идуруновую, катализируемой ферментом D-глюкуронил-С5-эпимеразой.

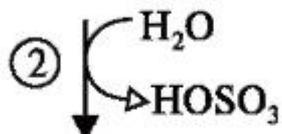
Распад протеогликанов

Распад протеогликанов - физиологический процесс регулярного обновления вне- и внутриклеточных макромолекул. В деградации протеогликанов участвуют протеиназы и гликозидазы. Процесс начинается в межклеточном матриксе. Вначале коровый и связующие белки подвергаются воздействию свободных радикалов, а затем гидролизуются ММП (ММП-1,-9,-2, стромелизином). Из внеклеточного пространства по механизму эндоцитоза гликозаминогликаны поступают в клетку, где эндоцитозные пузырьки сливаются с лизосомами (рис. 22-12). Гликозидазы гидролизуют цепи гликозаминогликанов и олигосахаридов до мономеров. В этом процессе участвуют экзо- и эндогликозидазы ( $\beta$ -глюкуронидаза,  $\beta$ -галактозидаза,  $\beta$ -идуронидаза) и сульфатазы. В итоге образуются неорганический сульфат и моносахариды.

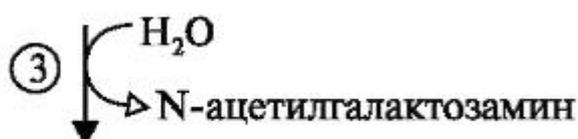
**Хондроитин-6-сульфат**



**Сульфатированные олигосахариды (тетрасахариды)**



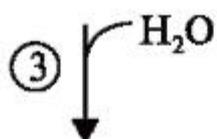
**Несульфатированные тетрасахариды**



**Несульфатированные трисахариды**



**Дисахариды**



**N-ацетилгалактозамин +  $\beta$ -D-глюкуроновая кислота**

Рис. 22-12. Распад хондроитинсульфата (схема). Ферменты: 1 - эндогликозидаза; 2 - сульфатаза; 3 -  $\beta$ -N-ацетилгалактозаминидаза; 4 -  $\beta$ -глюкуронидаза

Внеклеточный распад гликозаминогликанов характерен только для гепарансульфата, который расщепляется гепараназой, синтезируемой тромбоцитами или Т-лимфоцитами.

### ОБМЕН ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Гиалуроновая кислота (см. главу 2) может находиться в ряде органов (стекловидном теле глаза, пупочном канатике, суставной жидкости) в свободном виде, а в хрящевой ткани формирует протеогликановые агрегаты (рис. 22-13).

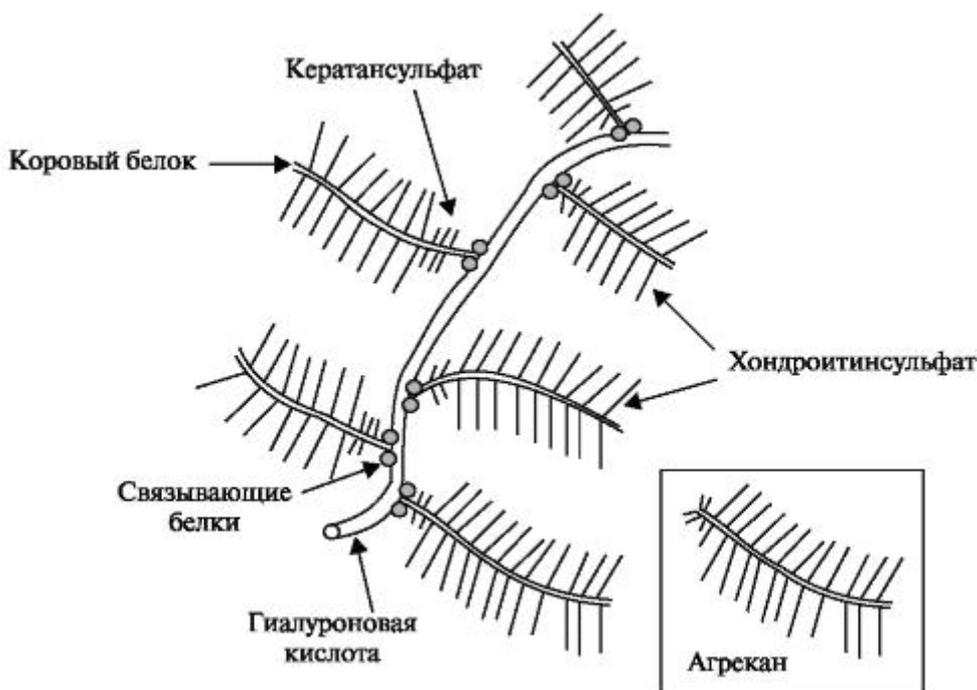


Рис. 22-13. Строение протеогликанового агрегата

В суставной жидкости гиалуроновая кислота играет роль смазочного вещества, уменьшая трение между суставными поверхностями. В процессе развития эмбриона, заполняя межклеточные пространства, она облегчает перемещение клеток. Цепи гиалуроновой кислоты способны свертываться с формированием доменной структуры. Они могут контактировать, сжиматься и проникать друг в друга, связывать воду, что и определяет высокую вязкость раствора. Гиалуроновая кислота синтезируется в большом количестве во время заживления ран.

*Синтез* гиалуроновой кислоты протекает на внутренней поверхности плазматической мембраны при участии фермента *гиалуронансинтетаза*. Сам фермент расположен в мембране и образует в ней каналы, поэтому гиалуронансинтетаза осуществляет не только поочередный перенос моносахаров от УДФ-гиалурононовой кислоты и УДФ-ацетилглюкозамина на строящуюся цепь полисахарида, но и транспорт гиалуроновой кислоты из клетки. Присоединение моносахаридного звена в реакциях синтеза сопровождается отщеплением молекулы УДФ.

В распаде гиалуроновой кислоты до олигосахаридов участвуют гиалуронидазы. Известны три группы этих ферментов. В организме человека гиалуронидаза обладает гексозаминидазной активностью и расщепляет  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) гликозидные связи между дисахаридными остатками с образованием тетра- и гексасахаридов. Дальнейший гидролиз образовавшихся олигосахаридов осуществляют  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидаза и  $\beta$ -D-глюкуронидаза.

*В записную книжку врача*

Бактериальные гликозидазы

При воспалении тканей пародонта бактериальные гиалуронидазы расщепляют гиалуроновую кислоту до дисахаридных единиц. Они также гидролизуют цепи других гликозаминогликанов. В более глубоком распаде участвуют  $\beta$ -глюкуронидазы и  $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазы. Таким образом, микроорганизмы способствуют «разжижению» межклеточного вещества, что позволяет им в дальнейшем беспрепятственно повреждать клетки.

## ГЛАВА 23. ХРЯЩЕВАЯ ТКАНЬ

Вопросы по теме

- Основные белки хрящевой ткани.
- Регуляция метаболизма хрящевой ткани.
- Заболевания, связанные с пороками развития хрящевой ткани.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

*Хрящевая ткань* - особый вид соединительной ткани. В сформированном организме она выполняет опорную функцию. В челюстно-лицевой области хрящ входит в состав ушных раковин, слуховых труб, носа, суставного диска височно-нижнечелюстных суставов, а также он обеспечивает связь между мелкими костями черепа. В зависимости от состава, метаболической активности и способности к регенерации различают три типа хрящей - гиалиновый, эластический и волокнистый.

Гиалиновый хрящ обладает более высокой метаболической активностью по сравнению с эластическим и волокнистым, содержит большое количество углеводов и липидов. Это позволяет осуществлять активный синтез белков и дифференцировку хондрогенных клеток для его обновления и регенерации. С возрастом в гиалиновом хряще происходят гипертрофия и апоптоз клеток с последующим обызвествлением внеклеточного матрикса.

Эластический хрящ имеет свои отличия. Для этого типа хряща характерно присутствие в хрящевом матриксе сети эластических волокон, малое количество липидов, углеводов и хондроитинсульфатов. Эластический хрящ из-за низкой метаболической активности не обызвествляется и практически не регенерирует.

Волокнистый хрящ по своей структуре занимает промежуточное положение между сухожилием и гиалиновым хрящем. Характерной особенностью волокнистого хряща является наличие в межклеточном матриксе большого количества коллагеновых волокон, которые расположены параллельно друг другу, а клетки находятся в виде цепочки между ними. Волокнистый хрящ, благодаря своему особому строению, может испытывать значительные механические нагрузки как при сжатии, так и растяжении.

Волокнистый хрящ не имеет надхрящницы, и питание клеток волокнистого хряща осуществляется через синовиальную жидкость. Состав синовиальной жидкости зависит от трансудации метаболитов из кровеносных сосудов синовиальной оболочки в суставную полость. Она содержит низкомолекулярные органические компоненты - мочевую кислоту, мочевины, глюкозу, натрий, калий, и неорганические вещества, которые близки в количественном соотношении к плазме крови. Однако содержание белков в синовиальной жидкости выше, чем в плазме крови. Помимо гликопротеинов

и иммуноглобулинов, синовиальная жидкость богата гликозаминогликанами, особенно гиалуроновой кислотой.

*В записную книжку врача*

Возможность пересадки хрящевой ткани

Наибольшей регенеративной способностью обладает гиалиновый хрящ. Это связано с высокой метаболической активностью хондроцитов, а также с присутствием надхрящницы - плотноволокнистой неоформленной соединительной ткани, которая окружает хрящ и содержит большое количество кровеносных сосудов. В наружном слое надхрящницы находится коллаген I типа, а внутренний слой сформирован хондрогенными клетками.

Пересадку хрящевой ткани практикуют в пластической хирургии, например, для реконструкции изуродованного контура носа. При этом аллогенная пересадка только одних хондроцитов, без окружающей их ткани, сопровождается отторжением трансплантата.

Основные компоненты межклеточного матрикса хрящевой ткани

Хрящевая ткань, подобно любой другой ткани, содержит клетки (хондробласты, хондроциты), погруженные в большой межклеточный матрикс. В процессе морфогенеза хондрогенные клетки дифференцируются в хондробласты. Последние начинают синтезировать и секретировать в хрящевой матрикс протеогликаны, а те, в свою очередь, стимулируют дифференцировку клеток.

Вместе с тем межклеточный матрикс хрящевой ткани имеет свои отличия. Присутствующие в ней белки представлены коллагенами II, VI, IX, XII, XIV типа, которые погружены в макромолекулярные агрегаты протеогликанов. Около 80-90% всех коллагеновых белков хряща приходится на долю коллагенов II типа. Остальные 15-20% коллагеновых белков - так называемые минорные коллагены IX, XII, XIV типа, которые сшивают фибриллы коллагена II типа и ковалентно связывают гликозаминогликаны. Особенностью матрикса гиалинового и эластического хряща считают присутствие коллагена VI типа.

Упругость хрящевого матрикса определяется наличием большого количества воды, которая связана с протеогликанами. При сжатии хряща вода вместе с ионами вытесняется из областей вокруг сульфатных и карбоксильных групп

протеогликана. Группы сближаются, и силы отталкивания между их отрицательными зарядами препятствуют дальнейшему сжатию ткани. После снятия нагрузки происходит электростатическое притяжение катионов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) с последующим притоком воды в межклеточный матрикс (рис. 23-1).

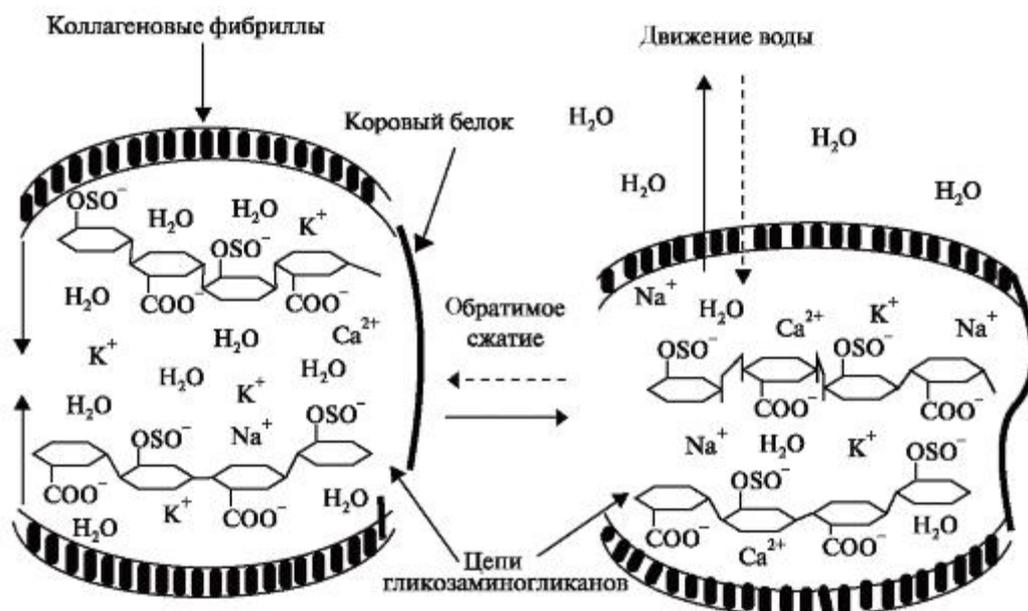


Рис. 23-1. Связывание воды протеогликанами в матриксе хряща. Вытеснение воды при его сжатии и восстановление структуры после снятия нагрузки

Содержание протеогликанов в хрящевом матриксе достигает 3-10% и основным протеогликаном хрящевой ткани является *агрекан*, который собирается в агрегаты с гиалуроновой кислотой. В хрящевом матриксе наряду с большими протеогликанами, присутствуют и малые: *декорин*, *бигликан* и *фибромодулин*. Они составляют только 1-2% от общей массы сухого вещества хряща, однако их роль очень велика. Декорин, связываясь в определенных участках с волокнами коллагена II типа, участвует в процессах фибриллогенеза, а бигликан необходим для формирования белковой матрицы хряща в процессе эмбриогенеза. С ростом эмбриона количество бигликана в хрящевой ткани уменьшается, и после рождения он исчезает совсем. Регулирует диаметр коллагена II типа протеогликан фибромодулин. Помимо коллагенов и протеогликанов, во внеклеточном матриксе хряща содержится небольшое количество неколлагеновых белков, характерных не только для хряща, но и для других тканей (табл. 23-1).

Таблица 23-1. Неколлагеновые белки хрящевой ткани

Белок	Свойства и функции
Хондрокальцин	Кальцийсвязывающий белок, содержащий 3 остатка $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты. Синтезируется гипертрофическими хондробластами и обеспечивает минерализацию хрящевого матрикса
Gla-белок	Высокомолекулярный белок из 84 аминокислотных остатков, включает 5 остатков $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты. Ингибитор минерализации хрящевой ткани
Хондроадгерин	Гликопротеин, богатый лейцином. Он связывает коллагены II типа и протеогликаны с хондроцитами
Белок хряща (CILP)	Гликопротеин, содержащий олигосахаридную цепь, связанную с белком N-гликозидной связью. Белок синтезируется хондроцитами, участвует в расщеплении протеогликановых агрегатов
Матрилин-1	Адгезивный гликопротеин, состоящий из трех полипептидных цепей. Синтезируется в процессе морфогенеза хрящевой ткани и гипертрофическими хондроцитами. В здоровой зрелой хрящевой ткани матрилин не обнаруживают. Его определяют при ревматоидном артрите, где он участвует в связывании фибриллярных волокон коллагена II типа с протеогликановыми агрегатами

К ним относятся адгезивные белки фибронектин, ламинин и интегрин. Большинство специфических неколлагеновых белков в хрящевом матриксе присутствуют только в период морфогенеза, обызвествления хрящевого матрикса или появляются при патологических состояниях. Чаще всего это кальцийсвязывающие белки, содержащие остатки  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты, а также гликопротеины, богатые лейцином.

#### Обызвествление хряща

Механизм обызвествления хряща - очень сложный процесс, который до конца еще не изучен. Физиологическому обызвествлению подвержены точки окостенения, продольные перегородки в нижней гипертрофической зоне зачатков хряща, а также прилегающий к кости слой суставного хряща. Вероятной причиной такого развития событий считают присутствие на поверхности гипертрофированных хондроцитов и щелочной фосфатазы, выделяемой из так называемых матриксных пузырьков. Появление

матриксных пузырьков является, по всей видимости, началом процесса минерализации хряща, сопровождающегося локальным накоплением фосфатных ионов. В то же время гипертрофированные хондроциты синтезируют и выделяют в матрикс хряща кальцийсвязывающий белок хондрокальцин, коллаген XI типа. В месте обызвествления хряща происходит частичная деградация протеогликанов, а увеличивающаяся концентрация фосфолипидов способствует формированию кристаллов апатитов, а те из них, которых деградация не коснулась, тормозят обызвествление. Нарушение индуктивных взаимоотношений, а также изменение (задержка или ускорение) сроков возникновения центров окостенения в составе отдельных закладок костей обуславливают формирование структурных дефектов черепа у зародышей человека.

*В записную книжку врача* Патология хрящевой ткани

Гипоксия плода, отсутствие или слабое движение зародыша способствуют нарушению образования суставных щелей или полному слиянию эпифизов противоположащих закладок костей. Это приводит к деформации отростков нижней челюсти и их сращению с височной костью (анкилозу).

#### Регуляция роста хрящевой ткани

Формирование и рост хрящевой ткани регулируется гормонами, факторами роста и цитокинами. Хондробласты являются клетками-мишенями для тироксина, тестостерона и соматотропного гормона; эти гормоны стимулируют рост хрящевой ткани, а глюкокортикоиды, в частности кортизол, тормозят пролиферацию и дифференцировку клеток.

Определенную роль в регуляции функционального состояния хрящевой ткани играют половые гормоны, которые тормозят высвобождение протеолитических ферментов, разрушающих матрикс хряща. К тому же сам хрящ синтезирует ингибиторы протеиназ, подавляющих активность последних.

#### Возрастные изменения в структуре хряща

При старении в хряще меняется качественный и количественный состав гликозаминогликанов. Так, в составе протеогликанов, синтезируемых молодыми хондроцитами, содержится большое количество хондроитин-6-сульфата. У пожилых людей, напротив, в хрящевом матриксе преобладают хондроитин-4-сульфаты. Состояние хрящевого матрикса определяется и

длиной гликозаминогликанов. Чем длиннее молекулы хондроитинсульфата в составе протеогликана, тем больше воды структурирует протеогликан. Наблюдаемое уменьшение размеров протеогликановых агрегатов происходит как за счет укорочения цепей гликозаминогликанов, так и длины корового белка. При старении в хряще меняется содержание гиалуроновой кислоты. Вследствие этого хрящевой матрикс пожилых людей становится менее упругим.

*В записную книжку врача Остеоартрит*

Изменение микроархитектоники межклеточного матрикса хряща в отдельных случаях является причиной развития остеоартрита. Болезнь развивается на фоне гипертрофии хондроцитов и нарастания массы хряща в суставных полостях. Коллаген II типа замещается коллагеном X типа, участвующим в процессах превращения хрящевой ткани в костную.

## **ГЛАВА 24. МИНЕРАЛИЗОВАННЫЕ ТКАНИ**

Вопросы по теме

- Минерализованные ткани организма.
- Виды кристаллов. Замещения в структуре кристалла.
- Основные белки межклеточного матрикса минерализованных тканей.
- Костная ткань.
- Физиологическая регенерация и ремоделирование костной ткани.
- Зубные ткани, состав и их развитие.

### **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИНЕРАЛИЗОВАННЫХ ТКАНЕЙ**

Состав минерализованных тканей

Особенностью зрелых минерализованных тканей зуба - эмали, дентина и бесклеточного цемента - является отсутствие клеток, а межклеточный матрикс состоит из большого количества минералов и меньшего числа белковых макромолекул. Все минерализованные ткани зуба и костной ткани различаются по содержанию воды, минеральных и органических соединений (табл. 24-1, 24-2).

Таблица 24-1. Процентное распределение воды, неорганических и органических веществ в минерализованных тканях

Ткань	Вещества		
	минеральные	органические	вода
Эмаль	95	1,2	3,8
Дентин	70	20	10
Цемент	65	25	10
Кость	45	30	25

В эмали, по сравнению с другими твердыми тканями, определяется наиболее высокая концентрация кальция и фосфатов. В дентине, наряду с этими ионами, имеется достаточно высокое содержание магния и натрия. Наименьшее количество кальция и фосфатов присутствует в костной ткани и цементе (табл. 24-2).

Таблица 24-2. Химический состав минерализованных тканей зуба

Ткань	Химические элементы (% сухой массы)					
	Ca <sup>2+</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>
Эмаль	32-39	16-18	0,25-0,56	0,05-0,3	0,25-0,9	0,2-0,3
Дентин	26-28	12-13	0,8-1,0	0,02-0,04	0,6-0,8	0,3-0,5
Цемент	21-24	10-12	0,4-0,7	0,15-0,2	0,6-0,8	0,03-0,08
Кость	22-24	11	0,3	0,2	0,8	0,01

#### Виды кристаллов

Большинство фосфорно-кальциевых солей кристаллизуется с образованием кристаллов разной величины и формы в зависимости от входящих элементов (табл. 24-3).

Таблица 24-3. Кристаллические образования, присутствующие в различных тканях

Фосфаты кальция	Название	Локализация
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Гидроксиапатит (гидроксилапатит)	Эмаль, дентин, кость, дентикли в пульпе зуба, камни в почках, кальцификаты мягких тканей, зубной камень
$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{H}_2\text{O})_5$	Октокальцийфосфат	Зубные и почечные камни
$\text{CaHPO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$	Брушит	Зубные камни, кальцификаты хрящей, кристаллы мочи
$\text{Ca}_9\text{Mg}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Магниевый апатит	Зубные, почечные и слюнные камни, кариес дентина, кальцификаты в суставах и мягких тканях
$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$	Кальций- пирофосфатдигидрат	Отложение в суставах при подагре
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_4(\text{CO}_3)_3(\text{OH})_2$	Карбонатный апатит	Кость, дентин, зубной камень
$(\text{CaMg})_3(\text{PO}_4)_2$	Витлокит	Зубной камень

В минерализованных тканях животного мира преобладают апатиты. Они имеют общую формулу:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$ , где X представлен анионами фтора или гидроксильной группой (-OH).

Гидроксиапатит [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] - основной кристалл минерализованных тканей. Он составляет 95-97% в эмали зуба, 70-75% в дентине и 60-70% от общего количества компонентов в костной ткани. Молярное соотношение Ca/P (кальциево-фосфатный коэффициент) в гидроксиапатите колеблется от 1,3 до 2,0 и в среднем равно 1,67.

Решетка гидроксиапатита имеет гексагональную структуру. Гидроксильные группы расположены вдоль гексагональной оси. Фосфатные группы, имеющие наибольшие размеры по сравнению с ионами кальция и гидроксилами, распределяются как равнобедренные треугольники вокруг гексагональной оси. Между кристаллами имеются микропространства, заполненные водой. Гидроксиапатиты довольно устойчивые соединения. Они имеют очень стабильную ионную решетку, в которой ионы плотно упакованы и удерживаются за счет электростатических сил.

Вместе с тем гидроксиапатиты могут обмениваться с элементами окружающей среды, сходными по размеру или физико-химическими свойствам. Такие реакции обмена ионов называют *изоморфным замещением*. В результате в составе апатитов помимо кальция и фосфатов

могут присутствовать и другие ионы. Наиболее часто встречаются следующие варианты обмена ионов (табл. 23-4).

