Ершов Ю.А.

Основы молекулярной диагностики.

http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970437230.html

ИздательствоГЭОТАР-Медиа

Год издания2016

Оглавление

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ 4
ПРЕДИСЛОВИЕ 5
ВВЕДЕНИЕ 6
Глава 1. ИНТЕГРАЛЬНЫЙ МЕТАБОЛОМ ЧЕЛОВЕКА 10
1.1. ИОННЫЙ И ГАЗОВЫЙ МЕТАБОЛОМ ЖИДКИХ СРЕД ОРГАНИЗМА 11
1.2. ЭЛЕМЕНТНЫЙ МЕТАБОЛОМ 40
1.2.1. Макро- и микроэлементы в среде и в организме человека 41
1.2.2. Топография важнейших биогенных элементов в организме человека 42
1.2.3. Биологическая роль химических элементов в организме 46
1.3. ВЕЩЕСТВЕННЫЙ МЕТАБОЛОМ ОРГАНИЗМА И ЕГО ПОДСИСТЕМ 51
1.3.1. Аминокислоты. Пептиды. Белки 51
1.3.2. Углеводы 67
1.3.3. Липиды (жиры) и мембраны 81
1.3.4. Нуклеотиды. Нуклеиновые кислоты 88
Глава 2. МЕТАБОЛИЗМ И МЕТАБОЛИТЫ 98
2.1. МЕТАБОЛИЗМ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ 98
2.2. КАТАБОЛИЗМ И АНАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ - ОСНОВНЫЕ ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ 101
2.3. МЕТАБОЛИЗМ И МЕТАБОЛИТЫ БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ 113
2.4. МЕТАБОЛИЗМ И МЕТАБОЛИТЫ ЛИПИДОВ И ЖИРНЫХ КИСЛОТ 120
2.5. МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕОТИДОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ 132
2.6. ИНТЕГРАЛЬНЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ. ВНУТРЕННИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПУТЬ. МЕЖСИСТЕМНЫЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПУТЬ 144
Глава 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕТАБОЛИТОВ 161
3.1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ АНАЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУР В МЕТАБОЛОМИКЕ 161
3.2. МЕТОДЫ АНАЛИЗА (ОБНАРУЖЕНИЯ) И ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА КОМПОНЕНТОВ ФРАКЦИЙ 162
3.2.1. Хроматография 162
3.2.2. Масс-спектрометрия 173
3.2.3. Хромато-масс-спектрометрия 177
3.2.4. Тандемная масс-спектрометрия 178
3.2.5. Электрофорез 179
3.2.6. Ядерно-магнитно-резонансная спектроскопия 181
3.2.7. Метод полимеразной цепной реакции 183
3.2.8. Секвенирование 187
3.2.9. Молекулярные детекторы на базе атомно-силовых чипов 188
3.3. ОБОБЩЕННЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ 190

Глава 4. МЕТАБОЛОМИКА 193
4.1. ГЕНОМИКА 198
4.1.1. Диагностика наследственных заболеваний 199
4.1.2. Структурная геномика. ДНК-диагностика 201
4.1.3. Методы ДНК-диагностики наследственных и приобретенных заболеваний 202
4.1.4. Функциональная геномика 206
4.2. ТРАНСКРИПТОМИКА И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТРАНСКРИПТОМИКИ 207
4.2.1. Транскриптомика 207
4.2.2. Клинические аспекты метаболизма нуклеотидов и нуклеиновых кислот 209
4.3. ПРОТЕОМИКА 213
4.3.1. Функциональная протеомика 216
4.3.2. Клинические аспекты протеомики 218
4.3.3. Патологии, обусловленные нарушениями аминокислотного обмена 221
4.3.4. Развитие молекулярной диагностики патологий, связанных с нарушениями обмена белков 240
4.4. ЛИПИДОМИКА 246
4.4.1. Клинические аспекты обмена липидов 247
4.4.2. Метаболизм холестерина 249
4.5. ГЛИКОМИКА 253
4.5.1. Гликогенозы 254
4.5.2. Гипергликемии 256
4.5.3. Сахарный диабет 257
4.5.4. Гипогликемии 264
4.5.5. Гексоземии 264
Глава 5. КСЕНОМЕТАБОЛОМИКА (КСЕНОБИОТИКИ) 265
5.1. ЛОКАЛИЗАЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ КСЕНОБИОТИКОВ 268
5.2. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ КСЕНОБИОТИКОВ 268
Глава 6. ТОКСИКОКИНЕТИКА 274
6.1. ТОКСИКОКИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ 274
6.2. ТОКСИКОГЕНОМИКА 281
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 282
ПРИЛОЖЕНИЕ 283
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ 289

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

Hb - гемоглобин

PSCA *(Prostate Stem Cell Antigen)* - антиген стволовых клеток предстательной железы

АДФ - аденозиндифосфат

АСМ - атомно-силовой микроскоп

АТФ - аденозинтрифосфат

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГАМК - γ-аминомасляная кислота

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ИМП - интегральный метаболический путь

ИФА - иммуноферментный анализ

ЛПВП - липопротеины высокой плотности

ЛПНП - липопротеины низкой плотности

ЛПОНП - липротеины очень низкой плотности

мИМП - межсистемный интегральный метаболический путь

НЭЖК - неэстерифицированные жирные кислоты

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК - рибонуклеиновая кислота

ТАГ - триацилглицериды

ФКУ - фенилкетонурия

ХМ – хиломикроны

ПРЕДИСЛОВИЕ

Метаболомика (от англ. *metabolomics,* греч. *metabolism + -omics* - «полный, целый, весь») - научная область, изучающая совокупность всех исходных, промежуточных и конечных продуктов метаболизма и их количественное содержание в организме.

Из промежуточных и конечных продуктов метаболизма строятся все клеточные субструктуры.

Метаболом - совокупность всех метаболитов (метаболический профиль), являющихся продуктами обмена веществ в клетках, тканях, органах и организме в целом.

Термин введен по аналогии с транскриптомикой и протеомикой. Метаболом меняется постоянно, так же как меняются транскриптом и протеом.

Транскриптомика (данные об экспрессии мРНК генов) и протеомика (данные протеомного анализа) не раскрывают полностью процессы, происходящие в клетке. Метаболические профили метаболомики дают мгновенный снимок составов, лежащих в основе физиологических процессов в организме. Соответственно, метаболомику можно рассматривать как раздел молекулярной физиологии.

В метаболомике для определения концентраций интермедиатов метаболизма применяют различные методы разделения и идентификации химических веществ.

Цель определения концентраций интермедиатов - воссоздание общей картины распределения потоков компонентов исходных субстратов в продукты жизнедеятельности клеток.

Одна из проблем метаболомики обусловлена тем, что с химической точки зрения многие интермедиаты метаболизма сходны по строению, поэтому их сложно отделить друг от друга стандартными физико-химическими методами. В организме в ходе метаболизма эти сходные соединения, как правило, опознаются ферментами и могут иметь различное значение для жизнедеятельности клетки.

Еще одна принципиальная проблема метаболомики связана с тем, что время жизни многих интермедиатов в клетке очень мало (эти вещества химически нестабильны в клеточных экстрактах), а их содержание в клетке очень сильно зависит от условий, в которых протекает жизнедеятельность организма.

Метабономика - количественное измерение динамического многопараметрического метаболического ответа живых систем на патофизиологические воздействия или генные модификации. Этот подход используют в токсикологии, диагностике заболеваний и ряде других областей.

Различия между метаболомикой и метабономикой не сводятся к выбору аналитических методов.

Несмотря на отсутствие общепризнанной точки зрения, считается, что метаболомика уделяет большее внимание метаболическим профилям на клеточном и органном уровне и преимущественно связана с*нормальным эндогенным метаболизмом.* Метабономика использует метаболические профили главным образом для получения информации об изменениях метаболизма, связанных с *внешними факторами окружающей среды и патологическими процессами.*

Из вышесказанного следует, что метаболомика и метабономика должны стать базовыми дисциплинами в образовании биологов, провизоров и медиков.

ВВЕДЕНИЕ

Метаболизм - совокупность биохимических превращений различных органических и неорганических веществ в биологической системе (от клетки до биосферы), составляющих материальную основу жизнедеятельности каждого живого организма, в частности человека.

Основная задача предлагаемой книги - описание методов диагностики на основе различных медико-клинических данных по метаболизму.

Очевидно, что для глубокого понимания жизнедеятельности любой биологической системы и управления (в частности, медикаментозного) ею необходимо знать биохимические реакции, определяющие метаболизм этой системы. Накоплен огромный фактический материал, позволяющий, по крайней мере в принципе, диагностировать различные патологии по характеру превращений того или иного вещества в организме пациента. Создана аппаратура с высокой разрешающей способностью, позволяющая одновременно определять содержание большого количества метаболитов (метаболом).

Метаболом формируется большой сетью метаболических реакций, где продукты одной ферментативной реакции служат исходными веществами для других. Такие системы описываются как гиперциклы.

В то же время систематизация существующей медико-клинической биохимической информации сильно отстает от темпов ее накопления. Эта информация не только труднодоступна для понимания, в ней и ориентироваться было весьма сложно. Именно тогда появились классические работы Дж. Николсона с важными теоретическими обобщениями, положившими начало глубокому осмыслению сущности метаболических процессов. Фундаментом этих обобщений стали новые научные дисциплины - метаболомика и метабономика.

Идея, что изменения в тканях и биологических жидкостях являются показателями болезни, зародилась еще в Древней Греции. Диагностические диаграммы мочи широко использовались в Средневековье и в последующие времена (рис. 0.1).

Пример таких диагностических диаграмм - «мочевое колесо», опубликованное Ульрихом Пиндером *(Ullrich Pinder)* в 1506 г. в книге *«Epiphanie Medicorum»*. Эти диаграммы связывали цвета, запахи и вкусы мочи с различными состояниями организма. Такие особенности имеют метаболическую природу. В «мочевом колесе» описаны возможные цвета, запахи и вкусы мочи, что дает возможность использовать эти органолептические свойства тест-проб для диагностирования болезни.

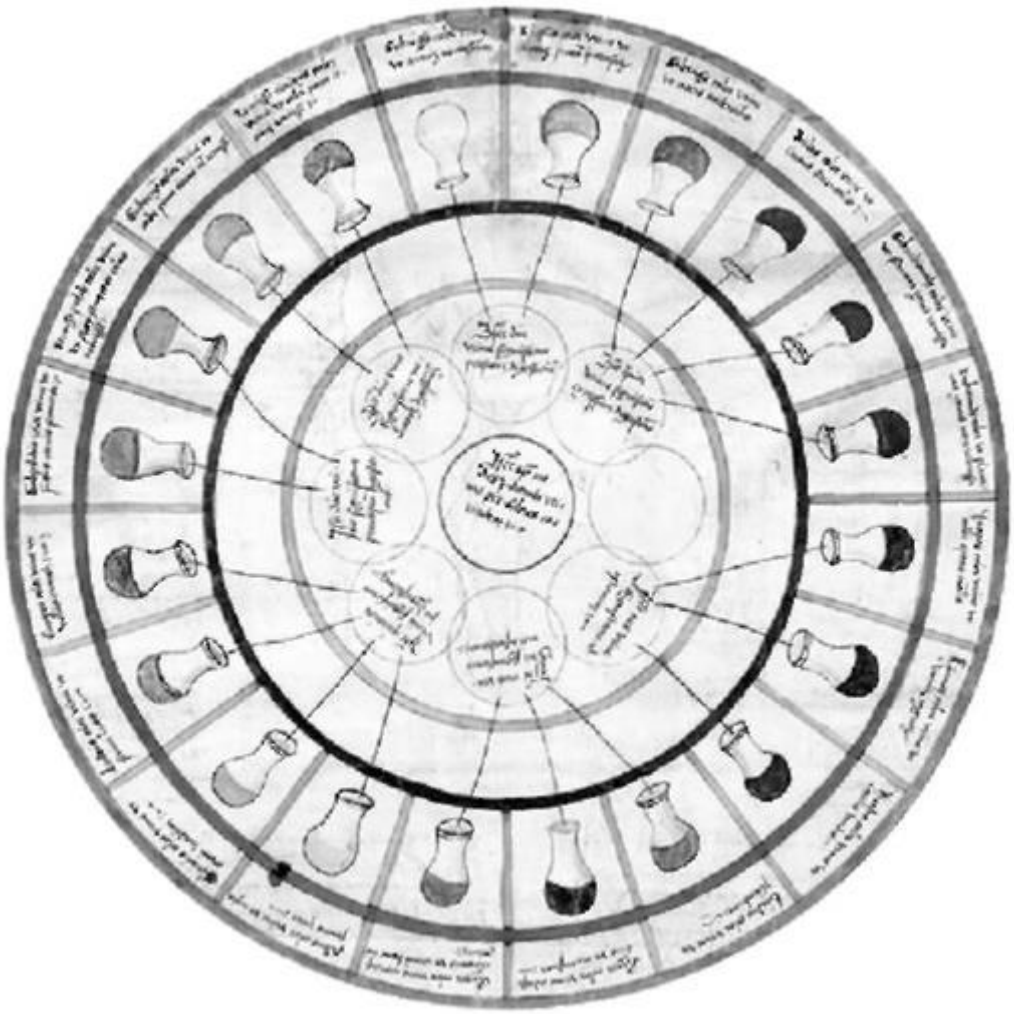


Рис. 0.1. Метаболом мочи - «мочевое колесо», в котором описаны возможные цвета, запахи и вкусы мочи, что дает возможность использовать эти органолептические свойства тест-проб для диагностирования болезни

Следует отметить, что корни диагностических диаграмм заложены в медицине Китая и Индии.

Связанная с метаболомикой область - метабономика использует современные методы анализа образцов, но основной принцип зависимости химических свойств тест-проб с биологией тот же самый. В значительной мере метабономика отличается тем, что широко использует методы идентификации тест-проб, известные как хемометрика или многовариантный статистический анализ. Эти методы дают возможность интерпретировать сложные базы данных.

Метаболомика и метабономика выросли из недр биохимии. Именно поэтому вполне естественна тенденция обобщить закономерности биохимических реакций, изученных in vitro, и перенести их на процессы жизнедеятельности. В частности, весьма плодотворными в биохимии оказались методы термодинамики и кинетики.

Различие между метабономикой и метаболомикой больше философское, чем техническое.

Метабономика направлена на измерение динамики интегрального метаболического ответа живых систем на биологическое стимулирование или генетические воздействия. Основное внимание направлено на изучение изменений во времени в сложных многоклеточных системах.

Метаболомика ищет аналитическое описание сложных биологических объектов и стремится идентифицировать и определить количество всех малых молекул в таком образце.

Практически, термины «метаболомика» и «метабономика» часто используются попеременно, а методы анализа и моделирования одни и те же.

Были две в значительной степени независимые отправные точки развития метаболомики.

• Первой отправной точкой стал метаболический контроль-анализ - математический метод, развитый в 1960-х гг. для моделирования метаболизма в клетках. При его использовании необходимо, чтобы концентрации метаболитов были определены количественно. Для этой цели были усовершенствованы методы, основанные на использовании газовой хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией.

• Второй отправной точкой стало развитие ядерной магнитно-резонансной (ЯМР) спектроскопии. К середине 1980-х гг. метод ЯМР стал достаточно чувствителен, чтобы идентифицировать метаболиты в неизмененных биологических жидкостях. Было доказано, что метаболические профили могут зависеть от различных болезней и побочных эффектов лекарственных средств.

Метаболомика основана на одновременном анализе большого числа низкомолекулярных метаболитов исследуемой тест-пробы.

Цель метаболомики - определить вид и количество малых молекул в биологических жидкостях при различных состояниях пациентов. Метаболомика отображает множество всех метаболитов организма. Полученный метаболический профиль дает мгновенный «снимок» физиологического состояния.

Вместе с другими хорошо разработанными «-омик»-технологиями (геномикой, протеомикой и др.) метаболомика вносит существенный вклад в детальное понимание функций экспрессии гена *in vivo,*результатов биохимического анализа, регуляторных сетей и более строгое математическое описание и моделирование функционирования биологических клеток в системной биологии. В результате становится возможным создавать модели состояний организма на основе данных биотрансформации и ферментативных методик.

Кроме того, возможность связать данные геномики и протеомики и определить время исследования различных физиологических состояний.

Концепцию индивидуального метаболического профиля, который отражает состав биологических жидкостей, предложил Р. Вильямс в конце 40-х гг. прошлого века. Используя бумажную хроматографию, он установил, что характеристические метаболические профили мочи и слюны могут быть связаны с различными заболеваниями (например, с шизофренией).

Однако только технологический прогресс 1960-70-х гг. сделал возможным количественное измерение метаболических профилей.

Термин «метаболический профиль» ввел в 1971 г. А. Хорнинг, который показал, что данные газовой хромато-масс-спектрометрии могут быть использованы для определения различных веществ в моче и тканевых экстрактах человека.

На протяжении 1970-х гг. группа А. Хорнинга совместно с Л. Полингом и А. Робинсоном играла ведущую роль в разработке газо-хромато-масс-спектрометрических методов мониторинга метаболитов в моче.

Одновременно стала быстро развиваться и ЯМР-спектроскопия.

В последующие годы метаболомные исследования с помощью ЯМР-спектроскопии проводились в основном в лаборатории Дж. Николсона в Биркбек-колледже Лондонского университета и позже в Лондонском королевском колледже. В 1984 г. Николсон показал, что протонная ЯМР-спектроскопия в принципе может быть использована для диагностики сахарного диабета. Затем он впервые стал использовать алгоритмы распознавания образов при анализе метаболических профилей по данным ЯМР-спектроскопии.

В 2007 г. завершена программа «Метаболом человека» в Канадском университете Альберта, возглавляемая Дэвидом Уишартом. Была получена первая версия базы данных о метаболоме человека, содержащая информацию о примерно 2500 метаболитах, 1200 лекарственных средств и 3500 пищевых веществах (содержимое метаболического «котла» человека).

Метабономика хорошо согласуется с философией системной биологии. В традиционном подходе при исследовании метаболических сетей не раскрывают взаимодействия между генами, белками и метаболитами индивидуальных типов клеток.

Основная проблема системной биологии состоит в том, что геномика, изучающая связь экспрессии генов и белков с метаболизмом, на каждом уровне биологической организации и контроля использует существенно различающиеся временные шкалы. Это затрудняет определение причинных связей.

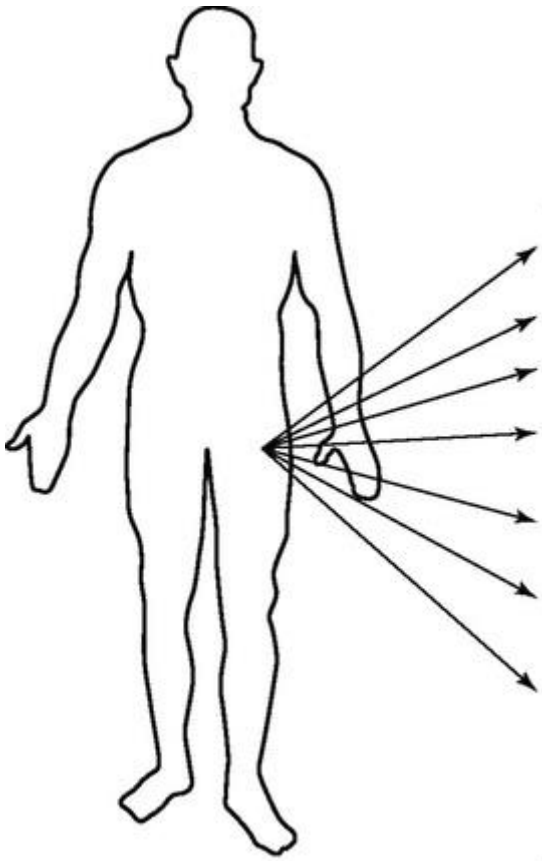
Влияние окружающей среды на экспрессию гена затрудняет также интерпретацию геномных данных, например, предсказание восприимчивости индивидуума к болезням.

Метабономика контролирует глобальный результат различных факторов влияния, не делая предположений об их влиянии на наблюдаемый результат.

Метабономика использует нисходящий, сверху вниз, интегральный биохимический анализ сложных организмов. Такой подход противоположен традиционному подходу снизу вверх, когда исследуют сети взаимодействий между генами, белками и метаболитами в различных типах клеток.

Глава 1. ИНТЕГРАЛЬНЫЙ МЕТАБОЛОМ ЧЕЛОВЕКА

Методами качественного и количественного химических анализов определяют, какие вещества и элементы входят в состав организма человека. Установлено, что состав разных органов, тканей и организма в целом зависит от пола, возраста, расы и меняется от индивидуума к индивидууму. Имеет место так называемая биохимическая индивидуальность человека.



Вещество X_i	w_i, %	m_i, кг
Вода	60	42
Белки	15	10,7
Жиры (липиды)	19	13,3
Углеводы (сахара)	0,4	0,3
ДНК РНК	0,01	0,01
Витамины Гормоны Микроэлементы	0,25	0,15
Зола (общая)	5,3	3,7
Зола (ткани)	0,4	0,3

Рис. 1.1. Вещественный состав организма человека (масса - 70 кг) - интегральный метаболом

Исследованиями установлено, что качественные и количественные показатели состава организма меняются в некоторых интервалах, которые принято считать нормой. В частности, рассчитана масса среднего, или стандартного, человека, равная 70 кг.

В расчете на массу «стандартного» человека в литературе приводятся различные нормальные биохимические и физиологические данные. Усредненные биохимические данные по вещественному составу среднего человека (интегральный метаболом) приведены на рис. 1.1.

С помощью количественного химического анализа было определено, что в среднем человеке содержится около 10 кг сухого вещества и 60 кг воды.

Содержание неорганических компонентов определяют по массе золы, образовавшейся от сжигания образцов ткани при такой температуре, когда все органические вещества превращаются в летучие продукты.

В табл. 1.1 приведены основные биохимические компоненты организма человека.

Таблица 1.1. Основные биохимические компоненты метаболома человека

Макрокомпоненты	Микрокомпоненты
Водные растворы	Витамины
Белки	Гормоны
Липиды (жиры)	Нуклеиновые кислоты и основания
Полисахариды (углеводы)	Микроэлементы

Каждый из приведенных в табл. 1.1 компонентов выполняет в организме свои специфические функции.

Водные растворы - среда, в которой протекают биохимические реакции.

Белки - структурные элементы, которые функционируют в качестве катализаторов (ферментов), а также реализаторов действия генов.

Липиды - главные структурные компоненты мембран, а также депонированная (запасенная) форма химической энергии, обеспечивающей жизнедеятельность.

Полисахариды - структурные компоненты клеток, а также одной из депонированных форм химической энергии.

Нуклеиновые кислоты - носители и трансляторы генетической информации.

Микрокомпоненты выступают в качестве функциональных компонентов, принимающих участие в различных взаимодействиях.

Все живые организмы состоят из однотипных белков, что говорит об общем их происхождении. Идентичность организмов каждого вида сохраняется благодаря свойственному только этому виду набору нуклеиновых кислот и белков.

1.1. ИОННЫЙ И ГАЗОВЫЙ МЕТАБОЛОМ ЖИДКИХ СРЕД ОРГАНИЗМА

Организм человека в среднем на 60% массы тела состоит из воды. Вода заполняет все составные части клеток и внеклеточного пространства и представляет собой среду, в которой осуществляются биохимические реакции, перенос веществ и химической энергии. Биохимические реакции протекают в водной среде организма при постоянной температуре.

Вода является средой, в которой растворены, или диспергированы, различные вещества, входящие в состав организма. В воде содержатся основные макрокомпоненты организма - белки, углеводы, липиды, а также микроэлементы, нуклеиновые кислоты и другие микрокомпоненты.

Вода - основа циркулирующих в организме жидкостей, она также принимает участие в обменных процессах.

Очевидно, что знание свойств растворов необходимо для понимания биохимических превращений в организме человека.

Растворы имеют большое значение как в повседневной жизни, так и в медицине. По современным представлениям, жизнь возникла в океане, который являл собой водный раствор неорганических и органических веществ. В ходе эволюции живые организмы развивались и менялись. Многие из них покинули океан и перешли на сушу. Однако животные и растения, выйдя из морской колыбели, сохранили в своих организмах водные растворы, содержащие различные неорганические ионы и органические вещества. Растворами являются плазма крови, спинномозговая жидкость и лимфа. Лекарственные вещества эффективны лишь в растворенном состоянии или должны перейти в растворенное состояние в организме.

Любой раствор состоит из растворенных веществ и растворителя, хотя эти понятия в известной степени условны. Например, в зависимости от соотношения количества спирта и воды эта система может быть раствором спирта в воде или воды в спирте.

Обычно растворителем считают тот компонент, который в растворе находится в том же агрегатном состоянии, что и до растворения. Например, в водном растворе глюкозы (твердое вещество) растворителем считается вода.

Учение о растворах представляет для биохимии и физиологии спорта особый интерес, потому что важнейшие биологические жидкости - кровь, лимфа, моча, слюна, пот - являются растворами солей, белков, углеводов, липидов в воде. Усвоение пищи связано с переходом питательных веществ в растворенное состояние. Биохимические реакции в живых организмах протекают в растворах.

Биологические жидкости участвуют в транспорте питательных веществ (жиров, аминокислот, кислорода), лекарственных препаратов к органам и тканям, а также в выведении из организма метаболитов (мочевины, билирубина, углекислого газа и т.д.). Состав некоторых биологических жидкостей приведен в табл. 1.2. Плазма крови является средой для клеток - лимфоцитов, эритроцитов, тромбоцитов.

Таблица 1.2. Ионный метаболом некоторых биожидкостей

Биожидкость	Na^+, ммоль/л	K^+, ммоль/л	Ca^{2+}, ммоль/л	Cl^-, ммоль/л	HCO_3^-, ммоль/л	Массовая доля белка, %
Плазма крови	140	5	2,5	105	27	6-8
Спинномозговая жидкость	140	3	1,3	120	21	0,03
Синовиальная жидкость	140	4	-	120	25	0,03
Асцитическая жидкость	135	3,5	1,8	105	30	-
Пот	75	5	2,5	75	-	-
Слезы	140	5	-	115	20	0,8
Слюна	60-100	7-20	1,5-4,0	60-80	10-20	0,5
Желудочный сок	20-60	6-7	-	145	-	0,5
Панкреатический сок	150	7	3	80	80	1,2
Моча	150	36	5	160	-	-

Способы выражения концентрации растворов

Важной характеристикой раствора является концентрация. От этой величины зависят свойства растворов.

Концентрацией вещества - компонента раствора - называют величину, измеряемую количеством растворенного вещества, содержащегося в определенной массе или объеме раствора или растворителя.

Наиболее часто применяемые способы выражения концентрации - массовая доля, молярная, моляльная, молярная концентрация эквивалента, молярная доля, объемная доля, титр.

Массовая доля ω(X) выражается в долях единицы, процентах (%), промилле (тысячная часть процента) и в миллионных долях (млн$^{-1}$). Массовую долю рассчитывают по формулам:

$$\omega(X) = \frac{m(X)}{m(p\text{-}p)};$$

$$\omega(X) = \frac{m(X)}{m(p\text{-}p)} 100\%,$$

где ω(X) - масса данного компонента X (растворенного вещества), кг (г); m (р-р) - масса раствора, кг (г).

Молярная концентрация с(X) выражается в моль/м^3, моль/дм^3, моль/ см^3, моль/л, моль/мл. В медицине предпочтительно применять единицы моль/л. Молярную концентрацию рассчитывают по формуле:

$$c(X) = \frac{n(X)}{V(p\text{-}p)} = \frac{m(X)}{M(X) \cdot V(p\text{-}p)},$$

где n(X) - количество растворенного вещества системы, моль; M(X) - молярная масса растворенного вещества, кг/моль или г/моль; т(X) - масса растворенного вещества, кг или г; V (р-р) - объем раствора.

Моляльная концентрация b(X) выражается в единицах моль/кг. Форма записи, например, такая: b(HCl) = 0,1 моль/кг. Рассчитывают моляльную концентрацию по формуле:

$$b(X) = \frac{n(X)}{m(р\text{-}ль)} = \frac{m(X)}{M(X) \cdot m(р\text{-}ль)},$$

где m (р-ль) - масса растворителя, кг.

Важной характеристикой растворяемого вещества является растворимость.

Растворимость может быть выражена в тех же единицах, что и концентрация, например, через количество растворенного вещества, содержащегося в 1 л насыщенного раствора (моль/л), или через массу (г) растворенного вещества в 100 г насыщенного раствора. Довольно часто растворимость выражают через массу растворенного вещества (г), насыщающего 100 г растворителя. Соответствующую величину называют*коэффициентом растворимости.*

Растворимость зависит от природы растворяемого вещества и растворителя, температуры, давления, присутствия в растворе других веществ.

Вещества с ионным типом связи и вещества, состоящие из полярных молекул, лучше растворяются в полярных растворителях, таких как вода, спирты. Эти растворители характеризуются высокой диэлектрической проницаемостью.

Газы, как и многие другие вещества, не растворяются в жидкости беспредельно. При некоторой концентрации газа X устанавливается равновесие:

$$X(г) \leftrightarrow X(р).$$

Растворимость газа пропорциональна его давлению. Эта зависимость выражается законом Генри (1803): количество газа, растворенного при данной температуре в определенном объеме жидкости, при равновесии прямо пропорционально давлению газа.

Закон Генри может быть записан в следующей форме:

$$c(X) = K_Г(X)\, p(X), \qquad (1.1)$$

где c(X) - концентрация газа в насыщенном растворе, моль/л; p(X) - давление газа X над раствором, Па; $K_Г(X)$ - постоянная Генри для газа X, моль х $л^{-1}$ х $Па^{-1}$.

Константа Генри зависит от природы газа, растворителя и температуры. В табл. 1.3 представлены константы Генри для некоторых газов в воде при 298 К.

Таблица 1.3. Константы Генри газов в воде (298 К)

Газ	$K_Г(X)$, моль х $л^{-1}$ х $кПа^{-1}$	Газ	$K_Г(X)$, моль х $л^{-1}$ х $кПа^{-1}$
N_2	6,13		7,53

O2	12,8	He	3,73
CO_2	337	Ar	14,9

Закон Генри справедлив лишь для сравнительно разбавленных растворов, при невысоких давлениях и отсутствии химического взаимодействия между молекулами растворяемого газа и растворителем.

Например, $C0_2$ и NH_3 вступают в химическое взаимодействие с водой, а HCl диссоциирует в воде, что резко повышает растворимость этих газов. При очень высоких давлениях растворимость газа может достигнуть максимума. Это связано с тем, что при очень высоких давлениях изменение объема жидкости вследствие растворения в ней газа становится соизмеримым с изменением объема растворенного газа.

Закон Генри является частным случаем общего закона Дальтона. Если речь идет о растворении не одного газообразного вещества, а смеси газов, то растворимость каждого компонента подчиняется закону Дальтона: растворимость каждого из компонентов газовой смеси при постоянной температуре пропорциональна парциальному давлению компонента над жидкостью и не зависит от общего давления смеси и индивидуальности других компонентов.

Иначе говоря, в случае растворения смеси газов в жидкости в математическое выражение закона Генри (1.1) вместо p(X) подставляют парциальное давление - p_i данного компонента.

Под парциальным давлением (p_i) компонента понимают часть общего давления ($p_{общ}$) газовой смеси, которая обусловлена этим компонентом:

$$P_{общ} = P_1 + P_2 + P_3 + ... + P_n.$$

Соответственно устанавливается метаболом газов в жидких средах организма.

Пример. Воздух представляет собой смесь, состоящую в основном из трех газов: 78% азота, 21% кислорода и 1% аргона (по объему). Определите концентрацию азота в воде при 298 К, если постоянная Генри равна $6{,}13 \times 10^{-4}$ моль х $л^{-1}$ х $Па^{-1}$.

Поскольку воздух содержит 78% азота по объему, парциальное давление азота в воздухе при 101 325 Па составляет 79 033,5 Па (объемная доля азота равна молярной доле азота: отсюда $p(N_2) = p_{общ}0{,}78$). Из закона Дальтона следует: $c(N_2) = Кг(N_2)$ х $p(N_2)$, отсюда: $c(N_2) = 6{,}13 \times 10^{-9} \times 79\,033{,}5 = 4{,}84 \times 10^{-4}$ моль/л.

Русский врач-физиолог И.М. Сеченов (1829-1905) установил (закон Сеченова): растворимость газов в жидкостях в присутствии электролитов понижается, происходит высаливание газов.

Математическое выражение закона Сеченова имеет следующий вид:

$$c(X) = c_0(X) \times e^{-K_c \cdot c_э}, \qquad (1.2)$$

где c(X) - растворимость газа X в присутствии электролита; $c_0(X)$ - растворимость газа X в чистом растворителе; $c_э$ - концентрация электролита; K_c - константа Сеченова, зависящая от природы газа, электролита и температуры.

На основе закона Сеченова можно рассчитать изменения метаболома газов в жидких средах организма в зависимости от концентрации электролитов.

Изменения метаболома газов в крови при изменении давления могут вызывать тяжелые заболевания.

Кессонная болезнь, от которой обычно страдают водолазы и аквалангисты, - проявление закона Генри. На глубине, например, 40 м ниже уровня моря общее давление повышается примерно в 4 раза и составляет около 400 кПа. Растворимость азота в плазме крови при таком давлении в соответствии с законом Генри в 4 раза больше, чем на поверхности моря.

Наглядной моделью эмболии как проявления закона Генри-Дальтона является образование обильной пены при откупоривании бутылки шампанского или газированной воды. Здесь имеют место понижение растворимости и выделение углерода диоксида (CO_2) при резком снижении его парциального давления.

Многочисленные исследования показали, что не только электролиты, но и белки, липиды и другие вещества, содержание которых в крови может меняться в известных пределах, оказывают существенное влияние на метаболом кислорода и углерода диоксида в крови в соответствии с законом Сеченова.

Коллигативные свойства растворов

В жидких средах организма поддерживается постоянство метаболома по кислотности, концентрации солей и органических веществ. Такое постоянство называется концентрационным гомеостазом.

Физико-химические свойства растворов отличаются от свойств чистой воды.

В частности, с увеличением концентрации растворенного вещества наблюдаются:

- понижение давления пара над раствором;
- повышение температуры кипения;
- понижение температуры замерзания;
- повышение осмотического давления.

Например, чистая вода при атмосферном давлении замерзает при 273,16 К и кипит при 373,16 К. При растворении в воде какого-либо вещества давление ее пара понизится, и для того чтобы раствор закипел, необходимо его нагреть до более высокой температуры, при которой давление пара станет равным атмосферному. На этом явлении основано действие антифризов.

Перечисленные изменения связаны с числом (количеством) растворенных частиц и не зависят от химического строения и размера молекул растворенного вещества. Эти свойства называютколлигативными.

Например, 0,1М раствор глицерина и 0,1М раствор глюкозы имеют одинаковую температуру замерзания -0,186 °С. В то же время температура замерзания 0,1М раствора

NaCl в 2 раза ниже, а именно -0,372 °С. Это связано с полной диссоциацией NaCl в воде. Именно поэтому 0,1М раствор NaCl содержит в 2 раза больше частиц по сравнению с 0,1М раствором глицерина.

Метаболом электролитов в биологических жидкостях и тканях определяется содержанием различных солей: NaCl, KC1, HC1, CaCl, NaH_2PO_4, $NaHCO_3$. Устойчивость биологических высокомолекулярных соединений и скорость многих биохимических реакций в значительной мере зависят от природы и концентрации присутствующих в жидкостях и тканях ионов, на которые диссоциируют электролиты.

За регуляцию осмотического давления путем поддержания концентрации ионов Na^+ и K^+ отвечает специальная группа гормонов. Главные гормоны этой группы у позвоночных - антидиуретический гормон, гипоталамо-гипофизарный комплекс, а также вазопрессин и альдостерон.

Электролитическая диссоциация

Электрические свойства растворов веществ зависят от природы растворенного вещества. Вещества, растворы которых хорошо проводят электрический ток, называются электролитами. Вещества, растворы которых слабо проводят электрический ток, называются неэлектролитами.

В растворах типичных электролитов - солей, кислот и оснований уже в процессе растворения происходит распад молекул этих веществ на ионы.

Например, диссоциация поваренной соли NaCl на ионы Na^+ и Cl^- выражается следующим уравнением:

Распад молекул вещества в растворителях на ионы называется электролитической диссоциацией (ионизацией).

Электролиты, которые практически полностью диссоциируют на ионы (ионизируются), называютсясильными, а электролиты, которые не полностью ионизируются, - слабыми.

Например, NaCl и другие соли - сильные электролиты. Уксусная кислота (CH_3COOH) и другие органические кислоты - слабые электролиты.

Процесс диссоциации обратим (справедливо для слабых электролитов). Наряду с распадом электролитов на ионы идет обратный процесс рекомбинации - образование из ионов молекул. В растворе устанавливается ионное равновесие.

Например, диссоциация уксусной кислоты (CH_3COOH) на ионы CH_3COO^- и H^+ выражается следующим уравнением:

$$CH_3COOH \leftrightarrow CH_3COO^- + H^+.$$

Двойная стрелка (↔) обозначает обратимость процесса диссоциации слабого электролита CH_3COOH, в отличие от диссоциации сильного электролита NaCl [односторонняя стрелка (→)].

Диссоциация зависит от природы растворителя. Чем полярнее растворитель (чем больше его диэлектрическая проницаемость), тем сильнее диссоциация.

Теория Аррениуса не учитывала химического взаимодействия растворенного вещества с растворителем. Именно поэтому количественно эта теория не могла объяснить различную степень диссоциации одного и того же электролита в разных растворителях.

Например, NaCl хорошо растворяется и проводит ток в воде и плохо - в спирте.

Степень диссоциации (ионизации). Сила электролитов

В растворе слабых электролитов наряду с ионами существуют неионизированные молекулы.

Для количественной характеристики полноты диссоциации введено понятие степени диссоциации (ионизации).

Степенью диссоциации (ионизации) электролита называют отношение числа молекул, распавшихся на ионы, к общему числу его молекул, введенных в раствор.

Иначе говоря, $\alpha_И$-доля молекул электролита, распавшихся на ионы. Степень диссоциации $\alpha_И$ выражается в процентах или долях единицы:

$\alpha_И = N_И \div N_Р$,

где $N_И$- число молекул электролита, распавшихся на ионы; $N_Р$ - число молекул электролита, введенных в раствор (растворенных).

Например, для с(CH_3COOH) = 0,1 моль/л степень диссоциации $\alpha_И$ = 0,013 (или 1,3%).

По степени диссоциации электролиты условно подразделяют на сильные ($\alpha_И$ >30%) и слабые ($\alpha_И$ <3%). В промежутке (3% < $\alpha_И$ < 30%) электролиты считаются средней силы.

К сильным электролитам относят почти все соли. Из наиболее важных кислот и оснований к ним принадлежат H_2SO_4, HCl, HBr, H1, HnO_3, NaOH, KOH, $Ba(OH)_2$.

К слабым электролитам принадлежит большинство органических кислот, а также некоторые неорганические соединения: H_2S, HCN, H_2CO_3, HClO, H_2O, H_3BO_3, Hg_2CI_2, $Fe(SCN)_3$ и др.

Диссоциация сопровождается выделением или поглощением теплоты. Следовательно, степень диссоциации должна зависеть от температуры. На степень электролитической диссоциации влияет концентрация раствора (табл. 1.4).

Таблица 1.4. Степень ($а_И$) и константа ($К_Д$) диссоциации уксусной кислоты (CH_3COOH) при различных концентрациях с(Х) в воде (291 К)

с(Х), моль/л	$\alpha_И$	$К_Д$, моль/л
0,000028	0,539	$1,77X10^{-5}$
0,000111	0,328	$1,78X10^{-5}$
0,000218	0,248	$1,78X10^{-5}$
0,001030	0,124	$1,80X10^{-5}$
0,050000	0,019	$1,84X10^{-5}$
0,100000	0,0135	$1,85X10^{-5}$

Из данных, представленных в табл. 1.4, видно, что при разбавлении раствора степень диссоциации значительно возрастает, соответственно, изменяется ионный метаболом.

В связи с этим указанная классификация силы электролитов по степени диссоциации $а_и$ справедлива только для растворов с концентрацией с(Х) порядка 0,1 моль/л.

Константа диссоциации. Закон разведения Оствальда

Количественно электролитическую диссоциацию как равновесный обратимый процесс можно охарактеризовать константой диссоциации (ионизации), определяемой законом действующих масс.

Если рассматривать электролитическую диссоциацию как равновесный обратимый процесс, диссоциацию электролита Kt_nAn_m (Kt+ - катион, An^- - анион) можно представить в виде:

$$Kt_nAn_m \leftrightarrow nKt^{n+} + mAn^{n-}$$

Согласно закону действующих масс, константу равновесия записывают следующим образом:

$$K_Д = \frac{\left[Kt^{n+}\right]^n \left[An^{n-}\right]^n}{\left[Kt_n An_m\right]}, \qquad (1.3)$$

где $[Kt^{n+}]$ и $[An^{n-}]$ - молярные равновесные концентрации ионов электролита; $[Kt_nAn_m]$ - молярная равновесная концентрация недиссоциированных молекул электролита; $К_д$ - константа равновесия, называемая константой диссоциации.

Например, для диссоциации уксусной кислоты (CH_3COOH):

$$CH_3COOH \leftrightarrow CH_3COO^- + H^+.$$

Константа диссоциации равна:

$$K_Д = \frac{\left[H^+\right]\left[CH_3COO^-\right]}{\left[CH_3COOH\right]}.$$

Уравнение (1.3) справедливо лишь для разбавленных растворов слабых электролитов. Чем больше константа диссоциации ($К_д$), тем сильнее диссоциирует электролит. В отличие от степени диссоциации, $К_д$зависит только от природы растворителя, электролита и температуры, но не зависит от концентрации раствора (табл. 1.5). Таким образом, и

константа диссоциации ($К_д$), и степень электролитической диссоциации ($а_И$) - количественные характеристики диссоциации. Естественно, что между ними существует связь.

Таблица 1.5. Константы диссоциации некоторых слабых электролитов при 298 К

Соединение	$К_д$		Соединение	$К_д$	
	$К_1$, моль/л	$К_2$, моль/л		$К_1$, моль/л	$К_2$, моль/л
HCN	$4,9\times10^{-10}$		HCOOH (муравьиная кислота)	$1,76\times10^{-4}$	
H_2S	$8,9\times10^{-8}$	$1,3\times10^{-13}$	CH_3COOH	$1,76\times10^{-5}$	
H_2SO_3	$1,3\times10^{-2}$	$6,3\times10^{-8}$	CH_3CH_2COOH (пропионовая кислота)	$1,35\times10^{-5}$	
H_2CO_3	$4,5\times10^{-7}$	$4,7\times10^{-11}$	CH_3–CH(OH)–COOH (молочная кислота)	$1,4\times10^{-4}$	
H_3PO_4	$7,6\times10^{-3}$	$6,2\times10^{-8}$	CH_3CO–COOH (пировиноградная кислота)	$3,2\times10^{-3}$	

Окончание табл. 1.5

Соединение	$К_д$		Соединение	$К_д$	
	$К_1$, моль/л	$К_2$, моль/л		$К_1$, моль/л	$К_2$, моль/л
NH_4OH	$1,8\times10^{-5}$		$(HOOC–CH_2)_2C(OH)(COOH)$ (лимонная кислота)	$1,2\times10^{-3}$	$7,3\times10^{-5}$
$Pb(OH_2)$	$9,6\times10^{-4}$	3×10^{-8}	$H_2C_2O_4$	$5,6\times10^{-2}$	$5,1\times10^{-5}$
$CO(NH_2)_2$ (мочевина)	$1,5\times10^{-14}$				

Примечание. Для H_3PO_4 $К_Д = 3,3x10^{-13}$ моль/л, для лимонной кислоты $К_Д = 1,6x10^{-6}$ моль/л.

Пусть имеется диссоциирующий на два иона слабый бинарный электролит KtAn, молярная концентрация которого - c(X), а степень диссоциации - $а_И$. В растворе этого электролита установится равновесие.

Применив закон действующих масс к ионному равновесию:

$$KtAn \leftrightarrow Kt^{+} + An^{-},$$

получают выражение для Кд:

$$K_Д = \frac{[Kt^+][An^-]}{[KtAn]}.$$

Подставив выражения для концентраций через степень диссоциации ($a_И$), получают:

$$K_Д = \frac{\alpha_И^2 c(X)}{1-\alpha_И}. \qquad (1.4)$$

Это соотношение называют законом разведения Оствальда (1888).

Уравнение (1.4) выражает зависимость степени диссоциации от концентрации раствора. Если электролит очень слабый, $a_И << 1$. Следовательно, величиной $a_И$ в знаменателе можно пренебречь, и уравнение (1.4) примет вид:

$$K_Д \approx \alpha_И^2 c(X), \quad \text{или } \alpha_И \approx \sqrt{\frac{K_Д}{c(X)}}. \qquad (1.5)$$

Следовательно, закон Оствальда может быть сформулирован следующим образом: степень диссоциации слабого электролита возрастает при разбавлении раствора.

Сильные электролиты не подчиняются этому закону. Для них $K_Д$ не является постоянной величиной и зависит от концентрации раствора (сильные электролиты не подчиняются закону действующих масс). Именно поэтому применимость закона разведения Оствальда является одним из признаков слабых электролитов. В табл. 1.5 приведены значения констант диссоциации некоторых слабых электролитов.

Многоосновные кислоты диссоциируют ступенчато.

Ступенчатая диссоциация характеризуется тем, что распад электролита по каждой последующей ступени происходит в меньшей степени, чем по предыдущей, т.е. $K_1 > K_2 > K_3$.

Силу электролита можно выразить другим, более удобным способом. Вместо константы диссоциации (Кд) часто используют ее десятичный логарифм, взятый с обратным знаком: $pK_Д = -\lg K_Д$.

Например, для уксусной кислоты (CH_3C00H) $K_Д = 1{,}76^{*}10^{-5}$ моль/л. Соответственно $pK_Д(CH_3COOH) = 4{,}76$.

Биологические жидкости и ткани содержат много различных электролитов: NaCI, KCI, HCI, $CaCI_2$, NaH_2PO_4, $NaHCO_3$ и др. Устойчивость биологических высокомолекулярных соединений (ВМС) и скорость многих биохимических реакций в значительной мере зависят от природы и концентрации присутствующих в жидкостях и тканях ионов. Поведение ионов в сложных биологических системах, какими являются живые организмы, определяется изложенными выше закономерностями.

Если в результате каких-то заболеваний происходит выделение мочи с повышенным содержанием солей, вместе с солями организм теряет и воду. При этом уменьшается концентрация ионов в плазме крови, что приводит к снижению осмотического давления крови.

При недостатке солей в организме объем внеклеточного пространства также уменьшается, поскольку организм не в состоянии заполнить его изотоническим раствором. Именно поэтому для поддержания постоянства осмотического давления во внеклеточном пространстве потеря солей сопровождается выведением воды.

Таким образом, концентрация ионов регулирует распределение воды между внеклеточным пространством и клетками тканей, а также между внеклеточным пространством и мочой.

Кислотно-щелочное равновесие в крови и биожидкостях определяется содержанием слабых и сильных электролитов: Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, H_2CO_3, $NaHCO_3$.

К многокомпонентным растворам высокомолекулярных соединений, которые содержатся в живых организмах, применима теория сильных электролитов. Например, можно использовать непосредственно для определения растворимости белков предельный закон Дебая-Хюккеля.

Для выделения и очистки белков используют метод осаждения путем добавления к раствору белка соли (высаливание). Оказалось, что осаждение (высаливание) ВМС в концентрированных растворах солей хорошо описывается на основе закона Дебая-Хюккеля, математическое выражение которого в этом случае имеет следующий вид:

$$\lg \frac{c_S}{c_S^0} = 0,5z^2\sqrt{I}, \qquad (1.6)$$

где c_8 и c_S^0 - растворимость ВМС в солевом и бессолевом (I=0) растворах; I - ионная сила раствора.

Ионная сила раствора равна:

$$I = ½[b(X_1)z^2_1 + b(X_2)z^2_2 + \ldots + b(X_n)z^2_n],$$

где I - ионная сила раствора; $b(X_1)$, $b(X_2)$ и т.д. - моляльные концентрации ионов X_1, X_2 и т.д.; z_1, z_2 ... - заряды ионов X_1, X_2 и т.д.

Очевидно, что уравнение (1.6) для растворов ВМС является аналогом закона Сеченова (8.2) для растворимости газов, так как из соотношения (1.6) следует:

$$c_S = c_S^0 e^{1,15z^2\sqrt{I}}.$$

Кислотно-основной метаболом жидких сред организма (водно-электролитный обмен)

Многие электролиты, в частности гидроксиды различных элементов, проявляют свойства кислот или оснований.

Для характеристики многих электролитов в водных растворах и в настоящее время можно использовать понятия кислоты, основания, данные Аррениусом:

• кислотой называют электролит, диссоциирующий в растворах с образованием ионов водорода (H^+);

• основанием называют электролит, диссоциирующий в растворах с образованием гидроксид-ионов (OH^-);

• амфолитом (амфотерным гидроксидом) называют электролит, диссоциирующий в растворе с образованием и ионов водорода, и гидроксид-ионов.

К амфолитам относят аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты, а также гидроксиды цинка, алюминия, хрома и других амфотерных элементов.

В кислой среде амфолит проявляет основной, а в щелочной - кислотный характер.

Например, цинк гидроксид при взаимодействии с кислотами ведет себя как основание:

$$Zn(OH)_2 + {}_2HCl = ZnCl_2 + 2H_2O,$$

а при взаимодействии с щелочами - как кислота H_2ZnO_2:

$$H_2ZnO_2 + 2NaOH = Na_2ZnO_2.$$

Таким образом, согласно теории Аррениуса, свойства кислот обусловлены наличием в их растворах ионов водорода, а свойства оснований - присутствием в их растворах гидроксид-ионов. Однако такой взгляд на кислоты и основания применим только для водных растворов.

Ограниченность понятий кислоты и основания, данных Аррениусом, можно проиллюстрировать примерами. Молекула не содержит иона OH^-, а молекула CO_2 - иона H^+, однако в водном растворе первая проявляет свойства основания, а вторая - кислоты.

Исследования подобного типа реакций и в особенности реакций, протекающих в неводных растворителях, привели к созданию более общих теорий кислот и оснований.

В 1923 г. И. Бренстед и Т. Лоури разработали протонную теорию кислот и оснований, согласно которой:

• кислотой называют всякое вещество, молекулярные частицы которого (в том числе и ионы) способны отдавать протон, т.е. быть донором протонов;

• основанием называют всякое вещество, молекулярные частицы которого (в том числе и ионы) способны присоединять протоны, т.е. быть акцептором протонов.

Согласно протонной теории, кислоты подразделяют на три типа:

• нейтральные кислоты, например HCl, H_2SO_4, H_3PO_4:

$$H_2SO_4 \leftrightarrow H^+ + HSO^-_4;$$

• катионные кислоты, представляющие собой положительные ионы, например NH^+_4, H_3O^+:

$$NH^+_4 \leftrightarrow NH_3 + H^+;$$

• анионные кислоты, представляющие собой отрицательные ионы, например HSO^-_4, $H_2PO^-_4$, HPO^{2-}_4:

$$HSO^-_4 \leftrightarrow H^+ + SO^{2-}_4.$$

Подобного типа классификация имеется и для оснований:

• нейтральные основания, например NH_3, H_2O, C_2H_5OH:

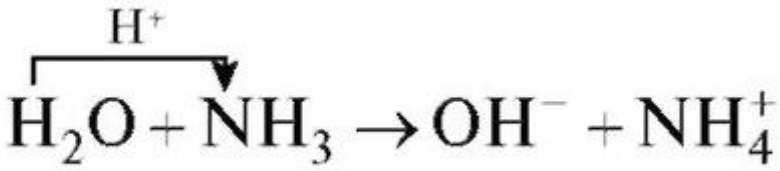
$$NH_3 + H^+ \leftrightarrow NH^+_4;$$

• анионные основания, представляющие собой отрицательные ионы, например Cl^-, CH_3COO^-, OH^-:

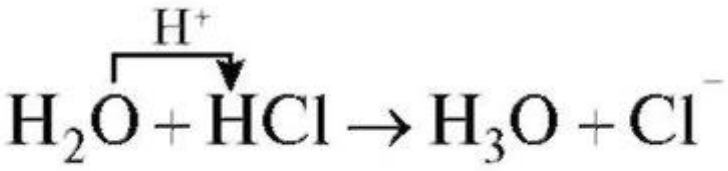
$$CH_3COO^- + H^+ \leftrightarrow CH_3COOH;$$

• катионные основания, представляющие собой положительные ионы, например, $H_2N\text{-}NH^+_3$

Растворители типа воды, жидкого аммиака, а также анионы многоосновных кислот, которые могут быть и донорами, и акцепторами протонов, являются *амфолитами.* Например, в реакции:



молекула воды отдает протон и является кислотой. Однако в реакции:



молекула воды присоединяет протон и является основанием. Таким образом, вода - типичный амфолит.

Диссоциация (ионизация) вещества происходит в результате взаимодействия с растворителем. При этом растворитель выполняет или функцию кислоты, или функцию основания.

Например, при растворении аммиака вода - кислота:

$$NH_3 + H_2O \leftrightarrow NH^+_4 + OH^-.$$

При растворении HCl вода - основание:

$$HCl + H_2O \leftrightarrow Cl^- + H_3O^+.$$

Согласно протонной теории, отдавая протон, кислота превращается в основание, которое называют сопряженным этой кислоте.

Например, кислоте CH_3COOH соответствует сопряженное основание CH_3COO^-, основанию Cl^- - сопряженная кислота HCl.

Именно поэтому, согласно протонной теории, имеет место кислотно-основное равновесие (КО-равновесие), обусловленное переносом протона:

III. $(кислота)_1 + (основание)_2 \leftrightarrow (кислота)_2 + (основание)_1$.

Для краткости обратимый процесс кислотно-основного взаимодействия называют КО-равновесием. Например:

$$HCl + NH_3 \leftrightarrow NH^+_4 + Cl^-$$

$$(кислота)_1\ (основание)_2\ (кислота)_2\ (основание)_1$$

Реакции нейтрализации, ионизации, гидролиза с точки зрения протонной теории являются частными случаями КО-равновесий.

Протолитические кислотно-основные равновесия III типа могут иметь место не только в воде, но и в других растворителях, например в безводном HF:

$$C_2H_5OH + HF \leftrightarrow C_2H_5OH^+_2 + F^-.$$

Диссоциацию воды, согласно теории Бренстеда, можно выразить следующим уравнением:

$$H_2O + H_2O \leftrightarrow H_3O^+ + OH^-;$$

$$\Delta H^O_Д = + 56{,}5\ кДж/моль,$$

т.е. одна молекула воды отдает, а другая - присоединяет протон, происходит автоионизация воды.

Константа диссоциации воды при 298 К, определенная методом электрической проводимости, равна:

$$K_Д(H_2O) = [H^+]\,[OH^-] = 10^{-16}\ моль/л,$$

где $[H^+]$, $[OH^-]$, $[H_2O]$ - концентрации ионов H^+, OH^- и воды (для краткости вместо H_3O+ в кислотно-основных равновесиях пишут H^+).

Степень диссоциации воды очень мала (очень слабый электролит), поэтому активность ионов водорода и гидроксид-ионов в чистой воде практически равна их концентрациям.

Поскольку вода присутствует в большом избытке, ее концентрация может считаться постоянной и составляет 55,6 моль/л (1000 г : 18 г/моль = 55,6 моль). Подставляя в выражение для константы диссоциации Кд(H_2O) это значение, получают новое выражение:

$$K(H_2O) = [H^+]\,[OH^-] = 10^{-14}\ моль^2/л^2\ при\ 298\ K. \qquad (1.6)$$

Константа К(H_2O) называется ионным произведением, или константой автоионизации воды.

Согласно выражению (1.6), в чистой воде или любом водном растворе при постоянной температуре произведение концентраций (активностей) водород- и гидроксид-ионов есть величина постоянная, называемая ионным произведением воды.

Константа К(H_2O) зависит от температуры. При повышении температуры К(H_2O) увеличивается, так как процесс диссоциации воды - эндотермический:

$$\Delta H^o_д = +\ 56{,}5\ кДж/моль\ (принцип\ Ле\ Шателье).$$

Например, при температуре тела человека 310 К константа К(H_2O) = = $3{,}13 \times 10^{-14}$, а при температуре 373 К возрастает до $5{,}9 \times 10^{-13}$.

В чистой воде при температуре 298 К концентрации ионов H^+, OH^-равны $[H^+] = [OH^-] = 1 \times 10^{-7}$ моль/л, как это следует из равенства (1.6).

В растворах разных веществ в соответствии с законом действующих масс константа К(H_2O) имеет то же значение, что и для чистой воды.

Растворы, в которых $[H^+] = [OH^-]$, называют нейтральными.

Если к чистой воде добавить столько щелочи, чтобы концентрация гидроксид-ионов повысилась, например, до 10^{-4} моль/л, то, по Ле Шателье, равновесие диссоциации воды сместится и концентрация $[H^+]$ понизится до 10^{-10} моль/л, так что по закону действующих масс ионное произведение воды останется равным 10^{-14} $моль^2/л^2$.

Наоборот, если к чистой воде добавить столько кислоты, чтобы концентрация водород-ионов повысилась, например, до 10^{-3} моль/л, то концентрация гидроксид-ионов понизится до 10^{-11} моль/л, и ионное произведение воды опять становится равным 10^{-14} $моль^2/л^2$.

Из этих примеров видно, что концентрации (точнее, активности) гидроксид-ионов и ионов водорода взаимозависимы. Зная концентрацию одного из этих ионов, всегда можно рассчитать концентрацию другого иона. Именно поэтому кислотность и щелочность раствора можно охарактеризовать количественно концентрацией одного из этих ионов.

В качестве характеристики кислой реакции среды часто используют концентрации ионов водорода. Но на практике использование концентрации ионов водорода для характеристики среды не очень удобно. Именно поэтому обычно для этой цели используют отрицательный десятичный логарифм концентрации ионов водорода, называемый водородным показателем pH среды (от англ. power Hydrogene - «сила водорода»:

$$pH = -\lg [H^+].$$

Например, если $[H^+] = 10^{-3}$ моль/л (кислая среда), то pH = 3,0, а когда $[H^+] = 10^{-9}$ моль/л (щелочная среда), то pH = 9,0. В нейтральной среде $[H^+] = 10$ моль/л и pH = 7,0.

Из этих примеров следует:

- в нейтральной среде $[H^+] = 10^{-7}$ моль/л, pH = 7,0;
- в кислой среде $[H^+] > 10^{-7}$ моль/л, pH <7,0;
- в щелочной среде $[H^+] < 10^{-7}$ моль/л, pH >7,0.

Реакцию среды можно охарактеризовать и гидроксильным показателем, т.е. отрицательным десятичным логарифмом концентрации гидроксид-ионов:

$$pOH = -\lg [OH^-].$$

Если взять отрицательный десятичный логарифм выражения ионного произведения воды, получают:

$$-\lg K(H_2O) = -\lg [H^+] \times [OH^-] = -\lg 10^{-14}$$

или

$$pH + pOH = 14.$$

В растворах сильных кислот и оснований показатели pH кислотности и основности могут быть рассчитаны по формулам:

$$pH = -\lg c \text{ (кислота)};$$

$$pOH = -\lg c \text{ (основание)}.$$

В растворах слабых кислот HA кислотно-основное равновесие III типа имеет вид:

$$HA + H_2O \leftrightarrow H_3O^+ + A^-$$

или

$$HA \leftrightarrow H^+ + A^-.$$

Константа кислотной диссоциации K_a равна:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}.$$

Здесь $[H^+] = [A^-]$, потому что в соответствии с реакцией при диссоциации HA образуется один ион H^+ и один ион A^-. $[HA] = c(HA) - [H^+]$, где c(HA) - исходная концентрация кислоты при ее растворении. Подставляя это значение в уравнение для K_a при c(HA), равной 0,01 или больше, получают выражение для расчета концентрации водородионов в растворе слабой кислоты:

$$[H^+] = \sqrt{Kc(HA)}$$

Взяв отрицательный десятичный логарифм обеих частей этого уравнения, получают:

$$pH = ½ [pK_a — \lg c(HA)], \qquad (1.7)$$

где $pK_a = -\lg K_a$.

В растворе слабых оснований B кислотно-основное равновесие III типа имеет вид:

$$B + H_2O \leftrightarrow BH^+ + OH^-,$$

где B - основание, а BH^+ - сопряженная B кислота.

Константа КО-равновесия в этом случае в соответствии с законом действующих масс равна:

$$K_b = \frac{[BH^+][OH^-]}{[B]}. \qquad (1.8)$$

Константу K_b называют константой диссоциации основания B. Например, когда при диссоциации образуются гидроксид-ионы:

$$NH_3 + H_2O \leftrightarrow NH^+_4 + OH^-,$$

константа диссоциации основания B равна:

$$K_b = \frac{[NH_4^+][OH^-]}{[NH_3]}.$$

Согласно теории Бренстеда основанию B соответствует сопряженная кислота BH^+. Именно поэтому сила основания в водном растворе может определяться и константой кислотной диссоциации сопряженной кислоты.

Действительно, константа кислотной диссоциации K_a для сопряженной кислоты BH^+ равна:

$$K_a = \frac{[H^+][B]}{[BH^+]}. \qquad (1.9)$$

Например, для диссоциации аммоний-иона:

$$NH^{+}_{4} \leftrightarrow NH_3 + H^{+}$$

$$K_a = \frac{[H^+][NH_3]}{[NH_4^+]}.$$

Перемножая выражения для K_a и K_b, получают:

$$K_a K_b = \frac{[H^+][B]}{[BH^+]} \frac{[BH^+][OH^-]}{[B]} = [H^+][OH^-] = K(H_2O).$$

Таким образом, величины K_a и K_b для сопряженной кислотно-основной пары связаны простым соотношением (T = 298 K):

$$K_a K_b = 10^{-14} \text{ или } pK_a + pK_b = 14,$$

отсюда

$$pK_b = 14 - pK_a. \qquad (1.10)$$

Таким образом, сила кислот и оснований может быть выражена в общей шкале значений pK_a, подобно тому как реакция среды характеризуется водородным показателем pH.

Кислотно-основной метаболом человеческого организма в норме и патологии

Одно из удивительных свойств живых организмов - постоянство pH биологических жидкостей, тканей и органов.

В табл. 1.6 представлены значения pH некоторых биологических объектов. Из данных таблицы видно, что pH различных жидкостей в организме человека меняется в довольно широких пределах в зависимости от их местонахождения. Например, pH сыворотки крови - 7,4, тогда как pH желудочного сока - жидкости, выделяемой клетками слизистой стенки желудка, - составляет около единицы.

Таблица 1.6. Значения pH различных биожидкостей и тканей организма

Биожидкость	pH (в норме)
Сыворотка крови	7,40 ± 0,05
Слюна	6,35-6,85
Чистый желудочный сок	0,9-1,1
Моча	4,8-7,5
Спинномозговая жидкость	7,40-0,05
Сок поджелудочной железы	7,5-8,0
Содержимое тонкой кишки	7,0-8,0
Желчь в протоках	7,4-8,5
Желчь в пузыре	5,4-6,9
Молоко	6,6-6,9
Водянистая влага глаза (слезная жидкость)	7,4 ± 0,1
Кожа (внутриклеточная жидкость, различные слои)	6,2-7,5
Печень (внутриклеточные жидкости):	
- купферовские клетки;	6,4-6,5
- клетки по периферии долек;	7,1-7,4
- клетки в центре долек	6,7-6,9

Значения pH крови, спинномозговой жидкости, слезной жидкости, желудочного сока практически постоянны. Это постоянство поддерживается их буферными системами (свойства буферных систем разобраны ниже) и необходимо, чтобы обеспечивать нормальную деятельность ферментов, регулировать осмотическое давление и другие показатели.

Активность ферментов и особенности протекающих в тканях биохимических реакций связаны с узким интервалом значений pH.

Например, оптимальная активность пепсина - фермента желудочного сока (pH ≈ 1,0), расщепляющего пептидные связи в белках, проявляется при pH = 1,5. Ферменты кишечного сока поджелудочной железы (pH 7,5-8,0) - трипсин и химотрипсин, катализирующие гидролиз белков и пептидов, - имеют максимальную активность в слабощелочной среде. Фермент слюны - амилаза, под действием которого крахмал и гликоген распадаются до мальтозы, имеет оптимальную активность при pH = 6,7, что соответствует pH слюны.

Смещение значения pH крови в кислую область от нормальной величины pH = 7,4 называется ацидозом, а в щелочную область - алкалозом.

Большое значение имеет клинико-лабораторное исследование метаболома желудочного сока на разные виды кислотности: активную (обусловлена содержанием сильной соляной и слабой молочной кислот, кислых фосфатов, муцина и других белков), резервную (разность общей и активной кислотности).

Активная кислотность измеряется концентрацией свободных ионов водорода в растворе.

Потенциальная (резервная) кислотность измеряется количеством водород-ионов, связанных в молекулах кислоты, т.е. представляет собой запас недиссоциированных молекул кислоты.

Сумма активной и резервной кислотностей составляет общую кислотность, которая определяется общей (аналитической) концентрацией кислоты и устанавливается титрованием. Активная кислотностьопределяет pH данного раствора.

Кислотно-основные буферные системы и растворы

В ходе титрования слабой кислоты щелочью (NaOH) (кислотно-основное титрование) проводят регистрацию pH. График зависимости pH от количества добавленной щелочи называется кривой титрования (рис. 1.2).

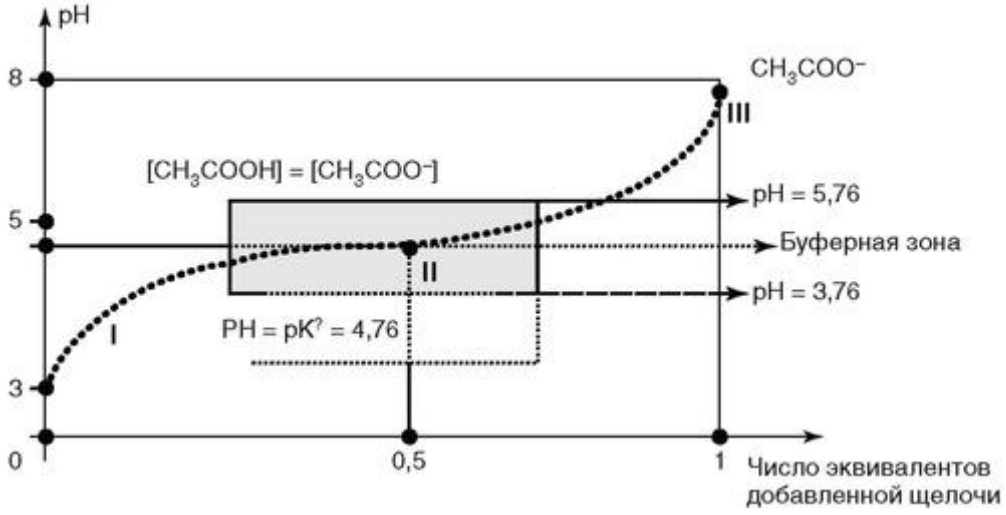


Рис. 1.2. Кривая титрования слабой (уксусной) кислоты щелочью

Наиболее важные точки на графике обозначены римскими цифрами I, II, III.

Точка I определяет pH исходного раствора слабой кислоты, точка III - точка эквивалентности - определяет количество кислоты в растворе.

Существенная особенность графика - точка перегиба II. В окрестности этой точки pH_{II} наблюдается интересное явление - кислая реакция среды меняется медленно при добавлении больших количеств щелочи. Это явление называют *буферным действием.* Область $pH_{II}\pm1$, в которой кислая реакция среды меняется незначительно, называют *буферной зоной.*

Кислотно-основными буферными растворами называют такие растворы, pH которых сохраняется практически постоянным при разбавлении или добавлении небольших количеств сильной кислоты или сильного основания.

Буферная емкость. Способность буферных растворов сохранять постоянство pH ограниченна. Прибавлять кислоту и щелочь, существенно не меняя pH буферного раствора, можно лишь в ограниченных количествах.

Величину, характеризующую способность буферного раствора противодействовать смещению реакции среды при добавлении сильных кислот или сильных оснований, называют буферной емкостью раствора.

Буферная емкость B измеряется количеством кислоты или щелочи (моль или ммоль эквивалентов), добавление которого к 1 л буферного раствора изменяет pH на единицу.

Математически буферная емкость определяется следующим образом.

Буферная емкость по кислоте (моль/л):

$$B_K = \frac{n(\frac{1}{z}HA)}{|pH - pH_0|V(бр)} = \frac{c(\frac{1}{z}HA)V(HA)}{|pH - pH_0|V(бр)};$$

буферная емкость по щелочи (моль/л):

$$B_{Щ} = \frac{n(\frac{1}{z}B)}{|pH - pH_0|V(бр)} = \frac{c(\frac{1}{z}B)V(B)}{|pH - pH_0|V(бр)},$$

где V(HA), V(B) - объемы добавленных кислоты HA или щелочи B соответственно, л; n(1/z HA), n(1/z B) - количество кислоты или щелочи, моль; c(1/z HA), c(1/z B) - молярные концентрации соответственно кислоты и щелочи; V (бр) - объем буферного раствора, л; pH_0, pH - значения pH буферного раствора до и после добавления кислоты или щелочи; | pH-pHo | - разность pH по модулю.

Буферная емкость, как следует из ее определения, зависит от ряда факторов.

Чем больше количества компонентов кислотно-основной пары основание/ сопряженная кислота в растворе, тем выше буферная емкость этого раствора (следствие закона эквивалентов).

Буферная емкость зависит от соотношения концентраций компонентов буферного раствора, а следовательно, и от pH буферного раствора.

На рис. 1.3 показан типичный график зависимости буферной емкости от pH на примере ацетатной кислотно-основной системы CH_3COO^-/ CH_3COOH. Из данных, представленных на рис. 1.3, видно, что максимальная буферная емкость, т.е. наибольшая способность этой системы противостоять изменению pH, соответствует значению $pH = pK_a = 4{,}76$. При $pH = pK_a$ отношение c(соль)/c(к-та) = 1, т.е. в растворе имеется одинаковое количество соли и кислоты. При таком соотношении концентраций pH раствора изменяется в меньшей степени, чем при других, и, следовательно, буферная емкость максимальна при равных концентрациях компонентов буферной системы и уменьшается с отклонением от этого соотношения.

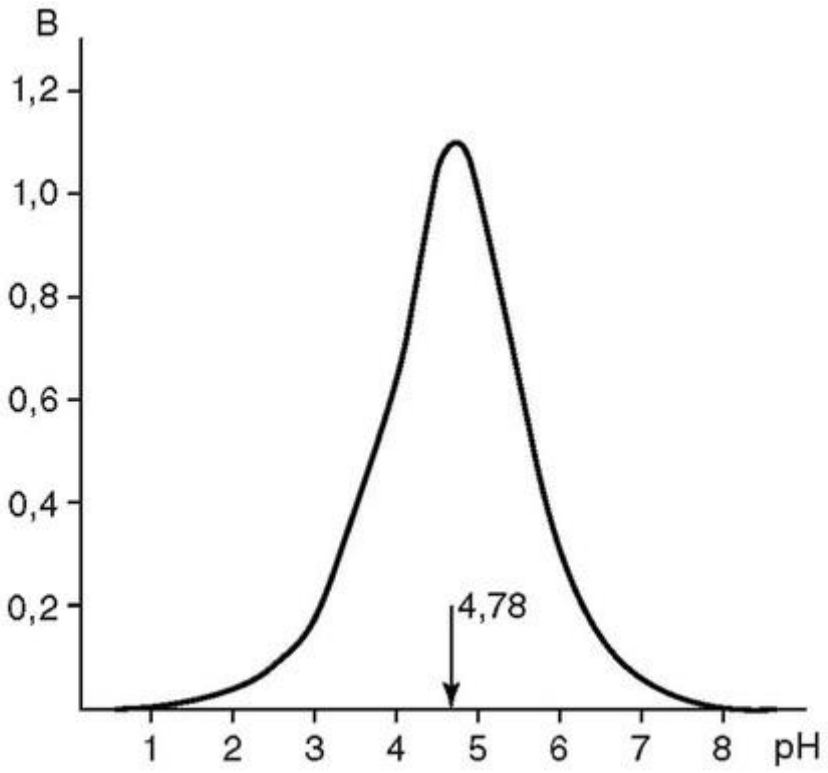


Рис. 1.3. Зависимость буферной емкости B от pH

Рис. 1.3 демонстрирует другой важный момент. Рабочий участок буферной системы, т.е. способность противодействовать изменению pH при добавлении кислот и щелочей, имеет протяженность приблизительно одну единицу pH с каждой стороны от точки pH = pK_a. Вне этого интервала буферная емкость быстро снижается до 0. Интервал pH = $pK_a \pm 1$ называется зоной буферного действия.

Особенно большое значение буферные системы имеют в поддержании кислотно-основного равновесия организмов. Внутриклеточные и внеклеточные жидкости всех живых организмов, как правило, характеризуются постоянным значением pH, которое поддерживается с помощью различных буферных систем. Значение pH большей части внутриклеточных жидкостей находится в интервале от 6,8 до 7,8.

Буферные системы крови

Кровь человека представляет собой взвесь клеток в жидкой среде. Кислотно-основное равновесие в крови обеспечивается совместным участием буферных систем плазмы и клеток: водородкарбонатной, фосфатной и белковой буферными системами.

Нормальное значение pH в метаболоме плазмы крови составляет 7,40 ± 0,05. Этому соответствует интервал значений активной кислотности $a(H^+)$ от 3,7 до $4{,}0 \times 10^{-8}$ моль/л. Поскольку в крови присутствуют различные электролиты (HCO^-_3, H_2CO_3, $H_2PO^-_4$, HPO^{2-}_4), белки, аминокислоты, это означает, что они диссоциируют в такой степени, чтобы концентрация $c(H^+)$ находилась в указанном интервале.

Плазма крови. В плазме крови функционирует несколько буферных систем.

Водородкарбонатная буферная система HCO^-_3/H_2CO_3 состоит из угольной кислоты (H_2CO_3) и сопряженного основания (HCO^-_3). Это наиболее важная буферная система крови.

Ее особенность в том, что один из компонентов - угольная кислота (H_2CO_3) образуется при взаимодействии растворенного в плазме CO_2 с водой:

$$CO_2\,(р) + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3.$$

Константа равновесия этой реакции:

$$K = \frac{[H_2CO_3]}{[CO_2]_P},$$

где $[CO_2]_р$ - концентрация растворенного CO_2.

Между CO_2 в альвеолах и водородкарбонатным буфером в плазме крови, протекающей через капилляры легких, устанавливается цепочка равновесия:

$$\text{Атмосфера} \leftrightarrow CO_2\,(г) \overset{1}{\leftrightarrow} CO_2\,(р) \overset{2\ +H_2O}{\leftrightarrow} H_2CO_3 \overset{3}{\leftrightarrow} H^+ + HCO^-_3$$

воздушное пространство легких $\quad -H_2O$ плазма крови.

В соответствии с уравнением Гендерсона-Гассельбаха, pH водород-карбонатного буферного раствора определяется отношением концентрации кислоты H_2CO_3 и соли $NaHCO_3$:

$$pH = pK_{a1}(H_2CO_3) + \lg\frac{c(NaHCO_3)}{c(H_2CO_3)}.$$

Согласно цепочке равновесия содержание H_2CO_3 определяется концентрацией растворенного CO_2, которая по закону Генри пропорциональна парциальному давлению CO_2 в газовой фазе альвеол легких:

$$[CO_2]_p = K_{ГР}(CO_2).$$

Водородкарбонатная буферная система действует как эффективный физиологический буферный раствор вблизи pH = 7,4.

При поступлении в кровь кислот - доноров H^+ равновесие 3 в цепочке по принципу Ле Шателье смещается влево в результате того, что ионы HCO^-_3 связывают ионы H^+ в

молекулы H_2CO_3. При этом концентрация H_2CO_3 повышается, а концентрация ионов HCO^-_3 соответственно понижается. Повышение концентрации H_2CO_3, в свою очередь, приводит к смещению равновесия 2 влево (принцип Ле Шателье). Это вызывает распад H_2CO_3 и увеличение концентрации CO_2, растворенного в плазме. В результате смещается равновесие 1 влево и повышается давление CO_2 в легких. Избыток CO_2 выводится из организма.

При поступлении в кровь оснований - акцепторов H^+ сдвиг равновесия в цепочке происходит в обратной последовательности.

В результате описанных процессов водородкарбонатная система крови быстро приходит в равновесие с CO_2 в альвеолах и эффективно обеспечивает поддержание постоянства pH плазмы крови.

Вследствие того, что концентрация $NaHCO_3$ в крови значительно превышает концентрацию H_2CO_3, буферная емкость этой системы будет значительно выше по кислоте. Иначе говоря, водородкарбонатная буферная система особенно эффективно компенсирует действие веществ, увеличивающих кислотность крови. К числу таких веществ прежде всего относят молочную кислоту *HLac,* избыток которой образуется в результате интенсивной физической нагрузки. Этот избыток нейтрализуется в следующей цепочке реакций:

$$NaHCO_3 + HLac \leftrightarrow NaLac + H_2CO_3 \leftrightarrow H_2O + CO_2\,(р) \leftrightarrow CO_2\,(г).$$

Таким образом, эффективно поддерживается нормальное значение pH крови при слабовыраженном сдвиге pH, обусловлено ацидозом.

В замкнутых помещениях многие часто испытывают удушье - нехватку кислорода, учащение дыхания. Однако удушье связано не столько с недостатком кислорода, сколько с избытком CO_2.

Избыток CO_2 в атмосфере, согласно закону Генри, приводит к дополнительному растворению CO_2 в крови. А это приводит к понижению pH крови, то есть к ацидозу.

Водородкарбонатная буферная система наиболее быстро отзывается на изменение pH крови. Ее буферная емкость по кислоте составляет $В_к$ = 40 ммоль/л плазмы крови, а буферная емкость щелочи значительно меньше и равна примерно $В_щ$ = 1-2 ммоль/л плазмы крови.

Фосфатная буферная система (HPO^2_4/H_2PO_4) состоит из слабой кислоты (H_2PO_4) и сопряженного основания (HPO^{2-}_4). В основе ее действия лежит кислотно-основное равновесие:

$$H_2PO^-_4 \leftrightarrow H^+ + HPO^{2-}_4.$$

Фосфатная буферная система способна сопротивляться изменению pH в интервале 6,2-8,2, т.е. обеспечивает значительную долю буферной емкости крови.

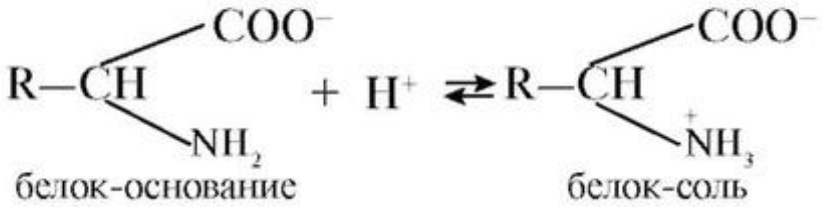
Фосфатная буферная система имеет более высокую емкость по кислоте, чем по щелочи. Именно поэтому она эффективно нейтрализует кислые метаболиты, поступающие в кровь, например молочную кислоту (HLac):

$$HPO^{2-}_4 + HLac \leftrightarrow H_2PO^-_4 + Lac^-.$$

Роль этой системы особенно важна при интенсивных мышечных нагрузках, сопровождаемых выделением лактата.

Однако различия буферной емкости данной системы по кислоте и щелочи не столь велики, как у водородкарбонатной: $B_к$ = 1-2 ммоль/л, $B_щ$ = 0,5 ммоль/л. Именно поэтому фосфатная система участвует в нейтрализации как кислых, так и основных продуктов метаболизма. В связи с малым содержанием фосфатов в плазме крови она менее мощная, чем водородкарбонатная буферная система.

Белковая буферная система состоит из белка-основания и белка-соли. Соответствующее кислотно-основное равновесие в средах, близких к нейтральным, смещено влево, и белок-основание преобладает (R - молекулярная часть белка):



белок-основание белок-соль

Основную часть белков плазмы крови (90%) составляют альбумины и глобулины. Изоэлектрические токи этих белков (число катионных и анионных групп одинаково, заряд молекулы белка равен нулю) лежат в слабокислой среде при pH = 4,9-6,3, поэтому в физиологических условиях при pH = 7,4 белки находятся преимущественно в формах белок-основание и белок-соль.

Буферная емкость, определяемая белками плазмы, зависит от концентрации белков, их вторичной и третичной структуры и количества свободных протонакцепторных групп. Эта система может нейтрализовать как кислые, так и основные продукты. Однако вследствие преобладания формы белок-основание ее буферная емкость значительно выше по кислоте и составляет для альбуминов $B_к$ = 10 ммоль/л, а для глобулинов $B_к$ = 3 ммоль/л.

Буферная емкость свободных аминокислот плазмы крови незначительна как по кислоте, так и по щелочи. Это связано с тем, что почти все аминокислоты имеют значения pK_a, очень далекие от pK_a = 7. Именно поэтому при физиологическом значении pH их мощность мала. Практически только одна аминокислота - гистидин (pK_a = 6,0) обладает значительным буферным действием при значениях pH, близких к pH плазмы крови.

Таким образом, уменьшение мощности буферных систем плазмы крови схематично можно изобразить так: HCO^-_3/H_2CO_3 > белки > HPO^{2-}_4/H_2PO^- > аминокислоты.

Эритроциты. Во внутренней среде эритроцитов в норме поддерживается постоянный pH, равный 7,25. Здесь также действуют водород-карбонатная и фосфатная буферная

системы. Однако их мощность отличается от таковой в плазме крови. Кроме того, в эритроцитах белковая система «гемоглобин-оксигемоглобин» играет важную роль как в процессе дыхания (транспортная функция по переносу кислорода к тканям и органам и удалению из них метаболической CO_2), так и в поддержании постоянства pH внутри эритроцитов, а в результате и в крови в целом. Необходимо отметить, что эта буферная система в эритроцитах тесно связана с водородкарбонатной системой.

Поскольку pH внутри эритроцитов равен 7,25, то соотношение концентраций соли (HCO^-_3) и кислоты (H_2CO_3) здесь несколько меньше, чем в плазме крови. Хотя буферная емкость этой системы по кислоте внутри эритроцитов несколько меньше, чем в плазме, она эффективно поддерживает постоянство pH.

Фосфатная буферная система играет в клетках крови гораздо более важную роль, чем в плазме крови. Прежде всего, это связано с большим содержанием в эритроцитах неорганических фосфатов.

Таким образом, в поддержании постоянства кислотно-щелочного равновесия в крови участвует ряд буферных систем, обеспечивающих кислотно-основной гомеостаз в организме (табл. 1.7).

Таблица 1.7. Соотношение буферных систем крови

Буферная система	Доля системы, %
Водородкарбонаты плазмы	35
Водородкарбонаты эритроцитов	18
Гемоглобин-оксигемоглобин эритроцитов	39
Белки плазмы	7
Органические фосфаты	4
Неорганические фосфаты	2

Вопросы и задачи к разделу 1.1

1. Как изменяется растворимость газов в воде при изменении температуры и давления?

2. Рассчитайте молярную концентрацию 0,9% раствора натрия хлорида (физиологического раствора) (ρ = 1 г/мл).

3. Мочевину массой 3 г растворили в 200 г воды. Вычислите моляльную концентрацию полученного раствора.

4. Вычислите молярную долю натрия хлорида в системе, которая состоит из 0,2 моль NaCl и 8 моль H_2O.

5. Общая масса азота в суточной моче в норме равна 7-25 г. Выразите количество азота в суточной моче в молях.

6. Что происходит с клеткой в гипо- и гипертоническом растворах?

7. Что называется степенью диссоциации? Какие факторы влияют на степень диссоциации?

8. Что называется константой диссоциации? Напишите выражения констант диссоциации H_2S, H_2CO_3 по первой и второй ступеням.

9. Какая взаимосвязь существует между степенью и константой диссоциации слабых электролитов?

10. Что такое кислота и основание с точки зрения протонной теории Бренстеда?

11. Укажите сопряженную кислоту для следующих оснований: H_2O, NH_3, HPO_4^{2-}.

12. Концентрация ионов $[OH^-]$ в растворе равна $6{,}5 \times 10^{-8}$ моль/л. Вычислите pH этого раствора.

13. Содержание соляной кислоты в желудочном соке человека составляет 0,4-0,5%. Рассчитайте примерную величину pH желудочного сока, приняв его плотность за 1 г/мл.

14. Вычислите $[H^+]$ для следующих растворов: а) мочи, pH = 6,0; б) слюны, pH = 6,7.

15. При каких значениях pH желудочного сока имеет место пониженная кислотность?