Таблица 24-4. Замещаемые ионы и заместители в составе апатитов

Замещаемые ионы	Заместители
$\text{PO}_4^{3-}$	$\text{AsO}_3^{2-}$ , $\text{HPO}_4^{2-}$ , $\text{CO}_2$
$\text{Ca}^{2+}$	Sr, Ba, Pb, Na, $\text{H}_2\text{O}$ , K, Mg
$\text{OH}^-$	F, Cl, Br, I, $\text{H}_2\text{O}$

Обмен ионов в кристаллической решетке гидроксиапатита изменяет его ионную решетку, а следовательно, и свойства, в том числе прочность и размеры кристаллов.

В кислой среде ионы кальция способны замещаться протонами (рис. 24-1а). Это замещение несовершенно, поскольку протоны во много раз меньше катиона кальция, и такое замещение приводит к разрушению кристалла гидроксиапатита в кислой среде (рис. 24-1б).

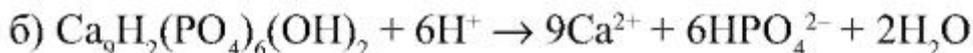
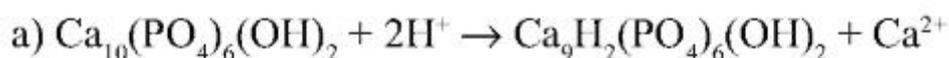
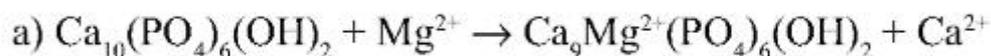


Рис. 24-1. Замещение кальция в структуре гидроксиапатита в кислой среде

*Магниевоый апатит*  $[\text{Ca}_9\text{Mg}^{2+}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  образуется при замещении ионов кальция на ионы магния (рис. 24-2а):



*Стронциевый апатит*  $[\text{Ca}_9\text{Sr}^{2+}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ . В кристаллической решетке апатитов стронций может вытеснять или заменять вакантные места для кальция, что приводит к нарушению структуры кристаллов (рис. 24-2б).

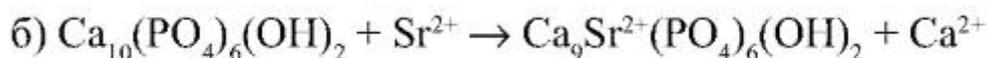


Рис. 24-2. Замещение кальция йонами магния (а) и стронция (б)

*В записную книжку врача Уровская болезнь*

В Забайкалье, вдоль берегов небольшой реки Уров, описано заболевание, получившее название «уровская болезнь». Оно сопровождается поражением костного скелета, уменьшением длины конечностей у людей и животных. Это связано с повышенным содержанием стронция в почве. Радиоактивный стронций  $^{90}\text{Sr}$ , количество которого растет при атомных взрывах, откладываясь в костной ткани, облучает костный мозг, что увеличивает риск развития злокачественных новообразований.

*Карбонатный апатит*  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_4(\text{CO}_3)_3(\text{OH})_2]$  содержит в своем составе карбонат или гидрокарбонат (рис. 24-3). Карбонатные апатиты более характерны для костной ткани, и с возрастом количество карбонатных апатитов увеличивается. В тканях зуба они образуются в непосредственной близости от эмалево-дентинной границы за счет продукции  $\text{HCO}_3^-$  одонтобластами.

Интенсивность замены зависит от количества образуемых бикарбонатов. Освобождающиеся в реакции декарбонирования молекулы  $\text{CO}_2$  взаимодействуют с молекулами  $\text{H}_2\text{O}$ : что сопровождается появлением молекул  $\text{HCO}_3^-$ , которая способна замещать фосфат-анионы по схеме.

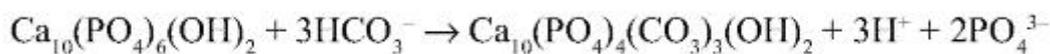


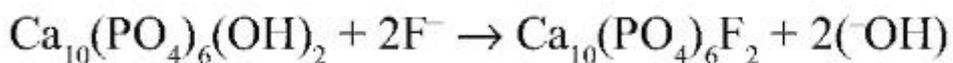
Рис. 24-3. Образование карбонатного апатита

Карбонат уменьшает кристалличность апатита и делает его более аморфным и хрупким.

*В записную книжку врача* Эрозия эмали зуба

Бесконтрольное потребление кислых и газированных напитков приводит к повреждению твердых тканей зуба. Кислые напитки (апельсиновый, лимонный, грейпфрутовый соки и др.) содержат большое количество органических кислот. При их диссоциации в ротовой полости высвобождаются протоны, которые способны замещать ионы кальция в кристаллической решетке эмали. Газированные напитки способствуют образованию карбонатных апатитов, которые неустойчивы в кислой среде. Накопление карбонатапатита свыше 3-4% общей массы гидроксиапатитов повышает кариесвосприимчивость эмали.

*Фторапатиты*  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$  - наиболее стабильные из всех апатитов. Они широко распространены в природе, прежде всего как почвенные минералы. В водной среде реакция взаимодействия фтора с фосфатами кальция зависит от концентрации ионов фтора. Если она сравнительно невысока (до 500 мг/л), образуются кристаллы фторапатита:



Фтор резко уменьшает растворимость гидроксиапатитов в кислой среде. При высоких концентрациях фтора (более 2 г/л) кристаллы не образуются:

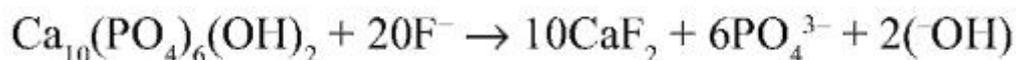


Рис. 24-4. Включение ионов фтора в структуру гидроксиапатита

#### *В записную книжку врача Флюороз зубов*

Поступление избыточного количества ионов фтора в организм беременной женщины и младенца сопровождается развитием особой формы несовершенного амелогенеза - флюороза зубов. В больших дозах фтор угнетает пролиферацию амелобластов и способен связываться с гидроксильными группами серина полипептидных цепей, что приводит к нарушению образования фосфосерина, участвующего в минерализации зубных тканей. Фтор способен связываться с активным центром сериновых протеиназ и, таким образом, ингибировать ограниченный протеолиз высокомолекулярных белков эмалевого матрикса. Поэтому для флюороза характерны более высокое содержание белка в эмали зрелого зуба и уменьшенное количество кальция, что сопровождается изменением проницаемости эмали.

Помимо кристаллов гидроксиапатитов и его аналогов в минеральной фазе костной ткани, дентине и цементе присутствуют моно-, ди-, три- и тетракальцийфосфаты, а также гидрокарбонат кальция  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ , карбонат магния  $\text{MgCO}_3$ , кислые фосфаты -  $\text{CaHPO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , октакальций фосфат  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ . Предполагается, что они могут быть источником кальция и фосфата, которые участвуют в формировании кристаллов гидроксиапатита. Характеристика основных белков минерализованных тканей

На стадии развития минерализованных тканей белки выполняют роль центров кристаллизации. Они составляют основу для прикрепления минералов и регулируют процессы минерализации. Особенностью структуры всех белков минерализованных тканей считают наличие остатков *фосфосерина, глутамата и аспартата*. Именно они способны связывать ионы кальция и, таким образом, участвовать в образовании кристаллов апатита на начальном этапе. Второй особенностью - присутствие *углеводов* и последовательности аминокислотных остатков Арг-Гли-Асп в первичной структуре белков, что обеспечивает их связывание с клетками или белками, формирующими межклеточный матрикс.

Коллагеновые белки, белки адгезии, кальцийсвязывающие белки, факторы роста встречаются в межклеточном матриксе большинства минерализованных тканей. Другие белки присущи только конкретному типу ткани, например амелогенины и энамелины для эмали зуба.

Эти различия и сходства в белковом составе минерализованных тканей обусловлены особенностями эмбриогенеза.

Межклеточный матрикс невозможно представить без гликопротеинов, содержащих в своем составе отрицательно заряженные аминокислотные остатки. Это белки остеонектин, костный сиалопротеин, костный кислый гликопротеин-75. За счет своих углеводных компонентов они связывают структуры межклеточного матрикса, а также выступают в виде центров минерализации.

Помимо гликопротеинов в минерализованных тканях присутствует большая группа Са-связывающих белков, содержащих остатки  $\gamma$ -карбоксихлутаминовой кислоты (Gla-белки). К ним относятся остеокальцин, матриксный Gla-белок и протеин S. Все эти белки отличаются как по аминокислотному составу, так и по количеству остатков  $\gamma$ -карбоксихлутаминовой кислоты. Так, количество остатков  $\gamma$ -карбоксихлутаминовой кислоты в остеокальцине колеблется от 2 до 3, в матриксном Gla-белке до 5, а в протеине S всего один остаток. Образование  $\gamma$ -карбоксихлутамата происходит в процессе посттрансляционной модификации и требует присутствия в качестве кофактора витамина K (см. главу 5).

Помимо вышеуказанных белков в минерализованных тканях могут встречаться низкомолекулярные протеогликаны - декорин и бигликан.

#### Формирование минерализованного матрикса

Развитие минерализованных тканей связано с образованием органического матрикса и последующей его минерализацией. Важную роль в формировании тканевых структур отводят секреторным клеткам, которые формируются под влиянием факторов роста, а также минеральным ионам, поступающим в зону минерализации.

Различают два вида минерализации: непрямую кристаллизацию (гомогенная нуклеация) и прямую кристаллизацию (гетерогенная нуклеация). *Непрямая кристаллизация* типична для гипертрофированных хондроцитов. Она основана на способности этих клеток выделять в межклеточный матрикс так называемые матриксные везикулы, которые осуществляют транспорт аморфного фосфата кальция в зону минерализации. Данный вид минерализации в большинстве случаев характерен для патологических состояний.

В физиологических условиях минерализация происходит по механизму *гетерогенной нуклеации*. В этом случае зарождение кристаллов апатитов происходит в центре минерализации на белковом матриксе. Все минерализованные ткани проходят три стадии своего развития: секреторную, созревания и зрелости.

*Секреторная стадия* включает:

- синтез белков и их экзоцитоз;
- формирование межклеточного матрикса из гликопротеинов и протеогликанов;
- постепенную деградацию высокомолекулярных белков матрикса до низкомолекулярных;
- открытие центров минерализации на белковых молекулах;
- формирование первичных кристаллов;
- рост и упорядоченное размещение кристаллов.

*В стадии созревания* происходит:

- освобождение межклеточного матрикса от органических соединений в реакциях протеолиза;
- завершение роста кристаллов;
- длительное насыщение кристаллов минеральными ионами.

*Стадия зрелости* заканчивается:

- формированием минерализованного матрикса;
- апоптозом клеток.

## КОСТНАЯ ТКАНЬ

### Белки костной ткани

Основным белком межклеточного матрикса костной ткани является коллаген I типа. Наряду с коллагеном I типа в костной ткани в следовых количествах присутствуют коллагеновые белки V, XI, XII типов. Коллаген V типа обычно обнаруживают в сосудах, которые пронизывают кость. Коллаген XI типа находится в хрящевой ткани и может соответствовать остаткам кальцифицированного хряща. Особенностью *костного коллагена* I типа является наличие в его структуре производных моносахаридов, меньшее количество поперечных связей, сформированных из остатков аллизина. Считают, что N-концевой пропептид коллагена I типа костной ткани фосфорилирован, и поэтому данный пептид частично сохраняется в минерализованном матриксе.

В костной ткани из общего количества неколлагеновых белков 10% приходится на долю протеогликанов. Вначале синтезируется большой хондроитинсодержащий протеогликан, который по мере созревания костной ткани расщепляется и замещается двумя малыми протеогликанами: *декорином* и *бигликаном*. Оба белка продуцируются остеобластами, но когда эти клетки превращаются в остециты, они синтезируют только бигликан.

Первым секретруется бигликан, содержащий дерматансульфат. Он оказывает влияние на процессы клеточной пролиферации. Далее в фазу минерализации появляются бигликаны, у которых гликозаминогликаны представлены хондроитинсульфатом. Другой малый протеогликан декорин

синтезируется позднее, он «отшлифовывает» молекулы коллагена и регулирует диаметр фибрилл.

В костной ткани присутствует гиалуроновая кислота, играющая важную роль в морфогенезе этой ткани.

Также определяется большое количество кальцийсвязывающих белков, участвующих непосредственно в минерализации. Это остеоонектин, остеопонтин, костный кислый гликопротеин-75, костный сиалопротеин, матриксный Gla-белок, остеокальцин, протеин S, ферменты гликолиза и щелочная фосфатаза. Активность кислой фосфатазы и протеиназы в костной ткани крайне низка.

*В записную книжку врача* Изменение костной массы

В норме кость достигает пика костной массы до 20-летнего возраста. В этот период прирост костной массы в год составляет до 8%. Далее до 30-35-летнего возраста идет период более или менее устойчивого состояния. Затем начинается естественное постепенное снижение костной массы, составляющее в год обычно не более 0,3-0,5%. После наступления менопаузы у женщин отмечают максимальную скорость потери костной ткани, которая достигает 2-5% в год и продолжается в таком темпе до возраста 60-70 лет. В итоге женщины теряют от 30 до 50% костной ткани. У мужчин эти потери обычно составляют от 15 до 30%.

Ремоделирование костной ткани

В процессе своей жизнедеятельности кость постоянно обновляется. При этом в ней происходят два противоположно направленных процесса - резорбция и восстановление. Соотношение этих процессов называют *ремоделированием* костной ткани.

Резорбция костной ткани

В участке костной ткани, подлежащему резорбции под влиянием гормона паращитовидных желез, активной формы витамина D - кальцитриола, интерлейкинов-1 и-би других факторов, костные клетки начинают синтезировать белок-лиганд к рецептору активатора ядерного фактора транскрипции каппа-B (от англ. *RANKL-Receptor Activator of Nuclear Kappa-B ligand*). Он до определенного времени остается связанным с поверхностью секретирующих его клеток.

В свою очередь, преостеокласты выставляют рецепторы RANK (*RANK-Receptor Activator of Nuclear Kappa-B*) к RANKL. После связывания RANKL с рецепторами на поверхности преостеокластов происходит образование остеокласта (рис. 24-5).

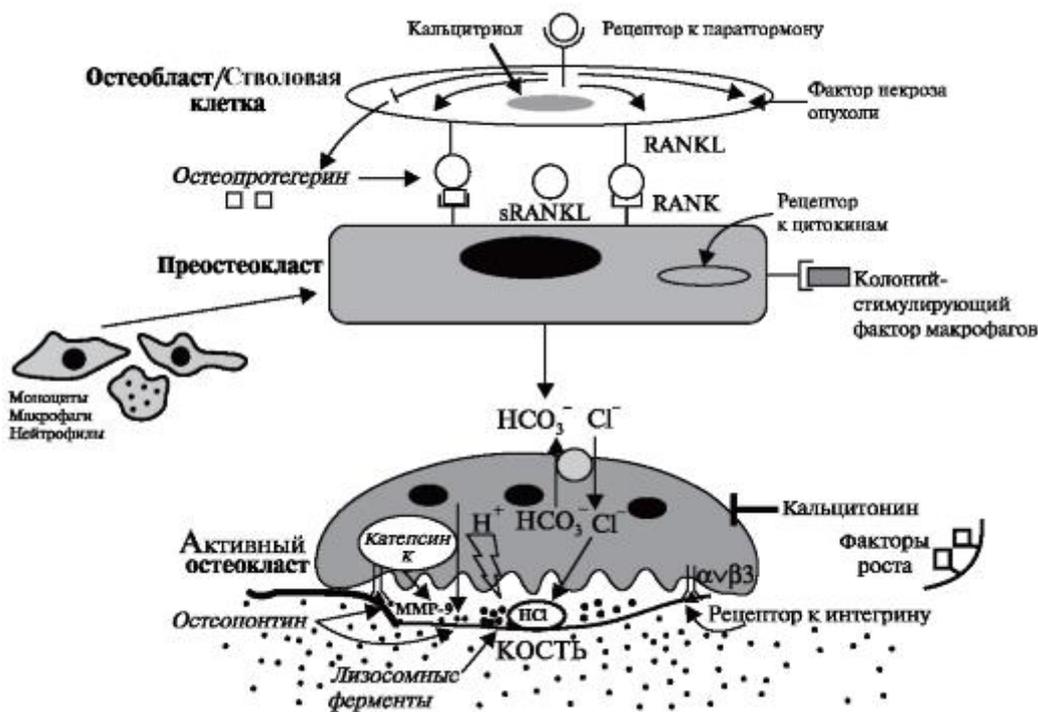


Рис. 24-5. Образование активного остеокласта и его участие в резорбции костной ткани

На стадии образования остеокластов из предшественников процесс может блокироваться белком остеопротегерином, который, свободно перемещаясь, способен связывать RANKL и, таким образом, предотвращать взаимодействие RANKL с рецепторами.

Образовавшийся активный остеокласт создает на своей поверхности «гофрированный» край мембраны. Через него высвобождаются лизосомные ферменты: катепсины К, D, В, кислая фосфатаза, эстераза и гликозидазы. Активный катепсин К, в свою очередь, активирует ММП-9, которая участвует в деградации коллагена и протеогликанов межклеточного матрикса. В этот период в остеокластах растет активность карбоангидразы. Ионы  $\text{HCO}_3^-$  обмениваются на ионы хлора. Они накапливаются в гофрированном крае и туда же переносятся протоны. Секретия протонов осуществляется за счет очень активной в остеокластах  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы. В

свою очередь, снижение рН и активация лизосомных ферментов способствуют разрушению минерального компонента.

Участок гофрированного края окружает так называемая *чистая зона*. Она как бы герметизирует область действия гидролитических ферментов и свободна от органелл. Именно поэтому костная резорбция происходит только под гофрированным краем, в замкнутом пространстве.

Зрелые остеокласты начинают активно поглощать кость, а завершают разрушение органической матрицы межклеточного вещества кости макрофаги. Сам процесс длится около 2 нед. Затем остеокласты, в соответствии с генетической программой, умирают. Апоптоз остеокластов может задерживаться при недостатке эстрогенов. На последнем этапе в зону разрушения поступают плюрипотентные стволовые клетки, которые дифференцируются в остеобласты. В дальнейшем остеобласты синтезируют и минерализуют матрикс в соответствии с новыми условиями статической и динамической нагрузки на кость.

*В записную книжку врача*

Роль белка остеопротегерина

Недифференцированные стромальные клетки костного мозга в большей степени синтезируют RANKL и в меньшей остеопротегерин. Характер ремоделирования костной ткани во многом определяется балансом между продукцией RANKL и остеопротегерина. Сдвиг в сторону синтеза RANKL наблюдается при постменопаузальном остеопорозе, болезни Педжета, при опухолевых метастазах, ревматоидном артрите и пародонтите.

Образование костной ткани

Большинство костей скелета, в том числе и челюстные кости, развиваются по типу прямого остеогенеза. Прямой остеогенез протекает при участии остеобластов, которые образуются из клеток-предшественников.

Дифференцировку преостеобластов в остеобласты стимулируют  $\beta$ -трансформирующий, инсулиноподобный факторы роста, а также факторы роста фибробластов, тромбоцитов и колониестимулирующий, морфогенетический белок кости.

Образовавшиеся остеобласты начинают активно поглощать кислород, активируются окислительно-восстановительные процессы, синтезируется

большое количество АТФ. Одновременно в митохондриях накапливаются ионы кальция и фосфатов. Из аминокислот синтезируются коллагеновые и неколлагеновые белки.

Все синтезированные органические вещества - специфические костные белки, ферменты - щелочная фосфатаза, пирофосфатаза, аденозинтрифосфатаза, аденозинмонофосфатаза и неорганические ионы в составе мембранных везикул секретируются из клетки для построения межклеточного материала. Межклеточное вещество начинает наполняться ионами кальция, фосфатом, который освобождается из пирофосфата при участии пирофосфатазы, а из органических соединений - под действием щелочной и других фосфогидролаз. Ионы кальция соединяются с фосфатом, и образуется аморфный фосфат кальция.

Будучи положительно заряженными, ионы кальция связываются с отрицательно заряженными органическими молекулами (рис. 24-6).

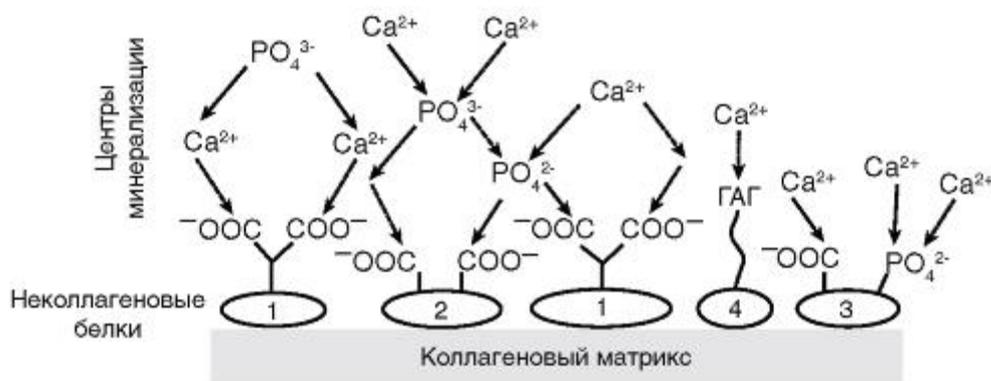


Рис. 24-6 Связывание неорганических ионов белками межклеточного матрикса костной ткани (схема): 1 - матриксные Gla-белки; 2 - белки, содержащие в своем составе аспарагиновую и глутаминовую кислоты, фосфосерин; 3 - остеоонектин; 4 - протеогликан

Таковыми молекулами являются гликозаминогликаны, освобождаемые при гидролизе высокомолекулярных протеогликанов, глицерофосфолипиды из разрушенных матриксных пузырьков, в составе которых выводились в матрикс из клетки макроэрги, белки и ферменты. Образовавшееся небольшое количество пар и триплетов из ионов кальция и фосфатов связывается с коллагеновыми и неколлагеновыми белками. Так, остеоонектин, матриксные Gla-белки и другие гликопротеины связывают оба иона, а коллаген способен присоединять только фосфат к аминогруппе аминокислотного остатка - лизина через образование фосфоамидной связи.

Вначале возникают спиралевидные структуры, рост которых идет по обычному принципу добавления новых ионов. Шаг такой спирали равен высоте одной структурной единицы кристалла. Формирование одного кристалла приводит к возникновению других кристаллов. Этот процесс называют *эпитаксисом*, или *эпитаксической нуклеацией*.

Следует отметить, что в минерализованном матриксе костной ткани депонируются, помимо кальция и фосфатов, и другие неорганические ионы.

Через несколько месяцев, после того как полость резорбции восполнится новообразованной костной тканью, плотность новой кости увеличивается. Часть остеобластов начинает превращаться в контурные клетки, которые участвуют в непрерывном выведении кальция из кости. Другая часть остеобластов превращается в остециты. Они остаются в кости и связаны друг с другом длинными клеточными отростками.

Обеспечение энергией остецитов в основном осуществляется за счет гликогенолиза. И если в остеобластах глюкоза утилизируется в реакциях гликолиза на 60%, то в остеocyтах на 85% и более. Именно за счет реакций субстратного фосфорилирования в гликолизе поддерживается постоянство органического и минерального состава костной ткани.

*В записную книжку врача*

Роль цитрата в минерализации

В процессах минерализации костной ткани активное участие принимает цитрат, которого в этот период в 200 раз больше, чем в гепатоцитах.

Молекулы цитрата могут связать до 3 ионов кальция.

## ЗУБНЫЕ ТКАНИ

Основу зуба составляет твердая обызвествленная ткань - дентин. Снаружи дентин в различных отделах покрыт двумя видами других твердых минерализованных тканей: эмалью и цементом. Внутренняя часть под дентином заполнена пульпой. Прикрепление зуба к костной лунке обеспечивает поддерживающий аппарат, состоящий из цемента, периодонтальных волокон, костной стенки зубной альвеолы и десны.

Большинство тканей зуба (дентин, клеточный цемент, волокна периодонта, пульпа), а также костная ткань альвеолы имеют *мезодермальное*

*происхождение.* Эмаль и бесклеточный цемент образуются из клеток *эктодермы*.

Процесс формирования эмали и дентина сходен, но отличается по спектру белков, синтезируемых одонтобластами и энамелобластами. Морфогенез клеток, участвующих в формировании дентина и эмали, происходит одновременно. Вначале клетки образуют разделительный каркас, состоящий из больших протеогликанов. По мере формирования белкового матрикса дентина и эмали большие протеогликаны исчезают, и их фрагменты выявляются в составе зрелого дентина.

По окончании морфогенеза твердые ткани зуба на протяжении всей жизни не обновляются. Постоянство их внутренней среды поддерживается за счет пульпы зуба, клеточного цемента, периодонтальных волокон и компонентов слюны.

## РАЗВИТИЕ ЗУБНЫХ ТКАНЕЙ

Дентиногенез (образование дентина зуба)

В образовании дентина участвуют секреторно-активные одонто-бласты. Для них характерно присутствие большого шероховатого ЭПР, хорошо развитого аппарата Гольджи, митохондрий и специальных секреторных гранул. Такая структура одонтобластов позволяет осуществлять активный синтез и транспорт белков и ионов во внеклеточный матрикс.

Первоначально синтезируются коллагеновые белки I, III, IV, V и VI типа, а также протеогликаны, гликопротеины, кальцийсвязывающие белки. Они формируют межклеточный матрикс дентина (предентин), который в последующем подвергается минерализации. Основным белком дентина - *коллаген I типа*. Протеогликаны, присутствующие в дентине, содержат хондроитин-4-сульфат и хондроитин-6-сульфат.

Внутреннюю поверхность дентинных трубочек покрывает гиалуроновая кислота, которая формирует защитную пленку от проникновения микроорганизмов и регулирует поток воды и ионов.

Особое место среди неколлагеновых белков дентина занимают кислые фосфопротеины, богатые аспарагиновой кислотой и фосфосерином. Вначале синтезируется высокомолекулярный фосфосиалопротеин, который затем гидролизуется с освобождением двух молекул

- *дентинсиалопротеина и дентинфосфопротеина*. В дентине значительно меньше белков, содержащих  $\gamma$ -карбоксиглутаминовую кислоту. В нем также присутствуют костный сиалопротеин, матриксный белок дентина-1, остеопонтин, дентинфосфопротеин и дентинсиалопротеин, морфогенетический белок кости. Считают, что эти белки контролируют участки и скорость минерализации первичного и вторичного дентина. Остеонектин появляется в матриксе дентина только в период его развития, а остеопонтин и остеокальцин присутствуют в дентине сформированного зуба. Имеется определенное сходство между костной тканью и дентином, поскольку часть белков - костный сиалопротеин, остеопонтин, остеокальцин, синтезируются как одонтобластами, так и остеобластами. Однако наряду с коллагенами и неспецифическими неколлагеновыми белками присутствуют белки, характерные только для дентина. Эти белки не только формируют трехмерную матрицу, но и участвуют в процессах минерализации дентина. К ним относят:

- *Матриксный белок дентина-1*, который содержит две молекулы N-ацетилнейраминовой кислоты, одну протеогликановую цепь, восемь остатков связанной фосфорной кислоты и двадцать молекул сульфата. Нарушение синтеза этого белка сопровождается дефектами формирования кристаллической основы дентина.
- *Дентинсиалопротеин*. Данный белок составляет 5-8% от всех белков дентина. Он содержит в своем составе 30% углеводов и 10% сиаловых кислот. По своей структуре белок сходен с костным сиалопротеином и остеопонтином.
- *Дентинфосфопротеин (фосфофорин)*. Особенностью этого белка является способность взаимодействовать с фрагментами молекулы коллагена, а благодаря наличию в его первичной структуре остатков аспарагиновой кислоты и фосфосерина он связывает ионы кальция. На долю этого белка приходится до 50% всех неколлагеновых белков дентина. Поскольку дентинфосфопротеин имеет большое сродство к ионам кальция, считается, что он действует как нуклеатор в образовании первичных кристаллов гидроксиапатита и влияет на формирование кристаллов в процессе их роста. В дентине скорость обмена минеральных компонентов в 6-7 раз ниже, чем в скелетных тканях. Наиболее интенсивно фосфат и кальций в

сформированном зубе откладываются в зоне преддентина на протяжении всего срока его функционирования.

*В записную книжку врача*

Факторы, регулирующие развитие одонтобластов

На пролиферацию и дифференцировку одонтобластов влияют фактор роста фибробластов, инсулиноподобный фактор роста-1,  $\beta$ -ТФР, морфогенетический белок кости-2 и -4, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ . При подавлении синтеза  $\beta$ -ТФР снижается синтез фосфосиалопротеинов и наблюдается гипоминерализация дентина.

Амелогенез (образование эмали зуба)

В образовании эмали зуба участвуют энамелобласты. На первых порах в цистернах гранулярной эндоплазматической сети секреторно-активных энамелобластов синтезируются преимущественно амелогенины, и их количество достигает 90%. Остальные 10% представлены неамелогениновыми белками - энамелинами и кальцийсвязывающими белками. Всего в созревающей эмали присутствует около 34 различных белков, а также пептиды, липиды и моносахариды. Синтезированные белки в клетках при участии протеинкиназ и гликозилтрансфераз подвергаются фосфорилированию и гликозилированию.

Особенностью *амелогенинов* является наличие большого количества остатков пролина, лейцина, гистидина, глутаминовой кислоты и отсутствие остатков гидроксипролина и цистеина, характерных для коллагеновых и кератиновых белков. Амелогенины - это гетерогенная белковая фракция с молекулярной массой от 19 до 28 кДа. По мере созревания эмали высокомолекулярные амелогенины расщепляются и увеличивается доля низкомолекулярных белков. Синтезированные молекулы амелогенина агрегируют между собой и собираются в цитоплазме энамелобластов без участия АТФ вначале в олигомеры, а затем в наносферы. Роль амелогенинов заключается в организации кристаллов удлинённой формы и определённой ширины.

Неамелогениновые белки

представлены *энамелинами* и *амелобластинами*. Энамелины - кислые белки, богатые аспарагиновой и глутаминовой кислотами, пролином и глицином.

Они сильно гликозилированы и содержат до 8% аминсахаров. Первым синтезируется белок-предшественник с молекулярной массой 130 кДа. В процессе протеолиза на разных стадиях развития эмали появляются его изоформы с меньшей молекулярной массой. Так, из энамелина с молекулярной массой 89 кДа освобождается энамелин с молекулярной массой 32 кДа, называемый *амелопротеиназой*. Наличие другого белка

амелобластина характерно только для секреторной стадии, и по мере созревания эмали в результате деградации этот белок исчезает.

Все синтезированные энамелобластами белки упаковываются в везикулы и перемещаются в составе секреторных гранул к апикальной поверхности клеток. Внутреннюю поверхность секреторных гранул выстилает тафтелин-интерактивный белок (*tuftelin-interacting protein*, ТИР-39). Он способен к образованию доменов, в которых присутствуют надвторичные структуры типа спираль-петля-спираль. Содержимое секреторных гранул высвобождается и распределяется по верху новообразованного слоя дентина. Белок ТИР-39 обеспечивает взаимосвязь между белками межклеточного матрикса эмали и дентина.

В межклеточном матриксе белки подвергаются дальнейшему расщеплению протеолитическими ферментами - энамелизинами (ММП-20), калликреином и матриксными сериновыми протеиназами. Высвобождаемые низкомолекулярные белки способны присоединять ионы кальция и выступают в качестве нуклеаторов.

Вначале формируются длинные и тонкие *кристаллиты*, которые встраиваются в органический матрикс параллельно друг другу. В более позднем периоде кристаллы утолщаются и превращаются в плоские шестиугольные призмы. Такое упорядоченное построение и форма кристаллов эмали отличаются от бесформенных пластинчатых призм кристаллов кости и дентина.

Образованная первичная эмаль состоит из большого органического матрикса и в меньшей степени из минеральных солей. В дальнейшей минерализации участвуют *энамелобласты стадии созревания*, которые содержат большое количество кальцийсвязывающих белков. Через энамелобласты к созревающей эмали переносятся неорганические ионы и удаляются органические вещества и вода. В этот период количество белков уменьшается в 100-200 раз. На фоне распада амелогенинов задерживается деградация энамелинов, которые прочно связаны с кристаллами гидроксиапатитов. *Окончательная минерализация эмали* происходит уже после прорезывания зуба и особенно интенсивно в течение первого года нахождения коронки зуба в полости рта. Часть неорганических веществ поступает со стороны дентина, но основное их количество поставляется слюной.

В связи с этим, для полноценной третичной минерализации прорезавшегося зуба очень важны минеральный состав и pH слюны.

*В записную книжку врача*

Несовершенный амелогенез

У человека встречаются генетически обусловленный несовершенный амелогенез (*amelogenesis imperfecta*), связанный с дефектом гена *AMELX* в хромосомах энамелобластов. При приеме беременными и младенцами антибиотиков тетрациклинового ряда у детей возникает множественная гипоплазия эмали (тетрациклиновые зубы), обусловленная нарушением синтеза амелогенинов и роста кристаллов на органическом матриксе.

При метаболических нарушениях, развивающихся в случае гипоксии плода, не образуется достаточного количества АТФ. Это сказывается на фосфорилировании амелогениновых и неамелогениновых белков, а впоследствии - на связывании ионов кальция с белковым матриксом эмали.

Цементогенез (образование цемента зуба)

В формировании другой минерализованной ткани зуба - цемента - участвуют цементоциты и цементобласты, которые формируют органический матрикс из коллагенов I, II, III, V, XII, XIV типов. Основным структурным белком цемента - это коллаген I типа. Другие коллагены цемента (II, XII, XIV типа) влияют только на толщину и ориентацию коллагеновых фибрилл.

Основу неколлагенового матрикса цемента составляют два больших гликопротеина - *костный сиалопротеин* и *остеопонтин*. В цементе также присутствуют гликопротеины - фибронектин и тенасцин. Они обеспечивают связывание периодонтальных волокон с цементом зуба. В цементе обнаружен *специфический цементосвязывающий белок*, который способствует адгезии и перемещению мезенхимальных клеток. Помимо этих белков, цементобласты синтезируют такие белки, как остеонектин, остеокальцин, ламинин и ундулин. *Ундулин* относят к специфическим неколлагеновым фибриллярным белкам межклеточного матрикса цемента и периодонтальных связок. Различные домены в его структуре обеспечивают связывание этого белка с интерстициальными коллагенами и коллагеном I типа.

## ГЛАВА 25. БИОХИМИЯ КРОВИ

Вопросы по теме

- Транспорт газов эритроцитами.
- Метаболические процессы в клетках крови.
- Основные белковые фракции плазмы крови.
- Ферменты плазмы крови.
- Небелковые органические компоненты плазмы крови.
- Неорганические вещества плазмы крови.

### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ КРОВИ

Кровь - особый вид соединительной ткани, которая состоит из клеточных (форменных) элементов и межклеточной жидкой среды (плазмы). Кровь, циркулирующая в сосудах, выполняет следующие функции:

- транспортную - перенос питательных веществ, метаболитов, растворенных в воде, кислорода и углекислого газа, а также гормонов из одного участка тела в другой;
- поддержание кислотно-основного равновесия (рН 7,36-7,45) буферными системами (белковой, гемоглобиновой, фосфатной, бикарбонатной);
- создание осмотического давления за счет белков плазмы и ионов натрия;
- обезвреживающую - связывание токсичных соединений (билирубина, ионов тяжелых металлов и др.) белками, в первую очередь альбумином;
- защитную - обеспечивается белыми клетками крови, системой комплемента, иммуноглобулинами;
- гемостатическую - определяется соотношением свертывающей и противосвертывающей систем;
- регуляция температуры тела путем перераспределения тепла в процессе прохождения крови от одного органа или ткани к другим.

Количество циркулирующей крови в организме взрослого человека составляет 5-6 л. На жидкую часть крови приходится в среднем 55% общего объема, остальное - форменные элементы, развивающиеся из стволовых клеток костного мозга. Среди форменных элементов крови преобладают эритроциты, количество которых у женщин достигает 4,5- 5,0 млн, а у мужчин - до 5,9 млн.

## КЛЕТОЧНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ КРОВИ

### Эритроциты

Каждую минуту в организме взрослого человека в костном мозге плоских костей из стволовых кроветворных клеток образуется 160 млн эритроцитов. Образование эритроцитов стимулируют ИЛ-3, синтезируемый Т-лимфоцитами и клетками костного мозга, и белок *эритропоэтин*, вырабатываемый в мозговом слое почек. Скорость образования эритропоэтина зависит от парциального давления кислорода. При кислородной недостаточности количество эритроцитов увеличивается. При хронической почечной недостаточности образование эритропоэтина, а следовательно, и эритроцитов снижается, что сопровождается развитием анемии.

На ранних стадиях своего развития эритроциты (эритробласты) содержат ядро, позднее оно исчезает, и образуется незрелая красная клетка - ретикулоцит, она поступает в кровоток. Зрелый эритроцит представляет собой сплюснутый двояковогнутый диск, не содержащий ядра и митохондрий. Общая поверхность эритроцитов достигает 300 м<sup>2</sup>, что в 200 раз превышает поверхность тела. Форма двояковогнутого диска обеспечивает прохождение эритроцита по мелким капиллярам, а большая площадь облегчает газообмен между внеклеточной средой и клеткой. В процессе дифференцировки эритробластов и созревания ретикулоцитов идет активный синтез белков, которые сохраняются на протяжении всей жизни зрелого эритроцита.

### Белки эритроцитов

Мембранные белки. В эритроцитах присутствует трансмембранный белок *гликофорин*. К внеклеточной части этого белка присоединено порядка

20 олигосахаридных цепочек, часть из которых - *антигенные детерминанты групп крови*. В мембране эритроцитов также содержатся:

- белок аквапорин, формирующий поры для транспорта воды (см. главу 8);
- белок полосы 3 (получивший название по электрической подвижности), или канал транспорта анионов  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ;
- $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза, с помощью которой из клетки удаляется  $\text{Na}^+$  в обмен на ионы  $\text{K}^+$ , создавая тем самым постоянство трансмембранного градиента этих ионов (см. главу 8);
- $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза, удаляющая ионы  $\text{Ca}^{2+}$  из клетки. Поэтому цитоплазма эритроцитов практически не содержит этого катиона.

Белки цитоскелета. Присутствие белков цитоскелета в эритроцитах *спектрина* и *анкирина* налагает заметные ограничения на латеральную диффузию интегральных белков в бислое мембранных липидов.

Белки цитоплазмы. Основной белок эритроцитов - *гемоглобин*. Различают несколько видов гемоглобина. *Эмбриональный (примитивный) гемоглобин* (HbF) возникает на самых ранних стадиях развития эмбриона. Он состоит из четырех  $\epsilon$ -цепей, затем две  $\epsilon$ -цепи замещаются двумя  $\alpha$ -цепями, и образуется более зрелый тип ( $2\alpha 2\epsilon$ ), а в возрасте 3 мес у эмбриона HbF заменяется фетальным гемоглобином HbF, состоящим из двух  $\alpha$ - и двух  $\gamma$ -цепей ( $2\alpha 2\gamma$ ). HbF обладает большим сродством к кислороду, что позволяет ему извлекать кислород из организма матери. На поздних этапах эмбриогенеза также начинает синтезироваться Hb взрослых (*adult*) - HbA, который состоит из двух  $\alpha$ - и двух  $\beta$ -цепей. После рождения в течение 4 мес происходит полная смена HbF на HbA. Основным Hb взрослого человека является HbA<sub>1</sub> (97-98%). *Минорный гемоглобин* - HbA<sub>2</sub> (2 $\alpha$ - и 2 $\beta$ -цепи) составляет 2-3% общего гемоглобина. *Аномальные гемоглобины* образуются в результате точечных мутаций в одном из генов, кодирующих синтез  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -цепей.

#### Транспорт газов эритроцитами

Транспорт кислорода. Благодаря гемоглобину 1 л крови может связывать около 210 мл кислорода. Связывание  $\text{O}_2$  гемоглобином происходит за счет кооперативного функционирования его субъединиц (см. также главу 1). В результате присоединения  $\text{O}_2$  к гемоглобину эритроцитов в легочных

капиллярах образуется *оксигемоглобин* (R-форма). Отдавая молекулы кислорода, оксигемоглобин превращается в *дезоксигемоглобин* (T-форма). Высвобождение  $O_2$  тканям напрямую зависит от аллостерического регулятора 2,3-бисфосфоглицерата в аллостерическом центре молекулы дезоксигемоглобина, при этом сродство гемоглобина к  $O_2$  резко снижается. При переходе в R-форму 2,3-бисфосфоглицерат покидает аллостерический центр.

Транспорт  $CO_2$ . У взрослого человека при распаде мономеров в тканях образуется до 500 л/сут  $CO_2$ , который поступает в кровь. При прохождении крови по капиллярам легких происходит диффузия растворенного  $CO_2$  из крови через стенки капилляров в просвет легочных альвеол. Только 5-10%  $CO_2$  переносится в физически растворенном виде. Попадая в цитоплазму эритроцита  $CO_2$  может присоединяться к аминогруппам гемоглобина с образованием *карбгемоглобина* или вступать в реакцию с водой.

Эту реакцию ускоряет  $Zn^{2+}$  - содержащий фермент карбоангидраза. Образовавшаяся угольная кислота ( $H_2CO_3$ ) диссоциирует на протон и бикарбонатион. Избыток  $HCO_3^-$  диффундирует по  $HCO_3^-/Cl^-$ -каналу эритроцита (см. главу 8) в плазму крови. Протоны, в свою очередь, связываются с оксигемоглобином и облегчают диссоциацию  $HbO_2$  с высвобождением  $O_2$  (рис. 25-1).

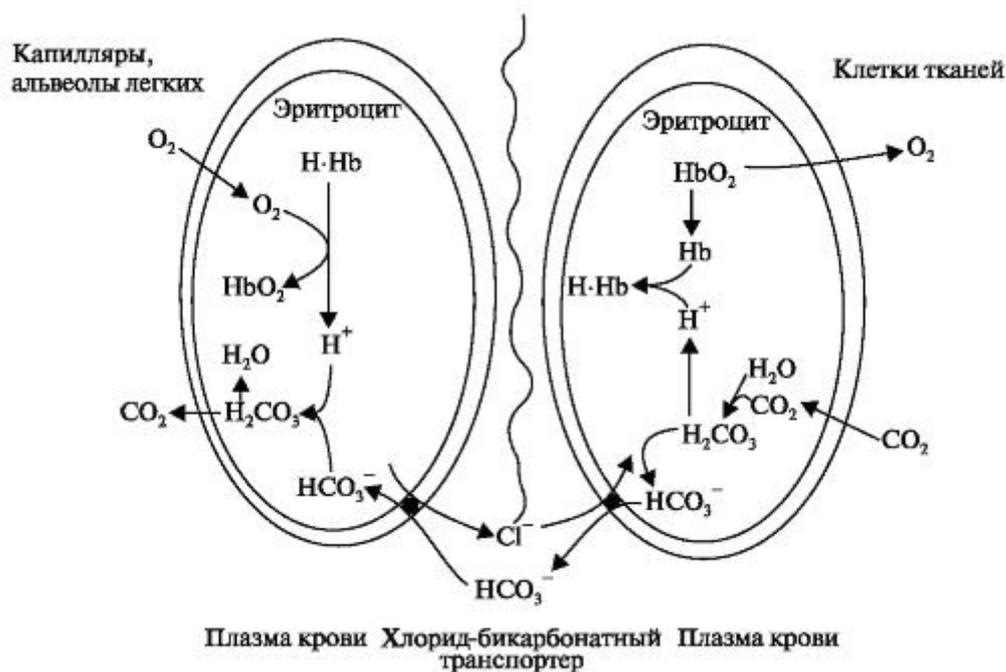


Рис. 25-1. Транспорт газов эритроцитами

Переносимый кислород, эритроциты его сами не потребляют. Однако незначительная его часть идет на окисление  $Fe^{2+}$  гемоглобина до  $Fe^{3+}$ . В этом случае гемоглобин превращается в *метгемоглобин* и не способен связывать

O<sub>2</sub>. В норме в эритроцитах содержится от 0,5 до 3% метгемоглобина. Под воздействием окислителей (метиленового синего и др.) количество метгемоглобина значительно увеличивается (до 30%).

Превращение метгемоглобина в гемоглобин происходит с участием фермента *метгемоглобинредуктазы* и НАДН (НАДФН).

При взаимодействии оксида углерода (СО) с гемоглобином образуется химическое соединение *-карбоксигемоглобин*, которое неспособно связывать кислород.

### Метаболизм эритроцитов

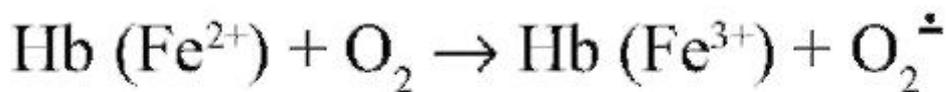
Обмен глюкозы. Обменные процессы из-за отсутствия органелл в *зрелых эритроцитах* очень ограничены (рис. 25-2). Возможны только реакции гликолиза и пентозофосфатного пути распада глюкозы. На фоне отсутствия митохондрий гликолиз является единственным источником энергии. Глюкоза распадается в цитоплазме до двух молекул молочной кислоты, которые удаляются из клетки в плазму крови. Образующиеся молекулы АТФ расходуются на обеспечение активного транспорта молекул через мембрану эритроцита, а восстановительные эквиваленты используются в реакциях гликолитической оксидоредукции и работы метгемоглобинредуктазы.

Рис. 25-2. Обмен глюкозы в эритроцитах. Ферменты: 1 - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; 2 - 6-фосфоглюконатдегидрогеназа; 3 - бисфосфоглицератмутаза; 4 - 2,3-бисфосфоглицератфосфатаза; 5 - лактатдегидрогеназа. ДАФ - дигидроксиацетонфосфат

Уникальная особенность гликолиза в эритроцитах состоит в том, что имеется обходной путь, по которому молекула 1,3-бисфосфоглицерата превращается в 2,3-бисфосфоглицерат. Молекулы 2,3-бисфосфоглицерата в эритроцитах выступают в качестве аллостерического регулятора гемоглобина. Завершает этот обходной путь фермент 2,3-бисфосфоглицератфосфатаза, которая отщепляет фосфат от молекулы 2,3-бисфосфоглицерата, превращая ее в 3-фосфоглицерат.