16. Назовите типы буферных систем.

17. Что называется буферной емкостью системы? От чего зависит буферная емкость системы?

18. Разберите механизм действия водородкарбонатной, гемоглобиновой, белковой и фосфатной буферных систем. Какова их биологическая роль в обеспечении нормальной жизнедеятельности человека?

18. Какова роль фосфатной буферной системы крови при интенсивных мышечных нагрузках?

19. Какие типы веществ подвергаются гидролизу?

20. Рассчитайте степень гидролиза натрия карбоната по первой ступени в растворе с концентрацией $c(Na_2CO_3) = 0{,}5$ моль/л.

21. Вычислите pH 0,1 моль/л раствора CH_3COONa, если $K_a(CH_3COOH) = 1{,}85 \times 10^{-5}$ моль/л.

22. Напишите уравнение гидролиза АТФ. Какова биологическая роль этого процесса в организме человека?

1.2. ЭЛЕМЕНТНЫЙ МЕТАБОЛОМ

Изучая геохимические превращения в земной коре, В.И. Вернадский установил, что изменения, происходящие в ее верхних слоях, оказывают определенное влияние на химический состав живых организмов. Исследования химического состава земной коры, почвы, морской воды, растений, животных, человека показали, что в живых организмах, в том числе и у человека, можно обнаружить почти все те же элементы, которые есть в земной коре и морской воде.

Пути поступления химических элементов в организм человека разнообразны. В процессе эволюции от неорганических веществ к биоорганическим основой использования тех или иных химических элементов при создании биосистем является естественный отбор.

Анализ данных о содержании химических элементов в земной коре, морской воде, растительных, животных организмах. Установлено, что большую долю вещества живых организмов составляют элементы, которые имеют довольно высокую распространенность в земной коре. Однако эта закономерность соблюдается не всегда. Например, в земной коре содержится много кремния (27,6%), а в живых организмах его мало. Аналогично и для алюминия, который в больших количествах содержится в земной коре (7,45%) и в очень незначительных ($1x10^{-5}$%) - в живых организмах.

Увеличенное содержание элемента в организме по сравнению с окружающей средой называют биологическим концентрированием элемента.

В результате естественного отбора основу живых систем составляют только шесть элементов - углерод, водород, кислород, азот, фосфор, сера, получивших название органогенов. Этих элементов в организме 97,4%.

Органогеном номер один, несомненно, - углерод. Он способен образовывать прочные ковалентные связи.

Соотношение кислорода и водорода в биомолекулах определяет тенденцию этих соединений к диспропорционированию и взаимодействию их с водой - средой живых организмов.

Остальные три органогена - азот, фосфор и сера, а также некоторые другие элементы (железо, магний), составляющие активные центры ферментов, как и углерод, очень лабильны. Для органогенов характерно образование водорастворимых соединений, что способствует их концентрированию в живых организмах. Характерным для органогенов, а также для некоторых металлов железа, магния и других является исключительное разнообразие образуемых ими связей. Это в значительной мере определяет разнообразие биомолекул в живых организмах.

1.2.1. Макро- и микроэлементы в среде и в организме человека

В.И. Вернадский в зависимости от среднего содержания (массовой доли - ω, %) элементов в живых организмах делил их по декадной системе. Соответственно этой классификации элементы, содержащиеся в живых организмах, делят на три группы.

Макроэлементы - элементы, содержание которых в организме выше 10^{-2}%. К ним относятся кислород, углерод, водород, азот, фосфор, сера, кальций, магний, натрий и хлор.

Микроэлементы - элементы, содержание которых в организме находится в пределах от 10^{-3} до 10^{-5}%. К ним относятся йод, медь, мышьяк, фтор, бром, стронций, барий, кобальт.

Ультрамикроэлементы - элементы, содержание которых в организме ниже 10^{-5}%. К ним относятся ртуть, золото, уран, торий, радий и др.

В настоящее время ультрамикроэлементы объединяют с микроэлементами в одну группу. В табл. 1.8 приведены уточненные данные по содержанию химических элементов в организме человека.

Таблица 1.8. Элементный метаболом организма человека

Массовая доля ω, %	Химические элементы (матовая доля - ω, %)
10 и более	O (62), C (21), H (10)
1-10	N (3), Ca (2), P (1)
0,01-1	K (0,23), S (0,16), CI (0,1), Na (0,08), Mg (0,027), Fe (0,01)
10^{-3}-10^{-2}	Zn, Sr
10^{-4}-10^{-3}	Cu, Co, Br, Cs, Si
10^{-5}-10^{-3}	I
10^{-5}-10^{-4}	Mn, V, B, Cr, Al, Ba
10^{-6}-10^{-3}	Mo, Pb, Ti
10^{-7}-10^{-4}	Be, Ag
10^{-6}-10^{-5}	Ni, Ga, Ge, As, Hg, Bi
10^{-7}-10^{-5}	Se, Sb, U
10^{-7}-10^{-6}	Th
10^{-12}-10^{-4}	Ru

В.В. Ковальский, исходя из значимости для жизнедеятельности, разделил химические элементы на три группы.

Жизненно необходимые (незаменимые) элементы. Они постоянно содержатся в организме человека, входят в состав ферментов, гормонов и витаминов (H, O, Ca, N, K, P, Na, S, Mg, CI, C, I, Mn, Си, Co, Fe, Zn, Mo, V). Их дефицит приводит к нарушению нормальной жизнедеятельности человека.

Примесные элементы, которые постоянно содержатся в организме животных и человека (Ga, Sb, Sr, Br, F, B, Be, Li, Si, Sn, Cs, AI, Ba, Ge, As, Rb, Pb, Ra, Bi, Cd, Cr, Ni, Ti, Ag, Th, Hg, U, Se). Биологическая роль их мало выяснена или неизвестна.

Примесные элементы, данные о количестве и биологической роли которых не выяснены (Sc, TI, In, La, Pr, Sm, W, Re, Tb и др.). Обнаружены в организме человека и животных.

Химические элементы, необходимые для построения и жизнедеятельности различных клеток и организмов, называют биогенными элементами.

Для 24 элементов биогенность установлена надежно. Это элементы 1-й и некоторые элементы 2-й групп по Ковальскому.

1.2.2. Топография важнейших биогенных элементов в организме человека

Органы человека по-разному концентрируют в себе различные химические элементы, т.е. микро- и макроэлементы неравномерно распределяются между разными органами и тканями. Большинство микроэлементов накапливается в печени, костной и мышечной тканях. Эти ткани служат основным депо (запасником) для многих микроэлементов.

Элементы могут проявлять специфическое сродство по отношению к некоторым органам и содержатся в них в высоких концентрациях. Хорошо известно, что:

- цинк концентрируется в поджелудочной железе;
- йод - в щитовидной;

- фтор - в эмали зубов;
- алюминий, мышьяк, ванадий накапливаются в волосах и ногтях;
- кадмий, ртуть, молибден - в почках;
- олово - в тканях кишечника;
- стронций - в предстательной железе, костной ткани;
- барий - в пигментной сетчатке глаза;
- бром, марганец, хром - в гипофизе и т.д.

Данные по распределению (топографии) некоторых макро- и микроэлементов в организме человека приведены на рис. 1.4.

В организмах микроэлементы могут находиться как в связанном состоянии, так и в виде свободных ионных форм. Установлено, что кремний, алюминий, медь и титан в тканях головного мозга находятся в виде комплексов с белками, тогда как марганец - в ионном виде.

Водород и кислород - макроэлементы. Они входят в состав воды, которой в организме взрослого человека в среднем содержится около 65%. Вода неравномерно распределена по органам, тканям и биологическим жидкостям человека. Например, в желудочном соке, слюне, плазме крови, лимфе вода составляет от 99,5 до 90%. В моче, сером веществе головного мозга, почках - 80%, в белом веществе головного мозга, печени, коже, спинном мозге, мышцах, легких, сердце - 70-80%. Меньше всего - 40% воды содержится в скелете.

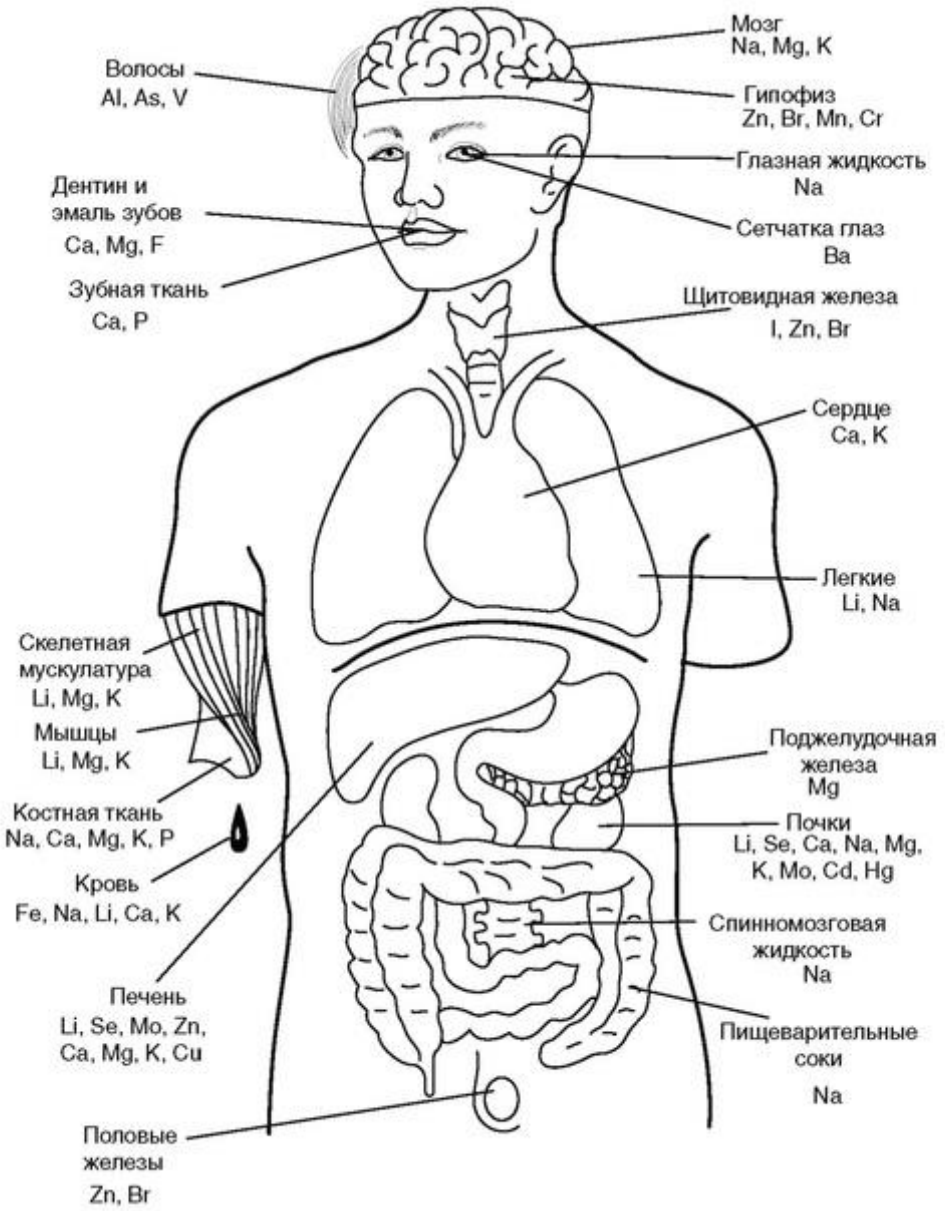


Рис. 1.4. Концентрирование элементов в организме человека

Макроэлементы - углерод, водород, кислород, азот, сера, фосфор - входят в состав белков, нуклеиновых кислот и других биологически активных соединений организма. Содержание углерода в белках составляет от 51 до 55%, кислорода - от 22 до 24%, азота - от 15 до 18%, водорода - от 6,5 до 7%, серы - от 0,3 до 2,5%, фосфора - около 0,5%. О содержании белков в различных тканях и органах животных и человека, а следовательно, и о примерном содержании элементов C, H, N, S, P можно судить на основании данных, приведенных в табл. 1.9.

Таблица 1.9. Метаболом белков в тканях различных органов животных и человека (ω, % сухой массы)

Органы и ткани	Массовая доля ω,%
Селезенка	84
Легкие	82
Мышцы	80
Почки	72

Сердце	60
Печень	57
Головной мозг	45
Кишечник	63
Кожа	63
Кости	28
Зубы	24

Из представленных в таблице данных видно, что максимальное количество белков (~80%) содержится в селезенке, легких, мышцах, минимальное (~25%) - в костях и зубах.

Углерод, водород и кислород входят также в состав углеводов, содержание которых в тканях животных невелико - примерно 2%. Эти элементы входят в состав липидов (жиров). Кроме того, в состав фосфолипидов входит фосфор в виде фосфатных групп. В наибольшей степени липиды концентрируются в головном мозге (12%), а затем в печени (5%), молоке (2-3%) и сыворотке крови (0,6%). Однако основная часть фосфора (600 г) содержится в костной ткани. Это составляет 85% массы всего фосфора, находящегося в организме человека. Концентрируется фосфор и в твердых тканях зубов, в состав которых он входит вместе с кальцием, хлором, фтором в виде гидроксил-, хлор-, фторапатитов общей формулы: $Ca_5(PO_4)_3X$, где X = OH, Cl, F соответственно.

Кальций концентрируется преимущественно в костной ткани, а также в зубной ткани. Натрий и хлор в основном содержатся во внеклеточных жидкостях, а калий и магний - во внутриклеточных. В виде фторидов натрий и калий входят в состав костной и зубной ткани. Магний в виде фосфата ($Mg_3(PO_4)_2$) содержится в твердых тканях зуба.

Десять металлов, жизненно необходимых для живого организма, получили название «металлы жизни».

Установлено, что в организме человека массой 70 кг содержание металлов жизни составляет:

- кальция - 1700 г;
- калия -250 г;
- натрия - 70 г;
- магния - 42 г;
- железа - 5 г;
- цинка - 3 г;
- меди - 0,2 г;
- марганца, молибдена и кобальта, вместе взятых, - менее 0,1 г.

В теле взрослого человека содержится около 3 кг минеральных солей, причем 5/6 этого количества (2,5 кг) приходится на долю костных тканей.

На изменение содержания химических элементов в организме влияют различные заболевания. Например, при рахите происходит нарушение фосфорно-кальциевого обмена, что приводит к снижению содержания кальция. При нефрите из-за нарушения электролитного обмена уменьшается содержание кальция, натрия, хлора и повышается содержание магния, калия.

В поддержании определенного содержания макро- и микроэлементов в организме участвуют гормоны.

1.2.3. Биологическая роль химических элементов в организме

Биологическая роль химических элементов в организме человека чрезвычайно разнообразна.

Главная функция макроэлементов состоит в построении тканей, поддержании постоянства осмотического давления, ионного и кислотно-основного состава.

Микроэлементы, входя в состав ферментов, гормонов, витаминов, биологически активных веществ в качестве комплексообразователей или активаторов, участвуют в обмене веществ, процессах размножения, тканевом дыхании, обезвреживании токсических веществ. Микроэлементы активно влияют на процессы кроветворения, окисления-восстановления, проницаемость сосудов и тканей.

Макро- и микроэлементы - кальций, фосфор, фтор, йод, алюминий, кремний - определяют формирование костной и зубной ткани.

Содержание некоторых элементов в организме человека меняется с возрастом. Например, содержание кадмия в почках и молибдена в печени к старости повышается. Максимальное содержание цинка наблюдается в период полового созревания, затем оно понижается и в старости доходит до минимума. Уменьшается с возрастом и содержание других микроэлементов, например ванадия и хрома.

Выявлено немало заболеваний, связанных с недостатком или избыточным накоплением различных микроэлементов. Дефицит фтора вызывает кариес зубов, дефицит йода - эндемический зоб, избыток молибдена - эндемическую подагру. Такого рода закономерности связаны с тем, что в организме человека поддерживается баланс оптимальных концентраций биогенных элементов - химический гомеостаз. Нарушение этого баланса вследствие недостатка или избытка элемента может приводить к различным заболеваниям.

Кроме шести основных макроэлементов-органогенов - углерода, водорода, азота, кислорода, серы и фосфора, из которых состоят углеводы, жиры, белки и нуклеиновые кислоты, для нормального питания человека и животных необходимы неорганические макроэлементы - кальций, хлор, магний, калий, натрий и микроэлементы - медь, фтор, йод, железо, молибден, цинк, а также, возможно (для животных -доказано), селен, мышьяк, хром, никель, кремний, олово, ванадий.

Анализ содержания и соотношения микроэлементов в организме человека находит применение и в судебно-медицинской экспертизе. Например, в случае алкогольного отравления под влиянием этилового спирта в печени повышается содержание кальция, а натрия и калия становится меньше. При этом в сердце и почках, наоборот, содержание кальция снижается.

Недостаток в пищевом рационе таких элементов, как железо, медь, фтор, цинк, йод, кальций, фосфор, магний и некоторых других, приводит к серьезным последствиям для здоровья человека.

Важно иметь в виду, что для организма вреден не только недостаток, но и избыток биогенных элементов, так как при этом нарушается химический гомеостаз. Например, при поступлении избытка марганца с пищей в плазме повышается уровень меди (синергизм Мп и Си), а в почках он понижается (антагонизм). Повышение содержания молибдена в продуктах питания приводит к увеличению количества меди в печени. Избыток цинка в пище вызывает угнетение активности железосодержащих ферментов (антагонизм Zn и Fe).

Минеральные компоненты, которые в ничтожно малых количествах являются жизненно необходимыми, при более высоких концентрациях становятся токсичными.

Жизненная необходимость, дефицит, токсичность химического элемента представлены в виде кривой зависимости «Концентрация элемента в пищевых продуктах - реакция организма» (рис. 1.5).

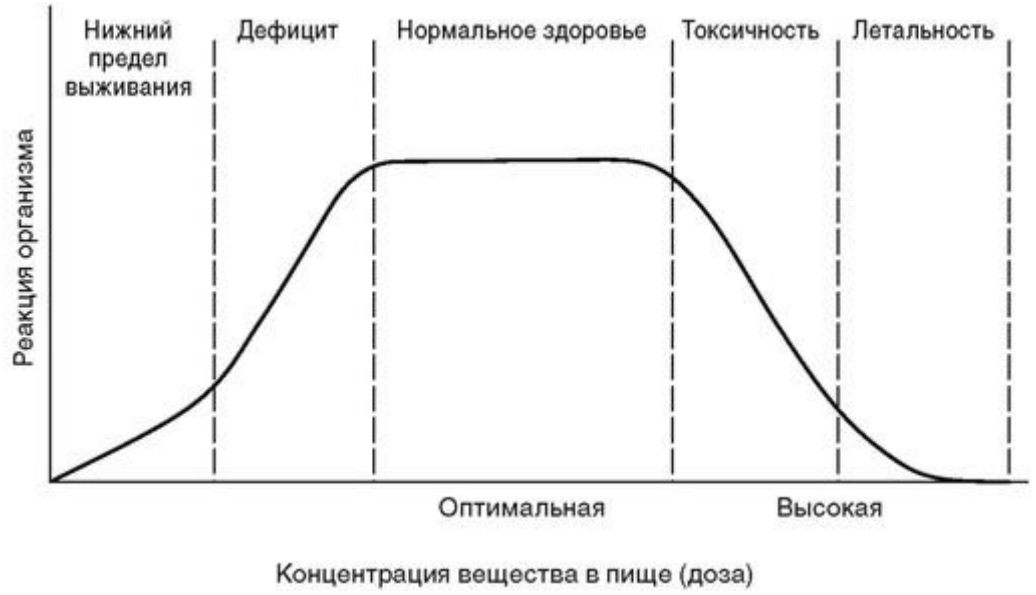


Рис. 1.5. Кривая зависимости реакции организма от концентрации необходимых веществ в пище

Приблизительно горизонтальный участок кривой (плато) описывает область концентраций, соответствующих оптимальному росту, здоровью, воспроизведению. Большая протяженность плато указывает не только на малую токсичность элемента, но и на большую способность организма к адаптации по отношению к значительным изменениям содержания этого элемента. Наоборот, узкое плато свидетельствует о значительной токсичности элемента и резком переходе от необходимых организму количеств к опасным для жизни. При выходе за плато (увеличение концентрации микроэлемента) все элементы становятся токсичными. В конечном счете существенное увеличение концентрации микроэлементов может привести к летальному исходу.

Ряд элементов (серебро, ртуть, свинец, кадмий и др.) считаются токсичными, так как попадание их в организм уже в микроколичествах приводит к тяжелым патологическим явлениям. Химический механизм токсического воздействия некоторых микроэлементов рассмотрен ниже.

Физико-химические свойства, а следовательно, их физиологическая и патологическая роль определяются положением этих элементов в периодической системе Д.И. Менделеева.

Как правило, с увеличением заряда ядра атомов увеличивается токсичность элементов данной группы и уменьшается их содержание в организме. Уменьшение содержания, очевидно, связано с тем, что многие элементы длинных периодов из-за больших атомных и ионных радиусов, высокого заряда ядра, сложности электронных конфигураций, малой растворимости соединений плохо усваиваются живыми организмами. В организме в значительных количествах содержатся легкие элементы *s*- и *p*-блоков.

К макроэлементам относятся *s*-элементы первого (водород), третьего (натрий, магний) и четвертого (калий, кальций) периодов, а также *p*-элементы второго (углерод, азот, кислород) и третьего (фосфор, сера, хлор) периодов. Все они жизненно необходимы. Большинство остальных *s*- и *p*-элементов первых трех периодов (Li, B, AI, F) физиологически активны, *s*- и *p*-элементы больших периодов (n ≥4) редко выступают в качестве незаменимых. Исключение составляют *s*-элементы - калий, кальций, p-элемент - йод. К физиологически активным относят некоторые *s*- и *p*-элементы четвертого и пятого периодов - стронций, мышьяк, селен, бром.

Среди *d*-элементов жизненно необходимы в основном элементы четвертого периода: марганец, железо, цинк, медь, кобальт. В последнее время установлено, что несомненна физиологическая роль и некоторых других *d*-элементов этого периода: титана, хрома, ванадия.

Все *d*-элементы пятого и шестого периодов, за исключением молибдена, не проявляют выраженной положительной физиологической активности. Молибден же входит в состав ряда окислительно-восстановительных ферментов (например, ксантиноксидазы, альдегидоксидазы) и играет большую роль в протекании биохимических процессов.

Некоторые *f*-элементы (лантаноиды и актиноиды) в ничтожных количествах содержатся в организме человека, наличие многих из них пока не установлено. Как правило, они высокотоксичны, образуют устойчивые соединения с комплексонами, полифосфатами, β-дикетонами, полифенолами, оксикислотами и другими полидентатными лигандами, поэтому попадание их в организм может изменить течение многих биохимических реакций.

Сходство и различие биологического действия связано с электронным строением атомов и ионов. Например, *s*-элементы IA-группы склонны образовывать связи с атомом кислорода, все они находятся в растворе в виде гидратированного иона - $Э^{+}(H_2O)_x$. Сходство лития с натрием обусловливает их взаимозамещаемость, причем, как правило, они являются синергистами.

Сходство характеристик этих элементов обусловливает их взаимо-замещаемость и близость биологического действия. Перечисленные элементы, за исключением цинка, стимулируют процесс кроветворения. Все они усиливают обмен веществ, влияют на биосинтез. В биосистемах они выступают в качестве как синергистов, так и антагонистов. Синергизм *3d*-элементов, например, в процессе кроветворения связан, возможно, с участием ионов этих элементов в различных этапах синтеза форменных элементов крови.

Синергизм *3d*-элементов проявляется также и в том, что введение в рацион животных солей Cu^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}и Zn^{2+} увеличивает продуктивность и повышает качество молока.

Можно отметить и другие случаи взаимозамещаемости ионов *3d*-элементов в биосистемах. Так, ионы никеля, марганца и железа замещают друг друга в живых организмах, участвуя в аналогичных ферментативных процессах.

В состав биомолекул входят *p*-элементы ША группы, связываясь с атомами кислорода. Исключение составляет таллий, для которого характерно образование связи с атомами серы. Очевидно, с этим связана высокая токсичность таллия, блокирующего сульфгидрильные (-SH) группы ферментов:

$$E{-}SH + Tl^{+} \rightarrow E{-}S{-}Tl + H^{+}\ (E{-}SH - \text{фермент})$$

Элементы IVA-группы входят в состав биомолекул, связываясь с атомами различных элементов. Углерод образует полимерные гомоцепи и соединяется с водородом, кислородом, азотом, серой, селеном и йодом. Остальные же элементы этой группы образуют преимущественно связи через атом кислорода, а свинец - и через серу. Очевидно, различный характер связи элементов этой группы обусловливает практическое отсутствие их взаимозамещаемости, а склонность свинца образовывать связь с атомами серы определяет его токсическое действие (блокирование сульфгидрильных групп ферментов).

P-элементы VA-группы также входят в состав биомолекул, образуя связи с атомами различных элементов. Для азота в биомолекулах характерны связи с углеродом и водородом. Фосфор связывается через кислород, мышьяк, сурьма и висмут - через кислород и серу. Это обусловливает отсутствие взаимозамещаемости азота и фосфора, а также этих элементов с мышьяком, сурьмой и висмутом. Наоборот, склонность мышьяка, сурьмы и висмута образовывать связи с серой определяет их взаимозамещаемость в организме. Обычно они выступают как синергисты.

Элементы VIA-группы образуют в биомолекулах связи с различными элементами, в том числе и друг с другом. Для кислорода характерны связи O-H, O-C, O-N, O-P, O-O; для серы - S-H, S-C, S-N, S-S, S-O, S-Se; для селена - Se-H, Se-N, Se-C, Se-Se, Se-O. Кислород резко отличается по физико-химическим характеристикам от серы и селена, в то время как эти элементы сходны по свойствам и могут взаимно замещаться в биохимических реакциях, например в процессах белкового обмена. Обычно они выступают в качестве синергистов.

P-элементы VIIA-группы - бром и хлор обычно находятся в организме в виде гидратированных ионов $Г^{-}$, а фтор и йод - в связанном состоянии. Йод в организме образует соединения со связью C-I. Фтор связывается с металлами (Ca, Mg, Fe). По физико-химическим характеристикам и склонности к координации с *биогенными* элементами фтор резко отличается от других галогенов, поэтому он мало участвует в замещении ионов хлора, брома и йода. Три последних элемента близки по свойствам и замещают друг друга в организме. При этом они проявляют как синергизм, так и антагонизм.

Синергизм и антагонизм элементов изучены еще недостаточно. Исследование этого вопроса чрезвычайно важно, так как его решение позволит раскрыть биологическую роль элементов, создать новые лекарственные препараты.

Взаимосвязь между физико-химическими характеристиками элементов и их биологическим действием позволяет прогнозировать результат поступления различных соединений этих элементов в организм человека.

Наряду с заболеваниями, вызванными загрязнениями окружающей среды, существуют заболевания, связанные с аномальным содержанием некоторых элементов в почве, водоемах той или иной географической зоны. Влияние аномалий на элементный метаболом проявляется в заболеваниях, называемых эндемическими.

Биогеохимические провинции - территории, в почве которых содержание химических элементов отличается от среднего.

В живых организмах, в том числе и в организмах людей, проживающих в этих провинциях, протекают специфические биохимические реакции.

Существуют биогеохимические провинции с пониженным и повышенным содержанием в них какого-либо элемента, например геохимическая провинция с повышенным содержанием стронция (река Уров, Восточная Сибирь), меди (Башкортостан), молибдена (некоторые районы Армении), пониженным содержанием йода (западные области Украины), кобальта (Ярославская область).

В настоящее время твердо установлено, что недостаток определенных химических элементов в почве приводит к пониженному уровню этих элементов в организме людей, проживающих в данной местности, и к тем или иным заболеваниям.

Таким образом, существует тесная связь между живой и неживой природой. Обычно содержание элемента в живых организмах соответствует содержанию этого элемента в земной коре. В живых организмах постоянно происходит обмен химических элементов. В таком обмене в основном принимают участие элементы с близкими физико-химическими характеристиками, такими как ионные радиусы, энергия ионизации, координационные числа, устойчивость однотипных комплексных соединений с биолигандами. При этом наблюдаются случаи как синергизма, так и антагонизма.

Вопросы и задачи к разделу 1.2

1. Какие существуют классификации химических элементов, входящих в живые организмы?

2. В земной коре меди содержится значительно меньше, чем титана, а в живом организме меди содержится в десятки раз больше. Как это можно объяснить?

3. При судебно-медицинской экспертизе установлено повышенное содержание кальция и пониженное содержание натрия и калия в печени. Отравление каким веществом могло иметь место?

4. Какова биогенная роль s-элементов IA- и IIA-групп?

5. В каком состоянии большинство //-элементов находится в организме?

6. Назовите основные биологические функции, выполняемые d-элементами в организме.

7. Существует ли взаимосвязь между токсичностью металлов и их электроотрицательностью, между токсичностью металлов и растворимостью их сульфидов?

8. В некоторых районах Армении в почве имеется повышенное содержание молибдена. Какое эндемическое заболевание встречается у населения этих районов?

1.3. ВЕЩЕСТВЕННЫЙ МЕТАБОЛОМ ОРГАНИЗМА И ЕГО ПОДСИСТЕМ

1.3.1. Аминокислоты. Пептиды. Белки

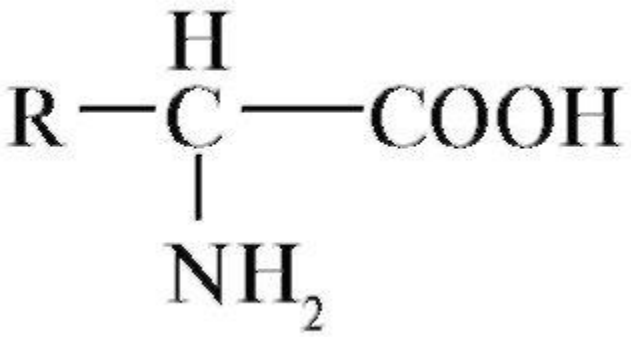
Белки - структурные и силовые элементы, которые функционируют в качестве катализаторов (ферментов), а также реализаторов экспрессии генов. Средняя массовая доля белков в организме человека составляет 15%, или 10,7 кг (см. рис. 1.1). Это главным образом различные мышцы. Белки относятся к классу высокомолекулярных соединений - полимеров.

Физические и химические свойства полимеров определяются свойствами мономеров, из которых состоит полимерная цепь. В связи с этим перед рассмотрением белков необходимо изучить свойства аминокислот - мономеров, из которых состоят полимерные цепи белков.

Аминокислоты

Установлено, что при гидролизе чистых белков, не содержащих примесей, освобождаются 20 различных α-аминокислот (табл. 1.10). Все другие аминокислоты (более 300), открытые в тканях животных, растений и микроорганизмов, существуют в природе в свободном состоянии либо в виде коротких пептидов или комплексов с другими органическими веществами.

Аминокислоты представляют собой гомологический ряд соединений общей формулы:

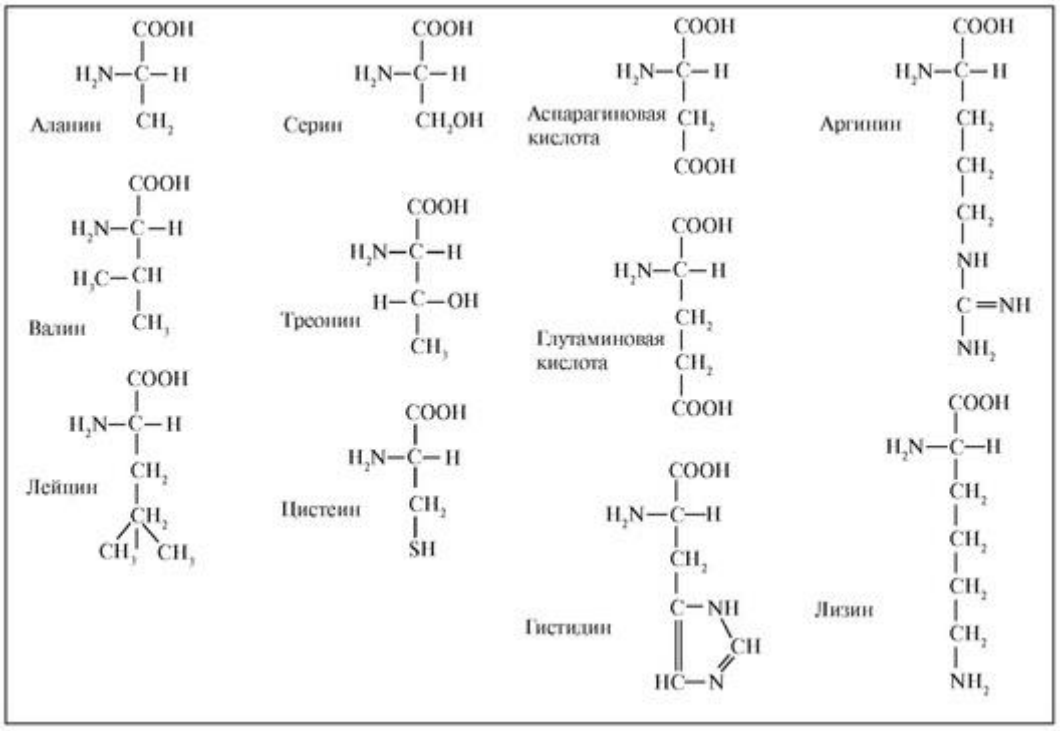


где *R* - радикал, определяющий индивидуальность аминокислоты.

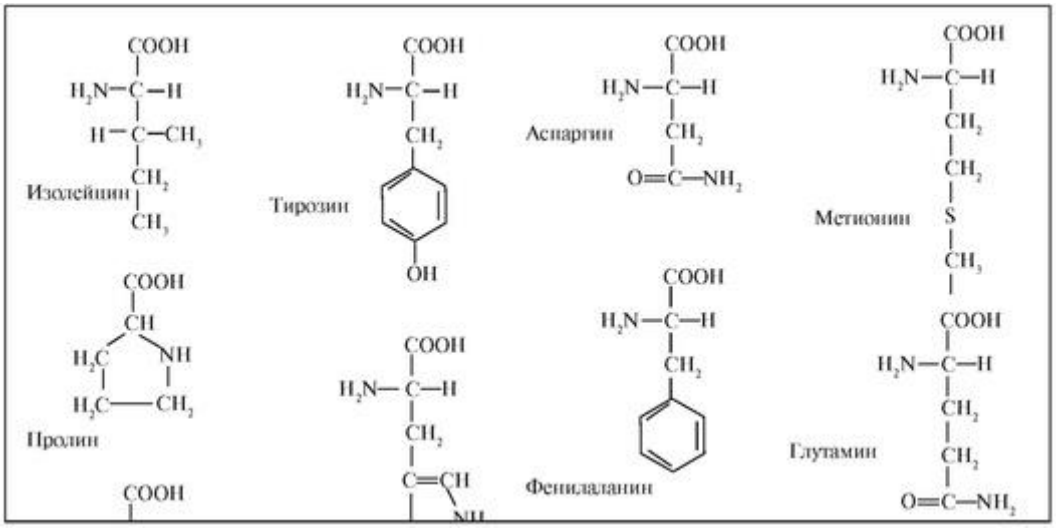
Следует подчеркнуть, что все аминокислоты, входящие в состав природных белков, являются α-аминокислотами, хотя аминогруппа в свободных аминокарбоновых кислотах может находиться в β-, γ-, δ- и ε-положениях.

Классификация аминокислот основана на химическом строении радикалов R (R-групп). Различают ароматические и алифатические аминокислоты, а также аминокислоты, содержащие серу или гидроксильные группы.

Таблица 1.10. Двадцать жизненно необходимых аминокислот



Окончание табл. 1.10



В современной классификации аминокислот (табл. 1.11) учитывают полярность радикалов R, т.е. способность к взаимодействию с водой при физиологических значениях pH = 7,0.

Таблица 1.11. Классы аминокислот

Аминокислоты	Сокращенные обозначения		Изоэлектрическая точка I	Массовая доля в белках, %
	лат.	рус.		
I. Неполярные R-группы				
Глицин	*Gly*	Гли	5,97	7,5
Аланин	*Ala*	Ала	6,02	9,0

Валин	*Val*	Вал	5,97	6,9
Лейцин	*Leu*	Лей	5,97	7,5
Изолейцин	*He*	Иле	5,97	4,6
Пролин	*Pro*	Про	6,10	4,6
II. Полярные, незаряженные R-группы				
Серин	*Ser*	Сер	5,68	7,1
Треонин	*Thr*	Тре	6,53	6,0
Цистеин	*Cys*	Цис	5,02	2,8
Метионин	*Met*	Мет	5,75	1,7
Аспарагин	*Asn*	Аси	5,41	4,4
Глутамин	*Gin*	Глн	5,65	3,9
III. Ароматические R-группы				
Фенилаланин	*Phe*	Фен	5,98	3,5
Тирозин	*Tyr*	Тир	5,65	3,5
Триптофан	*Trp*	Трп	5,88	1,1
IV. Отрицательно заряженные R-группы				
Аспарагиновая кислота	*Asp*	Асп	2,97	5,5
Глутаминовая кислота	*Glu*	Глу	3,22	6,2
V. Положительно заряженные R-группы				
Лизин	*Lys*	Лиз	9,74	7,0
Аргинин	*Arg*	Арг	10,76	4,7

Различают пять классов аминокислот:

- неполярные (гидрофобные);
- полярные (гидрофильные);
- ароматические (большей частью неполярные);
- отрицательно заряженные;
- положительно заряженные.

В представленной классификации аминокислот (см. табл. 1.11) приведены наименования, сокращенные латинские и русские обозначения, значения изоэлектрической точки (pI).

Помимо 20 основных аминокислот, в некоторых белках обнаружены оксипролин, оксилизин, дийодтирозин, фосфосерин и фосфотреонин.

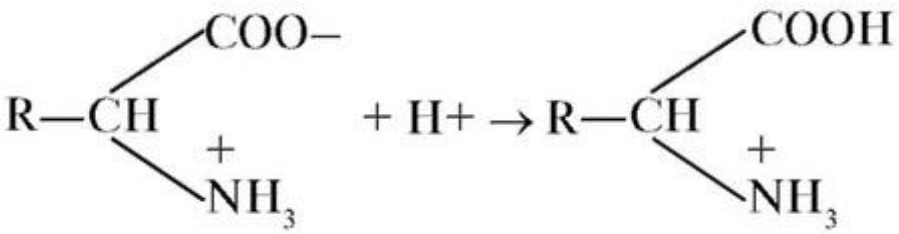
Первые две аминокислоты содержатся в белке соединительной ткани - коллагене. Дийодтирозин - основа гормонов щитовидной железы.

В мышечном белке миозине обнаружен N-метиллизин. В состав протромбина (белка свертывания крови) входит *γ*-карбоксиглутаминовая кислота. Селеноцистеин, в котором ОН-группа серина заменена селеном*(Se),* содержится в глутатионпероксидазе.

Ряд аминокислот выполняет важные функции в обмене веществ, хотя и не входит в состав белков. К ним относятся орнитин, цитруллин, гомосерин, гомоцистеин, цистеинсульфиновая кислота, диоксифенил-аланин.

Аминокислоты хорошо растворимы в воде. Все аминокислоты при физиологических значениях pH переходят в форму биполярного иона - цвиттер-иона [$+NH_3CH(CH_3)COO^-$]:

или



В водных растворах аминокислоты как амфолиты могут диссоциировать как кислота (донор протона) или как основание (акцептор протона).

Например, аланин:

$$^{+}NH_3CH(CH_3)COO^- \rightleftharpoons H^+ + NH_2CH(CH_3)COO^-;$$

$$^{+}NH_3CH(CH_3)COO^- + H^+ \rightleftharpoons NH_2CH(CH_3)COO^-.$$

Если к водному раствору аланина (например, 0,1М) постепенно добавлять щелочь (0,1М раствор NaOH), получают кривую титрования, типичную для всех нейтральных аминокислот (рис. 1.6).

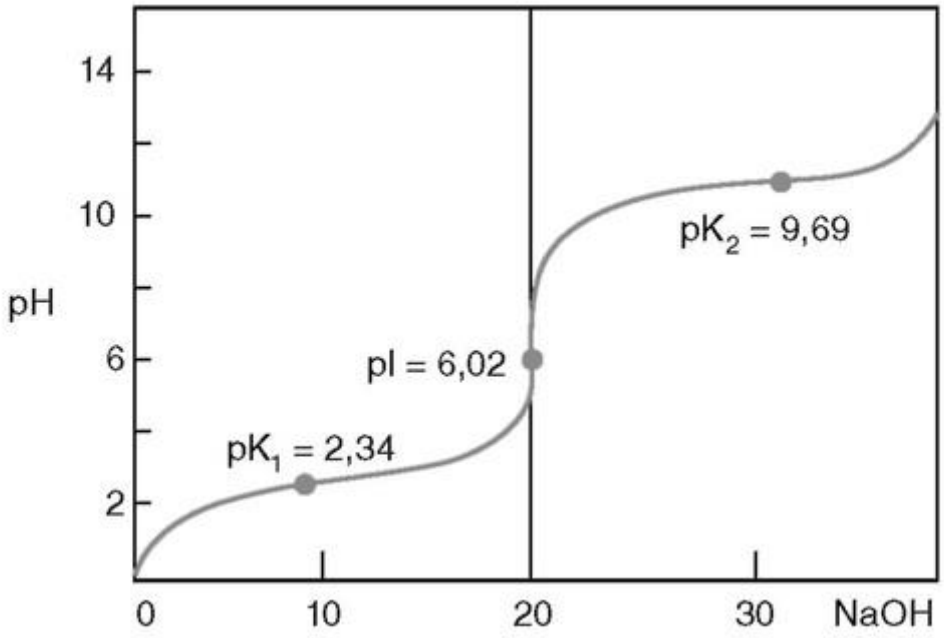


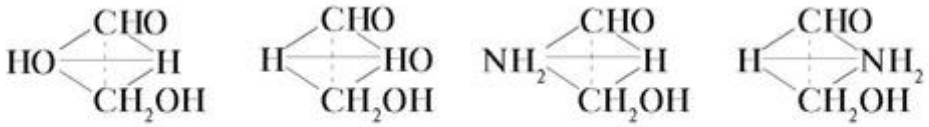
Рис. 1.6. Кривая титрования водного раствора аланина щелочью

Значения pK_1 для карбоксильной группы и pK_2 для аминогруппы (они равны значениям pH раствора, при которых эти группы наполовину диссоциированы) существенно различаются, составляя $pK_1 = 2,34$ и $pK_2 = 9,69$.

Из кривой титрования видно, что точка перехода между ветвями кривой находится при pH = 6,02. При этом значении pH суммарный (или средний) электрический заряд молекулы аланина равен нулю. Это значение pH называют изоэлектрической точкой и обозначают pI В этой точке молекулы аминокислот не перемещаются в электрическом поле ни к аноду, ни к катоду (изоэлектрическое состояние).

Стереоизомерию аминокислот принято соотносить с глицериновым альдегидом, также содержащим асимметрический атом углерода.

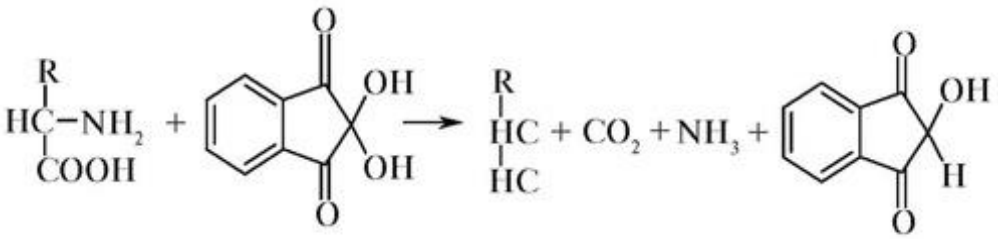
Ниже представлены L- и D-стереоизомеры глицеринового альдегида. Рядом показаны пространственные конфигурации L- и D-аланина:



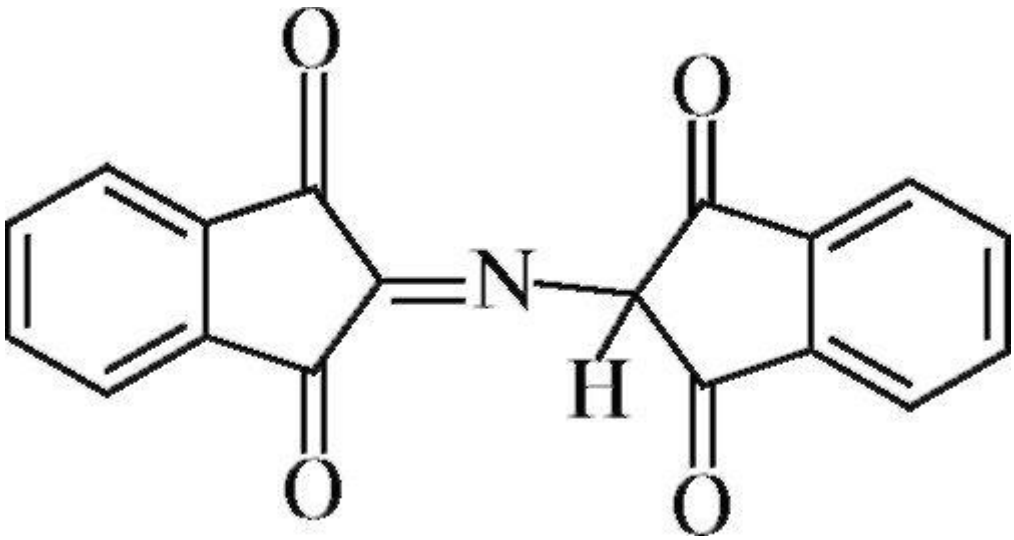
Все аминокислоты, образуемые при гидролизе природных белков в условиях, исключающих рацемизацию, принадлежат к L-ряду. Таким образом, природные аминокислоты имеют пространственное расположение, аналогичное конфигурации L-глицеринового альдегида.

Для качественного и количественного определения аминокислот в биообъектах применяют реакцию с нингидрином.

На I стадии реакции образуется восстановленный нингидрин:



На II стадии аммиак NH_3 реагирует с окисленной и восстановленной формой нингидрина. При этом образуется сине-фиолетовый продукт:



Количество этого продукта и, соответственно, аминокислоты определяют спектрофотометрическим методом на длине волны 570 нм.

Нингидриновую реакцию используют, благодаря ее высокой чувствительности, в современных автоматических анализаторах аминокислот.

Полипептиды. Белки

Одно из названий белков - протеины. Слово «протеин» происходит от греческого слова *protos,* что означает «первичный, занимающий первое место». Отсюда общее обозначение белков - *Pr.*

И в самом деле, все живое на земле содержит белки. Они составляют около 50% сухой массы тела всех организмов. У вирусов содержание белков колеблется в пределах 45-95%.

Около 30% всех белков человеческого тела находится в мышцах, около 20% - в костях и сухожилиях и около 10% - в коже.

Белки образуются в результате последовательных реакций конденсации аминокислот.

Вначале реагируют две аминокислоты (A_1 и A_2), образуя дипептид:

$$A_1 + A_2 \rightarrow A_1 - A_2 + H_2O.$$

Затем с дипептидом реагирует еще одна аминокислота, образуя трипептид:

$$A_1 - A_2 + A_3 \rightarrow A_1 - A_2 - A_3 + H_2O.$$

В результате последовательного присоединения аминокислот образуется полипептид - полимерная молекула, мономерами которой являются аминокислоты, соединенные пептидными (амидными) связями (отсюда название этих полимеров).

Число аминокислот (степень полимеризации) в полипептиде может достигать нескольких тысяч. В реакцию полимеризации могут вступать 20 аминокислот (см. табл. 1.10) в различных комбинациях, поэтому число полипептидов весьма велико, но лишь некоторые из них относятся к белкам.

В каждой клетке человека функционируют тысячи молекул различных белков.

С точки зрения химического строения между полипептидами и белками разницы нет. Белки - полипептиды, созданные клеткой. Они уникальны.

Белки могут состоять из нескольких полипептидных цепей. Пептидные цепи в таком белке могут быть связаны как слабыми молекулярными связями, так и прочными ковалентными непептидными связями.

Белки различаются:

- по качественному составу (состоят из разных аминокислот);
- по молярной массе (различное число аминокислот в молекуле);
- по порядку соединения аминокислот в цепи (табл. 1.12).

Порядок расположения аминокислот в полипептиде называют аминокислотной последовательностью.Аминокислотная последовательность в развернутой конформации молекулы определяет первичную структуру белка.

Процедуру установления этой последовательности называют секвенированием (от англ. *sequence* - «последовательность»). Секвенирование играет важную роль в изучении химии белка.

Ионизированные группы в боковых цепях полипептида обусловливают электролитную природу белков. Доля ионизированных концевых групп полипептидной цепи чрезвычайно мала. Степень ионизации боковых групп зависит от pH среды.

Изоэлектрической точкой белка называется значение pH, при котором белковая молекула имеет одинаковое число положительных и отрицательных ионизированных групп (заряд молекулы равен нулю).

Таблица 1.12. Содержание (массовая доля, % или г/100 г) аминокислот в белках

	Миоглобин мышцы	Гемоглобин эритроциты	Альбумин яичный белок
Аланин	5,7	9,0	6,7
Глицин	6,3	4,2	3,1
Валин	5,3	10,3	7,1
Лейцин	12,2	14,0	9,2
Изолейцин	5,0	0	7,0
Пролин	4,6	4,8	3,6
Фенилаланин	6,2	7,3	7,7
Тирозин	2,4	2,9	3,7
Треонин	3,6	1,9	4,0
Серин	4,6	4,4	8,2
Триптофан	2,9	5,2	3,7
Цистеин	1	1	1,9
Метионин	2,5	1,2	5,2
Аргинин	2,7	3,3	5,7
Гистидин	8,2	8,8	2,4
Лизин	16,1	9,6	6,3
Аспарагин	9,2	9,6	9,3
Глутамин	17,3	6,0	16,5

Каждый белок характеризуется своим значением изоэлектрической точки (табл. 1.13). При этом pH среды растворимость белка минимальна, и молекула белка остается неподвижной в постоянном электрическом поле.

Таблица 1.13. Значения изоэлектрических точек для некоторых белков

Название белка	Молярная масса, г/моль	pI
Миоглобин кашалота	17 600	7,0
Пепсин	35 000	1,1
Альбумин яйца	40 000	4,6
Гемоглобин лошади	68 000	6,6
Уреаза мочи	483 000	4,9
Антипневмококковый белок лошади	660 000	4,7

Примечание: pI - изоэлектрическая точка белка.

При добавлении кислоты pH среды снижается, и белок вследствие подавления диссоциации карбоксильных групп переходит в форму катиона; при добавлении щелочи повышается pH - заряд белковой молекулы меняется на отрицательный, и молекула белка переходит в форму аниона. На основе этого белки относят к полиамфолитам. Данное свойство белков используют для их анализа методом электрофореза.

Концевой участок цепи, на котором находится NH_2-группа, называют *N*-концевым, а противоположный участок с COOH-группой - C-концевым. Основную цепь без аминокислотных радикалов называют полипептидным скелетом молекулы, радикалы *R* - боковыми цепями.

На ранних стадиях изучения белков о величине и форме белковых молекул судили по данным ультрацентрифугирования, двойного лучепреломления и диффузии. Эти данные указывали на существование глобулярных (шарообразных) и фибриллярных (нитевидных) белков.

С помощью сканирующей микроскопии и рентгеноструктурного анализа (высокое разрешение, порядка 0,2-0,3 нм) удалось в деталях расшифровать не только полную пространственную структуру, форму, но и степень асимметрии белковых молекул во всех трех измерениях. Оказалось, что даже глобулярные белки крови (гемоглобин, альбумины и глобулины) асимметричны.

Особенно важно, что не только физико-химические, но и биологические свойства белков как в свободном, так и в связанном с другими биополимерами состоянии определяются их пространственной структурой.

Развернутая конформация молекулы белка неустойчива, и в результате теплового движения первичная структура белка переходит во вторичные структуры - α-спираль, β-слои (складки), беспорядочный клубок*(coil* - «участки») и затем в третичные структуры. В результате молекулы белка приобретают различные формы - конформации.

Под вторичной структурой белка подразумевают способы свертывания, скручивания (складывания, упаковки) полипептидной цепи в спиральную или какую-либо другую конформацию. Наиболее изученные конфигурации полипептидных цепей - α-спирали и β-слои.

Для каждого белка характерна определенная степень спирализации его полипептидной цепи.

Устойчивость конформаций вторичных структур молекулы белка обеспечивается в основном водородными связями между различными участками молекулы.

Третичная структура белка образуется в результате упорядоченной укладки α-спиралей и β-слоев. Примерами являются нитевидная (фибриллярная) и сферическая (глобулярная) третичные структуры белка.

Четвертичная структура белка образуется в результате упорядоченной укладки третичных структур - глобул или фибрилл нескольких белковых молекул. Примерами являются мышечные белки - миозин, коллаген (фибриллярная структура) и белок крови - гемоглобин (глобулярная структура). Четвертичная структура - надмолекулярное, мультимерное образование взаимодействующих между собой белковых молекул - субъединиц. Четвертичная структура белка предусматривает комплементарное взаимодействие белковых молекул за счет водородных связей. Эти комплексы из белковых молекул имеют постоянный состав и число субъединиц.

При различных внешних воздействиях может происходить денатурация белка.

В общем случае денатурацией называют нарушение структуры нативной молекулы белка, преимущественно ее третичной структуры, приводящее к потере характерных свойств (растворимости, электрофоретической подвижности, биологической активности).

Большинство белков денатурирует при нагревании их растворов выше 50-60 °С.

Внешние проявления денатурации сводятся к потере растворимости, особенно в изоэлектрической точке, повышению вязкости белковых растворов, увеличению количества свободных функциональных SH-групп и изменению характера рассеивания рентгеновских лучей. Наиболее характерным признаком денатурации является резкое снижение или полная потеря белком его биологической активности (каталитической, антигенной или гормональной).

Виды белков. Белки подразделяют на фибриллярные (миозин, коллаген, кератин, фиброин шелка) и глобулярные (гемоглобин, ферменты, глобулины крови).

Глобулярные белки (сферообразные) принимают участие в катализе, транспорте, регуляции.

Фибриллярные белки (нитевидные) - структурные и силовые. Фибриллярные белки составляют основу нерастворимых в воде и прочных тканей, таких как рога, копыта, шерсть, волосы, кожа, сухожилия.

Волосы - длинные прочные волокна, основой которых является белок - *α-кератин.* Основой сухожилий является другой белок - коллаген. Эластичность и упругость стенкам артерий или легочных альвеол придает эластин.

Коллаген образуется вне клеток из секретируемого ими белка - про-коллагена, который превращается в коллаген в результате взаимодействия соответствующих ферментов. Молекула коллагена представляет собой тройную суперспираль, образованную тремя скрученными полипептидами. Примерно треть аминокислотных остатков в коллагене представлена пролином, а каждый третий остаток - глицином.

Гидроксилирование пролина требует в качестве кофактора аскорбиновую кислоту (витамин С), которая нужна для поддержания в восстановленном состоянии иона Fe^{2+} в активном центре фермента пролилгидроксилазы. При недостатке витамина С нарушается образование соединительных тканей, и это вызывает заболевание - цингу.

Молекулы коллагена представляют собой цепь из примерно 1000 аминокислот. Они собираются в коллагеновые фибриллы, стыкуясь «голова к хвосту». Пустоты в этой структуре при необходимости могут служить местом первоначального отложения кристаллов гидро-ксиапатита $[Ca_5(OH)(PO_4)_3]$, играющего важную роль в минерализации костей.

Сухожилия представляют собой пучки параллельно ориентированных фибрилл.

В отличие от сухожилий, коллагеновые фибриллы кожи образуют подобие неупорядоченной сетки.

Эластин по своему строению отличен от коллагена и α-кератина. Он содержит обычные α-спирали. Эластин образует сеть, высокая эластичность которой обусловлена ковалентным связыванием боковых цепей лизина: четыре сближенных лизиновых остатка. В результате в один узел объединяются четыре пептидные цепи.

Большинство белковых молекул в организме имеют глобулярное строение. Пептидная цепь в глобулярных белках в естественном состоянии свернута в компактную структуру - глобулу, в отличие от фибриллярных белков, где длинные цепи вытянуты вдоль одной оси.

Глобулы устойчивы в водных системах вследствие того, что полярные группы основной и боковых цепей сосредоточены на поверхности в контакте с водой, а неполярные обращены вглубь молекулы и защищены от этого контакта.

Миоглобин - мышечный белок, переносящий кислород в мышечных клетках. Он состоит из одной полипептидной цепи, содержит только α-спирали, соединенные петлями, и имеет один гем. Аминокислотная последовательность миоглобина отличается от последовательностей как α-, так и β-цепей гемоглобина. Однако третичная структура α- и β-цепей гемоглобина и цепи миоглобина идентична.

Гемоглобин (Hb) - белок, переносящий кислород от легких к тканям и осуществляющий транспорт углекислого газа от тканей обратно к легким. *Hb* локализован в красных кровяных клетках - эритроцитах. Молекула *Hb* состоит из четырех полипептидных цепей (двух идентичных α- и двух идентичных β-цепей), каждая из которых содержит гемовую группу.

Тем состоит из атомов углерода, азота и водорода, образующих плоское кольцо, называемое порфирином. В центре кольца находится атом Fe, связанный с атомами кольца четырьмя координационными связями (из шести возможных). К гему примыкают два остатка гистидина *(His).* Имидазольная группа гистидина связана координационной связью с атомом Fe через пятую координационную связь. По шестой связи присоединяется молекула кислорода (O=O), в результате образуется молекула оксигемоглобина.

Ферменты (от лат. *fermentum* - «закваска») - биологические катализаторы - белковые вещества, ускоряющие протекание биохимических реакций в организме.

Второе название ферментов - энзимы, что в переводе означает «в дрожжах» и связано с дрожжевыми клетками.

Все ферменты состоят из собственно белковых частей и связанных с ними активных центров.

Кроме активного центра, у ферментов имеется *регуляторный (аллостерический) центр,* который в молекуле фермента пространственно разделен с активным центром. Вещества, связывающиеся с аллостерическим центром, называют *аллостерическими эффекторами.* Они влияют через аллостерический центр на функцию активного центра. Аллостерические эффекторы называются либо положительными (активаторы), либо отрицательными (ингибиторы).

Белок, который сам по себе является ферментом и не требует участия дополнительных кофакторов, узнает специфичный субстрат, ориентируя его нужным образом, и осуществляет общий кислотный и основной катализ на двух стадиях гидролиза.

Эти две функции - наиболее общие для всех белков, являющихся ферментами или входящих в их состав.

Молекулярные массы ферментов лежат в пределах от 12 000 до 1 000 000, что намного превышает размеры их субстратов.

У простых ферментов роль функциональных групп контактного и каталитического участков активного центра выполняют только боковые радикалы аминокислот. У сложных ферментов главную роль в этих процессах играют кофакторы.

Кофактор - молекула, соединенная с ферментом, активизирующая его работу.

Роль кофакторов играют неорганические вещества, например ионы Fe^{3+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, или сложные органические вещества, которые в этом случае носят название *коферментов.* Коферменты и ионы металлов связываются с белком фермента в ряде случаев временно и непрочно, в других - прочно и постоянно. В последнем случае небелковую часть фермента называют *простетической группой.*

В табл. 1.14 приведен список некоторых ферментов, для которых необходимы ионы или атомы металлов в качестве кофакторов.

Таблица 1.14. Ферменты с ионами или атомами металлов

Fe^{2+} или Fe^{3+}	Цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза
Cu^{2+}	Цитохромоксидаза
Zn^{2+}	ДНК-полимераза, карбоангидраза, алкогольдегидрогеназа
Mg^{2+}	Гексокиназа, глюкозо-6-фосфатаза
Mn^{2+}	Аргиназа
K^{+}	Пируваткиназа (совместно с Mg^{2+})
Ni^{2+}	Уреаза
Mo	Нитратредуктаза
Se	Глутатионпероксидаза

Каталаза - типичный металлофермент. В состав каталазы, как и в большинство ферментов, входит ион металла - Fe^{2+}. Такие биологические катализаторы называются *металлоферментами.* Строение активного центра каталазы аналогично гемоглобину и миоглобину.

В результате действия каталазы разрушаются две молекулы водород-пероксида, а молекула каталазы высвобождается и может вступать в следующий каталитический цикл. Этот процесс очень быстрый. В течение секунды 1 молекула каталазы может осуществлять до 20 000 циклов.

Каталитическая активность фермента зависит от сохранности нативной структуры белка - исчезает при нагревании белка в результате тепловой денатурации или при воздействии денатурирующими агентами и растворами с экстремальными значениями pH.

Таким образом, для сохранения каталитической активности фермента важно сохранение их первичной, вторичной и третичной структур.

Классификация ферментов. Число различных известных реакций, катализируемых ферментами, - более двух тысяч. Международным союзом по биохимии *(International Union of Biochemisry* - IUB) создана и рекомендована к повсеместному использованию систематика ферментов, позволяющая ориентироваться в этом множестве биохимических соединений.

Все ферменты включены в «Каталог ферментов» под своим классификационным номером, состоящим из четырех цифр. В рамках этой классификации все ферменты подразделены на шесть классов.

В настоящее время приняты два типа названий ферментов: рабочее, или тривиальное, и систематическое. Рабочее название складывается из названия субстрата, типа катализируемой реакции и окончания «-аза».

Лактат + дегидрогенизация (процесс отщепления H^+) + аза = лактатдегидрогеназа.

Оставлены рабочие (тривиальные) названия для ряда давно известных ферментов, таких как пепсин, трипсин, химотрипсин и т.д.

Систематическое название фермента образуется сложнее. Оно складывается из названий субстратов химической реакции, на которую действует фермент, названия типа катализируемого химического превращения и окончания «-аза».

Например, систематическое название фермента лактатдегидрогеназы пишется так:

L-лактат: *NAD*$^+$-оксидоредуктаза

субстрат I субстрат II тип химического превращения

Все ферменты разделены на шесть классов. В каждом из этих классов объединены ферменты, обладающие одинаковой реакционной специфичностью.

К 1-му классу - оксидредуктазы относят практически все ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные превращения.

К 2-му классу - трансферазы относят ферменты, катализирующие реакции переноса различных групп от одного субстрата (донор) к другому (акцептор) и не являющиеся гидролизом.

Ферменты 3-го класса - гидролазы катализируют различные реакции гидролиза.

Ферменты 4-го класса - лиазы катализируют в одном направлении негидролитическое расщепление субстрата с образованием кратной связи, а в другом направлении - присоединение кратной связи.

Например:

5-й класс составляют изомеразы - ферменты, катализирующие превращения в пределах одной молекулы, иными словами, катализирующие различные процессы изомеризации.

6-й класс составляют лигазы (синтетазы), катализирующие реакции конденсации или присоединения, сопряженные с гидролизом и использованием энергии фосфатной связи.

Источниками энергии в реакциях, катализируемых синтетазами, являются АТФ или другие нуклеозидтрифосфаты.

Активаторы и ингибиторы ферментов. Вещества, ускоряющие ферментативные реакции, получили название «активаторы», а замедляющие - «ингибиторы».

Например, активатором пепсиногена (предшественника пепсина) в желудочном соке является соляная кислота, та же соляная кислота является ингибитором для амилазы слюны.

На активность ферментов влияет присутствие различных веществ, например, некоторые катионы повышают, а другие - снижают активность ферментов. Большинство тяжелых металлов - Fe, Hg, Cd - относятся к ингибиторам ферментов. Активаторами являются ионы Mg, Mn, K, Zn, Mo. Этим во многом объяснятся экологическая нагрузка тяжелых металлов.

Некоторые ферменты выделяются в неактивном состоянии в виде проферментов.

Например, пепсин желудочного сока выделяется клетками в виде пепсиногена и активируется соляной кислотой в желудке во время приема пищи.

Трипсин поджелудочной железы выделяется в неактивном состоянии в виде трипсиногена и активируется в кишечнике под влиянием энтерокиназы - фермента кишечного сока.

В том и в другом случае активация заключается в отщеплении от пепсиногена или трипсиногена полипептидов, после чего ферменты становятся активными.

Большинство лекарственных препаратов являются ингибиторами ферментных систем. Эти свойства медикаментов используют для лечения различных заболеваний.

В организме реализуются два типа ингибирования (торможения) активности ферментов - субстратное, или конкурентное, и аллостерическое.

При субстратном ингибировании молекула субстрата и ее аналог присоединяются к одному и тому же активному центру, и между ними возникает конкуренция.

Конкуренция между субстратом и его аналогом обусловлена тем, что и субстрат, и аналог могут присоединяться к активному центру, так как их структуры очень близки, различия весьма незначительны. Конкурент субстрата взаимодействует с активным центром фермента, и субстрат не может вступить в контакт с ферментом. Для того чтобы вытеснить конкурента, необходимо увеличить концентрацию субстрата.

Ферменты могут ассоциировать в мультиферментные системы и функционировать совместно в форме ферментных комплексов.

Такие мультиферментные системы обладают способностью автоматически поддерживать требуемую скорость суммарной реакции.

Вопросы и задачи к разделу 1.3.1

1. Определите, какие количества (в граммах) первичного кислого фосфата натрия ($NaH_2PO_4 \times H_2O$; мол. масса - 138) и вторичного кислого фосфата натрия (Na_2HPO_4; мол.

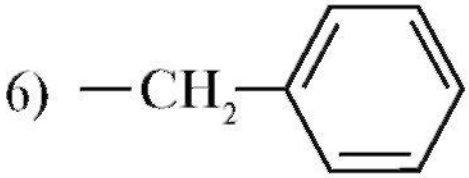
масса - 142) необходимы для приготовления 1 л стандартного буфера с pH = 7,0, в котором суммарная концентрация фосфатов равна 0,100М (величина pK первичного кислого фосфата при 25 °С равна 6,86).

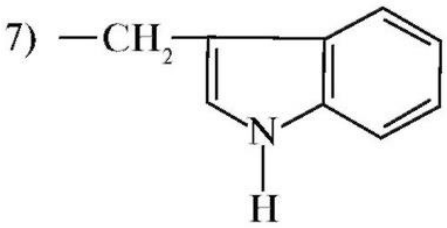
2. При определении кислотности желудочного сока было оттитровано до нейтральной реакции 10 мл желудочного сока раствором NaOH с концентрацией 0,1 н. На титрование потребовалось 7,2 мл раствора NaOH. Какова величина pH желудочного сока?

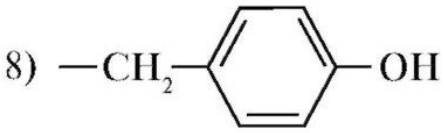
3. Исходя из выражения для константы равновесия, подтвердите правильность тезиса, что pK - это такой pH, при котором кислота ионизирована на 50%, т.е. представляет собой смесь недиссоциированных молекул кислоты и сопряженного с ней основания в соотношении 50:50.

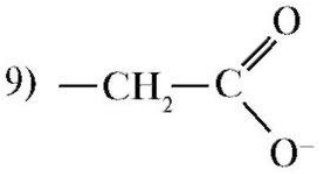
4. Ниже приведены структурные формулы боковых цепей (R-групп) 16 аминокислот *(Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr* и *Val).* Назовите аминокислоты, которым принадлежат изображенные здесь *Я*-группы.

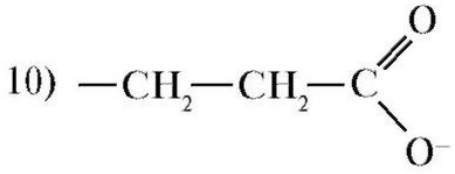
1) $-H$
2) $-CH_3$
3) $-CH(CH_3)-CH_3$
4) $-CH_2OH$
5) $-CH_2-CH_2-CH_2-$











11) $-CH_2-CH_2-S-CH_3$
12) $-CH_2-SH$

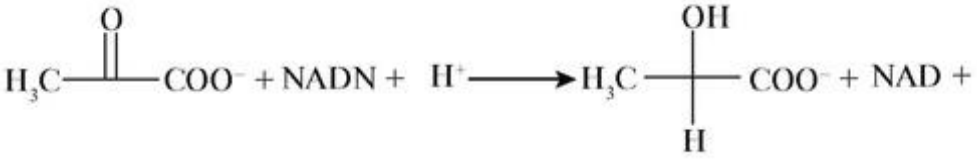
5. Рассчитайте минимальную молекулярную массу сывороточного альбумина быка, если по данным количественного аминокислотного анализа в нем содержится 0,58% (по массе) триптофана, молярная масса которого равна 204.

6. Рассчитайте *среднюю* молярную концентрацию ферментов в гипотетической клетке исходя из следующих условий: в бактериальной клетке (которая представляет собой цилиндр диаметром 1 мкм и высотой 2 мкм) цитозоль (удельная масса - 1,2) содержит 20% (по массе) растворимого белка. Весь этот белок полностью состоит из различных ферментов. Клетка содержит 1000 разных ферментов, растворенных в цитозоле;

молекулярная масса каждого фермента составляет 100 000; все ферменты присутствуют в одинаковой концентрации.

7. Фермент уреаза повышает скорость гидролиза мочевины при pH = 8,0 и температуре 20 °C в 10^{14} раз. Если данное количество уреазы может полностью гидролизовать данное количество мочевины за 5 мин при pH = 8,0 и температуре 20 °C, сколько времени потребовалось бы для полного гидролиза мочевины в тех же условиях без уреазы?

8. Лактатдегидрогеназа катализирует реакцию:



В отличие от NAD^+, раствор NADH поглощает свет при 340 нм. Объясните, как эти свойства NADH можно использовать для количественного определения лактатдегидрогеназы.

1.3.2. Углеводы

В организме человека содержится 0,4% (300 г) углеводов (см. рис. 1.1). Это балансовая величина. Углеводы постоянно расходуются на энергообеспечение организма и, соответственно, пополняются из различных источников.

Свое название углеводы получили на основе эмпирического состава - химические формулы большинства веществ этого класса можно представить в виде соединения углерода с водой - $C_x(H_2O)_y$ (уголь + вода).

Наиболее распространенные в природе сахара - моносахариды рибоза, глюкоза, фруктоза и манноза - относятся к D-ряду. Простые сахара, содержащие пять атомов углерода или более, могут существовать в виде фураноз (пятичленных колец) или пираноз (шестичленных колец).

Моносахариды (от греч. моно - «один»), или простые сахара, содержат только одну структурную единицу полигидроксиальдегида или полигидроксикетона. Среди природных моносахаридов наиболее распространены D-глюкоза и D-фруктоза ($C_6H_{12}O_6$), содержащие шесть атомов углерода.

Олигосахариды (от греч. олиго - «немного, несколько») состоят из коротких цепей, образованных несколькими моносахаридными единицами, соединенными ковалентными связями.

Полисахариды представляют собой длинные цепи, образованные сотнями или тысячами моносахаридных единиц. Некоторые полисахариды, например *целлюлоза,* имеют линейные цепи, тогда как другие, например *гликоген* и *крахмал,* - разветвленные.

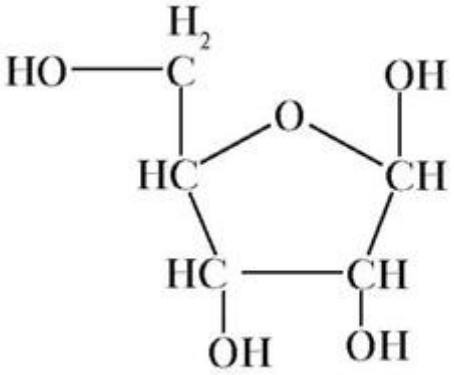
Наиболее распространенные в растительном мире углеводы - *крахмал* и *целлюлоза* - образованы из повторяющихся остатков D-глюкозы. Различие между ними состоит лишь в способах связи остатков D-глюкозы между собой.

Моносахариды

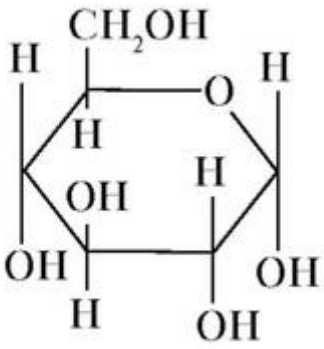
По числу углеродных атомов моносахариды делят на триозы (C_3), тетрозы (C_4), пентозы (C_5), гексозы (C_6), гептозы (C_7), октозы (C_8), нонозы (C_9).

Наиболее важными являются пентозы - рибоза и гексозы - глюкоза, фруктоза.

В твердом состоянии моносахариды находятся в виде циклических молекул - пятичленных (фуранозы) и шестичленных (пиранозы).



D-фруктоза



D-глюкоза

В растворе моносахаридов, кроме их циклических форм, присутствуют наиболее реакционно-способные ациклические формы. Важную роль в метаболизме играют моносахариды (табл. 1.15).

Таблица 1.15. Физиологически важные моносахариды

Моносахариды	Местонахождение	Биологическое значение
D-рибоза	Нуклеиновые кислоты	Структурный элемент нуклеиновых кислот и коферментов (АТФ, НАД, НАДФ)
D-рибулоза	Образуется в ходе метаболизма	Промежуточное соединение пентозофосфорного пути
D-аробиноза	Гуммиарабик, мякоть сливы и вишни	Компонент гликопротеинов
D-ксилоза	Древесная смола, протеогликаны, гликозаминогликаны	Компонент гликопротеинов
D-ликсоза	Сердечная мышца	Компонент миксофлавина, выделяемого сердечной мышцей человека
D-ксилулоза	Продукт метаболизма ураиновой кислоты	Обнаруживается в моче при пентозурии
D-глюкоза	Фруктовые соки, гидролизат крахмала, сахарозы, мальтозы, лактозы	Переносится кровью в ткани. Появляется в моче у больных диабетом из-за повышенного содержания в крови

Окончание табл. 1.15

Моносахариды	Местонахождение	Биологическое значение
D-фруктоза	Фруктовые соки, мед, гидролиз тростникового сахара, инсулина	Может превращаться в глюкозу в печени и кишечнике. Наследственная нетолерантность к фруктозе приводит к накоплению фруктозы и глипогликемии
D-галактоза	Гидролактозы	Превращается в глюкозу в печени, синтезируется в молочных железах, компонент лактозы молока, гликолипидов и гликопротеинов. Нарушение метаболизма галактозы приводит к галактоземии и образованию катаракты
D-манноза	Гидролиз растительных маннанов и камедей	Компонент многих гликопротеинов

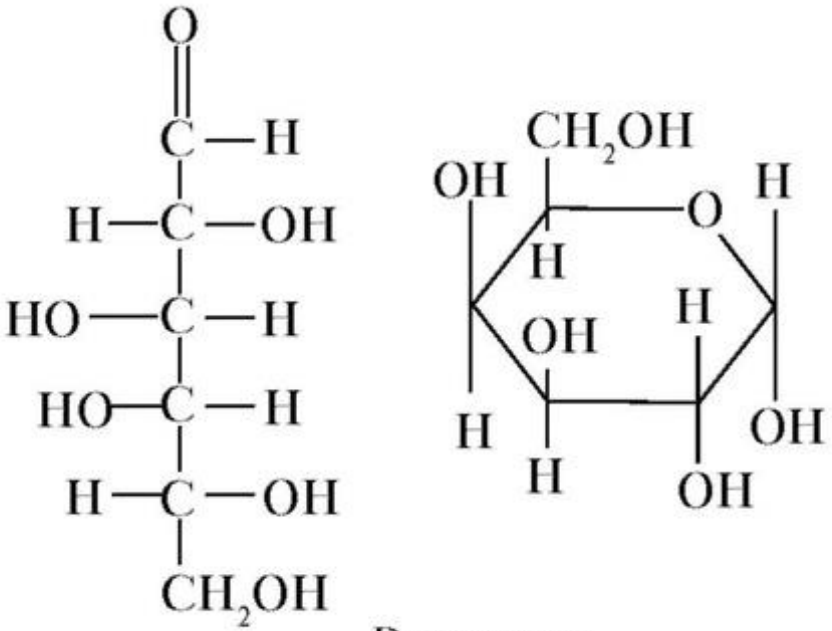
Глюкоза - наиболее легко утилизируемый источник энергии для человека. Она особенно необходима для нормального функционирования центральной нервной системы.

Глюкоза играет исключительно важную роль в выработке инсулина - основного анаболического и антикатаболического гормона организма человека.

Содержание глюкозы в крови человека считается в норме от 80 до 120 мг в 100 мл крови.

Глюкоза служит непосредственным предшественником гликогена (в основном мышечного) - запасного углевода организма.

Галактоза не встречается в свободном виде. Она входит вместе с глюкозой в состав лактозы (молочного сахара), а также является компонентом многих полисахаридов и гликопротеидов. Нарушение обмена галактозы, утрата организмом способности перерабатывать ее приводят к тяжелому наследственному заболеванию - галактоземии.

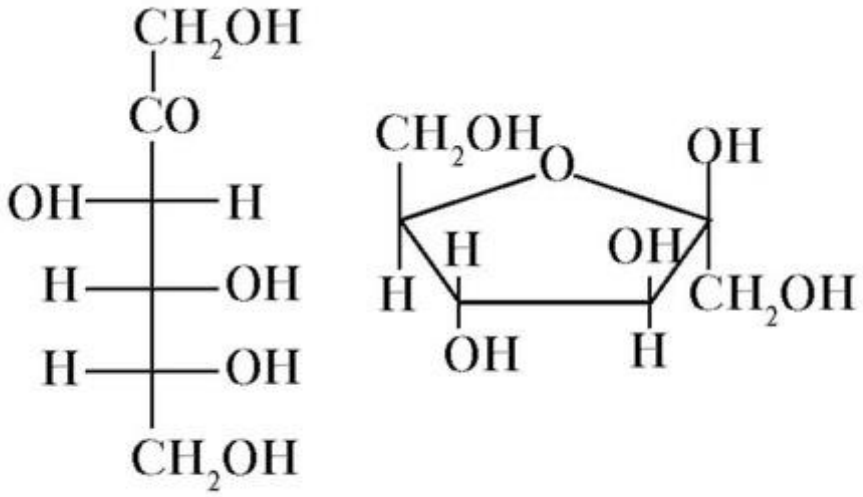


D-галактоза

Питаясь молоком матери, ребенок получает большое количество галактозы (составной части лактозы). Нарушение ее усвоения выражается в постепенной потере массы тела, отставании в физическом и умственном развитии, увеличении печени (в ряде случаев - ее циррозе) и появлении катаракты (помутнения хрусталика).

Фруктоза содержится в свободном виде в меде, фруктах, в которых содержание фруктозы составляет 39-40%, и образует вместе с глюкозой наиболее существенный для питания углевод - сахарозу (тростниковый сахар).

Как и глюкоза, фруктоза служит быстро утилизируемым источником энергии.



D-фруктоза

Фруктоза усиливает биологическую активность аминокислот, необходимых для синтеза белка мышц. Кроме того, фруктоза увеличивает всасываемость глюкозы и других питательных веществ.

Пентозы (5 углеродных атомов - C_5) - весьма важные для жизнедеятельности моносахариды. Это рибоза и дезоксирибоза, которые входят в состав рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислот.

Олигосахариды

Олигосахариды - соединения, молекулы которых построены из моносахаридов, соединяемых эфирными кислород-гликозидными связями, причем число остатков моносахаридов в молекулах олигосахаридов не превышает 10.

Образуются в реакции этерификации с отщеплением воды.

Олигосахариды делят по числу входящих в моносахаридов на ди-, три- и тетрасахариды.

Олигосахариды бывают линейными, циклическими, разветвленными, редуцирующими и нередуцирующими.

Дисахариды представлены в табл. 1.16.

Таблица 1.16. Физиологически важные дисахариды

Дисахарид	Источник	Клиническое значение
Мальтоза	Продукт распада крахмала (при переваривании амилазой или гидролизе), проростки злаков, солод	
Лактоза	Молоко, в период беременности может содержаться в моче	При понижении активности лактазы усвоение лактозы нарушается, что приводит к диарее и метеоризму
Сахароза	Тростниковый и свекловичный сахар, сорго, ананас, морковь	При понижении активности сахарозы ее усвоение нарушается и в связи с этим наблюдаются диарея и метеоризм

Мальтоза состоит из двух остатков глюкозы, образуется при частичном гидролитическом расщеплении крахмала и гликогена - основных резервных (запасных) углеводов растений и животных.

Мальтоза расщепляется в желудочно-кишечном тракте до двух остатков глюкозы. Некоторые люди страдают врожденной непереносимостью мальтозы и родственной ей изомальтозы из-за отсутствия в кишечном соке ферментов, расщепляющих эти дисахариды.

Лактоза менее сладкая, чем обычный сахар, состоит из остатка галактозы и остатка глюкозы. В большом количестве она содержится в молоке млекопитающих, в женском молоке - около 5,5-8,4%. Являясь основным углеводом женского молока, лактоза служит важным компонентом пищи грудного ребенка.

При врожденном отсутствии в кишечном соке лактазы - фермента расщепляющего лактозу в кишечнике, развивается заболевание, которое проявляется очень рано и сопровождается рвотой, диареей, вздутием живота, обезвоживанием, постепенным похудением. С мочой выводятся значительные количества лактозы, а также многие аминокислоты. Лечение состоит в исключении из питания лактозы и замене ее сахарозой, глюкозой и другими сахарами.

Сахароза гидролитически распадается на глюкозу и фруктозу и легко превращается в триглицериды (жиры), что способствует образованию значительных жировых отложений.

Существует заболевание, заключающееся в наследственной непереносимости сахарозы из-за отсутствия в кишечном соке фермента сахаразы. Оно проявляется у детей при переходе на смешанное вскармливание. Развиваются диарея, ребенок теряет в массе тела. Сахароза не усваивается организмом больного, а выводится через кишечник, в моче появляются значительные количества сахарозы. Лечение заключается в исключении из рациона сахара из тростника и свеклы или введении с пищей недостающих ферментов.

Полисахариды

Полисахариды представляют собой высокомолекулярные продукты поликонденсации моносахаридов, иногда содержащие десятки и сотни тысяч остатков моносахаридов, соединенных гликозидными связями.

Число встречаемых в природе полисахаридов чрезвычайно велико, но самые важные из них - целлюлоза, крахмал и гликоген .

Наиболее важный резервный полисахарид в клетках растений - *крахмал,* а в клетках животных - гликоген. И крахмал, и гликоген содержатся внутри клеток в виде крупных кластеров, или гранул. Молекулы крахмала и гликогена имеют много гидроксильных групп и поэтому сильно гидратированы. При экстрагировании крахмала и гликогена горячей водой из гранул образуются мутные коллоидные растворы, или взвеси.

Молекулы крахмала представляют собой разветвленные цепи из двух полимеров глюкозы: амилозы и амилопектина.

• *Амилоза* состоит из длинных, неразветвленных цепей остатков глюкозы. Молекулярная масса таких цепей колеблется от нескольких тысяч до 500 000.

• *Амилопектин* также имеет высокую молекулярную массу, но, в отличие от α-амилозы, его цепи сильно разветвлены.

Гликоген - основной резервный полисахарид в клетках животных. Его роль аналогична роли крахмала в клетках растений. Подобно амилопектину, гликоген - разветвленный полисахарид, состоящий из остатков D-глюкозы, связанных друг с другом.

В наибольшем количестве гликоген содержится в печени, где на его долю приходится до 7% общей массы органа. Гликоген имеется также в скелетных мышцах.

В клетках печени гликоген присутствует в виде крупных гранул, состоящих из меньших гранул. Последние образованы единичными, сильно разветвленными молекулами гликогена со средней молекулярной массой в несколько миллионов. С этими же гранулами прочно связаны ферменты, ответственные за синтез и распад гликогена.

В желудочно-кишечном тракте гликоген и крахмал расщепляются амилазами. Слюна и секрет поджелудочной железы содержат α-амилазы, гидролизующие эфирные связи в расположенных снаружи ветвях гликогена и амилопектина. При этом высвобождаются D-глюкоза, небольшое количество мальтозы и остается устойчивое по отношению к амилазам ядро, которое называют остаточным декстрином. Декстрины - клейкие вещества.

В точках ветвления *α-амилаза* неспособна атаковать связи и потому не гидролизует остаточный декстрин. Это делает специальный фермент - *α-глюкозидаза.*

В клетках животных гликоген расщепляется под действием другого фермента, а именно*гликогенфосфорилазы,* которая расщепляет гликоген с образованием не глюкозы, а глюкозо-1-фосфата.

Многие полисахариды служат внеклеточными опорными элементами в стенках клеток одноклеточных микроорганизмов и высших растений, а также на внешней поверхности клеток животных.

Другие полисахариды входят в состав соединительной ткани позвоночных и внешнего скелета (экзоскелета) членистоногих. Структурные полисахариды защищают клетки, ткани и органы, придают им форму и поддерживают ее.