Наряду с гликолизом в эритроцитах 10% глюкозы окисляется в реакциях пентозофосфатного пути. Дегидрогеназные реакции поставляют восстановительные эквиваленты (НАДФН) для антиоксидантной защиты, а образовавшийся рибулозо-5-фосфат в неокислительной части превращается в глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфат.

*Антиоксидантная защита.* Окисление железа гемоглобина эритроцитов сопровождается образованием супероксидного анион-радикала:



В обезвреживании супероксидного анион-радикала в эритроцитах участвует фермент супероксиддисмутаза, а в последующем распаде пероксида водорода - каталаза и глутатионпероксидаза (см. главу 12). Следует отметить, что в эритроцитах глутатион на 90% находится в восстановленной форме (рис. 25-3).

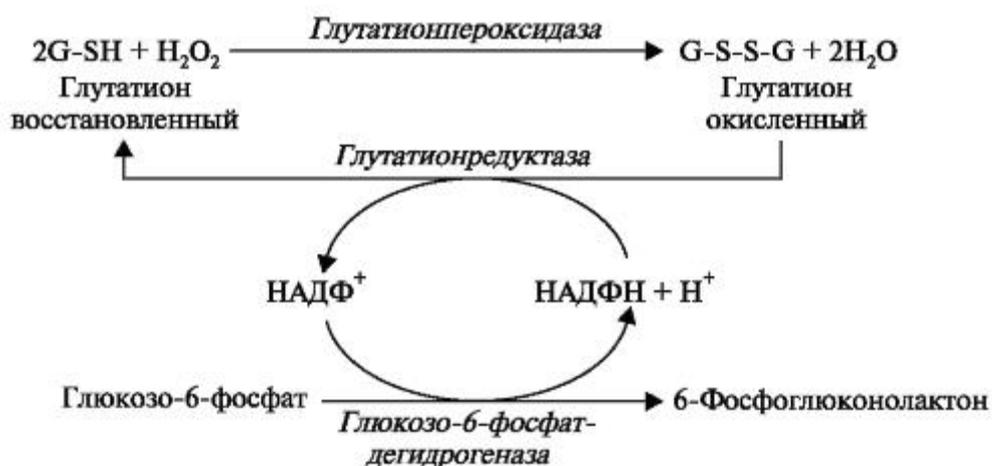


Рис. 25-3. Реакции, обеспечивающие антиоксидантную защиту в эритроцитах

*В записную книжку врача* Гемолитическая анемия

При отсутствии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионпероксидазы или глутатионредуктазы в эритроцитах накапливается пероксид водорода, при участии которого в протомерах гемоглобина окисляются остатки цистеина. Образование дисульфидных связей ведет к агрегации субъединиц гемоглобина, повреждению цитоплазматической мембраны и распаду эритроцитов. Развивается гемолитическая анемия.

Лейкоциты

В отличие от эритроцитов, белые клетки крови очень отличаются друг от друга как по строению, так и функциональному предназначению. Они представлены полиморфно-ядерными нейтрофилами (50-70%), лимфоцитами (25-40%), а также моноцитами, эозинофилами и базофилами.

Полиморфноядерные лейкоциты находятся в периферической крови от 6 до 8 ч, а затем покидают ее, попадают в межклеточное пространство, в полость рта, где выполняют функцию врожденной неспецифической защиты макроорганизма.

Моноциты, поступая из костного мозга в кровь, тоже довольно быстро ее покидают, попадают в ткани и превращаются здесь в тканевые макрофаги. Полиморфно-ядерные нейтрофилы и моноциты сообща участвуют в уничтожении различных микроорганизмов и собственно поврежденных макромолекул путем фагоцитоза. Фагоцитарный ответ происходит в несколько стадий.

- Рецепторы на поверхности мембраны фагоцитирующих клеток в углублениях, покрытых белком *клатрином*, взаимодействуют с поглощаемыми частицами.
- Образуются выросты плазматической мембраны фагоцита. Они окружают поглощаемую клетку (частицу), и формируется фагосома.
- Одновременно происходит *респираторный (дыхательный) взрыв*. Для него характерно резкое увеличение потребления кислорода и глюкозы фагоцитирующей клеткой. Активируется пентозофосфатный путь обмена глюкозы, и в клетке возрастает количество молекул НАДФН. Фермент мембраны фагосом - НАДФН-оксидаза восстанавливает молекулу кислорода с образованием супероксидного анион-радикала, который при участии супероксиддисмутазы превращается в пероксид водорода.
- Образовавшаяся фагосома сливается с лизосомой и получается фаголизосома.
- При участии миелопероксидазы и пероксида водорода иодиды и хлориды окисляются с образованием дополнительных токсичных окислителей - *гипохлорита* и *гипоиодида*. Образовавшийся из аргинина при участии NO-синтазы NO также взаимодействует с супероксидным анионом, что приводит к образованию *пероксинитрита* и гидроксильного радикала. Все образовавшиеся радикалы вызывают окислительные повреждения липидов и белков мембран микроорганизмов. Кроме того, NO может непосредственно взаимодействовать с железосерными белками в цепи переноса электронов, ингибируя дыхание и окислительное фосфорилирование.

- Из гранул нейтрофилов и макрофагов высвобождаются небольшие (3-4 кДа) катионные пептиды, богатые аргинином, лизином и неполярными аминокислотами - *дефензины* (от англ. *defense* - защита). Они внедряются в неполярную фазу мембранного бислоя бактерий и грибков. Это сопровождается повреждением мембраны, формированием пор и в конечном итоге гибелью фагоцитируемой клетки.
- Проникновению дефензинов способствует лизосомный фермент лизоцим, который гидролизует связи между N-ацетил-D-глюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой в полисахаридах бактериальной стенки.
- Благодаря низким значениям pH внутри фаголизосомы, органические молекулы поглощаемой частицы расщепляются кислыми лизосомными гидролазами (катепсинами, гликозидазами и др.).
- Продукты гидролиза поступают в цитозоль и утилизируются. Непереваренные молекулы в виде остаточных телец путем экзоцитоза удаляются из фагоцита.

### Лимфоциты

В костном мозге образуются лимфоциты, которые обеспечивают специфический иммунитет. Они постоянно рециркулируют из лимфы в кровь и ткани. Лимфоциты представлены В-лимфоцитами (гуморальный ответ) и Т-лимфоцитами (клеточный ответ).

В-лимфоциты специализируются на выработке антител (иммуноглобулинов). Т-лимфоциты обладают Т-клеточными рецепторами и синтезируют дополнительные рецепторы - CD-8 и CD-4 (от англ. *cluster differentiation*). В свою очередь, различают помощники Т-лимфоцитов (Т-хелперы) и цитотоксические клетки (Т-киллеры), которые синтезируют CD-8. Вступив в контакт с клеткой-мишенью, Т-киллеры производят целенаправленный выброс из своих гранул особых белков - перфоринов, которые, встраиваясь в мембрану клетки-мишени, формируют трансмембранные поры. Через них происходит утечка содержимого клетки, а также могут проникать белки, вызывающие апоптоз (см. главу 15). Свое цитотоксическое действие лимфоциты оказывают и через образование активных форм кислорода.

Угнетающие клетки (Т-супрессоры) взаимодействуют не со всеми клетками, а лишь с теми, которые относятся к числу В-лимфоцитов, Т-хелперов или Т-киллеров.

### Тромбоциты

Тромбоциты не содержат ядра и активно участвуют в процессе тромбообразования. На поверхности тромбоцитов рецепторы взаимодействуют с молекулами межклеточного матрикса, и при повреждении сосудов происходит послойное налипание тромбоцитов, на мембране которых происходит образование сгустка фибрина. Тромбоциты являются источником множества биологически активных веществ с разными функциями, таких как цитокины, факторы роста тромбоцитов и фибробластов. В этих клетках активна фосфолипаза  $A_2$ , отщепляющая от глицерофосфолипидов арахидоновую кислоту, из которой синтезируются эйкозаноиды - тромбоксаны  $TXA_2$ ,  $TXB_2$  (см. главу 14). Они стимулируют агрегацию тромбоцитов.

### ПЛАЗМА КРОВИ

Жидкую часть крови называют плазмой. Она содержит 90% воды, 6-8% белков, 2% органических небелковых соединений и 1% минеральных веществ. Плазму крови, лишенную фибриногена, называют *сывороткой*. Ее получают из свежей крови без добавления антикоагулянтов.

#### Минеральные компоненты плазмы крови

Неорганические вещества в плазме крови представлены в основном солями различных кислот. В плазме присутствуют в большом количестве ионы натрия, хлора, несколько меньше - бикарбонатов. Концентрация  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  и  $Cl^-$  в плазме выше, чем в цитоплазме клеток, тогда как для  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  и неорганического фосфата наблюдают обратное соотношение. В плазме крови также содержатся микроэлементы в крайне низком количестве. Они, как правило, связаны с белками или другими органическими веществами, которые обеспечивают транспорт ионов в депо. Так, ионы железа переносятся белком трансферрином, меди - церулоплазмином, а ионы тяжелых металлов - альбумином.

#### Белки плазмы крови

В норме в плазме крови содержится 65-85 г/л общего белка.

Используя различные методы, белки плазмы крови можно разделить на три основные группы: *альбумины*, *глобулины* и *фибриноген*. Содержание альбуминов в плазме крови достигает 40-50 г/л, глобулинов - 20-30 г/л и фибриногена - 2-4 г/л.

Традиционно для разделения белковых фракций применяют различные виды электрофореза. Обычно на бумажной электрофореграмме определяют 5 фракций плазменных белков:  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -глобулины и альбумины. В плазме крови присутствующий фибриноген формирует полосу между зонами  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинов. Электрофорез, проводимый с использованием крахмального геля, ацетата целлюлозы и др., позволяет обнаружить 1-2 фракции преальбуминов, 1 гомогенную фракцию альбуминов, 2-3 фракции постальбуминов ( $\alpha_1$ -глобулинов). За ними следуют  $\alpha_2$ -,  $\beta$ -глобулиновая и 1-2  $\gamma$ -глобулиновые фракции.

*В записную книжку врача*

Нарушение белкового состава плазмы крови

Большинство белков, постоянно присутствующих и функционирующих в плазме крови, синтезируется в печени. При многих заболеваниях общее количество белка остается в пределах нормы (65-85 г/л), но развивается *диспротеинемия*, т.е. меняется соотношение отдельных белковых фракций. Снижение белка в плазме крови называют *гипопротеинемией*, а появление белков, отсутствующих в норме, обозначают термином «*парапротеинемия*».

Белки плазмы крови также можно разделить на мажорные, т.е. присутствующие в большом количестве, и минорные, содержание которых невелико. Современные протеомные исследования позволили обнаружить в плазме крови более 3000 различных белков, но только часть из них полностью охарактеризована.

В плазме крови можно выделить постоянно присутствующие белки и транзиторные, которые синтезируются в одном органе и доставляются в другой.

Преальбумины и альбумины. Фракция *преальбуминов* гетерогенна. В ней присутствуют собственно преальбумин, тироксинсвязывающий и ретинол-транспортный белки. Преальбумин синтезируется в печени. Его содержание

зависит от характера питания и в норме не превышает 1% от концентрации альбумина. Ограничение в пище углеводов, калорийности пищи, стресс приводят к снижению концентрации этого белка. Напротив, увеличение количества углеводов в диете, опухолевые процессы, заболевания печени, почек, сахарный диабет сопровождаются накоплением в плазме крови преальбумина и ретинолсвязывающего белка.

На долю *альбуминов* приходится более половины всех белков плазмы крови. Примерно 40% альбуминов находится в плазме крови, а остальное количество - в интерстициальной жидкости и лимфе. Белок ежедневно синтезируется в печени в количестве 10-16 г.

Молекула альбумина представляет собой одиночную полипептидную цепь с молекулярной массой 66,5 кДа, содержащую большое количество остатков дикарбоновых аминокислот, поэтому при pH 7,4 она заряжена отрицательно. Связывая в плазме крови положительно заряженные ионы, главным образом  $\text{Na}^+$ , альбумин обеспечивает значительную часть онкотического давления крови. В структуре молекулы альбумина выделяют три домена. Каждый домен способен присоединять гидрофобные вещества и ионы металлов. Поэтому в соединении с альбумином транспортируются свободные жирные кислоты, билирубин, некоторые гормоны, лекарственные средства, ионы кальция, ртути, кадмия и другие соединения.

Из крови альбумин поступает в межклеточную жидкость, из которой по лимфатической системе он вновь возвращается в кровь.

#### *В записную книжку врача Гипоальбуминения*

При увеличении проницаемости капилляров и нарушениях кровообращения вследствие замедления тока крови усиливается выход альбумина в межклеточное пространство. Вместе с альбумином и ионами  $\text{Na}^+$  из крови в межклеточное пространство уходит вода. Содержание альбумина снижается при заболеваниях почек в результате его выделения с мочой (протеинурии, альбуминурии), циррозе печени (нарушается синтез этого белка), а также при голодании. Снижение концентрации альбуминов в плазме крови менее 30 г/л приводит к уменьшению онкотического давления крови и в последующем к возникновению отеков.

Глобулины. В отличие от альбуминов, глобулины нерастворимы в воде, а растворимы в слабых солевых растворах. В составе  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулиновых

фракций определяют липо- и гликопротеины, а также белки, связывающие ионы металлов. Они отличаются не только по строению, но и по функции. Большая часть антител в плазме крови находится во фракции  $\gamma$ -глобулинов. Характеристика отдельных, наиболее изученных глобулинов плазмы крови представлена в табл. 25-1.

Таблица 25-1. Характеристика отдельных глобулинов плазмы крови

Белковая фракция	Белок	Функции
$\alpha_1$ -Глобулины	$\alpha_1$ - Антитрипсин	Ингибитор трипсина, эластазы, трипсиноподобных протеиназ
	ЛПВП	Захват холестерина и образование холестеридов
	Протромбин	Белок свертывающей системы крови
	Транскортин	Транспорт кортизола, кортикостерона, прогестерона
$\alpha_2$ -Глобулины	Гаптоглобин	Связывание гемоглобина
	$\alpha_2$ -Макроглобулин	Поливалентный ингибитор плазменных протеиназ
	Церулоплазмин	Транспорт ионов меди к тканям и от них в печень
$\beta$ -Глобулины	ЛПНП	Транспорт холестерина к тканям
	Трансферрин	Связывание и транспорт ионов железа
	Транскобаламин	Транспорт витамина В <sub>12</sub>
	С-реактивный белок	Появляется при воспалении и активирует систему комплемента
	Фибриноген	Белок свертывающей системы крови
$\gamma$ -Глобулины	IgA	Антитела, защищающие эпителиальные ткани
	IgD	Рецепторы В-лимфоцитов
	IgE	Антитела к аллергенам
	IgG	Поздние антитела
	IgM	Ранние антитела

Помимо основных, в плазме крови определяют белки, присутствующие в небольшом количестве или появляющиеся при патологических состояниях.

*Интерфероны (ИФН)* вырабатываются в клетках в ответ на внедрение в них вирусов. У здорового человека в плазме крови концентрация ИФН очень мала и увеличивается при вирусных заболеваниях.

*$\alpha$ -Фетопроtein (АФП)* вырабатывается в процессе внутриутробного развития плода клетками эмбриональной печени. В крови взрослого человека содержание этого белка крайне низкое и увеличивается при развитии рака печени, некоторых опухолях репродуктивной системы (тератобластеме яичника и яичка), а также у беременных.

*Тропонины ( $T_n$ )* - белки мышечной ткани с молекулярной массой 79 кДа, состоящие из трех различных субъединиц:  $T_n$ -Т,  $T_n$ -1 и  $T_n$ -С. После связывания с актином они образуют тонкие нити (филаменты) миоцитов. В норме тропонины в плазме крови отсутствуют, но при инфаркте миокарда в плазме крови определяются миокардиальные формы  $T_n$ -Т,  $T_n$ -1, а также мышечный белок - миоглобин. Поэтому наличие этих белков в плазме крови рассматривают в качестве диагностических маркеров острого инфаркта миокарда.

*Криоглобулины* - белки, способные желатинизироваться или выпасть в осадок при температуре ниже 37 °С. При электрофорезе данные белки передвигаются во фракции иммуноглобулинов. Криоглобулины находят в плазме крови при хронической почечной недостаточности, миеломной болезни, циррозе печени, лейкозах и других патологических состояниях.

*Церулоплазмин* имеет 8 участков связывания меди. Церулоплазмин не только переносит ионы меди, но и обеспечивает постоянство их содержания в различных тканях. При наследственном заболевании (болезни Вильсона-Коновалова) уровень церулоплазмينا в крови понижается, а количество меди в мозге и печени повышается. Это проявляется в виде неврологической симптоматики и цирроза печени.

*$\gamma$ -Глобулины.* Иммунологические процессы в организме ассоциируются с наличием в плазме крови иммуноглобулинов, локализованных во фракции  $\gamma$ -глобулинов.

Структура иммуноглобулинов. Мономер иммуноглобулина состоит из четырех полипептидных цепей: двух легких (L - от англ. *Light*) и двух тяжелых (H - от англ. *Heavy*), соединенных друг с другом дисульфидными связями (см. главу 1). Дополнительные дисульфидные связи в молекуле Ig соединяют домены, которые обладают различными функциональными свойствами. N-концевые участки легких и тяжелых цепей содержат переменные (V) области, формирующие антигенсвязывающие участки (ab). Специфическую часть антигена, узнаваемую антителом, называют *эпитопом*. Шарнирные области способствуют образованию поперечных молекулярных связей. На C-конце пептидных цепей имеется так называемая константная (C - от англ. *Constant*), или постоянная, область.

*Классы иммуноглобулинов.* Существуют 5 основных классов иммуноглобулинов, которые отличаются константными областями H-цепей ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). Легкие цепи по различиям в структуре C-области подразделяют на два типа:  $\kappa$  - каппа и  $\lambda$  - лямбда. Каждый класс включает множество индивидуальных иммуноглобулинов, отличающихся по аминокислотной последовательности антигенсвязывающих участков. Молекулы иммуноглобулинов классов G, E и D содержат разное число мономеров [(H<sub>2</sub>b<sub>2</sub>)], IgA состоит из 2-4 мономеров [(H<sub>2</sub>b<sub>2</sub>)<sub>2-4</sub>], а IgM - из 5 мономеров [(H<sub>2</sub>b<sub>2</sub>)<sub>5</sub>], соединенных дисульфидными связями. Данные об основных классах иммуноглобулинов приведены в табл. 25-2.

Таблица 25-2. Классы иммуноглобулинов

Класс	H-цепь	Содержание H- и L-цепей	Молекулярная масса, кДа	Концентрация в сыворотке крови, мг/л
IgG	$\gamma$	$\kappa_2\gamma_2; \lambda_2\gamma_2$	150	80–180
IgA	$\alpha$	$(\kappa_2\alpha_2)_n; (\lambda_2\alpha_2)_n$ , где n=2, 3 или 4	360–720	9–45
IgM	$\mu$	$(\kappa_2\mu_2)_5; (\lambda_2\mu_2)_5$	950	6–25
IgD	$\delta$	$\kappa_2\delta_2; \lambda_2\delta_2$	160	0,001–0,004
IgE	$\epsilon$	$\kappa_2\epsilon_2; \lambda_2\epsilon_2$	190	$(1,7–450)\times 10^{-4}$

В ответ на попадание во внутреннюю среду организма чужеродных молекул начинается синтез антител, в первую очередь *иммуноглобулина M*. Повторные попадания в организм того же антигена приводят к образованию большого количества *иммуноглобулина G* (IgG).

*Иммуноглобулин А* секретируется в эпителиальных тканях.

*Иммуноглобулин Е* в присутствии специфического антигена или аллергена участвует в выделении гистамина и способствует развитию аллергии. У людей с повышенной чувствительностью IgE увеличивает синтез *фактора активации* тромбоцитов (от англ. *Activating Factor* - RAF), который сходен по строению с фосфатидилхолином.

*В записную книжку врача*

Повышение иммуноглобулинов в крови

В случае развития аллергической реакции в плазме крови в острый период определяется IgE на тот или иной аллерген (шерсть, растения, металлы, анестетики и др.), а при длительном воздействии аллергенов - специфический IgG.

При ряде патологических состояний наблюдают отсутствующие в норме в зонах  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулинов структурно-аномальные и функционально-инертные специфические белки - *парапротеины*. Они представлены H- и L-цепями IgA, IgD, IgG. Легкие цепи иммуноглобулинов способны преодолевать почечный порог и появляются в моче. Эти белки получили название «белки Бенс-Джонса».

Белки острой фазы. Воспаление и некроз тканей сопровождаются изменениями в составе белков плазмы крови. Эти изменения объединяют одним термином - «острофазный ответ». *Острофазный ответ* характеризуется увеличением так называемых *положительных* белков острой фазы -  $\alpha_1$ -антитрипсина,  $\alpha_1$ -антихимотрипсина,  $\alpha_2$ -макроглобулина, гаптоглобина, церулоплазмينا и других отдельных белков в зонах  $\beta$ -,  $\alpha_1$ - и  $\alpha_2$ -глобулинов, а также одновременным снижением количества транспортных белков - преальбумина, ретинолсвязывающего белка, альбумина, трансферрина (*отрицательные* белки острой фазы).

*С-реактивный белок* получил свое название из-за способности вступать в реакцию преципитации с С-полисахаридом пневмококков. С-реактивный белок в плазме крови в норме отсутствует, но его обнаруживают во фракции  $\alpha_2$ -глобулинов при патологических состояниях, сопровождаемых воспалением и некрозом тканей. Он возникает в острый период заболевания и исчезает в хроническую фазу. Определение С-реактивного белка имеет

диагностическое значение в острую фазу ревматизма, пневмоккоковой, стрептококковой или стафилококковой инфекции, инфаркта миокарда и других патологий.

К острофазным белкам относят также эндогенные ингибиторы протеолитических ферментов, в первую очередь *α<sub>1</sub>-антитрипсин*. Этот белок ингибирует фермент эластазу, участвующую в гидролизе эластина, а также протеиназы: тромбин, плазмин, трипсин, химотрипсин. Его количество увеличивается при воспалительных заболеваниях и уменьшается при тяжелых поражениях печени. Во фракции  $\alpha_1$ -глобулинов также определяют  $\alpha_1$ -антихимотрипсин, который ингибирует химотрипсин и некоторые протеиназы форменных элементов крови.

Белки свертывания крови и фибринолиза. Свертывание крови обеспечивает многокомпонентная система, в состав которой входят белки, фосфолипиды, фрагменты клеточных мембран и ионы кальция. Система свертывания крови представляет собой каскад протеолитических реакций, а ферменты фибринолиза находятся вне этого каскада. Смысл такого разделения в том, что системы фибринолиза и свертывания крови работают в организме постоянно, но с чрезвычайно низкой скоростью, и в норме эти два процесса уравновешены. Это обеспечивает постоянную готовность организма ответить на действие различных повреждающих факторов и поддерживать гемостаз.

Компоненты системы свертывания крови принято называть факторами свертывания. Факторы бывают тканевыми, плазменными и тромбоцитарными. Тканевые и плазменные факторы обозначают римскими цифрами, а тромбоцитарные - арабскими. Если фактор активен, то после цифры ставят букву «а». Например, переход неактивного фактора XII в активный можно обозначить так: фXII-фXIIa.

Большинство белков системы свертывания крови обладают ферментативной активностью. Они синтезируются в неактивной форме в виде проферментов и активируются в реакциях ограниченного протеолиза. Все факторы свертывания крови, кроме фXIII, являются сериновыми протеиназами. В ходе реакций свертывания крови белки-ферменты сначала выступают в роли субстрата, а затем - в роли фермента. Однако среди белков, участвующих в свертывании крови, есть такие, которые не обладают ферментативной активностью, но специфически ускоряют протекание ферментативной реакции. Их называют параферментами, и к ним относят фV и фVIII. Работа

параферментов контролируется *белком С*, в составе которого есть остаток  $\gamma$ -карбокситглутаминовой кислоты. Он существует в крови в виде профермента и активируется тромбином. Активный белок С в реакции ограниченного протеолиза активирует фV и фVIII. Действие всего каскада реакций свертывания направлено на превращение *фибриногена* в *фибрин*. Фибрин нерастворим в воде, выпадает в осадок в виде нитей и является основой кровяного сгустка.

*Протромбин* - белок, который синтезируется в печени. Для его синтеза необходим витамин К. Активный тромбин (фIIa) гидролизует пептидные связи между остатками аргинина и глутаминовой кислоты в молекуле своего субстрата - фибриногена, превращая его в мономер фибрина. На следующей стадии момеры фибрина спонтанно агрегируют с образованием регулярной полимерной структуры мягкого сгустка растворимого полимерного фибрина. На полимерном фибрине осаждаются компоненты крови и формируется тромб (сгусток). Вначале он рыхлый и мягкий, а молекулы полимерного фибрина удерживаются нековалентными связями. Однако затем под действием фXIIIa, который активируется тромбином, происходит прочная ковалентная сшивка молекул полимерного фибрина. Образуются межмолекулярные связи между карбоксильными группами глутамина и аминокетонами лизина, после чего растворимый фибрин-полимер переходит в нерастворимый. По окончании образования нитей фибрина происходит их сокращение (ретракция кровяного сгустка) с затратой энергии АТФ. Процесс тромбообразования постоянно контролируется ингибитором сериновых протеиназ *антитромбином III*.

*В записную книжку врача*

ДВС-синдром - диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови

ДВС-синдром - нарушение свертываемости крови, обусловленное массивным освобождением из тканей тромбопластических веществ, приводящих к избыточному образованию тромбина в периферической крови. Развитию ДВС-синдрома способствует и снижение уровня основного антикоагулянта плазмы - антитромбина III. Клинические проявления ДВС-синдрома складываются из тромботических, геморрагических и микроциркуляторных нарушений. Тромботические осложнения часто проявляются в виде тромбозов средних и крупных сосудов, а геморрагические проявления характеризуются появлением на коже синяков,

гематом при малейшей травме, в том числе и в местах инъекций, кровотечений из носа, десен и т.п. Кровоточивость при ДВС-синдроме обусловлена появлением участков микротромбоза с микронекрозом и последующим поверхностным изъязвлением слизистых оболочек, снижением уровня тромбоцитов и угнетением их активности.

Антикоагулянты. Естественные антикоагулянты синтезируются в тканях и поступают в кровь, где препятствуют активации факторов свертывания крови. К ним относят *гепарин*, *антитромбин III* и  *$\alpha_2$ -макроглобулин*. Гепарин предотвращает активацию некоторых факторов, но непосредственно на них не действует. Обладая высоким отрицательным зарядом, он связывается с катионными участками антитромбина III. В результате изменяется конформация антитромбина III, и он приобретает способность инактивировать сериновые протеиназы.  $\alpha_2$ -Макроглобулин является эндогенным ингибитором протеиназ всех классов. Время полужизни  $\alpha_2$ -макроглобулина очень короткое - 5 мин. Комплексы « $\alpha_2$ -макроглобулин-фермент» способны сорбировать на себе иммунные пептиды (например, интерлейкины, факторы роста, фактор некроза опухоли) и выводить их из кровотока.

*Фибринолиз* - расщепление фибрина плазмином на отдельные пептиды. Сам плазмин образуется из *плазминогена* под действием активатора плазминогена. Тканевый активатор плазминогена неактивен до тех пор, пока не вступит в контакт с фибрином. После того как фибрин гидролизован плазмином, активатор плазминогена теряет свою активность.

В регуляции процессов свертывания крови участвует также белок *фибринектин*. Свое действие он оказывает после образования связи с гепарином. В настоящее время определение количества этого белка используют в диагностике состояний, при которых происходит угнетение системы макрофагов (например, при сепсисе).

#### Ферменты плазмы крови

Все ферменты, определяемые в плазме или сыворотке крови, условно делят на три группы: секреторные, экскреторные и клеточные (индикаторные). *Секреторные ферменты* синтезируются в печени и постоянно присутствуют в плазме крови. Это ферменты, участвующие в процессе свертывания крови, ингибиторы протеиназ, холинэстераза и

др. *Экскреторные* ферменты синтезируются, главным образом, в гепатоцитах и в основном выделяются с желчью. При некоторых патологических процессах выделение экскреторных ферментов с желчью нарушается, и тогда их активность в плазме крови повышается. *Клеточные (индикаторные) ферменты* попадают в плазму крови из разных органов и тканей при их повреждении. В плазме крови эти ферменты не выполняют свои функции. Часть ферментов могут поступать из цитоплазмы клеток (например, лактатдегидрогеназы, трансаминазы), а другая часть - из лизосом (кислая фосфатаза) или цитоплазматических мембран (щелочная фосфатаза).

*Диагностическое значение активности ферментов.* В норме ферменты присутствуют в плазме крови от нескольких часов до нескольких дней. При патологических состояниях активность ряда ферментов может возрастать (*гиперферментемия*), а также могут появляться ферменты, которые в норме отсутствуют.

Гиперферментемия обусловлена выходом ферментов из поврежденных тканей: 1) на фоне их продолжающегося усиленного биосинтеза; 2) снижения времени инактивации; 3) нарушения экскреции. В процессе циркуляции по кровеносным сосудам ферменты начинают инактивироваться путем окисления радикалов отдельных аминокислот - цистеина, гистидина, удаления углеводов с поверхности белковых молекул. Затем такие измененные белки поглощаются клетками ретикулоэндотелиальной системы печени, селезенки.

Большинство ферментов, содержащихся в плазме крови, присутствует во многих тканях. К ним относятся лактатдегидрогеназа, трансаминазы, щелочная фосфатаза. Ферменты, характерные для определенных органов, называют *органоспецифическими*. Для печени такими ферментами считают гистидазу, уруканиназу, сорбитолдегидрогеназу, аргиназу, орнитинкарбамоилтрансферазу и  $\gamma$ -глутамилтранспептидазу. Для скелетных мышц, миокарда и мозговой ткани - это креатинкиназа. Однако определения общей активности этих ферментов часто бывает недостаточно. В ряде случаев определяют активность изоферментов (см. главу 5).

К числу органоспецифических ферментов также можно отнести  $\alpha$ -амилазу, активность которой преимущественно повышается при остром панкреатите. Возможен рост активности этого фермента при остром паротите или закупорке протоков околоушных слюнных желез.

При поражении костной ткани (переломах, остеосаркоме, метастазах опухолей в костную ткань), в случае воспаления и закупорки желчевыводящих путей, во второй половине беременности увеличивается активность щелочной фосфатазы.

Помимо повышения в сыворотке крови активности ряда ферментов, возможно снижение активности экскреторных ферментов. К таким ферментам относят *холинэстеразу*. Различают два типа холинэстераз: первая известна под названием истинной холинэстеразы, а вторая - псевдохолинэстеразы. Истинная холинэстераза также получила систематическое название «ацетилхолингидролаза» и тривиальное - «ацетилхолинэстераза». Псевдохолинэстераза, обладающая более широкой субстратной специфичностью, получила систематическое название «ацетилхолинацилгидролаза» и тривиальное - «холинэстераза». *Ацетилхолинэстераза* встречается преимущественно в мозговой, мышечной и нервной тканях, а также в эритроцитах.

Псевдохолинэстераза в основном, содержится в печени, поджелудочной железе и сыворотке крови. Значительное снижение активности псевдохолинэстеразы в сыворотке крови наблюдают при циррозе печени и бытовых отравлениях фосфорорганическими инсектицидами - хлорофосом и дихлофосом. Постоянное присутствие чрезвычайно активной холинэстеразы в плазме крови, возможно, является защитным приспособлением и предотвращает распространение по тканям ацетилхолина при его попадании в кровеносное русло. Полное угнетение активности холинэстеразы в плазме крови несовместимо с жизнью.

Низкомолекулярные органические вещества. В плазме крови определяется довольно высокая концентрация глюкозы, необходимая для питания клеток, мочевины, которая транспортируется в почки для дальнейшего выведения из организма. Также в плазме крови присутствуют холестерол, аминокислоты, креатинин, билирубин, мочевая кислота и др. (табл. 25-3).

Таблица 25-3. Количество низкомолекулярных веществ в плазме крови

Органические вещества	Количество	Неорганические вещества	Количество, ммоль/л
Мочевина	2,8-8,3 ммоль/л	Магний	0,7-1,2

Глюкоза	3,5-6,0 ммоль/л	Общий кальций	2-2,5
Холестерол общий	3,5-5,6 ммоль/л	Кальций ионизированный	0,8-1,1
Триацилглицеролы	0,6-2,3 ммоль/л	Хлор	85-100
Билирубин	5-20,4 мкмоль/л	НСО <sub>3</sub> <sup>-</sup>	20-30
Креатинин	50-176 мкмоль/л	Фосфат общий	0,65-1,3
Креатин	10-70 мкмоль/л	Фосфат органический	0,65-1,3
Мочевая кислота	20-60 мг/л	Железо	0,045-0,075
Ацетоуксусная кислота	8-28 мг/л		

*В записную книжку врача*

Изменения показателей плазмы крови при почечной недостаточности

Хроническая почечная недостаточность развивается вследствие воспалительного процесса в почках, сахарного диабета и др. Страдает в первую очередь выделительная функция почек, и в плазме крови повышается содержание мочевины до 40 ммоль/л, креатинина до 1000 мкмоль/л, растет количество калия.

## ГЛАВА 26. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЖИДКОСТИ

Вопросы по теме

- Смешанная слюна. Состав.
- Белки и ферменты слюны.
- Роль слюны в образовании приобретенной пелликулы зуба, зубного налета.
- Десневая жидкость.
- Лимфа. Состав.
- Спинномозговая жидкость.

- Компоненты мочи в норме и при патологических состояниях.

## СМЕШАННАЯ СЛЮНА

В ротовой полости находится жидкость, состоящая из секретов больших и малых слюнных желёз (железистый компонент), клеток (микроорганизмов, слущенного эпителия, лейкоцитов) и их метаболитов, остатков пищи. Эта жидкость получила название ротовой жидкости или смешанной слюны (*mixed saliva*).

### Образование железистого компонента

Околоушные слюнные железы и некоторые железы языка выделяют жидкий белковый секрет, а поднижнечелюстные, подъязычные, железы губ, щёк и кончика языка выделяют смешанный белково-слизистый.

Спонтанной секреции слюны слюнными железами не существует. Она регулируется симпатической и парасимпатической нервными системами, гормонами и вазоактивными пептидами. Симпатическая иннервация усиливает секрецию белков, а парасимпатическая отвечает за секрецию жидкой фазы слюны. Выделяют секрецию базальную и стимулированную. В регуляции тонуса сосудов слюнных желёз, помимо нейротрансмиттеров - адреналина, норадреналина и ацетилхолина, важную роль играют нейропептиды - субстанция Р и вазоактивный интерстициальный полипептид. Субстанция Р (SP) освобождается из капсаин-чувствительных афферентных волокон и является медиатором проницаемости для белков плазмы крови. Вазоактивный интерстициальный полипептид участвует в холинергическом расширении сосудов, усиливая тем самым секрецию белков.

Образование вторичных посредников цАМФ и 1,4,5-инозитолтрис-фосфата приводит к увеличению ионов кальция в ацинарных клетках. Кальций поступает из плазмы крови и частично из эндоплазматического ретикулума. Повышение концентрации кальция в цитоплазме активирует котранспортную систему  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  и другие транспортёры, расположенные на базолатеральной мембране. Накопление ионов хлора сопровождается привлечением ионов натрия, и высокий уровень натрия и хлора вызывает приток воды через аквапорин-3, а также по межклеточному пространству (рис. 26-1).

Рис. 26-1. Клеточные механизмы транспорта ионов и воды в ацинарных клетках. АМК - аминокислоты; АП - аквапорин; Гл - глюкоза

Ионы кальция также активируют каналы на апикальной мембране, и ионы, и вода через аквапорин-5 поступает в просвет выводных протоков. Так, в ацинарных клетках формируется *изотоничная* жидкость, которая не очень отличается от плазмы крови.

В выводных протоках под действием кортизола происходит интенсивная реабсорбция ионов натрия и хлора в обмен на ионы калия и  $\text{HCO}_3^-$  (рис. 26-2).

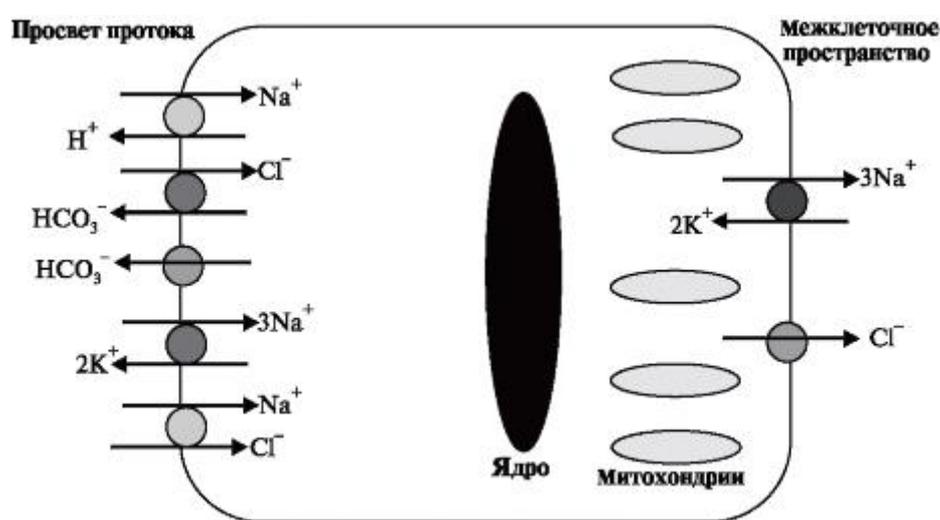


Рис. 26-2. Формирование слюны в клетках исчерченных выводных протоков слюнных желез

В результате в слюне содержание калия возрастает в 4-6 раз, а  $\text{HCO}_3^-$  в 2 раза, и к моменту поступления секрета в ротовую полость он становится *гипотоничным*, поскольку ионная сила слюны снижается в 10 раз по отношению к плазме крови.

Состав смешанной слюны

Смешанная слюна состоит на 98,5-99,5% из воды и сухого остатка. Сухой остаток представлен неорганическими веществами и органическими соединениями. Ежедневно у человека выделяется около 1000-1200 мл слюны. Секретция и химический состав слюны достаточно лабильны.

Неорганические компоненты слюны находятся в виде растворённых в ней анионами макроэлементов - хлоридов, фосфатов, бикарбонатов, роданидов, иодидов, бромидов, сульфатов, а также катионами  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . В слюне определяются микроэлементы: Fe, Cu, Mn, Ni, Li, Zn, Cd, Pb, Li и др. Все минеральные макро - и микроэлементы находятся как в виде простых ионов, так и в составе соединений - солей, белков и хелатов (табл. 26-1).

Количество неорганических компонентов смешанной слюны разнится в зависимости от состояния покоя или стимуляции слюнных желез различными пищевыми веществами, химическими и физическими факторами. Отмечено, что элементный баланс смешанной слюны подвержен значительным колебаниям в зависимости от генетических, гендерных, временных, биосоциальных и климатических факторов. Так, изменение концентрации микроэлементов слюны наблюдается при интенсивных физических упражнениях. В утренние часы в слюне достоверно выше концентрация ионов Al, Cu, Na и Mg, а в вечерние часы - ионов K, Ca, P, Fe, Mn, Se, Zn, Si, Ni, Cr и Sr. Содержание ионов в слюне также может зависеть от возраста.

Таблица 26-1. Неорганические компоненты нестимулированной смешанной слюны и плазмы крови (в ммоль/л)

Вещество	Слюна	Плазма крови
Натрий	6,6-24,0	130-150
Калий	12,0-25,0	3,6-5,0
Хлор	11,0-20,0	97,0-108,0
Общий кальций	0,75-3,0	2,1-2,8
Неорганический фосфат	2,2-6,5	1,0-1,6
Общий фосфат	3,0-7,0	3,0-5,0
Бикарбонатион ( $\text{HCO}_3^-$ )	20,0-60,0	25,0
Тиоцианаты ( $\text{SCN}^-$ )	0,5-1,2	0,1-0,2
Медь	0,3	0,1
Иод	0,1	0,01
Фтор	0,001-0,15	0,15

Бикарбонаты в ротовую полость эскретируются преимущественно из околоушных и поднижнечелюстных слюнных желёз и их концентрация зависит от стимуляции. Так количество бикарбоната слюны «покоя»

достигает 5 ммоль/л, а в стимулированной слюне оно возрастает до 60 ммоль/л.

В слюне фосфат содержится в двух формах: в виде «неорганического» фосфата и связанного с белками. Кальций, как и фосфаты, находится либо в ионизированной форме, либо в соединении с белками.

В ротовую полость со слюной также могут поступать ионы тяжелых металлов. Они способны взаимодействовать с выделяемыми микроорганизмами молекулами сероводорода, что приводит к образованию сульфидов металлов. Таким образом, на пришеечной поверхности зубов появляется «свинцовая кайма».

Из плазмы крови в слюну поступают тиоцианаты ( $\text{SCN}^-$ , роданиды). Они образуются из синильной кислоты с участием фермента роданезы. В слюне курильщиков содержится в 4-10 раз больше роданидов, чем у некурящих. Их количество также может возрасти при воспалении пародонта. Распад иодтиронинов в слюнных железах приводит к освобождению иодидов в слюну.

Органические вещества - белки, пептиды, аминокислоты, углеводы, в основном присутствуют в осадке смешанной слюны. Лейкоциты и микроорганизмы поглощают пищевые вещества, поступающие в ротовую полость и освобождают продукты обмена в окружающую среду. Другая часть органических веществ, таких, как мочевины, креатинин, гормоны, некоторые пептиды, факторы роста, калликреин и другие ферменты, выделяются с секретом слюнных желез (табл. 26-2).

Таблица 26-2. Органические компоненты нестимулированной смешанной слюны

Органические компоненты	Ед. измерения
Альбумин	30,0 мг/л
Белок	1,0-3,0 г/л
Глюкоза	0,06-0,17 ммоль/л
Иммуноглобулин А	39,0-59,0 мг/л
Иммуноглобулин G	11,0-18,0 мг/л
Иммуноглобулин М	2,3-4,8 мг/л
Креатинин	2,0-10,0 мкмоль/л

Молочная кислота	0,37 ммоль/л
Мочевина	3,3 ммоль/л
Мочевая кислота	0,18 ммоль/л
Пировиноградная кислота	0,1 ммоль/л
Холестерин	1-2 мкмоль/л

*Липиды.* Цельная слюна содержит от 10 до 100 мг/мл липидов. В слюне выявляют триацилглицеролы, свободные жирные кислоты (пальмитиновую, стеариновую, эйкозопентаеновую, олеиновую и др.), эфиры холестерина и свободный холестерол. В меньшей концентрации в слюне обнаруживаются фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, сфингомиелин и фосфатидилсерин. Следует отметить, что данные о содержании и характере липидов в слюне противоречивы. Это связано, в первую очередь с методами очистки и выделения липидов, а также со способом получения слюны, возрастом доноров и другими факторами.

Липиды поступают в полость рта главным образом с секретами околоушных и поднижнечелюстных слюнных желез, но некоторые липиды, такие, как холестерол и свободные жирные кислоты, как полагают, попадают в слюну из сыворотки крови. Источником ряда липидов в слюне также являются мембраны секреторных везикул, фрагменты мембран бактериальных клеток. Однако низкое содержание фосфолипидов в слюне показывает, что клеточные мембраны не являются основным источником липидов в слюне. Значительная часть слюнных липидов находится в связанном состоянии с белками слюны, в частности с высокомолекулярными гликопротеинами - муцинами, а также с основными белками, богатыми пролином. Липиды слюны участвуют в формировании пелликулы эмали зуба, входят в состав зубного налета, зубного камня, слюнных камней и содержимого кариозной полости.

*Мочевина* выделяется малыми слюнными железами, несколько меньше околоушными и поднижнечелюстными. Мочевина также может синтезироваться микрофлорой из L-аргинина. Часть мочевины попадает в смешанную слюну с пищей, а также из поврежденных тканей полости рта. Количество выделяемой мочевины зависит от скорости слюноотделения и обратно пропорционально количеству выделенной слюны. Уровень мочевины в слюне повышается при заболеваниях почек. В полости рта

мочевина расщепляется при участии уреолитических бактерий присутствующих в осадке слюны до углекислого газа и аммиака (рис. 26-3).

Рис. 26-3. Гидролиз мочевины уреолитическими бактериями в осадке слюны  
Освобождающееся количество аммиака влияет на рН зубной бляшки и смешанной слюны.

Помимо мочевины в слюне определяются мочева кислота и креатинин. Все эти вещества определяют уровень остаточного азота в слюне.

*Органические кислоты.* В смешанной слюне содержатся молочная, пировиноградная и другие кислоты. Увеличение количества органических кислот, в частности лактата в слюне и зубном налете, способствует очаговой деминерализации эмали и развитию кариеса.

Источником нитратов ( $\text{NO}_3^-$ ) и нитритов ( $\text{NO}_2^-$ ) в слюне являются пища, табачный дым и вода. Нитраты в полости рта при участии нитрат-редуктазы бактерий превращаются в нитриты и их содержание зависит от количества выкуренных сигарет. У курильщиков и лиц, занятых в табачном производстве, растет активность нитратредуктазы и количество нитритов в слюне. Образовавшиеся нитриты, в свою очередь, могут вступить в реакцию с вторичными аминами (аминокислотами, лекарствами) с образованием канцерогенных нитрозосоединений. Эта реакция протекает в кислой среде, а ускоряют ее добавленные в реакцию тиоцианаты, количество которых в слюне также растет при курении.

Мицеллы слюны

Слюна имеет мицеллярное строение. Комплекс, состоящий из нерастворимого в воде ядра, дисперсной фазы и слоев стабилизатора (диффузного и адсорбционного), охватывающих ядро, получил название мицеллы (рис. 26-4).