Целлюлоза - самый распространенный внеклеточный структурный полисахарид в растительном мире и самый распространенный в природе биополимер. Древесина состоит в основном из целлюлозы и других полимерных веществ, хлопок - почти целиком из целлюлозы.

В целлюлозе из-за α-конфигурации связей ее полимерные цепи сильно вытянуты и соединяются друг с другом бок о бок, образуя длинные нерастворимые фибриллы - нити. В молекуле целлюлозы β-связи не гидролизуются α-амилазами.

Таким образом, между коровой и населяющими ее рубец микроорганизмами устанавливаются отношения симбиоза.

Большое значение для жизнедеятельности организмов имеют гибридные (смешанные) углеводсодержащие биополимеры, называемые также *гликоконъюгатами.*

Гликоконъюгаты

Соотношение компонентов в молекулах разных гликоконъюгатов может колебаться в широких пределах.

Среди гликоконъюгатов различают гликопротеиды (содержат пептидные и полиили олигосахаридные цепи), гликолипиды (построены из полиили олигосахаридных цепей и липидного компонента),гликолипопротеиды (содержат углеводные, липидные и белковые компоненты), тейхоевые кислоты (в молекулах к цепи полиспиртов присоединены аминокислоты и моносахариды), нуклеиновые кислоты (см. раздел 1.3.4).

Пептидогликан

Клеточная стенка бактерий образует вокруг клетки жесткую сетчатую оболочку. Она защищает клеточную мембрану и цитоплазму клетки. Внутренний слой клеточной стенки состоит из пептидогликана. Он образует каркас, который почти целиком окружает клетку. Пептидогликан представляет собой сеть из длинных, параллельно расположенных полисахаридных цепей, связанных между собой через определенные интервалы поперечными сшивками из коротких полипептидных цепочек.

Пептидогликан в химическом отношении представляет собой гетерополимер, содержащий мураминовую, мезодиаминопимелиновую и D-глутаминовую кислоты и D-аланин, не входящие в состав других организмов. Полисахаридные цепи состоят из чередующихся моносахаридных остатков N-ацетил-D-глюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты (сложного девятиатомного сахара), соединенных друг с другом эфирными связями.

К каждому остатку N-ацетилмурамовой кислоты присоединена боковая тетрапептидная цепочка.

У бактерий *Staphilococcus aureus* (золотистого стафилококка), вызывающих развитие фурункулов и нагноение ран, остатки ацетилмурамовой кислоты в соседних полисахаридных цепях связаны друг с другом пептидными цепочками, состоящими из пяти остатков глицина.

Пептидогликан, или муреин (от лат. *murus* - «стенка»), - скрепленная поперечными связями структура, окружающая клетку. Второе название подчеркивает гибридную природу структуры, представляющей собой сочетание пептидных и полисахаридных элементов. Муреин представляет собой трехмерный полимер, состоящий из полисахаридных цепей с присоединенным к ним тетрапептидом необычного состава.

У грамположительных бактерий пептидогликан образует вокруг клетки несколько концентрических слоев, пронизанных другими макромолекулами.

У грамотрицательных бактерий, например у *E. coli,* пептидогликановый каркас покрыт богатой липидами внешней оболочкой, содержащей гидрофобные белки.

Морфологической функцией пептидогликана является сохранение формы бактериальных клеток. Его крупные молекулы образуют ячейки с эффективным диаметром около 0,9 нм, способные пропускать молекулы, имеющие размер дисахарида. Углеводные цепи пептидогликана гидролизуются лизоцимом и N-ацетилглюкозаминидазой, в результате чего образуются нитевидные водорастворимые соединения.

Целостность клеточных стенок жизненно важна для защиты, роста и деления бактерии. Действиепенициллина - антибиотика, используемого для борьбы с бактериальными инфекциями, основано на том, что он подавляет последний этап ферментативного синтеза пептидогликанов. Это приводит к формированию неполноценных клеточных стенок и подавлению роста чувствительных к антибиотику микроорганизмов.

Тонкий слой пептидогликана бактериальной клетки покрыт снаружи многокомпонентным слоем, в состав которого входят липополисахариды, белки, фосфоглицерид. Периферическая часть липополисахаридов -*полисахариды* - определяет серологическую специфичность 0-антигена грамотрицательных бактерий. Эти специфичные полисахариды являются гетерополисахаридами, состоящими из гексозаминов, гептоз, гексоз, 6-дезоксигексоз, пентоз, 3,6-диоксигексоз.

В соответствии со специфичностью и агглютинирующими свойствами углеводов бактерии различаются между собой. Только у сальмонеллы серологически обнаружено 700 видов углеводов. Многие из них содержат тетра- и пентасахаридные повторяющиеся единицы.

Гликопротеины

Важные биологические функции выполняют гликопротеины, которые представляют собой гликоконъюгаты - углеводсодержащие гетероцепные биополимеры.

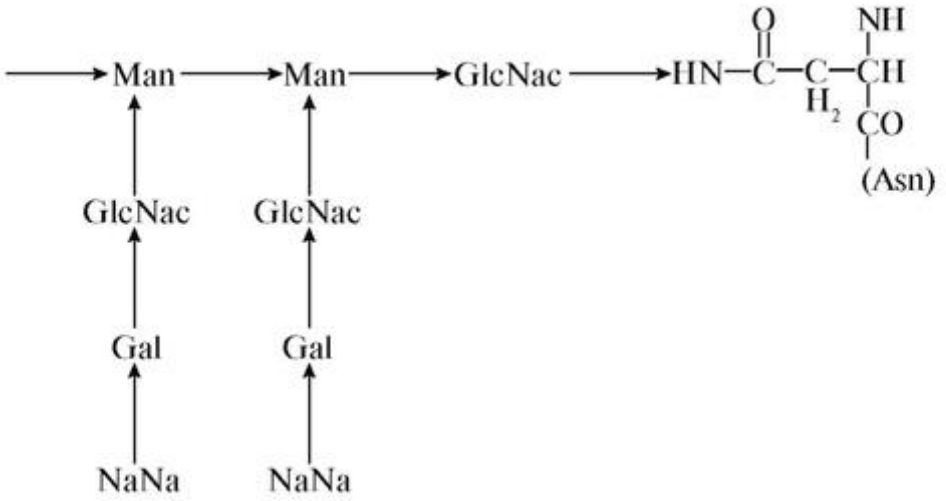
Гликопротеиды - белки, которые содержат ковалентно присоединенные углеводы - отдельные моносахариды или сравнительно короткие олигосахариды. Углеводная часть в молекуле гликопротеина составляет от 1 до 30% и более. Почти все белки на внешней поверхности животных клеток - гликопротеины. К гликопротеинам относится большая часть секретируемых клеткой белков, а также белков плазмы крови.

Гликопротеины мембран эукариотической клетки. Клетки животных окружены мягкой, гибкой структурой - клеточной мембраной.

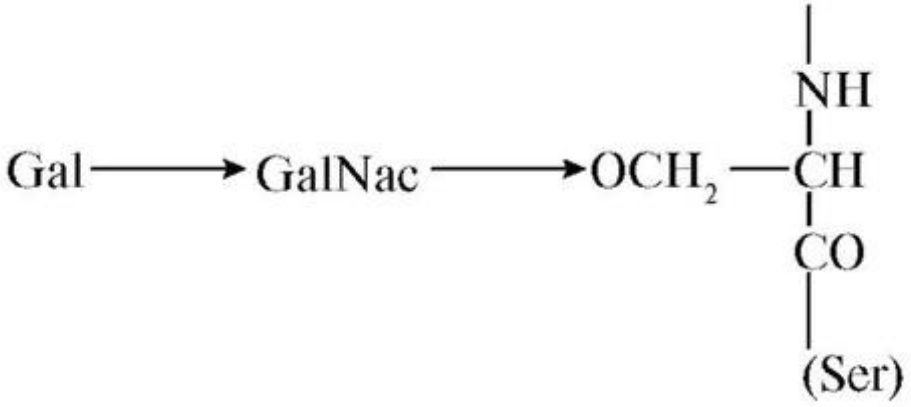
Мембрана состоит из полностью отличающихся по составу от подобных веществ в твердой клеточной стенке растений и микроорганизмов. В клеточной оболочке эукариотических клеток углеводы связаны с мембранными белками, причем их состав и структура характерны для каждого вида клеток.

Ниже приведена классификация сложных углеводсодержащих соединений, принятая в настоящее время.

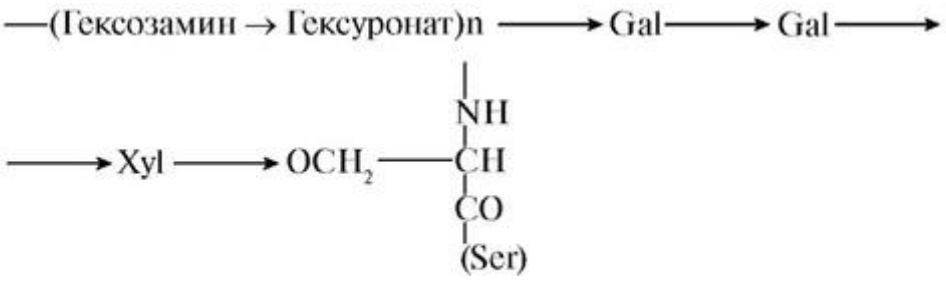
• N-гликозидная форма - олигосахаридные цепи присоединены к белку N-гликозидной связью: а) нейтральные олигосахаридные цепи, образованные только из маннозы и N-ацетил-D-глюкозамина; б) кислые олигосахаридные цепи, которые образованы из галактозы, фукозы, глюкозамина, сиаловых кислот (сиалогликопротеины):



• О-гликозидная форма - олигосахаридные цепи присоединены к белку через 0-гликозидную связь (например, олигосахарид простетической группы муцина слюны свиньи).



• Кислые мукополигликопротеины - олигосахаридные цепи в кислых мукополигликопротеинах (например, сульфогликопротеины), содержащие О-глюкозидную связь.



Хондроитинсульфат А, В, С

Соединения 1-й группы образованы за счет гликозидной связи между амидным азотом аспарагина в белках и ацетил-О-глюкозамином углеводной цепи.

В соединениях 2-й группы содержится гликозидная связь между гидроксильной группой треонина или серина белка и ацетил-О-галактозамином углеводной цепи.

В соединениях 3-й группы *р*-гликозидная связь находится между серином белка и ксилозой углеводной цепи, которая построена из повторяющихся дисахаридных единиц. Существуют белки, содержащие одновременно структуры 1-й и 2-й групп. Кроме того, известны S-гликозидные гликопротеины.

В мембране клеток разных тканей содержатся олигосахаридные цепи различных типов.

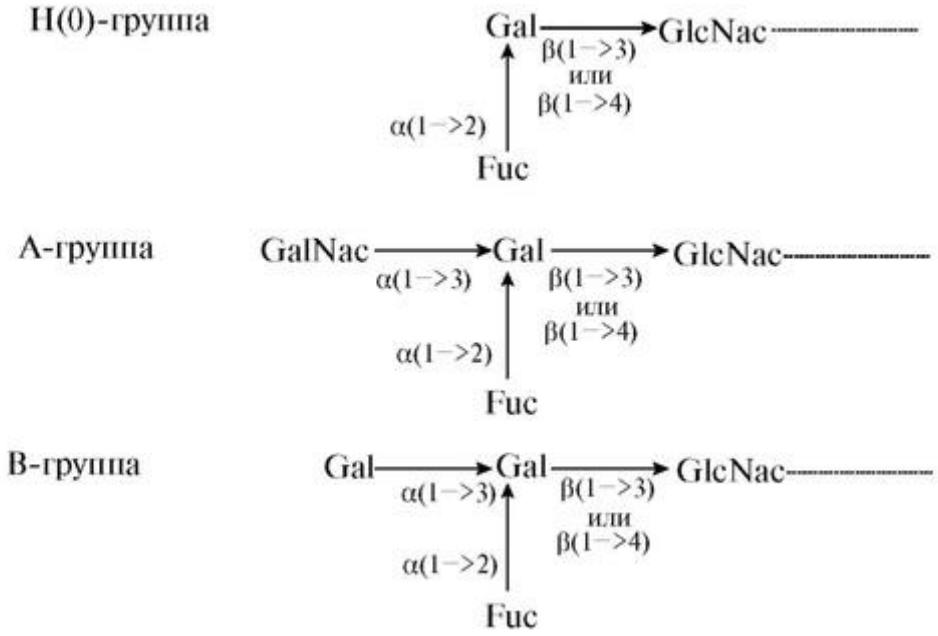
Клетки, выстилающие кишечник, окружены очень толстой, богатой углеводами оболочкой, получившей название гликокаликса, или пушистой оболочки *(fuzzy coat).* Олигосахариды таких клеточных оболочек относятся в основном к специфическим гликопротеидам клеточных мембран. Помимо гликопротеидов, в этих мембранах имеются и другие гибридные молекулы с углеводными группами, а именно гликолипиды.

В цитоплазматической мембране клеток печени содержится шесть видов гликопротеидов. Основными компонентами являются два гликопротеида с молекулярной массой (М.м.) 130 000 и 96 000.

Во внутриклеточных мембранах содержится мало гликопротеинов по сравнению с цитоплазматическими мембранами. При этом среди гликопротеидов внутриклеточных мембранных систем велико содержание соединений 1-й группы.

Выделенный из мембран эритроцитов белок гликофорин составляет 80% общего количества гликопротеидов цитоплазматической мембраны эритроцитов. Молекула гликофорина богата сиаловыми кислотами. Он имеет молярную массу 50 000 и состоит из 205 аминокислот. Гидрофобные остатки аминокислот погружены в мембрану, а углеводные цепи, связанные с N-концевым участком белка гликозидными связями, расположены на внешней поверхности клетки. Очищенный гликофорин обладает антигенной активностью к группам крови АВ0 и MN, а также является рецептором вируса гриппа и растительных агглютининов.

Химическая структура цепей полисахаридов, используемых для определения групп крови АВ0, имеет вид (Gal - галактоза, *GlcNac* - N-ацетилглюкозамин, *GalNac* - N-ацетил-галактозамин):



Помимо гликофорина, в эритроцитах человека найдены еще четыре вида белка, содержащих углеводы. Эти белки обозначили PAS-1, PAS-2, PAS-3 и PAS-4 по их окрашиванию реагентом PAS (в его составе йодная кислота), который применяют для обнаружения углеводов. Предполагают, что PAS-3, участвующий в транспорте неэлектролитов, представляет собой димер, а гликофорин является субъединицей PAS-1.

К мембранным гликопротеинам относится также фибронектин (от лат. *fibra* - «волокно» и *necter* - «связывать, присоединять»). Фибронектин способствует связыванию клеток друг с другом.

Полисахариды соединительных тканей

К гетерополисахаридам, имеющим важное значение для формирования и нормального функционирования соединительной ткани, можно отнести гиалуроновую кислоту (полимерная цепь с чередующимися остатками D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина).

Еще одну группу структурных и защитных полисахаридов составляют гликозаминогликаны, или кислые мукополисахариды. Обычно они присоединяются к белкам, образуя протеогликаны, т.е. такие состоящие из полисахаридов и белков соединения, в которых на долю полисахарида приходится основная часть молекулы - обычно более 95%. В отличие от протеогликанов, в гликопротеидах, также состоящих из полисахаридов и белков, большую часть молекулы составляет белковая часть.

Гликозаминогликаны образуются из повторяющихся дисахаридных остатков, каждый из которых представляет собой производное аминогексозы - обычно D-глюкозамина или D-галактозамина. По меньшей мере один из сахаров в повторяющемся дисахаридном остатке гликозаминогликана содержит кислотную карбоксильную или сульфатную группу, несущую при pH = 7,0 отрицательный заряд.

Примером кислой гексозы может служить D-глюкуронат, образующийся из D-глюкозы путем ее окисления по шестому атому углерода. Карбоксильная группа в положении 6 диссоциирует при pH, близком к 7,0.

Гликозаминогликаны относятся к гетерополисахаридам, т.к. они состоят из чередующихся остатков моносахаридов двух разных типов (табл. 1.17).

Таблица 1.17. Моносахаридные компоненты полисахаридов соединительной ткани

Полисахарид	Компоненты
Гиалуроновая кислота	D-глюкуронат + N-ацетил-D-глюкозамин
Хондроитин	D-глюкуронат + N-ацетил-D-галактозамин
Дерматансульфат	D-идуронат +N-ацетил-D-галактозамин-4-сульфат

В названии «мукополисахариды» приставка «муко-» указывает на то, что эти полисахариды были получены впервые из *муцина* - смазывающего протеогликана, содержащегося в слизистых выделениях. Впоследствии термин «кислые мукополисахариды» стал использоваться применительно к кислым полисахаридам различных тканей позвоночных.

Протеогликаны присутствуют в гелеобразном основном веществе (межклеточном цементе), заполняющем в большинстве тканей пространство между клетками. Кроме того, они содержатся в хрящах, сухожилиях и коже, а также в синовиальной жидкости, выполняющей функцию смазки в суставах.

Мукополисахариды делят на нейтральные, которые состоят из N-ацетил-D-глюкозамина и маннозы, и кислые, содержащие большое количество уроновых кислот и сульфатов. В слизи всегда содержится много мукополисахаридов. Они образуются в результате многократного повторения структурных единиц из дисахаридов, полученных соединением гексозных аминосахаров с уроновыми кислотами.

Гиалуроновая кислота. Это гликозаминогликан межклеточного основного вещества тканей животных. Она обнаружена в подкожном слое и стекловидном теле. Состоит из повторяющихся единиц дисахарида, в котором D-глюкуроновая кислота образует с N-ацетил-D-глюкозамином гликозидные связи.

Гиалуроновая кислота образует очень вязкие, гелеобразные растворы. Она часто встречается в сочетании с другими гликозаминогликанами. В качестве препарата гиалуроновая кислота используется при лечении артритов - заболеваний суставов.

Гиалуронидаза. Секретируемый некоторыми патогенными бактериями фермент гиалуронидаза способен гидролизовать гликозидные связи гиалуроновой кислоты и тем самым облегчать проникновение бактерий в ткани. Этот фермент позвоночных в процессе оплодотворения гидролизует гликозаминогликаны внешней оболочки яйцеклетки, делая ее проницаемой для сперматозоида.

В протеогликанах хрящей молекулы гликозаминогликанов ковалентно связаны с белком. Типичный протеогликан хрящевой ткани содержит около 150 полисахаридных цепей с молекулярной массой 20 000 каждая. Они (в виде боковых цепей) ковалентно присоединены к сердцевинным полипептидам. Такие протеогликаны представляют собой сильно гидратированные структуры.

Мукополисахарид хондроитин - основной полисахарид протеогликанов хряща. По составу почти идентичен гиалуроновой кислоте, но вместо остатков N-ацетил-D-глюкозамина он содержит N-ацетил-D-галактозамин. В его состав входят сернокислые эфирные группы - хондроитинсульфаты А, В и С. В состав хондроитинсульфатов А и С

входит D-глюкуроновая кислота, а в хондроитинсульфат В (дерматан-сульфат) - L-идуроновая кислота.

Дерматансульфат кожи также содержит чередующиеся остатки двух разных сахаров (см. табл. 1.17).

Гепарин . Еще один важный гликозаминогликан. Он образуется в клетках, присутствующих в выстилающем слое стенок артерий.

В состав гепарина входят повторяющиеся единицы из остатков шести сахаров, каждая из которых представляет собой последовательность чередующихся остатков сульфопроизводных N-ацетил-D-глюкозамина и D-идуроната. Он содержит большое количество сульфатов.

Гепарин - мощный ингибитор свертывания крови. Он предотвращает образование тромбов в циркулирующей крови. Выделенный из легочной ткани гепарин используют в медицине для предотвращения свертывания донорской крови, а также для предупреждения свертывания крови в сосудах при различных патологических состояниях, например после приступов стенокардии и тяжелых травм.

Большинство углеводов содержат сиаловые кислоты, сульфаты, уроновые кислоты, благодаря чему клеточная поверхность в нейтральной среде имеет отрицательный электрический заряд. При возникновении межклеточных связей, по-видимому, важную роль играют ионы Ca^{2+}, которые могут связывать две отрицательно заряженные группы на поверхности соседних клеток. Именно поэтому при разделении клеток их обрабатывают реагентом, связывающим Ca^{2+} - этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Однако только действием ионов Ca^{2+} невозможно объяснить, с чем связана тканевая специфичность клеток при образовании контактов.

В нормальных клетках печени поверхностный слой содержит гепарансульфат как основной компонент. При злокачественной опухоли в печени повышается содержание хондроинтинсульфата, а содержание гепарансульфата снижается. Сцепление клеток при этом уменьшается. Это, возможно, связано с различным распределением в нормальных и раковых клетках мукополисахаридов, которые являются центрами инициации слипания клеток под действием фактора конканавалина А.

Биологические функции углеводов

Общие биологические функции углеводов представлены в табл. 1.18.

Таблица 1.18. Биологические функции углеводов

Углеводы	Функции
Моносахариды	Восстановление и клеточное топливо
Полисахариды	
Лактоза и мальтоза	Восстанавливающие сахара
Сахароза	Основной промежуточный объект фотосинтеза. У многих растений сахара транспортируются из листьев к другим частям растения в форме сахарозы
Крахмал	Форма запасания топлива в клетках растений
Гликоген	Форма запасания топлива в клетках животных

Целлюлоза	Несущий скелет растений (стебли, ветви, стволы). Жвачные животные могут использовать целлюлозу как топливо, т.к. в их желудках вырабатывается целлюлаза
Гликозаминогликаны	Присоединяются к белкам, образуя протеогликаны
Гепарин	Мощный ингибитор свертывания крови
Протеогликаны	Содержатся в основном веществе хряща, сухожилий, кожи и синовиальной жидкости, выполняющей роль смазки в суставах
Гликопротеины	
Фибронектин	Содержится в мембранах клеток, связь клеток друг с другом
Антифризный белок	Понижает температуру замерзания водной среды организма и позволяет переносить рыбам низкую температуру полярных морей
Гликофорин	Фактор антигенной активности, рецептор вируса гриппа
Пептидогликан	Структурный компонент клеточных стенок бактерий

Вопросы и задачи к разделу 1.3.2

1. Какой углевод является наиболее легко утилизируемым источником энергии для человека?

2. Какой основной углевод женского молока служит важным компонентом пищи грудного ребенка?

3. При отсутствии какого фермента в кишечном соке развивается заболевание, которое проявляется очень рано и сопровождается рвотой, диареей, вздутием живота, обезвоживанием, постепенным похудением?

4. Какое заболевание заключается в наследственной непереносимости сахарозы? Какова биохимическая причина этого заболевания?

5. Какой основной резервный полисахарид содержится в клетках животных?

6. В соответствии с какими свойствами углеводов бактерии различаются между собой?

7. На чем основано действие пенициллина - антибиотика, используемого для борьбы с бактериальными инфекциями?

8. Какова химическая структура цепей полисахаридов, используемых для определения групп крови АВ0?

9. Какое вещество является ингибитором свертывания крови и предотвращает образование тромбов в крови при травмах?

10. Какой гликозаминогликан используется в качестве препарата при лечении артритов - заболеваний суставов?

11. Какой фермент позвоночных в процессе оплодотворения гидролизует гликозаминогликаны внешней оболочки яйцеклетки и делает ее проницаемой для сперматозоида?

12. Какой фермент патогенных бактерий способен гидролизовать гликозидные связи гиалуроновой кислоты и тем самым обеспечить проникновение бактерий в ткани?

1.3.3. Липиды (жиры) и мембраны

Структура и функции липидов. Липиды (от греч. *lipos* - «жир») - общее название для всех известных жиров и жироподобных веществ с различной структурой, обладающих типичным свойством - гидрофобностью (нерастворимостью в воде) и общими биологическими функциями.

Животные жиры - твердые, легкоплавкие вещества, легче воды (плотность - 0,91-0,94 г/см^3), плохо проводят тепло. Большинство растительных масел - жидкости, застывающие ниже 0 °С (подсолнечное - от -16 до -19 °С, оливковое - от -2 до -6 °С, и потому оно легко замерзает), но известны и твердые (кокосовое, пальмовое, пальмоядровое, масло какао). Кипят масла при атмосферном давлении лишь при высокой температуре (порядка 300 °С) и при этом разлагаются; их можно перегонять только в вакууме. Жиры и масла нерастворимы в воде, а в присутствии поверхностно-активных веществ могут давать с ней эмульсию. Они хорошо растворяются в эфире, бензоле, хлороформе и других неполярных и малополярных органических растворителях (CCl_4, $CHCl_3$, CCl_2=CHCl и др.). Именно такими растворителями выводят жировые пятна в химчистке.

Большая часть жиров в организме находится в жировой ткани, меньшая - входит в состав клеточных структур. В жировой ткани жир, находящийся в клетке в виде включений (липосом), легко выявляется при микроскопическом и микрохимическом исследованиях. Жировые капельки в клетках - это запасной жир, используемый для энергетических потребностей. Больше всего запасного жира содержится в жировой ткани, которой особенно много в подкожной основе (клетчатке), вокруг некоторых внутренних органов, например почек (в околопочечной клетчатке), а также в некоторых органах, например в печени и мышцах.

Липиды образуют множество семейств, но во всех имеются углеводородные цепи, которые и определяют общие отличительные свойства этих веществ.

В организме человека содержится 10-20% липидов от массы тела, и все они могут быть разделены на два вида: конструктивные и резервные.

Конструктивные (протоплазматические) входят в состав всех структур клеток органов и тканей (клеточные мембраны) и практически остаются на одном уровне в течение всей жизни. Они составляют примерно 25% общего количества липидов организма.

По биологическим функциям липиды подразделяются на три основные группы.

• Структурные и рецепторные компоненты мембран и клеточных поверхностей, выполняющие пластическую функцию. Основные компоненты - жирные кислоты.

• Выполняющие энергетическую функцию: депо энергии обеспечивают 25-30% всей энергии организма, при их полном распаде выделяется примерно в 2 раза больше энергии, чем при распаде углеводов и белков. Основные компоненты - жирные кислоты.

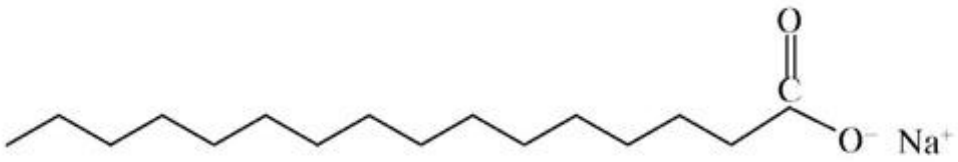
• Передатчики биологических сигналов. В эту группу входят стероидные гормоны и витамины.

Таблица 1.19. Наиболее распространенные жирные кислоты

Количество атомов углерода	Структура	Название
Насыщенные кислоты		
12	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	Лауриновая
14	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	Миристиновая
16	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	Пальмитиновая
18	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	Стеариновая
Ненасыщенные кислоты		
16	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$	Пальмито-олеиновая
18	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	Олеиновая
18	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$	Линолевая
18	$CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH_3(CH_2)_7COOH$	Линоленовая
20	$CH_3(CH_2)_3(CH_2CH=CH)_4(CH_2)_3COOH$	Арахидоновая

Жирные кислоты - длинные углеводородные цепи, несущие на одном из концов карбоксильную (-COOH) группу (табл. 1.19). Углеводородные цепи могут быть насыщенными и частично ненасыщенными.

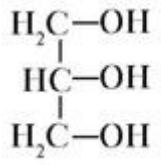
Соли жирных кислот - поверхностно-активные вещества, обладающие моющим действием. Их называют мылами по бытовому применению. Например, лаурат натрия - $CH_3(CH_2)_{10}COONa$:

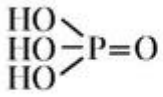


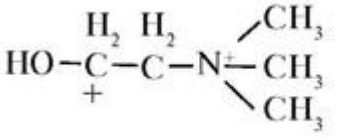
В пищу человека жирные кислоты входят в основном в виде нейтральных жиров - это производные трехатомного спирта - глицерина, который этерифицирован жирными кислотами по всем трем гидроксильным группам. Такие сложные эфиры называют триацилглицеридами (илитриацилглицеролами). Триацилглицериды составляют основную массу липидов в организме. Жирные кислоты запасаются (депо липидов) в организме, как правило, в форме триацилглициридов, так как свободные жирные кислоты при высоких концентрациях токсичны.

Большинство жирных кислот может быть получено с пищей, но они не являются незаменимыми: клетки могут сами их синтезировать. Но есть два исключения.

Основные незаменимые жирные кислоты - линолевая и линоленовая. При их отсутствии в пище у человека может развиться заболевание, характеризующееся шелушением кожи, выпадением волос и замедлением роста являются специфическими функциональными группами (строительными блоками). В качестве функциональных групп липидов выступают жирные кислоты, глицерин, фосфорная кислота, холин и др.







Если нейтральные жиры кипятить в водном растворе щелочи, то сложноэфирные связи гидролизуются и образуются глицерин и мыла (реакции, обратные этерификации). Данный процесс получил называние «омыление».

Нейтральные жиры не имеют полярной «головки», поэтому не выполняют структурных функций в организме, а являются только энергетическими депо.

Фосфолипиды и сфинголипиды - структурные компоненты мембран. Помимо жирных кислот, к глицерину могут присоединяться и другие группы, такие как аминогруппы кислоты и углеводы. Благодаря этому образуется множество различных липидов с разнообразными свойствами.

Производные глицерин-3-фосфата, называемые глицерофосфолипидами (или фосфоглицеридами),являются наиболее распространенными мембранными липидами.

Простейшим представителем фосфороглицеридов является фосфатидная кислота.

В мембранах часто встречаются производные фосфатидной кислоты, в которой к фосфорильному остатку присоединены различные полярные радикалы.

В качестве полярных радикалов выступают остатки холина и фосфорной кислоты (табл. 1.20).

Холин обычно относят к витаминам группы В, хотя животные и микроорганизмы способны его синтезировать. Холин - одно их важнейших веществ, основная задача которых состоит в переработке, разжижении и транспортировке молекул жира в печени и других частях организма. Холин помогает контролировать накопление холестерина, способствует передаче нервных импульсов, которые используются мозгом для формирования памяти.

Таблица 1.20. Распространенные полярные головные группы в фосфолипидах

Фосфорилхолин	$-P(O_2)OCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$	Лецитин (фосфатидилхолин)
Фосфорилэтаноламин	$-P(O_2)OCH_2CH_2NH_3^+$	Кефалин (фосфатидилэтаноламин)
Фосфорилсерин	$-P(O_2)OCH_2CH(NH_3^+)(COO-)$	Фосфатидилсерин

Во внутренних мембранах митохондрий и в мембранах бактериальных клеток встречается дилипид, образованный из двух соединенных глицерином остатков фосфатидной кислоты - кардиолипин (или дифосфатидилглицерин).

Благодаря своим бифильным свойствам фосфолипиды не только являются основой всех клеточных мембран, но и выполняют и другие функции. Они образуют поверхностный гидрофильный слой глобул липопротеинов крови, выстилают поверхность альвеол, предотвращая слипание стенок во время выдоха. Некоторые фосфолипиды участвуют в передаче сигнала в клетки.

Сфинголипиды. Кроме фосфоглицеридов, во многих типах мембран имеются липиды, образованные присоединением жирной кислоты и полярного радикала к сфингозину. Особенно богаты ими нервные ткани, в частности мозг.

Установлено, что при патологических состояниях организма, в частности при злокачественных образованиях, изменяются метаболизм и состав сфинголипидов, особенно гликосфинголипидов, что приводит к нарушению структуры мембран и биологических функций клеток.

Сфинголипиды - обязательные компоненты всех эукариотов. Они представляют собой один из наиболее разнообразных по химическому строению и биологической активности классов липидных молекул. Название (от греч. *sphinx* - «сфинкс») они получили за свои загадочные свойства.

Класс «сфинголипиды» объединяет сотни соединений липидной природы, различающихся химической структурой и биологическими функциями, но имеющих общую основу - сфингоидное (сфингозиновое) основание, представляющее собой аминоспирт с длинной алифатической цепью. Сфинголипиды делят на две основные группы:

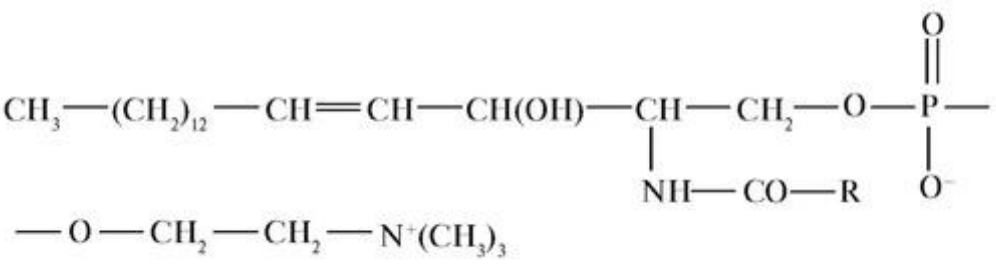
• сфингофосфолипиды, содержащие остатки фосфорной кислоты и холина (сфингомиелины) или фосфорной кислоты и инозитил-гликозида (фитосфинголипиды);

• сфингогликолипиды, содержащие моносахариды (обычно галактозу) или олигосахариды (цереброзиды) и остатки сиаловых кислот (ганглиозиды).

Сфингомиелины (от греч. *sphingo* - «сжимаю, сдавливаю, связываю» и *myelos* - «мозг») являются наиболее распространенными сфинголипидами. Они в основном находятся в мембранах животных и растительных клеток. Особенно богата ими нервная ткань; сфингомиелины обнаружены также в тканях почек, печени, легких, селезенки, эритроцитах. Особенно много сфингомиелинов в сером и белом веществе мозга, а также в оболочке аксонов периферической нервной системы.

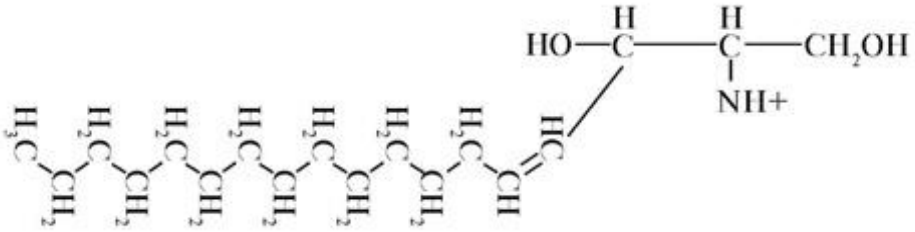
Сфингомиелин может накапливаться в клетках нервной системы и других органах в количествах, в десятки раз превышающих норму. Это приводит к психическим расстройствам (болезни Ниманна-Пика) и неврологии.

Общая структура сфингомиелинов выглядит так:



Конформация молекулы сфингомиелина в определенном отношении сходна с конформацией глицерофосфолипидов.

Сфингозин - аминоспирт с длинной углеводородной цепью.



Гликолипиды (гликосфинголипиды) - сложные липиды, содержащие в составе молекулы углеводные группы (чаще остаток D-галактозы).

Гликолипиды играют существенную роль в функционировании биологических мембран. Они содержатся преимущественно в ткани мозга, но имеются также в кровяных клетках и других тканях. Известны четыре основные группы гликолипидов: цереброзиды, сульфатиды, глобозиды и ганглиозиды.

Цереброзиды (от лат. *cerebrum* - «мозг») - природные органические соединения из группы сложных липидов. Впервые были обнаружены в составе мозга (отсюда их название). Не содержат ни фосфорной кислоты, ни холина. В их состав входит гексоза (обычно это D-галактоза), которая связана эфирной связью с гидроксильной группой аминоспирта сфингозина. Кроме того, в состав цереброзида входит жирная кислота. Среди жирных кислот чаще встречаются лигноцериновая, нервоновая и цереброновая кислоты, т.е. жирные кислоты, имеющие 24 углеродных атома.

Наиболее изученными представителями цереброзидов являются нервон, содержащий нервоновую кислоту, цереброн, в состав которого входит цереброновая кислота, и керазин, содержащий гликноцириновую кислоту.

Цереброзиды содержатся главным образом в нервной ткани, особенно в миелиновой оболочке нервных волокон, встречаются в селезенке, легких и других органах.

При нарушениях обмена цереброзидов возникает болезнь Гоше (французский врач Э. Гоше описал болезнь в 1882 г.), которая сопровождается накоплением цереброзидов в клетках ретикулоэндотелиальной системы мозга. У больных, страдающих болезнью Гоше, 6-8% сухой массы печени и селезенки составляют цереброзиды, содержащие в качестве остатка сахара глюкозу вместо галактозы.

При взаимодействии олеиновой кислоты с сфингозином образуется церамид. Церамид - первичный сфинголипид, из которого образуются три класса неглицероловых липидов (цереброзиды, фосфосфинголипиды, ганглиозиды).

Цереброзиды - это церамиды, к которым присоединен моносахарид, например галактоза. При этом образуется гликозидная связь между атомом C^{1-} кислорода сахара и атомом углерода - CH_2OH-группы сфингозина. Цереброзиды являются членами большой группы, названной гликолипидами. Цереброзиды обнаруживают в высоких концентрациях в мозге и нервной ткани.

Глобозиды отличаются от цереброзидов тем, что имеют в своем составе несколько углеводных остатков, связанных церамидом: церамид - глюкоза - галактоза - галактоза - N-ацетилгалактоза.

Цереброзиды и глобозиды относят к нейтральным сфинголипидам, так как они не содержат заряженных групп.

Фосфосфинголипиды - это церамиды, у которых оставшаяся спиртовая гидроксильная группа этерифицирована фосфатной производной, например фосфорилхолином. Наиболее типичным среди них является сфингомиелин, который входит в состав большинства мембран.

Ганглиозиды - наиболее сложные по составу липиды. Они содержат несколько углеводных остатков, среди которых присутствует N-ацетилнейраминовая кислота.

В тканях человека аминогруппа всегда ацетилирована (радикал ацетил CH_3CO-), при этом сахар превращается в N-ацетилнейраминовую (сиаловую) кислоту.

Сиаловая кислота представляет особый интерес тем, что участвует в инфицировании клеток вирусом гриппа.

Нейраминовая кислота представляет собой углевод, состоящий из 9 атомов углерода и входящий в группу сиаловых кислот. При гидролизе ганглиозидов можно обнаружить высшую жирную кислоту, спирт сфингозин, D-глюкозу и D-галактозу, а также производные аминосахаров: N-ацетилглюкозамин и N-ацетилнейраминовую кислоту. Эта кислота синтезируется в организме из глюкозамина.

В структурном отношении ганглиозиды в значительной мере сходны с цереброзидами, с той только разницей, что вместо одного остатка галактозы они содержат сложный олигосахарид.

Одним из простейших ганглиозидов является гематозид, выделенный из эритроцитов.

Ганглиозиды содержатся в основном в ганглиозных клетках нервной ткани, откуда они и получили свое название.

Однако ганглиозиды находятся и в плазматических мембранах многих клеток - эритроцитов, гепатоцитов, клеток селезенки и других органов. Главная роль ганглиозидов определяется их участием в осуществлении межклеточных контактов. Некоторые ганглиозиды служат своеобразными детекторами бактериальных токсинов - антигенов.

Веточки олигосахаридов образуют пушистый покров клеток, защищая их от антигенов. Ганглиозиды определяют группы крови (0, A, B) у человека (см. выше).

Ганглиозиды - это церамиды, у которых спиртовая группа связана с коротким, как правило, разветвленным олигосахаридом. Углеводные части ганглиозидов обладают антигенными свойствами и различаются концевыми остатками в олигосахаридных цепях.

Как правило, линейная часть сахаридной цепи содержит связанные последовательно N-ацетилгалактозамин *(GalNac),* галактозу *(Gal)* и глюкозу (*Glc*).

Обобщая, можно сказать, что к фосфолипидам относят все фосфорсодержащие липиды. При этом, если в основе структур - глицерин, их называют фосфороглицеридами, если производные сфингозина - сфингомиелинами .

Стероидные липиды. Липиды, не содержащие жирных кислот, относят к простым липидам. Иногда их называют неомыляемыми липидами, так как при щелочном гидролизе они не образуют мыла. К этой группе относятся жирорастворимые витамины, стероидные гормоны и некоторые другие жирорастворимые вещества. В основе всех простых липидов лежат стероиды и терпены.

Стероиды являются производными насыщенного полициклического углеводорода.

Наиболее распространенный стероид у животных - холестерин.

Холестерин (от лат. *chole* - «желчь», *sterol* - «жирный») входит в состав тканей и клеток живого организма как обязательный структурный элемент клеточных мембран и липопротеидных комплексов. Помимо этого, он играет роль предшественника стероидных гормонов и желчных кислот. Холестерин присутствует в крови и тканях в свободной (неэстерифицированной) и эстерифицированной формах.

Кристаллический холестерин представляет собой белое, оптически активное вещество, плавящееся при температуре 150 °С. Он нерастворим в воде, но легко, как и другие липиды, экстрагируется из клеток хлороформом, эфиром, бензолом или горячим спиртом.

Холестерин - предшественник всех стероидных гормонов (например, мужского - тестостерона или женского - эстрогена). Он является также основным компонентом желчных кислот.

Нарушение обмена холестерина приводит к развитию атеросклероза. Нормальный уровень холестерина в плазме крови колеблется в пределах 150-200 мг/100 мл. Возникновение ненормально высокого уровня (200-300 мг/100 мл) может привести к отложению холестериновых бляшек в аорте и мелких артериях; это состояние известно под названием атеросклероза (или артериосклероза). В конечном счете оно способствует нарушению сердечной деятельности.

Холестерин синтезируется в печени и плазме крови, упаковывается в липопротеиновые комплексы, которые переносятся в другие клетки. Проникновение холестерина в клетку зависит от наличия мембранных рецепторов, связывающих такие комплексы.

После связывания с рецептором комплекс проникает в клетку путем эндоцитоза, и затем лизосомные ферменты высвобождают холестерин внутри клетки.

У пациентов с высоким уровнем холестерина в крови обнаружены дефектные мембранные рецепторы. Имеются данные, что это генетический дефект. Возможно, в будущем лечение подобного состояния будет предусматривать повышение эффективности дефектных рецепторов или увеличение транспорта холестерина через клеточную мембрану каким-то другим способом.

Терпены - простые стероиды, в основе структуры которых лежит пятиуглеродный углеводород - изопрен. Терпены - это, как правило, душистые масла растений.

Вопросы и задачи к разделу 1.3.3

1. Назовите гидрофобные и гидрофильные группы в каждом из указанных липидов: а) фосфатидилэтаноламин; б) сфингомиелин; в) галактоцереброзид; г) ганглиозид; д) холестерол.

2. Назовите продукты, образующиеся при мягком гидролизе раствором NaOH соединений: а) 1-стеароил-2,3-дипальмотоилглицерол; б) 1-пальмотоил-2-олеилфосфатидилхолин.

3. Напишите с помощью формул строения уравнение образования триглицерида пальмитиновой кислоты. Выделите эфирные связи. Рассчитайте массовые и молярные доли элементов в липиде.

1.3.4. Нуклеотиды. Нуклеиновые кислоты

Все живые организмы содержат в качестве обязательных компонентов нуклеиновые кислоты, которые хранят информацию об аминокислотной последовательности набора белковых молекул, присущих данному организму. Нуклеиновые кислоты - один из основных признаков жизни и индивидуальности биологической особи.

Впервые дезоксирибонуклеиновая кислота была выделена из клеточных ядер лейкоцитов и поэтому носит название «нуклеиновая» (от лат. *nucleus* - «ядро»). В 1868 г. швейцарский биолог Мишер обнаружил вещество, обладающее кислыми свойствами в экстракте из ядер клеток гноя (лейкоцитов), и назвал его нуклеином. Имеется два класса нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновые (ДНК) и рибонуклеиновые (РНК).

Содержание ДНК и РНК различно в разных органах и клеточных структурах.

В расчете на сухое вещество содержание нуклеиновых кислот в организме исчисляется несколькими процентами. Наибольший интерес представляет сопоставление содержания ДНК и РНК на одну клетку организма, а также оценка того, в каких субклеточных структурах локализованы ДНК и различные виды РНК.

Выяснено, что содержание ДНК в клетках одного и того же организма отличается высоким постоянством.

Например, клетки различных тканей крысы содержат следующие количества ДНК [пикограмм (10^{-12} г) на клетку]:

- печень - 9,1;
- почки - 6,5;
- поджелудочная железа - 7,1;
- сердце - 6,3;
- тонкая кишка - 7,4;
- зобная железа - 7,2;
- легкие - 6,5;

- селезенка - 6,3;
- костный мозг - 6,7.

В то же время в клетках организмов различных видов количество ДНК резко различно. Приведем несколько примеров [пикограмм (10^{-12} г) на клетку]:

- человек - 6,8;
- дрожжи - 0,05;
- крокодил - 5,0;
- кишечная палочка - 0,014;
- карп - 3,5;
- вирус оспы - $2,7x10^{-4;}$
- курица - 2,3;
- вирус фХ174 - $2,6x10^{-6}$.

Локализована ДНК в основном в ядре клетки. Однако несколько процентов общей клеточной ДНК сосредоточено в митохондриях, хлоропластах и базальных тельцах жгутиков. Недавно показано, что ДНК митохондрий и хлоропластов автономна и отличается от ядерной ДНК.

Содержание РНК в клетках не отличается ни однообразием, ни стабильностью. Замечено, что в клетках тех тканей, где идет интенсивный синтез белка, содержание РНК превышает в несколько раз уровень ДНК. Так, например, в печени крысы РНК в 4 раза больше, чем ДНК, в поджелудочной железе - в 2-4 раза. Но там, где синтез белка мал, содержание РНК ниже, чем ДНК. Например, в легких и кишечнике крысы РНК в 2 раза меньше, чем ДНК.

Что касается соотношения в клетке разных видов РНК, то 85% падает на долю рРНК, примерно 10% - на долю сРНК и всего 5% - на долю нРНК. В рибосомах сосредоточена рРНК, в гиалоплазме (бесструктурной части клеток) - сРНК, частично в ядре, а частично в цитоплазме - нРНК.

Важным ключом к разгадке структуры ДНК стало открытие, сделанное в конце 40-х гг. XX столетия. Было установлено, что молекулы ДНК различных видов организмов содержат только 4 вида азотистых оснований и что между основаниями существует количественная связь.

Нуклеиновые кислоты являются линейными гетерополимерами (см. главу 2), состоящими из мономерных единиц - нуклеотидов. С химической точки зрения нуклеиновые кислоты являются полинуклеотидами.

Нуклеотиды состоят из азотистого основания, сахара и фосфорной кислоты. Кислотные свойства ДНК и РНК обусловлены наличием в составе их молекул фосфорной кислоты. Углеводный компонент (сахар) молекулы ДНК - дезоксирибоза. Наличие в составе

молекулы дезоксирибозы и фосфорной кислоты определило название ДНК. В молекуле РНК углеводным компонентом является рибоза.

Таким образом, различие между структурой мономерных компонентов ДНК (дезоксирибонуклеотидов) и РНК (рибонуклеотидов) мало, и оба класса нуклеиновых кислот обладают многими общими свойствами. Однако эти различия очень значительны при проявлении функциональных особенностей этих полимерных молекул.

И ДНК, и РНК построены из четырех разных нуклеотидов. Нуклеиновые кислоты отличаются числом мономерных компонентов, количеством каждого из четырех нуклеотидов и их последовательностью.

ДНК входит в состав хромосом, отвечает за хранение, передачу, трансформацию и реализацию наследственной (генетической) информации.

В ДНК содержится информация, необходимая для синтеза всего набора белков, присущего данному организму. Аминокислотная последовательность белков записана в ДНК с помощью специального кода. Ген - участок ДНК, кодирующий информацию о конкретном признаке.

Количество информации, которая заложена в ДНК, определяется длиной нуклеотидной последовательности цепи ДНК.

ДНК вируса фХ174 содержит 5386 пар оснований. Нуклеотидная последовательность единственной хромосомы *E. coli* содержит уже 4 млн пар оснований, а нуклеотидная последовательность ДНК 46 хромосом человека почти в миллион раз превышает число пар оснований, содержащихся в ДНК вируса фХ174.

Однако ДНК не принимает непосредственного участия в управлении образованием новых полипептидных цепей. Эту роль выполняет РНК.

Биологической функцией РНК является считывание информации с ДНК для последующего биосинтеза белка. Такая РНК называется матричной. Транспортная РНК осуществляет транспорт аминокислот из цитоплазмы к рибосоме - месту биосинтеза белка. Рибосомальная РНК входит в состав рибосом и контролирует биосинтез белка.

Образование новых эфирных связей и присоединение нуклеотида к растущей полимерной цепи нуклеиновой кислоты сопровождаются увеличением энергии Гиббса системы. Соответственно, биосинтез биополимеров должен обеспечиваться энергией. Получение и потребление энергии базируется на ряде химических превращений и является одной из главных задач метаболизма.

Нуклеотиды - строительные блоки нуклеиновых кислот. Нуклеотиды состоят из трех компонентов: углевода, азотистого основания и фосфорной кислоты.

В молекуле ДНК углевод представляет собой дезоксирибозу ($C_5H_{10}O_4$), в состав молекулы РНК входит рибоза ($C_5H_{10}O_5$).

Азотистые основания, входящие в состав ДНК и РНК, делятся на два класса гомологов - производных пиримидина и пурина. Для обозначения оснований приняты сокращения: аденин - *Ade,* гуанин - *Gua,*тимин - *Thy,* цитозин - *Cyt* (или более кратко A, G, T, C соответственно).

К производным пиримидина относятся следующие азотистые основания, блоки ДНК и РНК: цитозин (Cyt), урацил (*Ura),* тимин *(Thy).*

Важное различие нуклеотидов РНК и ДНК в том, что у РНК присутствуют урацил и цитозин вместо тимина у ДНК.

К производным пурина относятся аденин *(Ade)* и гуанин *(Gua),*

Производные фосфорной кислоты (фосфаты), входящие в состав ДНК и РНК, - монофосфат, дифосфат и трифосфат.

Нуклеотиды - мономеры цепей ДНКи РНК, образуются в результате последовательных реакций этерификации рибозы азотистыми основаниями и фосфатами.

Мононуклеотиды представляют собой сильные кислоты. Именно мононуклеотидные остатки определяют кислые свойства нуклеиновых кислот. Значения рК' для двух способных к диссоциации ОН-групп остатка фосфорной кислоты соответствуют приблизительно 1,0 и 6,2. Именно поэтому при pH = 7,0 свободные нуклеотиды находятся главным образом в форме $R\text{-}O\text{-}PO_3^{2-}$, где R - остаток нуклеотида.

Реакции этерификации оснований и рибозы идут с образованием соответствующих нуклеозидов.

В реакции этерификации урацила и рибозы образуется нуклеозид уридин.

Аналогичным образом образуются нуклеозиды с участием дезоксирибозы и других азотистых оснований.

Например, при этерификации урацила и дезоксирибозы образуется нуклеозид дезоксиуридин.

Нуклеозиды, входящие в состав ДНК, образуются аналогичным образом. К ним относятся уридин, аденозин и гуанозин.

Третий компонент нуклеиновых кислот - фосфорная кислота, которая при этерификации нуклеозидами образует сложноэфирные связи с рибозой или дезоксирибозой. При этом образуются мономерные компоненты полимерных цепей ДНК и РНК - нуклеотиды.

В качестве примера можно привести образование мононуклеотида - уридилмонофосфата.

Аналогичным путем этерифицируется аденозин, образуя аденозинмонофосфат (АМФ, или AMP), - важный компонент энергообеспечения организма (см. ниже).

Дополнительное фосфорилирование АМФ приводит к образованию еще двух компонентов энергообеспечения организма - аденозиндифосфата (АДФ) и аденозилтрифосфата (АТФ).

После накопления достаточного количества нуклеотидов осуществляется полимеризация - соединение нуклеотидов в полимерную цепь, и в конечном счете образуется нуклеиновая кислота.

Кратко синтез нуклеиновых кислот можно записать следующим образом: нуклеотид i = Nu_i, где i = 1, 2, 3, 4.

Образование динуклеотида, например, для реакции (AMP) + (GMP) → AG + H_2O:

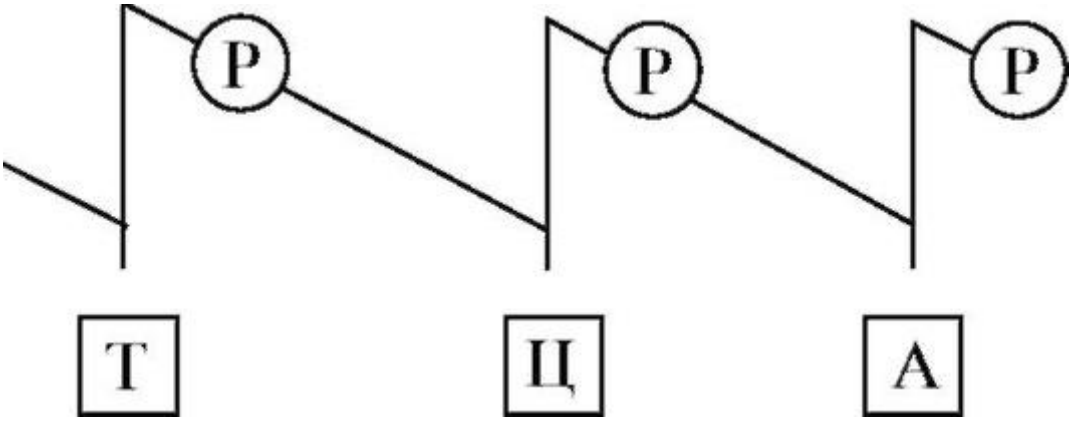
$Nu + Nu_2 \rightarrow Nu_2\text{-}Nu_2 + H_2O$.

Образование тринуклеотида:

$Nu_1 + Nu_2 + Nu_3 \rightarrow Nu_1\text{-}Nu_2\text{-}Nu_3 + H_2O$ и т.д.

Число нуклеотидов в цепи ДНК может достигать миллиона (10^6), и длина развернутой цепи составляет порядка 1 м.

Последовательность связанных между собой нуклеотидов называется первичной структурой нуклеиновой кислоты:



Размер ядра клетки, в котором находятся молекулы ДНК, около 1 мкм (10^{-6} м), то есть в миллион раз меньше длины развернутой цепи ДНК. Именно поэтому цепь ДНК, подобно швейной нитке в клубке или на катушке, свертывается, укладывается (упаковывается) определенным образом, принимая различные конформации.

Первая стадия укладки - соединение двух одинаковых цепей ДНК в двойную нить через водородные связи между парами нуклеотидов. Сокращенную запись последовательности нуклеотидов в цепи нуклеиновых кислот делают путем обозначения оснований буквами *A, T, G, C,* а фосфатных групп - символом р.Приведенные последовательности нуклеотидов можно записать буквенным кодом: в левой цепи -*pApGpCpG,* в правой - *pTpCpGpC (p* - фосфат).

На второй стадии двойная нить свертывается во вторичную структуру ДНК - двойную спираль (биспираль), аналогичную спиралям белков. Биспираль подвергается дальнейшей укладке. В результате получается компактная ядерная структура - хромосома.

Способность двойной спирали принимать различные конформации называется полиморфизмом ДНК.

Третичная и четвертичные структуры - способы упаковки ДНК в клетках.

Третичная структура - конденсация двухцепочечной ДНК, в результате которой линейные размеры молекул ДНК уменьшаются в 10 000 раз.

Существуют два способа конденсации - сфероидальная намотка (имеет место только в вирусах) и образование сверхспирали ДНК.

Сверхспирализация - закручивание в спираль оси двойной спирали (образование сверхвитков).

Следующий уровень упаковки ДНК в клетках - ассоциация сверхспиральной ДНК с различными специфическими белками - гистонами.

Гистоны - белки, обладающие основными свойствами. Гистоны состоят главным образом из аргинина и лизина. Аминокислотная последовательность гистонов обладает высоким постоянством структуры и практически не отличается у организмов различных видов. Гистоновые белки, входящие в структуру ДНК, характеризуются щелочной реакцией.

Таким образом, в неактивном состоянии клетки для ДНК характерны четыре уровня спирализации: двойная спираль нуклеотидной последовательности, скручивание двойной спирали, наматывание двойной спирали на гистоновые белки (как нить на катушку), скручивание белково-нуклеотидной структуры.

В клеточном цикле развития и деления идут обратные процессы, приводящие к развертыванию спирали с тем, чтобы ДНК была доступной для считывания записанной на ней генетической информации.

Двойная спираль ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, которые образуют правую спираль относительно одной оси, отсюда и название - двойная спираль.

Направление цепей взаимно противоположное.

Сахарофосфатный остов расположен по периферии двойной спирали. Азотистые основания находятся внутри, и их плоскости перпендикулярны оси спирали. Между основаниями образуются специфические водородные связи, в результате чего осуществляется так называемое уотсонкриковское спаривание.

Согласно Уотсону и Крику, аденин (А) образует водородные связи с тимином Т (АТ-пара), а гуанин (G) с цитозином (С) (GC-пара). Более объемные пурины всегда спариваются с пиримидинами - молекулами меньшего размера. Это приводит к тому, что расстояния между углеродными атомами C_1 дезоксирибозы в спаренных цепях оказываются одинаковыми для АТ- и GC-пар и составляют 1,085 нм.

При наблюдении в микроскоп за ядром делящихся эукариотических клеток обнаруживается, что молекулы их ДНК, несущие генетический материал, распределены по хромосомам, число которых зависит от вида организма. В клетке человека в норме находится 46 хромосом (23 пары).

Химические и физические свойства ДНК вытекают из ее структуры.

Молекулярную структуру ДНК установили физики методом рентгеноструктурного анализа, биохимики определили химический состав ДНК и сформулировали принцип спаривания комплементарных оснований.

В результате исследований структуры были сформулированы следующие выводы.

• Препараты ДНК, выделенные из разных тканей одного и того же организма, имеют одинаковый нуклеотидный состав.

• Нуклеотидный состав ДНК разных видов различен.

• Нуклеотидный состав ДНК у данного биологического вида не меняется с возрастом организма, не зависит от его питания и изменений окружающей среды.

• Число адениновых остатков в любой ДНК независимо от вида организма равно числу тиминовых остатков, а число гуаниновых остатков равно числу цитозиновых. Таким образом, число пуриновых остатков равно числу пиримидиновых остатков.

• Водные растворы ДНК при pH = 7,0 и комнатной температуре (20-25 °С) обладают высокой вязкостью. Если раствор нагреть до 80 °С или сильно изменить pH, то вязкость раствора резко снижается. Этот факт указывает на изменение конформации ДНК.

Высокие температуры и значения pH вызывают денатурацию ДНК, подобную денатурации белков.

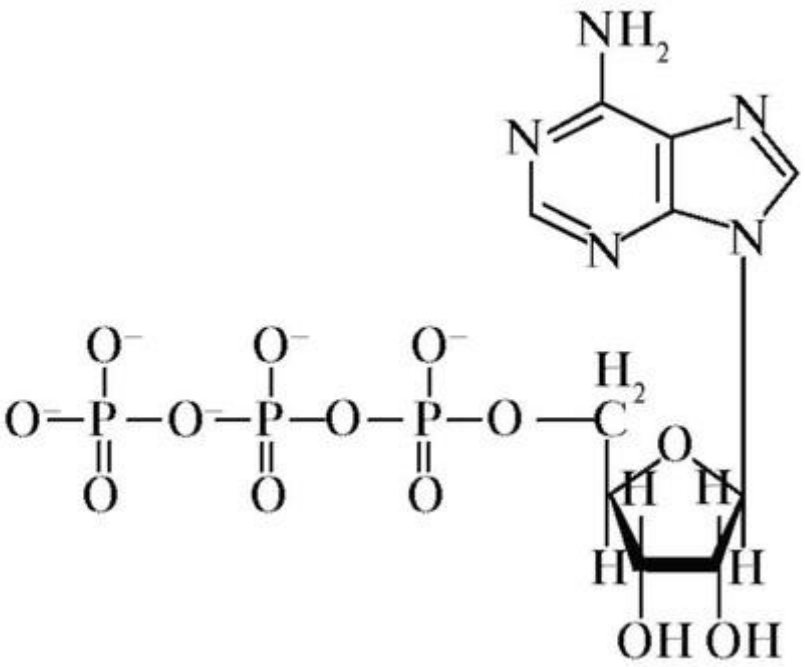
Денатурация ДНК приводит к расплетанию двухцепочечной структуры, разрушая водородные связи между спаренными основаниями и гидрофобные взаимодействия, закрепляющие структуру двойной спирали. В результате образуются одноцепочечные хаотические клубки. Денатурацию в литературе не совсем корректно называют также *плавлением* ДНК.

Обратный процесс сборки в двойную цепь *(ренатурация,* или *отжиг),* если расхождение цепей полностью завершено, осуществляется в два этапа. Сначала, в результате случайных столкновений, образуются короткие комплементарные участки двойной спирали, затем наступает быстрый этап «схлопывания» двойной спирали.

Свободные нуклеотиды. АТФ и NADPH. Кроме связанных в ДНК и РНК нуклеотидов, в организме функционирует большое количество свободных нуклеотидов (нуклеозидфосфатов) и никотинсодержащих нуклеотидов.

Свободные нуклеотиды содержатся в значительных количествах во всех клетках. Они образуются либо в результате синтеза, либо в результате частичного гидролиза нуклеиновых кислот. В нуклеозидах имеется несколько свободных гидроксильных групп. Именно поэтому существует более чем одно положение, по которому фосфатная группа может присоединяться к кольцу сахара.

Аденозинтрифосфат (ATP или АТФ в русском написании):



является переносчиком химической энергии, запасенной в высокоэнергетических фосфатных группах. Он является связующим звеном между процессами метаболизма, сопровождаемыми выделением энергии, и процессами, протекающими с потреблением энергии.

Для переноса или распределения энергии в окислительно-восстановительных реакциях биосинтеза используются и другие нуклеозидфосфаты.

К ним относятся никотинсодержащие нуклеозидфосфаты никотинамидадениндинуклеотидфосфат NADP (НАДФ), NADPH [НАДФ (водород)], а также никотинамидаденилдинуклеотид NAD^+ ($НАД^+$) и NADH [НАД (водород)]:

NAD^+ - окисленная форма никотинамидаденилдинуклеотида, NADH - восстановленная форма.

К окислительно-восстановительным переносчикам энергии относятся также FAD - флавинадениндинуклеотид и рибофлавинфосфат.

FAD является производным витамина B_2 (рибофлавина). Его номенклатурное название - рибофлавиндифосфат рибозиладенин. Восстанавливаясь, FAD присоединяет два атома водорода и превращается в FADR,.

Еще один переносчик электронов, относящийся к данной группе, - FMN - флавинмононуклеотид, он также является производным витамина B_2 и имеет следующее строение (отличается от витамина B_2 только наличием фосфатной группы).

Оба флавиновых кофермента могут существовать и в форме свободных радикалов - семихинонов, которые образуются в результате переноса только одного электрона на FAD или FMN.

Общее обозначение различных флавопротеидов, различающихся белковой составляющей фермента, - FP_n.

Динуклеотиды и тринуклеотиды выполняют и другие функции. Они являются переносчиками некоторых строительных блоков.

Например, уридилдифосфат (UDP) - специфический переносчик остатков сахара при синтезе полисахаридов. В форме уридилдифосфат-глюкозы он выступает как донор остатка глюкозы при биосинтезе гликогена. Аналогичным путем цитидилдифосфатхолин служит донором холина при биосинтезе холинсодержащих фосфоглицеридов.

Тринуклеотиды служат также высокоэнергетическими предшественниками мононуклеотидных единиц при ферментативном синтезе ДНК и РНК. В ходе этих реакций различные тринуклеотиды передают свою концевую пирофосфатную группу, превращаясь в нуклеозидмонофосфаты.

ДНК - хранитель наследственной информации. Наследственная информация записана (закодирована) в строго определенной последовательности нуклеотидов цепи ДНК. Любые изменения этой последовательности (мутации) ведут к нарушению закодированной первичной структуры белков в процессе их биосинтеза. В результате мутации нарушаются функции белка, что влияет на жизнедеятельность организма в целом.

Количество информации, записанной в ДНК, возрастает с удлинением нуклеотидной цепи, подобно тому, как возрастает количество информации с объемом магнитного носителя - пленки, диска и т.п.

Структура генов. Ген представляет собой последовательность нуклеотидов ДНК размером от нескольких сотен до миллиона пар нуклеотидов, в которых закодирована генетическая информация (число и последовательность аминокислот) о первичной структуре белка. Для правильного считывания информации в гене должны присутствовать кодон инициации, множество смысловых кодонов и кодон терминации.

В последовательности нуклеотидов двухцепочечной ДНК каждые три пары нуклеотидов кодируют одну из 20 аминокислот. Эти три пары подряд расположенных нуклеотидов являются ключевыми словами для аминокислот и называются кодонами. Кодон определяет, какая аминокислота будет располагаться в данной позиции в белке.

Каждый кодон соответствует одному аминокислотному остатку в белке. Кодон определяет, какая аминокислота будет располагаться в данной позиции в белке.

Например, в молекуле ДНК последовательность оснований AUG является кодоном для аминокислоты метионина *(Met),* а последовательность UUU кодирует фенилаланин *(Phe).* В молекуле иРНК вместо тимина (Т) присутствует основание урацил (U).

Из 64 возможных вариантов кодонов смысловыми являются 61, а триплеты - UAA, UAG - не кодируют аминокислоты, и поэтому их назвали бессмысленными. Однако они представляют собой знаки окончания (терминации) трансляции ДНК.

Знания нуклеотидной последовательности в молекулах ДНК недостаточно без знания принципов кодирования и программирования, лежащих в основе транскрипции, трансляции и регуляции экспрессии генов.

Для прокариот характерна относительно простая структура генов. Так, структурные гены бактерии, фага или вируса, как правило, контролируют синтез одного белка (одну ферментативную реакцию).

Эукариотические гены, в отличие от бактериальных, имеют прерывистое, мозаичное строение.

Кодирующие последовательности (экзоны) перемежаются с некодирующими (интронами). В результате структурные гены эукариот имеют более длинную нуклеотидную последовательность, чем соответствующая зрелая иРНК. Последовательность нуклеотидов в иРНК соответствует экзонам.

В процессе транскрипции информация о гене списывается с ДНК на промежуточную иРНК (про-иРНК), состоящую из экзонов и интронов-вставок. Затем специфические ферменты рестриктазы разрезают эту про-иРНК по границам (экзонинтрон). После этого экзонные участки соединяются (сплайсинг), образуя зрелую иРНК. Число интронов может варьировать в разных генах от нуля до многих десятков, а длина меняется в пределах от нескольких пар до нескольких тысяч оснований.

Наряду со структурными и регуляторными генами обнаружены участки повторяющихся нуклеотидных последовательностей, функции которых изучены недостаточно. Обнаружены также мигрирующие (мобильные) гены, способные перемещаться по геному.

Полный одинарный набор генетического материала организма называется геномом этого организма. В геном входят все последовательности нуклеотидов ДНК хромосом, ДНК митохондрий и хлоропластов растений.

Величина генома, выраженная в парах нуклеотидов, сильно варьирует у разных организмов. Геном эукариот значительно больше, чем у прокариот.

Например, геном самого маленького микроорганизма - микоплазмы содержит миллион (10^6) пар нуклеотидов, у амфибий и цветковых растений он составляет сто миллиардов (10^{11}) пар нуклеотидов. Однако даже между организмами одной и той же таксономической группы наблюдается высокая вариабельность размера генома.

Геном человека - совокупность наследственного материала, заключенного в клетке человека. Человеческий геном состоит из 23 пар хромосом, находящихся в ядре, а также митохондриальной ДНК. Двадцать две аутосомные хромосомы, две половые хромосомы (X и Y), а также митохондриальная ДНК человека содержат вместе примерно 3,1 млрд пар оснований.

В ходе выполнения проекта «Геном человека» была определена последовательность ДНК всех хромосом и митохондриальной ДНК. В настоящее время эти данные активно используются по всему миру в биомедицинских исследованиях.

Полное секвенирование (расшифровка полной структуры нуклеотидных последовательностей хромосом) выявило, что человеческий геном содержит 20-25 тыс. активных генов, что значительно меньше, чем ожидалось в начале проекта (порядка 100 тыс.), то есть только 1,5% всего генетического материала кодирует белки или функциональные РНК. Остальная часть является некодирующей ДНК, которую часто называют мусорной ДНК.

Вопросы и задачи к разделу 1.3.4

1. Проанализируйте, из каких стадий состоит метаболический путь биосинтеза пуриновых нуклеотидов.

2. Проанализируйте, из каких стадий состоит метаболический путь биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов.

3. Проанализируйте, из каких стадий состоит метаболический путь биосинтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов.

4. Как синтезируется цепь ДНК?

5. Как синтезируется цепь РНК?

6. Опишите первичную, вторичную и третичную структуры ДНК.

7. Каким образом «записаны» гены в структуре ДНК?

8. Что такое трансляция и транскрипция генетической информации?

Макрокомпоненты метаболома человека (см. рис. 1.1) - жидкие среды, белки, углеводы, липиды, нуклеотиды - рассмотрены в данной главе. Микрокомпоненты метаболома человека - витамины, гормоны, микроэлементы, функционирующие главным образом как эффекторы, - рассмотрены в соответствующих разделах.

Глава 2. МЕТАБОЛИЗМ И МЕТАБОЛИТЫ

2.1. МЕТАБОЛИЗМ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ

Метаболизм (от греч. *metabole* - «движение, изменение, превращение») - совокупность биохимических превращений веществ, поступающих в организм, и взаимопревращения веществ, из которых состоит организм.

Превращения (обмен) веществ в процессах метаболизма осуществляются через цепи последовательных реакций. Эти цепи последовательных реакций называют метаболическими путями (МП).

Характер метаболизма в тканях во многом определяется питанием.

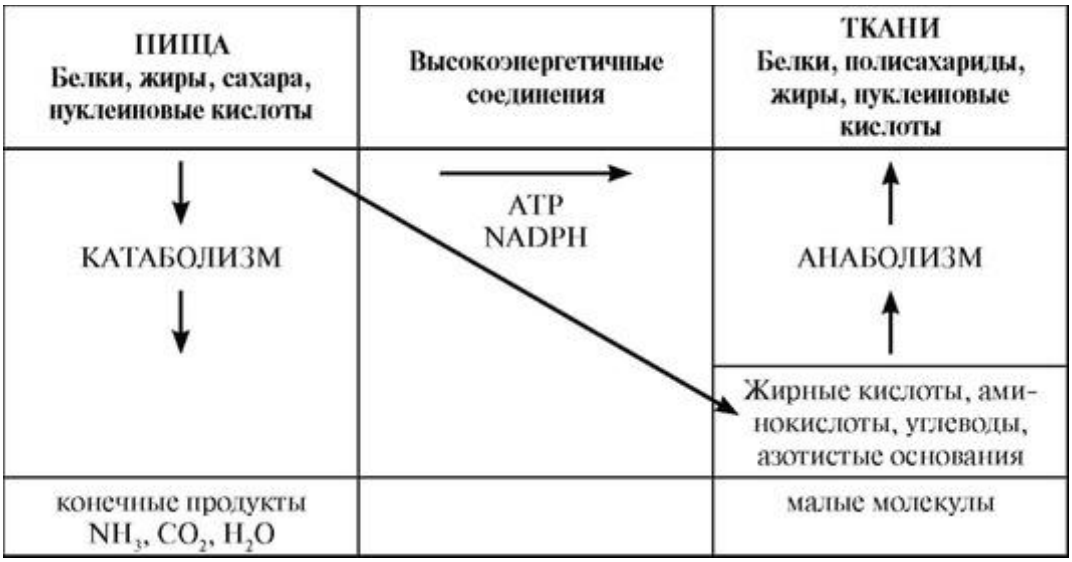
• У человека и других млекопитающих метаболическим превращениям подвергаются продукты, абсорбируемые после переваривания содержащихся в пище белков, жиров и углеводов.

• У жвачных животных (и в меньшей степени у других травоядных) целлюлоза переваривается симбиотическими микроорганизмами с образованием низших гомологов органических кислот (уксусной, пропионовой, масляной); тканевый метаболизм у этих животных адаптирован к утилизации в качестве основного субстрата низших жирных кислот.

При экспериментальном исследовании метаболического пути, во-первых, индентифицируют реагирующие компоненты, выясняют стехиометрию и механизм для каждой из последовательных стадий процесса. Заключительным этапом такого исследования является воспроизведение ферментативных реакций в пробирке. Во-вторых, идентифицируют генетические, аллостерические и гормональные механизмы, с помощью которых осуществляется регуляция скорости данного метаболического процесса.

Метаболические пути в целом организме изучают либо методом определения вводимых в организм и выводимых из него веществ (в норме, а также в условиях стресса и патологии), либо методом перфузии (промывки) отдельных органов, либо методом переживающих срезов ткани. Очень перспективным считают метод, основанный на изучении полученных мутантных организмов с генетическими дефектами, а также метод меченых атомов.

Таблица 2.1. Взаимосвязь общего катаболизма (расщепления) и анаболизма (синтеза)



Метаболизм включает катаболизм и анаболизм.

Катаболизм - фаза распада, ферментативное расщепление сложных молекул на более простые, метаболический путь от сложного к простому.

Анаболизм - синтез сложных молекул из малых, метаболический путь от простого к сложному.

В свою очередь, каждый из этих процессов (катаболизм и анаболизм) состоит из двух одновременно протекающих взаимосвязанных процессов:

• промежуточного метаболизма - последовательности ферментативных реакций распада или синтеза, промежуточные продукты которой носят название «метаболиты»;

• энергетического сопряжения - превращений энергии в реакциях метаболизма, в результате которых энергия либо запасается в высокоэнергетичных соединениях (АТФ, NADPH), либо расходуется при распаде этих соединений (табл. 2.1).

Процессы общего катаболизма можно разбить на три основные стадии (рис. 2.1).

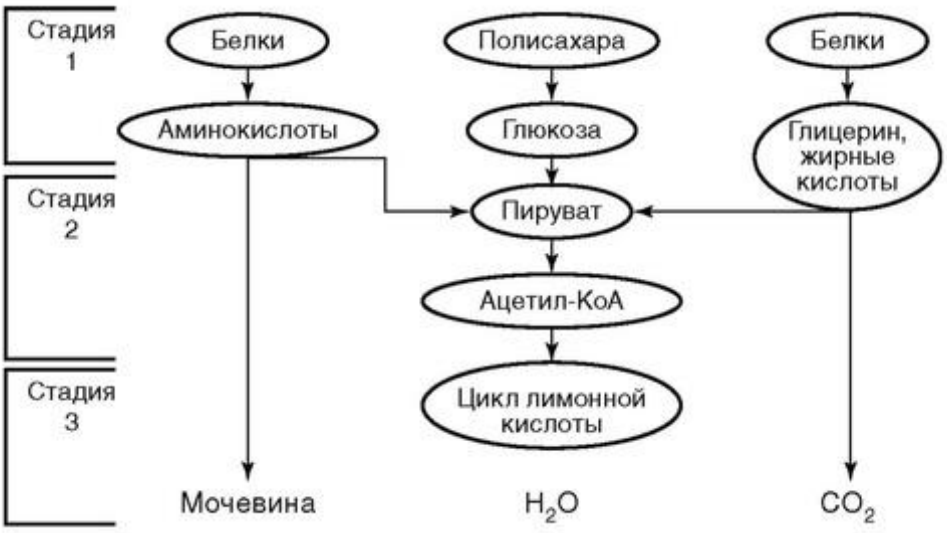


Рис. 2.1. Три основные стадии катаболизма

Первые две стадии катаболизма - расщепление белков, полисахаров и липидов до пирувата и ацетил-кофермента-А (ацетил-КоА). Третья стадия - цикл лимонной кислоты, основной процесс, обеспечивающий организм энергией и различными метаболитами.

Процессы анаболизма также включают три стадии. Исходными веществами, или строительными блоками, служат для анаболизма соединения, поставляемые процессами катаболизма.

Катаболические и анаболические пути не совпадают между собой.

Метаболизм пищевых веществ. Поступающая в организм пища, в значительной мере состоящая из белков, углеводов и жиров, должна быть деструктурирована до таких компонентов, как аминокислоты, гексозы, жирные кислоты, которые непосредственно участвуют в процессах метаболизма. Превращение исходных веществ в резорбируемые субстраты происходит поэтапно в результате процессов катаболизма, проходящих с участием различных ферментов.

Многоуровневая система пищеварения человека состоит из ряда этапов, к которым относятся следующие.

• Поступление пищи в ротовую полость. Преодоление глоточного сфинктера и выход в пищевод.

• Поступление пищи из пищевода в желудок. Гидролиз полимеров желудочными ферментами.

• Поступление пищевой смеси в двенадцатиперстную кишку. Перемешивание пищи с желчными кислотами и ферментами поджелудочной железы. Формирование пищеварительного сока (химуса) с участием кишечной секреции. Гидролиз в полости кишки.

• Транспорт полимеров, олиго- и мономеров через пристеночный слой тонкой кишки. Гидролиз нутриентов в щеточной кайме энтероцитов (мембранное пищеварение).

• Перенос продуктов гидролиза нутриентов в кровь и через портальную систему в печень. Доставка пищевых веществ лимфо- и кровотоком в ткани и органы.

• Транспорт продуктов гидролиза нутриентов через мембраны клеток и их включение в пластические, энергетические и внутриклеточные процессы.

Таким образом, процессы клеточного метаболизма протекают на последнем уровне процесса пищеварения.

2.2. КАТАБОЛИЗМ И АНАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ - ОСНОВНЫЕ ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ

Углеводный метаболизм - совокупность процессов превращения моносахаридов и их производных, а также гомополисахаридов, гетеро-полисахаридов и различных биополимеров в организме.

Прохождение всасываемых углеводов через эпителиальные клетки кишечника и поступление в клетки периферических тканей осуществляются с помощью особых транспортных систем, функция которых заключается в переносе молекул сахаров через поверхностные клеточные мембраны. Существуют особые белки-переносчики - пермеазы, специфические по отношению к сахарам и их производным. Пермеазы называют также транслоказами (например, транслоказа глюкозо-6-фосфата УДФ-глюкуроновой кислоты).

На начальном этапе обмена углеводов (рис. 2.2) олиго- и полисахариды расщепляются до моносахаридов - глюкозы, фруктозы и др.

Ткани, которые потребляют кислород (аэробные условия), осуществляют превращение пирувата в ацетил-КоА, который далее вступает в цикл лимонной кислоты. В этом цикле ацетил-КоА полностью окисляется до CO_2 и H_2O. Большая часть энергии этого процесса запасается в форме АТФ в результате окислительного фосфорилирования. Таким образом, глюкоза служит главным топливом для многих тканей.

Глюкоза, а также ее метаболиты участвуют и в других процессах (см. рис. 2.2). Глюкоза превращается в животный крахмал гликоген, который запасается в тканях, в особенности в скелетных мышцах и печени.

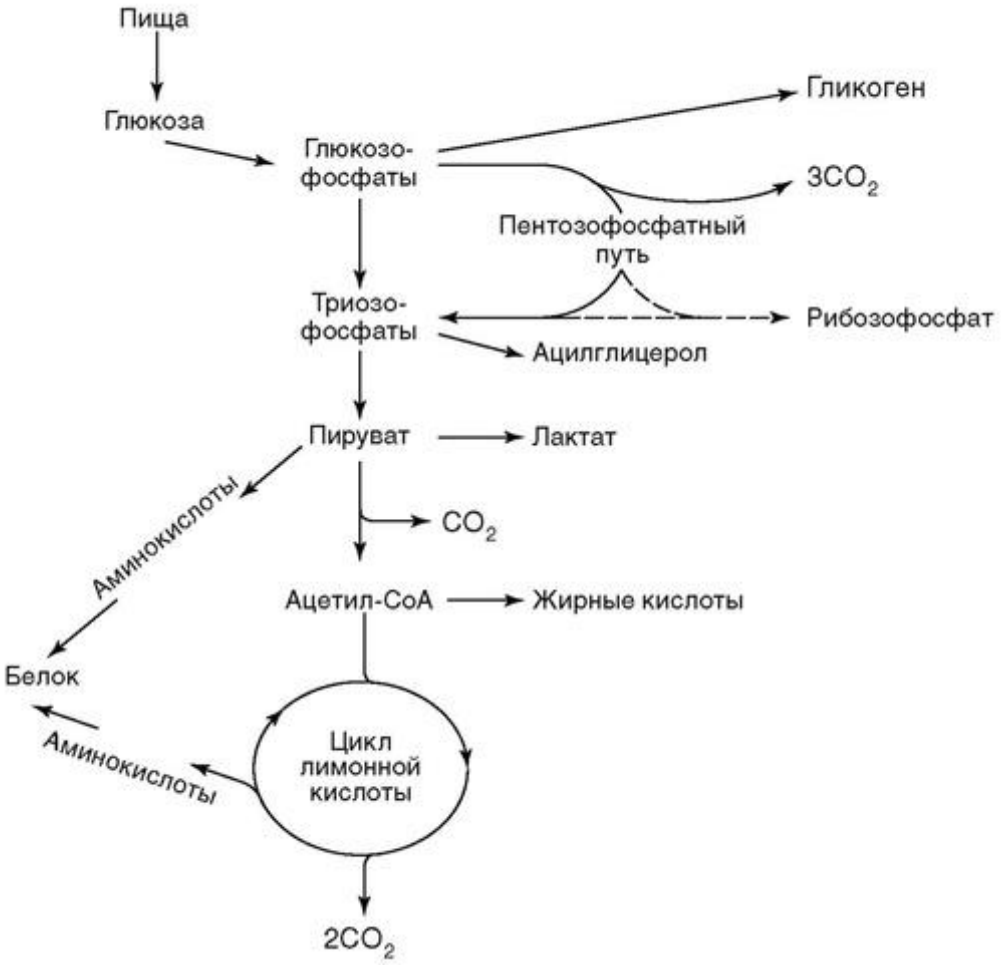


Рис. 2.2. Метаболическая сеть углеводов

Пентозофосфат, субстрат пентозофосфатного пути превращения глюкозы, является одним из промежуточных продуктов гликолиза. Этот путь служит источником восстановительных эквивалентов, используемых в процессах биосинтеза, например в биосинтезе жирных кислот. Кроме того, пентозофосфат является источником рибозы, необходимой для синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Триозофосфат, образующийся на одной из стадий гликолиза, является источником глицерина, используемого в синтезе жиров.

Пируват и ряд промежуточных соединений цикла лимонной кислоты - источники углеродных скелетов, используемых в синтезе аминокислот.

Ацетил-КоА служит основным строительным блоком в синтезе длинноцепочечных жирных кислот и холестерина - предшественника всех синтезируемых в организме стероидных гормонов.

При недостатке глюкозы в организме протекают процессы синтеза глюкозы и гликогена - глюконеогенез.

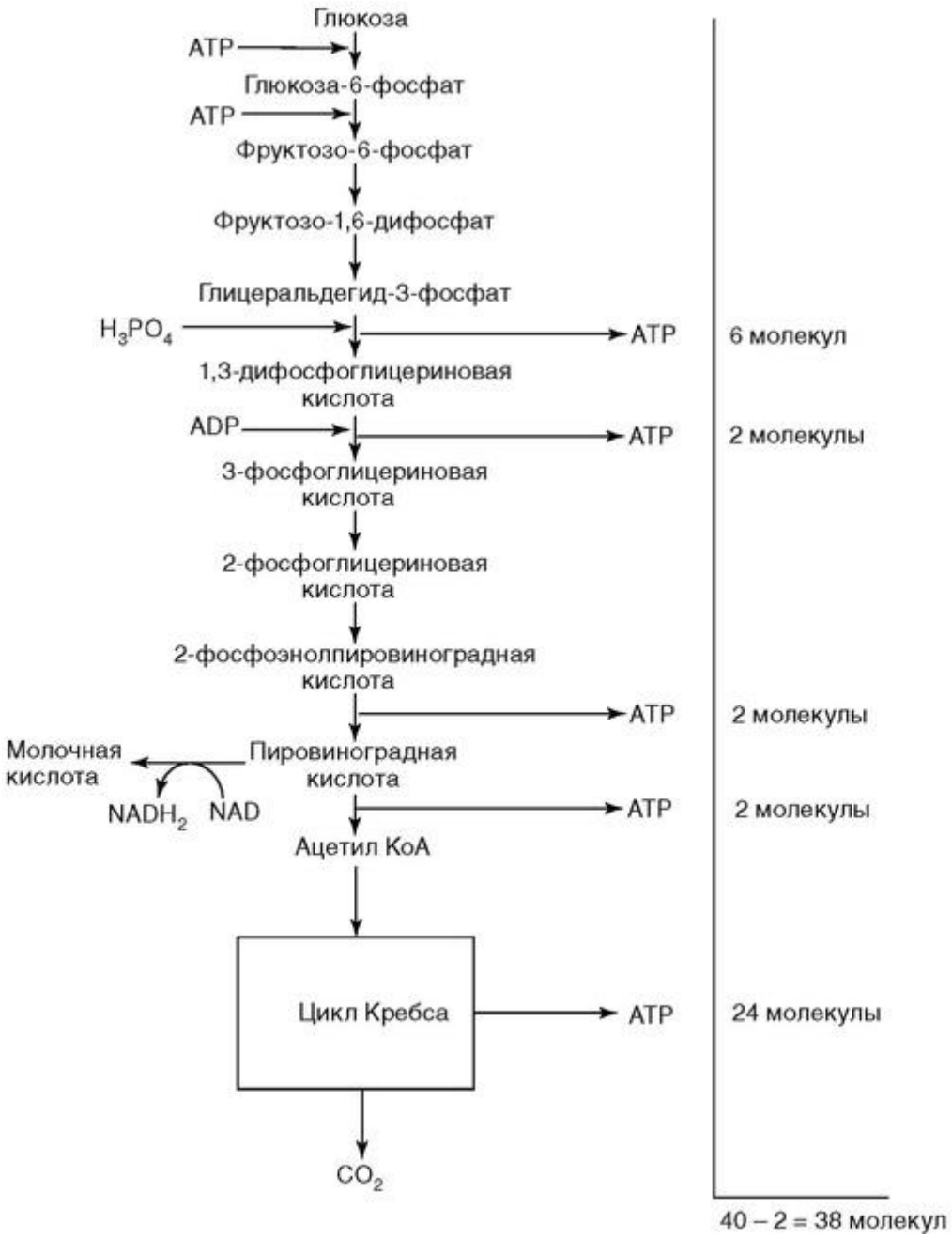


Рис. 2.3. Гликолиз: метаболический путь «глюкоза - ацетил-КоА»

Гликолиз (от греч. *glikos* - «сладкий» и *lisis* - «расщепление») - центральный метаболический путь общего катаболизма (рис. 2.3), в результате которого глюкоза превращается в ацетил-КоА. Гликолиз протекает без участия кислорода (анаэробный процесс).