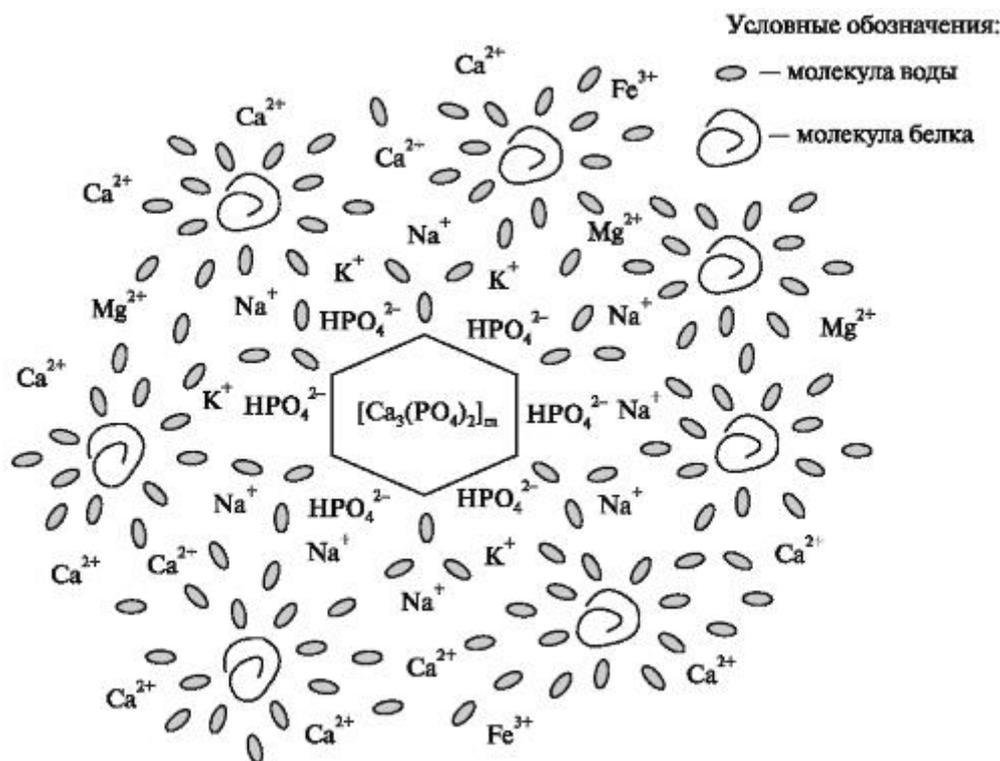


Рис. 26-4. Модель строения мицеллы слюны с «ядром» из фосфата кальция

На поверхности ядра сорбируются находящиеся в слюне в избытке молекулы моногидрофосфат-иона ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ). В адсорбционном и диффузных слоях мицеллы будут находиться ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , являющиеся противоионами. Белки, связывающие большое количество воды (в частности, муцин), способствуют распределению всего объема слюны между мицеллами, в результате чего она структурируется, приобретает высокую вязкость, становится малоподвижной.

В кислой среде заряд мицеллы может уменьшиться вдвое, так как вместо моногидрофосфат-иона ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) появляется дигидрофосфат-ион ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Такая слюна не способна участвовать в поддержании постоянства эмали. Подщелачивание слюны приводит к увеличению фосфат-ионов, которые соединяясь с ионами кальция, образуют плохо растворимые соединения  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , осаждающихся в виде зубного камня. Изменение структуры мицелл в слюне также приводит к образованию камней в протоках слюнных желез с развитием слюннокаменной болезни.

#### Функции смешанной слюны

1. Пищеварительная. Смачивая и размягчая твердую пищу, слюна облегчает проглатывание пищи. В формировании пищевого комка участвуют слюнные

муцины, а в расщеплении гомополисахаридов - секреторный фермент  $\alpha$ -амилаза.

2. Коммуникативная. Слюна необходима для формирования правильной речи и общения. При постоянном потоке воздуха в процессе разговора, приема пищи влажность в ротовой полости сохраняется. Это обеспечивают муцин и другие слюнные гликопротеины.

*Муцин* синтезируется в поднижнечелюстных, подъязычных и малых слюнных железах. Существует целое семейство муцинов. В слюне присутствуют высокомолекулярный и низкомолекулярный муцин. В полипептидной цепи муцина содержится большое количество серина и треонина, а всего их насчитывается около 200 на одну полипептидную цепь. Третьей, наиболее часто встречающейся аминокислотой в муцине является пролин. К остаткам серина и треонина через O-гликозидную связь присоединены остатки N-ацетилнейраминовой кислоты, N-ацетилгалактозамина, фруктозы и галактозы.

Сам белок по своему строению напоминает гребенку: короткие углеводные цепи, как зубья, торчат из жесткой, богатой пролином полипептидной основы (рис. 26.5).

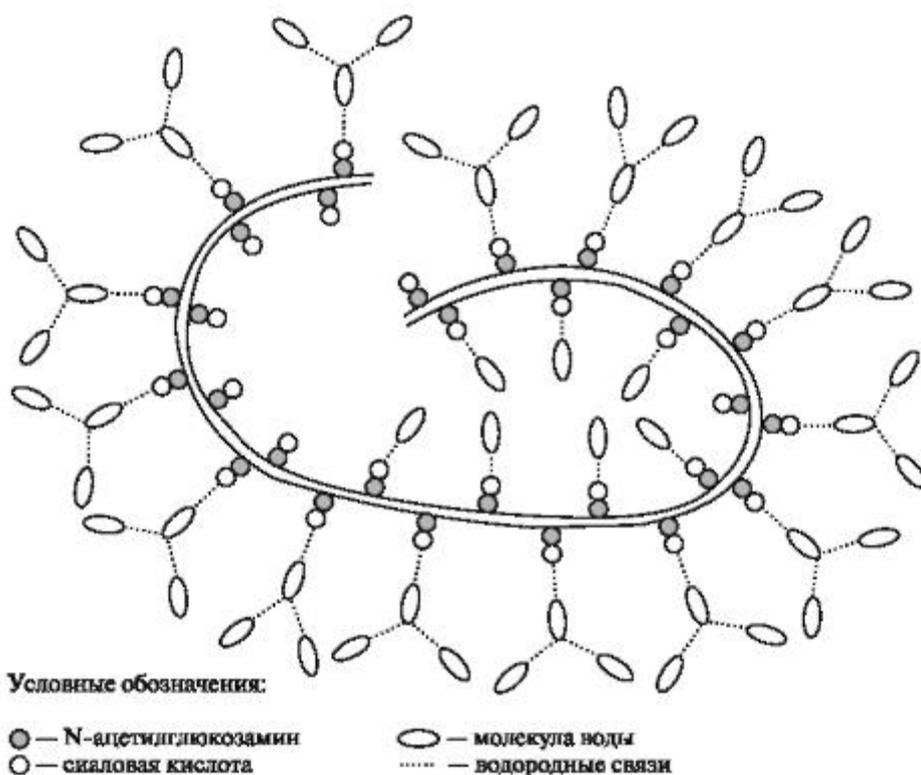


Рис. 26-5. Структура слюнного муцина (модель)

Такое строение позволяет молекуле муцина связывать большое количество воды, что придает слюне вязкость. Муцин, покрывая эпителий полости рта, защищает его от дегидратации и повреждающего действия бактерий.

3. Защитная. Она складывается: 1) из очищения зубов и слизистой оболочки полости рта от продуктов метаболизма бактерий и остатков пищи; 2) антимикробного и противовирусного действия; 3) формирования защитного слоя (пелликулы) на поверхности тканей полости рта; 4) поддержания кислотно-основного равновесия.

На сегодняшний день в слюне человека обнаружено несколько семейств эндогенных антимикробных пептидов (АМП) - *дефензины*, *кателицидины*, *гистатины* и др. АМП представляют собой небольшие молекулы, построенные из нескольких десятков аминокислот. Из-за небольшого размера они действуют путем нарушения структуры или функции клеточной мембраны микроорганизмов.

*Гистатины* (белки, богатые гистидином). Семейство гистатинов представлено 12 пептидами с разной функцией. Все они участвуют в образовании приобретенной пелликулы зуба, а гистатин-5 является мощным ингибитором роста кристаллов гидроксиапатитов в слюне.

*α- и β-Дефензины* - низкомолекулярные пептиды, богатые цистеином. Источником α-дефензинов являются лейкоциты, а β-дефензинов - кератиноциты и слюнные железы. Они формируют ионные каналы в мембране бактериальной клетки, агрегируют с пептидами мембран и, таким образом, обеспечивают перенос ионов в клетку, нарушая ее осмос. Дефензины также подавляют синтез бактериальных белков.

*Кателицидины* - это катионные пептиды разнообразной линейной, α-спиральной или β-шпилькообразной структуры, которые освобождаются из гранул нейтрофилов. Они способны связываться с липополисахаридами бактериальных мембран или формируют ионные каналы.

*Кальпротектин* - низкомолекулярный кальцийсвязывающий белок S100 (36 кДа). Кальпротектин высвобождается из нейтрофилов и макрофагов во время их активации или гибели и вовлекается в активный воспалительный процесс. Кальпротектин в нейтрофилах, ответственен за первичную иммунную

реакцию лейкоцитов, а также обладает противомикробными, фунгицидными и антипролиферативными свойствами.

*Лактоферрин* - гликопротеин, существующий в виде различных полимерных форм от мономера до тетрамера, что и определяет его функциональные свойства. Каждая молекула белка может обратимо связывать два иона трехвалентного железа или ионы цинка, меди и других металлов.

Лактоферрин относится к системе врожденного иммунитета. Главные биологические функции белка - это связывание и транспорт ионов железа, но кроме этого лактоферрин обладает антибактериальной, противовирусной, антипаразитарной, различными каталитическими активностями, а также противораковым, антиаллергическим, иммуномодулирующим действиями и радиопротективными свойствами.

*Иммуноглобулины*. Основным иммуноглобулином полости рта (90%) является секреторный иммуноглобулин А (sIgA, IgA<sub>2</sub>), который выделяется околоушными слюнными железами. Остальные 10% IgA<sub>2</sub> секретируются малыми и поднижнечелюстными слюнными железами. Все другие виды иммуноглобулинов (IgE, IgG, IgM) определяются в меньшем количестве. В слюну они поступают из плазмы крови через малые слюнные железы и зубодесневую бороздку.

*Гликопротеин-340* (gp340, ГП-340) - белок, богатый цистеином с молекулярной массой 340 кДа. В присутствии ионов кальция ГП-340 связывается с аденовирусами и вирусами, вызывающими гепатит, ВИЧ-инфекцию. Он также взаимодействует с бактериями ротовой полости (*Str. mutans*, *Helicobacter pylori* и др.) и подавляет их сцепление при образовании колоний. Белок ингибирует активность эластазы лейкоцитов и, таким образом, защищает белки слюны от протеолиза.

*Лизоцим* синтезируется эпителиальными клетками протоков слюнных желез. Ещё одним источником лизоцима являются нейтрофилы. Бактерицидное действие лизоцима основано на том, что он катализирует гидролиз  $\alpha$  (1→4) - гликозидной связи, соединяющей молекулу N-ацетилглюкозамина с N-ацетилмурамовой кислотой в полисахаридах клеточной оболочки микроорганизмов, что способствует разрушению муреина - пептидогликана, содержащегося в бактериальной стенке.

4. Кисотно-основное равновесие в полости рта определяется скоростью слюноотделения, совместным действием буферных систем слюны, метаболитами микроорганизмов, количеством зубов и частотой их расположения в зубной дуге. Значение рН смешанной слюны в норме колеблется от 6,5 до 7,4. В поддержании рН участвуют три буферные системы: *бикарбонатная, фосфатная и белковая*. Вместе эти буферные системы формируют первую линию защиты против кислотных или щелочных воздействий на ткани полости рта. Они имеют различные пределы буферной емкости: фосфатная наиболее активна при рН 6,8-7,0, карбонатная при рН 6,1-6,3, а белковая обеспечивает буферную емкость при различных значениях рН.

*В записную книжку врача Колебания рН слюны*

Благодаря буферным системам у практически здоровых людей уровень рН смешанной слюны восстанавливается после еды до исходного значения в течение нескольких минут. При несостоятельности буферных систем рН смешанной слюны понижается, что сопровождается увеличением скорости деминерализации эмали и инициирует развитие кариозных и некариозных поражений твердых тканей зуба. На рН слюны в большой степени влияет характер пищи: при приеме апельсинового сока, кофе с сахаром, клубничного йогурта рН снижается до 3,8-5,5, в то время как употребление пива, кофе без сахара практически не вызывают сдвигов в рН слюны.

5. Минерализующая. Слюна - основной источник ионов кальция и фосфора для эмали зуба. После прорезывания зуба механизм минерализации протекает через: 1) регуляцию рН; 2) препятствие в разрушении кристаллов гидроксиапатита эмали зуба; 3) включение ионов в минерализованные ткани. Ионы в эмаль зуба поступают через приобретенную пелликулу, в образовании которой участвуют белки слюны (статзерины, белки, богатые пролином, цистатины, гистатины и др.).

*Статзерины (Statherins, белки, богатые тирозином)* в пелликуле зуба связываются своей N-концевой областью с гидроксиапатитами эмали. Эти фосфогликопротеины содержат до 15% пролина и 25% кислых аминокислот. Статзерины, связывая кальций, ингибируют его осаждение и образование гидроксиапатитов в слюне. Совместно с гистатинами они ингибируют рост аэробных и анаэробных бактерий.

*Белки, богатые пролином (ББП)*, составляют до 70% общего количества всех белков секрета околоушных слюнных желёз. В структуре ББП от общего числа аминокислот 75% приходится на пролин, глицин, глутаминовую и аспарагиновую кислоты. ББП по свойствам делятся на 3 группы: кислые, основные и гликозилированные. Кислые ББП задерживают деминерализацию эмали зуба и ингибируют излишнее осаждение минералов, т.е. поддерживают постоянное количество кальция и фосфора в эмали зуба. Кислые и гликозилированные ББП способны связывать определенные микроорганизмы и таким образом участвуют в образовании микробных колоний в зубном налете. Основные ББП связывают танины пищи и тем самым защищают слизистую оболочку полости рта от их повреждающего действия, придают вязко-эластические свойства слюне.

6. Регуляторная. В слюне содержится ряд гормонов и биологически активных веществ. Часть этих соединений секретируется из плазмы крови, а другие белки поступают из слюнных желез. Из плазмы крови в слюну переносятся половые гормоны, глюкокортикоиды. Слюнные железы являются источником паротина, эритропоэтина, факторов роста.

*Паротин* - гликопротеин, выделяемый околоушными и поднижнечелюстными слюнными железами. Белок состоит из  $\alpha$ -  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц. Активным началом паротина является  $\gamma$ -субъединица, влияющая на развитие минерализованных тканей. Паротин стимулирует синтез нуклеиновых кислот в бластных клетках развивающегося зубного зачатка, активирует поступление ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{PO}_4^{3-}$ , необходимых для формирования кристаллов гидроксиапатита.

В слюне определяется фактор роста нервов, фибробластов, эндотелия, эпидермальный фактор роста и многие другие.

Белок *лептин* участвует в процессах регенерации слизистой оболочки ротовой полости. Связываясь с рецепторами кератиноцитов, он вызывает экспрессию факторов роста кератиноцитов и эпителия.

#### Ферменты слюны

В составе смешанной слюны определяется свыше 50 различных ферментов. Источниками ферментов в слюне выступают слюнные железы, микроорганизмы, лейкоциты и клетки эпителия. Их активность, за

исключением  $\alpha$ -амилазы и лизоцима не очень велика, и значения этой активности.

*Оксидоредуктазы.* В норме в смешанной слюне присутствуют слюнная пероксидаза (лактопероксидаза) и миелопероксидаза, а при патологических состояниях появляется глутатионпероксидаза.

*Лактопероксидаза* - гемопротейн, образуется в ацинарных клетках околоушных и поднижнечелюстных слюнных желез. Фермент окисляет тиоцианаты ( $\text{SCN}^-$ ). Механизм окисления  $\text{SCN}^-$  включает несколько реакций. Наибольшее окисление тиоцианатов слюнной пероксидазой протекает при pH 5,0-6,0, поэтому антибактериальный эффект этого фермента увеличивается при кислых значениях pH. Образующийся гипотиоцианат ( $\text{OSCN}$ ) подавляет рост *Str. mutans* и оказывает в 10 раз более мощное антибактериальное действие, чем  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

*Фермент миелопероксидаза* освобождается в смешанную слюну из полиморфно-ядерных лейкоцитов. Она участвует в окислении ионов хлора, иода и брома. Результатом взаимодействия системы «пероксидаза-пероксид водорода-хлор» является образование гипохлорита ( $\text{HOCl}$ ). Объектом действия последнего являются аминокислоты белков микроорганизмов, которые окисляются до активных альдегидов или других токсичных продуктов. Поэтому способность слюнных желез экскретировать в значительных количествах ионы тиоцианата, иода, брома, хлора также следует отнести к функции антимикробной защиты.

Ферменты класса трансфераз в смешанной слюне в основном представлены аспаратаминотрансферазой и аланинаминотрансферазой. Они не проходят из плазмы крови через гематосаливарный барьер и имеют тканевое или микробное происхождение. Их активность в слюне растёт при воспалении тканей пародонта, кариесе.

Наибольшее количество ферментов слюны относится к классу гидролаз. Это щелочная и кислая фосфатазы,  $\alpha$ -амилаза, лизоцим, нуклеазы.

*Гликозидазы.* Помимо  $\alpha$ -амилазы, в смешанной слюне определяется активность нескольких гликозидаз -  $\alpha$ -L-фукозидазы,  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкозидаз,  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозидаз,  $\alpha$ -D-маннозидазы,  $\beta$ -глюкуронидазы,  $\beta$ -гиалуронидазы,  $\beta$ -N-ацетилгексозаминидазы, нейраминидазы. Изменение гиалуронидазной активности в слюне коррелирует с количеством грамотрицательных бактерий

и возрастает при воспалении десны. Вместе с гиалуронидазной активностью возрастает активность  $\beta$ -глюкуронидазы, которая в норме подавляется эндогенным ингибитором.

*Нуклеазы (РНказы и ДНказы)* попадают в слюну с лейкоцитами. В смешанной слюне обнаружены кислые и щелочные РНказы и ДНказы, отличающиеся по своим свойствам. Эти ферменты резко замедляют рост и размножение многих микроорганизмов в ротовой полости. При некоторых воспалительных заболеваниях мягких тканей полости рта их активность увеличивается.

В зависимости от значения рН, при котором действует фермент, различают щелочную и кислую фосфатазы. Активность обеих фосфатаз в смешанной слюне, как правило, увеличивается при пародонтите и гингивите. Имеются противоречивые сведения об изменении активности этих ферментов при кариесе зубов.

*Кислая фосфатаза* проявляет свою активность при рН 4,8-5,0, содержится в лизосомах и попадает в смешанную слюну с секретами больших слюнных желез, а также из бактерий, лейкоцитов и эпителиальных клеток. В слюне определяется до 4 изоферментов кислой фосфатазы.

*Щелочная фосфатаза* наиболее активна при рН 9,1-10,5. В секретах слюнных желез здорового человека активность щелочной фосфатазы низка, и ее происхождение в смешанной слюне связывают с клеточными элементами и микроорганизмами.

*Протеиназы.* В слюне отсутствуют условия для активного расщепления белков. Это обусловлено тем, что в ротовой полости нет денатурирующих факторов, а также присутствует большое количество белков-ингибиторов протеиназ. Низкая активность протеиназ позволяет сохранять белки слюны в нативном состоянии и полноценно выполнять свои функции.

В слюне здорового человека определяется невысокая активность кислых и слабощелочных протеиназ, и их источником преимущественно являются микроорганизмы и лейкоциты, поэтому активность катепсинов В и D возрастает при воспалении, а при разрушении межклеточного матрикса тканей пародонта в слюне ещё появляются матриксные металлопротеиназы.

*Ингибиторы протеиназ.* Слюнные железы являются источником большого количества секреторных ингибиторов протеиназ. Они представлены преимущественно *слюнными цистатинами*.

Низкомолекулярные ингибиторы способны подавлять активность калликреина, трипсина, эластазы и катепсина G и выдерживают нагревание до 90 °С при кислых значениях рН, не теряя при этом своей активности.

Слюнные цистатины синтезируются в серозных клетках околоушных и поднижнечелюстных слюнных желез. Считается, что через ингибирование активности цистеиновых протеиназ слюнные цистатины выполняют антимикробную и противовирусную функции и защищают белки слюны от ферментативного расщепления.

В смешанную слюну человека из плазмы крови попадают  $\alpha$ -ингибитор протеиназ ( $\alpha_1$ -антитрипсин) и  $\alpha_2$ -макроглобулин.

Ингибитор -  $\alpha_2$ -макроглобулин ингибирует любые протеиназы. Он синтезируется в печени и в слюне определяется только у 10% обследуемых здоровых людей.

*В записную книжку врача*

Комплексы ингибиторов протеиназ с протеолитическими ферментами

В смешанной слюне большая часть ингибиторов протеиназ находится в комплексе с протеолитическими ферментами, и только небольшое количество в свободном состоянии. При воспалении количество свободных ингибиторов в слюне уменьшается, а находящиеся в комплексах ингибиторы подвергаются частичному протеолизу и теряют свою активность. Поскольку слюнные железы крупного рогатого скота являются источником ингибиторов протеиназ, то их используют для получения лекарственных препаратов «Трасилол», «Контрикал», «Гордокс» и др.

*Карбоангидраза* синтезируется в ацинарных клетках околоушных и поднижнечелюстных слюнных желез и в составе секреторных гранул выводится в слюну. Фермент регулирует буферную емкость слюны, присутствует в приобретенной пелликуле эмали и сохраняет свою ферментативную активность на поверхности зуба. Ускоряя удаление кислот с поверхности зуба, карбоангидраза защищает эмаль зубов от

деминерализации. Низкие концентрации карбоангидразы в слюне обнаруживаются у людей с активным кариозным процессом.

Роль белков слюны в образовании биопленки на тканях полости рта

Все поверхности твердых и мягких тканей ротовой полости покрыты пелликулой, состоящей в основном из компонентов слюны. Пелликула обеспечивает смазку, увлажнение тканей и регуляцию состава микрофлоры. В состав пелликулы входят не только слюнные белки и пептиды, но и другие молекулы, экспрессируемые эпителиальными клетками. Часть из них, а также гликолипиды могут служить рецепторами адгезии для бактерий и обеспечивать их прикрепление. В ее составе присутствуют антимикробные пептиды -  $\beta$ -дефензины и кальпротектин, препятствующие внедрению микроорганизмов в мягкие ткани.

Зубной налет. Осаждение клеток и остатков пищи из слюны на пелликулу приводит к формированию зубного налета - рыхлого белого биоматериала, образующегося на зубах из бактерий, слущенного эпителия, лейкоцитов и остатков пищи. Со временем зубной налет стареет, и его состав меняется. По мере старения зубного налета начинает преобладать анаэробная микрофлора, для которой характерны высокая ферментативная активность и образование органических кислот. Зубной налет на 78-80% состоит из воды, в которой растворены микро- и макроэлементы, белки и углеводы (20%). Содержание неорганических веществ варьирует, и по мере старения зубного налета количество кальция и фосфора продолжает расти. Помимо макроэлементов, в зубном налете присутствуют и микроэлементы - Sr, Fe, Mg, Mn, F и др. Содержание фтора может быть в десятки и даже сотни раз больше, чем в слюне, и достигать 6-180 мкг/г, что в значительной мере зависит от уровня фтора в воде. Фтор присутствует в виде фторида кальция  $\text{CaF}_2$ , связывается с белками матрикса зубного налета и проникает внутрь бактерий, вызывая их гибель. В незрелом зубном налете присутствуют глицерофосфолипиды, триацилглицеролы и холестерол. По мере созревания зубного налета появляются гликолипиды.

Бактерии способны прилипнуть не только к эмали зуба, но и к разным поверхностям ротовой полости. Адгезия микроорганизмов происходит за счет ван-дер-ваальсовых сил, образования сшивок с помощью ионов кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ), гидрофобных взаимодействий и водородных связей. На образованной первичной колонии происходит коадгезия, т.е. фиксация нового слоя

бактерий, и формируется вторичная колонизация. Взаимодействие первичной и вторичной колоний осуществляется зачастую с использованием белково-углеводных (лектиноподобных) связей, и в результате формируются пространственно-ориентированные группы микроорганизмов.

#### *В записную книжку врача* Коагрегация бактерий

Расположение бактерий обеспечивает метаболические взаимодействия между ними. Например, стрептококки после утилизации глюкозы освобождают из клетки лактат, который утилизируют вейлонеллы, поэтому вблизи клеток микроорганизмов среда защелачивается, что способствует расщеплению еще большего количества углеводов с последующим ростом количества молочной кислоты, т.е. активация метаболических процессов в анаэробных условиях в *S. mutans* и других бактериях неизбежно приводит к развитию патологии в твердых тканях зубов или воспалению в мягких тканях пародонта.

#### Формирование бактериями липких полисахаридов

Зубной налет отличается высокой метаболической активностью. По мере роста зубного налета на порядок увеличивается активность гликозидаз и других ферментов.

При участии бактериальных гликозилтрансфераз образуются липкие полисахариды (гликаны), которые адсорбируются на поверхности зуба. В прилипании микроорганизмов участвуют гликаны - леваны и декстраны и гликансвязывающий белок (рис. 26-6).

В синтезе леванов осуществляют бактериальные *фруктозилтрансферазы*, а декстрана - *глюкозилтрансферазы*. Они переносят остатки глюкозы от сахарозы.



#### *Преципитация бактерий*

Рис. 26-6. Схема образования липких полисахаридов в зубном налете

*Леван* - полисахарид, состоящий из остатков фруктозы, связанных  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6)-гликозидными связями, и соединенный с молекулой сахарозы (рис. 26-7а). *Молекула декстрана* - разветвленный полисахарид, образованный остатками  $\alpha$ -D-глюкозы, соединенных  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) и  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3)-гликозидными связями (рис. 26-7б).

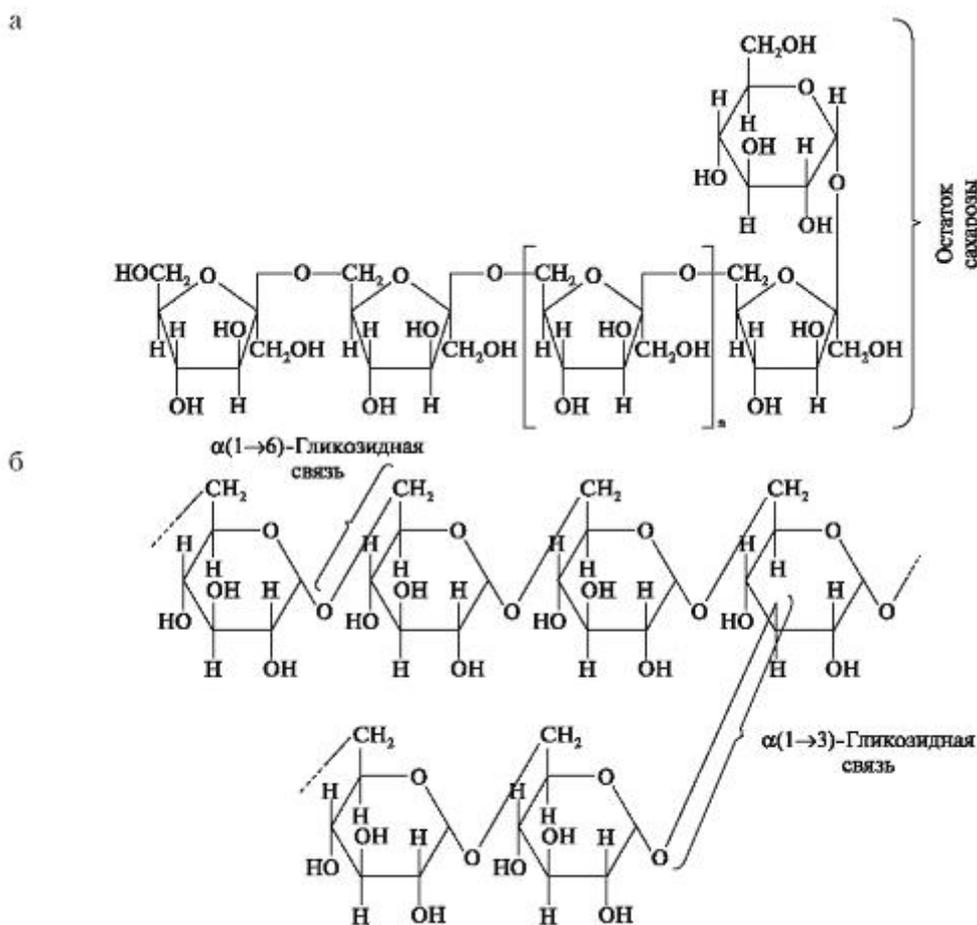


Рис.26-7. Структурная формула молекул: а - левана; б - декстрана

Молекулы декстрана достаточно долго сохраняются в зубном налете, в то время как молекулы левана легко растворимы и быстро гидролизуются леваназой некоторых стрептококков.

Липкие полисахариды помогают бактериям занять определенное место в зубном налете и обеспечивают их адгезию к эмали. Связь поверхности апатитов эмали с полисахаридами бактерий обеспечивают водородные связи, ионы кальция и белки адгезины. К белкам адгезинам относится гликопротеин с молекулярной массой 200 кДа, который выделяется стрептококками.

*В записную книжку врача*

### Короткоцепочечные органические кислоты

Бактерии способны утилизировать углеводы, аминокислоты с образованием короткоцепочечных органических кислот - уксусной, пропионовой, масляной, молочной. Их накопление, особенно масляной кислоты, являются одним из этиопатогенетических факторов развития пародонтита.

Зубной камень. Обызвествление зубного налета приводит к образованию зубного камня. В зависимости от расположения различают над- и поддесневой зубной камень. Они по своему составу сходны, но различаются по источникам поступления фосфорно-кальциевых соединений. В наддесневой камень минералы поступают из слюны, а в поддесневой из десневой жидкости.

В зубном камне определяется до 50% кальция, до 30% неорганического фосфата и около 0,5% магния. В следовых количествах присутствуют свинец, молибден, кремний, алюминий, стронций, кадмий, фтор и другие химические элементы.

Кальций и неорганический фосфат осаждаются на органической матрице в виде солей, и на начальных этапах в основном образуется *брушит* ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Помимо брушита образуются витлокит, монетит, октокальцийфосфат, гидроксиапатит и другие кристаллы. В структуре *витлокита* определяются безводный фосфат кальция  $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2$  и ионы  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ . *Октакальцийфосфат* -  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  является промежуточным связующим звеном между кислыми солями - монетитом, брушитом и гидроксиапатитом. Кристаллы октакальцийфосфата растут в форме тонких пластинок, содержат кислый фосфатный ион и не имеют гидроксильных групп. В зубном камне нередко присутствует другой кристалл - витлокит  $(\text{CaMg})_3(\text{PO}_4)_2$ .

Неорганические вещества в зубном камне связываются с белками, количество которых составляет от 0,1 до 2,5% и зависит от вида зубного камня. Наибольшее количество белка (2,5%) присутствует в светлом наддесневом зубном камне. В темном наддесневом камне количество белка снижается до 0,5%, а в поддесневом зубном камне до 0,1-0,3%. Помимо белков, в зубном камне обнаруживаются различные аминокислоты. В наибольшем количестве присутствуют аланин, лейцин, глицин, глутаминовая

и аспарагиновая кислоты, а также пролин, лизин, серин и треонин. Присутствующие аминокислотные остатки - глутамат и аспартат способны связывать ионы кальция, а остатки серина, треонина и лизина - фосфаты, что очень важно для инициации минерализации зубного налёта и дальнейшего образования зубного камня.

В зубном камне также присутствуют до 10% углеводов. Это гликозаминогликаны, галактоза, фруктоза, манноза и аминсахара. Содержание липидов в зубном камне невелико. Присутствующие глицерофосфолипиды, освобождаемые при распаде клеточных мембран микроорганизмов, связывают кальций и инициируют образование фосфорно-кальциевых солей, а в дальнейшем и гидроксиапатитов.

Образование зубного камня невозможно без молекул АТФ, которые, с одной стороны, необходимы для фосфорилирования органических соединений, а с другой стороны - при гидролизе АТФ освобождается ортофосфорная кислота, являющаяся компонентом кристаллов зубного камня.

## ДЕСНЕВАЯ ЖИДКОСТЬ

В десневой борозде содержится жидкость, которая выделяется через эпителий прикрепления и представляет собой физиологическую среду сложного состава.

В механизме образования десневой жидкости большое значение принадлежит морфологическим особенностям строения сосудов и эпителия десневой борозды. Концевые сосуды в этой области расположены под эпителием и параллельно ему. Это создает удобные условия для трансудации содержимого капилляров, включая даже некоторые белки крови в десневую борозду, а затем в ротовую полость.

Благодаря особенностям прикрепления эпителия, а именно широким межклеточным промежуткам и уменьшенному количеству десмосом, связывающих эпителиоциты, обеспечивается транспорт веществ через него в обоих направлениях. Из крови в просвет десневой борозды транспортируются электролиты, ряд белков - иммуноглобулины, компоненты системы комплемента, ферменты. В этих межклеточных пространствах выявляются многочисленные нейтрофильные гранулоциты, моноциты, которые мигрируют в десневую борозду из десны и являются источником дефензинов, лизосомных ферментов. В то же время из слюны и с

поверхности слизистой оболочки осуществляется массивное поступление антигенов в ткани внутренней среды, что, возможно, необходимо для адекватной стимуляции функции иммунной системы.

Количество десневой жидкости в норме невелико и зависит от времени суток (утром уменьшается, а вечером увеличивается), местоположения зуба, состояния пародонта. Появление патологических пародонтальных карманов (при воспалении пародонта) сопровождается увеличением количества десневой жидкости и изменением ее состава. Не следует упрощенно рассматривать десневую жидкость как среду, через которую вещества выходят только в полость рта. Скорее, это водная среда, окружающая зуб, которая определяет его амортизационные свойства в ответ на жевательную нагрузку. Поэтому любой сдвиг в количестве и составе десневой жидкости может сказаться в дальнейшем на функции и подвижности зубных рядов.

#### Состав десневой жидкости

Десневая жидкость в различных соотношениях содержит следующие компоненты:

- элементы плазмы крови;
- межклеточную жидкость тканей десны и пародонта;
- лейкоциты;
- микроорганизмы и их метаболиты.

В десневой жидкости определяются минеральные вещества и органические соединения. Хотя установлено, что десневая жидкость образуется в основном из плазмы крови, все-таки состав десневой жидкости несколько отличается от плазмы. Так, установлено, что количество ионов натрия и калия в десневой жидкости выше, чем в тканях десны, и значительно ниже, чем в плазме крови. При воспалении пародонта в десневой жидкости может увеличиваться и меняться соотношение ионов натрия и калия. В целом же деструкция тканей пародонта чаще сопровождается ростом количества ионов калия. В десневой жидкости также определяются кальций, фосфор, магний, цинк, сера, фтор, хлор. Интересно, что концентрация фтора в десневой жидкости и плазме крови одинакова, и предполагается, что десневая жидкость является одним из его источников в полости рта. Ионы кальция и

магния в десневой жидкости вызывают адгезию микроорганизмов и осаждение гликопротеинов на поверхности эмали, что играет определенную роль в формировании зубного налета.

#### Белки и ферменты десневой жидкости

Установлено, что белковый состав десневой жидкости и сыворотки крови сходны. Количество общего белка в ней достигает 61-68 г/л. Оно не меняется при развитии пародонтита и не зависит от степени тяжести воспаления и гигиены полости рта. В десневую жидкость из плазмы крови поступают альбумин и глобулины. Изменение количества иммуноглобулина G, а также появление иммуноглобулинов M и A, рост числа полиморфно-ядерных лейкоцитов с активацией системы комплемента следует рассматривать как часть системы клеточно-гуморального ответа в ответ на агрессивную микрофлору, появляющуюся в полости рта. Присутствующие все 9 компонентов системы комплемента играют важную роль в фагоцитозе, хемотаксисе и освобождении вазоактивных веществ.

Считается, что через образование пленки натяжения на соприкасающихся поверхностях белки десневой жидкости участвуют в соединении эпителия десневого желобка с поверхностью зуба. В формировании этой пленки участвуют белки клеточной адгезии типа фибронектина, а также белок фибрин. Препятствуют образованию плотной фибриновой пленки белки системы фибринолиза - плазмин, плазминоген и его активаторы.

В норме активность ферментов в десневой жидкости невелика. В ней определяется присутствие кислой и щелочной фосфатаз, гиалуронидазы,  $\beta$ -глюкуронидазы, арилсульфатазы, лизоцима, нитратредуктазы, малатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, трансаминаз, ферментов гликолиза.

При деструктивно-воспалительных изменениях в тканях пародонта в десневой жидкости повышается активность протеолитических ферментов, в том числе матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов. Матриксные металлопротеиназы (эластаза, коллагеназа), участвуя в гидролизе коллагена, эластина, иммуноглобулинов и многих других белков межклеточного матрикса, разрушают периодонтальные связки и костную ткань пародонта.

При деструкции тканей пародонта под действием протеиназ бактерий происходит разрастание клеток эпителия, завершающееся формированием глубокого пародонтального кармана.

## ЛИМФА

Лимфа образуется за счет тканевой жидкости, проникающей в лимфатические капилляры. По своему составу лимфа близка к плазме крови. В ней присутствуют клеточные элементы, белки, липиды, низкомолекулярные соединения (аминокислоты, глюкоза, глицерол, электролиты). У человека количество воды в лимфе составляет приблизительно 2/3 его веса, а минеральных солей достигает 0,8-0,9%, которые представлены преимущественно NaCl и в меньшей степени Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Помимо ионов хлора, карбонатов, в лимфе содержится весьма значительное количество неорганического фосфора, магния, кальция и железа.

Лимфатическая жидкость по сравнению с плазмой крови бедна белками. В ней преобладают альбумины над глобулинами, в небольшом количестве определяются факторы свертывания крови, антитела и активность ферментов - α-амилазы и липазы.

Из азотосодержащих соединений в лимфе большую часть составляет мочевины. Количество глюкозы невелико и не превышает 0,1% общего количества. Холестерол, фосфолипиды и триацилглицеролы находятся в лимфе в составе хиломикроннов и зависят от количества жиров, поступивших в лимфу из кишечника. Между приемами пищи содержание липидов в грудном протоке минимально.

*В записную книжку врача*

Изменение количества лимфы

Образование лимфы может быть сильно увеличено введением некоторых веществ. К числу их относятся пептоны, экстракты различных органов, желчь, концентрированные растворы хлористого натрия, мочевины и некоторые другие вещества.

## СПИННОМОЗГОВАЯ ЖИДКОСТЬ

В спинном и головном мозге человека циркулирует бесцветная и прозрачная жидкость в количестве 200-400 мл. Она получила название *спинномозговой жидкости* (*цереброспинальная жидкость* или *спинномозговой ликвор*). В ней

мало форменных элементов, которые преимущественно представлены лимфоцитами.

В составе спинномозговой жидкости определяются органические и неорганические вещества. В ней присутствует большое количество хлоридов и магния и несколько меньше калия, кальция, фосфора. Углеводы на 90% представлены глюкозой, а остальные 10% - декстрозой. Количество белка колеблется от 120 до 430 мг/л, и при электрофорезе определяется несколько белковых фракций. Содержание иммуноглобулинов А, М и G в 3-4 раза меньше, чем в плазме крови.

В спинномозговой жидкости выявляется от 20 до 25 свободных аминокислот и мочевины. В ней содержится лактат, и присутствуют ферменты - альдолаза, лактатдегидрогеназа и ее изоферменты. В норме количество липидов в спинномозговой жидкости незначительно, и в основном определяются следы холестерина.

С возрастом белковый спектр спинномозговой жидкости изменяется. Так, если для детей характерно низкое содержание альбуминов и повышенное содержание преальбуминов, то у лиц пожилого возраста растут фракции иммуноглобулинов А и G, и уменьшается IgM. Воспалительные процессы в нервной системе сопровождаются увеличением в спинномозговой жидкости количества белка и форменных элементов.

Особенностью спинномозговой жидкости является присутствие биологически активных веществ различной химической природы. Это нейромедиаторы - ацетилхолин, норадреналин, дофамин, серотонин, гамма-аминомасляная кислота, гормоны гипофиза, эпифиза, а также нейропептиды - эндорфины, энкефалины, циклические нуклеотиды - цАМФ и цГМФ, простагландины и кинины.

*В записную книжку врача*

Использование спинномозговой жидкости в диагностике заболеваний мозга

Спинномозговая жидкость - «ценное диагностическое окно» в центральную нервную систему. В силу своего непосредственного контакта с внеклеточным пространством мозга она намного лучше, чем другие биологические жидкости организма (кровь, моча), отражает биохимические изменения, происходящие в мозге. Спинномозговая жидкость является источником

специфических белков мозга (амилоид-бета, тау-белок), а также различных нейромедиаторов и их метаболитов, изменения уровней которых наблюдаются при таких заболеваниях, как рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, аутизм, наследственные нарушения обмена нейромедиаторов и др.

## МОЧА

### Образование мочи

Образование мочи в почках можно разбить на три этапа. *На первом этапе* в почечных клубочках происходит клубочковая (или гломерулярная) фильтрация безбелковой жидкости из плазмы крови в капсулу почечного клубочка. В фильтрации участвуют клетки внутреннего листка капсулы (подоциты), эндотелий и базальная мембрана, которая образована коллагеном IV типа в виде молекулярного сита и является общей для капилляров и подоцитов. Через образующиеся фильтрационные щели проходят молекулы с массой не более 50 кДа. Ежедневно гломерулы фильтруют 180 л приносимой плазмы крови. В результате ультрафильтрации плазмы крови в клубочках образуется *первичная моча*. В первичную мочу собираются молекулы с молекулярной массой до 60 кДа, и белок в ней практически отсутствует. О фильтрационной способности почек судят на основании величины *клиренса* (очищения) от эндогенных (креатинина) или специально вводимых веществ по количеству миллилитров плазмы, способной полностью освободиться от данного вещества при прохождении его через почку за 1 мин. *На втором этапе* происходит канальцевая реабсорбция - процесс обратного всасывания профильтровавшихся веществ и воды. *На третьем этапе* клетки некоторых отделов канальца переносят из внеклеточной жидкости в просвет нефрона (секретируют) ряд органических и неорганических веществ либо выделяют в просвет канальца молекулы, синтезированные в клетке канальца. На втором и третьем этапах в проксимальных канальцах происходит всасывание воды и растворенных в ней ионов  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ . Первичная моча при этом концентрируется.

Всасывание воды происходит пассивно вслед за активно транспортируемыми ионами натрия. Клетки проксимальных канальцев реабсорбируют также из первичной мочи глюкозу, аминокислоты, витамины. В дистальных канальцах происходит дополнительная реабсорбция  $\text{Na}^+$ . Всасывание воды здесь независит от ионов натрия. В просвет канальцев секретируются ионы  $\text{K}^+$ ,

$\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}^+$ . В процессе секреции калий из межклеточной жидкости поступает через базальную плазматическую мембрану в клетку канальца за счет работы  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ -АТФазы, а затем пассивно, путем диффузии, выделяется в просвет канальца нефрона через апикальную клеточную мембрану. В медуллярном отрезке собирательных трубочек идет окончательное концентрирование мочи.

Лишь 1% жидкости, профильтрованной почками, превращается в мочу. Вода в собирательных трубочках реабсорбируется с помощью белков *аквапоринов*. На сегодняшний день известны 11 членов семейства аквапоринов. Аквапорины-0, -1, -2, -4, -5, -8, -10 избирательно пропускают воду, аквапорины-3, -7, -9 воду, глицерол и мочевины, а аквапорин-6 только нитраты.

Почки участвуют в поддержании кислотно-основного равновесия в организме за счет выведения которые связываются с  $\text{NH}_3$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , а также реабсорбции  $\text{HCO}_3^-$  (рис. 26-8).

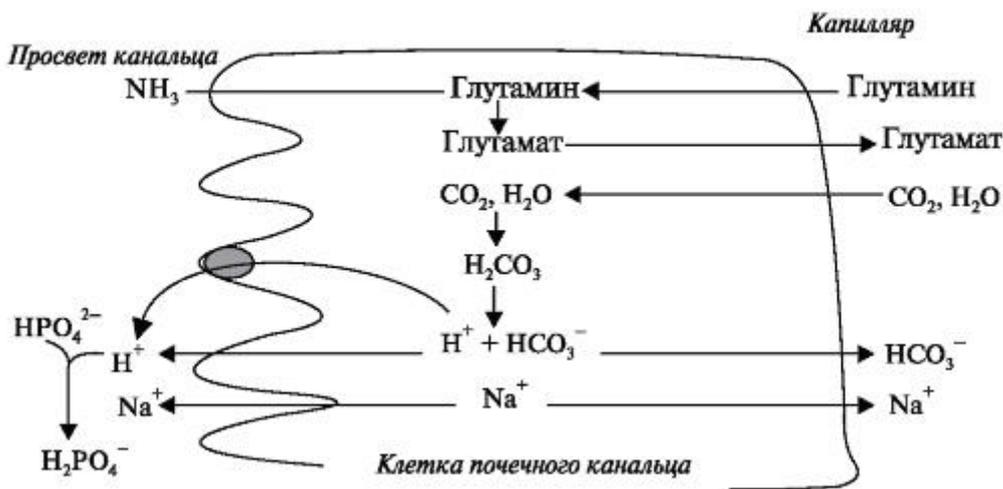


Рис. 26-8. Реабсорбция и секреция ионов в клетке канальца почки

Выделившаяся моча с физико-химической точки зрения представляет ультрафильтрат плазмы крови. Ежесуточное количество конечной (или вторичной) мочи, обладающей многократно более высокой осмотической активностью, чем первичная, составляет в среднем 1,5 л. Выделение веществ почками имеет суточный ритм - днем выше, чем ночью. Концентрация отдельных компонентов мочи здоровой почки в течение нескольких часов изменяется в 5-20 раз и во многом зависит от сосудистого тонуса.

В организме человека есть две взаимосвязанные системы протео-литических ферментов, в результате работы которых регулируются сосудистый тонус и водно-солевой обмен - *ренин-ангиотензин-альдостероновая и кининовая*. Активация обеих систем сводится к синтезу биологически активных низкомолекулярных пептидов из их предшественников путем реакций ограниченного протеолиза (см. главы 16, 21).

В почках в клетках юстагломерулярного аппарата синтезируется протеолитический фермент - *ренин*. Ренин превращает ангиотензиноген в декапептид ангиотензин I.

Дальнейший гидролиз ангиотензина I *ангиотензинпревращающим ферментом* с отщеплением двух аминокислотных остатков приводит к образованию ангиотензина II, который вызывает сужение периферических артерий и стимулирует синтез и секрецию альдостерона (рис. 26-9).