Метаболический путь гликолиза состоит из 11 стадий. Каждая стадия изображена вертикальной стрелкой и представляет собой соответствующую реакцию (см. рис. 2.3).

Реакции на каждой стадии катализируются ферментами:

1 - гексозокиназой;

2 - гексозо-6-фосфатизомеразой;

3 - 6-фосфофруктаназой;

4 - фруктозодифосфатальдолазой;

5 - триозофосфатизомеразой;

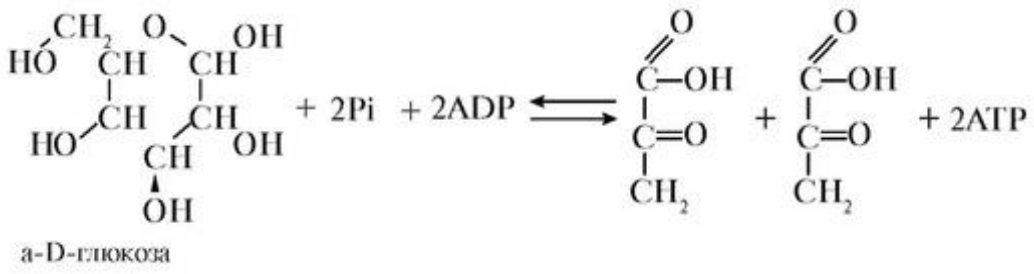
6 - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой;

7 - фосфоглицераткиназой;

8 - енолазой;

9 - пируваткиназой.

Все реакции гликолиза протекают в жидкой среде клетки - цитоплазме. Здесь находятся все белки-ферменты гликолиза. Суммарное уравнение реакций гликолиза:



а-D-глюкоза

В результате гликолиза образуются две молекулы АТФ, и тем самым запасается примерно 60 кДж энергии на каждый моль (180 г) расщепленной глюкозы.

Анаэробный гликолиз, несмотря на небольшой энергетический эффект, является основным источником энергии для скелетных мышц в начальном периоде интенсивной работы, то есть в условиях, когда снабжение кислородом ограниченно. При интенсивных нагрузках, когда поступление кислорода недостаточно, в мышцах накапливается избыток лактата, что приводит к болевым ощущениям.

Еще одно разветвление пути гликолиза - восстановление пировиноградной кислоты до этилового спирта, его называют спиртовым брожением.

Пентозофосфатный путь является альтернативным путем окисления глюкозы. Этот обходной путь (шунт) включает восемь стадий.

В результате из трех молекул глюкозо-6-фосфата образуются три молекулы CO_2 и три молекулы пентоз - рибозы и ксилозы. Последние используются для регенерации двух молекул глюкозо-6-фосфата и одной молекулы глицеральдегид-3-фосфата. Особенно важное значение имеет образование рибозы, которая необходима для синтеза нуклеиновых кислот.

Пентозофосфатный путь протекает в печени, жировой ткани, коре надпочечников, щитовидной железе, эритроцитах, семенниках и молочных железах в период лактации. Этот путь метаболизма углеводов не действует в нелактирующих молочных железах и малоактивен в скелетных мышцах.

Все ткани, в которых активность данного пути высока, используют в реакциях восстановительного синтеза NADPH, например в реакциях синтеза жирных кислот, стероидных гормонов, аминокислот (с участием глутаматдегидрогеназы) или восстановленного глутатиона в эритроцитах.

При интенсивном синтезе жиров (липогенезе) и при функционировании систем с участием NADPH возрастает скорость деградации глюкозы по пентозофосфатному пути. Это связано с увеличением соотношения концентраций NADP/NADPH. После приема пищи может индуцироваться синтез глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфо-глюконатдегидрогеназы.

Цикл лимонной кислоты (Кребса). Биоорганические вещества, такие как глюкоза, обладают большим запасом энергии. Основная часть энергии глюкозы передается в цикле Кребса (рис. 2.4), сопряженном с клеточным дыханием.

При окислении глюкозы кислородом:

$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = CO_2 + H_2O$ высвобождается энергия Гиббса $\Delta G = -2880$ кДж/моль. Эта энергия может запасаться в клетке в форме химической энергии фосфатных связей аденозинтрифосфата (АТФ).

Цикл Кребса представляет собой ряд последовательных реакций, протекающих в митохондриях. В ходе этих реакций осуществляется катаболизм ацетильных групп CH_3CO-, передаваемых от пирувата, конечного продукта гликолиза. Пируват вступает в реакции цикла Кребса, предварительно превращаясь в ацетил-КоА.

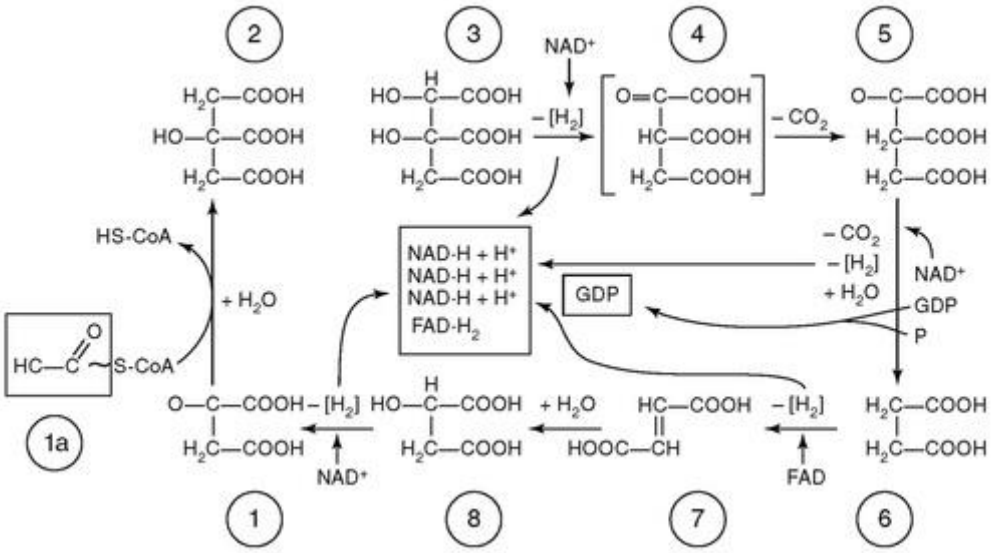


Рис. 2.4. Цикл Кребса (цикл лимонной кислоты): 1 - оксалоацетат; 1а - ацетил-КоА; 2 - лимонная кислота (цитрат); 3 - изоцитрат; 4 - оксалосукцинат; 5 - кетоглутарат; 6 - янтарная кислота (сукцинат); 7 - фумарат; 8 - яблочная кислота (малат)

Цикл Кребса, в отличие от гликолиза, - путь замкнутый. На восьмой стадии цикл замыкается, и начинается его новое прохождение.

Все стадии цикла лимонной кислоты протекают во внутренней среде митохондрий - матриксе. Здесь находятся все ферменты этого метаболического пути. В клетке может находиться от нескольких сотен до нескольких десятков тысяч митохондрий. Особенно много митохондрий в мышечных клетках, где требуются большие затраты энергии.

Образованные в цикле Кребса высокоэнергетические вещества NADH и $FADH_2$ (см. рис. 2.4) передают свою энергию в реакции ресинтеза АТФ из АДФ:

$$NADH + 3АДФ + 3P_i + 1/2O_2 + H^+ = 3АТФ + NAD + 4H_2O.$$

В результате на каждую молекулу NADH образуется три молекулы АТФ. Эта реакция окислительно-восстановительная, то есть сопровождается переносом электронов от восстановителя (NADH) к окислителю - кислороду O_2. Эта реакция называется окислительным фосфорилированием АДФ в АТФ.

Окислительное фосфорилирование происходит во внутренней митохондриальной мембране. В трех участках дыхательной цепи происходит запасание энергии в результате синтеза АТФ из АДФ и P_i.

Молекулы АТФ, образованные в матриксе, выходят из митохондрий в плазму клетки, где участвуют в различных биохимических реакциях, идущих с расходом энергии.

Для удовлетворения энергетических потребностей человеческого организма молекулы АТФ на протяжении суток многие тысячи раз расщепляются до молекул АДФ и P_i с последующим ресинтезом АТФ.

Суммарное уравнение реакций гликолиза и цикла лимонной кислоты:

$$C_6H_{12}O_6 + 38АДФ + 38P_i + 6O_2 = 38АТФ + 6H_2O + 6CO_2.$$

Стандартная энергия Гиббса окисления глюкозы равна: ΔG = -2880 кДж/моль. Стандартная энергия Гиббса гидролиза 38 моль АТФ (запасенная энергия) равна: $\Delta G^{0'}$ = - 38 х 30 = 1180 кДж, то есть запасается лишь 40% энергии глюкозы (коэффициент полезного действия дыхания). Остальная энергия выделяется из организма в виде тепла (Q). Этим объясняется разогрев и повышение температуры тела при интенсивной работе.

Метаболический путь глюконеогенеза от пирувата к глюкозе. Превращение глюкозы в пировиноградную кислоту, катализируемое ферментами гликолиза, является центральным путем катаболизма углеводов в большинстве клеток как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Точно так же обратный процесс превращения пирувата в глюкозу является центральным путем биосинтеза моносахаридов и полисахаридов.

Путь глюконеогенеза образует сеть с двумя путями, начинающимися с различных наборов неуглеводных предшественников.

Один из этих путей состоит из ряда последовательных реакций, в которых промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот превращаются в пируват. Второй путь состоит из ряда реакций, приводящих к восстановлению CO_2 до глюкозы.

Расходящиеся пути, начинающиеся с глюкозо-6-фосфата (см. рис. 2.3), приводят к образованию свободной глюкозы, запасных полимеров (крахмала и гликогена) и других моносахаридов и их производных.

Еще один важный путь глюконеогенеза начинается с аминокислот.

У человека и высших животных в период восстановления после интенсивной мышечной работы особенно активно происходит синтез глюкозы из молочной кислоты (лактата) крови, осуществляющийся главным образом в печени.

Центральный путь, ведущий от пирувата к глюкозе, - образование фосфоенолпирувата из пирувата. Эти реакции представляют обращение реакций, реализующихся в процессе гликолиза.

Глюконеогенез идет в обход необратимых стадий, используя альтернативные реакции, которые термодинамически выгодны. Первая из них - превращение пирувата в фосфоенолпируват: пируват + АТФ → фосфоенолпируват + АДФ.

Суммарное уравнение для этого обходного пути образования фосфоенолпирувата получают, суммируя все реакции и изменения энергии Гиббса:

$$\text{пируват} + \text{АТФ} + \text{GTP} \leftrightarrow \text{фосфоенолпируват} + \text{АДФ} + \text{GDP} + P_i;$$
$$\Delta G^{o\prime} = +0{,}8 \text{ кДж/моль}.$$

Фосфоенолпируват, образованный из пирувата в результате описанных выше реакций, легко превращается в фруктозо-1,6-дифосфат, затем в глюкозо-6-фосфат в последовательности реакций, которые представляют собой реакции гликолиза, идущие в обратном направлении.

Свободная глюкоза образуется при действии глюкозо-6-фосфатазы, катализирующей конечную реакцию глюконеогенеза:

$$\text{глюкозо-6-фосфат} + H_2O \rightarrow \text{глюкоза} + P_i;\ \Delta G^{o\prime} = -13{,}5 \text{ кДж/моль}.$$

Суммарное уравнение метаболического пути глюконеогенеза, ведущего от пирувата к свободной глюкозе, имеет вид:

$$2CH_3COCOOH + 4АТФ + 2GTP + \textit{2NADH} + 2H^+ + 6H_2O \rightarrow \text{глюкоза} + 2NAD^+ + 4АДФ + 2GDP + 6\ P_i$$

Глюконеогенез из аминокислот. При дефиците иных источников, например при длительном голодании, осуществляется синтез глюкозы из аминокислот, при этом мышечная масса уменьшается.

Аминокислоты, которые могут служить предшественниками фосфоенолпирувата и, следовательно, глюкозы, называются гликогенными аминокислотами.

Существует три группы из 20 аминокислот млекопитающих.

• Гликогенные:

- аланин;

- аргинин;

- аспарагиновая кислота;

- аспарагин;

- цистеин;

- глутаминовая кислота;

- глутамин;

- глицин;

- гистидин;

- метионин;

- пролин;

- серин;

- треонин;

- триптофан;

- валин.

• Кетогенные (лейцин).

• Гликогенные и кетогенные:

- изолейцин;

- лизин;

- фенилаланин;

- тирозин.

Первая стадия синтеза гликогена у животных катализируется глюкозофосфат-уридилтрансферазой:

α-D-глюкозо-1-фосфат + UTP ↔ UDP-глюкоза + PP_i.

Вторая стадия приводит к образованию гликогена:

UDP-глюкоза + $(глюкоза)_n$ → UDP + $(глюкоза)_{n+1}$,

где $(глюкоза)_n$ и $(глюкоза)_{n+1}$ - полиглюкозные цепи из n и (n+1) остатков глюкозы.

Скорость синтеза и распада гликогена находится под гормональным контролем и изменяется при различных эндокринных нарушениях. Гормоны действуют на разных стадиях обмена глюкозы.

Адреналин действует на гликогенфосфорилазную реакцию в печени. В результате образуется фосфорилированная, или активная, форма (а-форма) гликогенфосфорилазы, которая катализирует распад гликогена с образованием глюкозо-1-фосфата.

Аналогичные изменения адреналин вызывает в мышцах. Однако, поскольку мышцы не могут выделять глюкозу в кровь, конечный эффект адреналина в этом случае состоит в стимуляции гликолиза и дыхания при интенсивной мышечной работе.

Глюкагон, полипептидный гормон, стимулирует распад гликогена печени и также повышает уровень глюкозы в крови. Механизм действия глюкагона заключается в стимуляции аденилциклазы печени.

Синтез и распад гликогена не только катализируются различными ферментами, но и регулируются независимо. При введении глюкагона или адреналина быстро уменьшается содержание гликогена в печени и повышается уровень глюкозы в крови.

Метаболическая сеть фруктозы и галактозы. Метаболизм фруктозы - составная часть метаболизма глюкозы (см. рис. 2.3).

Метаболический путь галактозы включает ряд реакций (рис. 2.5).

Галактокиназы много у грудных детей. Ее содержание увеличивается в случае питания, богатого лактозой.

В печени взрослых обнаружен фермент УДФ-галактозопи-рофосфорилаза, который непосредственно образует УДФГал в реакции с участием УТФ.

УТФ + галактозо-1-фосфат → УДФГал + пирофосфат.

Полисахариды. Полисахариды представляют собой продукты поликонденсации моносахаридов, иногда содержащие десятки и сотни тысяч остатков моносахаридов, соединенных гликозидными связями.

В состав полисахаридов могут входить остатки серной, фосфорной и жирных кислот. Существует группа полисахаридов, построенных с помощью фосфодиэфирных связей.

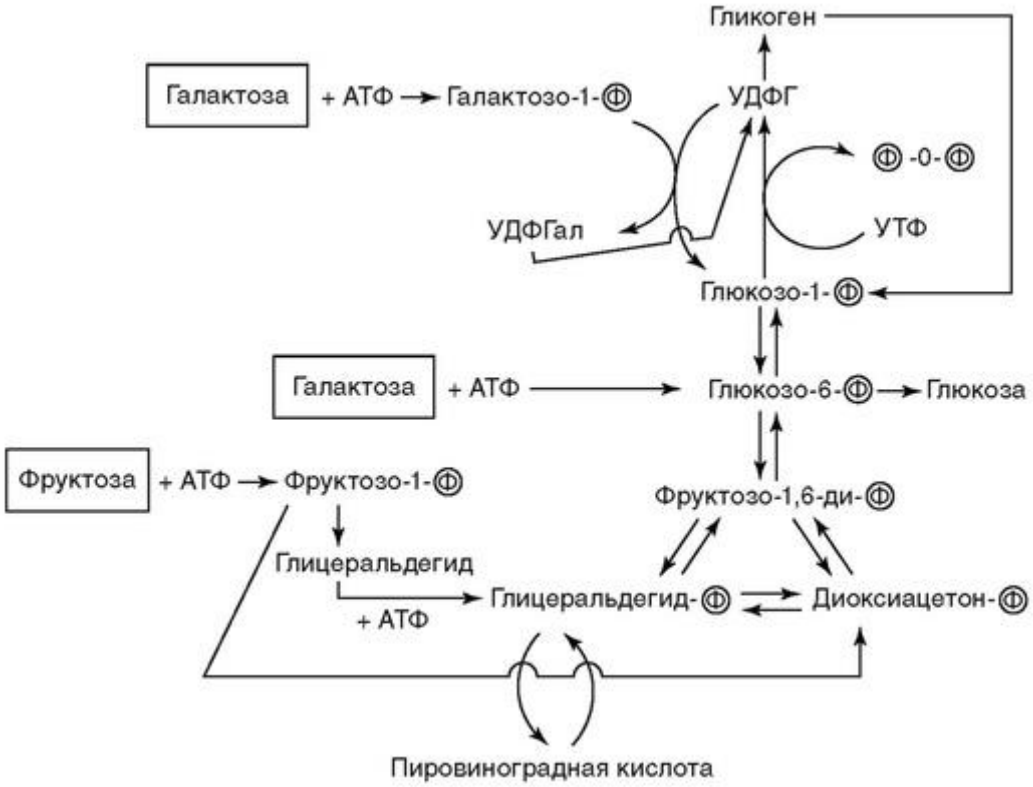


Рис. 2.5. Метаболическая сеть глюкозы, фруктозы и галактозы в печени

Смешанные углеводсодержащие биополимеры (гликоконъюгаты) подразделяют на:

• гликопротеины (содержат пептидные и полиили олигосахаридные цепи);

• гликолипиды (построены из полиили олигосахаридных цепей и липидного компонента);

• гликолипопротеины (содержат углеводные, липидные и белковые компоненты);

• тейхоевые кислоты (в их молекулах к цепи из остатков спиртовых производных полиоз - полиспиртов присоединены аминокислоты и моносахариды);

• нуклеиновые кислоты.

Патологические аспекты углеводного обмена. Метаболизм углеводов играет важную роль в жизнедеятельности организма. Нарушения метаболизма углеводов приводят к различным патологиям (табл. 2.2).

Таблица 2.2. Важнейшие представители сахаров и их биологическое значение

Сахара	Местонахождение	Биологическое значение
D-рибоза	Нуклеиновые кислоты	Структурный элемент нуклеиновых кислот и коферментов (АТФ, НАД, НАДФ). Интермедиат пентозофосфатного пути
D-рибулоза	Образуется в ходе метаболизма	Промежуточное соединение пентозофосфорного пути

D-арабиноза	Гуммиарабик, сливовая и вишневая мякоть	Компонент гликопротеинов
D-ксилоза	Протеогликаны, гликозаминогликаны	Компонент гликопротеинов
D-ликсоза	Сердечная мышца	Компонент миксофлавина, выделяемого сердечной мышцей человека
L-ксилулоза	Промежуточный продукт метаболизма ураиновой кислоты	Обнаруживается в моче при пентозурии
D-глюкоза	Фруктовые соки, гидролиз крахмала, тростникового сахара, мальтозы, лактозы	Сахара организма. Переносится кровью, эффективно используется тканями, появляется в моче у больных сахарным диабетом
D-фруктоза	Фруктовые соки, мед, гидролиз тростникового сахара, инсулина	Превращается в глюкозу в печени и кишечнике с последующим использованием в этой форме. Наследственная нетолерантность к фруктозе приводит к накоплению фруктозы и гипогликемии
D-галактоза	Гидролактозы	Превращается в глюкозу в печени, входит в состав лактозы молока, гликолипидов и гликопротеинов. Нарушение метаболизма галактозы приводит к галактогении и образованию катаракты

Пернициозная анемия - заболевание, при котором наблюдается повышение активности транскетолазы в первой реакции переноса кетогруппы (транскетолазная реакция пентозофосфатного пути). Определение активности транскетолазы в крови позволяет судить о степени недостаточности тиамина.

У некоторых пациентов прием примахина (антималярийного препарата) и сульфамидов, а также употребление в пищу ряда продуктов вызывают острые нарушения, обусловленные уменьшением количества эритроцитов за счет гемолиза.

Оказалось, что для людей, предрасположенных к такого рода нарушениям, характерен пониженный уровень глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в красных кровяных тельцах. Этот фермент ответствен за образование $НАДФН_2$.

Непереносимость фруктозы - наследственное заболевание, при котором прием в пищу фруктозы или ягод и фруктов, ее содержащих, вызывает различного рода расстройства: снижение уровня глюкозы в крови, нарушения функций пищеварительного тракта и печени. Это заболевание является следствием пониженной альдолазной активности в печени (альдолаза мышц остается в норме). Показано, что в печени таких больных обнаруживается белок, очень схожий с альдолазой, но лишенный заметной ферментативной активности. Этот белок получил название CRM *(CrossReacting Material).*

При исследовании ткани, полученной путем биопсии у людей, страдающих гликогенозами, обнаружены генетически дефектные ферменты.

При одном из типов гликогенозов - болезни фон Гирке отсутствует активность глюкозо-6-фосфатазы. При болезни Андерсена образуется аномальный фермент ветвления гликогена. В результате образуются молекулы гликогена с аномально длинными, неветвящимися цепями.

При болезни Мак-Ардла подавлена активность мышечной гликогенфосфорилазы, что приводит к избыточному отложению гликогена в мышцах.

Наследственное заболевание детей грудного возраста - галактоземия - проявляется в замедленном психическом развитии и катаракте (помутнении хрусталика). Почти полное отсутствие активной галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы у новорожденных является причиной галактоземии. Содержание глюкозы в крови иногда оказывается пониженным.

Актуальной задачей медицины является терапия патологии метаболизма углеводов при одновременной патологии липидного метаболизма.

Это обусловлено резким ростом количества диабетических пациентов с признаками ожирения. Таким образом, регуляция концентрации глюкозы в крови (гликемии) у больных сахарным диабетом является одной из важных проблем современной медицины.

Создание системы управления гликемией, обеспечивающей снижение аномально повышенной концентрации глюкозы в крови до нормы (4-6 ммоль/л, или 70-110 мг/100 мл) и ее поддержку в заданных пределах, связано с разработкой алгоритмов управления, средств программного и аппаратного обеспечения.

Для диагностики диабета используют кривые сахарной нагрузки (рис. 2.6). Пациенту дают выпить стакан водного раствора 25 г глюкозы или сахарозы и определяют изменение содержания глюкозы в плазме крови со временем.

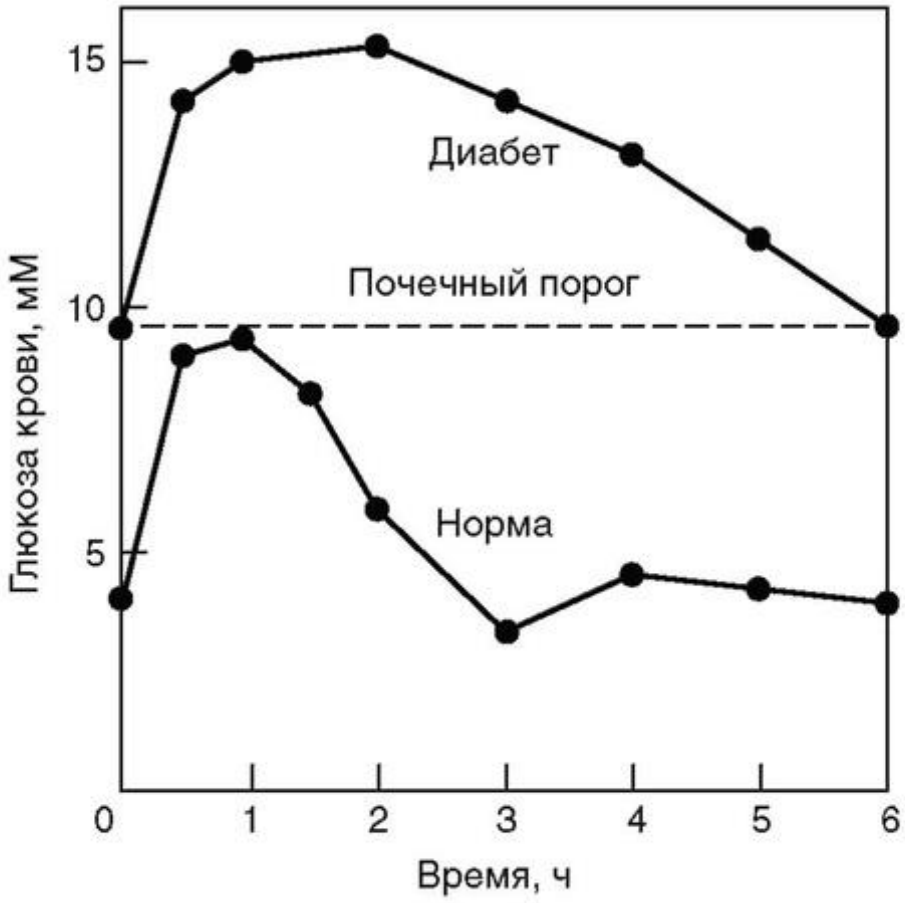


Рис. 2.6. Кривые сахарной нагрузки у здоровых и больных диабетом людей (норма - 4-6 ммоль/л, или 70-110 мг/100 мл)

У здорового человека после потребления стандартного количества глюкозы содержание глюкозы в крови может возрасти вдвое, но оно быстро снижается по мере того, как увеличивается секреция инсулина в ответ на повышение содержания глюкозы в крови.

Данные о состоянии углеводного обмена в норме и при патологии могут быть рассчитаны по параметрам различных моделей.

2.3. МЕТАБОЛИЗМ И МЕТАБОЛИТЫ БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ

Белки и их обмен незаменимы для нормального функционирования организма и всех процессов, протекающих в нем (рис. 2.7).

Направленность и интенсивность обмена белков определяется физиологическим состоянием организма и регулируется, как и все другие виды обмена, деятельностью (ЦНС).

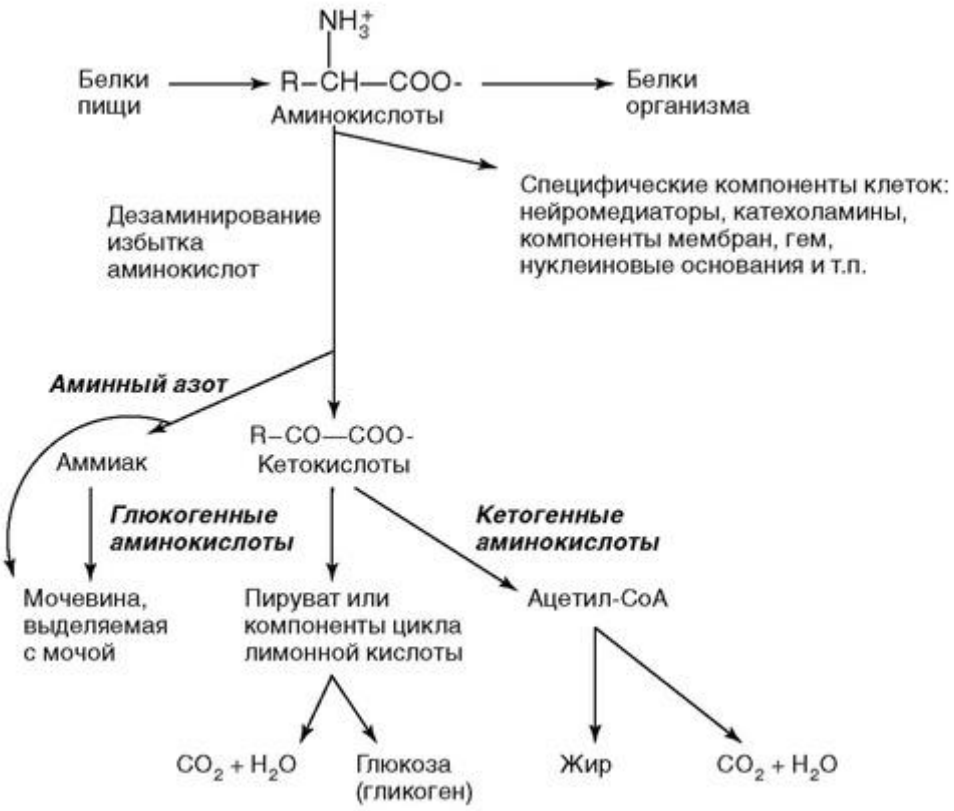


Рис. 2.7. Метаболическая сеть аминокислот

Роль аминокислот в организме определяется в первую очередь тем, что они служат предшественниками при синтезе белков и других биологически активных соединений.

Молекулы белка и большинства олигопептидов не могут проходить через мембраны клеток слизистой оболочки кишечника. В то же время аминокислоты свободно проходят через нее. Именно поэтому, чтобы аминокислоты белков могли включиться в метаболизм, белки должны гидролизоваться до аминокислот.

У млекопитающих гидролиз белков начинается под действием желудочного сока, pH которого находится в пределах 1,0-1,5. Активным началом при этом является протеолитический фермент пепсин, выделяемый клетками слизистой оболочки желудка в форме неактивного предшественника (зимогена) пепсиногена. Из желудочного сока выделен также еще один протеолитический фермент - гастриксин.

Образующиеся в результате гидролиза полипептиды из желудка попадают в тонкую кишку. Показатель кислотности среды кишечника поддерживается в пределах pH = 7,0-8,0.

Таблица 2.3. Протеолитические ферменты желудочно-кишечного тракта человека

Фермент	Среда	Функция
Пепсин	Желудочный сок	Протеиназа
Гастриксин	Желудочный сок	Пепсиноподобный фермент
Трипсин	Панкреатический сок	Протеиназа
Химотрипсин	Панкреатический сок	Протеиназа
Коллагеназа	Панкреатический сок	Протеиназа
Карбоксипептидаза	Панкреатический сок	Пептидаза
Эластаза	Панкреатический сок	Пептидаза
Аминопептидаза	Кишечный сок	Пептидаза
Лейцинаминопептидаза	Кишечный сок	Пептидаза
Аланинаминопептидаза	Кишечный сок	Пептидаза
Энтеропептидаза	Кишечный сок	Гликопротеин
Трипептидазы	Кишечный сок	Пептидазы
Дипептидазы	Кишечный сок	Пептидазы
Пролилдипептидаза	Кишечный сок	Пептидазы
Пролиндипептидаза	Кишечный сок	Пептидазы

В кишечнике полипептиды подвергаются действию нескольких протеолитических ферментов (табл. 2.3).

Трипсин максимально активен при pH = 7,0 и специфически расщепляет пептидные связи остатков аргинина или лизина в полипептидной цепи.

В тонкой кишке химотрипсин гидролизует пептидные связи остатков триптофана, фенилаланина и тирозина.

Помимо химотрипсина и трипсина, в тонкой кишке содержатся ферменты карбоксипептидаза А, карбоксипептидаза В, а также проэластаза.

Стенки тонкой кишки секретируют также лейцинаминопептидазу, гидролизующую NH_2-концевые пептидные связи.

В результате комбинированного действия различных ферментов поступающие с пищей белки подвергаются полному гидролизу до аминокислот. Аминокислоты всасываются эпителиальными клетками тонкой кишки, поступают в кровь и разносятся по всем тканям. В клетках тканей часть аминокислот идет на синтез различных белков, другая часть - на энергообеспечение жизнедеятельности.

Синтез (анаболизм) белков. Белки, функционирующие в организме, постоянно разрушаются в результате окисления входящих в них аминокислот. Такие белки подвергаются деполимеризации, и окисленные аминокислоты выводятся из организма.

Убыль разрушенных белков составляет примерно 100 г в сутки в расчете на среднего человека (массой 70 кг). Это примерно всего 1% общей массы белка (~10 кг) в организме.

Сигнал о необходимости синтеза недостающего белка поступает в клетку на соответствующий ген нуклеиновой кислоты, кодирующий этот белок, и начинается многостадийный процесс синтеза.

Синтез индивидуальных белков представляет собой реакцию полимеризации аминокислот A_1, A_2, A_3 и так далее в полипептидную цепь в генетически заданной последовательности:

$A_1 + A_2 \rightarrow A_1 - A_2 + H_2O$;

$A_1 - A_2 + A_3 \rightarrow A_1 - A_2 - A_3 + H_2O$ и т.д.

Аналогичным путем идет биосинтез белка после травм и ранений в регенерируемых тканях.

Иммуноглобулины. Основная биологическая роль иммуноглобулинов IgE определяется уникальной способностью молекул этих белков соединяться с мембранами тучных клеток и базофильных клеток. На поверхности одного базофила имеются 40 000-100 000 рецепторов, которые связывают от 5000 до 40 000 молекул IgE.

Молекулы иммуноглобулинов Е симметричны (рис. 2.8).

Молекулы IgE построены из легких (около 220 аминокислотных остатков) и тяжелых (450-600 аминокислотных остатков) L- и H-полипептидных цепей, соединенных дисульфидными S-S-связями и нековалентными взаимодействиями с тяжелыми (якорными) цепями.

В антителах человека обнаружено два вида легких и пять видов тяжелых *(g, m, a, d, e)* цепей, которые отличаются аминокислотными последовательностями. Тяжелые цепи, характерные для каждого из классов и подклассов иммуноглобулинов, содержат по одному или более олигосахаридному фрагменту.

Каждая тяжелая цепь имеет постоянный и вариабельный участки.

Постоянный участок тяжелой цепи молекулы IgE сохраняет неизменность первичной структуры (последовательность аминокислот) и постоянство антигенности в пределах данного класса иммуноглобулинов.

Вариабельный участок тяжелой цепи молекулы IgE характеризуется большой изменчивостью первичной структуры, и на этом участке происходят реакции соединения молекулы иммуноглобулина с антигеном.

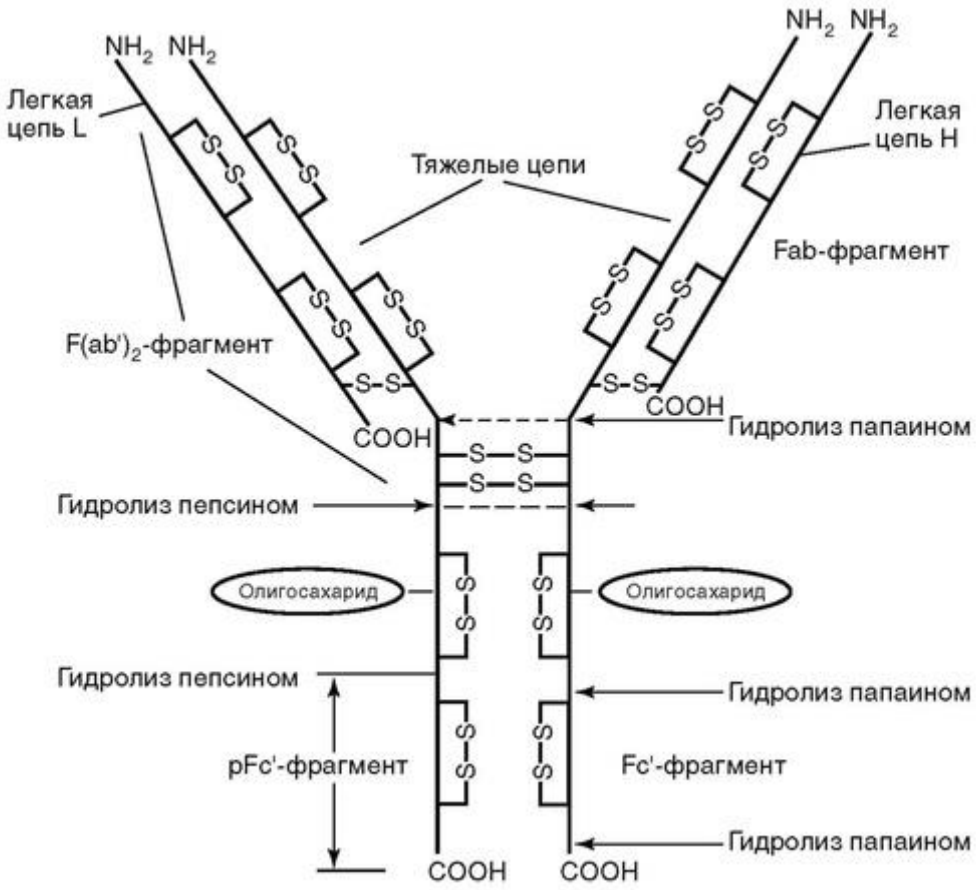


Рис. 2.8. Структура молекулы иммуноглобулина G

Надмембранные части этих рецепторов легко подвергаются протеолитическому гидролизу и поступают в кровь и как антитела участвуют в аллергических реакциях, IgE - также в защитном противогельминтном иммунитете.

Под действием фермента папаина иммуноглобулин может быть расщеплен на три фрагмента: два из них одинаковые, обладают способностью связывать антиген и названы *Fab*-фрагментами (фрагмент антигенсвязывающий), третий фрагмент определяет физиологическую активность (*Fc*-фрагмент).

Фермент пепсин расщепляет молекулу антитела иначе. При расщеплении образуются двухвалентный$F(ab')_2$-фрагмент и несколько осколков *Fc*-фрагмента, из которых наиболее крупный назван *pFc*'фрагментом.

Энергетическая функция аминокислот. Аминокислоты , поступающие в ткани организма, не только используются клетками для биосинтеза белка, но и включаются также в процессы энергообеспечения жизнедеятельности. Через ряд превращений аминокислоты подключаются к циклу Кребса (рис. 2.9), и запасенная в них энергия передается клетке.

Катаболизм аминокислот - основная часть азотистого обмена в организме.

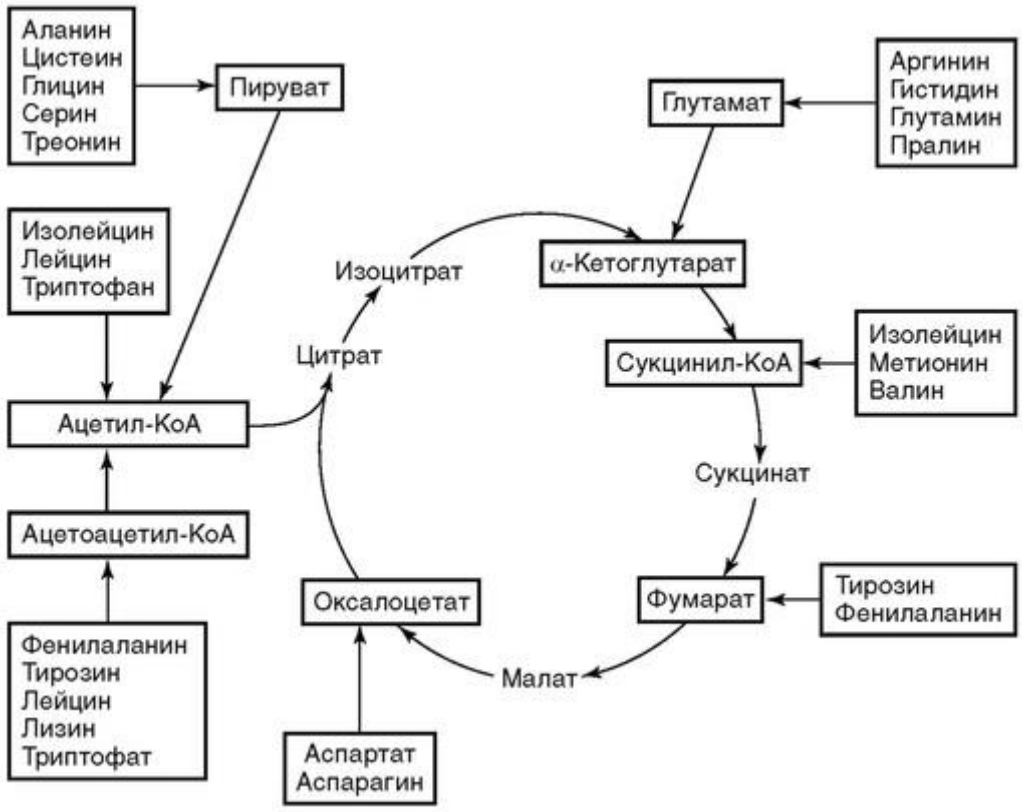


Рис. 2.9. Пути введения углеродных скелетов аминокислот в цикл Кребса

Общие пути превращения аминокислот включают реакции дезаминирования, трансаминирования, декарбоксилирования и биосинтеза.

Общий итог трансаминирования различных аминокислот состоит в том, что все их аминогруппы собираются в общий фонд в виде одной аминокислоты - обычно глутаминовой.

Глутаминовая кислота служит каналом для передачи аминогрупп в заключительную последовательность реакций, ведущую к образованию конечных продуктов азотистого обмена.

Все трансаминазы содержат один и тот же кофермент - пиридоксальфосфат. Для реакций, катализируемых им, характерен общий механизм.

Пути катаболизма всех 20 аминокислот можно разделить на несколько типов в зависимости от того, как эти аминокислоты вступают в цикл карбоновых кислот.

Продукт дезаминирования аминокислот - аммиак - высокотоксичен. Токсичность аммиака обусловлена тем, что он участвует в реакции восстановительного аминирования α-кетоглутаровой кислоты в митохондриях (фермент глутаматдегидрогеназа):

NH_4^+ + α-кетоглутаровая кислота + НАД-Н ↔ глутаминовая кислота + $НАД^+$.

Одним из путей связывания и обезвреживания аммиака в организме, в частности в мозге, сетчатке, почках, печени и мышцах, является биосинтез глутамина (или аспарагина).

У большинства наземных позвоночных аммиак связывается и выводится в виде мочевины. Такие организмы носят название уреотелических.

Основным механизмом обезвреживания аммиака в организме человека и наземных позвоночных является биосинтез мочевины в четырехстадийном орнитиновом цикле мочевинообразования Кребса (рис. 2.10).

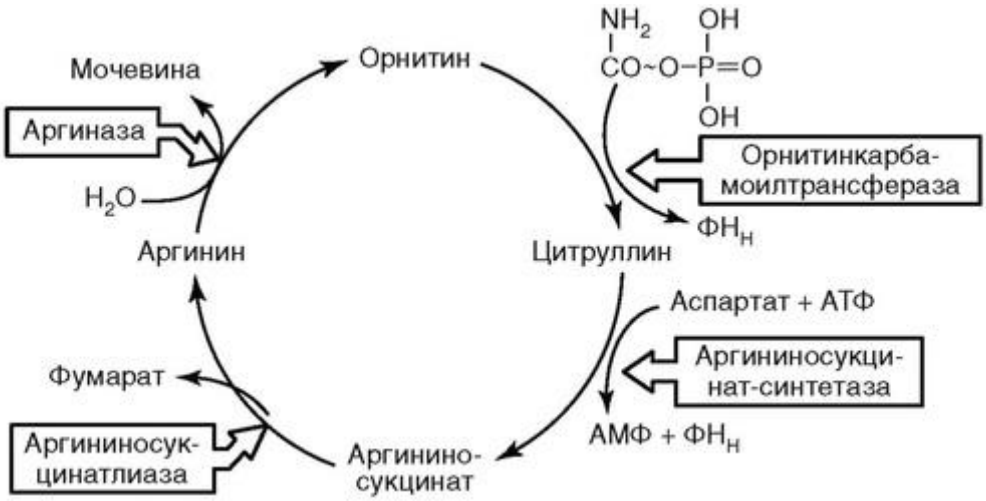


Рис. 2.10. Орнитиновый цикл образования мочевины Кребса

На последней стадии аргинин расщепляется на мочевину и орнитин под действием аргиназы.

Суммарная реакция синтеза мочевины без учета промежуточных продуктов:

$$CO_2 + NH_3 + 3ATP + 2OH_2 + АСПАРТАТ \longrightarrow$$

$$\longrightarrow H_2N\overset{\Uparrow}{\underset{O}{}}NH_2 + 2ADP + AMP + ФУМАРАТ + 2Pн + PPн$$

Данная реакция сопровождается снижением энергии Гиббса ($\Delta G^{0'}$ = -40 кДж), поэтому процесс всегда протекает в направлении синтеза мочевины.

Пирофосфат (PPн) в дальнейшем гидролизуется до фосфата, поэтому на образование одной молекулы мочевины расходуется в общей сложности четыре высокоэнергетические фосфатные связи.

Клинические аспекты азотистого обмена. Известно множество врожденных нарушений аминокислотного обмена (табл. 2.4).

Белковая недостаточность у человека развивается как при полном и частичном голодании, так и при приеме однообразного белкового питания, когда в диете преобладают белки растительного происхождения, биологическая ценность которых значительно ниже ценности белков животного происхождения. Результатом является развитие отрицательного азотистого баланса - гипопротеинемии (снижение концентрации белков в

сыворотке крови до 50-30 г/л; в норме - 65-85 г/л). При этом наблюдают нарушения коллоидно-осмотического и водно-солевого обмена (развитие голодных отеков).

Таблица 2.4. Врожденные болезни, связанные с нарушениями аминокислотного обмена

Болезнь	Затронутый фермент или процесс
Альбинизм	Тирозиназа
Алкаптонурия	Оксидаза гомогентизиновой кислоты
Аргининсукцинатацидемия	Аргининсукциназа
Цистиноз	Утилизация цистина
Цистинурия	Обмен серосодержащих аминокислот цистина, лизина и аргинина
Синдром Фанкони	Повышенное выделение аминокислот
Болезнь Гартнапа	Триптофанпирролаза
Гистидинемия	Гистидаза
Гомоцистинурия	Цистатионинсинтетаза
Изовалератацидемия	Изовалерил-КоА-дегидрогеназа
Лейциноз	Ферменты декарбоксилазы разветвленных α-кетокислот
Фенилкетонурия	Фенилаланингидроксилаза

Часто встречаются наследственные дефекты реабсорбции (всасывания) аминокислот в почках. В результате аминокислоты уходят из сыворотки крови в мочу, и развивается гипопротеинемия.

Одним из хорошо известных заболеваний считается цистиноз. Основной метаболический дефект связан с врожденным нарушением реабсорбции почти всех аминокислот. При цистинозе образования камней почти не происходит, в отличие от другого врожденного нарушения обмена - цистинурии, при которой всегда образуются цистиновые камни.

При другом наследственном пороке обмена - гепатоцеребральной дистрофии (болезни Вильсона),помимо общей гипераминоацидурии, отмечаются снижение концентрации медьсодержащего белка - церулоплазмина - в сыворотке крови и отложение меди в мозге, печени, почках. Возможно, свободная медь образует комплексы с аминокислотами, которые не всасываются в канальцах почек.

Следствием таких наследственных заболеваний является увеличение содержания в тканях нормальных промежуточных или побочных (неспецифических) продуктов обмена, оказывающих токсическое влияние на организм и в первую очередь на ЦНС.

Фенилкетонурия (фенилпировиноградная олигофрения) развивается как результат потери способности организма синтезировать фенилаланин-4-монооксигеназу, катализирующую превращение фенилаланина в тирозин.

Алкаптонурия характеризуется экскрецией с мочой больших количеств (до 0,5 г/сут) гомогентизиновой кислоты, окисление которой кислородом воздуха придает моче темную окраску.

Альбинизм характеризуется врожденным отсутствием пигментов в коже, волосах и сетчатке. Метаболический дефект связан с потерей меланоцитами способности синтезировать тирозиназу - фермент, катализирующий окисление тирозина в

диоксифенилаланин и диоксифенилаланинхинон, являющихся предшественниками меланина.

Болезнь Хартнупа характеризуется специфическими нарушениями обмена триптофана. Основным проявлением болезни, помимо пеллагроподобных кожных поражений, психических расстройств и атаксии, служит гипераминоацидурия. При этом с мочой выделяются повышенные количества индолилацетата, индолилацетилглутамина и индикана, но нормальные количества индолилмолочной кислоты. Очевидно, метаболический блок связан с первой реакцией нормального пути обмена триптофана, и обмен преимущественно идет по пути декарбоксилирования.

При другом наследственном пороке обмена триптофана - болезни «моча с запахом кленового сиропа» и при фенилкетонурии также экскретируется индолилацетат, но в этих случаях он имеет своим источником индолилпируват, так как параллельно с мочой выделяется в больших количествах индолилмолочная кислота, которая может образоваться только из фенилпирувата.

Таким образом, первичные нарушения обмена отдельных аминокислот обычно наступают вследствие блокирования действия какого-либо фермента.

Иммуноглобулины - белки-антитела. Они синтезируются под влиянием антигенов и специфически с ним реагируют.

2.4. МЕТАБОЛИЗМ И МЕТАБОЛИТЫ ЛИПИДОВ И ЖИРНЫХ КИСЛОТ

В основном жиры расходуются для поддержания нормальной температуры человеческого тела, а также на работу различных мышц. Даже когда человек ничего не делает (например, спит), ему каждый час требуется на покрытие энергетических расходов около 350 кДж энергии. Это затраты на так называемый основной обмен. Примерно такую мощность имеет электрическая 100-ваттная лампочка.

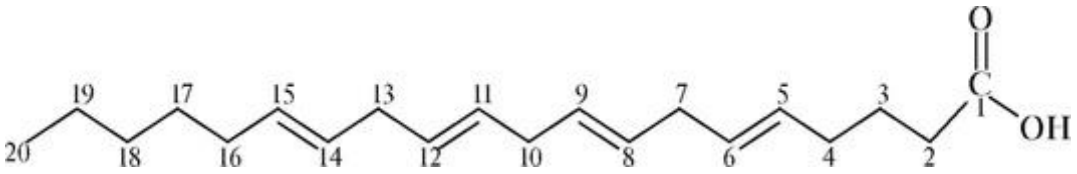
Для обеспечения организма энергией в неблагоприятных условиях в нем создаются жировые запасы, которые откладываются в подкожной клетчатке, в жировой складке брюшины - так называемом сальнике, ягодицах.

Для покрытия минимальной суточной потребности человека в энергии достаточно всего 50 г жира. Однако даже при умеренной физической нагрузке взрослый человек должен получать с продуктами питания гораздо больше жиров. Но их количество не должно превышать 100 г. Это количество дает треть энергетических расходов при диете, обеспечивающей около 1200 кДж.

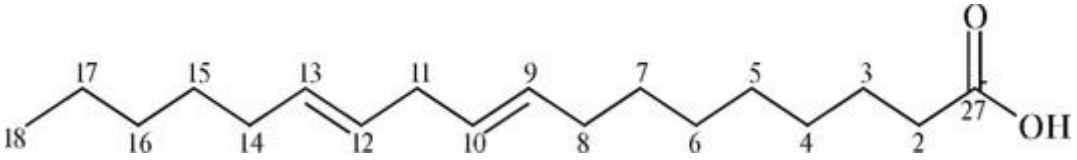
Несмотря на высокую энергоемкость жиров, получение из них энергии в организме - процесс медленный. Это связано с малой скоростью метаболизма углеводородных цепей липидов.

Углеводы, хотя и дают меньше энергии, чем жиры, выделяют ее намного быстрее. Именно поэтому перед физической нагрузкой, например перед спортивными состязаниями, предпочтительнее съесть сладкую, а не жирную пищу.

Значительную долю потребляемого жира должны составлять растительные масла. Из полиненасыщенных жирных кислот наибольшей активностью обладает арахидоновая кислота:



Наименьшей активностью обладает линоленовая кислота:



Жиры не только выполняют энергетическую функцию, но и играют важную структурную роль в организме.

Жиры входят в состав клеточных структур, в том числе мембран. Служат основой синтеза очень важных для организма соединений - простагландинов, которые принимают участие чуть ли не во всех биологических процессах. При отсутствии в пище жира нарушается деятельность центральной нервной системы, ослабляется иммунитет.

Запасенные в организме жиры могут служить также источником воды при ее дефиците.

Превращения липидов в пищеварительном тракте являются начальным этапом их обмена. На этом этапе происходят преобразование более сложных молекул липидов в менее сложные и последующее их всасывание слизистой оболочкой кишечника (рис. 2.11).

Начальная стадия переваривания жиров - гидролиз.

Гидролиз жира начинает идти уже в желудке под действием содержащейся в слюне фермента липазы (от греч. *lipos* - «жир»).

В желудочном соке содержится фермент, гидролизующий липиды, - липаза.

Из желудка жир периодически выбрасывается в тонкую кишку. Этот процесс регулируется продуктами гидролиза - моноглицеридами и жирными кислотами.

При наличии поверхностно-активных веществ кишечника жир дробится на мельчайшие капельки - хиломикроны (размер порядка 0,5 мкм), с которыми липаза легко взаимодействует. Ферментативный процесс осуществляется на границе раздела фаз «липид - вода». Затем пути превращения глицерина и жирных кислот расходятся.

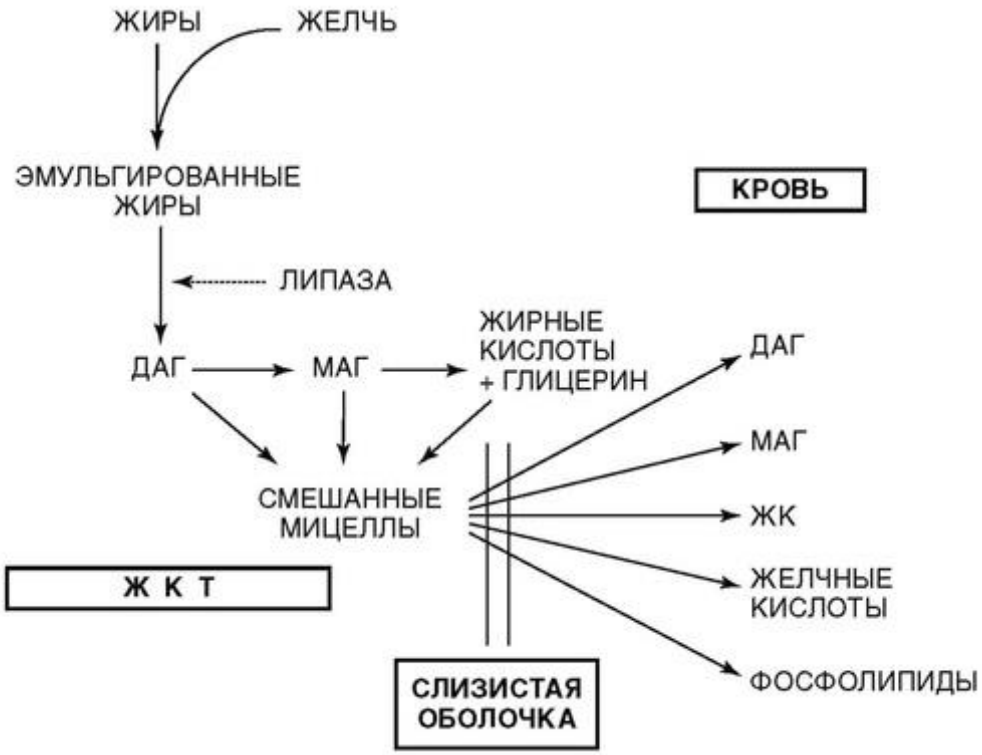


Рис. 2.11. Метаболическая сеть жиров. ДАГ, МАГ - диацил- и моноацилглицериды; ЖКТ - желудочно-кишечный тракт; ЖК - жирные кислоты

В двенадцатиперстной кишке соляная кислота химуса желудка нейтрализуется в основном бикарбонатами панкреатического сока и желчи.

Панкреатическая липаза, как и другие пищеварительные ферменты (пепсин, трипсин и химотрипсин), поступает в верхний отдел тонкой кишки в виде неактивной пролипазы. Превращение пролипазы в активную липазу происходит при участии желчных кислот и колипазы - белка панкреатического сока.

Гидролизу подвергаются только две эфирные связи в молекуле триацилглицерида (ТАГ). Центральная эфирная связь остается неизмененной. В результате образуются две молекулы жирных кислот и одна молекула моноацилглицерида (МАГ).

Далее продукты гидролиза - моноглицериды и жирные кислоты должны пройти через стенки клеток кишечника, чтобы потом попасть в кровь.

Мембраны клеток кишечника пропускают только водные растворы веществ, поэтому жирные кислоты, моноглицериды и желчные кислоты собираются в мицеллы размером менее 10 нм. В клетках кишечника продукты гидролиза взаимодействуют и образуют новые молекулы триглицеридов. Далее эти молекулы в форме жировых капелек переносятся потоком крови в различные части организма.

Всасывание продуктов расщепления липидов и небольшой части нерасщепленных жиров в эпителии кишечника начинается через 10-30 мин после приема пищи. Максимум накопления липидов в крови - через 4-6 ч, нормализация уровня липидов в крови - через 9 ч после приема пищи.

У позвоночных животных примерно половина энергии, которая потребляется клетками печени, почек, сердечных и скелетных мышц в состоянии покоя, получается за счет окисления жирных кислот, которые высвобождаются при гидролизе триглицеридов.

Жирные кислоты поступают в цитоплазму из внеклеточной жидкости или из липидных запасов самой клетки в липосомах.

Глицерин, образующийся при гидролизе, фосфорилируется через АТФ с образованием глицерофосфата, который включается в гликолиз. Затем глицерофосфат идет в основном на синтез новых молекул триглицеридов, но часть его окисляется с образованием диоксиацетонфосфата.

Жирные кислоты через ацетил-КоА подключаются в метаболическую сеть цикла Кребса (рис. 2.12).

Катаболизм (расщепление) жирных кислот. Катаболизм высших жирных кислот осуществляется преимущественно путем окисления.

Предельные (насыщенные) жирные кислоты окисляются ступенчато, путем отщепления от их молекул ацильных двууглеродных фрагментов (CH_3-cO-). Распад высших жирных кислот проходит в несколько стадий. Все стадии окисления ускоряются специфическими ферментами.

Окисление жирных кислот внутри митохондрий протекает через четыре последовательные стадии. В результате образуется укороченная на два углеродных атома молекула коэнзимной формы кислоты ацил-КоА и ацетил-КоА. Образовавшийся ацетил-КоА. включается в цикл трикарбоновых кислот. Укороченный на два углеродных атома ацил-КоА снова проходит весь путь β-окисления вплоть до образования 4-углеродного соединения бутирил-КоА, который затем окисляется до двух молекул ацетил-КоА, которые также включаются в цикл трикарбоновых кислот. На этой стадии катаболизм жирной кислоты завершается.

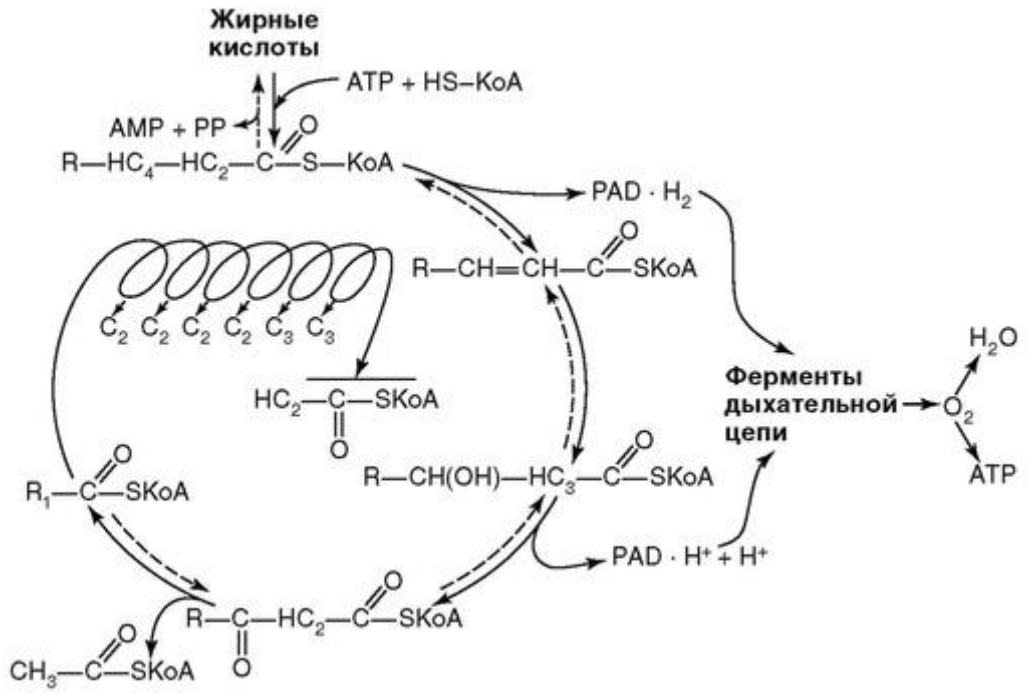


Рис. 2.12. Подключение жирных кислот в метаболическую сеть цикла Кребса

Окисление ненасыщенных жирных кислот в принципе происходит так же, как и окисление насыщенных, поскольку ненасыщенные жирные кислоты предварительно восстанавливаются до предельных кислот.

Биосинтез (анаболизм) жирных кислот. В биосинтезе липидов *de novo* (липогенезе) используются значительная часть жирных кислот, моноглицеридов и глицерин, высвобождающиеся при гидролизе жиров, поступающих с пищей. Это связано с тем, что липиды каждого организма, как и белки, углеводы, имеют индивидуальный состав и строение.

Митохондриальная система биосинтеза жирных кислот осуществляет только удлинение существующих в организме среднецепочечных жирных кислот.

Полный биосинтез пальмитиновой кислоты из ацетил-КоА протекает вне митохондрий в цитозоле по другому пути с участием НАДФН, АТФ, ионов Mn^{2+} и HCO_3^-. Субстратом является ацетил-КоА, конечным продуктом - пальмитиновая кислота.

Ферментные системы, осуществляющие синтез жирных кислот, называются жирнокислотными синтетазами, которые делятся на две группы: полиферментные (животные ткани и дрожжи) и жирнокислотные (микроорганизмы и растения) синтетазы.

Последовательность реакций, происходящих при синтезе жирных кислот, состоит из шести циклически повторяющихся стадий.

Суммарное уравнение анаболизма жирных кислот можно представить в виде:

$$\underset{\text{Ацетил-КоА}}{8CH_3{-}CO{-}S\text{-КоА}} + 7АТФ + 14НАДФН + 14H^+ +$$

$$+ \underset{\text{пальмитиновая кислота}}{CH_3{-}(CH_2)_{14}{-}COOH} + 14НАДФ^+ + 8HS\text{-КоА} + 7АДФ + 7H_3PO_4 +$$

$$+ 6H_2O.$$

Наиболее распространенные мононенасыщенные жирных кислоты - пальмитоолеиновая и олеиновая - синтезируются из пальмитиновой и стеариновой кислот. Этот синтез протекает в микросомах клеток печени и жировой ткани при участии молекулярного кислорода. Ферменты, участвующие в превращении насыщенных жирные кислот в ненасыщенные, называют десатуразами.

Наряду с десатурацией жирных кислот в микросомах происходит и их удлинение (элонгация), причем оба эти процесса могут сочетаться и повторяться.

В организме млекопитающих, в том числе и человека, не могут образоваться, например, из стеариновой кислоты линолевая и линоленовая кислоты. Эти кислоты относятся к категории незаменимых жирных кислот.

К незаменимым жирным кислотам обычно относят также арахидоновую кислоту.

Триглицериды синтезируются (ресинтез) из глицерина и жирных кислот (главным образом).

Протекание того или иного пути ресинтеза триглицерида зависит от состава продуктов расщепления пищевых липидов, поступивших в кишечную стенку.

Эпителиальные клетки кишечника способны синтезировать фосфолипиды из поступающих из пищи свободных жирных кислот, глицерина и аминоспиртов.

В жировой ткани и мышцах вследствие очень низкой активности глицеролкиназы образование глицерол-3-фосфата в основном связано с процессами гликолиза и гликогенолиза.

Биосинтез (анаболизм) фосфолипидов. Интенсивный биосинтез фосфолипидов происходит в печени, стенке кишечника, семенниках, яичниках, молочной железе и других тканях. Наиболее важные фосфолипиды синтезируются главным образом в эндоплазматической сети клетки.

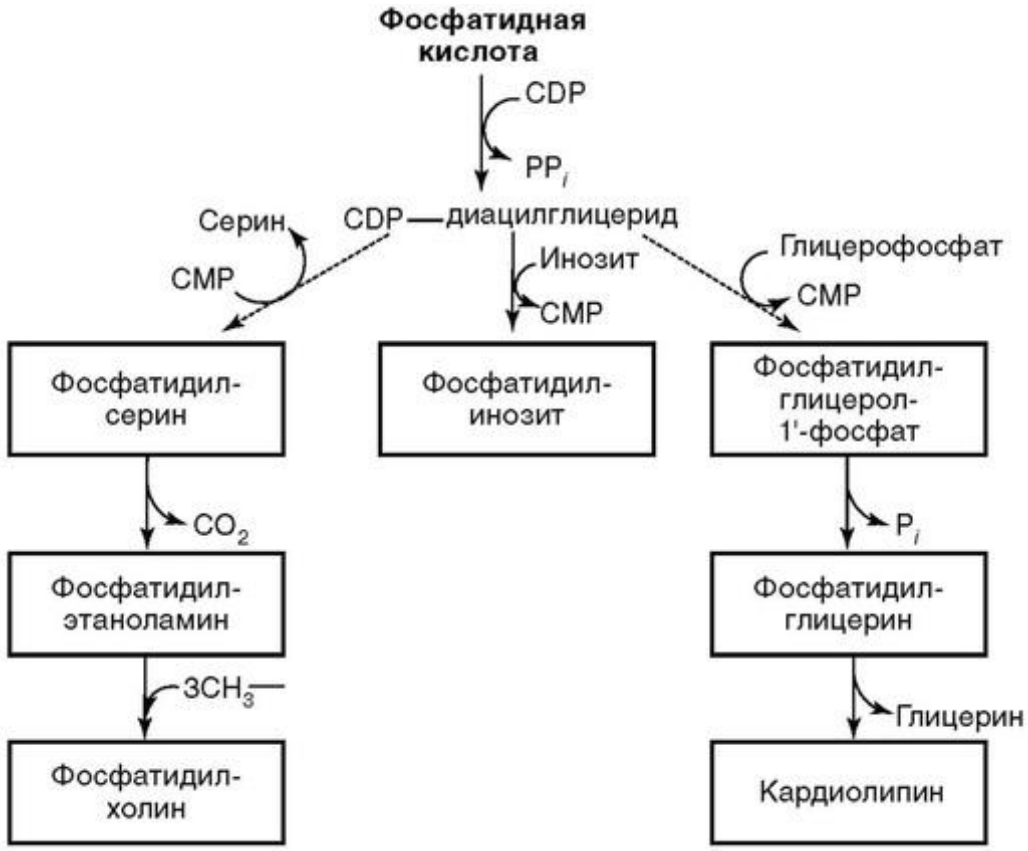
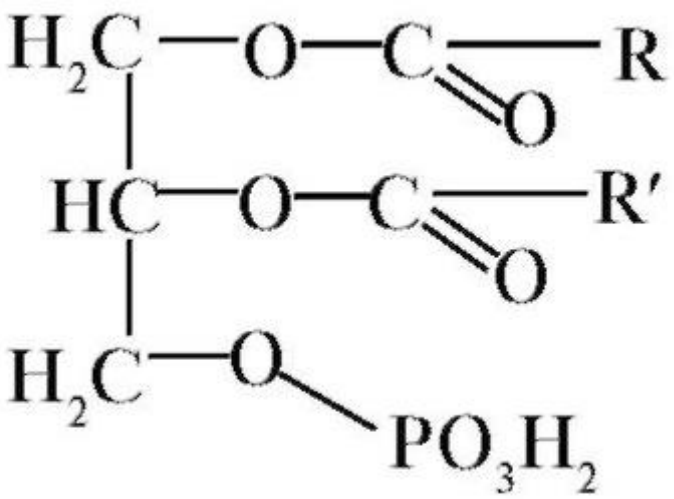


Рис. 2.13. Метаболическая сеть биосинтеза фосфоглицеридов. CMP, CDP, CTP цитидил моно-, ди- и трифосфат

Центральную роль в биосинтезе фосфолипидов играют 1,2-диглицериды, фосфатидная кислота и сфингозин. Цитидинтрифосфат (CTP) участвует в синтезе практически всех фосфолипидов.

В качестве примера на рис. 2.13 рассмотрен синтез отдельных представителей фосфолипидов.

Биосинтез фосфоглицеридов. Наиболее важные фосфоглицериды являются компонентами мембран, а также липопротеинов, выполняющих транспортную функцию. Эти фосфоглицериды образуются по разветвленному метаболическому пути, начинающемуся с фосфатидной кислоты:



Реакции сетей биосинтеза фосфоглицеридов локализованы главным образом в эндоплазме.

Продуктами этих реакций являются фосфатидилмонометилэтаноламин, фосфатидилдиметилэтаноламин и фосфатидилхолин (лецитин). Образование фосфатидилхолина из фосфатидилдиметилэтаноламина описывается уравнением:

фосфатидилдиметилэтаноламин + S-аденозилметионин → фосфатидилхолин + S-аденозилгомоцистеин

При этом фосфатидилхолин синтезируется в результате последовательного переноса трех метильных групп от трех молекул S-аденозилметионина к аминогруппе остатка этаноламина.

Существует еще один путь синтеза фосфатидилхолина в клетках животных. В этом случае, как и при синтезе фосфатидилэтаноламина, используется цитидилтрифосфат в качестве переносчика, но уже не фосфоэтаноламина, а фосфохолина, в результате чего образуется фосфатидилхолин:

CDP-холин + 1,2-диглицерид → фосфатидилхолин + CMP.

Фосфатидилсерин у млекопитающих образуется в реакции обмена этаноламина на серин следующим путем (с участием ионов Ca^{2+}):

фосфатидилэтаноламин + L-серин → фосфатидилсерин + этаноламин.

Существует и второй путь образования фосфатидилсерина, который связан с предварительным вовлечением фосфатидной кислоты в синтез фосфоглицеридов. Происходит перенос серина на фосфатидильный остаток с образованием фосфатидилсерина:

CDP-диглицерид + L-серин → фосфатидилсерин + CMP.

Таким же путем образуется фосфатидилинозитол. Сфингомиелин синтезируется в результате взаимодействия церамида с CDP-холином. Интермедиатом в биосинтезе сфингомиелина является церамид (N-ацилсфингозин), который образуется при взаимодействии сфингозина с ацил-КоА:

сфингозин + ацил-КоА → церамид + CDP-холин → сфингомиелин.

В клетках печени, мозга, половых желез, коры надпочечников и других органов постоянно синтезируется холестерин в количестве 0,8-1,5 г в сутки. В организме холестерин подвергается разнообразным превращениям и служит источником важнейших соединений (гормонов, витаминов $Д_3$, желчных кислот).

Биосинтез холестерина. Метаболический путь ферментативного синтеза холестерина насчитывает более 35 энзиматических реакций. На этом пути можно выделить три основные стадии (рис. 2.14).

• Превращение активного ацетата кофермента (CH_3-CO-S-КоА) в мевалоновую кислоту ($C_6H_{12}O_4$).

• Образование из мевалоновой кислоты сквалена - тритерпеноида ($C_{30}H_{50}$).

• Циклизация сквалена в холестерин - тетрациклический липид (не глицерид).

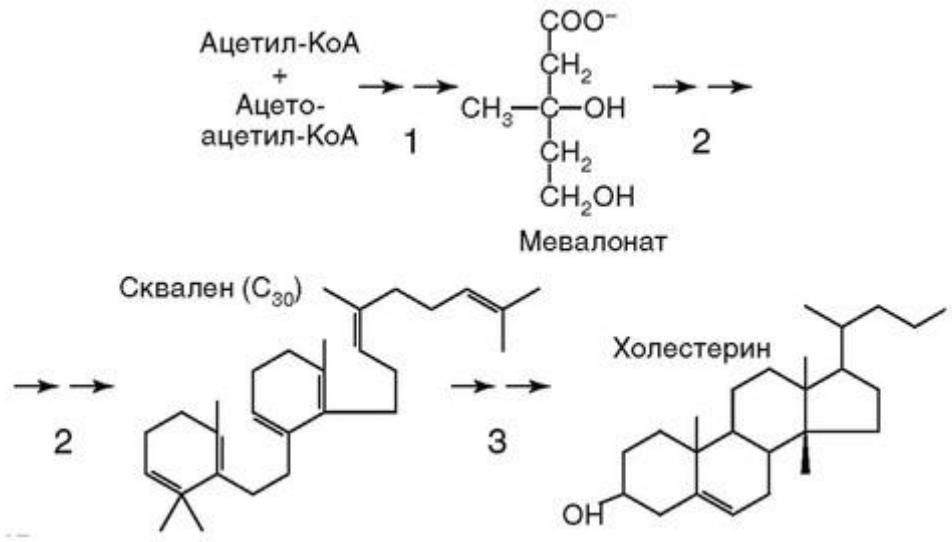


Рис. 2.14. Метаболический путь биосинтеза холестерина

Холестерин выполняет в организме структурную функцию - входит в качестве компонента в состав клеточных мембран и метаболическую - служит предшественником при синтезе стероидов: желчных кислот, стероидных гормонов, витамина D_3.

Источниками холестерина в тонкой кишке являются пища (0,3-0,5 г в сутки, у вегетарианцев значительно меньше), желчь (с желчью в тонкую кишку выделяется 1-2 г в сутки эндогенного холестерина), слущенный эпителий желудочно-кишечного тракта и кишечные соки (до 0,5 г в сутки).

Восстановление и окисление холестерина происходят в толстой кишке под воздействием ферментов микрофлоры. Основная часть холестерина в свободной форме подвергается всасыванию в тонкой кишке в составе смешанных жировых мицелл.

Реакцией, регулирующей скорость биосинтеза холестерина в целом, является восстановление р-гидроокиси-р-метилглутарил-КоА в мевалоновую кислоту, катализируемое ГМГ-КоА-редуктазой. Данный фермент испытывает регуляторное воздействие ряда факторов. В частности, скорость синтеза редуктазы в печени подвержена четким суточным колебаниям: максимум ее приходится на полночь, а минимум - на утренние часы.

Гормональная регуляция метаболизма триацилглицеридов. Кроме аллостерической регуляции коферментами, существует гормональный контроль за активностью *ацетил-КоА-карбоксилазы.*

Адреналин и глюкагон путем увеличения концентрации cAMP и активности протеинкиназы активируют фосфорилирование ацетил-КоА-карбоксилазы и переводят ее в неактивное состояние. Эти гормоны также путем фосфорилирования переводят липазу в жировой ткани в активное состояние.

Следовательно, синтез жирных кислот прекращается и начинаются мобилизация триацилглицеринов, окисление жирных кислот и синтез кетоновых тел, то есть включаются процессы, которые поставляют клеткам энергодативные вещества.

Процессы обмена жира в организме регулируются также нейрогормональным путем.

Например, инсулин усиливает биосинтез жирных кислот, превращение углеводов в жиры и подавляет процесс β-окисления. Адреналин, тироксин и гормон роста активируют распад (липолиз) жира. Снижение выработки гормонов гипофиза и половых гормонов приводит к стимуляции процессов синтеза жиров и торможению липолиза, в результате чего происходит ожирение организма.

Переключение процессов синтеза жирных кислот на их окисление происходит при смене периода пищеварения на период распределения продуктов расщепления пищи по тканям и осуществляется с помощью регуляторных механизмов.

Нарушения, обусловленные недостатком поступления незаменимых жирных кислот с пищей, наблюдаются у больных, жизнедеятельность которых в течение длительного времени поддерживается только за счет внутривенного питания, почти лишенного жирных кислот. Принято считать, что во избежание этих нарушений необходимо, чтобы на долю незаменимых жирных кислот приходилось не менее 1-2% общей потребности в калориях. Следует отметить, что незаменимые жирные кислоты содержатся в достаточно больших количествах в растительных маслах.

Нарушения обмена липидов имеют различную природу.

• Недостаточное поступление жира с пищей, являющееся основным в развитии разнообразных повреждений обменных процессов, а также причиной развития авитаминозов жирорастворимых витаминов (поскольку для их всасывания необходим жир), и снижения против нормы количества ненасыщенных жирных кислот, которые, как известно, не синтезируются в организме.

• Нарушение процессов переваривания и всасывания липидов, связанное с недостаточной выработкой липолитических ферментов в пищеварительном тракте и секрецией желчи. Это нарушение приводит к выделению нерасщепившегося жира с калом, который приобретает характерный серовато-белый цвет (ахолический стул).

• Недостаток в организме липотропных веществ типа холина, метионина, витамина F, которые предохраняют печень от повышенного отложения жира (жировой инфильтрации) путем участия в синтезе фосфолипидов.

• Кетонурия и кетонемия (ацетонурия и ацетонемия) проявляются повышенным накоплением в крови мочи кетоновых тел, к которым относятся нормальные конечные продукты распада жирных кислот: ацетон, ацетоуксусная и гидроксимасляная кислоты. Избыток ацетоновых тел наблюдается в случаях сахарного диабета и голодания.

• Ожирение характеризуется повышенным отложением жира во всем организме. Проблема ожирения - проблема долголетия, так как люди с избыточной массой тела живут в среднем на 7 лет меньше, чем люди, имеющие нормальную для своего возраста и рода деятельности массу тела. Наряду с этим смертность среди ожиревших в 3-4 раза выше в случае сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета и рака.

Значительный интерес представляют нарушения обмена холестерина в связи с заболеваниями, возникающими на этой почве. Хроническая гиперхолестеринемия приводит к атеросклерозу. Обмен холестерина тесно связан с липопротеинами.

Различают несколько классов липопротеинов (табл. 2.7): α-липопротеины, или липопротеины высокой плотности (ЛПВП): β-липопротеины, или липопротеины низкой плотности (ЛПНП); пре-β-липопротеины, или липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП); хиломикроны (ХМ).

Таблица 2.7. Классы липопротеинов

Класс	Размер, нм	Физиологическая функция
Липопротеины высокой плотности	8-11	Транспорт холестерина от периферийных тканей к печени
Липопротеины низкой плотности	18-26	Транспорт холестерина, триацилглицеридов и фосфолипидов от печени к периферийным тканям
Липопротеины очень низкой плотности	30-80	Транспорт холестерина, триацилглицеридов и фосфолипидов от печени к периферийным тканям
Хиломикроны	75-1200	Транспорт холестерина и жирных кислот пищи из кишечника в периферические ткани и печень

Липопротеины (липопротеиды) представляют собой комплексы, состоящие из белков - аполипопротеинов (апо-ЛП) и липидов, связь между которыми осуществляется посредством гидрофобных и электростатических взаимодействий. В составе липопротеинов могут быть свободные жирные кислоты, нейтральные жиры, фосфолипиды, холестериды.

Липопротеины подразделяют на свободные, или растворимые в воде (липопротеины плазмы крови, молока), и нерастворимые в воде структурные липопротеины клеточных мембран, миелиновой оболочки нервных волокон.

Наиболее изучены свободные липопротеины плазмы крови, которые классифицируют по их плотности. Чем выше содержание липидов в липопротеине, тем ниже его плотность.

Все липопротеины плазмы содержат в разных соотношениях полярные и неполярные липиды.

Липопротеины высокой плотности (ЛПВП, ЛВП; *High-Density Lipoproteins* - HDL) обладают максимальной среди липопротеинов плотностью из-за высокого уровня белка относительно липидов. Частицы ЛПВП - наиболее мелкие среди липопротеинов, 8-11 нм в диаметре.

Липопротеины высокой плотности обладают антиатерогенными свойствами. Высокая концентрация ЛПВП в плазме крови существенно снижает риск атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний.

Именно поэтому холестерин ЛПВП иногда называют хорошим холестерином (альфа-холестерином), в отличие от плохого холестерина липопротеинов низкой плотности, который, наоборот, увеличивает риск развития атеросклероза.

Липопротеины низкой плотности (ЛПНП, ЛНП; *Low Density Lipoprotein* - LDL) - класс липопротеинов, являющийся наиболее атерогенным. ЛПНП образуются из липопротеинов очень низкой плотности в процессе липолиза. ЛПНП являются одним из основных переносчиков холестерина в крови.

Липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП, ЛОНП; *Very Low Density Lipoprotein* - VLDL) образуются в печени из липидов и аполипопротеинов. После поступления в кровь они подвергаются частичному гидролизу и превращаются в липопротеины низкой плотности.

ЛОНП переносят триацилглицеролы, а также фосфолипиды, холестерин и его эфиры из печени в другие ткани. Метаболизм ЛОНП схож с метаболизмом хиломикронов, но интегральным белком в этом случае является другой апопротеин - B-100. ЛОНП высвобождаются из клеток печени обратным пиноцитозом, после чего через слой эпителиальных клеток поступают в капилляры печени. В крови на частицы ЛОНП из частиц ЛВП переносятся апопротеины C2 и E.

Триацилглицеролы ЛОНП, как и в хиломикронах, гидролизуются при активации ЛПЛ с помощью апопротеина C2. Образующиеся жирные кислоты поступают в ткани. В результате гидролиза триацилглицеролов диаметр частиц ЛОНП уменьшается, и они превращаются в ЛПП.

Половина ЛПП поглощается печенью с помощью рецепторного эндоцитоза через рецепторы апопротеина E и B-100. Триацилглицериды ЛПП гидролизуются печеночной липазой. Апопротеины C2 и E возвращаются на ЛВП и частица превращается в ЛНП. Относительное содержание холестерина в ЛНП значительно увеличивается, и размер частицы уменьшается.

В составе липопротеинов апобелки, являясь амфифильными веществами, выполняют функцию стабилизаторов частиц липопротеинов. Некоторые аполипопротеины обладают ферментативной активностью и могут регулировать ферментативную активность липидного обмена. Аполипопротеины могут выступать в качестве лигандов клеточных

рецепторов для липопротеинов и могут осуществлять транспорт липидов из одного липопротеина в другой.

ЛВП синтезируются в печени и обеспечивают обратный транспорт холестерина из внепеченочных тканей к печени. В новообразованных ЛВП содержатся апопротеины А1 и А2. Апопротеин А1 синтезируется также в кишечнике, где входит в состав хиломикронов. Апопротеин С синтезируется в печени, выделяется в кровоток и уже в кровотоке переносится на ЛВП. Новообразованный ЛВП представляет собой фосфолипидный дискообразный бислой, включающий свободный холестерин и апопротеин А1. Апопротеин А1 - активатор фермента лецитинхолестеринацилтрансферазы (ЛХАТ). Этот фермент связан с поверхностью ЛВП в плазме крови. ЛХАТ катализирует реакцию между фосфолипидом ЛВП и свободным холестерином частицы. При этом образуются эфиры холестерина и лизолецитин.

Неполярные молекулы эфиров холестерина переходят внутрь частицы, и к ее поверхности присоединяются новые молекулы холестерина. В результате частица ЛВП приобретает сферическую форму.

Хиломикроны *(chylomicron)* - крупные мицеллярные частицы размером от 75 нм до 1,2 мкм, образующиеся в клетках тонкой кишки при всасывании липидов пищи из желудка (рис. 2.15). Из кишечника хиломикроны секретируются в лимфатические сосуды, после чего они попадают в кровь.