Альдостерон усиливает реабсорбцию ионов натрия и воды в почечных канальцах, что приводит к увеличению объема крови, циркулирующей в сосудах. Катаболизм ангиотензина II осуществляется очень быстро ферментом *ангиотенгиназой*, который синтезируется многими тканями. Из ангиотензина II при участии *аминопептидазы* образуется ангиотензин III.

Ангиотензиноген  
(глобулярный белок)

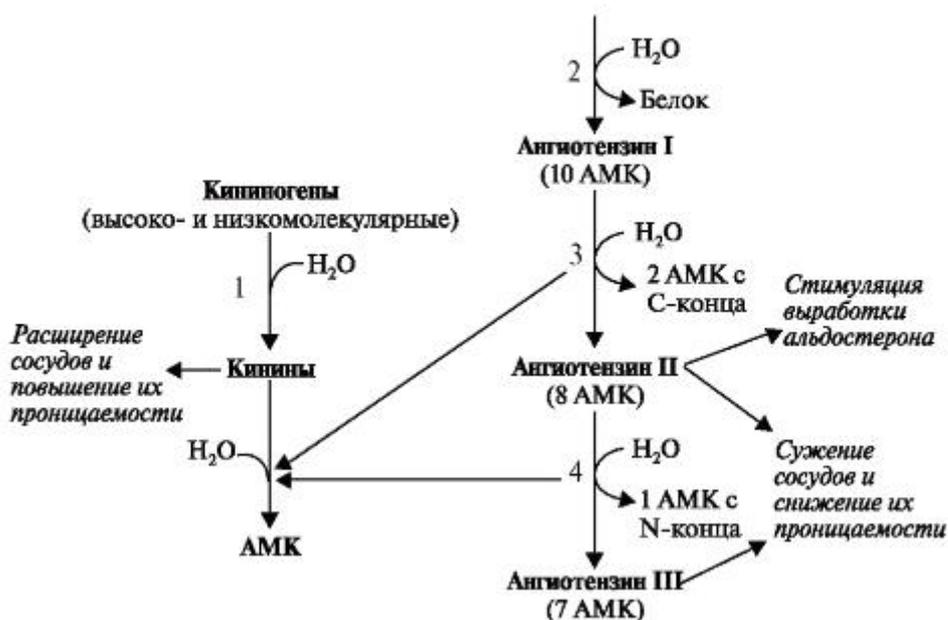


Рис. 26-9. Схема образования ангиотензиноактивных пептидов в почках. АМК-аминокислоты. Ферменты: 1 - калликреин; 2 - ренин; 3 - ангиотензин-превращающий фермент; 4 - аминопептидаза

Выработка ренина зависит от кровоснабжения почек, поэтому при снижении артериального давления выработка ренина увеличивается, а при повышении - снижается. При патологии почек наблюдается повышенная выработка ренина и может развиваться стойкая гипертензия (повышение артериального давления).

*Ренин-ангиотензин-альдостероновая* система работает в тесном контакте с другой системой регуляции сосудистого тонуса: *калликреинкининовой*. В печени синтезируется белок *кининоген*, который в тканях под действием сериновых протеиназ - *калликреинов*, превращается в вазоактивные пептиды - кинины: *брадикинин* и *каллидин*. Брадикинин и каллидин обладают сосудорасширяющим эффектом, что сопровождается снижением артериального давления. В гидролизе кининов участвуют ангиотензинпревращающий фермент и аминопептидаза. Тем самым регулируется соотношение расширения и сужения сосудов.

*В записную книжку врача*

Применение ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента в клинике

Для понижения артериального давления, особенно стойкой при поражении почек, назначаются препараты, ингибирующие ангиотензинпревращающий фермент, - «Энап» и др.

Физико-химические свойства мочи

Объём мочи за сутки в норме колеблется от 500 до 2500 мл и зависит от количества принятой воды и пищи, потерь воды с дыханием, потом и каловыми массами. При употреблении пищи с высоким содержанием азота объём мочи увеличивается, так как для выведения азотсодержащих метаболитов необходимо много жидкости. Соотношение между дневным и ночным диурезом в норме составляет 4:1-3:1. Нарушение этого соотношения называется *никтурией* и наблюдается при различных заболеваниях почек и сердца. Выделение суточной мочи в объеме менее 400 мл указывает на *олигурию*, менее 100 мл на *анурию*, более 2,5 л - *наполиурию*. Длительная анурия ведет к отравлению азотсодержащими веществами - *уремии*. Задержка выделения мочи наблюдается при тяжелых поражениях паренхимы почек, мочекаменной болезни (при закупорке мочеточника), отравлениях тяжелыми металлами, сильном эмоциональном стрессе.

*Плотность мочи* в норме составляет 1,015-1,022 г/л. В течение суток она колеблется в довольно широких пределах и зависит от объема образующейся мочи. Постоянно низкие значения удельной плотности указывают на

нарушение концентрационной функции почек, что наблюдается при хроническом нефрите и сморщенной почке.

*Изостенурия* (выделение мочи с одинаковой относительной плотностью) свидетельствует о тяжелой почечной недостаточности. При *несахарном диабете* выделяется большое количество мочи с низкой плотностью (1,001-1,004 г/л), что связано с нарушением реабсорбции воды в канальцах. При *сахарном диабете*, несмотря на большой объем мочи, она имеет высокую плотность (*гиперстенурия*) из-за присутствия в ней осмотически активного вещества - глюкозы. Высокая плотность мочи определяется при *олигурии*, которая характерна для такого заболевания, как острый нефрит.

*Цвет мочи* в норме благодаря присутствию пигментов *урохрома, уробилина, уроэритрина* имеет различные оттенки желтого, и может значительно изменяться в зависимости от наличия в ней тех или иных красящих веществ. Розово-красный цвет наблюдается при гематурии и гемоглобинурии, после приема амидопирина, антипирина, сантонина и некоторых других препаратов; ярко-желтый - после приема рибофлавина; коричневый или красно-бурый - при высокой концентрации уробилина и билирубина; зеленый или синий - при введении в организм метиленового синего, усилении процесса гниения белков в кишечнике (образующееся большое количество индоксилсерной кислоты разлагается с образованием синего индиго).

В норме моча *прозрачна*, но при длительном стоянии образуется легкий осадок. Мутность мочи обуславливается присутствием микроорганизмов при воспалительных процессах в мочевой системе, эпителиальных клеток, слизи, крови, усиленном выведении солей.

У человека, питающегося смешанной пищей, моча имеет слабокислую реакцию (рН 5,3-6,5), причем преимущественно мясная пища делает мочу более кислой, молочно-растительная диета - щелочной. В моче, имеющей кислую реакцию, присутствуют главным образом однозамещенные фосфаты калия и натрия. В моче с щелочным значением рН преобладают двузамещенные фосфаты или бикарбонаты калия и натрия. Снижение рН мочи наблюдается при *кетонурии* (сахарный диабет, голодание).

Защелачивание мочи происходит при воспалительных процессах в мочевыводящих путях (из-за разложения мочевины микроорганизмами с

образованием аммиака), приеме щелочных минеральных вод, питьевой соды и некоторых лекарственных препаратов. Реакция мочи влияет на характер солеобразования при мочекаменной болезни: при рН ниже 5,5 чаще образуются мочекислые (уратные) камни, при рН от 5,5 до 6,0 - оксалатные, при рН выше 7,0 - фосфатные камни.

#### Химический состав мочи

Составными частями мочи являются конъюгаты серной и глюкуроновой кислот, глицина и других полярных соединений, которые образуются в печени путём биотрансформации и затем поступают в мочу.

В моче можно обнаружить большое количество разнообразных веществ. Выведение ингредиентов мочи подвергается циркадным ритмам. Например, экскреция фосфатов максимальна вечером (около 20 часов), минимальная утром (около 6 часов). Поэтому эти вещества необходимо исследовать в суточном количестве мочи.

#### Неорганические компоненты мочи

В моче присутствуют практически все минеральные вещества, входящие в состав крови и тканей организма. Из общего количества сухого остатка, образующегося при выпаривании суточного количества мочи, на долю минеральных компонентов приходится 15-20 г. В моче определяются ионы натрия, калия, хлора, кальция, магния, а также бикарбонаты, фосфаты, сульфаты, аммиак. Количество бикарбонатов в моче в значительной мере коррелирует с величиной рН мочи. При рН 5,6 с мочой в сутки выделяется бикарбонатов 0,5 ммоль/л, при рН 6,6 в мочу поступает 6 ммоль/л, а при рН 7,8 уже 9,3 ммоль/л. Кислая реакция мочи зависит главным образом от присутствия однозамещенных фосфатов.

Из минеральных солей больше всего с мочой выделяется хлористый натрий (8-15 г/сут). Сера аминокислот метионина и цистеина после окисления до  $\text{SO}_4^{2-}$  удаляется либо непосредственно в виде неорганического сульфата, либо в составе его эфиров.

#### Органические компоненты мочи

В составе мочи можно определить следующие *органические компоненты* - мочевины, креатинин, аминокислоты (глицин, гистидин, глутамин, аланин, серин), мочевую, гиппуровую, щавелевую, молочную, лимонную, масляную

и другие кислоты. Общее содержание органических кислот в суточном количестве мочи обычно не превышает 1 г.

В норме в моче имеется незначительное количество белка (25-70 мг), которое не обнаруживается обычными качественными пробами, поэтому до сих пор считается, что белка в моче нет. Однако современными методами протеомного анализа в моче удается выявить до 1500 белков.

Количество мочевины в моче непосредственно связано с интенсивностью обмена белков. Так, при распаде в организме 70 г белка с мочой выделяется 30 г мочевины. Количество выделяющейся мочевины увеличивается при употреблении высокобелковой пищи, усиленном распаде тканевых белков, что встречается при злокачественных опухолях, лихорадке, гипертиреозе. Снижение количества мочевины наблюдается при нарушении азотвыделительной функции почек и заболеваниях печени.

*Мочевая кислота* - конечный продукт распада пуриновых азотистых оснований, выделяется около 0,7 г за сутки. Ее количество возрастает при потреблении продуктов с высоким содержанием нуклеиновых кислот (например, икра рыб), при таких тяжелых заболеваниях, как лейкемия и подагра.

Содержание *креатинина* в моче отражает активность метаболических процессов в мышечной ткани. Поскольку ежедневно выделяемое количество креатинина является постоянной величиной для каждого человека (оно прямо пропорционально его мышечной массе), креатинин может служить маркером интенсивности почечной фильтрации.

*Креатин* в моче взрослого человека практически отсутствует. У грудных младенцев он обнаруживается вследствие его *избыточной продукции* в растущей мышечной ткани, а у пожилых людей как результат атрофии мышц, *теряющих способность использовать* креатин. Определение количества креатина имеет особое диагностическое значение при миопатиях (прогрессирующей мышечной дистрофии), а также при заболеваниях печени и эндокринной патологии. Присутствие креатина в моче обозначается термином *креатинурия*.

Количество выделяемых с мочой *свободных аминокислот* зависит от питания и функционального состояния печени (в норме в среднем выделяется 1,1 г). В моче определяются также производные аминокислоты глицина и бензойной кислоты - *гиппуровая кислота* (0,7 г/сут). В большем количестве она содержится в моче вегетарианцев, так как в растительной пище много

ароматических соединений, являющихся предшественниками бензойной кислоты.

Нарушение функции печени сопровождается снижением образования гиппуровой кислоты, эта реакция положена в основу функциональной печеночной пробы Квика-Пытеля (см. главу 15).

Диагностическое значение может иметь определение в моче аминокислот, которые встречаются только в определенных белках, например, гидроксипролин в коллагене или 3-метилгистидин в актине и миозине. Эти аминокислоты могут также служить индикаторами интенсивности катаболизма белков. Исследования присутствия некоторых аминокислот в моче используются для диагностики *врожденных нарушений аминокислотного обмена*.

На основании количественного определения *метаболитов* многих *гормонов* (катехоламинов, стероидов, серотонина), содержащихся в моче, можно судить об интенсивности продукции и распада гормонов в организме.

Патологические компоненты мочи

В отобранной для анализа патологически измененной моче образуется выраженный мочевой осадок, в состав которого могут входить клеточные элементы: эритроциты, лейкоциты, бактерии, а также соли и цилиндры, выпавшие в осадок в виде кристаллов или аморфных соединений («неорганизованный осадок мочи»). К последним относятся: мочевая кислота (ее содержание повышается на 25-30% при подагре), ее соли, оксалаты, гиппуровая кислота, аморфные фосфаты, карбонат кальция, ксантин, которые способствует камнеобразованию, холестерин и другие компоненты, отвечающие разным видам патологии.

*Гипераминоацидурия* является следствием нарушений метаболизма аминокислот в организме, в случае которой наблюдается повышенное выделение аминокислот с мочой. Гипераминоацидурия наблюдается при патологических состояниях, вызванных белковым голоданием, раневым истощением, тяжелыми ожогами, кахектической стадией злокачественных новообразований, болезнью Иценко-Кушинга, либо носят наследственный характер вследствие нарушения реабсорбции аминокислот в почечных канальцах, например при синдроме Фанкони, гепатоцеребральной дистрофии.

*Гипераргининурия* (повышенное содержание аргинина в моче) наблюдается при дефекте фермента *аргиназы* в печени. Увеличение содержания аргинина в моче также сопровождается повышением количества в моче лизина и орнитина.

*Гематурия* - появление эритроцитов в моче. Она бывает двух видов: внепочечная - при травмировании мочевыводящих путей, и почечная, вследствие нарушения проницаемости почечных клубочков при остром нефрите.

*Гемоглобинурия* - наличие гемоглобина в моче, встречается при тяжелом внутрисосудистом гемолизе.

*Глюкозурия* встречается при превышении максимума реабсорбции глюкозы (около 10 ммоль/л) в почечных канальцах (например, при сахарном диабете), когда выделение глюкозы с мочой может достигать нескольких граммов в сутки. Помимо сахарного диабета, глюкозурия может встречаться у больных тиреотоксикозом, сильном стрессе, назначении глюкокортикоидов.

Глюкозурия, причиной которой является дефект транспортной системы почечных канальцев, называется *ренальным диабетом* (уровень глюкозы в крови при этом в норме). Наличие глюкозы в моче при отсутствии избыточного употребления сахара и богатых им продуктов, инфузионной терапии растворами глюкозы указывает на нарушения его реабсорбции в проксимальном отделе нефрона (тубулопатиях, интерстициальном нефрите). В моче могут присутствовать в определяемых количествах пентозы, фруктоза, галактоза (при врожденной недостаточности ферментов их метаболизма), что необходимо помнить при исследовании мочи. Их появление может искажать значение истинной глюкозурии.

*Желчные пигменты*. В норме моча содержит ряд желчных пигментов, но концентрация *билирубина* в ней крайне низка. Резкое возрастание количества билирубина в моче, которая при этом приобретает «цвет пива», наблюдается при механической желтухе. Увеличение его концентрации характерно и для паренхиматозной желтухи. *Свободный билирубин* может появляться в моче одновременно с протеинурией только при тяжелом нарушении клубочковой фильтрации.

При заболеваниях печени нарушена экскреция желчи, и в кишечнике всасывается меньшее количество *мезобилиногена*. Однако даже это

небольшое количество поступающего в печень мезобилиногена не усваивается ею, и этот мезобилиноген попадает в кровь, а затем выделяется с мочой. Поэтому в клинической практике обычно исследуют не количество уробилинов в моче, а присутствие мезобилиногена (уробилиногена). Положительная реакция на уробилиноген может быть также в тяжелых случаях гемолитической желтухи.

*Кетонурия* - появление в большом количестве в моче кетоновых тел (ацетоацетата,  $\beta$ -гидроксимасляной кислоты). Кетонурия бывает резко выражена при декомпенсированном сахарном диабете, длительном голодании и низкоуглеводном питании, а также при инфекционных заболеваниях.

*Кристаллурия* - появление в моче нерастворенных кристаллических соединений фосфата кальция, магниев-аммонийных фосфатов, уратов. Это свидетельствует о развитии мочекаменной болезни. Вследствие затруднения выделения мочи, в мочевыводящих путях развивается инфекция, в мочу выходят эритроциты (гематурия). Нарушение транспорта белков в почечных канальцах при уролитиазе ведет к 20-30-кратному выделению с мочой цистеина, лизина, аргинина и орнитина.

*Алкаптонурия (гомогентизинурия)* характеризуется резким увеличением содержания в моче метаболита тирозина - гомогентизиновой кислоты. Она появляется из-за недостаточной активности *оксидазы го-могентизиновой кислоты*. Такая моча при стоянии на воздухе приобретает темный цвет.

*Порфиринурия* наблюдается при злокачественной анемии и заболеваниях печени, когда количество порфиринов в моче может увеличиваться на порядок и выше. Существуют врожденные порфирии, при которых характерна избыточная продукция некоторых порфиринов, и они также из крови попадают в мочу. При стоянии на свету такая моча приобретает красный цвет.

*Протеинурия* - увеличение количества белка в моче. Наблюдается при заболеваниях почек, которые сопровождаются структурно-функциональным нарушением гломерулярных мембран, например, при нефритах и нефрозах. Физиологическая протеинурия (до 0,033 г/л белка в разовых порциях мочи или 30-50 мг/л в суточной) может быть при лихорадочных состояниях, стрессе, физической нагрузке, введении нор-адреналина. Патологическая

протеинурия может колебаться от слабо выраженной (150-500 мг/сут) до выраженной (более 2000 мг/сут) и зависит от формы заболевания и его тяжести. Большое диагностическое значение имеет и исследование качественного состава белка в моче при протеинурии. Чаще всего это белки плазмы крови, которые прошли через поврежденный клубочковый фильтр.

Через мембрану почечных клубочков в норме большая часть белков не проходит, что объясняется большим размером белковых молекул, а также их зарядом и строением. При минимальных повреждениях в клубочках почек наблюдается, прежде всего, потеря преимущественно *альбумина* - *альбуминурия*. Различают альбуминурию почечную как результат повреждения нефрона и внепочечную - при заболеваниях мочевыводящих путей или предстательной железы. При тяжелых нефропатиях почечный фильтр повреждается сильнее, поэтому состав белков мочи примерно соответствует составу белков плазмы.

*Цитруллинурия* - появление в моче цитруллина в результате недостаточности фермента синтеза мочевины в печени - *аргининсукцинатсинтетазы*. Цитруллин выявляется в моче у новорождённых при тяжелой гипераммониемии и у взрослых после белковой нагрузки.

*Фенилкетонурия* обусловлена наследственной недостаточностью печеночной печеночного фермента - *фенилаланингидроксилазы*, вследствие чего блокируется превращение *фенилаланина* в *тирозин*. Для обнаружения фенилаланина и его метаболитов в моче добавляет несколько капель хлорного железа. В этом случае через 2-3 мин моча окрашивается в оливково-зелёный цвет.

*Ферментурия*. В моче присутствуют ферменты - липаза,  $\alpha$ -амилаза, РНКазы, лактадегидрогеназа, кислая и щелочная фосфатазы. При ряде заболеваний их активность в моче возрастает. Так, при остром панкреатите резко увеличивается амилазная активность мочи

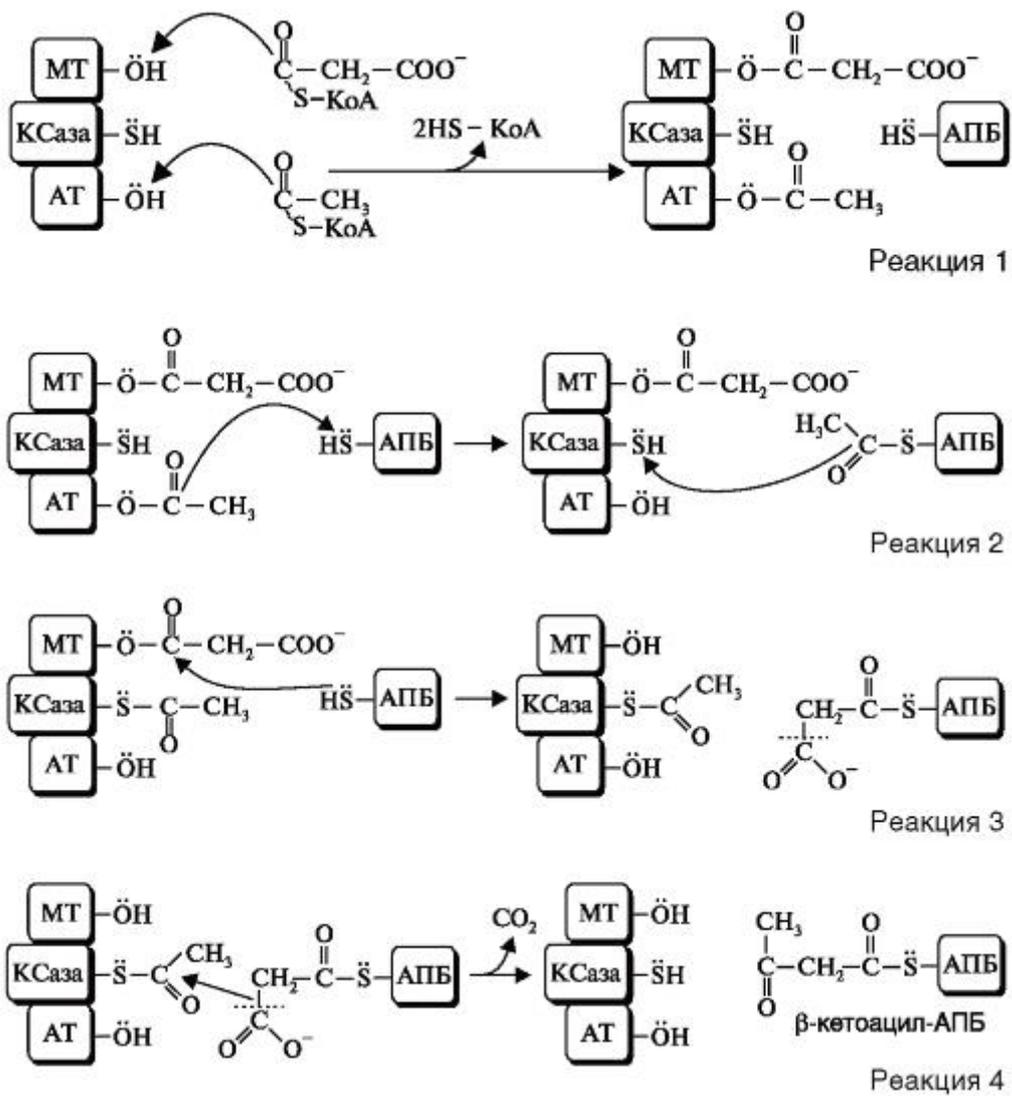


Рис. 14-21. Механизм удлинения углеводородной цепи в процессе синтеза пальмитиновой кислоты: реакция 1 - присоединение молекул малонил-КоА и

ацетил-КоА к ферментам первого домена одной цепи; реакция 2 - перенос ацетата на АПБ второго домена второй субъединицы; реакция 3 - перемещение ацетильного остатка в активный центр кетоацилсинтазы и перенос малонильного остатка на АПБ; реакция 4 - конденсация малонильного и ацетильного фрагментов с образованием  $\beta$ -кетоацила; МТ - малонилтрансфераза; КСаза -  $\beta$ -кетоацилсинтаза; АТ - ацетилтрансфераза - ферменты первого домена одной субъединицы пальмитатсинтазы; АПБ - ацилпереносающий белок второго домена другой субъединицы пальмитатсинтазы