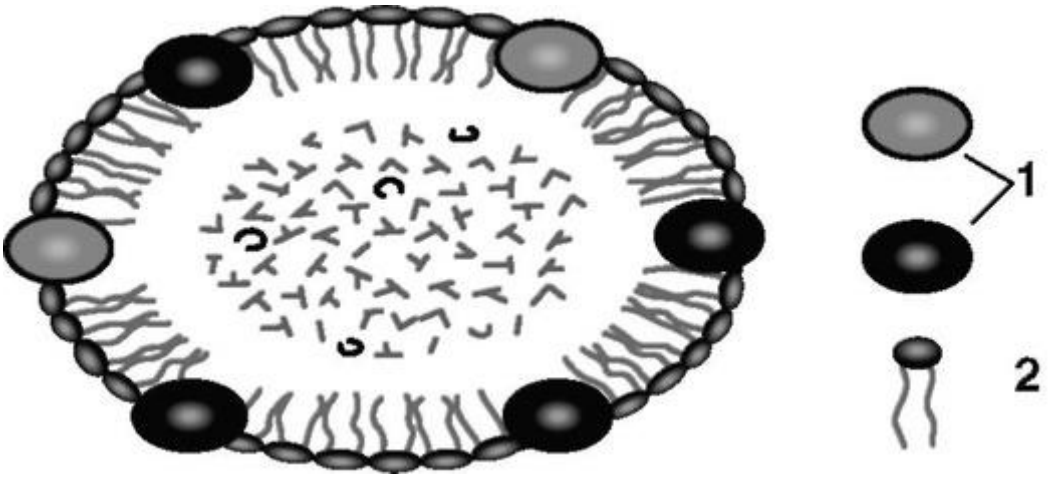


Рис. 2.15. Строение и состав хиломикрона: 1 - молекулы аполипидов; 2 - молекулы фосфолипидов

Хиломикроны состоят на 85% из триглицеридов. Кроме триглицеридов, хиломикроны содержат также холестерин и его эфиры. Единственным белком в составе хиломикронов является аполипопротеин В-48. Этот белок входит в поверхностный слой мицеллы хиломикрона и обеспечивает стабильность мицеллярной частицы при циркуляции.

Хиломикроны обеспечивают транспорт пищевых липидов из кишечника в печень по следующей схеме.

При циркуляции в лимфе, а затем в крови на формирующиеся хиломикроны из липопротеинов высокой плотности переносятся аполипо-протеины С-II и С-Е. После этого зрелые хиломикроны подвергаются липолизу в печени под действием липопротеинлипазы, находящейся на стенке внепеченочных сосудов. Образующиеся при этом жирные кислоты

проступают в жировую, мышечную и другие ткани. Размер частиц хиломикрона уменьшается, остаток хиломикрона быстро поглощается печенью и полностью распадается.

Хиломикроны переносят до половины всех триацилглицеролов и холестерина лимфы.

Установлено, что атеросклероз и связанные с ним заболевания протекают при значительном повышении содержания в плазме крови фракции ЛПНП, а во многих случаях и фракции ЛПОНП.

Исследования показали, что сами по себе нативные ЛПНП и ЛПОНП аллергенностью не обладают. Атерогенность у этих классов липопротеинов появляется только тогда, когда их частицы подвергнутся химическому изменению и прежде всего перекисному окислению. При этом сначала в их составе образуются такие продукты перекисного окисления липидов, как диеновые и триеновые конъюгаты, гидроперекиси, малоновый диальдегид и др., а затем уже происходит взаимодействие с белковыми компонентами - аполипопротеинами. Образуются химически измененные липопротеины, которые называют перекисномодифицированными.

Перекисная модификация липопротеинов может в определенной степени протекать в кровеносном русле, но главным местом их образования является артериальная стенка.

В отличие от липопротеинов низкой и очень низкой плотности, ЛПВП рассматриваются как антиатерогенные. Они осуществляют обратный транспорт холестерина - от периферических тканей в печень, где холестерин окисляется в желчные кислоты. Кроме того, ЛПВП обладают еще одним важным свойством: они задерживают перекисную модификацию липопротеинов низкой и очень низкой плотности. Именно поэтому чем выше уровень ЛПВП в крови, тем меньше вероятность развития атеросклероза.

2.5. МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕОТИДОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Метаболизм рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов - основа всех форм жизни. Эти биомолекулы служат прямыми предшественниками нуклеиновых кислот РНК и ДНК, а также нуклеотидных коферментов.

Мононуклеотиды синтезируются в цитоплазме.

Синтез индивидуальных нуклеиновых кислот представляет собой соединение мононуклеотидов Nu_1, Nu_2 , Nu_3 и так далее в полинуклеотидную цепь в генетически заданной последовательности:

$Nu_1 + Nu_2 > Nu_1 - Nu_2 + H_2O$;

$Nu_1 - Nu_2 + Nu_3 > Nu_1 - Nu_2 - Nu_3 + H_2O$ и т.д.

Полинуклеотидные цепи нуклеиновых кислот могут состоять из сотен тысяч нуклеотидов.

Для метаболических путей биосинтеза мононуклеотидов характерно то, что они находятся под непосредственным контролем аллостериче-ских регулирующих агентов.

Четыре рибонуклеотида - аденозинмонофосфат (AMP), цитозинмонофосфат (CMP), гуанозинмонофосфат (GMP), урацилмонофосфат (UMP) и четыре дезоксирибонуклеотида - dAMP, dCMP, dGMP, dUMP соединяются в РНК и ДНК клеток в строго определенных соотношениях, различных для разных биологических видов.

Катаболизм (расщепление) нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Мононуклеотиды постоянно образуются в клетке в результате гидролиза нуклеиновых кислот, имеющихся в организме, а также поступающих с пищей:

$Nu_1 - Nu_2 - Nu_3 - + H_2O - Nu_1 - Nu_2 - + Nu_3$

$Nu_1 - Nu_2 + H_2O - Nu_1 + Nu_2$.

Свободные нуклеотиды идут на синтез новых нуклеиновых кислот или подвергаются дальнейшему распаду.

Метаболический путь распада пуриновых нуклеотидов на примере аденозина приведен на рис. 2.16.

Распад пуриновых нуклеотидов начинается с отщепления фосфатной группы под действием фермента нуклеотидазы. Из аденилата таким путем образуется аденозин, затем начинается метаболический путь распада из семи последовательных реакций.

В организме человека, приматов, большинства животных, птиц и некоторых рептилий конечным продуктом пуринового обмена является мочевая кислота, которая выводится из организма с мочой.

У других рептилий и некоторых млекопитающих мочевая кислота расщепляется в последующих трех реакциях (5-7) до аллантоина, а у рыб - до аллантоиновой кислоты и мочевины.

На рис. 2.17 на примере цитидина приведен метаболический путь распада пиримидиновых нуклеотидов. Он представляет собой последовательность из пяти реакций гидролиза.

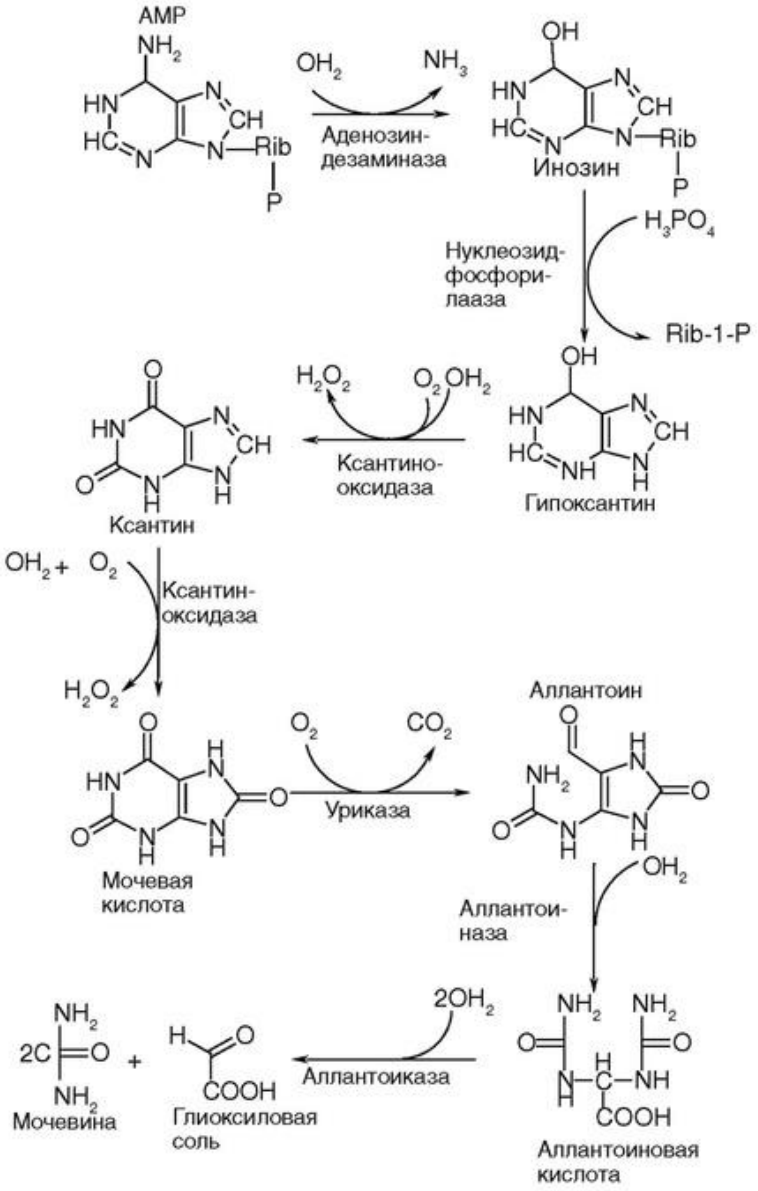


Рис. 2.16. Метаболический путь распада пуриновых нуклеотидов на примере аденозина

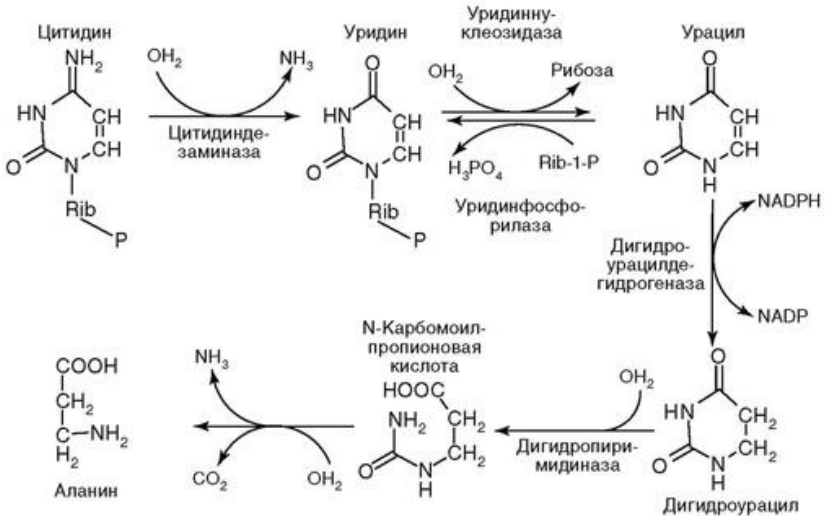


Рис. 2.17. Метаболический путь распада пиримидиновых нуклеотидов на примере цитидина

Конечными продуктами реакции распада пиримидиновых оснований являются CO_2, NH_3, мочевина, аланин, аминоизомасляная (карбоноилпропионовая) кислота.

Гидролитический путь распада пиримидинов является главным путем образования аланина. В тканях животных аланин подвергается дальнейшему распаду путем трансаминирования до пировиноградной кислоты под воздействием катализирующей реакцию специфической аминотрансферазы.

Биосинтез (анаболизм) рибонуклеотидов. Рибонуклеотиды и дезоксирибонуклеотиды являются мономерными единицами ДНК.

Синтез ДНК и РНК происходит в митохондриях: репликация ДНК, то есть синтез идентичных копий-реплик, и транскрипция - «переписывание» информации с ДНК путем синтеза информационной или матричной РНК (тРНК).

Матричная РНК является матрицей для биосинтеза белка. Еще один вид РНК называется транспортной (tРНК). Она осуществляет транспорт аминокислот из цитоплазмы к месту биосинтеза белка в рибосомах. Рибосомальная РНК (rРНК) входит в состав рибосом и имеет больший вариабельный состав, чем матричная или транспортная, контролирует биосинтез белка.

Синтез нуклеиновых кислот определяется скоростью синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Синтез нуклеотидов зависит, в свою очередь, от наличия всех составляющих их компонентов - рибозы, фосфорной кислоты, оснований.

Биосинтез пуриновых рибонуклеотидов аденозинмонофосфата (аденилата) и гуанозинмонофосфата (гуанилата) начинается с рибозо-5-фосфата, на котором последовательно, в несколько стадий, образуется 5-фосфо-D-рибозиламин.

Следующие стадии начинаются с присоединения глицина к 5-фосфо-D-рибозиламину и заканчиваются замыканием имидазольного кольца пуринового ядра и образованием инозиновой кислоты (рис. 2.18).

При этих реакциях азот аспарагиновой кислоты включается в первое положение будущего пуринового ядра. Последний углеродный атом кольца пурина присоединяется к 5-NH-группе в виде формильного остатка (источник - N-формилтетрагидрофолиевая кислота). Затем происходит замыкание второго кольца при отщеплении молекулы воды. На этом заканчивается образование предшественника пуриновых нуклеотидов - инозинмонофосфата (IMP) (инозиновой кислоты).

Для превращения инозиновой кислоты в адениловую (AMP) необходимо введение еще одной аминогруппы, донором которой также является аспарагиновая кислота.

Источником энергии служит GTP. Промежуточным продуктом реакции служит аденилоянтарная кислота.

Превращение AMP и GMP в нуклеозидди- и трифосфаты протекает в две стадии при участии нуклеозидмонофосфаткиназы и нуклеозиддифосфаткиназы:

$$GMP + ATP \rightleftharpoons GDP + ADP$$

$$GDP + ATP \rightleftharpoons GTP + ADP$$

Биосинтез пиримидиновых рибонуклеотидов. Пиримидиновые рибонуклеотиды - это цитидин-5-монофосфат (CMP), или цитидилат, и уридин-5-монофосфат (UMP), или уридилат.

Биосинтез пиримидиновых рибонуклеотидов отличается от синтеза пуриновых тем, что в случае пиримидинов образуется сначала шестичленное пиримидиновое кольцо, а затем к нему присоединяется рибозофосфат.

Последовательность химических реакций синтеза на примере UMP приведена на рис. 2.19.

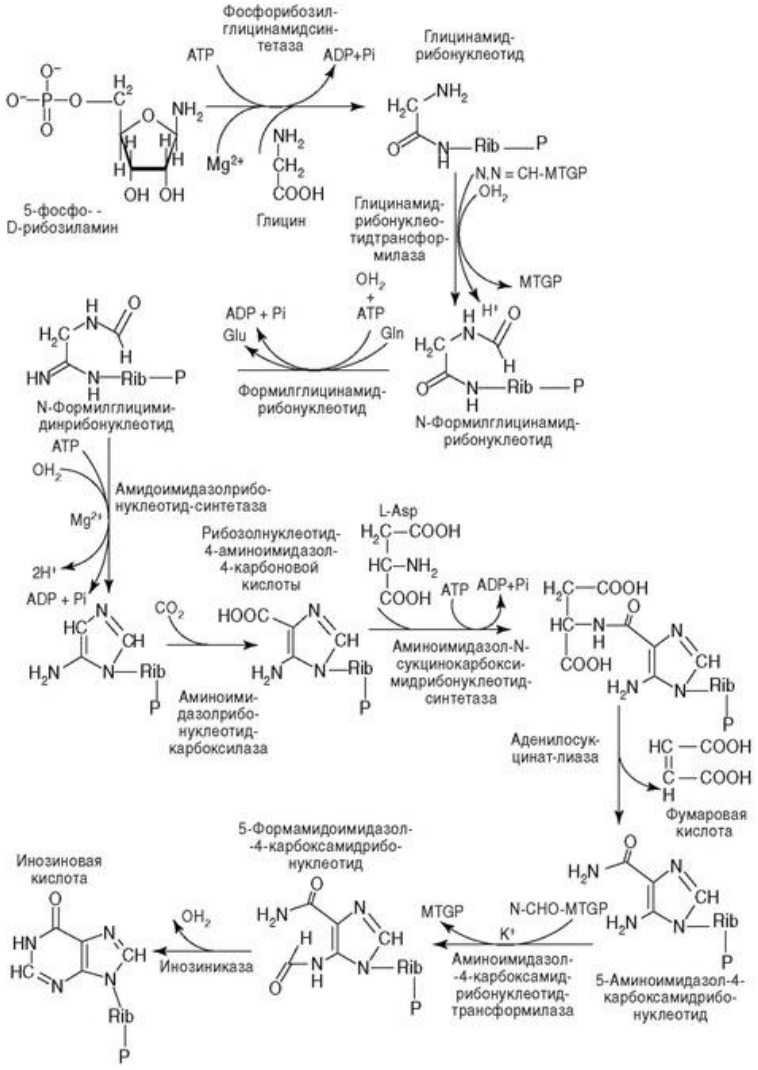


Рис. 2.18. Метаболический путь превращения 5-фосфо-D-рибозиламина в инозиновую кислоту

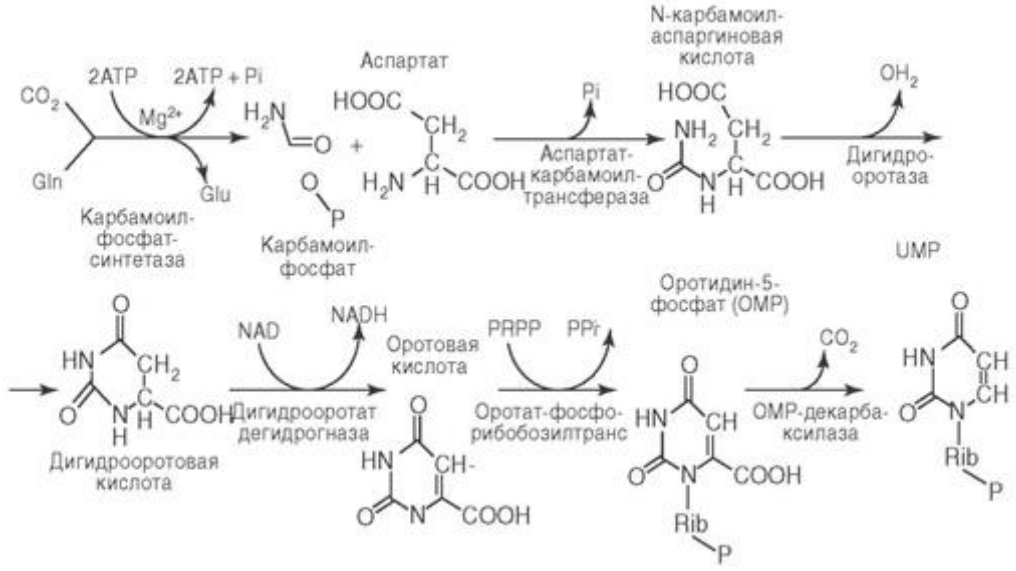


Рис. 2.19. Метаболический путь превращения глутамина в пиримидиновый рибонуклеотид UMP

Превращение UMP в UDP и UTP осуществляется, как и в случае пуриновых нуклеотидов, путем фосфорилирования:

$$UMP + ATP \rightleftharpoons UDP + ADP$$

$$UDP + ATP \rightleftharpoons UTP + ADP$$

Предшественником цитидиловых нуклеотидов является UTP, который преобразуется в CTP:

$$UTP + ATP + Gln \rightleftharpoons CTP + Glu + ADP + Pi$$

У прокариот в этой реакции используется свободный аммиак, а в клетках животных CTP-синтетаза катализирует включение амидной группы глутамина в четвертое положение пиримидинового кольца UTP.

Скорость биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов регулируется аспартаттранскарбамоилазой (АТКазой), которая катализирует первую реакцию этого метаболического пути. АТКаза ингибируется конечным продуктом данной последовательности реакций - CTP.

Дезоксирибонуклеотиды dADP, dGDP, dCDP, dUDP образуются путем восстановления из рибонуклеотидов ADP, GDP, CDP, UDP.

На рис. 2.20 превращения рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды показаны па примере нуклеотидов - производных аденина (АДФ > dАДФ).

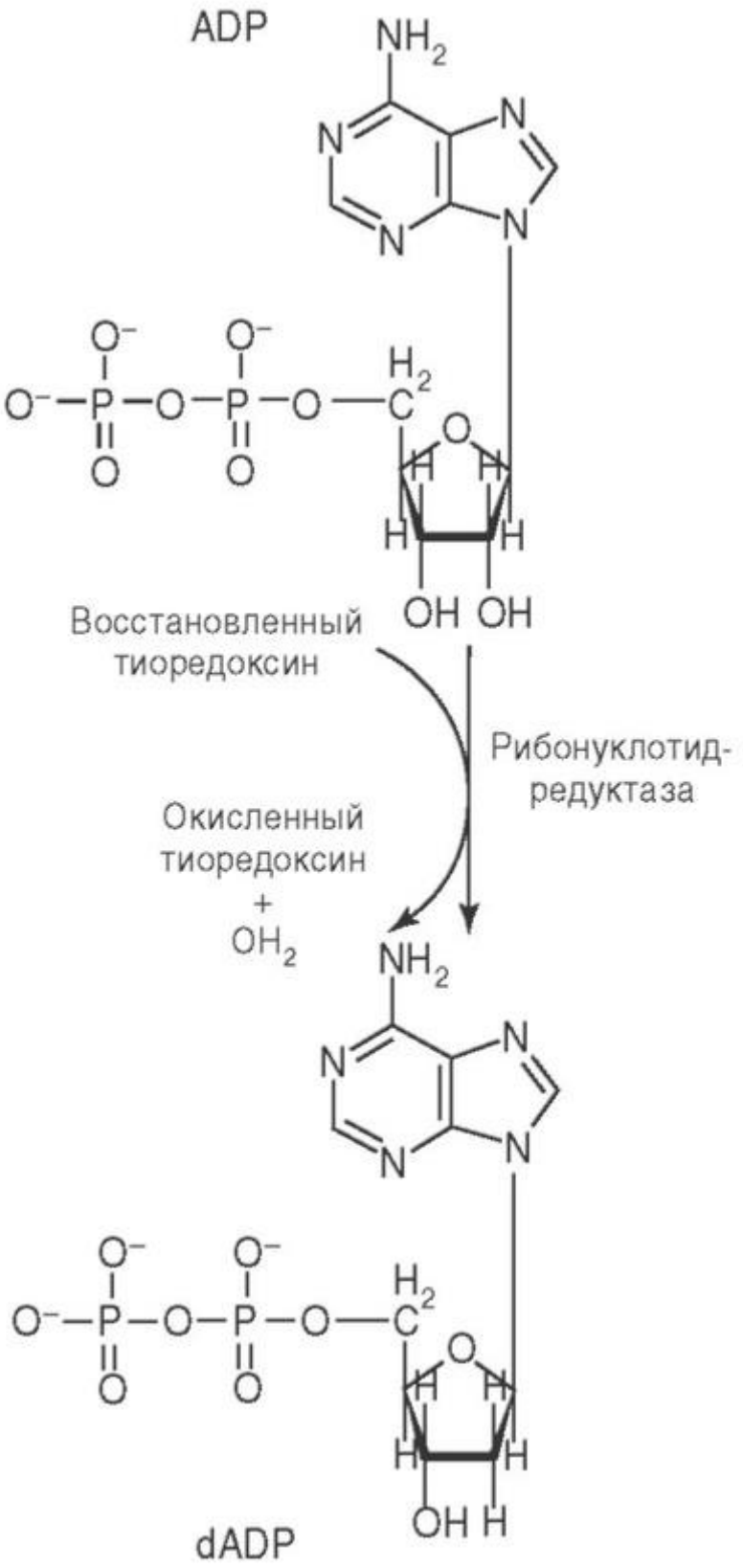


Рис. 2.20. Биосинтез дезоксирибонуклеотида - дезоксиаденозиндифосфата (аАДФ) из рибонуклеотида - аденозиндифосфата (АДФ)

Синтез дезоксирибонуклеозид-5-трифосфатов осуществляется в результате реакций фосфорилирования, которые катализируются соответствующими киназами:

$$dADP + ATP \longrightarrow dATP + ADP$$

$$dCDP + ATP \longrightarrow dCTP + ADP$$

$$dTDP + ATP \longrightarrow dTTP + ADP$$

$$dGDP + ATP \longrightarrow dGTP + ADP$$

Биосинтез ДНК и РНК. Синтез нуклеиновых кислот ДНК и РНК из нуклеотидов происходит в ядре клетки и митохондриях.

Синтез ДНК носит название «репликация», то есть создание дочерних копий-реплик, идентичных родительской ДНК.

Синтез РНК носит название «транскрипция» - «переписывание» информации с матрицы ДНК на матричную РНК (тРНК). Матричная РНК является исходной молекулой для передачи информации о структуре белков, которые синтезируются в плазме. Именно поэтому матричную РНК называют также информационной РНК (iРНК).

Один из видов РНК называется транспортной (tРНК). Она осуществляет транспорт аминокислот из цитоплазмы к рибосомальной РНК.

Рибосомальная РНК (rРНК) входит в состав рибосом и контролирует биосинтез белка. rРНК имеет более вариабельный состав, чем матричная или транспортная.

Матричные РНК (iРНК) синтезируются на гене - одном из участков молекулы ДНК.

Роль матриц играют разделенные цепи двунитевой материнской ДНК.

Репликация представляет собой реакцию полимеризации мононуклеотидов Nu_1, Nu_2, Nu_3 и т.д. в дочернюю полинуклеотидную цепь в последовательности, заданной генами:

$Nu_1 + Nu_2$ -- $Nu_1 \rightarrow Nu_2 + H_2O$;

$Nu_1 - Nu_2 + Nu_3 \rightarrow Nu_1 - Nu_2 - Nu_3 + H_2O$ и т.д.

В ходе транскрипции двойная нить ДНК расплетается, и вилка перемещается от одного конца молекулы ДНК к другому концу - нуклеотид Nu_i соединяется с нуклеотидом Nu_i+_1.

Цепи молекулы ДНК расходятся, и каждая из них становится матрицей, на которой синтезируется новая комплементарная цепь. В результате образуются новые двуспиральные молекулы ДНК, идентичные родительской молекуле.

Основную роль в репликации ДНК играет фермент ДНК-полимераза. ДНК-полимераза соединяет (полимеризует) мононуклеотиды в цепь дочерней ДНК-реплики.

Помимо ДНК-полимеразы, в репликации участвуют более 40 ферментов и белковых факторов, объединенных в единую ДНК-репликазную систему, называемую реплисомой.

Ферменты хеликаза, топоизомераза и ДНК-связывающие белки расплетают ДНК, удерживают матрицу в разведенном состоянии и вращают молекулу ДНК.

Имеется несколько видов ДНК-полимераз, катализирующих репликацию.

Одним из хорошо изученных ферментов, участвующих в стадии инициации репликации ДНК, является специфическая клеточная РНК-полимераза, названная праймазой.

Праймаза катализирует синтез короткого олигорибонуклеотида (от 10 до 60 нуклеотидов), то есть праймера, с которого начинается синтез ДНК.

Праймазы различаются как по структуре, так и по специфичности действия.

Основным ферментом, катализирующим стадии элонгации, является ДНК-полимераза III (мол. масса около 900 000) и ряд других белков.

К настоящему времени в клетках животных, как и у бактерий, открыто несколько ДНК-полимераз.

ДНК-полимераза I в качестве матрицы использует одноцепочечные участки, в то время как ДНК-полимераза III - двухцепочечные ДНК, в которых имеются короткие одноцепочечные последовательности.

Важную функцию соединения двух цепей ДНК или замыкания двух концов одной цепи ДНК в процессе репликации либо репарации ДНК выполняет особый фермент - ДНК-лигаза, катализирующая за счет энергии АТФ образование фосфодиэфирной связи между ОН-группой дезоксирибозы одной цепи и фосфатной группой другой цепи ДНК.

Функцию раскручивания (расплетания) двойной спирали ДНК в репликационной вилке выполняет специфический белок, названный хеликазой (мол. масса 300 000).

Особую роль в сверхспирализации играют ферменты топоизомеразы, которые обеспечивают как репликацию, так и транскрипцию ДНК. Эти ферменты наделены способностью не только создавать супервитки, но и уничтожать суперспирализацию путем сшивания образующихся разрывов или разрезания ДНК.

Наконец, открыты специальные ферменты, «редактирующие» ДНК. Они осуществляют вырезание и удаление ошибочно включенных нуклеотидов или устраняют (репарируют) повреждения ДНК, вызванные физическими или химическими факторами (рентгеновским излучением, УФ-лучами, химическим мутагенезом).

Следует отметить, что в эукариотических клетках имеются два белковых фактора репликации - RFA и RFC. Фактор репликации RFA связывает одноцепочечную ДНК (наподобие белковых факторов связывания разъединенных цепей ДНК при репликации у *E. coli),* фактор RFC - стабилизатор всего репликационного комплекса.

Синтез ДНК в клетках человека и животных протекает в период клеточного цикла, называемого S-фазой.

Репликация ДНК начинается сразу в нескольких тысячах молекул в затравочных участках ДНК - праймерах, синтезируемых специальными ферментами. Затравка

синтезируется из рибонуклеозитфосфатов, соответственно ДНК заканчивает синтез новой цепи, натыкаясь на РНК-затравку, следствием чего является образование фрагментов Оказаки.

Для того чтобы обеспечить направленный синтез цепи ДНК, в действие вступает особая система репараций, удаляющая РНК-затравку путем гидролиза и восстанавливающая правильную структуру ДНК. Фрагмент завершает ДНК-лигаза, которая соединяет 3'-конец нового фрагмента с 5'-концом предыдущего.

Новые двуспиральные молекулы ДНК состоят из одной цепи исходной родительской молекулы и одной вновь синтезированной цепи.

Состав и последовательность расположения нуклеотидов в родительской ДНК «переписываются» на дочернюю ДНК по тому же принципу комплементарности, на основе которого образуется двуспиральная молекула ДНК.

Предложены различные механизмы биосинтеза ДНК с участием известных ферментов и белковых факторов. Эти механизмы основаны главным образом на данных, полученных в опытах *in vitro* (в колбе).

Инициация представляется единственной стадией репликации ДНК, которая точно регулируется.

Элонгация синтеза ДНК включает два различных по механизму процесса синтеза лидирующей и отстающей цепей на расплетенных родительских цепях ДНК.

Предполагается, что может осуществляться сопряженный и согласованный механизм синтеза лидирующей и отстающей цепей ДНК при участии полимераз и всего комплекса праймосом.

Терминация синтеза ДНК наступает, когда ДНК-матрица пройдена до конца.

Принцип комплементарности, на основе которого построена двухспиральная молекула ДНК, действует и при синтезе iРНК.

Синтезированная цепь iРНК представляет собой точную копию одного из генов цепи ДНК. Таким путем информация, содержащаяся в гене, «переписывается» на iРНК (рис. 2.21). Именно поэтому этот процесс и назвали транскрипцией (от лат. *transcriptio* - «переписывание»). По завершении транскрипции молекулы iРНК перемещаются к месту синтеза белка, то есть к рибосомам. Туда же из цитоплазмы поступают аминокислоты, из которых строится белок.

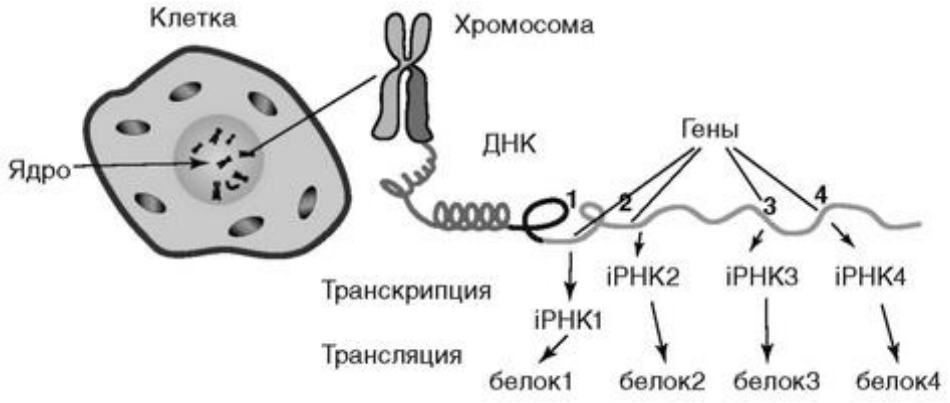


Рис. 2.21. Транскрипция дезоксирибонуклеиновой кислоты - синтез iРНК, трансляция - синтез белков

Каждый из генов организма отвечает за создание определенного белка и соответствующего вещества - метаболита. Но количество этого метаболита в расчете на один ген различно для разных генов. Некоторые из них вырабатывают много того, что должны, другие - недостаточно. Экспрессия гена - величина, измеряемая количеством соответствующего этому гену метаболита в расчете на один ген.

Экспрессия одних генов находится на невысоком уровне, у других степень экспрессии высокая.

Синтез белков осуществляется в рибосомах полимеризацией аминокислот в порядке, закодированном триплетами tРНК.

В табл. 2.5 приведен состав триплетов, которыми закодированы все 20 аминокислот.

Каждая аминокислота переносится в рибосому специализированной транспортной РНК. Поскольку в состав природных белков входит 20 разных аминокислот, очевидно, существует не менее 20 разных tРНК.

У аланиновой tРНК, например, кодовый триплет CGA (в iРНК ему комплементарен триплет GCU), у валиновой tРНК кодовый триплет CAA (в iРНК ему комплементарен триплет GUU) (см. таблицу генетического кода). У tРНК кодовый триплет UUU. Этот триплет соответствует аминокислоте лизину - лизиновая tРНК. Она присоединяет и транспортирует в рибосому аминокислоту лизин.

В клеточном цикле время синтеза и удвоения ДНК называется S-стадией. За ней следуют стадии G2 и M - митоз (деление клетки).

Синтез ДНК на матрице РНК. Выдающимся достижением биохимии нуклеиновых кислот является открытие фермента обратной транскриптазы, или ревертазы.

Таблица 2.5. Генетический код

Первое основание	Второе основание				Третье основание
	У (А)	Ц (Г)	А (Т)	г (Ц)	
У (А)	Фен	Сер	Тир	Цис	У (А)

	Фен	Сер	Тир	Цис	Ц (Г)
	Лей	Сер	-	-	А (Т)
	Лей	Сер	-	Три	Г (Ц)
Ц (Г)	Лей	Про	Гис	Арг	У (А)
	Лей	Про	Гис	Арг	Ц (Г)
	Лей	Про	Глн	Арг	А (Т)
	Лей	Про	Глн	Арг	Г (Ц)
А (Т)	Иле	Тре	Аси	Сер	У (А)
	Иле	Тре	Аси	Сер	Ц (Г)
	Иле	Тре	Лиз	Арг	А (Т)
	Мет	Тре	Лиз	Арг	Г (Ц)
Г (Ц)	Вал	Ала	Асп	Гли	У (А)
	Вал	Ала	Асп	Гли	Ц (Г)
	Вал	Ала	Глу	Гли	А (Т)
	Вал	Ала	Глу	Гли	Г (Ц)

Многие РНК-содержащие онкогенные вирусы содержат ревертазу в составе покровных белков. Фермент открыт также во многих клетках прокариотов и эукариотов, в частности в лейкозных клетках, растущих тканях, включая эмбриональные ткани.

Синтез ДНК на матрице РНК происходит в три этапа.

Ревертазной активностью обладают и ДНК-полимеразы, например, фермент из *E. coli* способен катализировать синтез ДНК на матрице гРНК.

Обратная транскрипция показывает, что передача наследственной информации от РНК к ДНК может происходить, не подчиняясь постулату «поток информации идет в одном направлении».

В настоящее время можно дополнить основную схему передачи генетической информации в живой клетке и представить ее в более полной форме.

На схеме (рис. 2.22) круговые стрелки около ДНК и РНК указывают на возможность этих молекул копировать самих себя.

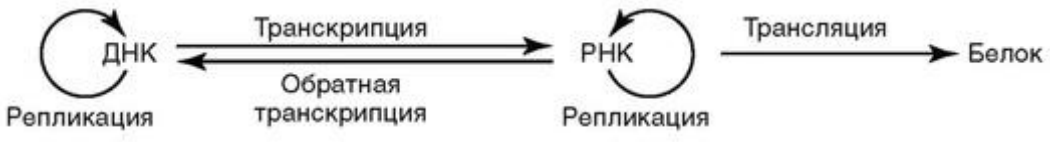


Рис. 2.22. Обратная транскрипция

Вопросы и задачи к разделу 2.5

1. Изобразите метаболический путь расщепления глицеральдегид-3-фосфата до этанола.

2. Укажите, как связаны между собой отдельные части этого пути.

3. Каким путем идет биосинтез белка после травм и ранений в регенерируемых тканях?

4. Из какого вещества активно синтезируется глюкоза в период восстановления после интенсивной мышечной работы?

5. В результате каких процессов катаболизма уменьшается мышечная масса при длительном голодании?

6. В чем заключается конечный эффект действия адреналина при интенсивной мышечной работе?

7. Каков механизм действия глюкагона при физических нагрузках?

8. Почему перед физической нагрузкой, например перед спортивными состязаниями, предпочтительнее есть сладкую, а не жирную пищу?

2.6. ИНТЕГРАЛЬНЫЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ. ВНУТРЕННИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПУТЬ. МЕЖСИСТЕМНЫЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПУТЬ

Далеко не всегда понятно, чем определяются особенности метаболизма различных организмов, с чем связано влияние на метаболизм физиологического состояния организма. Неясно, в частности, почему должны постоянно разрушаться и вновь синтезироваться такие важные компоненты структуры и функционирования живой клетки, как белки.

Ответ на поставленные и многие другие вопросы может быть найден на основе анализа биологических систем и метаболических процессов различных типов с помощью кинетических и термодинамических методов.

Типы метаболических процессов

Последовательные превращения исходного вещества (Xi), приводящие к образованию некоторого продукта (X_1), называются метаболическим путем (МП), или метаболической цепью ($Xi \rightarrow X_1$):

$$Xi \rightarrow X_1 \rightarrow X_2 \rightarrow X_3 \rightarrow X_1, \qquad (IV)$$

где Xi - исходное вещество; $X_1 \rightarrow X_3$ - метаболиты-интермедиаты; X_1 - продукт.

Метаболическая цепь (IV) состоит из четырех последовательных реакций.

Пространственная реализация метаболических путей в общем случае зависит от конкретной биологической системы, в которой осуществляется метаболизм.

В частности, путь «глюкоза - CO_2» может полностью осуществляться внутри одной клетки животного.

С другой стороны, этот путь может быть более длинным и проходить через ряд тканей организма (рис. 2.23).

Метаболический путь, состоящий из реакций, протекающих внутри одной системы, называетсявнутренним (вМП).

Метаболический путь, реакции которого протекают в разных системах, называется межсистемным (мМП).

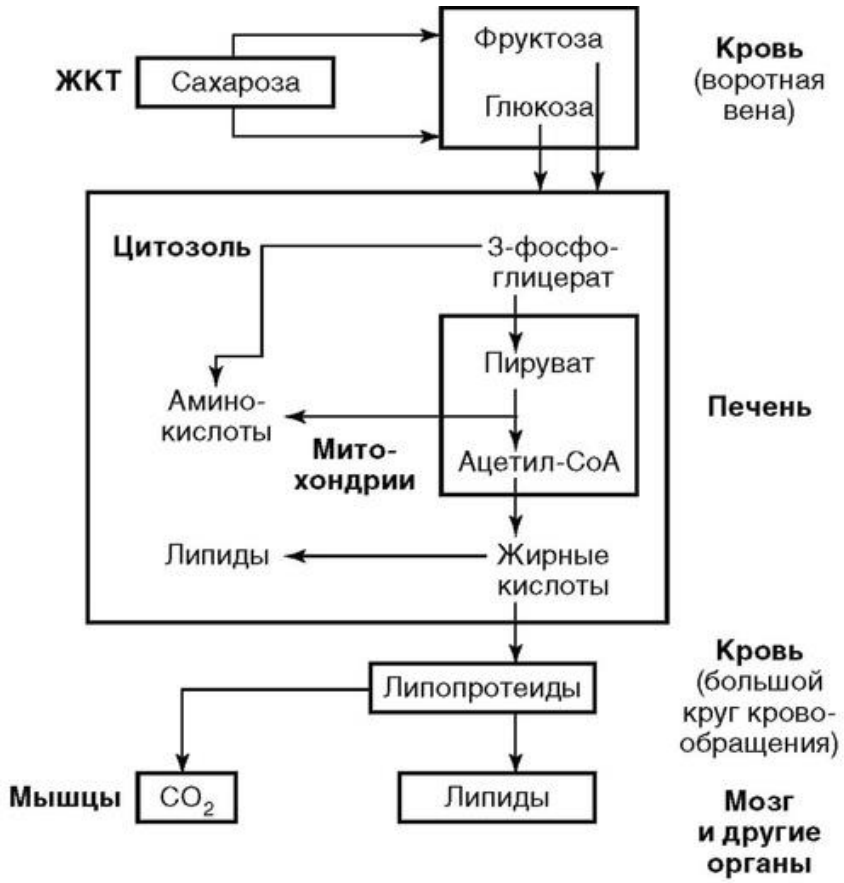


Рис. 2.23. Межсистемный интегральный метаболический путь сахарозы

Одно и то же вещество может участвовать в различных превращениях. Характерным примером служат вещества пируват и ацетил-КоА. В подобных случаях наблюдают пересечение различных метаболических цепей. Следствием такого пересечения является возникновение метаболической сети биологической системы (рис. 2.24).

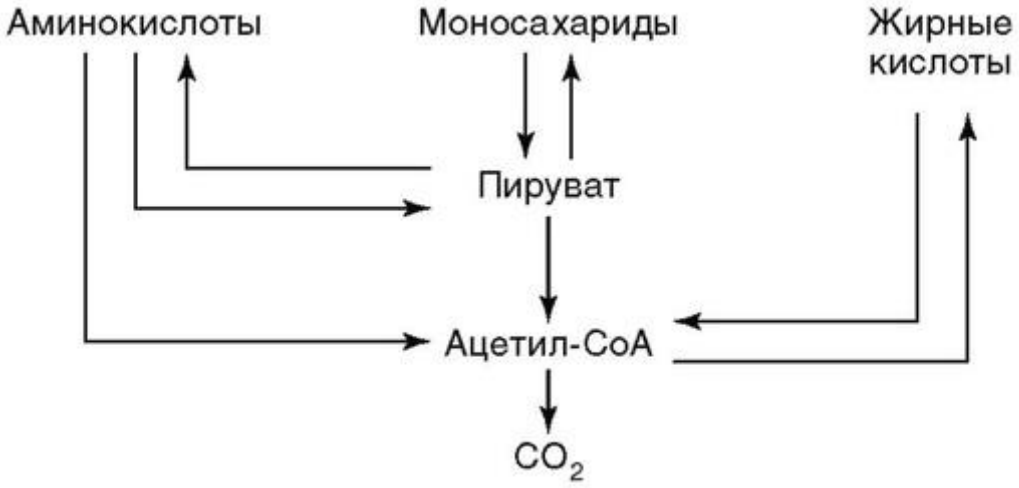


Рис. 2.24. Метаболическая сеть ацетил-КоА

Метаболическая сеть представляет собой частичную (парциальную) или полную совокупность метаболических путей рассматриваемого биологического объекта: клетки, органа, организма.

Полная метаболическая сеть отображает функционирование биологической системы в целом на биохимическом уровне.

Хорошо известна метаболическая сеть ретикулоцита. Она включает гликолитический, фосфоглюконатный окислительный пути, цикл трикарбоновых кислот, путь дыхательной цепи, а также пути синтеза пуринов, гемоглобина, холестерина, глицеридов.

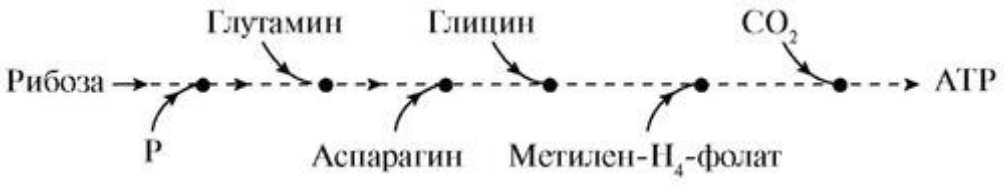
Метаболический путь - совокупность реакций, связывающих два или более ключевых метаболита.

Например, гликолиз представляет собой путь из 10 цитоплазматических реакций, связывающих глюкозу с пируватом или лактатом (см. рис. 2.3).

Цикл Кребса - цепь превращений, связывающих цитрат с оксалоацетатом и эквивалентных полному разрушению ацетильного радикала (см. рис. 2.4).

Гликолиз и цикл Кребса - примеры внутренних метаболических путей, состоящих из одной цепи.

В биохимии рассматривают метаболические пути, включающие несколько цепей. Обычно это синтез сложных органических веществ. Например, синтез АТФ можно рассматривать как совокупность цепей превращения рибозы, глицина, аспарагина, метилентетрагидрофолата:



Общая метаболическая сеть может включать как внутренние, так и межсистемные метаболические процессы.

Метод интегральных метаболических путей

Принципы составления интегральных метаболических путей (ИМП) следующие.

• Исходными считаются не те или иные промежуточные метаболиты, а вещества, служащие для клетки (организма) исходными питательными субстратами.

• Аналогично в ИМП не должно быть иных компонентов, кроме веществ, выступающих для клетки в качестве конечных при синтезе или распаде. Все другие соединения, высвобождающиеся в специфических реакциях синтеза вещества X, должны использоваться в превращениях, связанных с образованием этого вещества.

• Элементарным метаболическим процессом целесообразно считать односубстратную ферментативную реакцию, протекающую по механизму Михаэлиса-Ментен:

$$S + E \leftrightarrow ES; \qquad (I)$$

$$ES \rightarrow E + P, \qquad (II)$$

где S - субстрат; E - фермент; ES - фермент-субстратный комплекс; P - продукт.

Широко известным примером ферментативной реакции, проходящей обе стадии (I-II), является гидролиз сахарозы:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow 2C_6H_{12}O_6, \qquad (III)$$

где $C_{12}H_{22}O_{11}$ - сахароза (субстрат); $2C_6H_{12}O_6$ - фруктоза и глюкоза (продукт), фермент β-фруктофуранозидаза (обычно называемая сахарозой или инвертазой).

При реализации этих принципов суммарное уравнение синтеза или распада определенного вещества не содержит промежуточных интермедиатов. Следовательно, это уравнение позволяет найти, во-первых, затраты исходных питательных соединений на синтез вещества X, во-вторых - общее изменение энергии Гиббса в системе при синтезе (распаде) данных веществ.

Применение метода ИМП удобно показать на примере синтеза АТФ (рис. 2.25).

Для того чтобы составить ИМП синтеза АТФ, необходимо к уже приведенным реакциям добавить:

• реакции образования всех названных субстратов (кроме глутамина аспартата) из глюкозы и NH^+;

• реакции превращения побочных продуктов (глутамата и фумарата) в соответствующие субстраты, тогда глутамин и аспартат будут выступать в качестве

регенерирующих субстратов; то же относится к свободной форме фолиевой кислоты (Н4-фолату);

• необходимо везде строго учитывать стехиометрические соотношения.

Используя схему рис. 2.25, составляют суммарное уравнение рассматриваемого ИМП:

1,75 глюкоза (X_1) + 5NHT (X_2 АТФ (Z_2) + 0,5CO_2 - GTP.

Энергетику ИМП, соответствующую этому уравнению, можно найти путем суммирования изменений энергий Гиббса всех реакций ИМП.

При последовательном анализе конкретных метаболических процессов необходимо учесть, что ИМП можно разделить, как и отдельные метаболические цепи, на внутренние и межсистемные.

Все реакции внутренних ИМП протекают внутри одной системы, реакции межсистемных ИМП - в разных системах.

Деление ИМП на два вида имеет принципиальное значение. Если ИМП при заданном определении системы является межсистемным, при кинетическом и термодинамическом описании этого ИМП необходимо учитывать перенос метаболитов между системами.

Распад глюкозы может происходить как аэробным, так и анаэробным способом. Имеют место три варианта распада.

Аэробные пути полного распада глюкозы. Этот ИМП объединяет реакции трех наиболее известных путей метаболизма:

• пути Эмбдена-Мейергофа (превращение глюкозы в пируват);

• пути окислительного декарбоксилирования пирувата с образованием ацетил-КоА;

• пути разрушения ацетильного остатка в цикле Кребса. Редуцированная схема ИМП распада глюкозы приведена на рис. 2.25.

Используя эту схему, можно составить брутто-реакцию всего ИМП распада глюкозы:

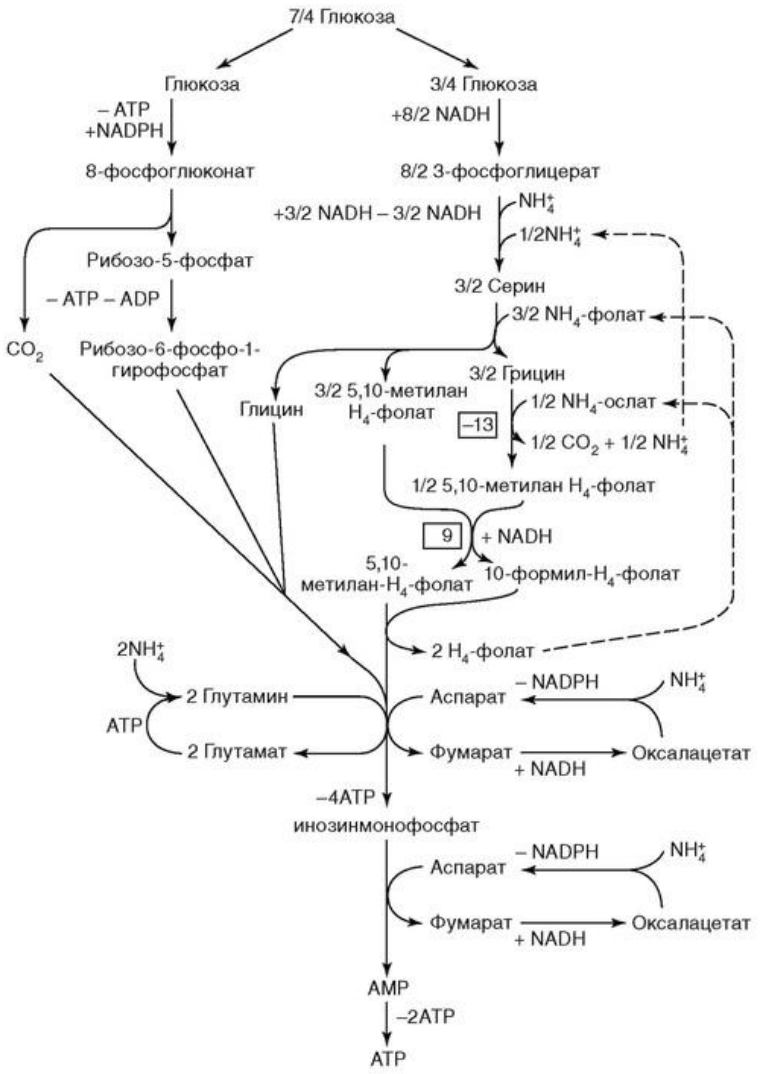


Рис. 2.25. Интегральные метаболические пути синтеза аденозинтрифосфата

$$\text{глюкоза} + 2NADPH + 8NADH + 2FADH + 2АТФ + 6CO_2 + 2GTP;$$
$$\Delta G' = -331 \text{ кДж/моль.}$$

Из анализа ИМП распада глюкозы следует, что метаболические пути, по крайней мере те, которые входят в данный ИМП, организованы с энергетической точки зрения достаточно экономно.

При полном распаде глюкозы совершается 12 окислительных реакций. В результате на 1-м этапе пентозного цикла энергия метаболитов уменьшается на величину, которая близка к энергии сгорания глюкозы:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = 6CO_2 + 6H_2O; \Delta G' = -2871 \text{ кДж/моль.}$$

Пути превращения глюкозы в нейтральные жиры и липиды

При отсутствии коферментов синтез стеариновой кислоты (точнее, ее активной формы - стеарил-КоА) из глюкозы описывается уравнением:

$$4{,}5C6H_{12}O_6 + HKoA + O_2 = C_8H_{35}O_2 + KoA + 9CO_2 + 9H_2O;$$

$$\Delta G' = -1833 \text{ кДж/моль.} \qquad \text{(XLI)}$$

Таким образом, на образование 1 моля нейтральной жирной кислоты требуется 4,5 моля глюкозы. При этом 9 углеродных атомов уходят с CO_2. Такая стехиометрия обусловлена особенностями метаболических путей.

Вначале глюкоза распадается до ацетил-КоА с потерей двух атомов углерода в расчете на одну молекулу глюкозы, и лишь затем ацетил-КоА используется непосредственно для синтеза жирной кислоты (рис. 2.26).

Дальнейший синтез жирной кислоты - циклический процесс, общая схема которого обратна схеме распада жирных кислот. В ходе каждого цикла происходит включение в растущую цепь двууглеродного фрагмента.

Синтез нейтральных жиров. Рассмотренный выше ИМП можно считать подсистемой более крупного ИМП синтеза нейтрального жира из глюкозы. Конечная стадия этого ИМП - конденсация всех компонентов в нейтральный жир.

Синтез фосфо- и сфинголипидов. Фосфолипиды отличаются от жиров тем, что вместо одного из ацильных радикалов содержат фосфатную группу, связанную с азотистым основанием. Чаще всего азотистым основанием является холин, включающий три лабильные метильные группы.

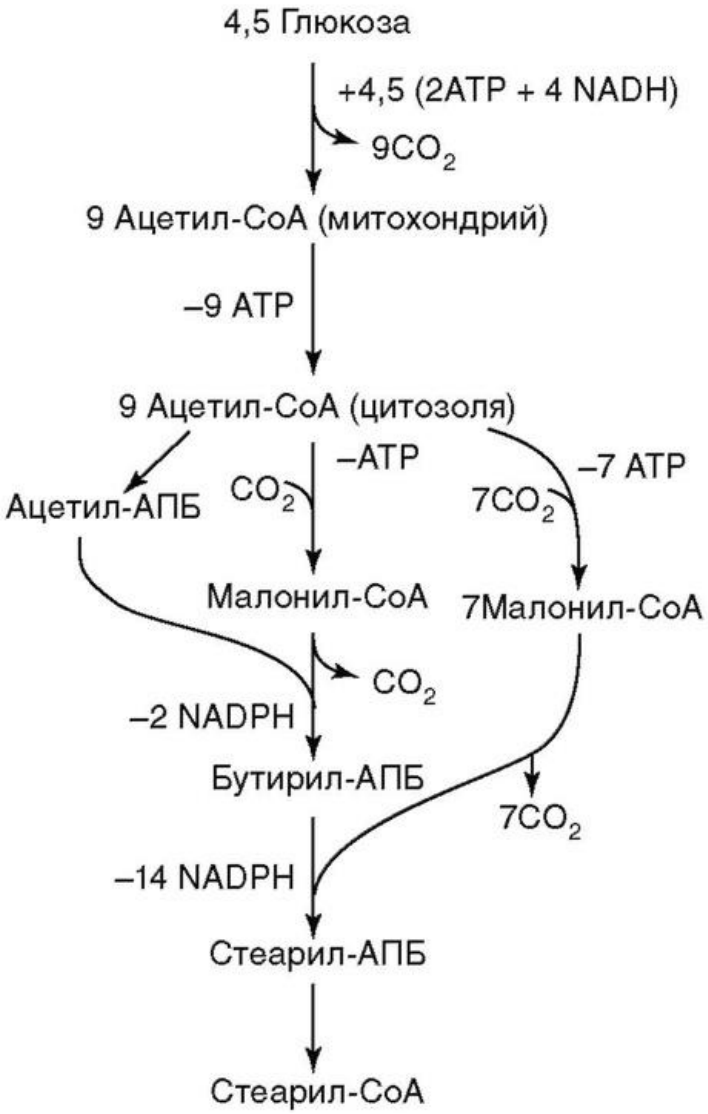


Рис. 2.26. Интегральный метаболический путь «глюкоза - стеарат»

Сфинголипиды. При синтезе из глюкозы сфингомиелина вначале должны образоваться остаток непредельной жирной кислоты, многоатомный спирт сфингозин (18- углеродных атомов) и холин. Сфингозин при своем образовании проходит стадию одной из жирных кислот - пальмитиновой.

Превращение глюкозы в сфингомиелин представляет экзергонический процесс без участия коферментов:

$$\text{глюкоза-}NH_2 + 2'/2\ 02 = \text{сфингомиелин} + 2CO_2;\ \Delta G' =$$
$$= -4217\ \text{кДж/моль.} \qquad \text{(XLIXa)}$$

Синтез холестерина. Суммарное уравнение пути синтеза холестерина, учитывающее лишь превращения метаболитов:

$$9C_6H_{12}O_6 + 16 \times O_2 \rightarrow C_{27}H_{46}O\ \text{(холестерин)} + 27CO_2 + 31H_2O;$$
$$\Delta G' = -9606\ \text{кДж/моль. (Lla)}$$

Синтез нуклеотидов и нуклеиновых кислот

Анализ ИМП синтеза нуклеотидов включает:

• составление ИМП синтеза каждого из четырех нуклеотидов;

• суммирование ИМП, взятых с такими стехиометрическими коэффициентами, которые соответствуют содержанию мономеров в макромолекуле;

• определение энергозатрат на полимеризацию мономеров.

Синтез нуклеотидов из аминокислот. Один из вариантов интегрального пути (рис. 2.27) - использование в качестве источников четырех аминокислот: серина, глутамина, аспартата и аланина. Эти аминокислоты наиболее распространены в белках, следовательно, выше всего их содержание и в аминокислотном пуле клеток. Кроме того, глутамин и аспартат непосредственно выступают в роли регенерирующего субстрата.

Синтез дезоксирибонуклеотидов. Для образования ДНК необходимы нуклеотиды: dATФ, dGTP, dCTP и TTP. Для пуриновых нуклеотидов структуры ИМП очень близки к той, что изображена на схеме рис. 2.25.

Расчет показывает, что дополнительного расхода глюкозы (или других энергетических субстратов) репликация ДНК не требует. Следовательно, нельзя считать, что стабильность ДНК, хотя бы отчасти, обусловлена высокой «дороговизной» ее синтеза.

Общее изменение энергии Гиббса при синтезе ДНК из глюкозы и NH_{4+} равно:

$\Delta G = (-1987 + 102\varepsilon)\ N_o/N_A$ кДж/моль,

где N_o - число нуклеотидных пар в ДНК; N_A - число Авогадро; ε - доля GC-пар.

Всего в ДНК человека примерно $1{,}5^{*}10^{22}$ нуклеотидных пар. Коэффициент ε можно положить равным 0,5. Подстановка этих значений в формулу дает:

ΔGднк(чел.) = -177 кДж.

Синтез белков

Расчет материальных энергетических затрат при синтезе белков распадается на две отдельные задачи:

• образование белков из готовых аминокислот;

• предварительный синтез аминокислот, например из глюкозы и NH^{4+}.

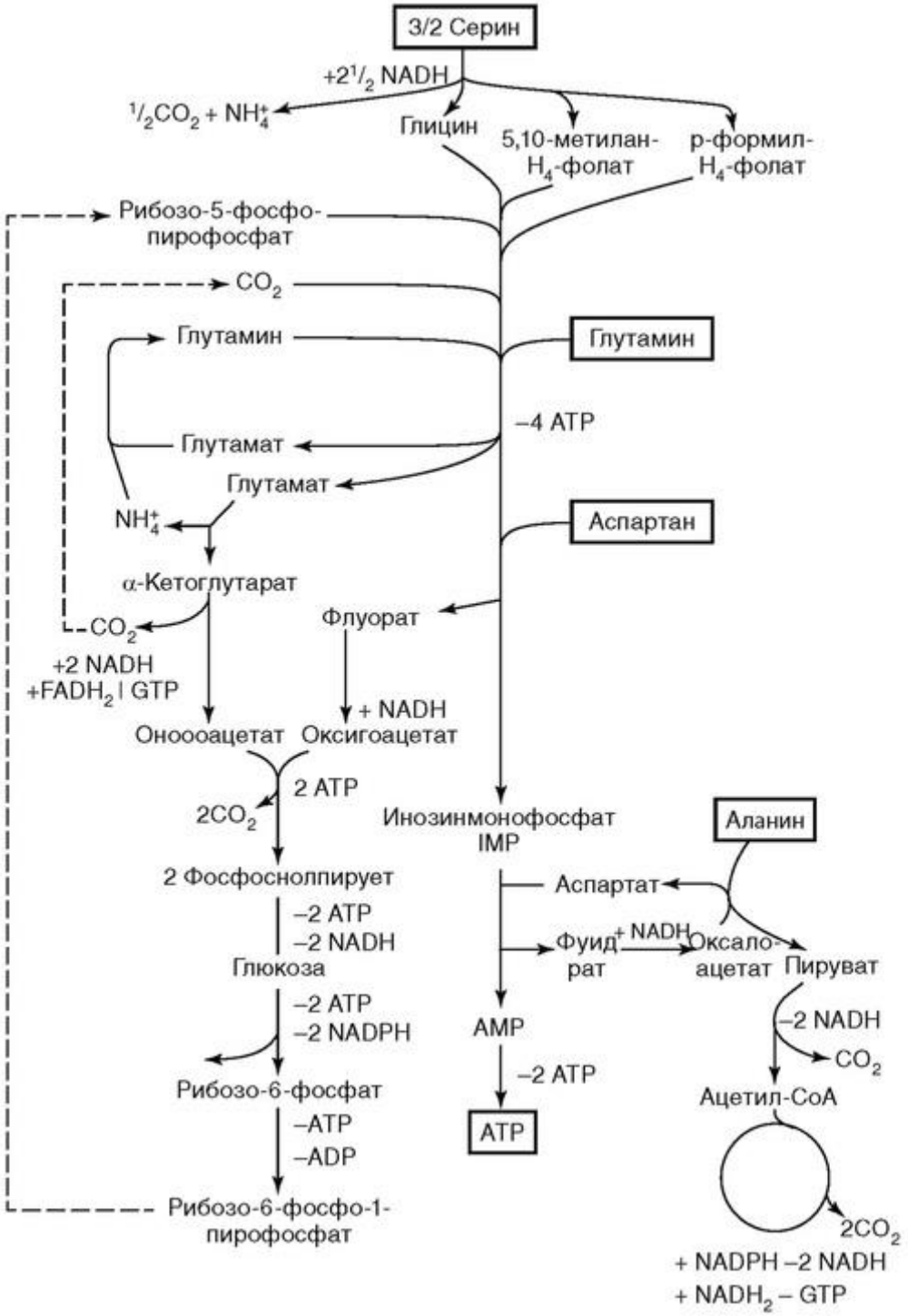


Рис. 2.27. Интегральный метаболический путь введения углеродных скелетов аминокислот в цикл Кребса

Синтез белков из аминокислот. Синтез мРНК предшествует синтезу белка на рибосомах. Следовательно, при оценке энергетической стоимости белкового синтеза необходимо учитывать метаболизм мРНК.

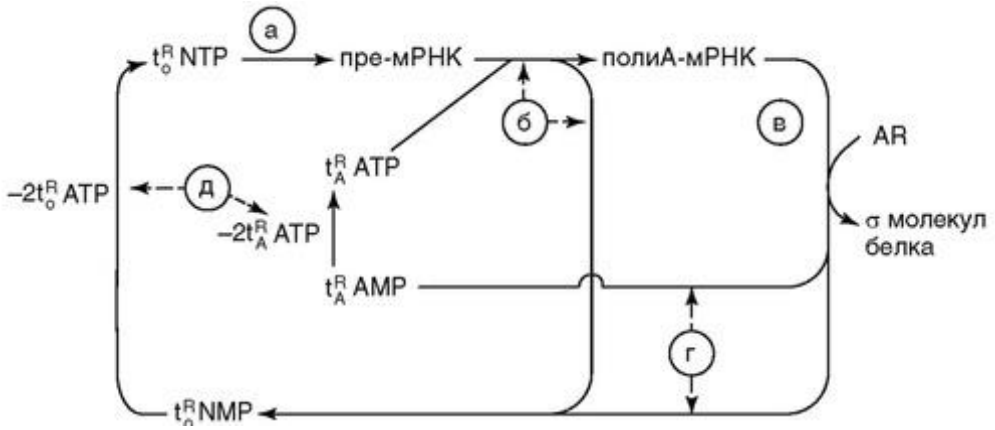


Рис. 2.28. Метаболическая сеть мРНК. 1^R_o - количество нуклеотидов в пре-мРНК

Метаболизм мРНК. Метаболическая сеть мРНК приведена на схеме рис. 2.28 (буквами обозначены основные стадии обмена).

• Транскрипция.

• Процессинг. Из первичного транскрипта удаляются участки, соответствующие некодирующим отделам ДНК.

• Трансляция. σ_0 - средняя кратность использования молекул мРНК при синтезе данного белка.

• Деполимеризация мРНК. После каждого «прочитывания» мРНК ее полА-фрагмент укорачивается на определенное число нуклеотидов. В конце концов вся мРНК распадается на рибонуклеозид-монофосфаты (rNMP).

• Фосфорилирование rNMP.

Затраты веществ и энергии на трансляцию. Основные этапы включения очередной аминокислоты в растущую пептидную цепь показаны на схеме рис. 2.29.Суммарное уравнение трансляции имеет вид:

$$(АК)n + АК + 4АТФ = (АК)_{nm} + 4АДФ. \qquad (LX)$$

Изменение энергии Гиббса при включении в белки 1 моля аминокислот равно:

$$\Delta G'21 = 4\Delta G'_{АТФ} + \Delta G'_{пс},$$

где $\Delta G_{пс}$ - энергия Гиббса образования пептидной связи, равная 18 кДж/моль. Отсюда vG'21 = -190 кДж/моль.

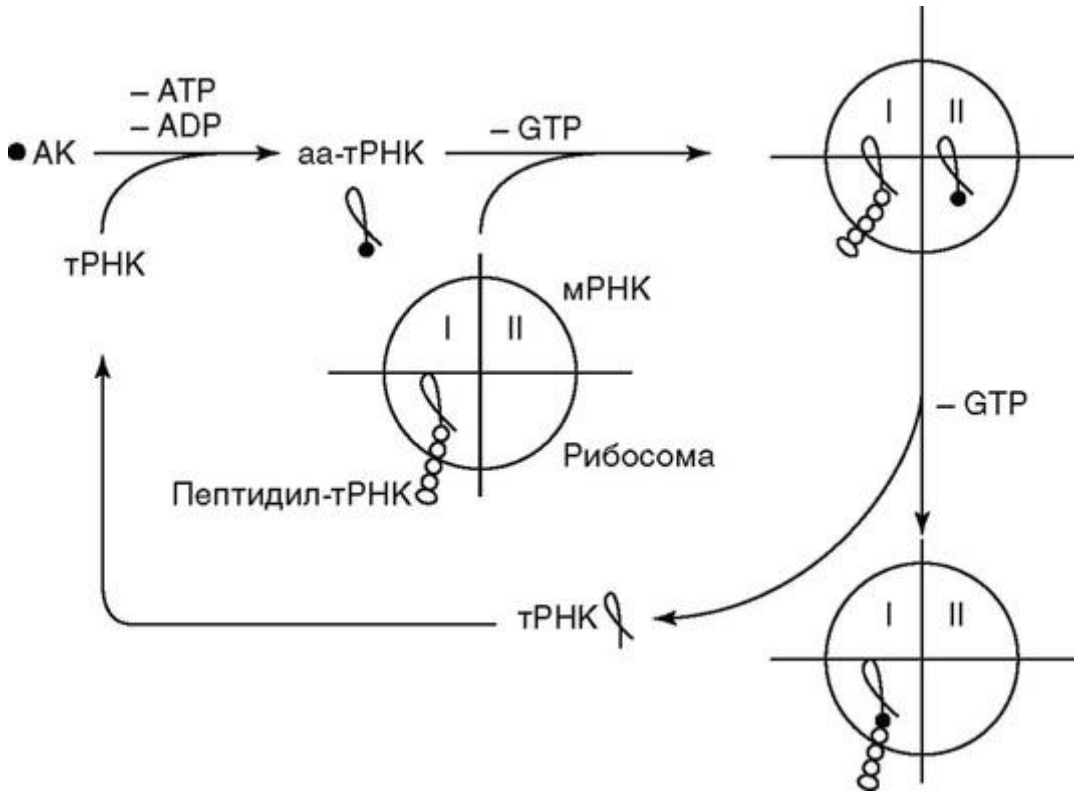


Рис. 2.29. Интегральный метаболический путь включения очередной аминокислоты в растущую пептидную цепь

Для того чтобы найти общую потерю энергии при синтезе белка, надо учесть еще и те потери, которые сопровождают преобразование энергии глюкозы в энергию АТФ.

Синтез аминокислот из глюкозы и ионов аммония. Принцип составления ИМП синтеза аминокислот тот же, что и для других метаболитов. Исходными считаются не те или иные промежуточные метаболиты, а вещества, служащие для клетки (организма) исходными питательными субстратами. В данном случае это глюкоза и NH_4^+. Следовательно, все компоненты аминокислоты должны образоваться только из этих веществ. Аналогично не должно быть в ИМП и иных продуктов, кроме самой аминокислоты (и таких конечных метаболитов, как CO_2 и др.). Все другие вещества, высвобождающиеся в специфических реакциях, должны использоваться в превращениях, связанных с синтезом аминокислоты.

Аминокислоты разбиты на пять групп.

• Трех- и двууглеродные аминокислоты - серин, цистеин, аланин и глицин. ИМП их синтеза наиболее просты.

• Аминокислоты, проходящие при своем синтезе стадию аспартата. Эта группа, кроме самого аспартата, включает аспарагин, треонин и метионин.

• Аминокислоты с длинными углеводородными радикалами - валин, лейцин, инолейцин и (условно) лизин. В пути синтеза каждой из этих аминокислот обязательно встречается конденсация того или иного метаболита (полуальдегида аспартата, а-кетобутирата, самого пирувата) с молекулой пирувата, чем и обусловлено объединение названных аминокислот в одну группу.

• Аминокислоты, проходящие при синтезе стадию глутамата. Кроме глутамата, сюда относятся глутамин, аргинин и пролин.

• Циклические аминокислоты - гистидин, фенилаланин, тирозин и триптофан. ИМП синтеза этих веществ наиболее сложны.

Термодинамика синтеза аминокислот. Синтез аминокислоты включает, как правило, следующие процессы:

• превращение исходного субстрата - глюкозы в общие промежуточные метаболиты;

• преобразование углеродного скелета;

• формирование определенных функциональных групп - азотсодержащих, серосодержащих, метильной, а также циклических структур (индольного, имидазольного, фенольного колец).

Напомним, что все изложенное относится к процессам, рассматриваемым при отсутствии коферментов.

Таким образом, если составить энергетические профили синтеза аминокислот, то они будут включать переходы как сверху вниз (снижение энергии метаболитов), так и снизу вверх. Но в целом на таких профилях энергия аминокислот будет почти всегда ниже энергии исходных субстратов (с учетом стехиометрических соотношений).

Итак, на примере синтеза аминокислот вновь подтверждается сформулированное ранее правило: в синтез любого вещества вовлекается обычно такое количество исходных субстратов, которое превосходит по конечный продукт.

Математическая формулировка этого правила такова. Пусть результирующее превращение ИМП будет:

$$\Sigma n(X_1)X_1 \rightarrow \Sigma 2n(Y_J)Y_J, \qquad \text{(LXVIII)}$$

где Xi - субстраты, Yj - продукты ИМП; n(X) и n(YJ) - соответствующие стехиометрические коэффициенты.

Тогда, согласно этому правилу, выполняется неравенство:

$$|\Sigma\, n(X_i) - \Delta G_c'(X_i)| > |\Sigma\, n(Yj) \times \Delta G_c(Yj)|\,. \qquad (2.45)$$

Знак модуля использован потому, что ΔG_c - всегда отрицательная величина.

Данное правило сформулировано на основе анализа таких ИМП, в которых исходным субстратом служит глюкоза, а в качестве продукта выступает вещество произвольного класса (углевод, липид, нуклеотид, аминокислота).

Участие коферментов в ИМП синтеза аминокислот меняет результирующее значение $\Delta G'$. В одних случаях оно становится менее отрицательной величиной, а в других - более

отрицательной. Например, в случае синтеза лизина и изолейцина меняет знак с положительного на отрицательный.

Термодинамика синтеза белков. В табл. 2.6 указан аминокислотный состав пяти белков. Только два из этих белков могут образоваться в обычных условиях из глюкозы и NH_4+, а не из готовых аминокислот. Это цитохром С и белок вируса табачной мозаики.

Таблица 2.6. Аминокислотный состав белков

Показатели		Цитохром С	Белок ВТМ	Инсулин	Коллаген	Лизоцим
Всего остатков в молекуле белка		104	158	51	958	129
Молярная масса белка		11 678	17 541	5690	82 856	14 217
$n(Г)_i = \Sigma\alpha_i \cdot I^{Pr}_{i,i}$	моль глюкозы/моль белка	–98,3	–140,0	45,1	–615,2	–110,0
$m(Г)_i$	г глюкозы/г белка	–1,52	–1,44	–1,43	–1,34	–1,39
$\Delta G^0_i = \Sigma\beta_i \cdot I^{Pr}_{i,i}$	кДж/моль белка	–38549	–50939	–14515	–226364	–44619
	кДж/г белка	–3,39	–2,90	–2,55	–2,73	–3,14

При расчете энергетики синтеза белков учитываются энергозатраты на трансляцию и метаболизм мРНК.

Данные по аминокислотному составу позволяют рассчитать n(Г)i и AG' с помощью табл. 2.6.

Если затраты глюкозы n(T)i и диссипация энергии AGf отнесены к 1 молю белка, то различия между белками очень значительны. В первую очередь эти различия связаны с тем, что в белках неодинаково общее число аминокислотных остатков. Отнесение рассматриваемых величин к 1 г белка устраняет влияние этого фактора и проявляет роль качественного состава белка.

Анализ метаболизма в сложных системах

При анализе метаболизма в сложной системе необходимо учитывать, что перенос метаболитов может осуществляться не только между частями системы (если принимать за системы отдельные органы или даже клетки), но и между системами. От составления внутрисистемных ИМП (вИМП) следует переходить к составлению межсистемных ИМП (мИМП).

Поскольку концентрация любого метаболита в различных компартментах организма, как правило, неодинакова, межсистемный перенос метаболитов сопровождается изменением энергии Гиббса.

В то же время влияние качественного состава белков невелико.

Далее для расчета мИМП необходимо знание макрокинетических характеристик. Если мИМП включает и процессы удаления вещества Хк, то поток энергии Гиббса в мИМП равен:

$$\Delta G'(Xk) = \Delta G'мП(Xk) \times vn(Xk), \qquad (3.1)$$

где ΔG'мП(Xk) - энергия Гиббса мИМП; vn(Xk) - поток вещества Xk, моль/сут.

Следует учитывать также, что кроме химической работы в организме существуют и другие виды: осмотическая, электрическая, механическая.

Межсистемные интегральные метаболические пути обмена креатина и креатинина в организме человека

Как известно, креатин (фосфорилированная форма - креатинфосфат) является дополнительным аккумулятором энергии в мышцах и некоторых других органах. Вместе с АТФ креатин образует последовательную цепь аккумуляторов энергии (рис. 2.30).

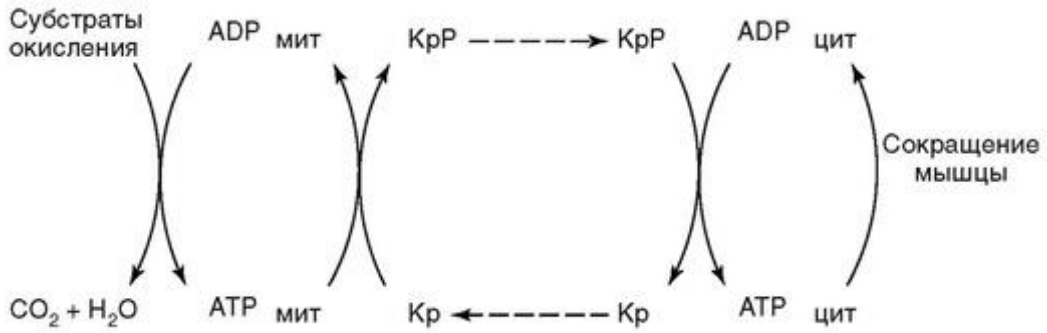


Рис. 2.30. Цепь аккумуляторов энергии в системе АТР-креатин. Кр, КрР - креатин, креатинфосфат, мит - митохондрии, цит - цитозоль, цит - цитозоль.

При избытке АТФ происходит фосфорилирование, то есть зарядка креатина. При мышечной работе, наоборот, креатинфосфат разряжается на АДФ, образующийся АТФ служит непосредственным источником энергии для сокращения мышц.

ИМП обмена креатина является межсистемным, поскольку отдельные стадии пути связаны с различными органами. В соответствии с общими принципами составления ИМП, начальными субстратами пути берут вещества, поступающие в организм: глицин, аргинин и серин, а продуктами пути - вещества, выводящиеся из организма (креатин и креатинин).

Термодинамика отдельных стадий межсистемных интегральных метаболических путей

Для анализа данного мИМП удобно сгруппировать реакции и процессы следующим образом.

Специфические реакции мИМП. Реакции, свойственные только обмену «креатин - креатинин» и непосредственно не использующиеся в других метаболических путях. Сюда относятся прежде всего две реакции синтеза креатина:

аргинин + глицин = гуанидинацетат + орнитин; ΔG' = 0. (LXXa)

Гуанидинацетат с током крови переносится в печень, где получает метильную группу от S-аденозинметионина (S-AM):

гуанидинацетат-f-S-AM = креатин + S-АГ; $\Delta G' \approx 1$ кДж/моль, (LXX6),

где S-АГ - S-аденозингомоцистеин.

Поступив из печени в мышцы, креатин (при избытке АТФ) фосфорилируется:

креатиH^+ АТФ → креатинфосфат + АДФ; $AG' \approx 6$ кДж/моль. (LXXb)

Образовавшийся креатинин выходит в кровь и фильтруется в мочу.

Общее изменение энергии Гиббса в специфических реакциях обмена креатина (в расчете на 1 моль креатина и креатинина, выделяемых с мочой) равно -44 кДж/моль.

Неспецифические реакции мИМП. В процессе синтеза креатина происходит перенос лабильной метильной группы от активной формы метионина (S-AM) на гуанидинацетат. Реакции, приводящие к преобразованию углеродных атомов серина в метильную группу метионина, происходят в печени.

С учетом неспецифических реакций получают:

ΔQi = -207 кДж/моль.

Транспорт веществ. К процессам активного транспорта веществ через мембраны относится в первую очередь всасывание аминокислот в кишечнике. Точное значение преодолеваемого градиента концентраций не определено. Можно допустить, что в клетках эпителия кишечника концентрация свободных аминокислот в 100 раз выше, чем в просвете кишечника. Следует учесть также, что с переносом 1 моля аминокислот сопряжен гидролиз 3 молей АТФ. Тогда для всасывания того количества аминокислот, которое необходимо для образования 1 моля Кр + Крн, требуется $\Delta G' \approx 365$ кДж/моль.

Общее изменение энергии Гиббса в рассмотренных процессах активного транспорта (в кишечнике и почках) составляет $\Delta G3$ = -417 кДж/ моль.

Проведенное рассмотрение с энергетической стороны характеризует все стадии рассматриваемого мИМП. Суммирование всех записанных ранее уравнений дает:

$$(0{,}5Ser + Gly + Arg)\ \text{ЖКТ}\ (-\text{NADPH} + 0{,}5\text{NADH} - 12{,}5\text{АТФ}) = (1-\alpha)\ \text{Кр}_{\text{м}} + \alpha\text{Крн}_{\text{м}} + \text{орнитин}_{\text{р}};\ \Delta G' = -668\ \text{кДж/моль.}\ \text{(LXXIV)}$$

Индекс «м» означает локализацию продукта в моче, «р» - в почках.

Для расчета общих энергетических затрат организма необходимо учесть регенерацию коферментов. Расчет показывает, что баланс ко-ферментов равен нулю.

Суммарная реакция выражается уравнением:

$$(0{,}5Ser + Gly + Arg)\text{ЖКТ} + 0{,}42\ \text{глюкоза ткани} \rightarrow K_{рм} + (1-\alpha)K_{рнм} + \text{орнитин}_{р};$$

$$\Delta G'_{мп}(Kp) = -1092\ \text{кДж/моль.}\ (LXXVI)$$

Поток энергии Гиббса мИМП обмена креатина. Для того чтобы определить, каков вклад рассмотренного мИМП в суточную энергопродукцию организма человека, достаточно воспользоваться формулой (3.1). Значение $\Delta G'_{МП}(Kp)$ рассчитано выше. Поток веществ vn(Kp) в данном мИМП - среднесуточное выделение с мочой смеси «креатин + креатинин», которое равно, как уже отмечалось, примерно 0,0115 моля. Подстановка этих значений в (3.1) дает: $\Delta G'6(Kp) = -13$ кДж.

Кинетическая модель метаболизма креатина и креатинина в организме человека состоит из пяти подсистемных блоков. Эти блоки отображают соответствующие органы и ткани: 1 - ЖКТ, 2 - кровь, 3 - печень, 4 - почки, 5 - мышцы, 0 - внешняя среда.

Для того чтобы получить систему кинетических уравнений, описывающих данную модель потока, для каждого метаболита составляют кинетические уравнения по всем блокам модели.

Таким образом, для каждого реагента получают в общем случае столько уравнений, сколько имеется блоков в схеме. В случае метаболизма креатина и креатинина модель описывается 72 уравнениями.

С помощью различных приближений количество уравнений может быть сокращено. Но даже такие редуцированные системы уравнений многомерны, и их общее решение можно получить лишь численными методами. Однако стационарные решения получить относительно несложно. При этом производные по времени (dxi/dt) равны нулю, и получается система алгебраических уравнений, которую в ряде случаев удается решить.

Стационарные скорости накопления в моче креатина и креатинина описываются двумя уравнениями. На основе решения этих уравнений при t = 24 ч получают массу и количество креатина и креатинина, выделяемых организмом за 1 сут.

В частности, может быть рассчитана зависимость продукции креатина и креатинина от соотношения АТФ и АДФ в мышцах.

Определение потоков в конкретных случаях требует разъяснений. Например, синтез АТФ происходит в результате последовательного присоединения фрагментов различных веществ - фосфорной кислоты, глутамина и так далее к одной и той же молекуле рибозы. Отсюда следует, что поток рибозы в цепи синтеза АТФ равен количеству рибозы, поступившей в эту цепь и включенной в молекулы АТФ.

Молекула глюкозы, поступившая в цепь гликолитического распада, сохраняет свой шестиуглеродный скелет до фруктозодифосфата. После этого происходит расщепление скелета на два трехуглеродных фрагмента, образуются молекулы глицеральдегид-3-фосфата и фосфодиоксиацетона. Очевидно, что нельзя в прямом смысле говорить о потоке глюкозы на последующих участках цепи.

Вопросы и задачи к главе 2

1. Сколько различных трипептидов можно приготовить из трех аминокислот - глицина, аланина и серина - при условии, что любая из этих трех аминокислот может занимать любое из трех возможных положений, причем каждую аминокислоту можно использовать более одного раза? Сколько различных трипептидов можно приготовить, если использовать каждую аминокислоту только один раз?

2. Напишите с помощью формул строения уравнение образования тетрапептида Ala-Cys-Gln-His. Выделите пептидные связи.

3. Рассчитайте минимальную молекулярную массу сывороточного альбумина быка, если по данным количественного аминокислотного анализа в нем содержится 0,58% (по массе) триптофана, мол. масса которого равна 204.

4. Укажите связи в В-цепи инсулина, в которых происходит ее расщепление под действием: а) трипсина; б) химотрипсина.

5. Объясните, какие свойства белков лежат в основе аффинной хроматографии и каким образом можно получить белок, оставшийся на аффинной колонке, в чистом виде? Какие принципы лежат в основе предлагаемой операции?

Глава 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕТАБОЛИТОВ

3.1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ АНАЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУР В МЕТАБОЛОМИКЕ

Выделение метаболитов из тканей и клеток состоит из ряда стадий. Методики обработки тканей и клеток детально разработаны и широко применяются на практике в клинической диагностике.

Первоначально для разрушения межклеточных связей, клеточной стенки и плазматических мембран применяют механическую (в жидкой или твердой среде) или немеханическую (ферментативную, химическую, физическую) обработку ткани (рис. 3.1).

Для ферментативной обработки (как правило, мышечной ткани, перед гомогенизированием) используют трипсин, коллагеназу, протеинкиназу-К и другие ферменты.

При механической обработке для мягкого растирания ткани ее предварительно измельчают ножницами, затем гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (гомогенизатор Поттера-Эльвегейма).

В результате получают препарат со смесью метаболитов, содержавшихся в исходном образце.

Аликвоты полученного препарата используют для качественного и количественного анализа в целях определения метаболического профиля исследуемого органа. При этом идентифицируют различные метаболиты и определяют их количества. Проводят анализ полученных данных и ставят диагноз.

Современные методы качественного и количественного анализа - ГХ-МС, ЖХ-МС/МС, СЕ-МС, FT-МС-спектроскопия, ЯМР-спектроскопия и др.

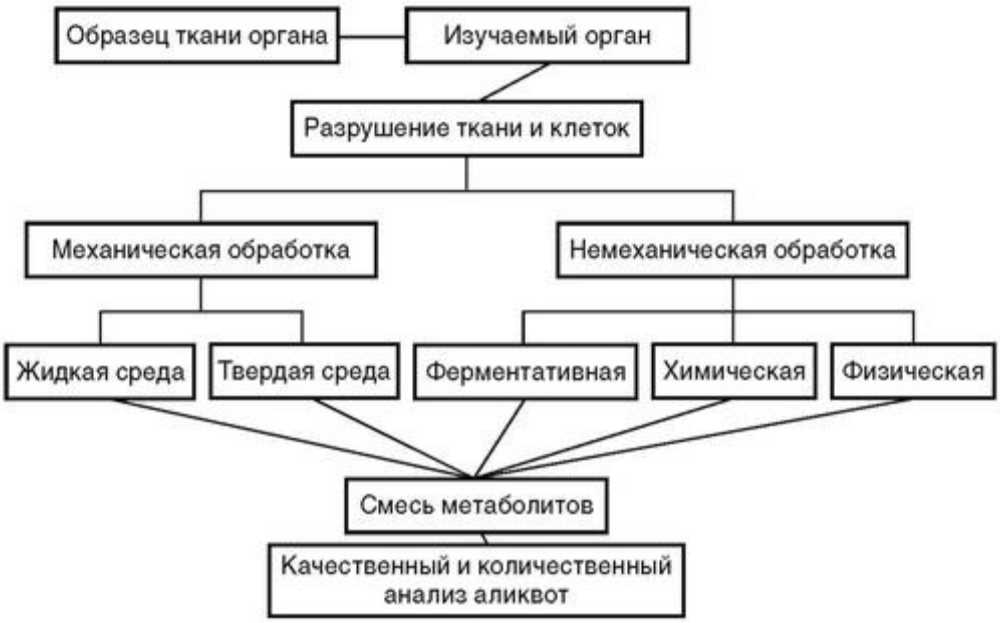


Рис. 3.1. Последовательность аналитических процедур в метаболомике

3.2. МЕТОДЫ АНАЛИЗА (ОБНАРУЖЕНИЯ) И ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА КОМПОНЕНТОВ ФРАКЦИЙ

3.2.1. Хроматография

Хроматографию открыл и предложил как метод разделения и анализа смесей русский ученый Михаил Семенович Цвет в 1903 г.

Хроматография - аналитический метод, сочетающий в себе и разделение, и количественное определение веществ, входящих в состав многокомпонентных проб.

В основе разных методов хроматографии лежат адсорбционные процессы различной природы. Хроматография - один из немногих методов, сочетающий в себе и разделение, и количественное определение веществ, входящих в состав многокомпонентных проб.

Главным элементом для этих методов анализа являются хроматографические колонки.

Хроматографические колонки - трубки, стенки которых покрыты веществом неподвижной фазы.

В ходе анализа по трубке движется подвижная фаза (газ или жидкость) с исследуемой смесью (рис. 3.2).

В результате непрерывно повторяющихся процессов сорбции и десорбции веществ на стенке трубки происходит разделение компонентов исследуемой смеси.

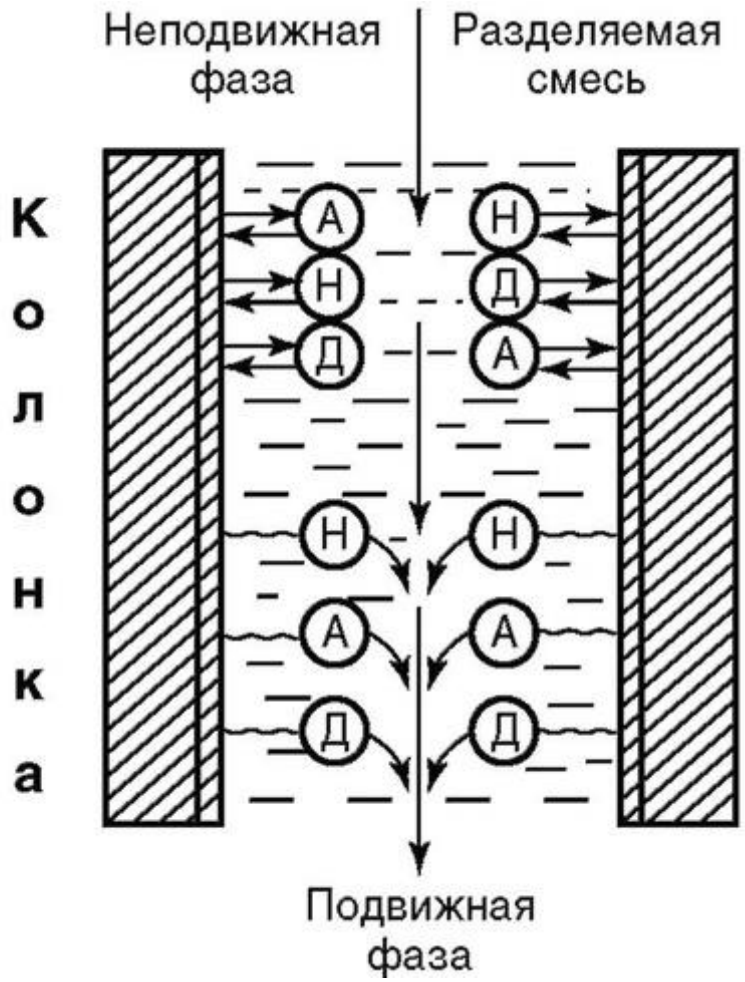


Рис. 3.2. Принцип разделения в хроматографической колонке

Обязательным условием для проведения хроматографии является наличие двух фаз: неподвижной (стационарной) и подвижной. В результате того, что различные вещества (А, Д, Н) перемещаются вдоль неподвижной фазы с разной скоростью, происходит их разделение (см. рис. 3.2).

Различная скорость перемещения отдельных компонентов смеси вдоль неподвижной фазы связана со сложным характером взаимодействия в системе «вещество - подвижная фаза - неподвижная фаза». По механизму взаимодействия различают адсорбционную, распределительную, ионообменную, хемосорбционную и молекулярно-ситовую хроматографию.

Колонки характеризуются эффективностью, селективностью и емкостью.

Эффективность является мерой расширения пика вещества при его движении вдоль колонки. При правильном подборе селективности неподвижной фазы удается разделить все индивидуальные компоненты даже самой сложной смеси.

Селективность определяется как разница в степени удерживания веществ разной природы на неподвижной фазе.

Емкость колонки связана с ее физическими размерами и определяет максимальный объем пробы, который можно ввести в колонку без ее перегрузки.

В хроматографии применяют насадочные (набивные) и капиллярные колонки.

Соответственно, емкость набивных колонок значительно больше, чем капиллярных.

Насадочными колонками в газовой хроматографии традиционно называют трубки большого диаметра (обычно 2 мм), которые заполняют (набивают) адсорбентом - измельченным порошком.

Капиллярные колонки - полые трубки малого диаметра. В газовой хроматографии распространены размеры от 0,1 до 0,5 мм. Чем меньше диаметр колонки, тем меньше размытие пиков в результате диффузии и, соответственно, тем выше эффективность.

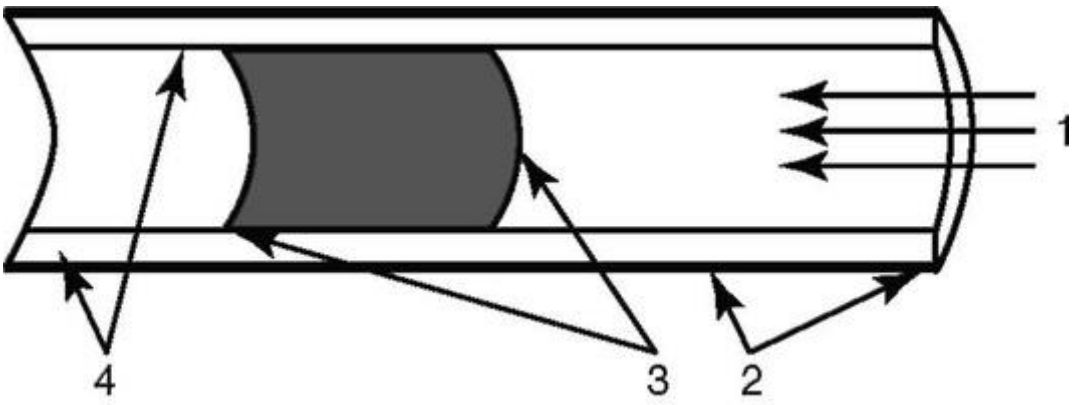


Рис. 3.3. Схема работы капиллярной газовой хроматографической колонки: 1 - поток газа-носителя; 2 - стенка капилляра; 3 - зона вещества на неподвижной фазе; 4 - неподвижная фаза

На рис. 3.4. представлена современная капиллярная газовая колонка HP-5MS общего назначения. Длина - 30 м, внутренний диаметр - 0,25 мм, внешний диаметр - 0,3 мм.

Преимущества капиллярной хроматографии: малый расход газа или раствора носителя, возможность применения газовых молекулярных сепараторов, квадрупольного или времяпролетного масс-анализатора.

Хроматографические методики включают несколько этапов:

- подготовку анализируемой пробы и сорбента;
- введение пробы в разделительную колонку;
- включение потока подвижной фазы (элюирование);
- обнаружение зон разделенных веществ - детектирование, запись хроматограммы;
- количественное определение содержания веществ в разделенных зонах.

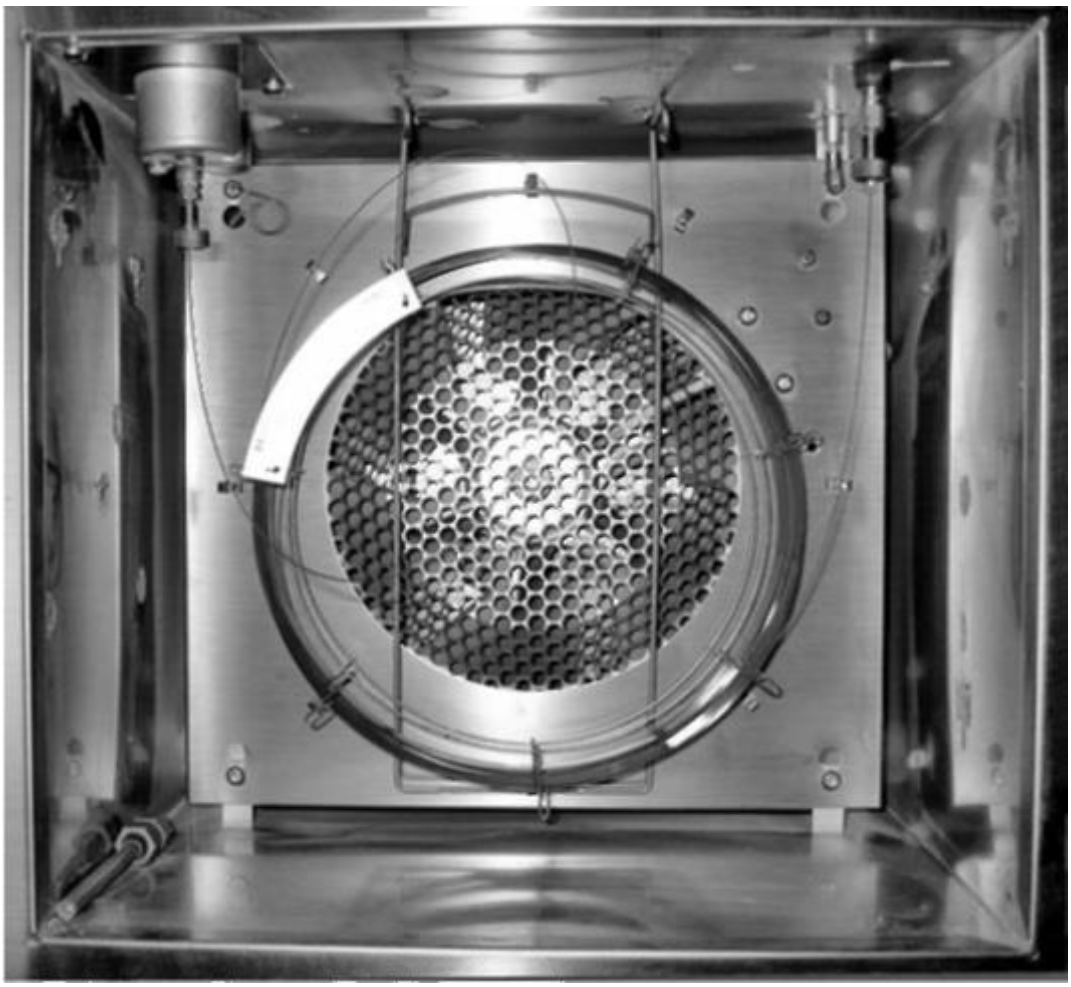


Рис. 3.4. Капиллярная газовая хроматографическая колонка HP-5MS общего назначения в сборке хроматографа

В зависимости от способа ввода пробы и механизма перемещения хроматографических зон по слою сорбента различают проявительный (элюентный), фронтальный и вытеснительный варианты хроматографии.

В проявительном варианте пробы анализируемой смеси периодически вводят в поток подвижной фазы (элюента). В колонке смесь разделяется на отдельные зоны компонентов, между которыми находятся зоны подвижной фазы.

Во фронтальном варианте в колонку непрерывно подают пробы анализируемой смеси. Можно также подавать в колонку одновременно пробу и подвижную фазу. В этом варианте в чистом виде на выходе из колонки можно получить только первый, наименее сорбируемый компонент.

В вытеснительном варианте после подачи разделяемой смеси в колонку вводят вещество - вытеснитель, который сорбируется лучше любого из компонентов смеси.

В вытеснительной хроматографии зоны разделяемых веществ примыкают друг к другу.

Газовая хроматография (ГХ) - метод разделения летучих компонентов, при котором подвижной фазой служит инертный газ-носитель, протекающий через неподвижную фазу с большой поверхностью. В качестве подвижной фазы используют водород, гелий, азот,

аргон, углекислый газ. Газ-носитель не реагирует с неподвижной фазой и разделяемыми веществами.

Различают газотвердофазную и газожидкостную хроматографию (ГЖХ). В первом случае неподвижной фазой является твердый носитель (силикагель, уголь, оксид алюминия), во втором - жидкость, нанесенная на поверхность инертного носителя.

Для газовой хроматографии используют два типа колонок - капиллярные и насадочные. Насадочные колонки имеют внешний диаметр от 2 до 4 мм и длину от 1 до 4 м.

Внутренний диаметр капиллярных колонок - 0,1-0,5 мм, длина - 15-100 м. Материалами для колонок служат стекло, нержавеющая сталь, медь, фторопласт. Большее распространение получили капиллярные колонки из плавленого кварца с нанесенной внутри неподвижной фазой. Длина подобных колонок может достигать сотен и даже тысяч метров, хотя чаще используются колонки длиной 30-60 м.

Основным прибором для газовой и газожидкостной хроматографии является газовый хроматограф (рис. 3.5). Основными узлами хроматографов являются хроматографическая колонка (3), детектор (4), а также устройство для ввода пробы (2).

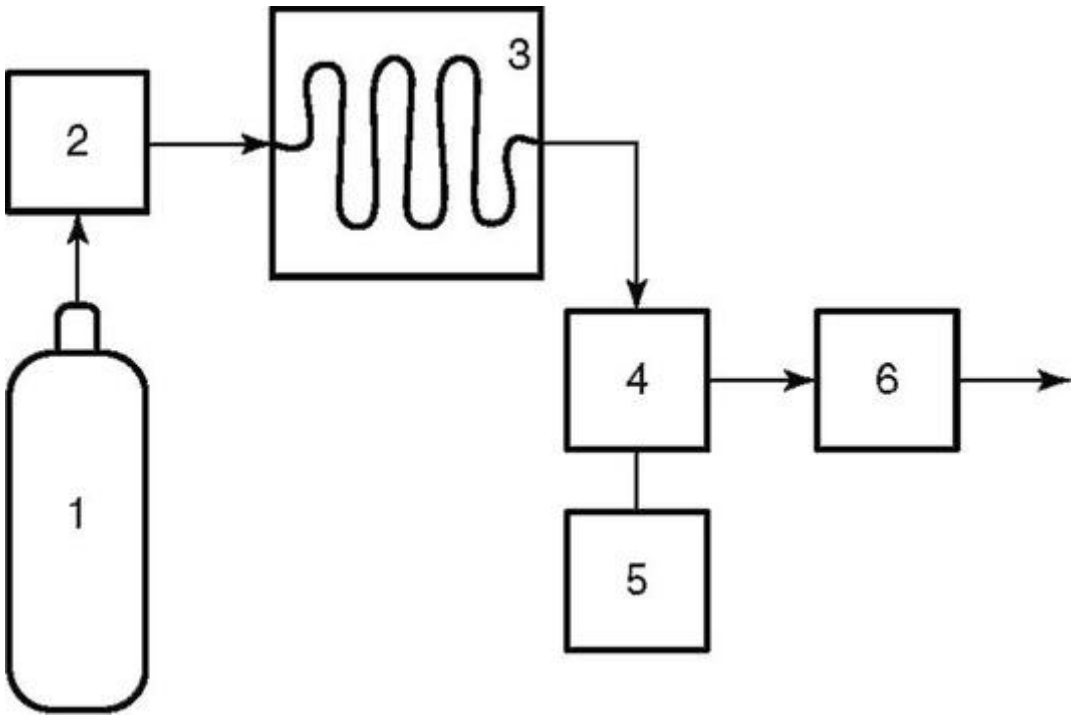


Рис. 3.5. Блок-схема газового хроматографа: 1 - источник газа-носителя (подвижной фазы); 2 - блок ввода пробы; 3 - хроматографическая колонка в термостате; 4 - детектор; 5 - регистрирующий прибор с монитором (компьютер); 6 - расходомер

В колонке с сорбентом анализируемая проба разделяется на составные компоненты. Детектор, расположенный на выходе из колонки, автоматически непрерывно определяет количество разделяемых веществ в потоке элюента.

Крайне важно плотное наполнение колонок неподвижной фазой, а также обеспечение постоянства температуры колонки при хроматографии. Точность поддержания температуры должна составлять 0,05-0,1 °С. Для точного регулирования и поддержания температуры используют термостаты.

В качестве источников газа-носителя (1) обычно используют баллоны со сжатым или сжиженным газом. Для хроматографии используют гелий, реже азот, еще реже - водород и другие газы.

Устройство ввода пробы (2) предназначено для подачи пробы анализируемой смеси в хроматографическую колонку.

Детекторы (4) предназначены для непрерывного измерения концентрации веществ на выходе из хроматографической колонки. Принцип действия детектора должен быть основан на измерении такого свойства аналитического компонента, которым не обладает подвижная фаза.

Расходомер (6) хроматографа предназначен для контроля за расходом газа в системе, а также для поддержки необходимого давления газа на входе в систему. Обычно в качестве регулятора расхода газа используют редуктор или дроссель.

Если на хроматографе анализируют жидкие пробы, устройство ввода проб совмещается с испарителем, нагретым до температуры, превышающей температуру колонки на 50 °С.

При пробе объемом несколько микролитров вводят в испаритель с помощью микрошприца путем прокалывания эластичной прокладки.

В газовой хроматографии используют следующие виды детекторов:

- пламенно-ионизационный детектор (ПИД);
- катарометр (детектор по теплопроводности);
- детектор электронного захвата (ЭЗД);
- пламенно-фотометрический детектор (ПФД);
- термоионный детектор (ТИД);
- фотоионизационный детектор (ЭЗД);
- электрохимический детектор (ЭХД);
- хемилюминесцентный детектор (ХЛД);
- масс-спектрометр;
- ИКфурье-спектрометр.

На монитор (5) регистрирующего прибора выводится хроматограмма смеси с пиками компонентов (см. рис. 3.5).

Все вещества анализируемой пробы после ввода в колонку с потоком подвижной фазы расположены в начале хроматографической колонки (см. рис. 3.2).

В потоке подвижной фазы компоненты смеси перемещаются вдоль колонки со скоростями, обратно пропорциональными коэффициентам распределения этих веществ.

Вещества, значения констант распределения которых велики, передвигаются вдоль слоя сорбента по колонке медленнее, чем вещества с малыми константами распределения. Именно поэтому раньше всех из колонки выходит компонент Д, затем компонент А и потом Н ($К_3<К_1<К_2$).

Величины сигнала детектора пропорциональны концентрации веществ в потоке элюента. Они автоматически регистрируются, например, на диаграммной ленте в виде хроматограммы. Полученная хроматограмма отражает расположение зон на слое сорбента или в потоке подвижной фазы во времени.

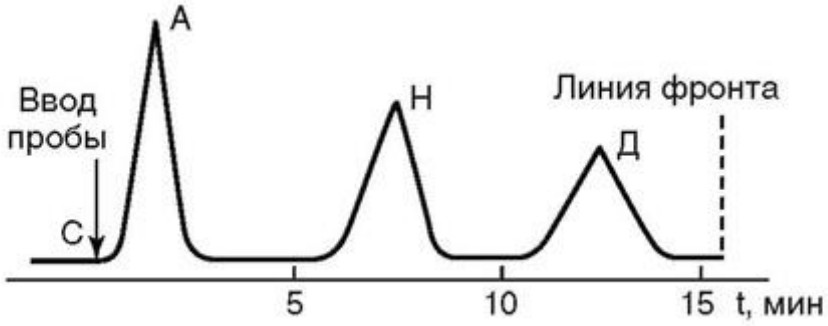


Рис. 3.6. Газожидкостная хроматограмма смеси анестетиков: анестезина (А), новокаина (Н), дикаина (Д). Время удержания А, Н, Д - 2, 8, 12,5 мин соответственно

На рис. 3.б представлена хроматограмма смеси лекарственных анестетиков: анестезина (А), новокаина (Н), дикаина (Д), полученная на хроматографе с использованием методики ГЖХ. Идентификация веществ проводится по времени удержания - величине, измеряемой временем выхода данной зоны от момента ввода пробы в колонку.

Время удержания определяет качественный состав смеси.

Для идентификации веществ на хроматограмме используют степень разделения - Rf. Степенью разделения называют величину, измеряемую отношением расстояния l(Xi), пройденного веществом Xi, к расстоянию (линии фронта), пройденному растворителем l(P). Например, для новокаина (Xi = H) Rf = l(H)/l(P).

Площадь пика каждого вещества на хроматограмме при малых концентрациях пропорциональна содержанию этого вещества в пробе. Таким способом определяют количественный состав смеси.

Газовая хроматография, в особенности с масс-спектрометрическим детектированием (газовая хромато-масс-спектрометрия), - один из наиболее мощных и широко используемых методов. Она дает очень высокое хроматографическое разрешение, но для определения многих биомолекул требуется химическая дериватизация - получение производных анализируемых веществ в целях улучшения характеристик разделения и детектирования. Без химической дериватизации могут анализироваться только летучие соединения.

Жидкостная хроматография (ЖХ). В жидкостной хроматографии подвижной средой является растворитель-носитель (вода, метанол, ацетонитрил, смеси растворителей).

Неподвижной фазой могут служить кремнийорганические соединения, привитые на стенку трубки, или диспергированные SiO_2 или Al_2O_3 с развитой поверхностью.

В зависимости от задач анализа используют различные кремнийорганические соединения. Например, диметилдифенилполисилоксан и диметилполисилоксан (рис. 3.7).

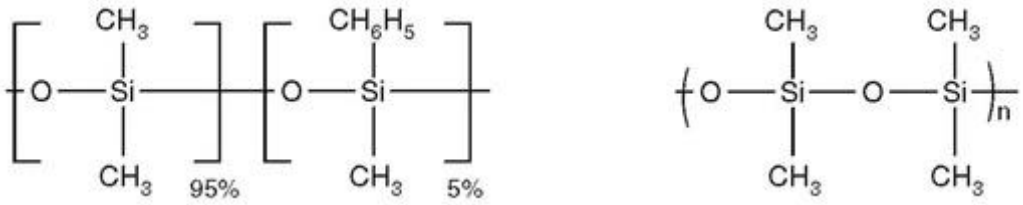


Рис. 3.7. Полимеры диметилдифенилполисилоксан и диметилполисилоксан для неподвижных фаз жидкостных хроматографов

Кроме рассмотренных методов обнаружения и определения количества компонентов биопроб, в метаболомике широко используются ряд других хроматографических методов. К ним относятся:

- газожидкостная хроматография (ГЖХ);
- высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ);
- капиллярный электрофорез (КЭФ);
- адсорбционная хроматография (АХ);
- распределительная хроматография (РХ);
- ионообменная хроматография (ИОХ);
- хемосорбционная хроматография (ХСХ);
- молекулярно-ситовая хроматография (МСХ).

Как и газовый, жидкостный хроматограф представляет собой систему блоков, предназначенных для проведения хроматографического анализа (рис. 3.8).

Резервуар с подвижной фазой (1) и система подачи элюента (2, 3, 5) обеспечивают поток элюента с регулируемой скоростью. Современные хроматографы снабжены автоматизированной системой ввода пробы и системой термостатирования колонки (4). Выход колонки соединен с детектором (7) и коллектором фракций (8) (в жидкостной хроматографии, как правило, разделение сочетается с препаративным выделением фракций). На выходе из колонки стоит детектор (9), сигнал которого передается на регистрирующий прибор (самописец), монитор компьютера и принтер.

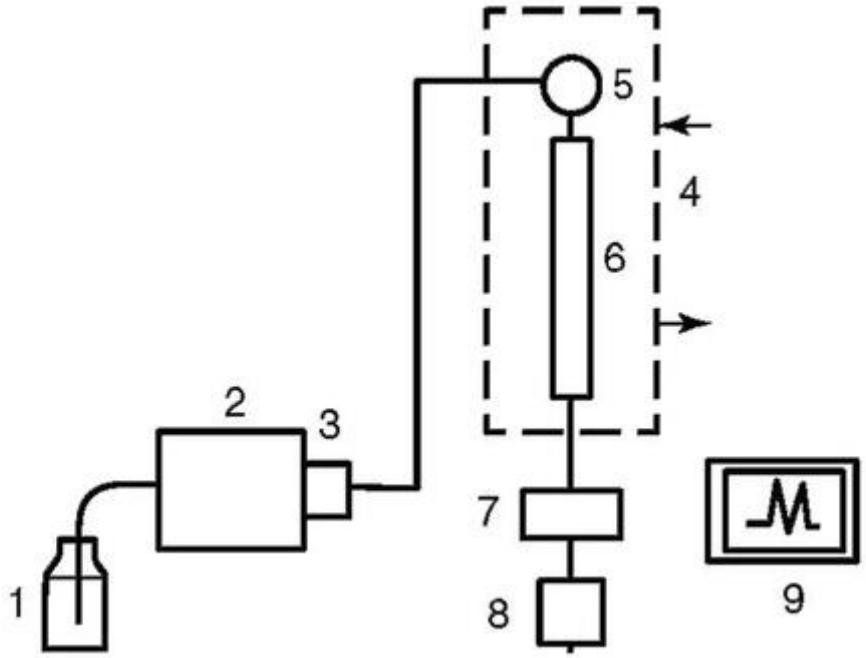


Рис. 3.8. Блок-схема жидкостного хроматографа: 1 - источник элюента (подвижной фазы); 2 - насос; 3 - фильтр; 4 - термостат; 5 - блок ввода пробы; 6 - хроматографическая колонка в термостате; 7 - детектор; 8 - коллектор фракций; 9 - регистрирующий прибор с монитором (компьютер)

Различная скорость перемещения отдельных компонентов смеси вдоль стационарной фазы связана со сложным характером взаимодействия в системе «вещества - подвижная фаза - неподвижная фаза». Адсорбционную, распределительную, ионообменную, хемосорбционную и молекулярно-ситовую хроматографии различают по доминирующему механизму разделения веществ. На практике часто реализуется одновременно несколько механизмов разделения, например адсорбционно-распределительный.

В газожидкостной хроматографии разделение газовой смеси основано на различной летучести или растворимости компонентов пробы в жидкости. Неподвижной фазой служит жидкость, нанесенная на инертный носитель, подвижной - газ.

Этот метод можно использовать для анализа газообразных, жидких и твердых веществ с молекулярной массой меньше 400 Д. Анализируемые вещества должны удовлетворять определенным требованиям, главные из которых - летучесть, термостабильность, инертность, легкость получения. Этим требованиям в полной мере удовлетворяют, как правило, органические вещества, поэтому газовую хроматографию широко используют как серийный метод анализа органических соединений.

Высокоэффективная жидкостная хроматография имеет более низкое хроматографическое разрешение по сравнению с газовой хроматографией. Этот недостаток компенсируется более широким рядом соединений, которые потенциально могут быть измерены.

Капиллярный электрофорез имеет более высокую теоретическую эффективность разделения, чем ВЭЖХ, и может использоваться для исследования более широкого диапазона соединений, чем газовая хроматография. Как и все электрофоретические методы, он наиболее удобен для разделения ионов.

Адсорбционная хроматография основана на различии адсорбционных свойств разделяемых веществ. Компоненты, не адсорбируемые на стационарной фазе, находятся только в подвижной фазе. Скорость их перемещения в разделительной системе максимальная. Наоборот, хорошо адсорбируемые компоненты задерживаются на стационарной фазе и медленно передвигаются вдоль нее.

Распределительная хроматография основана на различиях в коэффициентах распределений (закон Нернста), представляющих собой отношение концентрации вещества в неподвижной жидкой фазе на носителе к таковой в подвижной газовой или жидкой фазе.

В ионообменной хроматографии разделение ионов веществ определяется различием термодинамических констант ионного обмена. Разделение ионов осуществляется путем обратимого обмена катионов и анионов на соответствующих полиионитах (смолах), которые подразделяются на катиониты и аниониты.

В хемосорбционной хроматографии разделение веществ определяется различием термодинамических констант химического равновесия разных типов: констант растворимости (осадочная хроматография), нестойкости комплексных соединений (адсорбционно-комплексообразовательная хроматография), равновесия окислительно-восстановительных реакций (редокс-хроматография).

К хемосорбционной хроматографии относится аффинная хроматография, основанная на высокой специфичности взаимодействия субстрата с ферментом. Стационарная фаза содержит либо фермент, либо субстрат. В анализируемой смеси будет «вылавливаться» партнер соответствующей фермент-субстратной реакции.

В молекулярно-ситовой хроматографии (устаревшее название - гель-фильтрация) в качестве стационарной фазы используют молекулярные сита - пористые тела, в порах которых задерживаются молекулы только определенного размера. Этот метод позволяет анализировать смеси, содержащие вещества со значительно различающимися размерами молекул. Крупные молекулы не попадают в поры и перемещаются по разделительной колонке быстрее, чем мелкие. Молекулярно-ситовая хроматография чрезвычайно широко применяется в биохимии для разделения смесей биополимеров (например, белков) на фракции.

Хроматографию широко применяют в медико-биологических исследованиях и в традиционной клинической и фармацевтической практике.

С помощью хроматографии можно быстро провести анализ крови на присутствие в ней алкоголя, наркотиков, летучих веществ, вызывающих токсикоманию. Хроматографию применяют для допинг-контроля (обнаружения допингов, запрещенных стимулирующих веществ в организме спортсменов).

В биологических жидкостях с помощью хроматографии можно выявить не определяемые другими методами микрокомпоненты, которые появляются при наличии той или иной патологии.

В клинических и аналитико-фармацевтических лабораториях широко применяется тонкослойная хроматография.

Аффинная хроматография

Аффинная хроматография (от лат. *affinis* - «родственный») (биоспецифическая хроматография, хроматография по сродству) - метод очистки, разделения и анализа биополимеров. Метод основан на избирательном взаимодействии биополимеров с молекулами вещества-лиганда (линкеров), ковалентно связанных с инертным носителем на неподвижной фазе.

Например, при анализе ферментов лигандами служат их субстраты, ингибиторы или коферменты.

Высокая эффективность аффинной хроматографии обусловлена тем, что разделение основано на специфических функциональных свойствах, отличающих данный фермент от множества различных биополимеров. Лиганд обычно удерживается ковалентными связями, используются также ионный обмен. Другие виды хроматографии (см. выше) основаны на различии физико-химических свойств молекул - заряда, формы, размера.

В аффинной хроматографии используется нерастворимый носитель, на котором иммобилизуется соединение, называемое лигандом. Связывание с лигандом происходит в соответствии со специфическими свойствами молекул лиганда и анализируемого вещества. Связывание осуществляется путем разных взаимодействий: ионных, водородных, гидрофобных и других, в зависимости от конформации и размера молекул.

Лиганд связывает анализируемое вещество, находящееся в подвижной, обычно жидкой фазе. Раствор, в котором находятся молекулы анализируемых веществ, вступает в контакт с неподвижным лигандом. Из всех веществ удерживаются те, чьи молекулы способны соединяться с лигандом. Разрыв связей может происходить за счет действия агента, связывающегося с молекулой вместо лиганда, или агента, способного связываться с лигандом вместо молекулы.

Неподвижная фаза в аффинной хроматографии представляет собой специально приготовленный сорбент, построенный по схеме «носитель- соединяющее звено - лиганд». Носителем служит чаще всего сефарозапроизводное агарозы с поперечными сшивками. Присоединение к агарозе лиганда, содержащего, например, аминогруппу, осуществляется после активации сефарозы бромцианидом.

Содержание лиганда колеблется от 0,1 до 10 мкмоль на 1 г влажного сорбента. Сефароза, однако, малоустойчива к действию различных химических реактивов и микроорганизмов. Именно поэтому применяют более стабильные макропористые неорганические носители (силикагель) и синтетические полимеры.

Выбор лиганда зависит от субстрата. Например, при разделении амилаз применяют крахмал или гликоген. Однако их превращение в ходе анализа постоянно изменяет свойства сорбента. Именно поэтому применяют ингибиторы ферментов - аналоги субстратов, устойчивые к дальнейшему превращению.

Например, для анализа протеиназ используют не расщепляемые протеиназами пептиды D-аминокислот. Эффективны такие природные ингибиторы ферментов, как пепстатин - ингибитор аспартильных протеиназ. Иногда применяют лиганды, связывающие большие группы родственных ферментов (в частности, киназы и дегидрогеназы). Примерами таких группоспецифических лигандов могут служить антрахиноновые красители, аналоги никотинамидаденилдинуклеотида.

Разделение в аффинной хроматографии обычно проводят на хроматографических колонках.

Помимо ферментов, методом аффинной хроматографии можно выделять также токсины, рецепторы, ингибиторы, транспортные белки и другие биологически активные вещества. Высокой избирательностью отличается иммуносорбция - хроматография, в которой в качестве лигандов используют антитела, обладающие специфичностью к выделяемым белкам.

Для разделения белков применяют также ряд других методов.

Ковалентная хроматография основана на избирательном образовании и последующем расщеплении ковалентных связей между выделяемым веществом и носителем, например между белком с SH-группами и ртутьорганическими производными агарозы.

Применяется также лигандообменная (металлохелатная) хроматография, при которой ферменты связываются через функциональный ион металла (например, кадмия или никеля в никель-хелатной хроматографии) с комплексоном, иммобилизованным на носителе.

Метод металлохелатной хроматографии особенно широко применяют при очистке генно-инженерных белков, генетический код которых заклонирован в специально синтезированных плазмидах. Молекула такого белка экспрессируется с присоединенной к ней полигистидиновой концевой группой, которая специфически связывается ионом металла при введении в колонку. Примеси при элюировании не задерживаются и выходят из колонки. В результате достигается высокая чистота выделяемого белка. При необходимости возможно провести ренатурацию связанных на сорбенте белков.

Распространен метод гидрофобной аффинной хроматографии. В этом методе сорбент (например, фенилсефароза), содержащий гидрофобные группировки гидрофильной матрицы, взаимодействует с гидрофобными участками на поверхности молекул белка.

Избирательное разделение гликопротеинов обеспечивают иммобилизованные на носителях лектины - белки, специфически взаимодействующие с концевыми моносахаридными звеньями углеводных цепей.

Аффинная хроматография используется для анализа различных биопроб, в частности для определения содержания индивидуальных белков.

На аффинной хроматографии основан, например, метод определения содержания HbA_{1c}, признанный «золотым стандартом».

Заполняющий хроматографические колонки сорбент обеспечивает на первой стадии специфическое связывание HbA_{1c} (фракции Б) и его отделение от негликозилированной фракции (фракции А). На второй стадии происходит полное вытеснение гликозилированной фракции за счет вымывания из сорбента растворителем.

По измеренным оптическим плотностям обеих фракций при длине волны 414 нм можно вычислить содержание гликозилированного гемоглобина HbA_{1c}.

3.2.2. Масс-спектрометрия

Различные масс-спектрометры (рис. 3.9) представляют собой приборы для разделения ионизированных молекул или атомов по их массам путем воздействия магнитных и электрических полей на пучки ионов, летящих в вакууме.

Рис. 3.9. Блок-схема масс-спектрометра: 1 - система подготовки и введения исследуемого образца (в частности, хроматограф); 2 - ионный источник (ионизационная камера масс-спектрометра); 3 - масс-анализатор; 4 - приемник ионов; 5 - система обработки данных; 6 - компьютер; 7 - масс-спектр; 8 - откачные устройства

Масс-спектрометр (рис. 3.9) содержит:

• блок подготовки исследуемого образца (1);

• ионный источник, где вещества образца частично ионизуются и происходит формирование ионного пучка (2);

• масс-анализатор, в котором происходит разделение ионов по массам (3);

• приемник ионов, где ионный ток преобразуется в электрический сигнал (4);

• система обработки данных (5);

• устройство регистрации сигнала (компьютер) (6);

• монитор (7).

В масс-спектрометре сначала происходит ионизация молекул с образованием газообразных ионов, затем идет разделение ионов, регистрация их масс и относительных количеств. Исследуемый образец переводится в газообразное состояние до или в процессе ионизации.

Каждый положительный или отрицательный ион характеризуется отношением его массы к заряду (m/z). В соответствии с этим отношением происходит разделение различных ионов.

Для разделения ионов по отношению массы к заряду используют анализаторы. Например, наиболее часто применяемыми являются магнитные, электростатические и квадрупольные анализаторы. Тип используемого анализатора в значительной степени определяет одну из важнейших характеристик масс-спектрометров - разрешающую способность, определяющую точность, с которой может быть установлена масса иона.

Помимо информации о количестве ионов (ионном токе), из анализатора поступает также информация о массе ионов. Одновременно с записью хроматограммы на мониторе, обычно на вершине хроматографического пика, регистрируется масс-спектр, по которому устанавливается строение веществ.

В общем случае разрешающую способность масс-спектрометра определяют как соотношение измеряемой массы к разности масс между двумя соседними идентифицируемыми ионами: $R = M/\Delta M$.

На рис. 3.10 приведен масс-спектр диэтилацеталя.

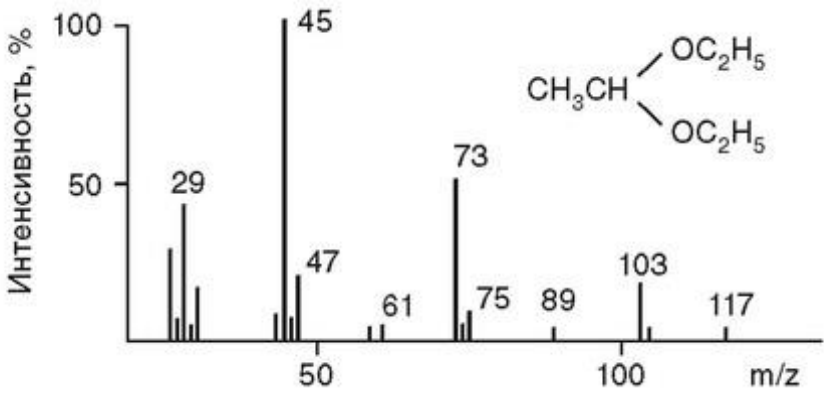


Рис. 3.10. Масс-спектр диэтилацеталя

Пики спектра относятся к фрагментам, на которые распадаются молекулы диэтилацеталя при ионизации. На основе анализа закономерностей фрагментации можно показать, что данный масс-спектр соответствует диэтилацеталю.

Нахождение зависимости между пиками масс-спектра и строением анализируемого вещества - основная задача масс-спектрометрии.

При ионизации органических молекул образуются молекулярные ионы, которые в результате разрыва химических связей с перегруппировкой атомов в осколочных ионах могут подвергаться дальнейшему распаду. Последовательность (направление) распада ионов устанавливается по масс-спектрам. Совокупность всех направлений распада составляет характерную для каждого органического соединения схему фрагментации.

В случае сложных масс-спектров схема фрагментации отвечает многим, часто перекрывающимся направлениям распада.

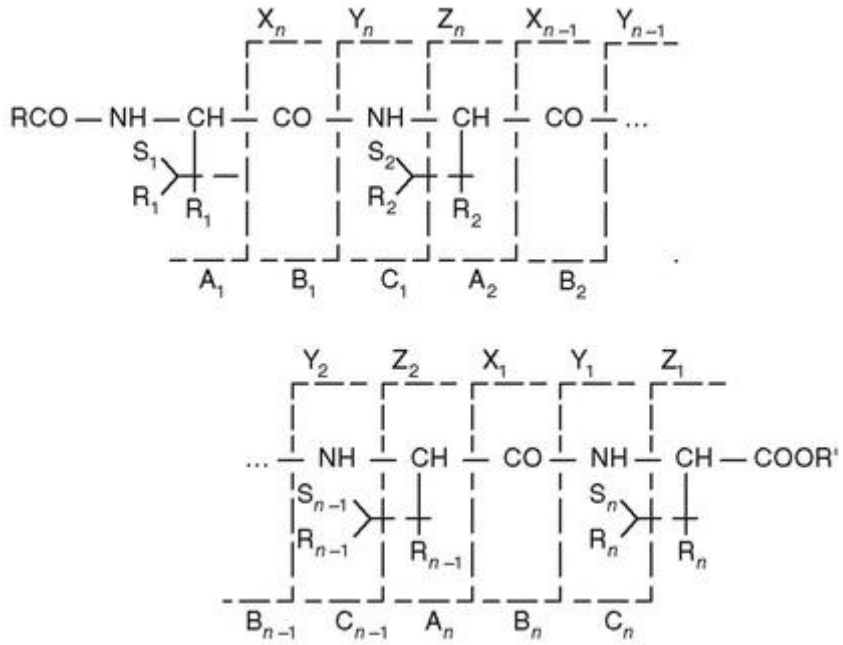


Рис. 3.11. Схема фрагментации полипептида в ионизационной камере масс-спектрометра

В качестве примера на рис. 3.11 приведена схема фрагментации полипептида. Молекулярный ион пептида распадается в результате разрыва связей CH-CO, CO-NH, NH-CH и CH-R с образованием осколочных ионов A_n и X_n, B_n и Y_n, C_n и Z_n, S_n и R_n (n - номер аминокислотного остатка в пептидной цепи). Осколочные ионы распадаются далее аналогичным образом.

Число пиков соответствующих ионов в масс-спектре полипептида может достигать нескольких сотен. Количество фрагментов определяется строением молекул исследуемого вещества.

Путем стандартизации условий измерений получают достаточно воспроизводимые масс-спектры. Масс-спектр исследуемой системы программа сравнивает со спектрами, имеющимися в каталоге, записанном в памяти компьютера. Таким путем быстро осуществляются структурный анализ и идентификации веществ в исследуемой системе. Именно поэтому масс-спектрометрия и хромато-масс-спектрометрия широко используются при изучении процессов метаболизма, контроле за продуктами питания, определении загрязнения окружающей среды, в криминалистике.

Наряду со структурными исследованиями масс-спектрометрию применяют для количественного анализа органических веществ.

Количественный анализ основан на определении интенсивностей пиков ионов определенным значением m/z в масс-спектрах.

Количественный анализ проводят на хромато-масс-спектрометрах. При этом применяют метод внутренних стандартов. В качестве таких стандартов используют соединения, близкие по строению к исследуемым, в частности меченые соединения или их гомологи.

Более точные результаты дает применение меченых соединений. При этом нет необходимости в построении калибровочных кривых.

3.2.3. Хромато-масс-спектрометрия

Различные методы хроматографии трудоемки и не всегда дают возможность определить сложный состав биопроб при изучении метаболома. Именно поэтому в метаболомике нашли широкое применение комплексные аналитические методики, сочетающие хроматографию с различными физическими и физико-химическими методами. Особенно большое распространение получила хромато-масс-спектрометрия (рис. 3.12).

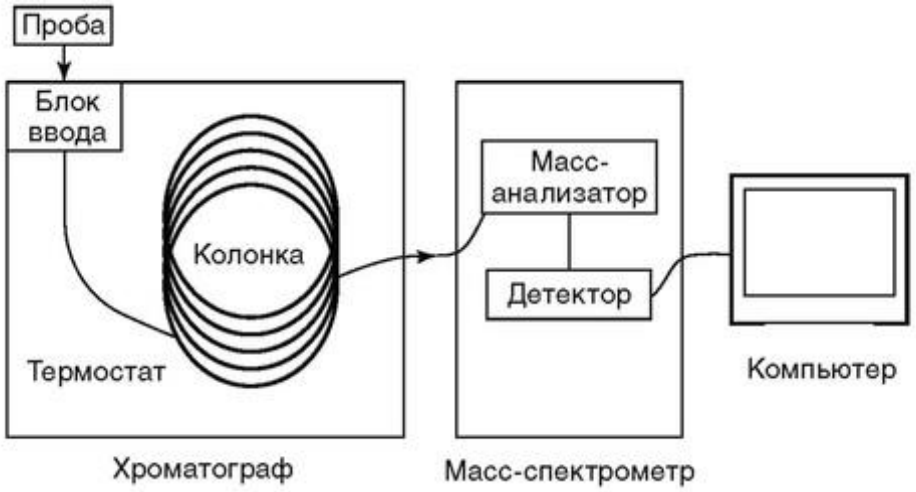


Рис. 3.12. Блок-схема хромато-масс-спектрометра

Этот метод химического анализа сочетает хорошо разработанные методики хроматографического разделения компонентов смесей с масс-спектрометрией - высокоинформативным методом определения структуры биоорганических соединений в диапазоне молярных масс от 20 до 20 000 Да и выше.

Хромато-масс-спектрометрия дает возможность анализировать олигомеры, полимеры, полярные соединения, содержащие большое число ионогенных групп, то есть те вещества, которые не проходят через хроматографическую колонку хроматографа.

Хроматографию делят на газовую и жидкостную в зависимости от агрегатного состояния подвижной фазы (элюента). В хромато-масс-спектрометрии применяют оба метода разделения компонентов смеси.

Масс-спектрометр (масс-анализатор) в хромато-масс-спектрометрии по существу представляет собой детектор компонентов смеси, разделенных в колонке хроматографа (см. рис. 3.5).

Для стыковки хроматографа и масс-спектрометра используют блок стыковки (рис. 3.13).

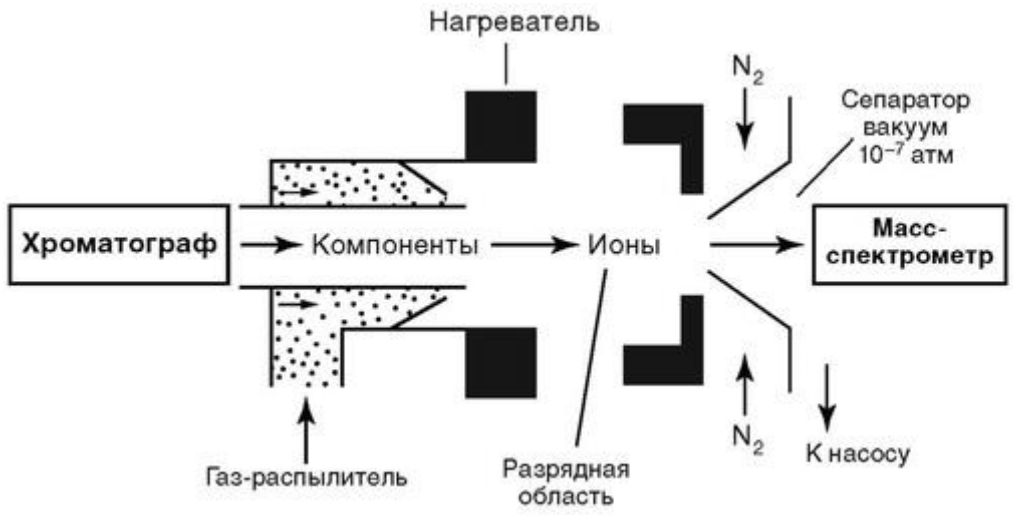


Рис. 3.13. Стыковочный блок (интерфейс) жидкостного хроматографа и масс-спектрометра

Жидкий поток из колонки жидкостного хроматографа направляется в газовый распылитель. Здесь жидкость распыляется в аэрозоль и смешивается с большим количеством нагретого газа-распылителя (азота или воздуха). Затем аэрозоль жидкого раствора с компонентами пробы перемещается в нагреватель. Здесь раствор испаряется и переходит в газовую фазу. Далее газообразный образец поступает в разрядную область ионизации.

Ионизация происходит при атмосферном давлении в коронном разряде либо под действием бета-излучения. Далее под действием электрического поля ионизированные частицы поступают в вакуум-сепараторы. Здесь происходит откачка молекул газа и растворителя, а ионизированные частицы образца (ионный ток) попадают в камеру масс-спектрометра с глубоким вакуумом.

С помощью установленного в масс-спектрометре датчика, реагирующего на изменение полного ионного тока, записывают хроматограммы. Именно поэтому масс-спектрометр можно рассматривать как универсальный детектор к хроматографу.

Газовая хроматография хорошо сочетается с масс-спектрометрами с ионизацией электронным ударом или химической ионизацией, поскольку в колонке газового хроматографа вещества находятся в газовой фазе. Биологические соединения не разделяются на компоненты с помощью газовой хроматографии, поэтому применяют жидкостную хроматографию.

Для стыковки жидкостного хроматографа с масс-спектрометром используют источники ионизации в электроспрее и химической ионизации при атмосферном давлении.

3.2.4. Тандемная масс-спектрометрия

В мировой практике здравоохранения все более широкое применение находит тандемная масс-спектрометрия (МС-МС, квадрупольная). Тандемная масс-спектрометрия - методика точного количественного анализа следовых количеств вещества в сложных матрицах. Эта методика позволяет проводить анализ нескольких сотен соединений в микроколичествах биологического материала.

В частности, тандемная масс-спектрометрия используется для массового скрининга новорожденных на наследственные болезни обмена веществ (НБО). В пятне высушенной крови возможно определение различных аминокислот и ацилкарнитинов.

Количественное определение этих веществ позволяет исключать несколько десятков наследственных заболеваний, относящихся к различным классам НБО (нарушения метаболизма аминокислот, органических кислот и дефектов митохондриального бета-окисления жирных кислот).

Ранее для диагностики этих нарушений использовали большое количество биологического материала, проводили несколько исследований (аминокислотного анализа, хромато-масс-спектрометрии, определения спектра ацилкарнитинов), что требовало значительного времени и материальных затрат.

Наследственные нарушения метаболизма аминокислот, органических кислот и дефектов митохондриального бета-окисления жирных кислот насчитывают около 100 нозологических форм, большинство из которых проявляется в неонатальном периоде. Тандемная масс-спектрометрия позволяет количественно определить все эти соединения в ходе одного анализа. Некоторые из перечисленных НБО поддаются эффективной терапии, и вовремя начатое лечение может спасти жизнь ребенку. Поздняя диагностика нарушений не позволяет предупредить инвалидность и смертельный исход.

В последнее время в практику молекулярной диагностики внедряется хромато-тандемная масс-спектрометрия.

3.2.5. Электрофорез

Электрофорезом называют перемещение ионов и других заряженных частиц в жидкой фазе под действием внешнего электрического поля, преимущественно высокого напряжения.

Если раствор находится в тонком капилляре, например в кварцевом, то электрическое поле, наложенное вдоль капилляра, вызывает в нем движение заряженных частиц и пассивный поток жидкости (рис. 3.14). Положительно заряженные частицы движутся к катоду, отрицательно заряженные - к аноду. Качественно электрофорез аналогичен электролизу. Различие количественное: под действием электрического поля в первом случае движутся частицы, во втором - ионы.

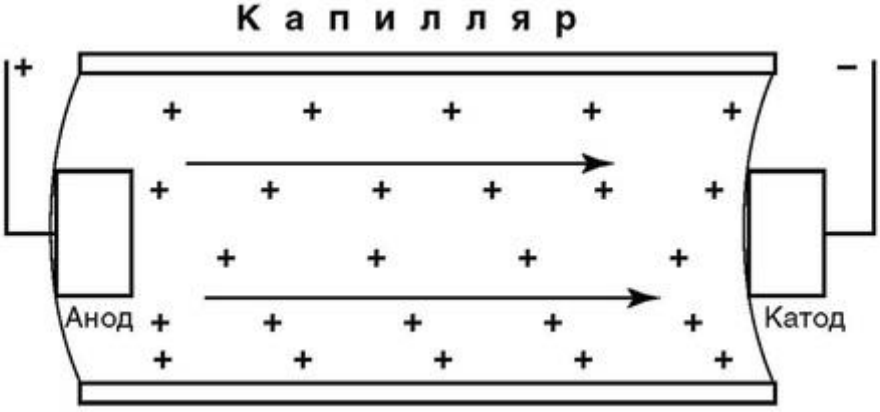


Рис. 3.14. Перемещение положительно заряженных частиц в жидкой фазе под действием внешнего электрического поля в капилляре

Разделение смесей белков проводят в гелях.

Гель - вязко-упругое вещество, состоящее по крайней мере из двух компонентов - полимера и низкомолекулярной жидкости. Полимер (гелеобразователь) образует непрерывную трехмерную макромолекулярную сетку, пустоты которой заполнены жидкостью (дисперсионной средой).

Гелеобразователями могут быть как неорганические вещества (диоксид кремния, оксид алюминия), так и органические вещества (поливиниловый спирт, полиакриламид, желатин, агар-агар). Дисперсионными средами (наполнителями геля) могут быть вода, спирты, углеводороды.

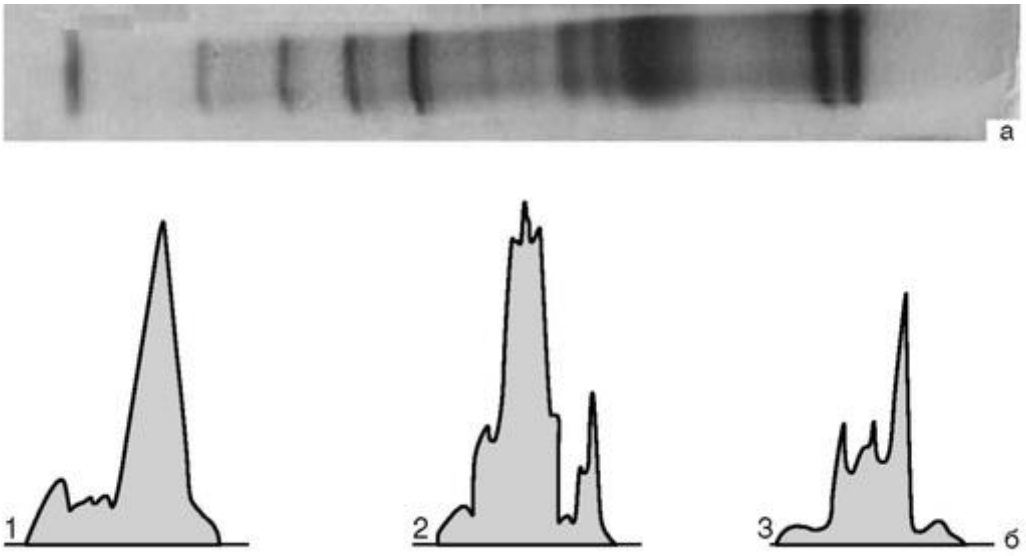


Рис. 3.15. Биопроба сывороток крови разделяется на индивидуальные компоненты при электрофорезе: а - разделение белков пробы в капилляре для электрофореза; б - электрофореграммы: 1 - сыворотка в норме; 2, 3 - сыворотки при нефрите

Скорость движения ионов в жидкости пропорциональна заряду, и молекулы с одинаковым удельным зарядом движутся с равной скоростью. При перемещении молекул белков в пространственной сетке геля под действием сил трения происходит дополнительное разделение молекул. Сила трения зависит от формы и размера молекул. Частицы с большим зарядом и меньшего размера движутся под действием электрического поля быстрее, чем частицы с меньшим зарядом и большего размера. В результате при электрофорезе смеси белков будет наблюдаться сложная картина распределения смеси на индивидуальные компоненты - электрофореграмма (рис. 3.15а).

Непосредственно после разделения можно проводить идентификацию компонентов с помощью масс-спектрометрии.

Электрофорез используют в клинических исследованиях для диагностики многих заболеваний (рис. 3.15б), разделения аминокислот, нуклеиновых кислот, антибиотиков, ферментов, антител, форменных элементов крови, бактериальных клеток, для определения чистоты белковых препаратов.

Двухмерный электрофорез

Двухмерный электрофорез (2D-электрофорез) - метод разделения и анализа смеси веществ, основанный на последовательном использовании заряда и массы молекул смеси.

Полное разделение белков пробы не всегда удается осуществить при одномерном электрофорезе. Различные белки при одномерном электрофорезе могут перемещаться в одной полосе либо в силу близости их размеров, либо при совпадении их электрофоретических подвижностей при данном pH. В таких случаях разделение смеси белков проводят в два этапа.

Вначале электрофорез проводят в одном направлении. На втором этапе полученную полоску геля с треком первого направления вырезают и накладывают на стартовую зону пластинки геля второго направления. Включают электрическое поле и проводят разделение во втором, перпендикулярном первому направлении при измененных условиях электрофореза.

Каждый трек полоски первой стадии может дать несколько пятен во втором направлении, если содержащиеся в ней белки имеют различную электрофоретическую подвижность в новых условиях. В результате после осаждения и прокрашивания на плоскости пластинки появляется картина двухмерного электрофореза - распределение пятен индивидуальных белков смеси (фингерпринт) (рис. 3.16).

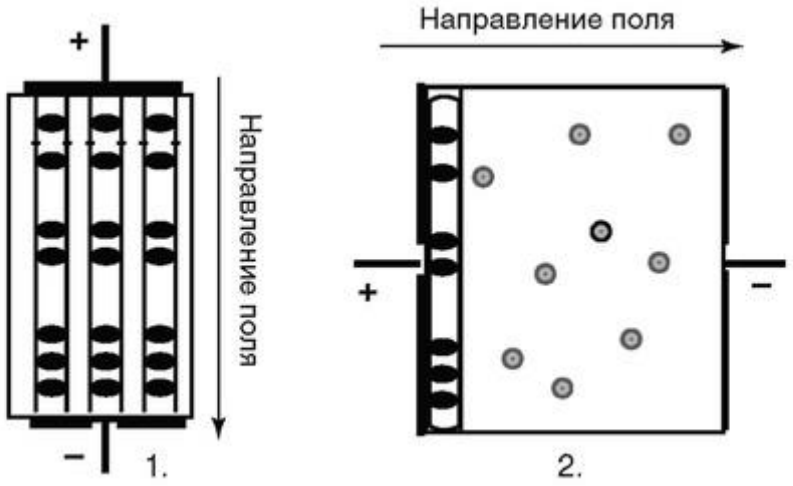


Рис. 3.16. Две стадии двухмерного электрофореза

3.2.6. Ядерно-магнитно-резонансная спектроскопия

В 70-х гг. прошлого века группа американских ученых - А. Хорнинг, Л. Полинг и А. Робинсон - разработала ряд газо-хромато-масс-спектрометрических методов мониторинга метаболитов в моче.

Одновременно стала быстро развиваться и ядерно-магнитно-резонансная (ЯМР) спектроскопия.

Метаболомные исследования с помощью ЯМР-спектроскопии проводились в основном под руководством английского исследователя Дж. Николсона в 80-х гг. прошлого века. Было показано, что протонная ЯМР-спектроскопия может быть использована для диагностики диабета. При этом для анализа метаболических профилей по данным ЯМР-спектроскопии был разработан алгоритм распознавания образцов.

В основе ЯМР-спектроскопии лежит резонансное поглощение радиочастотной электромагнитной энергии веществом, находящимся в постоянном магнитном поле (рис. 3.17).

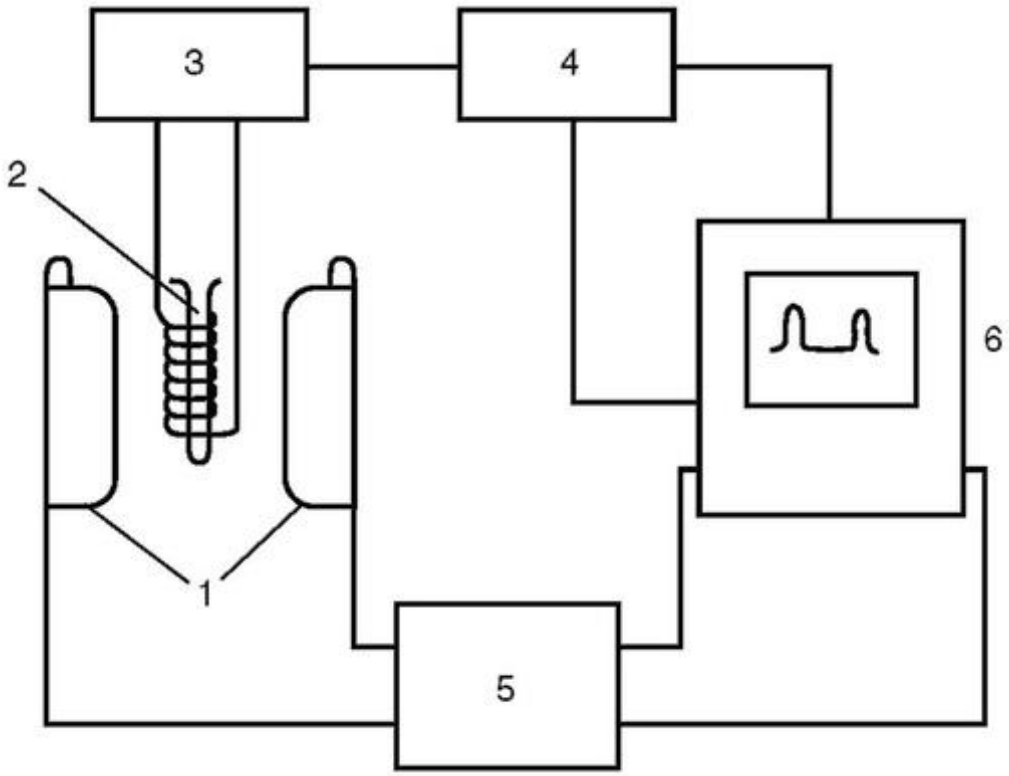


Рис. 3.17. Схема ядерно-магнитно-резонансного радиоспектрометра: 1 - полюса магнита, создающего постоянное магнитное поле (B_0); 2 - ампула с образцом исследуемого вещества; 3 - генератор радиочастотного поля (B_1); 4 - детектор; 5 - генератор модулирующего напряжения; 6 - компьютер

Спектры ЯМР регистрируют с помощью радиоспектрометров (см. рис. 3.17).

Ампулу с образцом исследуемого вещества помещают в соленоид контура, расположенного в зазоре магнита. В соленоиде генерируется слабое радиочастотное электромагнитное поле B_1. Магнит создает постоянное магнитное поле (B_0) (напряженность - 1-12 Тл), перпендикулярное радиочастотному полю (B_1). При частоте переменного поля, соответствующей энергии перехода ядерного спина, наступает резонансное поглощение. Поглощение детектируется, усиливается и подается на блок обработки сигналов компьютера.

Область поглощения, в которой наблюдается детектируемый сигнал с одним или несколькими максимумами, называется спектром ЯМР изучаемого вещества.

Поглощением радиочастотной электромагнитной энергии обладают атомы веществ с ненулевым ядерным спином. К ним относятся атомы ^{1}H, ^{2}H, ^{13}C, ^{14}N, ^{15}N, ^{19}F, ^{29}Si, ^{31}P.

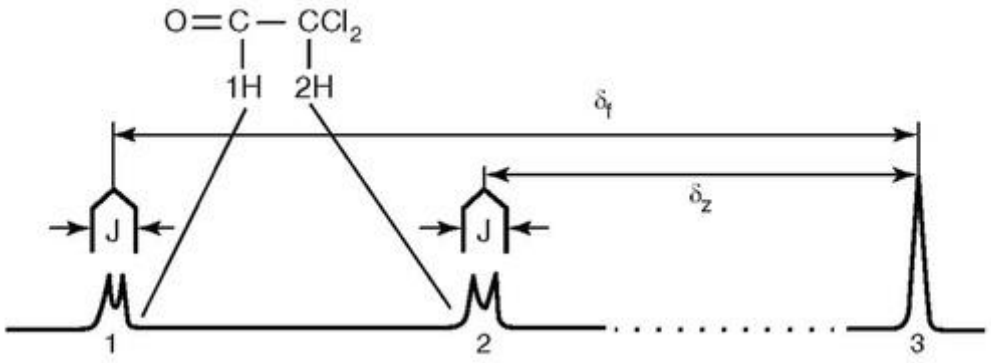


Рис. 3.18. Спектр ядерного магнитного резонанса на протонах дихлорацетальдегида (HCO-CHC12): δ_f, δ_z - химические сдвиги (м.д.) максимумов спектра протонов атомов H_1 и H_2 по отношению к максимуму 3 стандарта; J - константы спин-спинового взаимодействия (КССВ, Гц)

На рис. 3.18 в качестве примера приведен спектр ядерного магнитного резонанса на протонах (ПМР) дихлорацетальдегида $HCO\text{-}CHC1_2$.

В обычном спектре ПМР каждый имеющийся в молекуле протон дает свой максимум поглощения.

Максимумы поглощения спектра ПМР характеризуются тремя параметрами: интенсивностью, химическим сдвигом (δ) и константой спин-спинового взаимодействия (J) данного протона с другими протонами той же молекулы.

Интенсивность (площадь максимума) прямо пропорциональна содержанию протонов данного типа в образце, то есть количеству вещества.

Химический сдвиг измеряется по отношению к внутреннему стандартному веществу (чаще всего тетраметилсилану) в миллионных долях (м.д.) постоянного магнитного поля (B_0).

Константа спин-спинового взаимодействия (КССВ, Гц) характеризует величину спинового взаимодействия данного протона с другими протонами в той же молекуле.

Величина химического сдвига определяется особенностями структуры молекулы и внешними факторами, в частности спектром растворителя.

Химические сдвиги (δ) и константы спин-спинового взаимодействия (J) специфичны для каждого вещества и отличаются от этих параметров для других веществ. Следовательно, по этим двум параметрам ЯМР-спектра в принципе можно определить качественный состав смеси. По площади максимумов спектра ЯМР-вещества с помощью калибровочных кривых можно определить его количество в смеси. Соответствующие методики применяют для качественного и количественного анализа биологических проб в метаболомике.

3.2.7. Метод полимеразной цепной реакции

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) представляет собой способ определения нуклеотидных последовательностей молекул ДНК - первичной структуры ДНК (см. раздел 2.3).

Метод ПЦР имитирует естественную репликацию ДНК и позволяет обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул.

В нуклеотидной последовательности молекул ДНК закодирована генетическая информация. Каждая биологическая особь обладает своим индивидуальным набором молекул ДНК. Нуклеотидные последовательности в молекулах ДНК определяют индивидуальность особи.

Молекулы ДНК служат матрицей в первом случае для репликации, то есть копирования наследственной информации в дочерних молекулах ДНК, а во втором - для транскрипции, то есть для перекодирования информации на структуру РНК. Нуклеотидная последовательность полностью определяет молекулу РНК.

В основе метода ПЦР лежит амплификация (многократное копирование) ДНК в пробирке *(in vitro).* С помощью этого метода в течение нескольких часов можно выделить и размножить число определенных фрагментов ДНК в миллиарды раз. Возможность получения огромного количества копий одного строго определенного фрагмента генома значительно упрощает исследование имеющегося образца ДНК.

Для проведения ПЦР готовят реакционную смесь, содержащую праймеры, *Taq*-полимеразу, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ), буферный раствор.

Праймеры - пара искусственно синтезированных олигонуклеотидов размером 15-30 пар нуклеотидов, идентичных соответствующим участкам ДНК-мишени. Праймеры играют ключевую роль в образовании продуктов амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы.

Taq-полимераза - термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности (см. раздел 2.3).

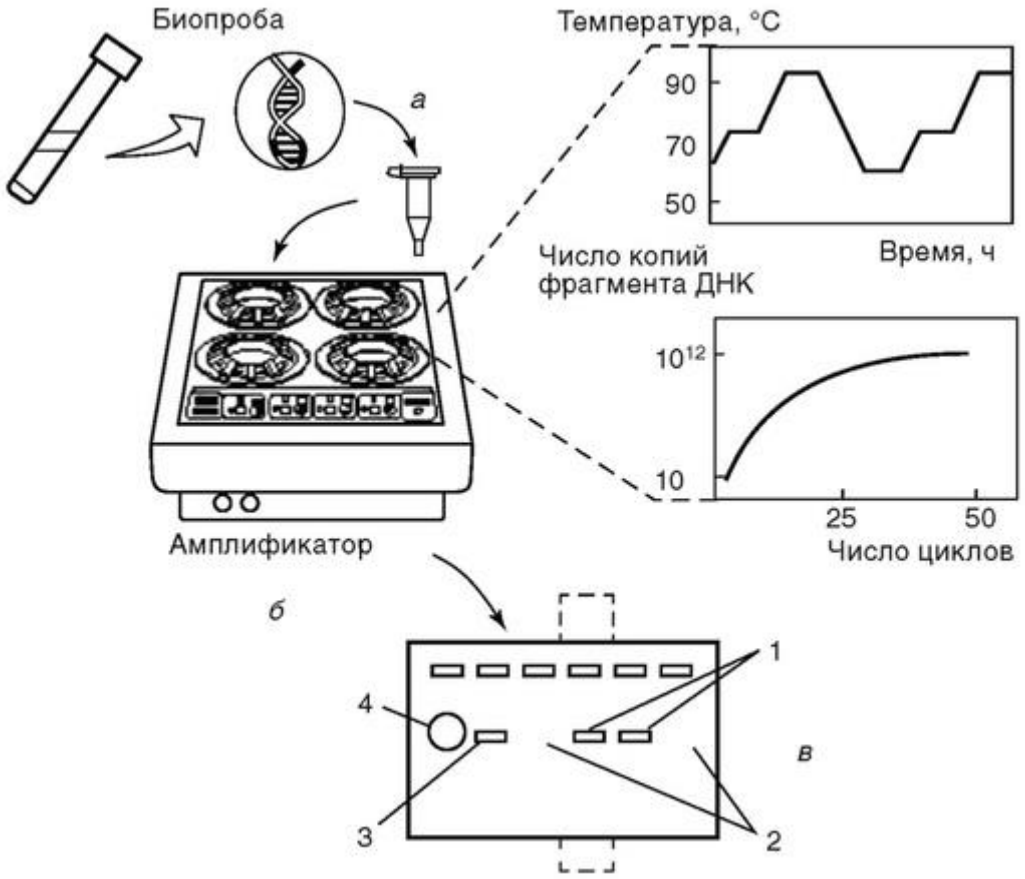


Рис. 3.19. Стадии метода полимеразной цепной реакции: а - первая стадия - выделение ДНК; б - вторая стадия - амплификация и ренатурация (отжиг); в - третья стадия - электрофоретическое определение продуктов ПЦР в агарозном геле; 1, 2 - положительные и отрицательные образцы; 3, 4 - положительный и отрицательный контроль

Смесь дНТФ - дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфат (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфат (дТТФ) - строительный материал для синтеза второй цепи ДНК, катализируемого *Taq*-полимеразой.

Буферный раствор содержит смесь катионов и анионов в определенной концентрации. Буферный раствор обеспечивает оптимальные условия для амплификации реакции при стабильном значении показателя кислотности pH.

ПЦР проводят в несколько стадий (рис. 3.19).

• Первая стадия - выделение препарата ДНК из биопробы путем экстракции (извлечения) ДНК и удаление или нейтрализация посторонних примесей для получения препарата ДНК с чистотой, пригодной для постановки ПЦР.

• Вторая стадия - амплификация и ренатурация (отжиг) в амплификаторе. Выделенный из биопробы препарат ДНК вносят в подготовленную реакционную смесь. При отсутствии в препарате исходной ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется (см. рис. 3.19).

• Третья стадия - определение продуктов ПЦР в агарозном геле. Если в анализируемом образце присутствует исходная ДНК, при амплификации с ДНК происходит ряд событий,

обеспечиваемых определенными температурными циклами. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов.

• Первый этап - термоденатурация ДНК. Реакционную смесь нагревают до 92-95 °С. В результате двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул.

• Второй этап - ренатурация, соединение праймеров с одноцепочечной молекулой ДНК-мишени.

• Третий этап - элонгация (синтез) второй цепи ДНК. Фермент *Taq*-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК, начиная с 3'-конца праймера.

иЭтапы денатурации, отжига и элонгации многократно повторяются (30 и более раз). На каждом цикле число синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается (рис. 3.20).

Накопление специфических продуктов амплификации в течение некоторого интервала времени происходит в геометрической прогрессии до достижения плато.

Для визуализации результатов амплификации на третьей стадии детекции полученных продуктов используют различные методики.

В настоящее время наиболее распространена методика горизонтального электрофореза, основанная на разделении молекул ДНК по размеру.

Для этого готовят пластину агарозного геля, представляющего собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу с добавлением специального красителя ДНК (например, бромистого этидия). В геле формируют лунки, в которые затем вносят продукты амплификации.

Пластину геля с продуктами амплификации помещают в аппарат для горизонтального электрофореза и подключают источник постоянного напряжения. Отрицательно заряженная ДНК начинает перемещаться в геле от минуса к плюсу, при этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. Все молекулы одного размера перемещаются с одинаковой скоростью. Краситель присоединятся к молекулам ДНК.

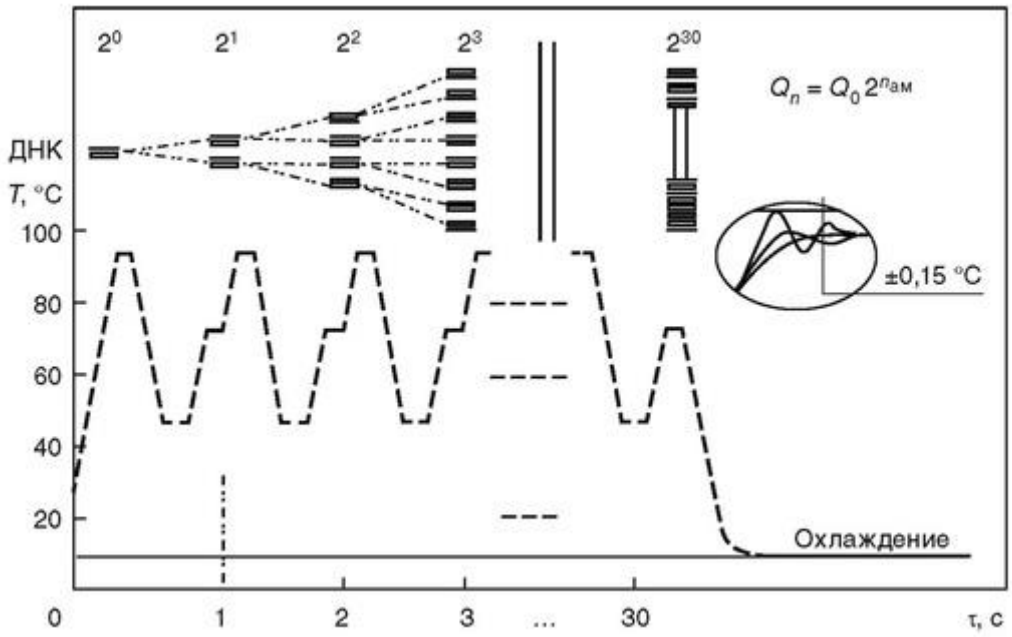


Рис. 3.20. Циклы удвоения числа синтезированных копий фрагмента дезоксирибонуклеиновой кислоты

После окончания электрофореза количество продуктов амплификации определяется в ультрафиолетовом флюориметре.

При оценке правильности результатов ПЦР следует учитывать, что данный метод не является строго количественным. Теоретически продукты амплификации единичных молекул ДНК-мишени могут быть обнаружены с помощью электрофореза уже после 30-35 циклов. Однако на практике это выполняется, когда реакция проходит в условиях, близких к идеальным, что в реальности встречается нечасто. Особенно большое влияние на эффективность амплификации оказывает чистота препарата ДНК.

Метод ПЦР - один из наиболее широко используемых в молекулярной медицине. Без него не обходится ни одна современная онкологическая клиника. Метод ПЦР применяют не только для уточненной диагностики неоплазм, но и для подбора пар «донор-реципиент» при трансплантациях органов и тканей, детекции сопутствующих инфекционных патологий.

В отличие от хромато-масс-спектроскопии, метод ПЦР менее пригоден для оценки макроструктуры гена, но является уникальным подходом к детальному анализу отдельных его фрагментов.

3.2.8. Секвенирование

Секвенирование - анализ последовательности мономеров в цепи полимера - подразумевает изучение последовательности ДНК или белков различными инструментальными средствами биоинформатики.

На рис. 3.21 представлены две основные стадии секвенирования.

Процедура секвенирования в основном включает следующие этапы.

- Разделение пробы на индивидуальные компоненты.
- Расшифровку последовательности по данным разделения пробы.
- Сравнение последовательности с другими последовательностями (поиск подобия).
- Идентификацию генов и их экспрессии.
- Предсказание структур белка.
- Картирование генома.

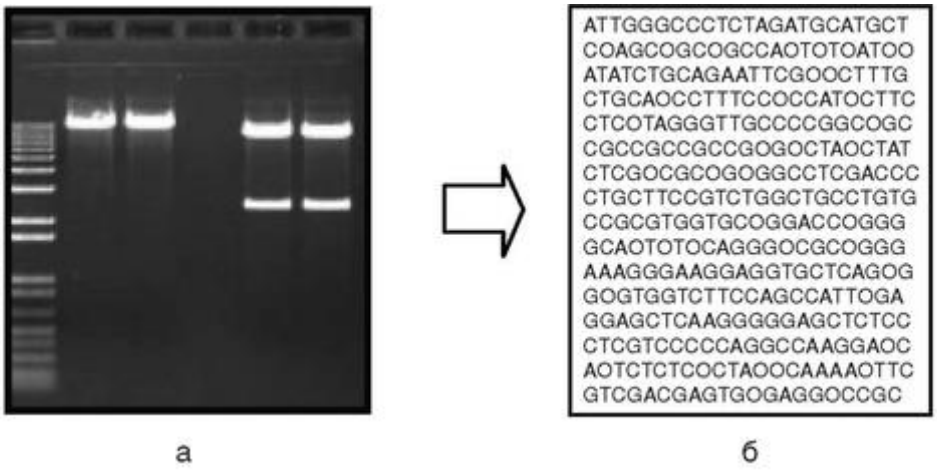


Рис. 3.21. Схема секвенирования: а-разделение пробы в геле на индивидуальные компоненты при электрофорезе; б - идентификация ДНК-последовательности

3.2.9. Молекулярные детекторы на базе атомно-силовых чипов

К диагностическим системам нового поколения относятся молекулярные детекторы на базе атомно-силовых чипов, с помощью которых в сыворотке крови выявляют маркеры заболеваний, например маркеры вирусных частиц гепатитов В и С.

Актуальность диагностики вирусных гепатитов В и С обусловлена широкой распространенностью этих заболеваний и их ростом в последние годы. Вирус гепатита С (HCV - *Hepacivirus, Flaviviridae)* - РНК-содержащий вирус. Долгое время предполагали существование вируса гепатита С, однако сам вирус оставался неизвестен.

В настоящее время основными методами анализа маркеров заболеваний вирусными гепатитами являются иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Эти методы зарекомендовали себя как высокоспецифичные и высокочувствительные.

Чувствительность метода ПЦР высока - можно определить несколько копий нуклеиновой кислоты. Но с помощью ПЦР возможно детектировать только нуклеиновые кислоты, но не белки, в то время как многие маркеры инфекционных заболеваний имеют белковую природу.

Полный анализ протеома клеток, тканей, органов и биологических жидкостей осуществляется с помощью двухмерного электрофореза с высоким разрешением и с

последующей масс-спектрометрической идентификацией индивидуальных белков. Этот метод позволяет проанализировать до 10 000 индивидуальных белков в одном образце и зафиксировать изменения их концентраций.

Однако диагностика на ранних стадиях инфекционных заболеваний на основе этих методов недостаточно эффективна.

Существенным недостатком традиционных методов протеомдиагностики, в частности иммуноферментного анализа, является низкий предел обнаружения порядка 10^{-12} моль/л при анализе белков в биопробах.

Подходы, позволяющие определять белки в многокомпонентных биопробах при концентрациях ниже 10^{-12} моль/л, основаны на использовании методов регистрации и идентификации единичных молекул с помощью молекулярных детекторов.

Молекулярный детектор на базе атомно-силового микроскопа (АСМ) основан на измерении силы взаимодействия зонда атомно-силового микроскопа с молекулами, иммобилизованными на поверхности АСМ. При сканировании зондом вдоль такой поверхности измеряется высота молекул и их комплексов.

В диагностических аппаратно-программных комплексах АСМ комбинируются метод АСМ-регистрации с методами специфического связывания биомолекул из раствора с молекулами-зондами, иммобилизованными на подложке (неспецифическая сорбция компонентов сыворотки крови - фишинг). Данный подход может быть использован в молекулярной диагностике для выявления различных белков в многокомпонентных биопробах.

Примером молекулярной диагностики на основе АСМ-чипов может служить выявление в сыворотке крови маркеров заболеваний вирусными гепатитами (HCV) B и C: HBsAg и HCV*core*Ag.

На первом этапе молекулярной диагностики гепатитов проводят фишинг. Для этого АСМ-чип помещают в раствор, содержащий маркеры гепатитов B и C. На втором этапе подсчитывают образовавшиеся иммунокомплексы на поверхности чипа с помощью зондирования атомно-силовым микроскопом.

Был проведен ХС-МС-анализ белков, содержащих HGV, в различных образцах сыворотки крови.

ХС-МС-анализ положения в аминокислотной последовательности наиболее часто идентифицируемых пептидов *HCVcoreAg* показал, что все они принадлежат к консервативным областям HCVcoreAg .

Полученные данные выявили неравномерность частоты встречаемости пептидов HCVcoreAg в ХС-МС-идентифицированных белках.

Данная информация может быть полезна для проведения диагностических анализов на основе масс-спектрометрии.

В ряде случаев в МС-спектрах белков, биоспецифически сорбированных на поверхность рабочей зоны АСМ-чипов в биопробе крови, помимо белкового маркера ВГС - HCV*core*Ag, был выявлен другой белковый маркер - поверхностный гликопротеин E_2.

Соответствующие данному гликопротеину E_2 пептиды представлены на масс-спектре рис. 3.22.

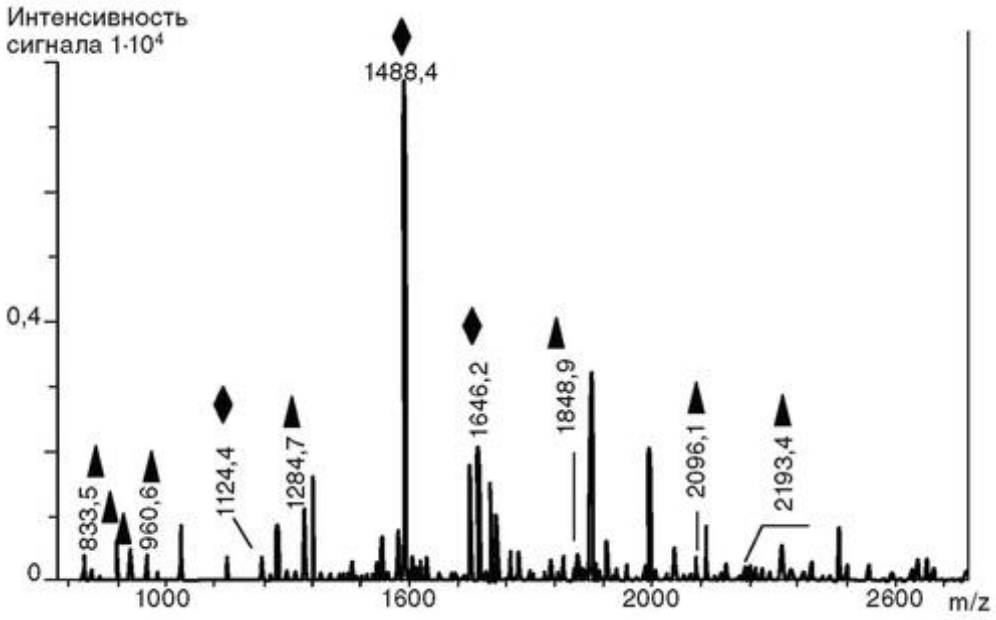


Рис. 3.22. Масс-спектр рабочей зоны АСМ-чипа с анти-HCV*corein*после инкубации в сыворотке, содержащей вирусные частицы гепатита С. 1. ▲ - фрагменты HCVcoreAg; 2. ♦ - фрагменты гликопротеина E_2

Идентификация вирусного белка E_2 повышает достоверность результатов АСМ-МС-анализа. Следует отметить, что те же пептиды были идентифицированы и при ESI-МС/МС-анализе рекомбинантного HCVcoreAg из биопробы плазмы крови.

МС-анализ с применением электроспрейного типа ионизации (ESI) АСМ-чипов после инкубации в растворах образцов сыворотки крови позволил на поверхности АСМ-чипа идентифицировать маркерный белок HCV - HCVcoreAg. Полученные результаты АСМ-МС-анализа с двумя различными типами ионизации образцов хорошо согласуются между собой (рис. 3.23).

3.3. ОБОБЩЕННЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ

Анализ данных в метаболомике основан на методах биоинформатики.

В биоинформатике используют вычислительную технику, математику и теорию информации для анализа и моделирования биологических систем, состоящих из генов, РНК, белков и метаболитов, на основе сформированных баз данных.

С появлением высокопроизводительных метаболомных технологий объем биологических данных и публикаций по метаболомике быстро возрастает.

Существенная часть полученных биологических данных указывает на генотипические особенности многих модельных организмов.

Секвенирование подразумевает изучение последовательности ДНК или белков различными инструментальными средствами биоинформатики, в частности такими методами, как выравнивание последовательности, анализ базы данных

последовательностей, повторных исследований последовательности, вторичного предсказания структуры и других методов на компьютере.

Следовательно, слово *in silico* часто применяется в сочетании со многими методами секвенирования. Это означает «использование компьютера» или «в компьютере». Такими инструментальными средствами и методами биоинформатики в конечном счете стремятся определять биологические функции и структуру генов и белков, которые они кодируют.

Важной проблемой является недостаточная разработанность методов корреляции характерных генотипических особенностей с фенотипическими свойствами организмов. Решение этой проблемы необходимо для внедрения научных результатов в практику метаболомной диагностики патологий на основе геномных данных и рекомендаций по лекарственной терапии.

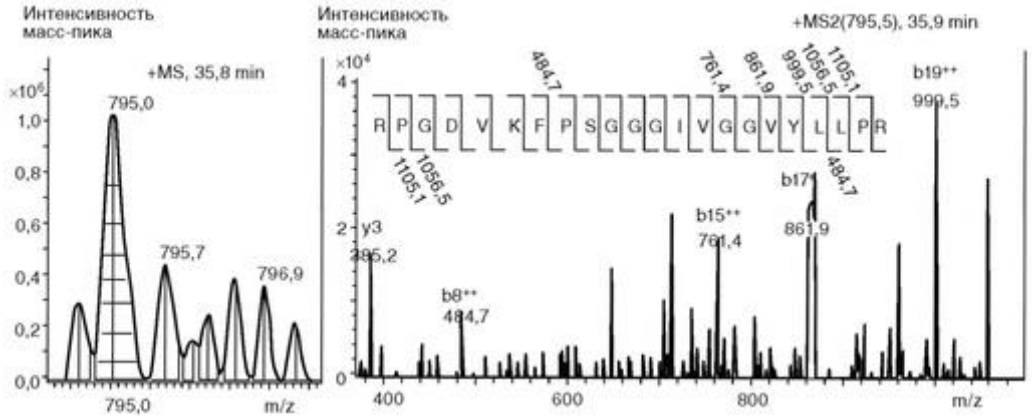


Рис. 3.23. ESI-MC/MC-спектры (при разных типах ионизации) гидролизованного пептида с поверхности АСМ-наночипа с иммобилизованным на нем белковым маркером HCV после инкубации в растворе образца сыворотки крови. Пептид маркера HCVm/z = 795,5

Сложность решения этой проблемы связана с большим объемом анализируемых данных (тысячи генов, миллионы публикаций), растущим разнообразием информации (гены, тропы, метаболические профили) и сложностью объектов (иерархическая организация объектов, структуры графов).

Метаболомные данные обычно представляют собой результаты различных измерений объектов в разных условиях. Это могут быть различные спектры в цифровом формате или списки метаболитов и их концентраций. В самом простом случае такие данные можно представить в виде таблицы-матрицы, в которой строки соответствуют образцам, а колонки - концентрациям метаболитов.

Для анализа полученных данных используют различные статистические методы, обычно это проекционные методы, такие как регрессия на главные компоненты и регрессия на проекциях на скрытые переменные. Широко используют алгоритмы распознавания образов при анализе метаболических профилей по данным хроматографии и ультрафиолетовой, ЯМР- и масс-спектроскопии.

Метаболические профили по данным хроматографии и масс-спектрометрии представляют собой матрицы.

Для каждого найденного компонента биопробы программное обеспечение автоматически выделяет чистый масс-спектр, не содержащий посторонние значения отношений массы (m) ионных фрагментов к их заряду (z). Присутствие посторонних значений m/z обусловлено фоном прибора, наложением пиков масс-спектров различных компонентов биопробы друг на друга или на пики мешающих компонентов - наложение масс-спектров различных компонентов биопробы (рис. 3.24).

Алгоритмы распознавания образов при анализе метаболических профилей основаны на сравнении полученных спектров компонентов биопробы со спектрами нескольких тысяч изученных соединений, хранящихся в базе данных постоянной памяти компьютера. Эта база данных пополнятся спектрами новых исследованных химических соединений.

В результате компьютерной обработки масс-спектров исследуемой биопробы получают данные о качественном и количественном составе пробы. Эти данные выводятся на монитор компьютера.

При диагностике наследственных заболеваний используют статистические методы медицинской генетики, в том числе популяционно-статистические.

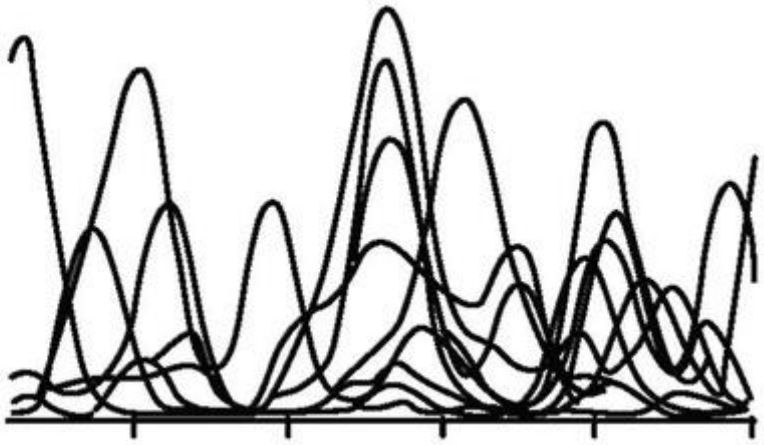


Рис. 3.24. Наложение пиков масс-спектров различных компонентов биопробы

С помощью популяционно-статистических методов определяют частоты генов и изменение частот генов под действием отбора, степень гетерозиготности и генетического полиморфизма, влияние факторов внешней среды на экспрессию генов, степень межпопуляционного генетического разнообразия.

Методы популяционно-статистического анализа являются основой применения математической статистики в клинико-генетическом анализе.

Для обеспечения достоверности статистических результатов численность изучаемой популяции должна быть оптимальной. Для клинико-генетических исследований оптимальной считается численность популяции порядка от 0,5 до 5 млн человек.

При создании базы данных для популяционно-генетического анализа широко используют обзорный метод и его различные модификации.

Наследственные заболевания неравномерно распределены среди разных рас и народностей в различных регионах земного шара. Региональная статистика заболеваний и

количества гетерозигот способствует правильной организации профилактических мероприятий в соответствующих регионах.

Если популяция находится в генетическом равновесии по данному признаку и известна частота заболевания в популяции, частоты генотипов и фенотипов можно рассчитать по формуле Харди-Вайнберга для диаллельной системы:

$p2 + 2pq + q2 = (p + q)2 - 1,$

где p2 - доля гомозигот по одному из аллелей; p - частота этого аллеля; q2 - доля гомозигот по альтернативному аллелю; q - частота альтернативного аллеля; 2pq - доля гетерозигот.

Для установления и подтверждения типа наследования заболеваний проверяют соответствие расщепления данной популяции законам

Менделя по исследуемому признаку в родственных семьях. При достаточной базе данных соотношение больных и здоровых родных братьев и сестер (сибсов) одного и того же поколения и частота, с которой ген сегрегирует в исследуемых семьях, будут определять тип наследования.

В современных популяционных исследованиях наследственных заболеваний широко используют основанные на тех же принципах компьютеризованные методы расчета, например методы взвешенных шансов и линейной интерполяции.

Глава 4. МЕТАБОЛОМИКА

Метаболомика (от англ. *metabolomics*, греч. *metabolism* + суффикс *-omics* - «полный, целый, весь») - научная область, изучающая совокупность всех исходных, промежуточных и конечных продуктов метаболизма и их количественное содержание в организме.

Составные части метаболомики:

• геномика - идентификация генов человека и мутаций, приводящих к наследственным заболеваниям;

• транскриптомика - идентификация и определение количества матричных РНК, кодирующих белки, определение закономерностей экспрессии матричных РНК;

• РНомика - идентификация и определение количества некодирующих РНК, определение закономерностей экспрессии некодирующих РНК;

• протеомика - идентификация, определение количества индивидуальных белков в биопробах (крови, спинномозговой жидкости, моче, биопсии);

• липидомика - идентификация, определение количества липидов в биопробах (кровь, спинномозговая жидкость, моча, биопсии).

На рис. 4.1 представлена обобщенная схема процедур автоматизированной постановки диагноза и метода лечения в метаболомике. На схеме показан путь создания моделей, на основе которых выводится метаболический профиль пациента. Важной процедурой

является сопоставление индивидуальных показателей с метаболомными показателями в норме и при различных патологиях, хранящимися в базе накопленных и постоянно обновляемых данных в памяти компьютера.

Примером применения метаболомики на основе традиционных методов молекулярной диагностики может служить диагностика ранних артритов.

Артрит (от греч. *arthron* - «сустав» и *-itis* - «воспаление») - собирательное обозначение любых болезней (поражений) суставов.

Рис. 4.1. Обобщенная схема процедур автоматизированной постановки диагноза и метода лечения в метаболомике

Артрит является распространенным заболеванием в человеческой популяции. Наиболее широко распространены ревматоидный, подагрический и псориатический артриты.

Ревматоидный (от греч. ρευμα - «течение») артрит - системное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением мелких суставов по типу эрозивно-деструктивного полиартрита неясной этиологии со сложным аутоиммунным патогенезом. Причины заболевания неизвестны. Косвенные данные - увеличение количества лейкоцитов в крови и скорости оседания эритроцитов (СОЭ) - указывают на инфекционную природу процесса.

Подагра (от греч. *ποδαγρα* - «ножной капкан») - гетерогенное по происхождению заболевание, которое характеризуется отложением в различных тканях кристаллов солей мочевой кислоты - уратов. Отложение кристаллов происходит из-за повышенного

содержания мочевой кислоты в полости сустава в результате нарушения метаболизма пуринов (см. главу 3).

Избыток пуриновых нуклеотидов приводит к чрезмерному образованию и накоплению уратов. Мочевая кислота в норме растворима в крови и выделяется почками с мочой. У пациентов с подагрой кристаллы откладываются в хряще суставов. В результате развивается воспаление суставов, что вызывает боль и припухание этих суставов.

Псориатический артрит - хроническое прогрессирующее заболевание суставов, ассоциированное с псориазом.

Причина псориаза и псориатического артрита в настоящее время неизвестна. Поражение суставов при псориазе нередко напоминает ревматоидный артрит, подагру, реактивный артрит.

Диагностика артритов, особенно на ранних стадиях, представляет собой сложную задачу. Это связано с тем, что причины, вызывающие сходные воспалительные процессы в суставах, могут быть при различных артритах.

Причинами развития артрита могут быть какой-либо инфекционный процесс, аллергия, аутоиммунные заболевания, нарушения обмена веществ, травма сустава.

Существуют и такие воспалительные заболевания суставов, этиология которых до сих пор до конца не выяснена. Ревматоидный артрит - пример такой патологии.

Для выбора терапии артрита необходимо, насколько это возможно, поставить диагноз и определить, какой именно фактор привел к развитию патологического процесса.

Диагностика артрита определяется комплексом данных, в том числе к ним относятся:

- тщательный сбор анамнеза;
- выявление связи с аллергическими, инфекционными заболеваниями, травмой;
- выявление характерной клинической картины артрита;
- лабораторные методы анализа (признаки воспаления, повышение уровня мочевой кислоты, синовиальная жидкость, наличие антител к гемолитическому стрептококку группы А и др.);
- инструментальная диагностика (рентгенография, УЗИ, компьютерная или магнитно-резонансная томография);
- статистическая обработка полученных данных и постановка диагноза.

Одним из широко применяемых методов обработки полученных данных является кластерный анализ.

При кластерном анализе анализируемого множества данных проводят разбиение этого множества на непересекающиеся подмножества так, чтобы элементы данного подмножества отличались между собой в значительно меньшей степени, чем элементы разных подмножеств.

В кластерном анализе не используют априорные предположения о вероятностной природе исходной информации.

На рис. 4.2 представлены результаты кластерного анализа данных по мониторингу содержания уратов в крови и моче группы здоровых и больных разными формами артрита пациентов.

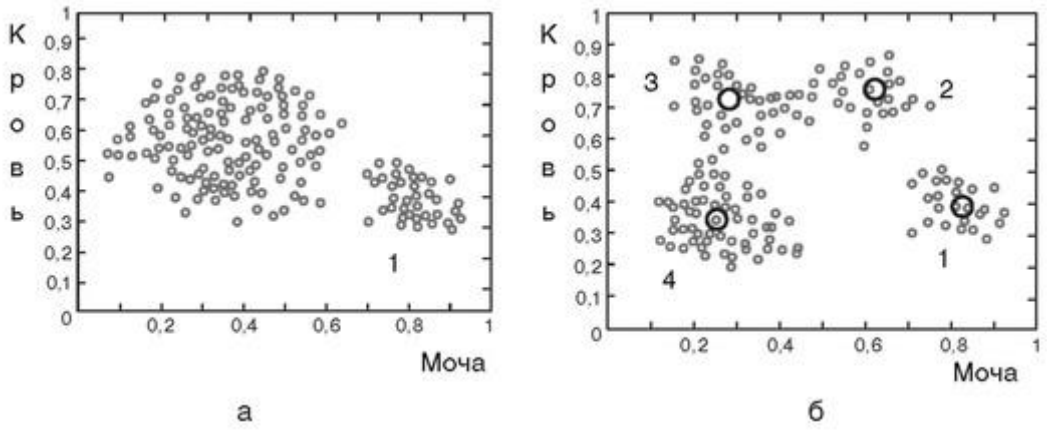


Рис. 4.2. Кластерный анализ данных по мониторингу содержания уратов в крови и моче группы здоровых и больных разными формами артрита пациентов: а - корреляция данных до кластерного анализа - явно выделена только нормогруппа здоровых пациентов; б - результат кластерного анализа - явно выделены центры кластеров и границы между множествами здоровых (1) и больных псориазом (2), ревматизмом (3), подагрой (4)

В результате кластерного анализа получают четкое разделение пациентов с разными формами патологий. Корреляция данных в результате кластерного анализа явно выделяет центры четырех кластеров, и отслеживаются границы между множествами здоровых и больных ревматоидным, подагрическим и псориатическим артритами.

Основной трудностью в диагностике артрита является то, что ни один из методов лабораторной или инструментальной диагностики заболевания не позволяет однозначно и точно поставить правильный диагноз. Для диагностики артрита, выявления его причины, а следовательно, правильного выбора назначаемого лечения необходимо комплексное обследование пациента. Все данные, полученные при обследовании, затем должны быть связаны с клинической картиной заболевания.

Основой автоматической системы диагностики артритов является вектор состояния V пациента - комплекс диагностических данных.

Вектор состояния V включает клинический минимум обследования пациента.

Для сбора клинических данных разработана анкета, содержащая набор параметров и диагноз, являющийся ответом (врач вводит в базу данных ЭВМ).

На основе компьютерной обработки исходных клинических данных в нейронных сетях в качестве значимых приняты следующие параметры - компоненты V_i вектора состояния V.

1. Заболевания и другие факторы, предшествующие артриту (V_1).

2. Симптомы, предшествующие артриту (V_2).

3. Боль в суставах (V_3).

4. Индекс припухлости (V_4).

5. Индекс массы тела (V_5).

6. Утренняя скованность (V_6).

7. Количество воспаленных суставов (V_7).

8. Подъем температуры тела (V_8).

9. Функциональная недостаточность суставов (V_9).

10. Наличие подкожных образований (V_{10}).

11. Степень поражения кожи, ногтей (V_{11}).

12. Артериальная гипертензия (V_{12}).

13. Степень поражения сердца (расширение границ) (V_{13}).

14. Рентгенография суставов (степень поражения) (V_{14}).

15. ЭКГ (V_{15}).

16. УЗИ (V_{16}).

17. Рентгенография грудной клетки (V_{17}).

18. Hb (V_{18}).

19.СОЭ (V_{19}).

20. С-реактивный белок (V_{20}).

21. Ревматоидный фактор (V_{21}).

22. Мочевая кислота (кровь) (V_{22}).

23. Холестерин (V_{23}).

24. Глюкоза (V_{24}).

Диагностические параметры (компоненты V_i вектора состояния) нормируют по отношению к значениям этих параметров у здоровых людей. Нормированные параметры представляют в виде полярных диаграмм (рис. 4.3, 4.4).

Полярные диаграммы наглядно отображают диагноз пациента для врача и удобны для компьютерной обработки при автоматизированной системе диагноза.

При компьютерной обработке в программе на нейронных сетях используют априорную информацию, полученную на основе анализа базы данных различных клиник об артритах с установленным диагнозом (обучение).

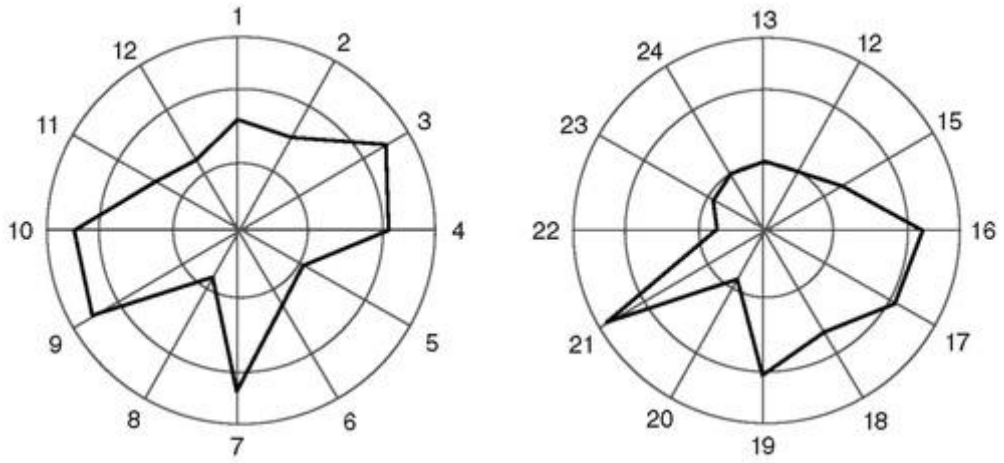


Рис. 4.3. Полярная диаграмма вектора состояния пациента при ревматоидном артрите

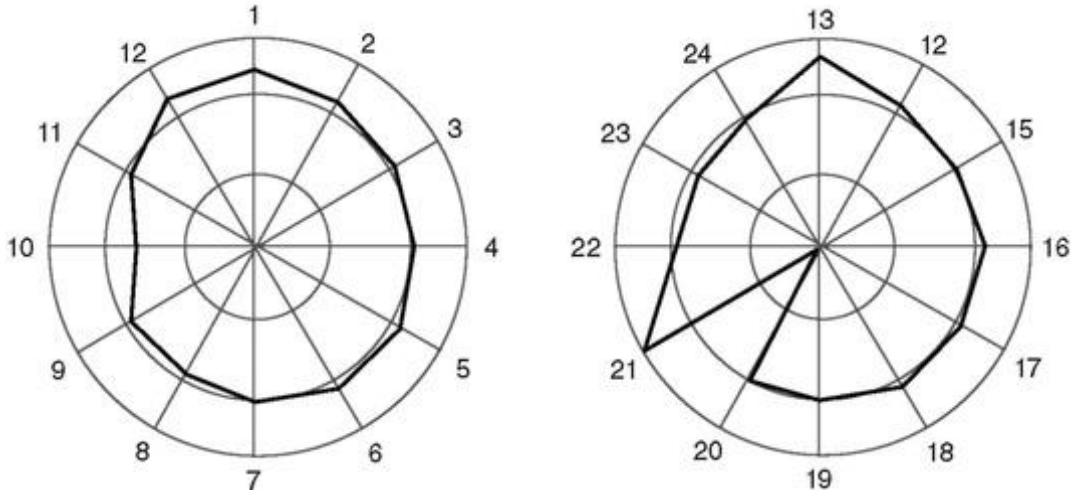


Рис. 4.4. Полярная диаграмма вектора состояния пациента при подагрическом артрите

На основе анализа обучающих данных устанавливают наиболее значимые параметры. В случае артритов - это мочевая кислота в плазме крови (коэффициент значимости 0,89) и ревматоидный фактор (коэффициент значимости 0,91). В результате анализа отбрасывают малозначимые параметры [температуру, снижение массы тела, лимфоциты, иммуноглобулины (коэффициент значимости 0,2)], что существенно упрощает постановку диагноза.

Более точная диагностика заболеваний на современном уровне проводится методами молекулярной диагностики.

4.1. ГЕНОМИКА

Геномика (от лат. *gen* - «род» и греч. *-omics* - суффикс, обозначающий «полный, целый, весь») - раздел молекулярной генетики, посвященный изучению генома и генов живых организмов.

Геном живого организма - совокупность всех генов, находящихся в его клетках.

Геномика - научная дисциплина, предметом которой является комплексное изучение структуры и функции генома.

Протяженность геномов у живых организмов может достигать миллиардов пар нуклеотидов. При расшифровке генома человека, завершенной в 2003 г., установлено, что геном человека содержит порядка 3 млрд пар нуклеотидов и 20-28 тыс. генов.

В рамках геномики проводятся исследования по структурной, функциональной и сравнительной геномике, а также по генетическому разнообразию человека.

Геномика как наука сформировалась в 1980-2000 гг. на основе секвенирования геномов различных видов живых организмов и человека.

Геномику подразделяют на три раздела:

• структурная геномика - расшифровка последовательностей генов и записанной в них информации;

• функциональная геномика - расшифровка путей передачи информации, записанной в геноме, от гена к признаку;

• сравнительная геномика - сравнительные исследования последовательностей генов разных организмов и записанной в них информации.

Сравнительная геномика базируется на данных по секвенированию геномов организмов, имеющих значение для здоровья и жизнеобеспечения человека. Такая информация необходима, чтобы наиболее эффективно использовать знания, полученные при разработке проекта «Геном человека».

4.1.1. Диагностика наследственных заболеваний

Исследования показывают, что большинство заболеваний человека, а возможно, и все его болезни связаны с мутациями, приводящими к изменению уровней экспрессии конкретных генов.

Известно, что примерно только 2% болезней человека вызваны действием одного гена. Остальные 98% заболеваний полиили эпигенные. Отсюда следует, что практически ни один ген не действует индивидуально. Гены действуют только во взаимодействии с другими генами и средой.

Мутации в определенных генах на разных стадиях эмбриогенеза нарушают функционирование различных биохимических путей метаболизма. В результате в организме взрослого человека развиваются соответствующие патологии с различной локализацией (рис. 4.5). Методы метаболомики дают возможность диагностировать такие патологии.

Рис. 4.5. Развитие мутаций, возникших в геноме человека на разных стадиях эмбриогенеза. Выделены области локализации развившихся клонов мутантных клеток во взрослом организме

В гаметогенезе (периоде созревания половых клеток) и при первом дроблении достаточно часто происходит значительное количество мутаций, нарушающих дальнейшее развитие организма. Если мутации происходят в клетках зародышевой линии, все соматические клетки организма, который развивается из мутантной зиготы, будут содержать указанную мутацию.

Мутации на стадии бластогенеза (фазы зародыша) приводят к появлению бластопатии в виде тяжелых уродств. Многие из таких патологий несовместимы с жизнью и ведут к прерыванию беременности (спонтанным выкидышам).

В эмбриогенезе (периоде закладки и формирования различных органов) контроль за развитием осуществляется генетическими факторами по жесткому графику. Результатами нарушения эмбрионального развития являются эмбриопатии, например алкогольная эмбриопатия, приостановка развития головного мозга.

Соматическая мутация может произойти у детей, родители которых являются донорами мутантных генов в гетерозиготном состоянии в соответствующем аллельном гене соматических клеток. Это также может стать причиной развития наследственного заболевания.

К таким генетическим патологиям относится ряд онкологических и аутоиммунных заболеваний, например ретинобластома - онкологическое поражение сетчатки глаз, чаще всего в детском возрасте.

Традиционная диагностика наследственных заболеваний основана на трудоемких методах детального изучения анамнеза и симптомов, результатов биохимических анализов и культивирования патогенных микроорганизмов.

Современные методы молекулярной биологии, в частности ДНК-диагностика на основе ПЦР, значительно ускорили диагностику наследственных, а также инфекционных заболеваний.

Теоретической базой диагностики наследственных заболеваний является структурная геномика.

4.1.2. Структурная геномика. ДНК-диагностика

ДНК-диагностика - метод молекулярной диагностики различных патологий на основе изучения структуры ДНК изучаемого организма и анализа генома этого организма.

Основой анализа любого генома является его расшифровка путем секвенирования (от англ. *sequence* - «последовательность») - определение нуклеотидных последовательностей в цепях ДНК и РНК. После расшифровки генома изучают белковые продукты генов и взаимодействия разных генов и белков. Этим занимается протеомика.

Большую роль в диагностике ряда заболеваний, особенно наследственных, играет определение отдельных нуклеотидных полиморфизмов - замены одного из нуклеотидов в гене на другой нуклеотид.

Полиморфными называют генетические локусы, которые содержат один и тот же ген или несколько генов, выполняют одну и ту же функцию, но различаются по первичной структуре ДНК. Наличие в популяции полиморфных локусов получило название генетического полиморфизма.

К 2005 г. идентифицировано около 1,5 млн отдельных нуклеотидных полиморфизмов *(Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs; ОНП). SNP-маркеры обнаруживаются с частотой 1 на 500 нуклеотидов. Опубликована карта ОНП.

Внутригенные отдельные нуклеотидные полиморфизмы наиболее перспективно использовать при изучении генетической восприимчивости к заболеваниям. К настоящему времени определено более 60 000 ОНП.

Современные методы ДНК-диагностики находят широкое применение в медицине для обнаружения мутаций при наследственных (или приобретенных) заболеваниях и ДНК-типировании организмов (рис. 4.6).

ДНК-типированием называют установление генотипических особенностей, которые позволяют идентифицировать организм.

В процессе ДНК-типирования определяют особенности первичной структуры ДНК исследуемого организма в конкретных генетических локусах. На основе ДНК-типирования осуществляют идентификацию личности в судебно-медицинских исследованиях и определяют отцовство.

ДНК-диагностика наследственных и приобретенных заболеваний может заключаться как в обнаружении известных, уже описанных мутаций, так и в поиске новых мутаций, приводящих к тому же патологическому состоянию организма.

Рис. 4.6. Применение методов ДНК-диагностики в медицине

В связи с этим диагностика генетических механизмов наследственных заболеваний осуществляется в два этапа.

На первом этапе ДНК клинических биопроб исследуют на присутствие известных из литературной базы данных мутаций, определяющих различные наследственные заболевания. Вывод о возможном наличии таких мутаций в ДНК пациента делается на основании диагноза заболевания, поставленного по клиническим симптомам болезни.

Если соответствующие мутации в геномной ДНК не обнаружены, заболевание может вызываться новыми мутациями в том же самом или других генах, функционально связанных с первым.

В таких случаях на втором этапе изучения этиологии заболевания применяют другие методы, позволяющие обнаружить неизвестные мутации.

4.1.3. Методы ДНК-диагностики наследственных и приобретенных заболеваний

Целью ДНК-диагностики наследственных и приобретенных заболеваний является обнаружение в геноме больного мутаций, вызывающих наблюдаемые симптомы заболеваний.

Основным требованием, предъявляемым к биопробам для исследования ДНК, является отсутствие сильной деградации ДНК и ее повреждений химическими агентами. Источниками клеток для выделения ДНК могут служить различные биопробы, взятые у пациента: слюна, свежая или высушенная кровь, биоптаты различных тканей, а также консервированные ткани.

В слюне содержится ДНК клеток слизистых оболочек и микроорганизмов, присутствующих в ротовой полости. В лаборатории ДНК слюны отделяют от белков путем гидролиза протеиназой-К и дополнительно депротеинизируют фенолом. Растворенную ДНК концентрируют осаждением спиртом. В результате получают препарат ДНК для анализов.

В корнях волос содержатся несколько сотен соматических клеток и количество молекул ДНК, достаточное для проведения ПЦР и других методов. Преимуществом корней волос перед другими источниками ДНК является почти полное отсутствие внеклеточного матрикса, затрудняющего выделение ДНК из соматических клеток. Клетки корней волос лизируют буферным раствором, содержащим неионные детергенты, белки гидролизуют протеиназой-К. Протеиназу-К затем денатурируют нагреванием при 100 °С. При этом происходит денатурация ДНК, что необходимо для секвенирования.

Биоптаты для микроскопии и парафинированные ткани используют для семейного генетического анализа, когда другие источники ДНК недоступны из-за смерти пациента или по другим причинам. При использовании ДНК из биоптатов фиксированных тканей возможна амплификация лишь коротких сегментов ДНК длиной в несколько сотен пар оснований, так как для фиксации тканей при патолого-анатомических исследованиях используют формальдегид или глутаровый альдегид, которые модифицируют ДНК.

Дальнейшую депротеинизацию образцов и осаждение ДНК осуществляют так же, как и для корней волос.

ПЦР-исследование. В последнее время преобладают методы обнаружения новых неизвестных мутаций путем анализа продуктов ПЦР. При этом наиболее часто используют следующие методы.

Прямое секвенирование продуктов ПЦР является эффективным методом обнаружения мутаций. Этим методом можно обнаружить до 99% мутаций. Метод позволяет точно определить не только положение мутации в последовательности нуклеотидов, но и тип и возможный механизм возникновения мутации с учетом положения соседних нуклеотидов.

Электрофорез продуктов ПЦР в денатурирующем градиентном геле позволяет обнаруживать до 95% мутаций. Однако этот метод не дает возможности точно определить положение мутации в анализируемых участках ДНК.

Методы обнаружения ошибочно спаренных нуклеотидов. Основания канонической двойной спирали ДНК в большей степени защищены водородными связями от действия модифицирующих агентов, чем ошибочно спаренные основания двойной спирали. Именно поэтому ошибочно спаренные основания можно избирательно модифицировать химической обработкой.

В одном из способов химической модификации подвергаются ошибочно спаренные остатки пиримидинов - цитозина или тимидина с использованием соответственно гидроксиламина или осмийтетроксида. В результате неспаренные пиримидины удаляются из цепей ДНК.

После удаления из цепей неспаренных пиримидинов и расщепления депиримидинизированных остатков рибозы образовавшиеся фрагменты ДНК определяют с помощью электрофореза. В результате можно установить места расщепления цепей ДНК и, соответственно, положение мутантных нуклеотидов. Комбинированное использование этих методов дает возможность находить все теоретически возможные сочетания мутантных нуклеотидов.

В другом способе ошибочно спаренные остатки гуанина и тимидина модифицируют карбодиимидом. При проведении ПЦР ДНК-полимераза прекращает элонгацию строящейся цепи ДНК вблизи модифицированных оснований. В результате образуется укороченный продукт ПЦР в виде вновь синтезированного фрагмента ДНК. Модифицированное основание, следовательно, и мутация могут быть обнаружены посредством удлинения праймера Paq-полимеразой.

Эффективность выявления мутаций с использованием химических модификаций ошибочно спаренных нуклеотидов приближается к 95%.

Разработаны и другие методы обнаружения мутаций. Например, метод оценки конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК и метод анализа гетеродуплексов.

Рассмотренные методы обнаружения новых неизвестных мутаций используются и для идентификации известных мутаций ДНК. В то же время для выявления описанных в литературе мутаций, приводящих к разным патологиям (например, серповидно-клеточной анемии или нарушениям в системе свертывания крови), можно использовать и другие, более простые методы.

Все описанные методы приобрели особую значимость с развитием метода ПЦР, который достаточно просто позволяет амплифицировать конкретные участки геномной ДНК, получать препаративные количества гомогенной по размерам двухцепочечной ДНК и быстро создавать гетеродуплексы.

Несмотря на широкое распространение ПЦР, в последнее время все более активно используются методы, основанные на применении новой техники.

ДНК-микрочип *(DNA microarray)* - метод ДНК-диагностики заболеваний в молекулярной биологии и медицине, основанный на распознавании фрагментов ДНК по принципу комплементарного спаривания.

Технология ДНК-микрочипов основана на методике Саузерн-блоттинга. В этом методе фрагментированную ДНК переносят на подходящий носитель и затем с помощью зонда с известной нуклеотидной последовательностью определяют содержание изучаемой последовательности в биопробе.

Современный ДНК-микрочип (рис. 4.7) представляет собой твердую подложку-матрицу из нескольких сотен отдельных микрочипов. На отдельные микрочипы нанесены дезоксиолигонуклеотиды (зонды или пробы), сгруппированные в виде микроскопических точек и закрепленные на твердой подложке. Матрица состоит из тысяч дезоксиолигонуклеотидов.

Микрочипы отличаются конструкцией, особенностями работы, точностью, эффективностью и стоимостью.

В обычном ДНК-микрочипе зонды ковалентно прикрепляются к стеклянной или кремниевой плоской поверхности. В других технологиях вместо больших твердых поверхностей используют микроскопические шарики.

Каждая точка содержит несколько пикомолей ДНК с определенной нуклеотидной последовательностью. Олигонуклеотиды ДНК-микрочипа могут быть короткими участками генов или других функциональных элементов ДНК и используются для гибридизации с кДНК или мРНК (кРНК).

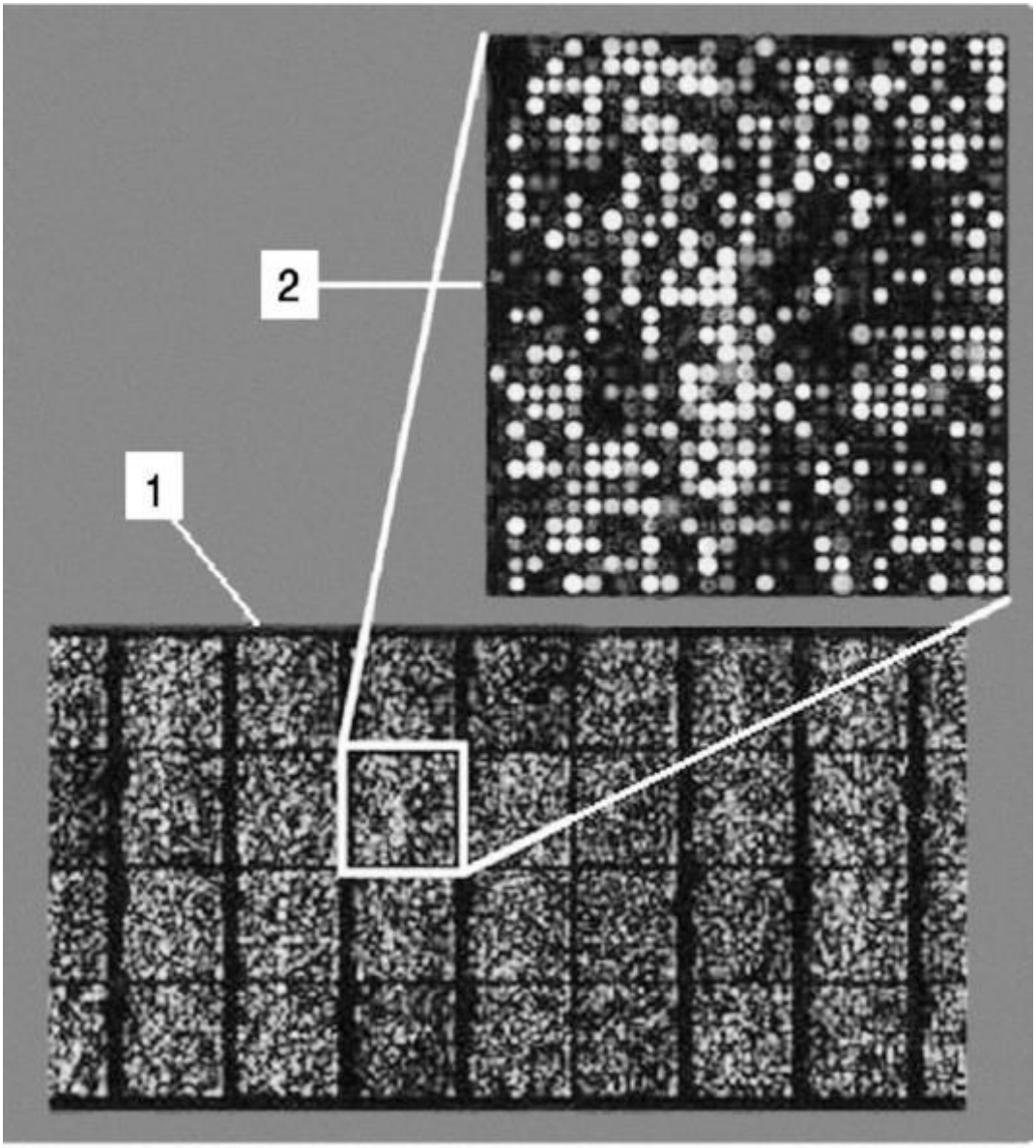


Рис. 4.7. ДНК-микрочипирование: 1 - часть матрицы микрочипов с точечными дезоксиолигонуклеотидными зондами; 2 - отдельный микрочип, где цветом (флюоресценцией) выделяются точки с олигонуклеотидными зондами

Гибридизация зонда и мишени регистрируется и количественно измеряется методами флюоресценции или хемилюминесценции. В результате получают данные об относительном содержании нуклеиновой кислоты с заданной последовательностью в образце.

ДНК-микрочипы используют для анализа изменения экспрессии генов, выявления однонуклеотидных полиморфизмов, генотипирования или повторного секвенирования мутантных геномов.

Экспрессия генов (от лат. *expressio* - «выражение») - процесс передачи наследственной информации от гена, закодированной в последовательностях нуклеотидов ДНК, и отображение этой информации в функциональных продуктах - РНК и белках. Экспрессия генов может регулироваться на всех стадиях передачи наследственной информации: при транскрипции и трансляции, при посттрансляционных модификациях белков.

Регуляция экспрессии генов позволяет клеткам контролировать собственную структуру и функцию и является основой дифференцировки клеток, морфогенеза и адаптации организма.

Основными способами определения экспрессии генов в данное время являются секвенирование РНК, содержащих поли-А (мРНК), и применение экспрессионных ДНК-микрочипов.

Исходными методами секвенирования были методы обрыва цепи и химической деградации. Потребность в массовом и быстром секвенировании привела к разработке более эффективных новых технологий.

Начало новым методам секвенирования положила автоматизация основных этапов определения первичной структуры ДНК.

Методы секвенирования нового поколения основаны на параллельном определении структуры разных участков молекулы ДНК. При этом могут определяться до сотен мегабаз и гигабаз нуклеотидных последовательностей за один рабочий цикл (1 мегабаза - 1 млн азотистых оснований либо нуклеотидов). В результате за один цикл работы секвенатора можно определить первичные структуры нескольких участков генома.

Производительность секвенаторов нового поколения может достигать сотен миллиардов пар оснований. Это позволяет сканировать весь геном пациента всего за несколько дней.

4.1.4. Функциональная геномика

Основная задача функциональной геномики - характеристика различных генов, составляющих геномы, изучение механизмов их регуляции, взаимодействия друг с другом и с факторами среды в норме и при патологии.

Еще одно важное направление функциональной геномики - транскриптомика - изучает координированную работу генов, образование первичных транскриптов, процессы сплайсинга и формирования зрелых мРНК. Благодаря технологии микрочипов удается одновременно анализировать картину транскрипции мРНК со 100 тыс. генов.

Исследование транскриптома методом микрочипов позволяет установить различия между экспрессией генов в разных тканях, проанализировать характер экспрессии в разные периоды болезни, а также подразделить белки на секретируемые и связанные с мембранами путем определения мРНК этих белков.

В рамках еще одного направления функциональной геномики - нигомики - исследуют генетические механизмы и генетический контроль клеточной дифференцировки и гистогенеза, а также образования субклеточных структур.

Технологии, позволяющие анализировать молекулярные механизмы путем сравнения генов или их продуктов в разных органах и тканях, а также геномов различных организмов, развиваются в рамках сравнительной геномики.

Например, сравнения белковых последовательностей внутри и между видами организмов помогают получить информацию об их потенциальных функциях. При неудаче простого сравнительного анализа, основанного на гомологии с другими белками и/или на

их трехмерном строении, определяют разные компоненты белковых комплексов и/или клеточных структур перед тем, как их истинная функция станет очевидной.

Изучение координации внутри клетки и организма действия пакетов генов путем сравнения геномов разных видов основано на том, что жизненно важные регуляторные функции сохранились у многих видов организмов на протяжении эволюции. Например, информация о регуляции клеточного цикла, необходимая для понимания процесса канцерогенеза у человека, получена путем сравнения с аналогичными процессами у дрожжей.

В конце XX в. было сделано важное открытие - практически во всех эукариотных организмах были обнаружены различные РНК нового класса, которые не кодируют белки и не являются ни рибосомальными, ни транспортными РНК. Эти РНК получили называние микроРНК, поскольку эти молекулы состоят всего из 19-22 нуклеотидов. К микроРНК относятся также короткие интерферирующие РНК (si-RNA), которые выключают синтез определенных белков путем разрушения их мРНК.

МикроРНК регулируют экспрессию генов после их транскрипции. Регулирование происходит путем репрессии трансляции, расщепления и ускорения распада мРНК.

Большинство молекул мРНК имеют функциональные группы - маркеры, указывающие на возможность самопроизвольной деградации этих молекул. МикроРНК, имеющие соответствующие комплементарные участки, узнают эти маркеры и направляют на молекулу мРНК ферменты, приводящие к деградации этой молекулы.

С помощью РНомики содержащиеся в образцах микроРНК идентифицируются, определяется их концентрация. Вариации концентраций различных микроРНК в тканях свидетельствуют о различных патологиях, что используется в клинической РНомике для диагностики этих патологий.

4.2. ТРАНСКРИПТОМИКА И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТРАНСКРИПТОМИКИ

4.2.1. Транскриптомика

Транскриптомика *(transcriptomics)* (от лат. *transcriptio* - «переписывание» и греч. - *omics* - суффикс, обозначающий «полный, целый, весь»; неологизм) - научное направление, занимающееся изучением транскриптома. Транскриптом - совокупность всех матричных РНК. Исследуются кодирующие белки, определяются количества каждой индивидуальной мРНК, устанавливаются закономерности экспрессии всех генов, кодирующих белки.

Реализация проекта «Геном человека» позволяет обнаруживать мутации в генах, приводящие к наследственным заболеваниям или к повышению вероятности возникновения многих патологий, таких, например, как онкологические, сердечно-сосудистые заболевания (атеросклероз), диабет, метаболический синдром, шизофрения и др.

В практику лабораторной диагностики внедрены методы идентификации мутаций, наиболее часто приводящих, например, к различным раковым заболеваниям. Эти методы основаны на применении полимеразной цепной реакции и определении маркерных генов, содержащих нарушения, приводящие к конкретным патологиям.

Развитие геномики патологий позволяет проводить их молекулярно-генетическую диагностику и затем определять экспрессию - интенсивность синтеза РНК и белков, имеющих отношение к возникновению и развитию заболеваний. Экспрессию определяют путем расшифровки транскрипционных профилей, характеризующих экспрессию всех генов, активных в анализируемой биопробе.

Применяемые при этом методы основаны на использовании ДНК-микрочипов (см. рис. 4.7).

Для того чтобы определить, транскрибируется ли данный ген, на чип помещают фрагмент гена - олигонуклеотид. Этот олигонуклеотид соответствует экспрессируемой части гена (экзону).

Затем из образца (например, опухоли) выделяют суммарную РНК. На основе обратной транскрипции молекул РНК данной биопробы получают ДНК-копии этих РНК - кДНК. Эти кДНК-копии метят флюоресцентными метками и проводят на микрочипе гибридизацию с иммобилизованными олигонуклеотидами (рис. 4.8).

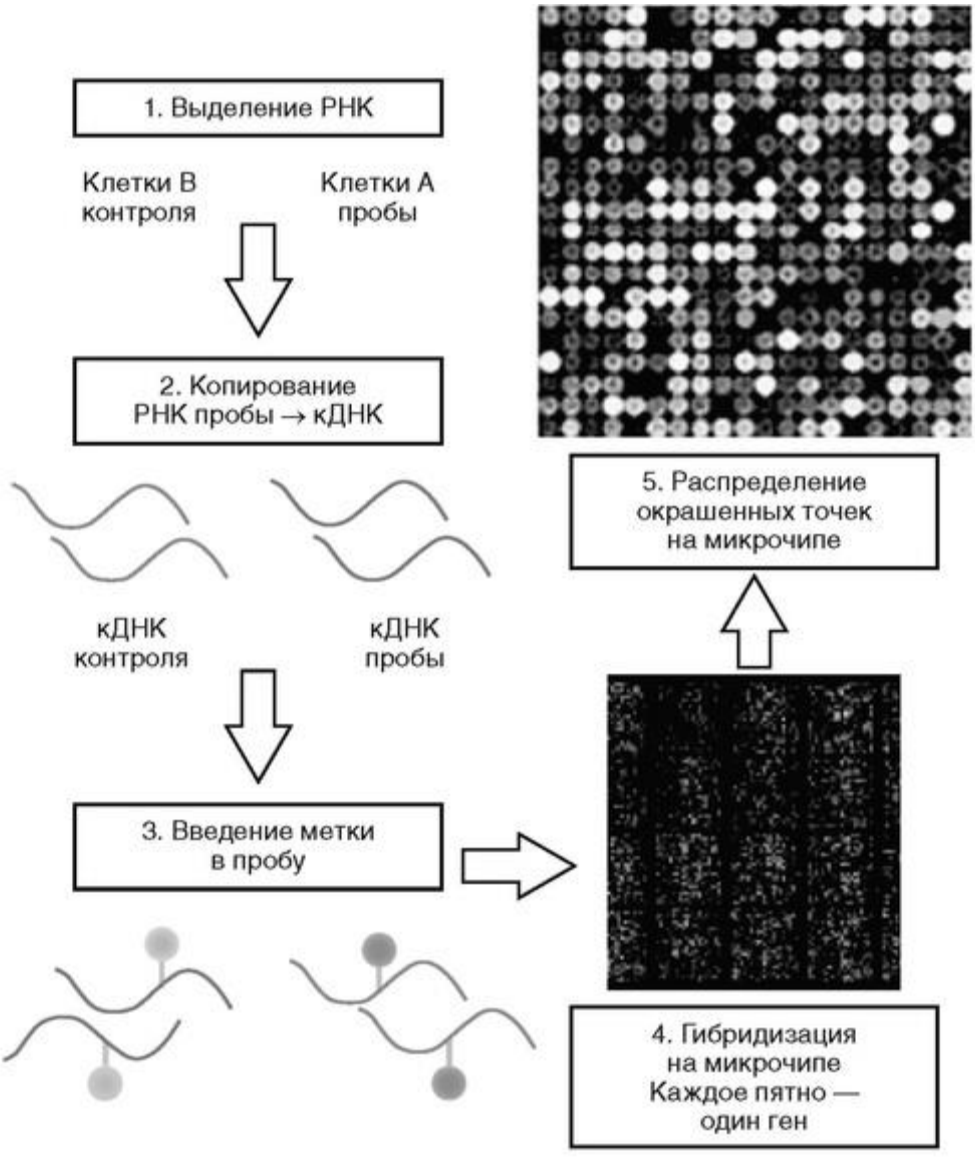


Рис. 4.8. Последовательность стадий определения транскриптома

Если в данных условиях какие-то точки с конкретными генами не гибридизируются, это значит, что данный ген не транскрибируется. Если данная точка микрочипа флюоресцирует (окрашена), значит, олигонуклеотиды на этом участке микрочипа гибридизовались с флюоресцентно меченой кДНК-копией, и, следовательно, ген транскрибируется.

Для того чтобы определить, является ли полученный результат ошибкой или нет, проводят сравнение двух образцов - А и В (см. рис. 4.8).

Для этого берут образец А биопробы (патология), из него получают суммарную РНК и после обратной транскрипции молекул биопробы флюоресцентно метят (например, красным) все полученные молекулы кДНК. Ту же процедуру проводят с контрольным образцом В (норма), но метят молекулы кДНК другим цветом (например, зеленым).

Затем проводят гибридизацию ДНК-микрочипа со смесью этих двух препаратов кДНК. Имеет место конкурентная гибридизация - гибриды образуют преимущественно те молекулы, которых больше.

Если сигнал в данной точке на чипе будет красным, значит, в клетках А (патология) транскрипция данного гена сильней, чем в клетках В (норма). Если сигнал зеленый, то транскрипция сильнее в клетках В (норма). Если красного и зеленого поровну, получится желтый цвет.

Таким образом, можно сравнивать уровень транскрипции данного гена в разных тканях и органах, в биологических жидкостях при норме и патологии, до и в ходе терапии, до хирургической операции и после нее.

Довольно часто термины «геномика», «транскриптомика» и «протеомика» употребляются в одном и том же значении - для обозначения анализа экспрессии всех генов данного образца как на уровне синтеза мРНК, так и на уровне синтеза белков (см. главу 2).

Установлено, что каждая болезнь характеризуется своими особенностями - уникальным паттерном уровней транскрипции набора генов, характерного именно для данной болезни.

Сравнение транскриптомов нормальных и патологических образцов позволяет:

• идентифицировать новые маркерные гены - гены, для которых точно известна хромосомная локализация;

• прослеживать изменение уровней маркерных генов во времени;

• прослеживать динамику патологии;

• прослеживать эффективность проводимого лечения и прогнозировать его результат.

На современном уровне транскриптомы анализируют с помощью компьютерных методов распознавания образцов.

4.2.2. Клинические аспекты метаболизма нуклеотидов и нуклеиновых кислот

Основой транскриптомики являются:

- идентификация всех матричных РНК, кодирующих белки;

- определение количества каждой индивидуальной мРНК;

- определение закономерностей экспрессии всех генов, кодирующих белки.

Транскриптомика - основа геномики патологий, методы которой позволяют проводить молекулярно-генетическую диагностику.

Детально изученный геном человека позволяет обнаружить мутации в генах, приводящие к наследственным заболеваниям или повышению вероятности возникновения различных заболеваний, таких как, например, онкологические, сердечно-сосудистые, диабет, метаболический синдром, шизофрения. В молекулярной лабораторной диагностике применяют методы идентификации мутаций, приводящих к тем или иным заболеваниям.

Эти методы основаны на применении ПЦР и маркерных генов, содержащих нарушения, приводящие к конкретным патологиям.

Нарушения метаболизма нуклеотидов в организме человека (см. главу 2) приводят к различным патологиям.

Особенно существенно влияние образовавшихся в результате метаболического распада нуклеотидов свободных пуриновых и пиримидиновых оснований. Значительная часть этих свободных оснований не подвергается дальнейшему распаду, а используется опять для синтеза пуриновых нуклеотидов. Метаболический путь синтеза в этом случае проще, короче и энергетически выгоднее рассмотренного в главе 2.

Свободный гуанин реутилизируется при участии фермента - гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы.

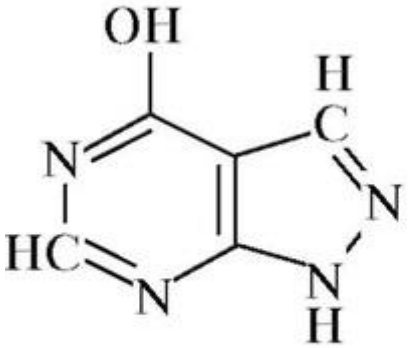
У детей встречаются генетические отклонения, связанные с отсутствием этого фермента. Такая недостаточность (синдром Леша-Найхана) встречается только у мальчиков. Синдром обычно проявляется в возрасте около двух лет в виде комплекса симптомов: умственной отсталости, нарушения координации движений, агрессивности к самому себе. При этой патологии отсутствует синтез нуклеотидов из свободных составляющих, но синтез по рассмотренному пути идет нормально.

Осложнения возникают не из-за недостатка пуриновых нуклеотидов, а, наоборот, из-за их избыточного синтеза.

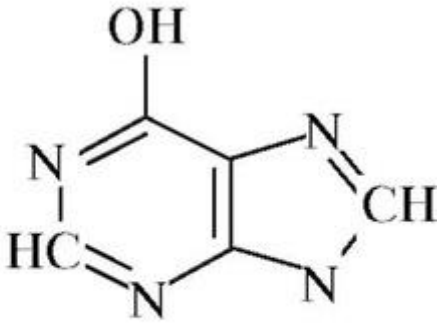
Избыток пуриновых нуклеотидов приводит к чрезмерному образованию и накоплению мочевой кислоты. В результате развивается воспалительная болезнь суставов - подагра.

Предполагается, что причиной подагры может быть наследственная недостаточность какого-либо из ферментов, участвующих в обмене пуринов.

Один из путей лечения подагры - применение аллопуринола:



Аллопуринол



Гипоксантин

Аллопуринол является ингибитором ксантиноксидазы, которая ответственна за синтез мочевой кислоты из пуринов.

Как видно из формулы строения, в результате небольшого изменения в структуре гипоксантина (субстрат ксантиноксидазы) образуется ингибитор этого фермента, обладающий лечебным действием.

Часть интермедиатов, необходимых для синтеза нуклеотидов, поступает в организм человека с пищей (см. табл. 2.1).

Например, нуклеопротеиды, поступившие с пищей, распадаются сначала на полипептиды и нуклеиновые кислоты. Затем происходит полный гидролиз нуклеиновых кислот до мононуклеотидов. Мононуклеотиды под действием фосфатаз в кишечнике разлагаются до нуклеозидов и фосфорной кислоты и в таком виде всасываются.

Часть поступивших в ткани азотистых оснований может быть использована для синтеза нуклеотидов. Если же распад происходит до свободных пуриновых и пиримидиновых оснований, гуанин не используется для синтетических целей.

Предполагается также, что мононуклеотиды могут всасываться, и их распад осуществляется уже внутри клеток слизистой оболочки преимущественно фосфорилитическим путем.

Достижения в области молекулярной биологии углубили знания об экспрессии генов и причинах многих болезней и способствовали разработке новых подходов к клинической диагностике и лечению таких болезней.

В рамках молекулярной медицины созданы вакцины для предотвращения гепатитов, инсулин человека - для лечения сахарного диабета, фактор VIII - для восстановления нормального свертывания крови и лечения гемофилии и многие другие препараты.

Для генотерапии разработаны биотехнологические методы выделения нормальных генов.

Полученные нормальные гены вводят в организм больного, где они нормально экспрессируются. В результате здоровье пациента восстанавливается.

В стадии клинических испытаний находятся методы генокоррекции таких наследственных болезней, как семейная гиперхолестеринемия, гемофилия и некоторые другие заболевания.

При генной терапии в организм больного вводят нормально работающие гены и устраняют метаболические нарушения, вызванные мутантными генами. Таким путем, например, лечат детей с иммунодефицитом, вызванным дефектом фермента аденозиндезаминазы.

Известен клинический случай, когда врачи не могли поставить диагноз ребенку трех лет. Кишечник ребенка отек и был полностью пронизан абсцессами. За три года ребенок перенес более ста различных хирургических операций.

Диагноз был установлен полным секвенированием ДНК ребенка. В результате была выявлена молекулярная причина заболевания - белок XIAP, участвующий в сигнальных цепях апоптоза - запрограммированной смерти клеток. В норме белок XIAP играет важную роль в функционировании иммунной системы.

На основе поставленного диагноза была рекомендована трансплантация костного мозга. После трансплантации у ребенка восстановилось пищеварение.

Другой случай связан с нетипичным раковым заболеванием женщины - острой формой промиелоцитарной лейкемии.

При стандартных методах диагностики заболевание не было выявлено. Методом транскриптомики генома раковых клеток было установлено, что участок хромосомы 15 переместился на хромосому 17. Это вызвало отрицательное генное взаимодействие. В результате установленного диагноза было проведено необходимое лечение пациентки.

4.2.3. Биотехнологические аспекты получения лекарственных препаратов нуклеотидов и нуклеиновых кислот

Для выявления дефектов в структуре ДНК она должна быть выделена из соответствующей биопробы (биологической жидкости, биоптата, культуры клеток) и «наработана» в количествах, достаточных для исследования.

ДНК выделяют из ядер клеток различных тканей. Этапы выделения ДНК включают лизис клеток, удаление фрагментов клеточных органелл и мембран с помощью центрифугирования, ферментативное разрушение белков протеиназами. Затем ДНК экстрагируют из раствора фенолом и хлороформом. ДНК из экстракта осаждают этанолом, фильтруют, промывают, и полученный фильтрат ДНК растворяют в буферном растворе.

Молекула ДНК одной хромосомы среднего размера содержит 1,5 млрд ($1{,}5 \times 10^9$) пар нуклеотидов и имеет длину порядка 4 см. Молекулярные нити такой длины чувствительны к механическим воздействиям и при выделении из раствора часто фрагментируются - расщепляются на олигонуклеотидные фрагменты. В ходе выделения получают молекулы ДНК значительно меньше исходных, но все равно они содержат тысячи или десятки тысяч пар нуклеотидов. Такие молекулы неудобны для исследования, и их приходится дополнительно фрагментировать.

При гидролизе ДНК на фрагменты используют ферменты, расщепляющие ДНК, рестриктазы или рестрикционные эндонуклеазы, выделенные из бактериальных клеток.

Рестриктазы воздействуют на специфические последовательности (сайты рестрикции) из 4-12 нуклеотидов в двухцепочечной молекуле ДНК и расщепляют ее в местах локализации этих последовательностей. В биотехнологии используют более 500 различных типов рестриктаз бактериального происхождения.

Полученные при рестрикции фрагменты ДНК могут быть разделены методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле. Затем ДНК в геле определяют по ультрафиолетовым спектрам после обработки этидийбромидом, который дает розовое окрашивание препарата.

При обработке геномной эукариотической ДНК, в частности ДНК человека, рестриктазами образуется много фрагментов различной длины. Идентификацию специфических последовательностей во фрагментах ДНК в геле проводят после разделения с помощью электрофореза путем гибридизации с мечеными ДНК-зондами. ДНК-зонды представляют собой фрагменты однонитевой ДНК длиной свыше 100 нуклеотидных звеньев со строго определенной первичной структурой. Синтез ДНК-зондов осуществляется в автоматизированных машинах. Такие молекулы можно использовать для специфического связывания с исследуемыми участками фрагментов.

Идентификация участков ДНК и установление первичной структуры ДНК (секвенирование ДНК) осуществляются микрочипированием.

Ввиду исключительной сложности смесей, с которыми имеют дело биохимики, на первых этапах разделения в подавляющем большинстве случаев фракция с выделяемым веществом, содержит множество других компонентов, то есть происходит лишь частичная очистка (обогащение смеси искомым компонентом).

Выделение индивидуальных биополимеров - ДНК, РНК, белков - является многоступенчатым процессом. На каждой ступени разделения должна получаться фракция, более богатая выделяемым веществом, чем на предыдущей ступени, и содержащая меньшее число побочных компонентов. Такой процесс часто называют фракционированием.

На каждой стадии разделения, включая начальную, биополимер находится либо в виде раствора, либо в виде осадка.

Для разделения смесей применяют физико-химические методы: осаждение, фильтрацию, экстракцию, сорбцию, гель-фильтрацию, диализ, ультрафильтрацию, хроматографию, высаливание.

Способность живых организмов и молекул ДНК используется для разработки селекционных методов выполнения биохимических анализов.

Микробиологические подходы позволили разработать методы, основанные на селекции клонов микроорганизмов, которые выросли из отдельных клеток, несущих желаемые признаки. Например, микроорганизмов, способных продуцировать определенные белки, не свойственные изучаемым организмам. Так родилась генная инженерия, которая не только открыла новые горизонты в биотехнологии, но и стала важнейшим инструментом биохимических исследований.

4.3. ПРОТЕОМИКА

Белки являются одним из важнейших биохимических компонентов организма, обеспечивающих жизнедеятельность, функционируют в качестве ферментов, а также «реализаторов» экспрессии генов.

Протеом описывает весь набор белков внутри клетки, ткани или организма. Этот набор насчитывает несколько тысяч различных белков и их производных.

На рис. 4.9 разнообразие известных белков (суммарный протеом организма) представлено в виде распределения числа белков в зависимости от числа аминокислот в полипептидной цепи. Такое разнообразие белковой компоненты организма сильно усложняет идентификацию индивидуальных белков при молекулярной диагностике.

В суммарном протеоме особую роль играют небольшие белковые молекулы - олигопептиды, содержащие не более 50 аминокислотных остатков. Эти белки выполняют специфические функции. К ним относится, например, инсулин - важнейший регулятор углеводного обмена. Сюда относятся также нейропептиды - пептиды, которые участвуют в регуляции нервной системы.

Для олигопептидов в московских научных центрах создан специальный банк данных - EROP-Moscow (EROP - *Endogenous Regulatory Oligopeptides* - эндогенные регуляторные олигопептиды).

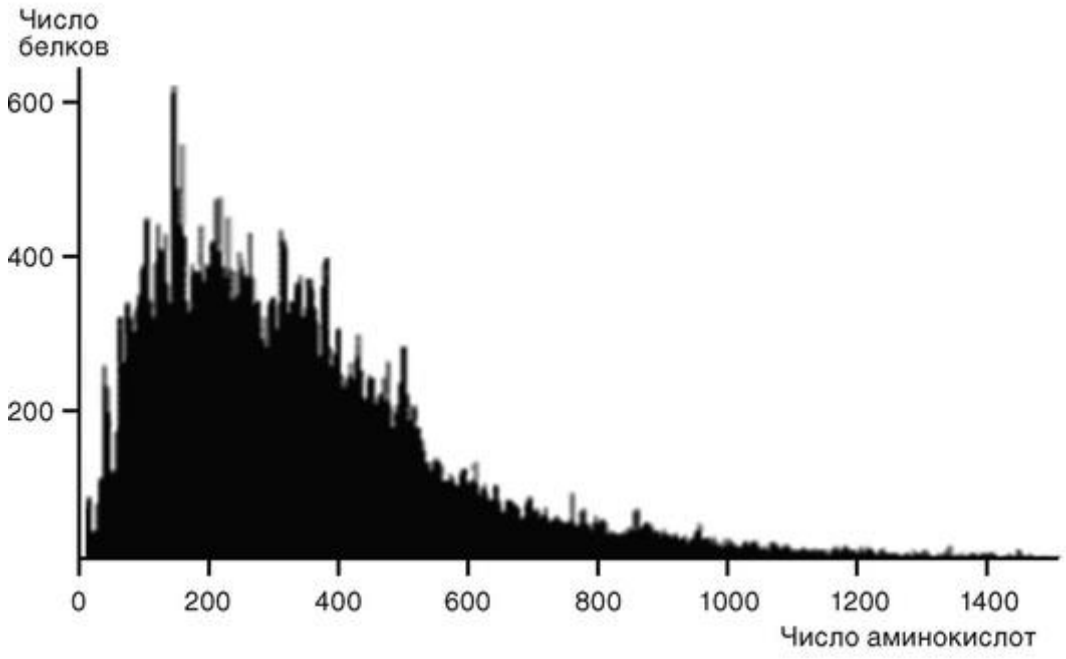


Рис. 4.9. Зависимость числа известных белков от числа аминокислотных остатков в полипептидной цепи (длины цепи)

Следует отметить, что ввиду огромного разнообразия для белков до сих пор не создано строгой классификации.

Задачами биоинформатики в протеомике являются создание базы данных о свойствах известных белков, анализ этой информации и разработка вычислительных методов для выявления механизмов их функционирования.

На рис. 4.10 представлена схема методики современной автоматизированной компьютерной идентификации белков в биопробах. Такие методики позволяют проводить экспресс-анализ большого количества биопроб и представлять вероятный диагноз.

Участие в различных физиологических и патологических процессах определяет использование белков в качестве эффективных диагностических маркеров и их применение как лекарственных веществ.

Для обнаружения и изучения свойств различных белков широко применяют как традиционные, так и новые - постгеномные технологии.

Традиционные подходы к изучению индивидуальных белков - биохимический и иммунохимический - ориентируются на последовательное изучение отдельных белков.

Индивидуальные белки выделяют, используя их специфику - функциональную активность или антигенные свойства. В то же время при анализе биопроб одновременно изучают совокупность индивидуальных белков биопробы и получают характеристику протеома в целом.

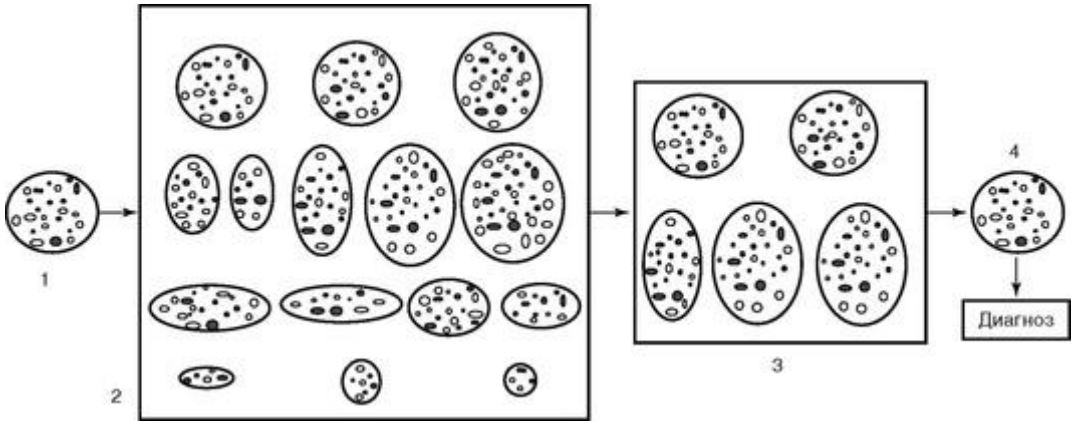


Рис. 4.10. Компьютерная идентификация белка в биопробе и молекулярная диагностика: 1 - пептидный фингерпринтЖХ-МС/МС изучаемого белка; 2 - компьютерная база данных пептидных фингерпринтов изученных белков; 3 - выборка близких фингерпринтов изученных белков; 4 - идентифицированный фингерпринт белка в биопробе

Широко используется электрофорез (рис. 4.11).

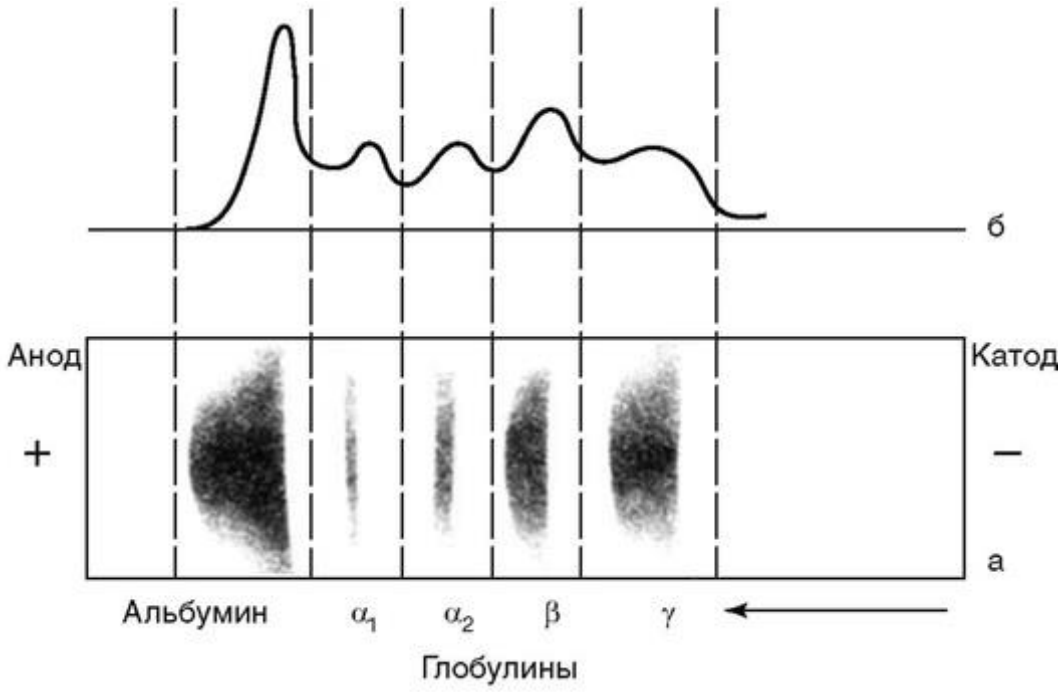


Рис. 4.11. Электрофореграмма белков плазмы крови (норма): а - распределение полос при электрофорезе; б - интенсивность полос

Полный анализ протеома клеток, тканей, органов и биологических жидкостей проводят с помощью двухмерного электрофореза с высоким разрешением или ВЭЖХ, микрочипированием с последующей масс-спектрометрической идентификацией индивидуальных белков. Это позволяет проанализировать до 10 000 индивидуальных белков в одном образце и зафиксировать изменения их концентраций в ходе течения заболеваний.

До настоящего времени для расшифровки протеома широко используют комплексный метод - двухмерный электрофорез (см. главу 3). Разрешающая способность двухмерного электрофореза многократно превышает разрешающую способность одномерного, с помощью которого смеси белков разделяют по разнице молекулярных масс. Двухмерный электрофорез (2-D-PAGE) в состоянии выявить в несколько раз больше различных белков по сравнению с одномерным.

Метод двухмерного электрофореза по-прежнему играет большую роль в протеомных исследованиях. Однако растущий объем анализов, которые необходимо выполнить, привел к развитию методов и аппаратных комплексов, комбинирующих высокоэффективную жидкостную хроматографию и тандемную масс-спектрометрию. Эти методы обеспечивают высокую производительность, чувствительность и информативность.

При этом все более широкое применение находят микрочипы (см. рис. 4.7).

4.3.1. Функциональная протеомика

Высокая значимость каждого из индивидуальных белков для обеспечения тех или иных функций и/или молекулярных структур в организме определяет их вовлеченность в различные физиологические и патологические процессы.

Функциональная протеомика занимается определением функциональных свойств протеома. Задачи, решаемые функциональной протеомикой, существенно сложнее, чем, например, секвенирование.

Предсказание функциональной роли отдельных белков путем определения взаимосвязи между структурой белка и его функциями в организме является одной из основных задач протеомики. При этом протеомика связывает те или иные функции организма с деятельностью соответствующих генов (экспрессией).

В клетках организма на различных этапах жизнедеятельности происходит экспрессия лишь той или иной части генов. Заключительной стадией экспрессии гена является, как правило, соответствующий белок. Белки выполняют в организме разнообразные биологические функции. Это, например, ферменты, гормоны, рецепторные и регуляторные белки.

Состав белков в клетках постоянно меняется в зависимости от фазы клеточного цикла, тканевой принадлежности, внешних воздействий.

Одной из важных задач протеомики является расшифровка механизма взаимодействия в человеческом организме около 300 000 белков.

Изучение специфичных для различных патологий белок-белковых комплексов является эффективным методом определения механизмов возникновения и развития этих патологий.

Установление механизмов взаимодействия белков позволяет ускорить разработку соответствующих лекарственных веществ и методов излечения различных патологий.

В качестве примера можно привести разработку синтезов альтернативных форм инсулина.

В результате были спасены и продлены жизни миллионов людей, страдающих сахарным диабетом.

Установлено, что причинами возникновения многих заболеваний, в том числе и опухолевых, является нарушение в результате образования белок-белковых комплексов синтеза различных интермедиатов в цепи передачи сигнала или мутации в генах, кодирующих синтез интермедиатов.

TNF-α нарушает регулирование экспрессии генов, ответственных за пролиферацию и выживание клеток. Нарушение этой регуляции приводит к развитию таких патологических процессов, как опухолевый рост, воспалительные и аутоиммунные патологии, например комплексы рецепторов и внутриклеточных эффекторов с фактором некроза. Выявлены взаимодействующие пары белков, ассоциированные с нейродегенеративными патологиями, серповидно-клеточной анемией и шизофренией.

Одним из достижений протеомной диагностики является установление этиологии болезни Альцгеймера. Одной из первопричин этой нейродегенеративной патологии являются отложения видоизмененного белка бета-амилоида в нервных тканях. Образование измененного бета-амилоида обусловлено изомеризаций аспартата (рис. 4.12).

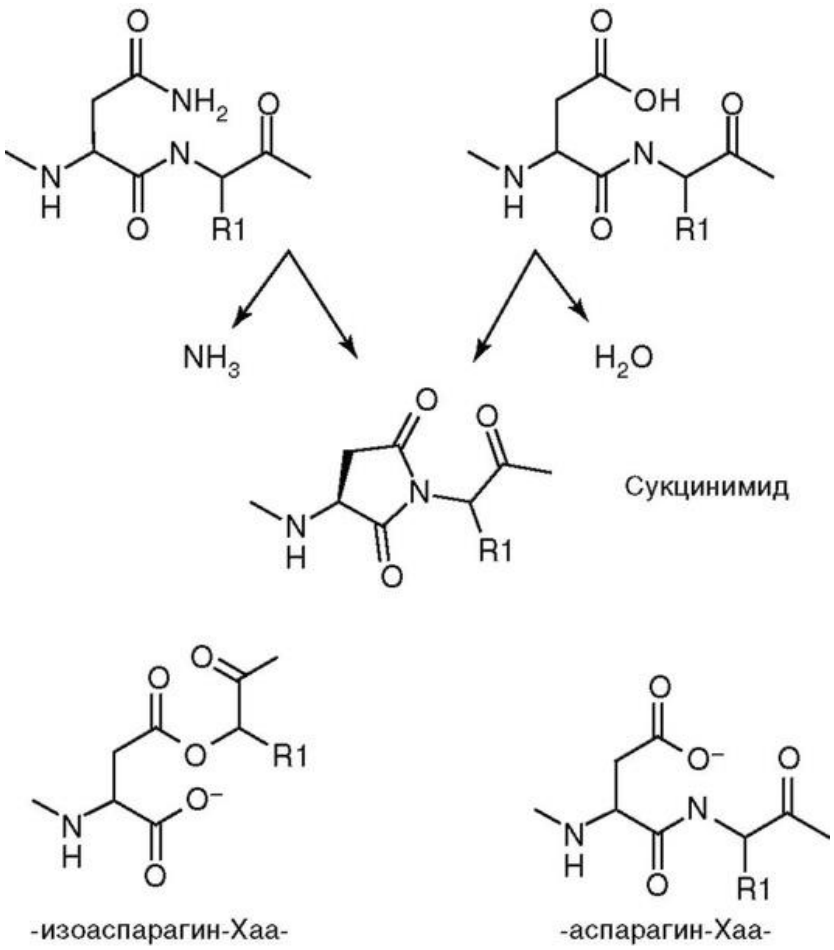


Рис. 4.12. Образование изоаспарагина на пути анаболизма амилоида

В организме человека примерно 28 амилоидогенных белков. Эти белки взаимодействуют и легко присоединяются друг к другу. Установлено, что каждый из амилоидогенных белков связан с какой-нибудь болезнью.

Например, были обследованы группа людей с сахарным диабетом и болезнью Альцгеймера, люди с деменцией, но без сахарного диабета и здоровая контрольная группа. В сером веществе и в стенках сосудов головного мозга пациентов с сахарным диабетом и деменцией обнаружили множество отложений амилоидогенного белка. Такой белок нашли и в головном мозге людей с болезнью Альцгеймера, но без сахарного диабета. У контрольной группы отложений не наблюдалось. Функциональная активность закодированных в геномах белков определяется, прежде всего, их пространственным строением. Именно поэтому очень важной является задача определения складывания полипептидной цепи в трехмерную структуру (фолдинг белка) на основе закодированной в гене аминокислотной последовательности. Понимание механизмов фолдинга также важно для диагностики многих нейродегенеративных заболеваний у человека и животных, часто связанных с наличием в их организме прионов - белков с ненормальным фолдингом.

Следует отметить, что проблема фолдинга - одна из самых сложных и труднорешаемых задач современной молекулярной биологии.

4.3.2. Клинические аспекты протеомики

Расшифровку протеома в биопробах на современном уровне проводят методами, дающими возможность в едином цикле проводить разделение и последующую идентификацию и анализ всех белков в биопробе.

К этим методам относятся различные модификации хроматографических, электрофоретических и масс-спектрометрических технологий (см. главу 3).

С помощью 2Б-методов в клинической протеомике находят белки, наличие которых связано с теми или иными патологиями. Такие белки играют роль маркеров соответствующих заболеваний. Обнаружение маркеров заболеваний, в частности онкомаркеров, служит одной из основ молекулярной диагностики.

Например, белок тимозин бета-15 обнаруживают в моче при различных злокачественных опухолях. Очевидно, этот белок участвует в молекулярных механизмах злокачественного перерождения клеток. Соответственно, ген тимозина бета-15 и продукты его экспрессии могут стать не только диагностическими маркерами, но и лекарственными мишенями для подавления опухолевого роста.

В качестве другого маркера можно назвать белок *Prostate Stem Cell Antigen* (PSCA) - антиген стволовых клеток предстательной железы. Установлена гиперэкспрессия (до 80%) гена PSCA при раке простаты и его метастазах.

Важным разделом протеомики является изучение лекарственных воздействий на метаболизм белков.

На основе установленных корреляций между изменениями белков и наблюдаемых при этом патологий в настоящее время разработано большое количество лекарственных средств, лечебный эффект которых определяется воздействием на белковый обмен. Такие лекарственные средства составляют более 90% всех препаратов, представленных на фармацевтическом рынке.

В результате большого количества исследований показано, что данные 2D-методов коррелируют с механизмами функционирования белков. Например, если лекарственное средство усиливает пролиферацию в пероксисомах, то на 2D-электрофореграмме наблюдают повышенное количество белков, содержащихся в этих пероксисомах. Таким образом, идентификация белков - лекарственных мишеней дает возможность устанавливать механизмы функционирования этих белков.

При изучении фармакодинамики ловастатина, понижающего уровень холестерина в крови, было установлено, что при введении ловастатина в плазме крови значительно повышается количество белка HMG-кофермент-А-синтазы при снижении количества других белков. На основе этих данных было показано, что механизм действия ловастатина заключается в повышении активности липопротеинового рецептора - белка, который удаляет холестерин из крови.

Рассмотренные данные свидетельствуют о том, что экспрессия генов в тканях очень пластична, отвечает на воздействия большого числа факторов и почти всегда включает не один или два, а множество генов. 2D-электрофорез идеально подходит для изучения подобных динамических изменений.

Современные протеомные исследования направлены на совершенствование разнообразных технических методик и постоянное расширение базы данных. Это позволяет

надеяться, что прогресс в протеомных исследованиях качественно усилит потенциал современной клинической биохимии.

Общей задачей протеомики является определение всех белков, синтезируемых в клетках, а также определение строения белковых молекул, их количества, локализации, модификаций и механизмов взаимодействия.

Заболевания в масс-спектромике определяют путем сравнения протеинограммы пациентов с протеинограммой в норме. Протеинограммы при патологиях существенно отличаются от нормы, отображая избыток одних белков и дефицит других (рис. 4.13).

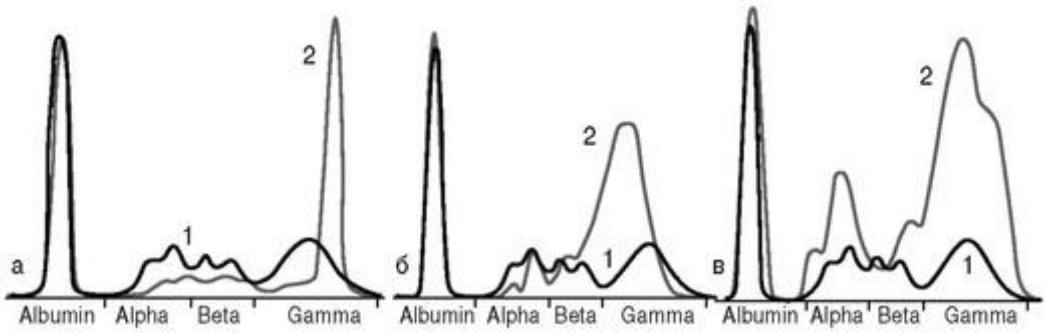


Рис. 4.13. Масс-спектры белков (протеинограммы, масс-фингерпринтинг) плазмы крови в норме (кривые 1) и при патологиях (кривые 2): а - миелома - пониженный уровень альфа- (α_1, α_2) и бета-глобулинов (β_1, β_2), повышен уровень гамма-глобулина; б - перитонит - пониженный уровень альфа- (α_1, α_2) и бета-глобулинов (β_1), повышен уровень бета- (β_2) и гамма-глобулинов; в - гепатит - повышенный уровень альфа-, бета- и гамма-глобулинов

В клинической протеомике основной задачей являются идентификация, количественное определение всех индивидуальных белков в тест-пробе (сыворотке крови, спинномозговой жидкости, моче, биопсии) и наблюдение (мониторинг) за изменением концентраций белков во времени.

Анализ всех белков различных биопроб - клеток, тканей, органов и биологических жидкостей - проводят с помощью двухмерного электрофореза с последующей масс-спектрометрической идентификацией индивидуальных белков. Это позволяет проанализировать до 10 000 индивидуальных белков в одной биопробе.

Техника протеомного анализа различных биопроб включает последовательность процедур. К ним относятся:

- отбор и подготовка биопробы к аналитическим процедурам;
- двухмерный электрофорез и проявление белковых пятен на геле;
- определение количества пятен и их расположение на электрофореграмме;
- выделение участков геля, содержащих индивидуальные белковые пятна;
- расщепление индивидуальных белков в геле на пептидные фрагменты трипсином;
- масс-спектрометрический анализ пептидов (масс-фингерпринтинг);

• секвенирование пептидных фрагментов индивидуальных белков;

• определение протеома путем компьютерной обработки результатов анализа.

С помощью этой техники открыты новые белковые маркеры. В частности, разработаны новые методы молекулярной диагностики в области кардиоваскулярной протеомики и онкопротеомики.

Метаболизм белков тесно связан с метаболизмом аминокислот - наименьших индивидуальных единиц белковых молекул (см. главу 2). Естественно, что различные патологии, связанные с нарушениями метаболизма белков, в различных аспектах обусловлены нарушениями аминокислотного обмена.

4.3.3. Патологии, обусловленные нарушениями аминокислотного обмена

На рис. 4.14 представлены метаболические сети аминокислот.

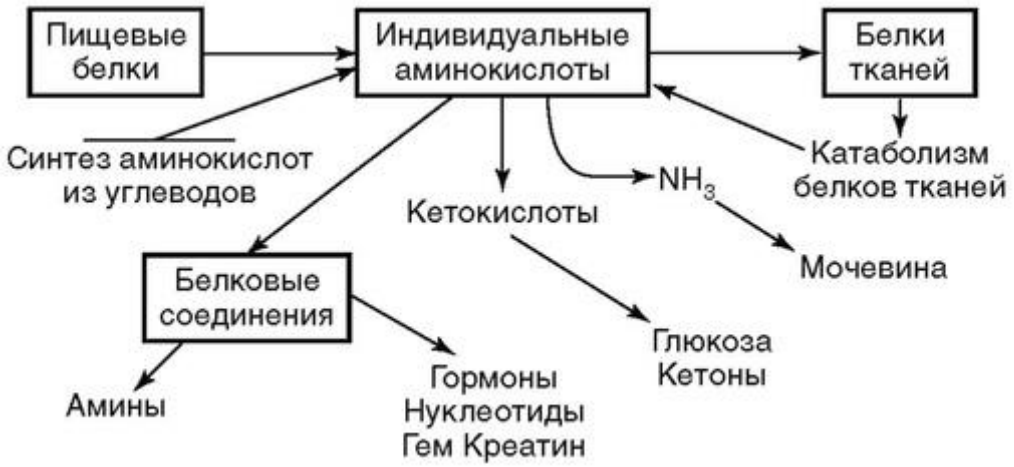


Рис. 4.14. Метаболические сети аминокислот

Источниками индивидуальных аминокислот в организме являются пищевые белки, собственные белки тканей и синтез аминокислот из углеводов. Многие клетки используют аминокислоты для синтеза белков и других веществ: фосфолипидов, гема, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, катехоламинов, гистамина.

В организме человека на аминокислоты распадается около 400 г белков в сутки, примерно такое же количество синтезируется. При этом основным источником аминокислот служат пищевые белки (около 30-50 г белков в сутки). Исключение даже одной незаменимой аминокислоты из пищевого рациона ведет к неполному усвоению других аминокислот и сопровождается развитием отрицательного азотистого баланса, истощением, остановкой роста и нарушениями функций нервной системы.

Все 20 аминокислот в организме человека (см. главу 2), входящие в блок «индивидуальные аминокислоты», различаются по строению и участвуют в самых разнообразных биохимических превращениях, обеспечивающих жизнедеятельность организма на различных уровнях. Именно поэтому нарушения аминокислотного обмена приводят к различным патологиям.

Значение аминокислот для организма в первую очередь определяется тем, что они используются для синтеза белков.

Аминокислоты непосредственно участвуют в биосинтезе не только белков, но и большого количества других биологически активных соединений, регулирующих процессы обмена веществ в организме, таких как нейромедиаторы и гормоны - производные аминокислот. Аминокислоты служат донорами азота при синтезе всех азотсодержащих небелковых соединений, в том числе нуклеотидов, гема, креатина, холина и других веществ.

При нарушении обмена аминокислот развиваются различные болезни (табл. 4.1).

Гиперглицинемия (дефект, по-видимому, нескольких метаболических циклов, в том числе печеночной трансаминазы) - задержка умственного развития.

Глицинурия - повышенное содержание глицина в моче при нормальном содержании его в крови. В почках образуются оксалатные камни.

Гомоцистинурия (недостаток цистатионин-синтетазы) - задержка умственного развития, прогрессирующая параплегия, судорожные припадки.

Гистидинемия (недостаток гистидазы) - атаксия, судорожные припадки, встречается задержка развития.

Фенилкетонурия (недостаток фенилаланингидроксила) - тяжелое отставание в умственном развитии, раздражительность, приступы судорог.

Таблица 4.1. Данные о болезнях, связанных с нарушением метаболизма аминокислот

Болезнь	Дефектный фермент, система	Основные проявления
Гиперглицинемия	Печеночная трансаминаза	Резкое повреждение мозга, судороги, гипотония, нарушения дыхания
Глицинурия	Глицинрасщепляющий фермент	Повышенное содержание глицина в моче при нормальном содержании в крови. Оксалатные камни в почках
Гомоцистинурия	Цистатионин-β-синтаза	Высокая концентрация гомоцистина и метионина в тканях. Нарушение умственного развития и развития скелета
Гистидинемия	Гистидаза	Высокая концентрация гистидина в моче и крови. Нарушения умственного развития и речи, атаксия, судорожные припадки
Фенилкетонурия	Фенилаланингидроксилаза, дигидроптеридинредуктаза, дигидробиоптерин-синтетаза	Высокая концентрация фенилкетона в моче. Тяжелое отставание в умственном развитии, судороги

Тирозинемия	Парафенилпируватоксидаза, тирозинаминотрансфераза	Высокая концентрация тирозина в моче и крови. Нарушение умственного развития, гиперкератоз ладоней и подошв, помутнение роговицы
Альбинизм	Тирозиназа	Нарушение синтеза меланина. Чувствительность к солнечному облучению. Снижение остроты зрения
Алкаптонурия	Диоксигеназа гомогентизиновой кислоты	Выделение с мочой гомогентизиновой кислоты, охроноз, артриты
Лейциноз (болезнь кленового сиропа)	Декарбоксилаза α-кетокислот лейцина, изолейцина и валина с разветвленной углеродной цепью	Моча имеет запах кленового сиропа. Высокая концентрация лейцина, изолейцина, валина и α-кетокислот в крови и моче. Истощение, неврологические нарушения
Болезнь Паркинсона	Дефекты ферментов в метаболическом пути тирозина	Акинезия (скованность движений), ригидность (напряжение мышц), тремор (непроизвольное дрожание)

Тирозиноз (недостаток парафенилпируватоксидазы) - отставание в развитии.

Альбинизм (недостаток тирозиназы) - чувствительность к солнечному облучению. Алкаптонурия .

Лейциноз (болезнь кленового сиропа) - нарушение метаболизма разветвленных аминокислот с блоком окислительного декарбоксилирования, дефицитом декарбоксилазы кетокислот - приступы судорог, слепота, прогрессирующая ригидность.

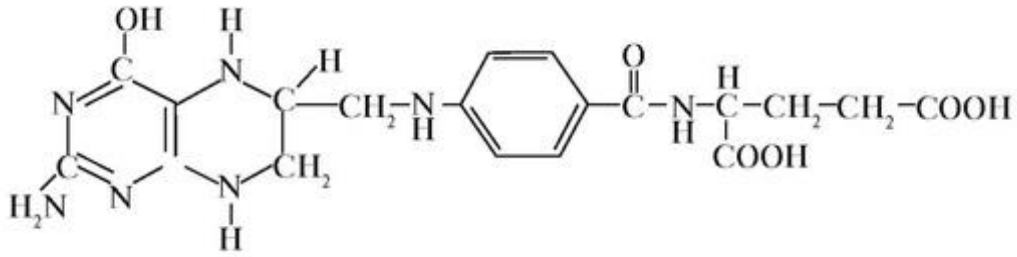
Болезнь Паркинсона - акинезия (скованность движений), ригидность (напряжение мышц), тремор (непроизвольное дрожание).

Нарушения обмена глицина

Известен ряд заболеваний, связанных с нарушениями обмена глицина .

Катаболизм глицина происходит несколькими путями (рис. 4.15).

• Глицин расщепляется на аммиак, диоксид углерода (CO_2) и метилен-H_4-фолат (тетрагидрофолиевую кислоту).



- Глицин превращается в серин под действием сериноксиметил-трансферазы.

- Глицин окисляется под действием оксидазы аминокислот.

- Глицин - один из важных компонентов синтеза различных биогенных веществ.

В основе заболеваний, связанных с нарушениями обмена глицина, лежат недостаточность какого-либо фермента или дефект системы транспорта этой аминокислоты.

Гиперглицинемия - наследственное заболевание. Клинический анализ плазмы крови устанавливает сильно повышенное содержание глицина в крови.

Гиперглицинемия развивается в раннем возрасте и сопровождается эпизодической рвотой, подавлением двигательной активности; электроэнцефалограммы фиксируют нарушения в работе головного мозга. Болезнь часто завершается летальным исходом.

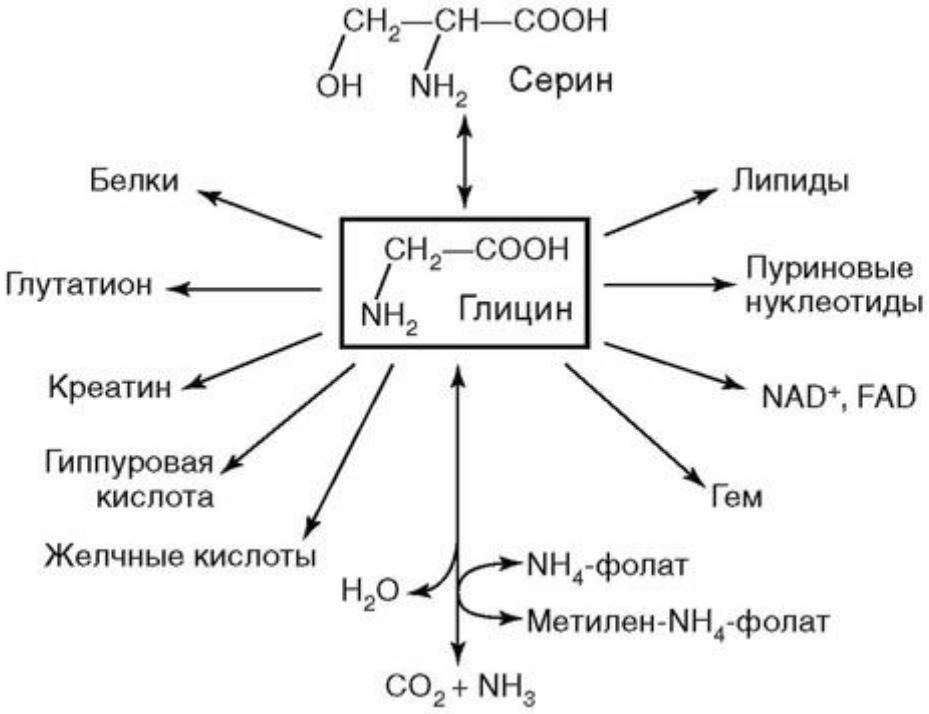


Рис. 4.15. Пути метаболизма глицина

Гиперглицинемия - следствие нарушения обычных путей катаболизма глицина в нервных клетках.

Глицин - один из наиболее важных нейромедиаторов торможения сигналов в спинном мозге, промежуточном и головном мозге. Глициновые рецепторы имеются во многих участках центральной нервной системы. Эти рецепторы находятся на постсинаптических мембранах.

Высокий уровень глицина в плазме крови и моче обычно свидетельствует о нарушении функций мозга.

При гиперглицинемии наблюдаются повреждение тканей головного мозга, судороги, гипотония, нарушения дыхания.

Этиология гиперглицинемии - дефект глицинрасщепляющей ферментной системы на пути катаболизма глицина (рис. 4.16). В результате в плазме крови накапливается избыток глицина, что приводит к нарушению жизнедеятельности различных тканей.

Связываясь с рецепторами центральной нервной системы, глицин блокирует нейроны. В результате нейроны уменьшают выделение возбуждающих аминокислот, таких как глутаминовая кислота (глутамат), и повышают выделение тормозящей γ-аминомасляной кислоты (ГАМК). ГАМК является основным нейромедиатором торможения процессов центральной нервной системы.

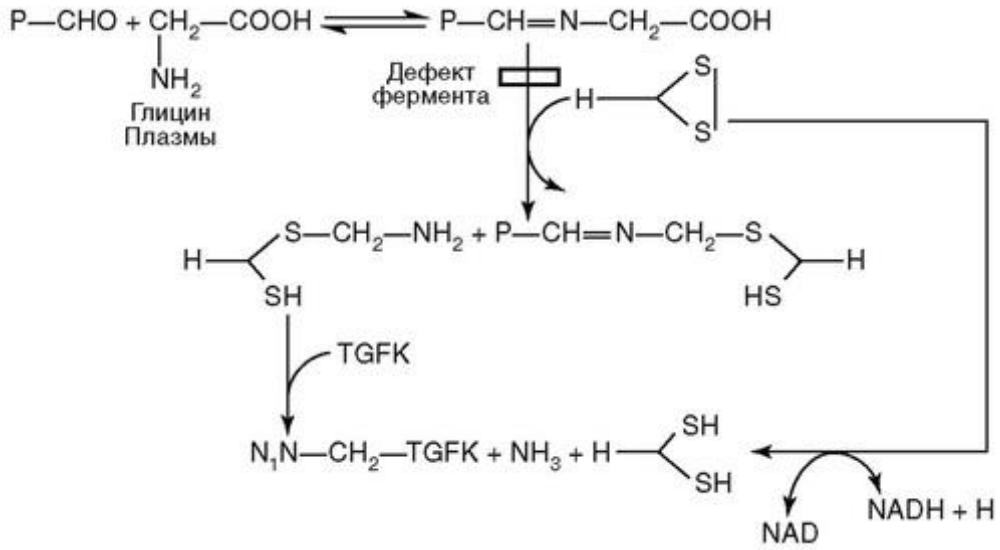


Рис. 4.16. Дефект фермента на пути катаболизма глицина

Глицин связывается также со специфическими участками NMDA-рецепторов глутамата и аспартата, в результате включается передача сигнала от возбуждающих нейротрансмиттеров глутамата и аспартата. (NMDA-рецептор - ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат.)

В спинном мозге глицин приводит к торможению мотонейронов, что позволяет использовать глицин в неврологической практике для устранения повышенного мышечного тонуса.

Глицинурия - наследственное заболевание. Клинический анализ плазмы крови и мочи устанавливает сильно повышенное содержание глицина в моче (до 1 г в сутки) при нормальном содержании его в крови. Один из симптомов заболевания - накопление

оксалатных камней в почках. При этом содержание оксалата в моче находится в пределах нормы.

Причиной глицинурии является нарушение реабсорбции глицина в почках. Наследуется как доминантный признак, сцепленный с Х-хромосомой.

Первичная гипероксалатурия характеризуется высоким выделением оксалата с мочой, независимо от поступления его с пищей. В дальнейшем прогрессирует двустороннее образование оксалатных камней в мочевыводящих путях, развиваются нефрокальциноз и инфекция мочевыводящих путей. Больные погибают в детском возрасте от почечной недостаточности или гипертонии.

Оксалат синтезируется при дезаминировании глицина, в результате которого образуется глиоксилат (глиоксиловая кислота) - предшественник оксалата.

$$CH_2NH_2\text{-}COOH \leftrightarrow COOH\text{-}CHO + NH_3 \rightarrow COOH\text{-}COOH$$

Глицин Глиоксилат Оксалат

Метаболический дефект обусловлен недостаточностью глицинаминотрансферазы. В результате дефицита глицинаминотрансферазы нарушаются метаболизм глиоксилата и его накопление из-за невозможности обратного превращения в глицин.

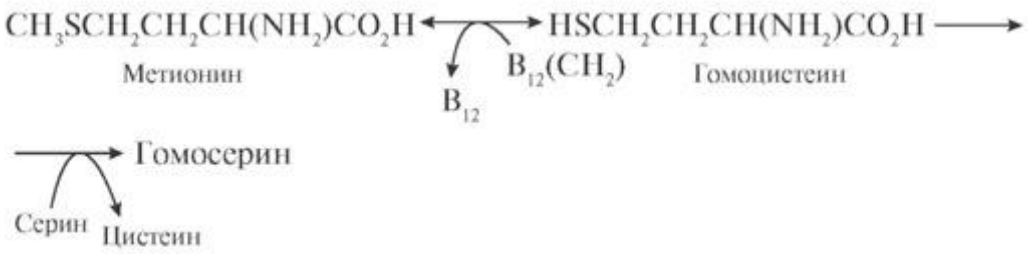
Нарушения обмена метионина

Гомоцистинурия - высокий уровень гомоцистина в моче, наследственное заболевание. Гомоцистинурия - результат нарушения обмена метионина, которое может проявляться на всех этапах развития организма. Как показали исследования, избыток гомоцистина в крови приводит к возникновению атеросклероза, сердечных заболеваний и инфаркту.

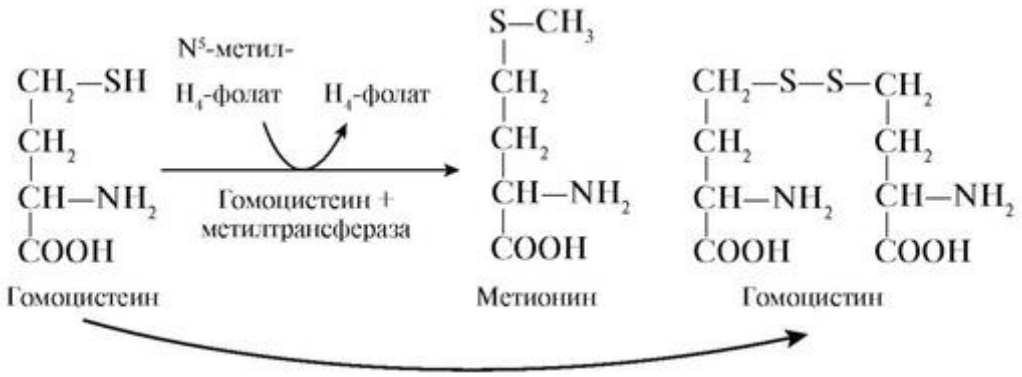
Наиболее характерны такие клинические проявления, как умственная отсталость, эктопия хрусталиков, костные деформации, тромбоэмболии и сердечно-сосудистая патология. Такие дети при рождении выглядят здоровыми. Следующим осложнением этого заболевания является тромбоэмболия сосудов различного диаметра, в частности головного мозга, которая может проявляться в любом возрасте.

Заболевание типично для моногенной патологии: реализуется вследствие единичной генной мутации, приводящей к нарушению синтеза первичного биохимического продукта.

Гомоцистеин - промежуточный продукт превращения метионина в гомосерин, синтезируется из метионина путем удаления терминальной метильной группы CH_3. Гомоцистеин может конвертироваться обратно в метионин с помощью витаминов B_{12} (цианокобаламины - кофакторы).



В основе гомоцистинурии лежит снижение активности фермента цистатионин-β-синтетазы и дефицит кофактора этого фермента - витамина B_{12} (субстрат - фолиевая кислота). В результате происходит накопление гомоцистина и метионина:



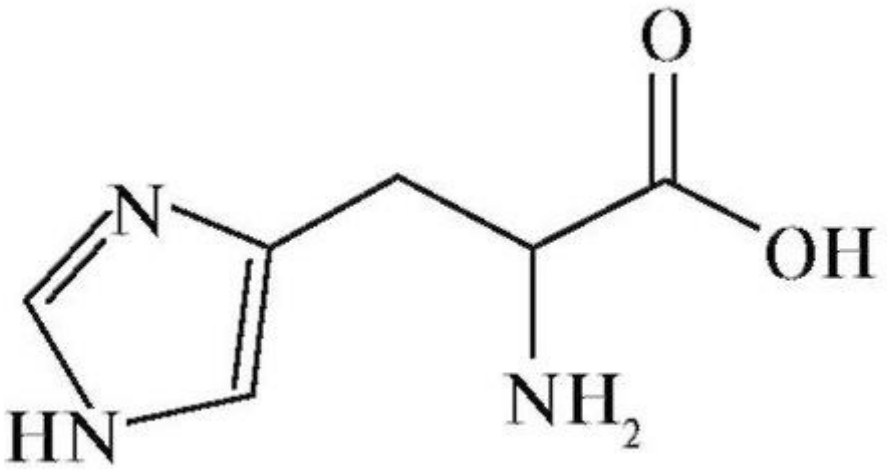
Гомоцистин - димер гомоцистеина.

Лечение гомоцистинурии включает большие дозы витамина B_6 и фолиевой кислоты, диетотерапию - продукты с низким содержанием метионина. Допустимое содержание метионина - 29-45 мг на 1 кг массы тела раз в сутки. Вместо коровьего молока можно использовать козье, которое содержит меньше метионина, а также кобылье молоко.

Нарушения обмена гистидина

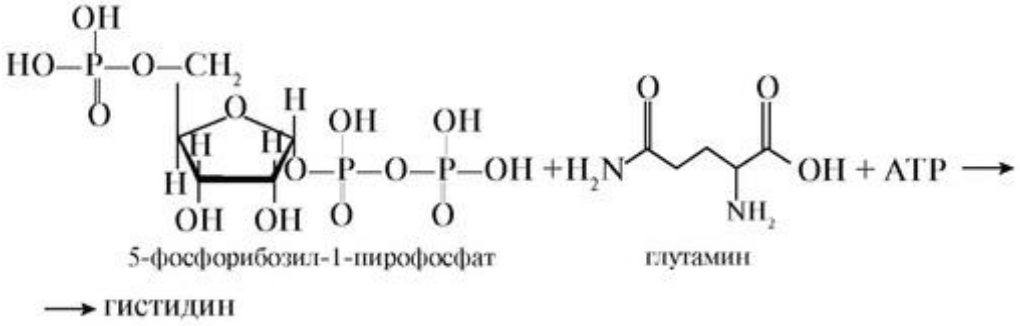
Гистидинемия - высокий уровень гистидина в крови. Накопление гистидина определяется наследственным дефектом гистидазы. Гистидинемия проявляется задержкой в умственном и физическом развитии детей. Наследственный дефект уроканиназы в печени может вызвать уроканинемию, при которой в крови повышается уровень уроканата. Симптомы этого патологического состояния во многом аналогичны симптомам других энзимопатий и проявляются отставанием умственного и физического развития.

Гистидин (L-α-амино-β-имидазолилпропионовая кислота) - гетероциклическая аминокислота:



Гистидин входит в состав активных центров различных ферментов, является предшественником в биосинтезе гистамина.

Биосинтез гистидина осуществляется из 5-фосфорибозил-1-пирофосфата с использованием фрагмента аденинового кольца АТФ и азота глутамина.



В разных тканях гистидин подвергается действию различных ферментов и включается в два разных метаболических пути: катаболизм до конечных продуктов и синтез гистамина (рис. 4.17).

В печени и коже гистидин подвергается дезаминированию под действием фермента гистидазы с образованием уроканиновой кислоты. Конечными продуктами катаболизма гистидина служат глутамат, NH_3 и производные H_4-фолата (N-формимино-H_4-фолат и N-формил-H_4-фолат).

Рис. 4.17. Схема обмена гистидина в разных тканях

Клиническая диагностика гистидинемии вариабельна - от тяжелой умственной отсталости до отсутствия симптомов, психомоторное и речевое развитие задерживается, характерна мышечная гипотония, судорожный синдром; светлые волосы и голубизна глаз.

При исследовании определяют уровень гистидина и уроканиновой кислоты в крови и моче, реакцию на прием препарата тидина (100 мг/ кг массы тела).

Нарушения обмена фенилаланина. Фенилкетонурия

Метаболические пути фенилаланина и тирозина (рис. 4.18) в разных тканях взаимосвязаны. Соответственно, взаимосвязаны патологии, обусловленные нарушениями обмена фенилаланина и тирозина.

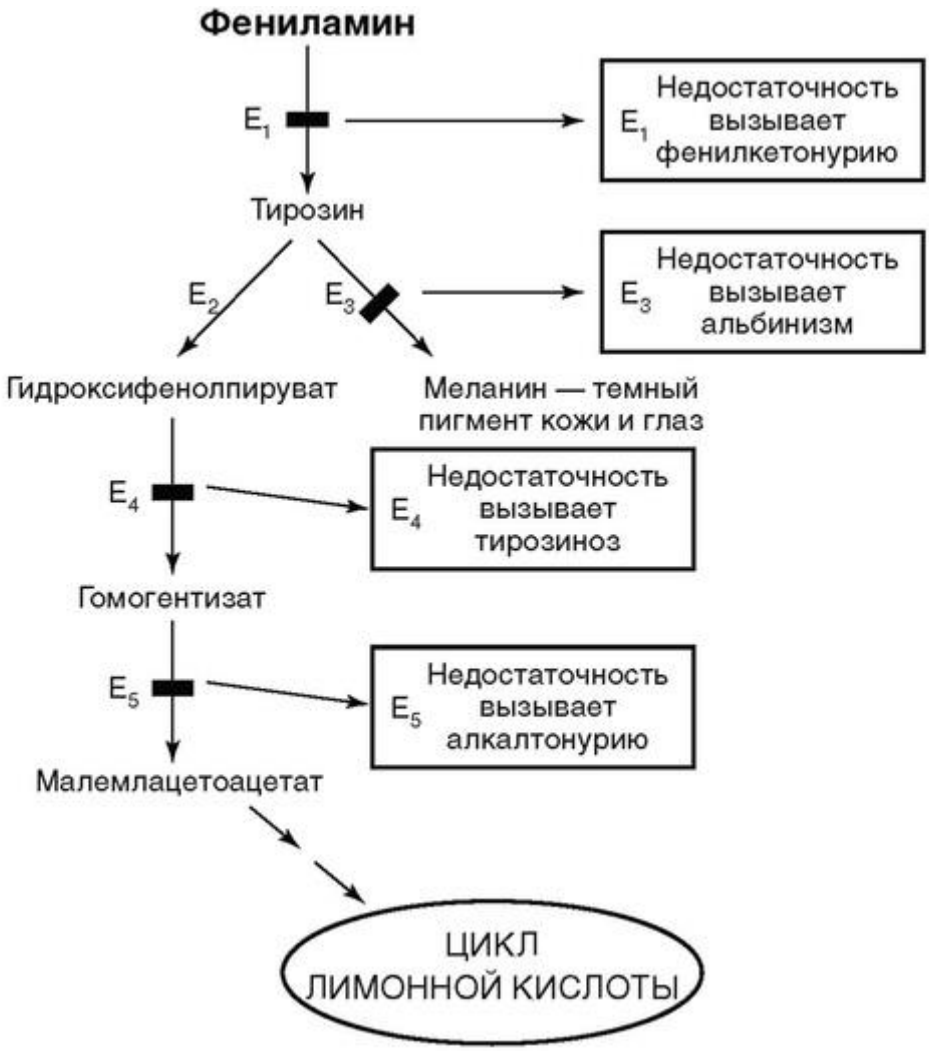


Рис. 4.18. Метаболические пути фенилаланина и тирозина. Ферменты: E_1 - фенилаланингидроксилаза; E_2 - диоксигеназа; E_3 - тирозиназа; E_4 - диоксигеназа; E_5 - диоксигеназа

Три ферментативных этапа фенилаланин-тирозинового метаболического пути особенно подвержены генетическим мутациям. В результате этих мутаций возникают три вида врожденных нарушений обмена.

У некоторых людей дефект затрагивает первый фермент (E_1) данного метаболического пути (см. рис. 4.18) - фенилаланингидроксилазу (ее называют также фенилаланин-4-монооксигеназой),катализирующую превращение фенилаланина до тирозина. Этот дефект служит причиной заболевания, которое получило название фенилкетонурии.

Фенилаланинмонооксигеназа катализирует реакцию, в которой один из двух атомов молекулы кислорода (O_2) включается в фенилаланин и образует гидроксильную группу тирозина. Второй атом кислорода восстанавливается при этом до H_2O за счет NADH, который также требуется для этой реакции:

фенилаланин + NADH + H^+ + O_2 → тирозин + NAD^+ + H_2O.

При наследственном дефекте, затрагивающем фенилаланин-4-монооксигеназу, на первый план выступает альтернативный путь обмена фенилаланина, в норме мало

используемый. На этом побочном пути фенилаланин претерпевает трансаминирование в реакции с оскетоглутаратом, что приводит к образованию фенилпирувата (рис. 4.19).

Фенилкетонурия (ФКУ) - наследственное заболевание. В печени здоровых людей небольшая часть фенилаланина (~10%) вместо тирозина превращается в фениллактат и фенилацетилглутамин.

Этот альтернативный путь катаболизма фенилаланина (см. рис. 4.19) становится главным при нарушении основного пути - превращения в тирозин, катализируемого фенилаланингидроксилазой.

Дефект фенилаланингидроксилазы приводит к гиперфенилаланинемии и повышению содержания в крови и моче метаболитов альтернативного пути: фениллактата, фенилацетилглутамина, фенилпирувата и фенилацетата. Этот дефект приводит к заболеванию - ФКУ.

При дефекте фенилаланингидроксилазы накопившийся фенила-ланин подвергается трансаминированию с α-кетоглутаратом. Образовавшийся фенилпируват превращается либо в фениллактат, либо в фенилацетилглутамин, которые накапливаются в крови и выделяются с мочой. Эти соединения токсичны для клеток мозга.

Известны две формы ФКУ - классическая и вариантная.

Классическая ФКУ - наследственное заболевание, связанное с мутациями в гене фенилаланингидроксилазы, которое приводит к снижению активности этого фермента или полной его инактивации. При этом концентрация фенилаланина повышается по сравнению с нормой в крови в 20-30 раз (норма - 1-2 мг/дл). Концентрация фенилпирувата и фениллактата в моче достигает 300-600 мг/дл. В норме эти вещества практически отсутствуют.

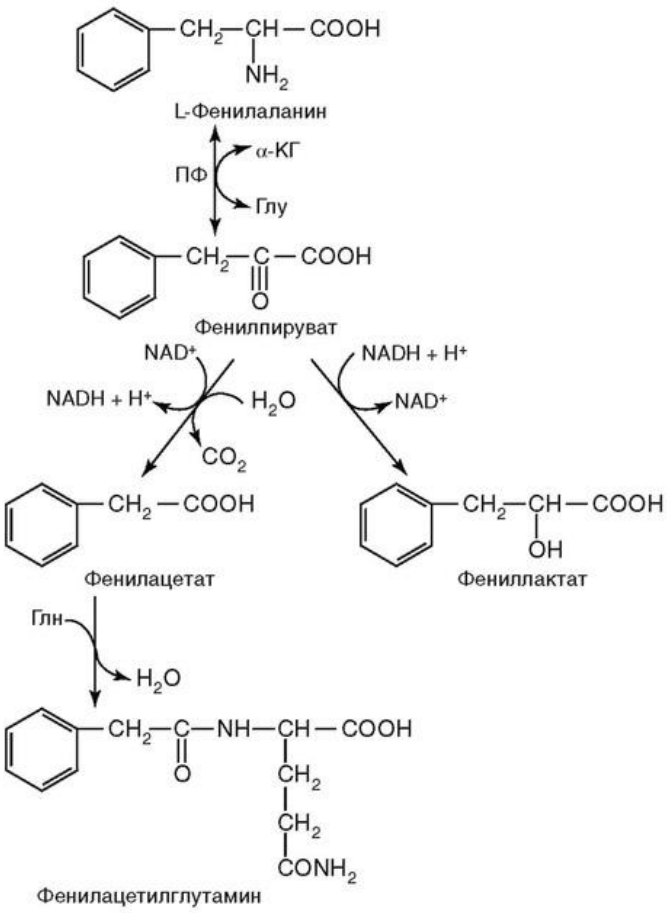


Рис. 4.19. Альтернативный путь катаболизма фенилаланина, приводящий к фенилкетонурии

Наиболее тяжелые проявления ФКУ - нарушения умственного и физического развития, судорожный синдром, нарушение пигментации. При отсутствии лечения больные не доживают до 30 лет. Частота заболевания - 1:10 000 новорожденных. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу.

Вариантная ФКУ (кофермент-зависимая гиперфенилаланинемия) - следствие мутаций в генах, контролирующих метаболизм тетрагидробиоптерина ($H_4БП$) (рис. 4.20).

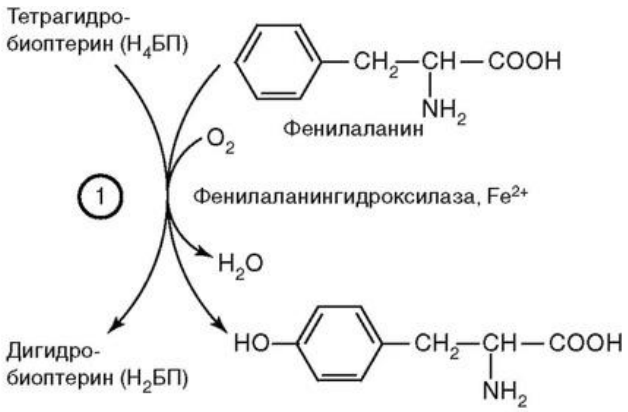


Рис. 4.20. Реакция гидроксилирования фенилаланина с образованием тирозина. Фермент фенилаланингидроксилаза

В результате дефекта фенилаланингидроксилазы в крови возрастает уровень фенилаланина, приводящий к патологии. Диагностику мутантного гена, ответственного за ФКУ, можно проводить с помощью рестрикционного анализа и ПЦР.

Клинические проявления близки к проявлениям классической ФКУ. Заболеваемость - 1-2 случая на 1 млн новорожденных. Наблюдается прогрессирующее нарушение умственного и физического развития у детей.

Развитие ФКУ можно предотвратить диетой с очень низким содержанием или полным исключением фенилаланина.

Почти во всех белках содержится какое-то количество фенилаланина. В малых количествах он все же необходим для нормального роста (это одна из незаменимых аминокислот), поэтому состав рациона больного ребенка следует очень тщательно контролировать. Природные белки, например казеин молока, следует предварительно подвергать гидролизу и удалять из них фенилаланин.

Нарушения обмена тирозина. Тирозинемия. Болезнь Паркинсона

Известен ряд заболеваний, связанных с нарушениями обмена тирозина.

Тирозинемия - наследственное заболевание. Клинический анализ плазмы крови устанавливает повышение содержания тирозина в 2-3 раза по сравнению с нормой.

Различают три типа тирозинемии, обусловленных дефектами ферментов в метаболическом пути тирозина (рис. 4.21).

Тирозинемия типа I (тирозиноз). Причиной заболевания является дефект фермента E_4фумарилацетоацетатгидролазы, катализирующего расщепление фумарилацетоацетата на фумарат и ацетоацетат.

Накапливающиеся на пути тирозина метаболиты снижают активность некоторых ферментов и транспортных систем аминокислот. Содержание тирозина в крови у больных в несколько раз превышает норму.

Патофизиология этих нарушений метаболизма имеет сложный характер.

Острая форма тирозиноза характерна для новорожденных. Клинические проявления - диарея, рвота, задержка в развитии. Без лечения дети погибают в возрасте 6-8 мес из-за развивающейся недостаточности печени.

Хроническая форма характеризуется сходными, но менее выраженными симптомами. Гибель наступает в возрасте 10 лет.

Для лечения используют диету с пониженным содержанием тирозина и фенилаланина.

Тирозинемия типа II. Причина - дефект фермента тирозинаминотрансферазы E_1 (см. рис. 4.21). Концентрация тирозина в крови больных повышена. Для заболевания характерны поражения глаз и кожи, умеренная умственная отсталость, нарушения координации движений.

Тирозинемия новорожденных. Заболевание (кратковременное) возникает в результате снижения активности фермента n-гидроксифенил-ируватдиоксигеназы E_2, превращающего n-гидроксифенилпируват в гомогентизиновую кислоту (рис. 4.22). В результате анализ крови показывает повышенные концентрации n-гидроксифенилпирувата, тирозина и фенилаланина.

Для лечения используют бедную белком диету и витамин С.

Болезнь Паркинсона. Болезнь Паркинсона развивается при недостаточности дофамина в черной субстанции мозга. Это одно из самых распространенных неврологических заболеваний (1:200 среди людей старше 60 лет).

Катаболизм тирозина происходит несколькими путями (рис. 4.23).

При болезни Паркинсона снижена активность тирозингидроксилазы и ДОФА-декарбоксилазы.

Заболевание сопровождается тремя основными симптомами: акинезией (скованностью движений), ригидностью (напряжением мышц), тремором (непроизвольным дрожанием).

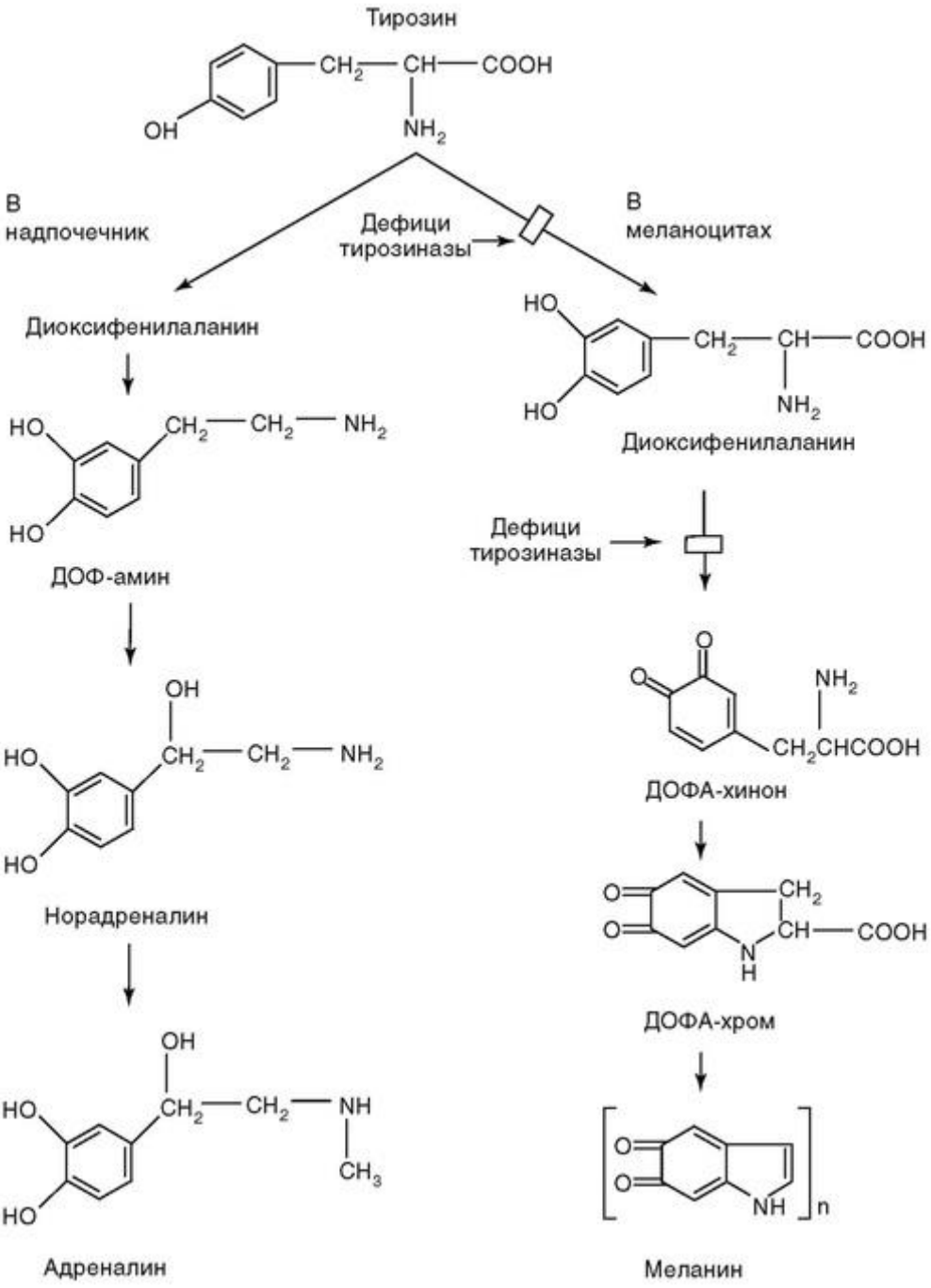


Рис. 4.21. Метаболическая сеть тирозина при дефиците тирозиназы, приводящем к альбинизму

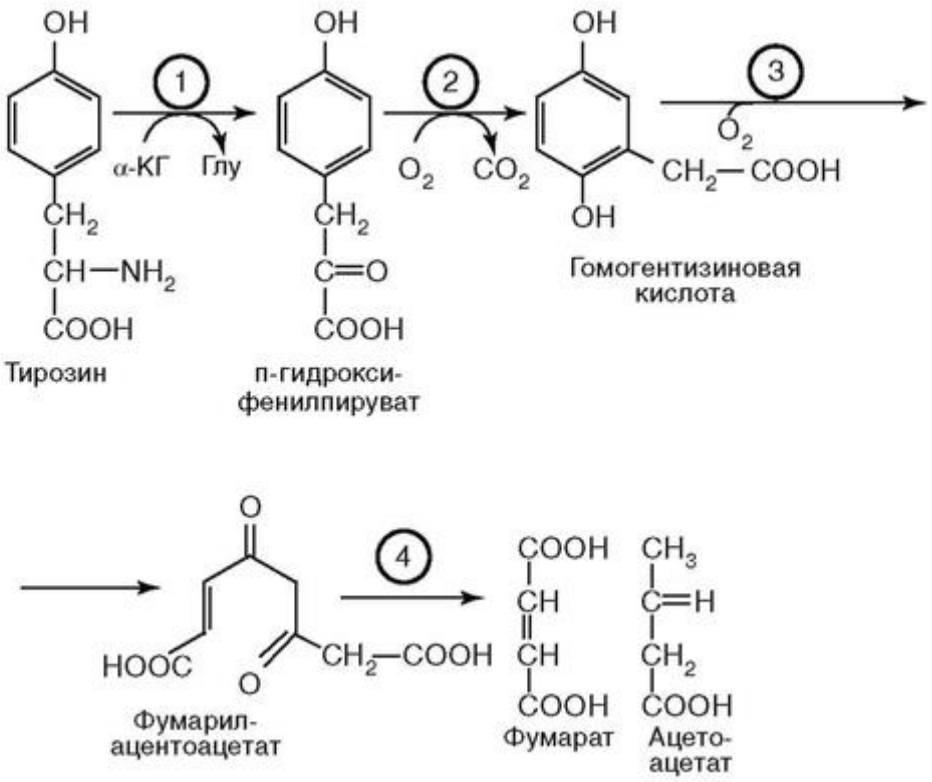


Рис. 4.22. Метаболический путь тирозина в норме

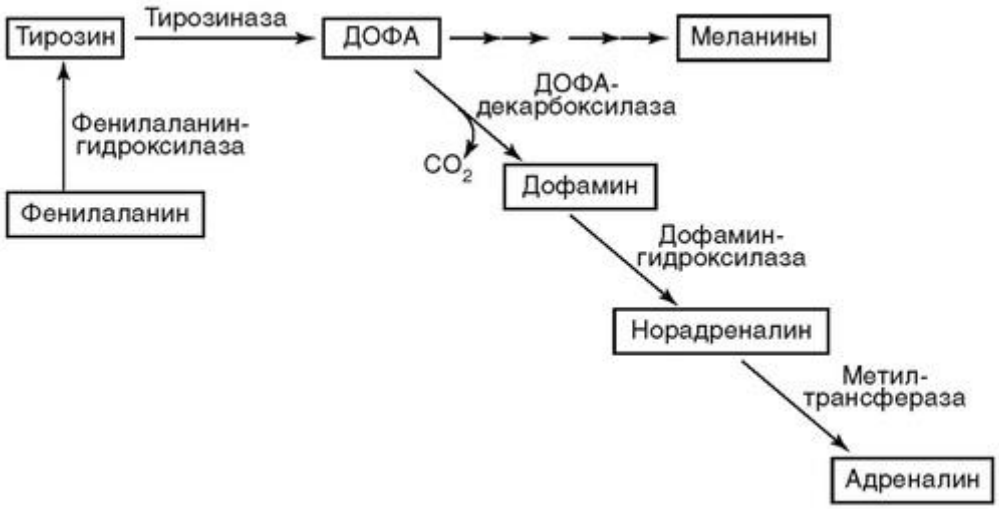


Рис. 4.23. Метаболическая сеть тирозина

Дофамин не проникает через гематоэнцефалический барьер и как лекарственный препарат не используется.

Со снижением в нервных клетках содержания дофамина и норадреналина часто связаны депрессивные состояния.

Гиперсекреция дофамина в височной доле мозга наблюдается при шизофрении.

Для лечения паркинсонизма применяют: заместительную терапию леводопой, мадопаром♠, накомом♠ - предшественниками дофамина, подавление инактивации дофамина депренилом♠, ниаламидом♠, пирлиндолом (пиразидолом♠) - ингибиторами моноаминооксидазы.

Альбинизм

Альбинизм - наследственное заболевание. Частота заболевания - 1:20 000. При клиническом анализе кожных и волосяных покровов, плазмы крови и мочи выявляется сильно пониженное содержание меланина. Клиническое проявление альбинизма (от лат. *albus* - белый) - отсутствие пигментации кожи и волос.

Причина метаболического нарушения - врожденный дефект тирозиназы. Этот фермент катализирует превращение тирозина в катехоламин - дофамин (ДОФА) в меланоцитах - клетках, синтезирующих пигменты - меланины (см. рис. 4.16). В результате дефекта тирозиназы синтез меланинов нарушается.

У больных часто снижена острота зрения, возникает светобоязнь. Длительное пребывание таких больных под открытым солнцем приводит к раку кожи. В результате отсутствия меланина кожа приобретает молочно-белый цвет (альбинизм), наблюдаются светобоязнь, просвечивание радужной оболочки, снижение остроты зрения. Солнечное облучение вызывает воспалительные изменения кожи - эритему. Альбинизм может сопровождаться глухотой, немотой, эпилептической полидактилией и олигофренией.

Дофамин - нейромедиатор, вырабатываемый в головном мозге, поэтому нарушение синтеза этого нейромедиатора при альбинизме может служить причиной различных нервно-психических заболеваний. При этом патологические отклонения наблюдаются как при снижении, так и при увеличении количества катехоламинов.

Алкаптонурия

Алкаптонурия (алкаптон - бензохинонацетат + греч. *uron* - «моча») - «черная моча» - наследственное заболевание. Заболеваемость - 2-5 случаев на 1 млн новорожденных. Алкаптонурией чаще болеют мужчины. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Ген оксидазы гомогентизиновой кислоты человека локализован на длинном плече хромосомы 3 человека (3q 21-23).

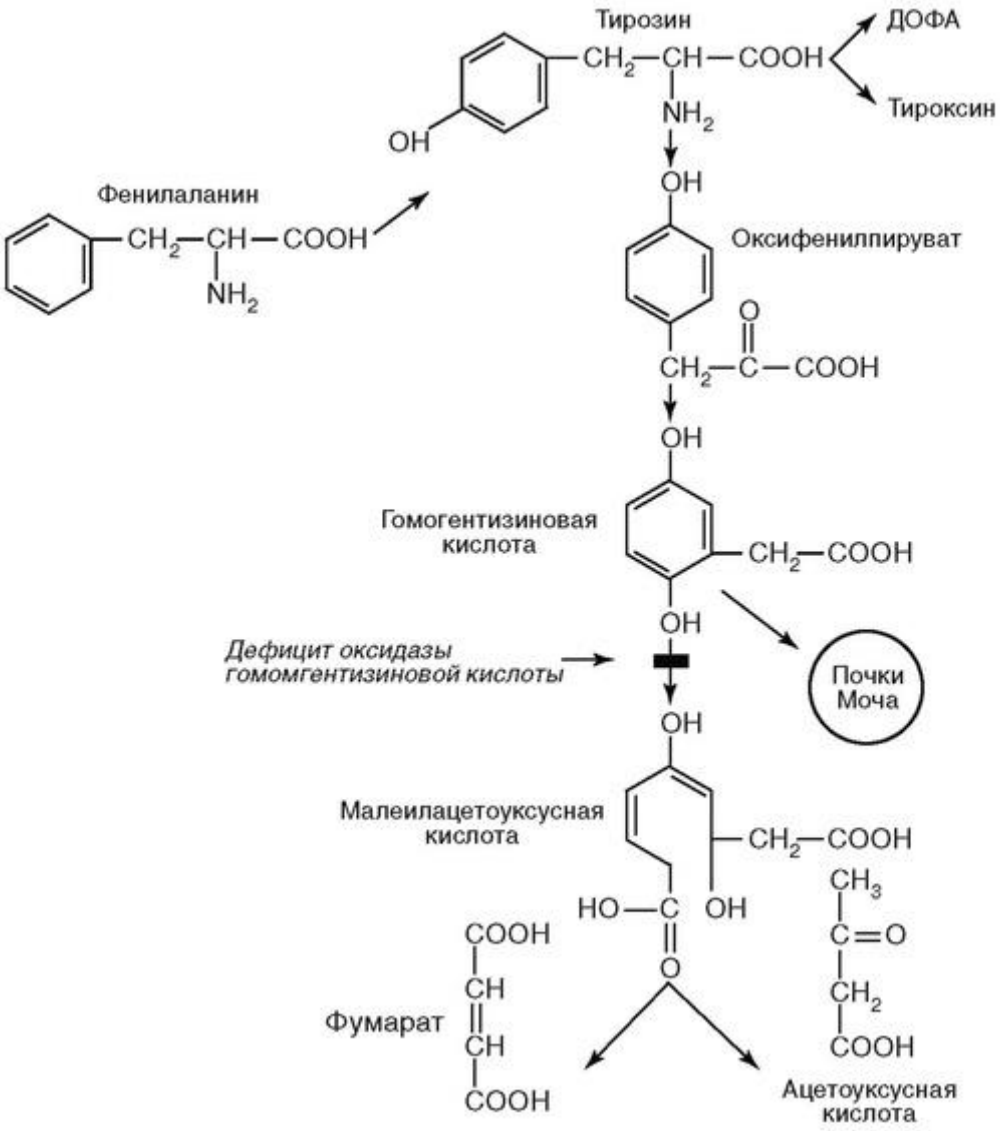


Рис. 4.24. Метаболическая сеть тирозина при дефекте диоксигеназы гомогентизиновой кислоты, приводящем к алкаптонурии

При клиническом анализе плазмы крови и мочи выявляется повышенное содержание гомогетинзиновой кислоты и алкаптона.

В нормальных условиях (рис. 4.24) гомогентизиновая кислота (промежуточный продукт распада тирозина) превращается в малеилацето-уксусную кислоту, из которой в конечном счете образуются фумаровая и ацетоуксусная кислоты.

Вследствие дефекта диоксигеназы (см. рис. 4.24) это превращения тормозится, и остающаяся в избытке гомогентизиновая кислота выводится почками. В моче гомогентизиновая кислота окисляется кислородом воздуха и превращается в темные пигменты - алкаптоны (бензохинонацетат - хиноновый полифенол).

Клиническими проявлениями болезни являются пигментация соединительной ткани (охроноз) и артрит. Не полностью экскретируемый мочой алкаптон откладывается в хрящевой и другой соединительной ткани, обусловливая их потемнение и повышенную хрупкость. Часто появляется пигментация склер и ушных хрящей.

Диагностических методов выявления гетерозиготных носителей дефектного гена к настоящему времени не найдено.

Нарушения обмена лейцина. Лейциноз

Лейциноз (валинолейцинурия, болезнь кленового сиропа) - наследственное заболевание.

При клиническом анализе плазмы крови выявляется повышенное содержание аминокислот с разветвленной цепью (лейцина, изолейцина и валина).

Клинические проявления лейциноза (от греч. *leukos* - «белый») - приступы судорог, слепота, прогрессирующая ригидность, отсутствие пигментации кожи и волос.

Лейциноз - заболевание, связанное с нарушением метаболизма разветвленных аминокислот с блоком окислительного декарбоксилирования, дефицитом декарбоксилазы α-кетокислот (рис. 4.25).

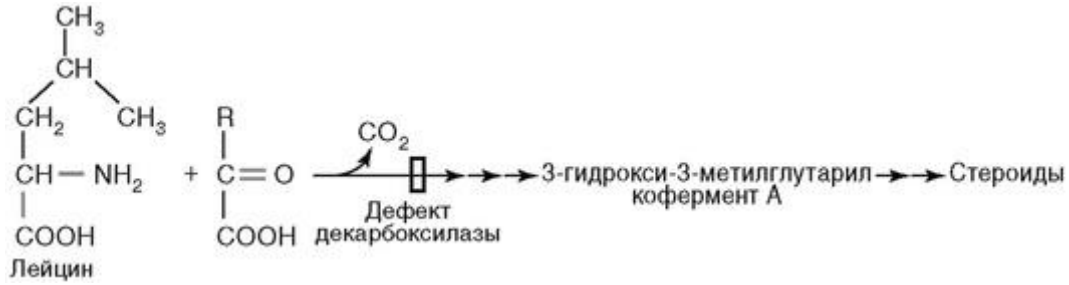


Рис. 4.25. Метаболическая сеть лейцина при дефекте декарбоксилазы α-кето-кислот

Наиболее ярким отличительным признаком этой болезни является характерный запах мочи больного, напоминающий запах кленового сиропа или жженного сахара.

Характерно сильно повышенное содержание аминокислот с разветвленной цепью и соответствующих им разветвленных кетокислот, поэтому болезнь кленового сиропа иногда называют кетонурией. Отмечено также присутствие в моче разветвленных α-гидроксикислот, образующихся при восстановлении α-кетокислот. Механизм токсического действия накапливающихся соединений неизвестен.

Больным назначают диету с заменой белков смесью очищенных аминокислот, не содержащей лейцина, изолейцина и валина. После того как содержание этих трех аминокислот в плазме снизится до нормального уровня, можно вводить их в пищу, например в составе молока и других продуктов, но лишь в таком количестве, чтобы обеспечить (но не превысить) потребности в аминокислотах с разветвленной цепью.

Роль фолиевой кислоты в обмене аминокислот. Макроцитарная анемия

В превращениях серина и глицина главную роль играют ферменты, коферментами которых служат производные фолиевой кислоты.

Фолиевая кислота - витамин, широко распространенный в животной и растительной пище.

Молекула фолиевой кислоты (фолата) состоит из остатков птериноила, глутамила и парааминобензоила, поэтому фолат называют также птероилглутаминовой кислотой.

Коферментную функцию выполняет восстановленная форма фолата - тетрагидрофолиевая кислота (или H_4-фолат). H_4-фолат - акцептор β-углеродного атома серина. При этом образуется метиленовый мостик между атомами азота в молекуле H_4-фолата в положениях 5 и 10, образуя метилен-H_4-фолат. В H_4-фолате фолиевая кислота превращается в печени в несколько стадий с участием ферментов фолатредуктазы и дигидрофолатредуктазы, коферментом которых служит NADPH.

Недостаточность фолиевой кислоты у человека возникает редко. Гиповитаминоз фолиевой кислоты приводит к нарушению обмена одноуглеродных фрагментов. Такое же нарушение наблюдается и при недостаточности витамина B_{12}, функция которого связана с обменом фолиевой кислоты.

Первое проявление фолатодефицита - мегалобластная (макроцитарная) анемия. Этот вид анемии характеризуется уменьшением количества эритроцитов, снижением содержания в них гемоглобина, что вызывает увеличение размера эритроцитов.

Причина этих симптомов - нарушение синтеза ДНК и РНК из-за недостатка в метаболическом пути предшественников - тимидиловой кислоты и пуриновых нуклеотидов вследствие дефицита производных тетрагидрофолиевой кислоты. Клетки кроветворной ткани в первую очередь реагируют на нарушение синтеза нуклеиновых кислот снижением скорости эритропоэза.

4.3.4. Развитие молекулярной диагностики патологий, связанных с нарушениями обмена белков

Рассмотрение наследственных патологий в предыдущем разделе показывает их тесную связь с дефектами ферментативной активности белков, то есть с протеомикой.

В 2002 г. начат проект «Протеом плазмы крови». Основной целью проекта является определение общего числа индивидуальных белков в плазме крови и диагностическое значение различных белков.

На первом этапе проекта была создана аннотированная база данных 3000 белков плазмы крови человека. Эта база данных содержала информацию об особенностях масс-спектрального анализа, идентификации, концентрации и стабильности каждого белка.

На втором этапе на основе масс-спектрометрической идентификации было идентифицировано еще 9500 белков. Следующий этап проекта - построение протеомов плазмы, характерных для различных патологий, и формулировка их диагностических показателей.

Важными направлениями молекулярной диагностики являются кардиоваскулярная геномика, транскриптомика и протеомика.

Известно, что моноциты кровотока способствуют развитию воспаления в стенках артерий, что приводит к атеросклерозу. Анализ транскриптома моноцитов показал, что после коронарного шунтирования у пациентов повышается уровень экспрессии белка онкогена FOS. Оказалось, что корреляция между шунтированием и повышенным уровнем

экспрессии гена FOS выше, чем корреляция между шунтированием и уровнем С-реактивного белка - маркера атеросклероза.

Повышение вероятности развития атеросклероза может быть связано с мутациями в различных генах, например, в гене *ALOX5AP,* который кодирует белок 5-липооксигеназы. Этот белок активирует синтез лейкотриена - липида, медиатора воспалительного процесса в стенках сосудов.

Развитие осложнений заболеваний, вызванных атеросклерозом, во многих случаях связано с сосудистой адгезией тромбоцитов - гемостазом. В этой связи быстро развивается направление молекулярной диагностики, основанной на протеомике тромбоцитов. Изучены механизмы, приводящие к нарушениям тромбоцитарной активности.

При анализе протеомов тромбоцитов были идентифицированы белки, которые секретируются тромбоцитами при активации. Было установлено, что при стимуляции тромбином тромбоциты выделяют более 300 белков. Аналогичные белки секретируются также и другими клетками. Оказалось, что в атеросклеротических повреждениях локализована примерно треть белков секретома. Эти исследования привели к идентификации новых мишеней для новых лекарственных препаратов, например циклофилина А и калуменина.

К настоящему времени созданы базы данных по сотням белков протеома миокарда, уровни которых изменяются при хронических и острых сердечно-сосудистых патологиях. Обнаружено, что при таких патологиях возрастают концентрации белков теплового шока.

Диагностически важные белки кардиопротеома подразделяют на три класса: белки, определяющие биоэнергетику и метаболизм, белки, индуцируемые стрессом, и белки, обеспечивающие контрактацию и формирование цитосклета.

Разработан информативный метод молекулярной диагностики на основе изучения протеомов биопсии миокарда, взятых до и после кардиохирургии. Обнаружено, что уровни более 100 кардиоспецифических белков значительно изменяются при дилатационной кардиомиопатии.

При различных формах сердечной недостаточности в начальных стадиях имеет место компенсаторная адаптация работы сердца к патологическим изменениям. В частности, развивается гипертрофия левого желудочка. В таких случаях электрокардиография, клинические и гемодинамические показатели не всегда отражают переход от патологии к норме. При определении изменений кардиопротеома до и после кардиохирургии возвращение к норме надежно определяется, в частности, при коронарном шунтировании.

Несомненно, что кардиопротеомная молекулярная диагностика в сердечно-сосудистой хирургии станет необходимым разделом общей клинической диагностики.

Эритропоэтин

Эритропоэтин (от *греч. erythros* - «красный» *и poietikos - «образующий»)* - гликопротеин, содержащий 35% углеводов, молекулярная масса - 30-40 000 Да, гормон, стимулирующий образование эритроцитов в костном мозге. Обладает антигенными свойствами, инактивируется нейраминидазой, трипсином, химотрипсином и папаином.

Эритропоэтин - основной регулятор эритропоэза, стимулирует образование эритроцитов из поздних клеток-предшественников и повышает выход ретикулоцитов из костного мозга.

У взрослых эритропоэтин вырабатывается главным образом почками, и небольшое количество синтезируется в печени. Продукция эритропоэтина зависит от соотношения между потребностями тканей в кислороде и его доставкой, секреция эритропоэтина возрастает при гипоксии.

Измерение уровня эритропоэтина в плазме - важный диагностический метод. В частности, при повышенном уровне этого гормона исключается эритремия как причина эритроцитоза.

Рекомбинантные препараты эритропоэтина, полученные методами генной инженерии (например эпоэтин-альфа и эпоэтин-бета), успешно излечивают состояния, сопровождаемые недостаточной секрецией этого гормона, например, анемию при заболеваниях почек.

Естественный и рекомбинантный эритропоэтин имеют почти идентичную аминокислотную структуру. Именно поэтому рекомбинантный эритропоэтин чрезвычайно трудно отличить от физиологического аналога традиционными методами лабораторной диагностики. Современные методы молекулярной диагностики по идентификации белков (см. главу 3) дают возможность определить точное соотношение естественного и рекомбинантного эритропоэтина в плазме крови.

Прием рекомбинантного эритропоэтина повышает кислородную емкость и ускоряет транспорт кислорода в ткани. Именно поэтому это вещество вызывает повышение работоспособности в видах спорта с преимущественным проявлением аэробной выносливости. К таким спортивным дисциплинам относятся все виды легкоатлетического бега, начиная от 800 м, а также все виды бега на лыжах и велосипедные гонки. Кроме того, эритропоэтин способен заменить массовое использование анаболических стероидов.

В связи со стимулирующим действием препараты эритропоэтина применяют в качестве допинга в сочетании со станазололом, инсулином и соматотропным гормоном. Эти допинги запрещены спортивными организациями.

Аллергопротеомика

Аллергопротеомика - один из разделов протеомики, основанный на анализе белков - иммуноглобулинов и мониторинге изменений протеомов иммуноглобулинов при патологиях. На этой основе проводится молекулярная диагностика аллергий и бронхиальной астмы.

Иммуноглобулины (антитела) - глобулярные белки гликопротеидной природы.

Иммуноглобулины используются иммунной системой для идентификации и нейтрализации чужеродных объектов (биогенных молекул, токсинов, бактерий, вирусов) и поэтому называются антителами.

Синтез иммуноглобулинов осуществляется В-лимфоцитами плазмы крови в ответ на присутствие антигенов. Для каждого антигена формируются соответствующие ему специализировавшиеся плазматические клетки, вырабатывающие специфичные для этого

антигена антитела. Антитела распознают антигены, связываясь с характерным фрагментом (эпитопом) поверхности чужеродной клетки или линейной аминокислотной цепи антигена.

Основное количество иммуноглобулинов находится в сыворотке крови, лимфе, слюне и других жидкостях организма, а также на поверхности клеточных мембран, где они выполняют роль рецепторов и нейтрализуют или разрушают антигены.

Выделяют пять классов (изотипов) иммуноглобулинов, различающихся молярной массой, зарядом, первичной структурой и содержанием углеводов. В соответствии со структурными и антигенными свойствами Н-цепей иммуноглобулины разделяют на пять классов: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE.

• IgG являются основными эффекторами иммунитета человека.

• IgM выполняют роль рецепторов В-лимфоцитов и обеспечивают ранний противоинфекционный иммунитет.

• IgA обеспечивают местный иммунитет на слизистых оболочках.

• IgD - рецепторы В-лимфоцитов.

• IgE - эффекторы аллергических реакций и противопаразитарного иммунитета.

Иммуноглобулин G (IgG) (см. рис. 2.8) доминирует среди иммуноглобулинов во внутренних жидкостях организма, особенно во внесосудистых, где обеспечивает защиту от микроорганизмов и токсинов. Способен преодолевать плацентарный барьер.

Иммуноглобулин М (IgM) эффективно агглютинирует антигены, синтезируется на ранних стадиях иммунного ответа - образует первую линию обороны при бактериемии. Неспособен преодолевать плацентарный барьер.

Иммуноглобулин А (IgA) - основной иммуноглобулин слизистых секретов. Обеспечивает защиту слизистых оболочек от инфекций. Неспособен преодолевать плацентарный барьер.

Иммуноглобулин D (IgD) в основном связан с мембраной лимфоцитов и неспособен преодолевать плацентарный барьер.

Иммуноглобулин Е (IgE) отвечает за связывание антигенов на слизистых оболочках. Привлекает антибактериальные вещества. Участвует в защите от бактериальных инвазий. Обеспечивает проявление симптомов аллергии. Иммуноглобулин Е неспособен преодолевать плацентарный барьер.

Содержание иммуноглобулинов в биопробах определяют различными методами анализа протеинов (см. главу 3).

Препараты специфических антител (иммунные сыворотки) используют для лечения, диагностики и профилактики инфекционных заболеваний (гамма-глобулины, антитоксические сыворотки).

Большая часть антител относится к IgG-глобулинам. Гамма-глобулины - широко применяемые в лечебных целях препараты, - состоят в основном из IgG.

В норме иммуноглобулин IgE составляет менее 0,001% всех иммуноглобулинов сыворотки крови. Его концентрация в сыворотке крови взрослого человека составляет менее 0,05 г/л. Содержание IgE в сыворотке крови здоровых людей зависит от возраста (табл. 4.2).

Таблица 4.2. Содержание IgE в сыворотке крови здоровых людей

Возрастная группа	Содержание, кЕ/л
Новорожденные	0-2
3-6 мес	3-10
1 год	8-20
5 лет	10-50
10 лет	15-60
Взрослые	20-100

IgE можно обнаружить в организме человека уже на 11-й неделе внутриутробного развития. Содержание IgE в сыворотке крови возрастает постепенно с момента рождения человека до подросткового возраста.

В пожилом возрасте уровень IgE может снижаться.

Уровни IgE в сыворотке крови зависят от патологии (рис. 4.26). У больных, страдающих бронхиальной астмой, аллергическим ринитом и поллинозом, средние значения общего IgE существенно увеличены.

Методами протеомики идентифицированы четыре специфических белка-биомаркера бронхиальной астмы. Это позволяет более точно ставить диагноз и определять специфику заболевания путем оценки комбинации этих соединений.

Все четыре белка вовлечены в регуляцию воспаления и синтезируются преимущественно в печени. Результаты были подтверждены данными, полученными в представительных группах здоровых и больных астмой людей.

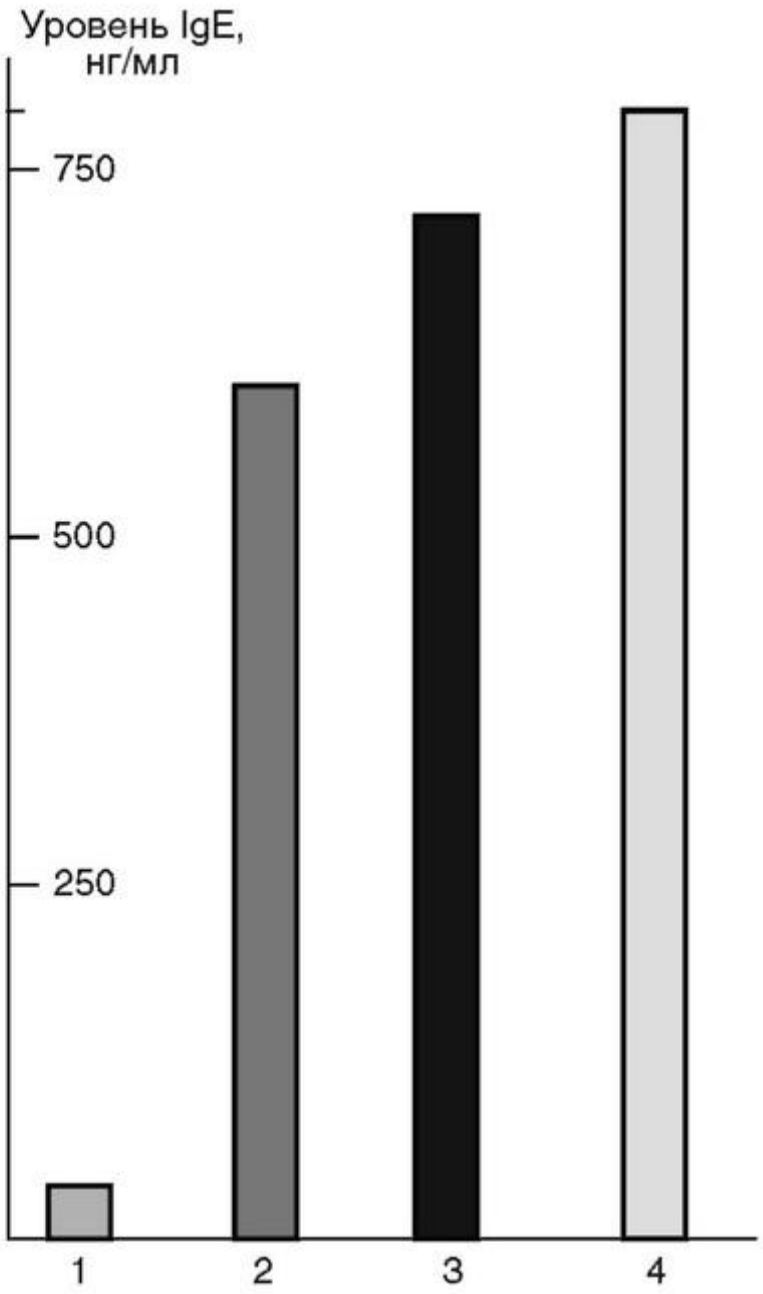


Рис. 4.26. Содержание IgE в сыворотке крови в норме и при патологических состояниях: 1 - норма; 2 - поллиноз (сенная лихорадка); 3 - бронхиальная астма; 4 - аллергический ринит

Такие современные методики молекулярной диагностики дают возможность взглянуть на различные болезни с новой стороны.

Онкопротеомика

Еще одним интенсивно разрабатываемым разделом молекулярной диагностики является онкопротеомика - протеомика онкологических патологий.

Диагностика онкологических патологий основана на анализе протеомов и их динамики при развитии различных опухолей. К настоящему времени определены пути передачи

клеточных сигналов, приводящих к онкогенезу. Идентифицированы маркеры для диагностики типа опухоли и контроля организма на хирургическое вмешательство и терапию.

Обнаружены маркерные гены, активирующиеся на ранних стадиях онкогенеза, и соответствующие им маркерные белки. Найдены молекулярные маркеры, позволяющие проводить классификацию опухолей. Обнаружены предикторы метастазирования и маркеры, позволяющие прогнозировать развитие онкозаболеваний.

Важным достижением онкопротеомики является определение протеоинтерактома - комплекса всех белков, взаимодействующих с данным белком. Мутации в гене белка p53 весьма часто приводят к канцерогенезу.

Например, определение интерактома белка p53 выявило все белки, с которыми взаимодействует этот белок. В результате были установлены пути передачи внутриклеточных сигналов, приводящих к злокачественному росту и к устойчивости опухоли к химиотерапии.

4.4. ЛИПИДОМИКА

Липидомика - раздел метаболомики (от лат. *lipos* - «жир» и греч. *-omics* - суффикс, обозначающий «полный, целый, весь») - раздел молекулярной биологии, посвященный изучению липидома живых организмов.

В липидомике изучают сети метаболизма липидов и взаимодействующих с ними белков, нуклеиновых кислот, стероидов и других веществ в биологических системах (рис. 4.27).

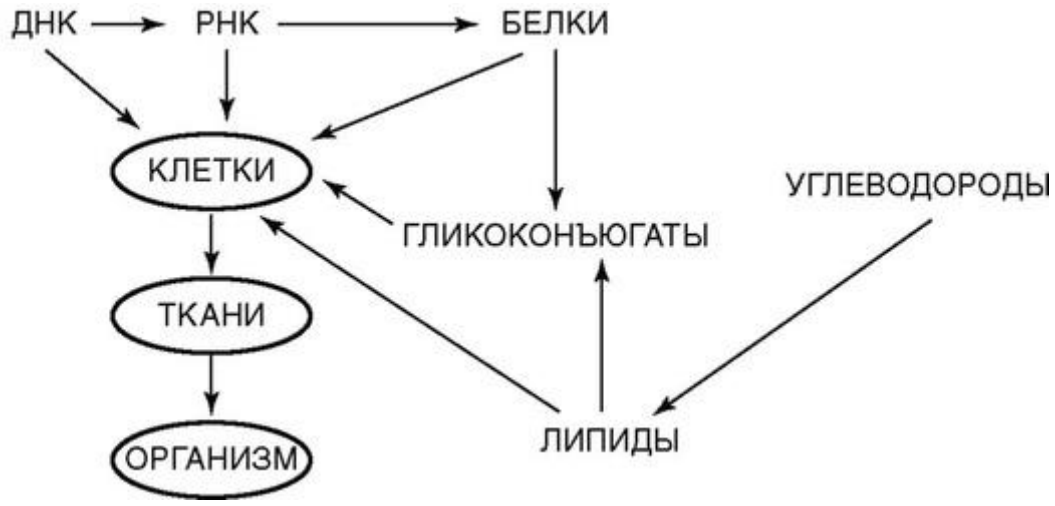


Рис. 4.27. Метаболические сети липидов

Липидом описывает весь набор липидов внутри клетки, ткани или организма. Развитие липидомики обусловлено быстрым развитием таких методов, как масс-спектрометрия, ядерный магнитный резонанс, флюоресцентная спектроскопия, и вычислительных методов, связанных с признанием существенной роли липидов во многих метаболических заболеваниях, таких как ожирение, атеросклероз, инсульт, гипертония и сахарный диабет.

Системы молекулярной диагностики в липидомике включают идентификацию и количественное определение различных клеточных липидов, их взаимодействия с другими жирами, белками и метаболитами (рис. 4.28).

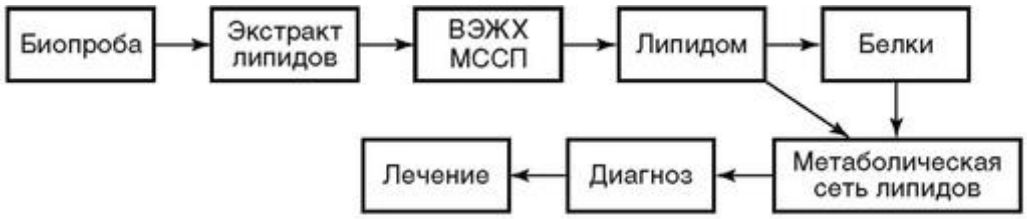


Рис. 4.28. Система молекулярной диагностики в липидомике

Липидомика количественно описывает пространственные и временные изменения в содержании и составе липидов, накопленных при нарушениях в клетках при изменении физиологического или патологического состояния. Информация, полученная при этом, облегчает понимание изменений функционирования клеток.

Таким образом, исследования играют существенную роль в определении и понимании биохимических механизмов патологических процессов путем выявления изменений в клеточном метаболизме липидов и нарушении гомеостаза.

С нарушениями метаболизма липидов связаны различные заболевания человека.

• Сердечно-сосудистые заболевания - простагландины и другие эйкозаноиды.

• Сахарный диабет, избыточная масса тела - ядерные рецепторы (PPAR).

• Нейродегенеративные заболевания, шизофрения, депрессия - полиненасыщенные жирные кислоты.

• Бронхиальная астма - лейкотриены *(lukasts* + рак).

Наследственные болезни обмена липидов - обширная группа патологических состояний, связанных с нарушением жирового обмена. К ним, в частности, относятся плазматические липидозы, для которых характерно накопление липидных субстанций внутри клеток (болезнь Ниманна-Пика и др.), нарушения обмена липопротеинов (α- и β-липопротеинемии).

Пролиферация, миграция и апоптоз клеток связаны с полиненасыщенными жирными кислотами, простагландинами, 3-фосфоинозидами, церамидами, сфингозинфосфатом, лизофосфолипидами, полиненасыщенными жирными кислотами.

Результаты исследований в области липидомики находят широкое применение в нанобиотехнологии и молекулярно-диагностических исследованиях. Перспективы изучения липидома связывают с созданием новых лекарственных препаратов и биосенсоров.

4.4.1. Клинические аспекты обмена липидов

Большинство ученых считают атеросклероз болезнью не только артерий, но и всего обмена веществ и нервного аппарата, регулирующего кровообращение и питание сосудистых стенок.

В клинической практике проводят определение уровня общих жиров и жировых фракций, свободных неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК), фосфолипидов и холестерина.

Таблица 4.2. Содержание липидов в плазме крови взрослых здоровых людей

Липиды	Содержание, г/л
Неэстерифицированные жирные кислоты	0,08-0,2
Триглицериды	0,5-1,9
Фосфолипиды (без сфингомиелинов)	1,1-2,8
Сфингомиелины	0,3-0,6
Холестерин неэстерифицированный	0,5-0,8
Холестерин эстерифицированный	1,0-1,7
Холестерин общий	1,5-2,5

При атеросклерозе в крови повышается уровень холестерина, достигающий в отдельных случаях 5 г/л вместо 1,5-2,5 г/л в норме, а также β-липопротеинов, которые являются основной транспортной формой липидов и холестерина.

В норме количество общего жира в плазме крови составляет 5,6 г/л, из них 1,4 г/л - нейтрального жира. Эти величины через 1-4 ч после приема пищи могут возрастать примерно в полтора раза. Такое физиологическое состояние называется алиментарной (пищевой) гиперлипемией. Гиперлипемию обнаруживают при сахарном диабете, воспалении поджелудочной железы, острых гепатитах (воспаление паренхимы печени), лихорадочных состояниях.

Доказана ведущая роль определенных классов липопротеинов в патогенезе атеросклероза. Положение акад. Н.Н. Аничкова: «Без холестерина нет атеросклероза» с учетом современных знаний можно выразить иначе: «Без атерогенных липопротеинов не может быть атеросклероза».

Концентрация холестерина при атеросклерозе, диабете, микседеме возрастает; при острых инфекционных заболеваниях, легочном туберкулезе, острых воспалениях печени и поджелудочной железы - снижается.

Общее содержание в плазме крови свободных или неэстерифицированных жирных кислот, которое в норме находится в пределах 0,08-0,2 г/л, значительно повышается при нефрозах и диабете.

Увеличение концентрации фосфолипидов (норма - 1,1-2,8 г/л) отмечается при диабете, нефрозах (заболеваниях почек), желтухах. При пониженной функции щитовидной железы количество фосфолипидов снижено.

При нарушении синтеза пропионил-КоА из витамина B_{12} накапливается пропионат и развивается смертельно опасный ацидоз вследствие закисления жидких сред организма.

Нарушения липидного обмена возможны уже в процессе переваривания и всасывания жиров.

Расстройства могут быть связаны с недостаточным поступлением панкреатической липазы в кишечник и нарушением поступления в кишечник желчи.

Кроме того, нарушения процессов переваривания и всасывания липидов могут быть связаны с заболеваниями пищеварительного тракта. При этом образовавшиеся в полости кишечника моноглицериды и жирные кислоты не могут нормально всасываться вследствие повреждения эпителиального покрова кишечника. Во всех этих случаях кал содержит много нерасщепленного жира или невсосавшихся высших жирных кислот и имеет характерный серовато-белый цвет.

При снижении активности липопротеинлипазы крови (не расщепляются триглицериды) нарушается переход жирных кислот из хиломикронов (ХМ) в плазме крови в жировые депо. Чаще это наследственное заболевание, обусловленное полным отсутствием активности липопротеинлипазы. Плазма крови при этом имеет молочный цвет в результате чрезвычайно высокого содержания ХМ.

В крови здорового человека кетоновые (ацетоновые) тела содержатся в очень небольших концентрациях. Однако при голодании, а также у людей с тяжелой формой сахарного диабета содержание кетоновых тел в крови может повышаться до 20 ммоль/л. Это состояние носит название кетонемии; оно обычно сопровождается резким увеличением содержания кетоновых тел в моче (кетонурией). Например, в норме за сутки с мочой выводится около 40 мг кетоновых тел, а при сахарном диабете содержание их в суточной порции мочи может доходить до 50 г и более.

Периферические ткани при диабете и голодании сохраняют способность использовать кетоновые тела в качестве энергетического материала, однако ввиду необычно высокой концентрации кетоновых тел в притекающей крови мышцы и другие органы не справляются с их окислением, и, как следствие, возникает кетонемия.

4.4.2. Метаболизм холестерина

Холестерин входит в состав всех клеточных мембран, значительная часть холестерина используется для синтеза половых гормонов, гормонов надпочечников и образования желчных кислот.

Состав липидов тканей определяют по схеме:

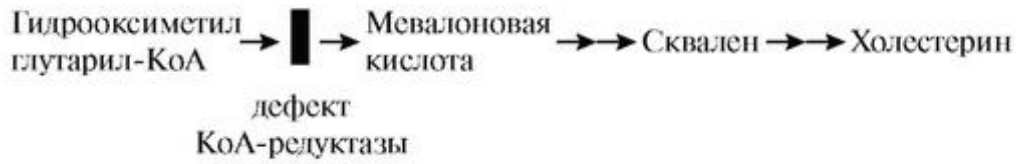
биопроба → гомогенизация → экстракция → анализ методом ВЭЖХ.

Экстракцию липидов из гомогенизата биопробы обычно проводят смесью хлороформа с метанолом. Затем проводят анализ методами электрофореза, ВЭЖХ и др. (рис. 4.29).

Рис. 4.29. Разделение липопротеинов плазмы крови методом электрофореза

Синтез холестерина осуществляется в печеночных клетках из ацетата, кроме того, часть холестерина поступает в организм из пищи. У человека в сутки синтезируется около 800 мг холестерина и около 400 мг поступает из пищи.

Метаболический путь ферментативного синтеза холестерина насчитывает более 35 реакций. На этом пути выделяют три основные стадии:



Скорость биосинтеза холестерина в целом регулируется реакцией восстановления β-гидроокиси-β-метилглутарил-КоА в мевалоновую кислоту, катализируемую ГМГ-КоА-редуктазой. Данный фермент испытывает регуляторное воздействие ряда факторов. В частности, скорость синтеза ГМГ-КоА-редуктазы в печени подвержена четким суточным колебаниям: максимум приходится на полночь, минимум - на утренние часы.

Основными липидами в плазме крови являются эфиры холестерина, триглицериды, фосфолипиды и свободные жирные кислоты.

Триглицериды - эфиры жирных кислот и глицерина. Большая часть триглицеридов синтезируется в печени, откуда они поступают в кровь в составе липопротеинов очень низкой плотности.

Около 70-150 г триглицеридов всасываются из кишечника после их предварительного расщепления липазой, незначительное количество триглицеридов синтезируется в слизистой оболочке кишечника из эндогенных жирных кислот.

В крови триглицериды циркулируют в составе крупных мицеллярных частиц липопротеинов - хиломикронов. Триглицериды используются преимущественно жировой тканью для синтеза жира.

В крови в норме натощак уровень холестерина - не более 200 мг% (5,2 ммоль/л), триглицеридов - 200-400 мг% (2,26-4,52 ммоль/л). Около 75% холестерина в крови находится в виде эфиров. Эфиры холестерина депонируются в клетках. Холестерин входит в состав желчных кислот.

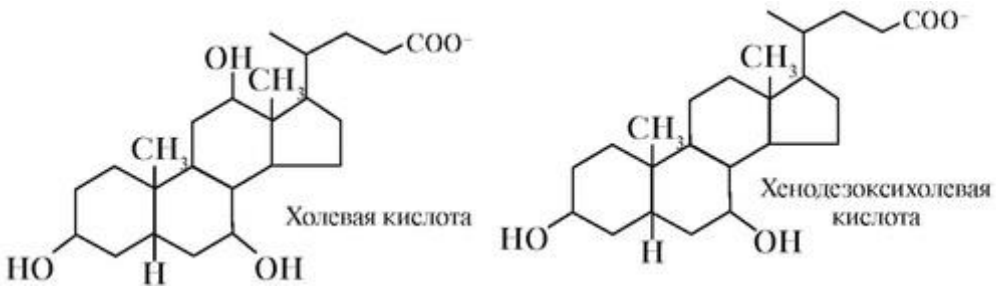
Регуляция ГМГ-КоА-редуктазы - ключевого фермента синтеза холестерина - происходит разными способами.

В период абсорбции синтез холестерина увеличивается. Одновременно увеличивается и доступность ацетил-КоА - исходного субстрата для синтеза холестерина (ацетил-КоА образуется из углеводов и жиров пищи).

В постабсорбционном периоде и при голодании в результате дезактивации ГМГ-КоА-редуктазы синтез холестерина ингибируется.

Желчные кислоты - производные холестерина с пятиуглеродной боковой цепью в положении 17, которая заканчивается карбоксильной группой.

В организме человека синтезируются две желчные кислоты: холевая, которая содержит три гидроксильные группы, и хенодезоксихолевая, содержащая две гидроксильные группы.



Эти кислоты имеют рКа, примерно равные 6, и поэтому при физиологических значениях pH в кишечнике не полностью диссоциированы и не являются эффективными эмульгаторами.

В печени эмульгирующие свойства желчных кислот увеличиваются за счет реакции конъюгации. Эти конъюгированные желчные кислоты находятся в ионизированной форме и поэтому являются солями. Эти соли служат главными эмульгаторами жиров в кишечнике. Эмульгируя жиры, желчные кислоты способствуют их перевариванию, делая доступными для действия панкреатической липазы.

Сердечно-сосудистые заболевания

Наиболее распространенные сердечно-сосудистые заболевания - ишемическая болезнь сердца и гипертоническая болезнь.

Патофизиологическими причинами этих заболеваний являются атеросклероз, тромбоз, эмболия сердечных сосудов, биохимическими причинами - во многих случаях нарушения метаболизма липидов.

Атеросклероз (от греч. *athere* - «кашица» и *sklerosis* - «уплотнение») - хроническое заболевание, возникающее в результате нарушения метаболизма липидов и связанного с ним белкового метаболизма. При атеросклерозе в интиме артерий откладываются очаги липидов и белков и реактивно разрастается соединительная ткань.

У больных атеросклерозом нередко отмечают гиперхолестеринемию и ожирение.

В настоящее время в развитии атеросклероза придается значение не столько самой гиперхолестеринемии, сколько нарушению метаболизма липопротеинов, компонентами молекул которых является холестерин.

Нарушение ведет к повышению в плазме крови уровня липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и низкой плотности (ЛПНП) при среднем уровне липопротеинов высокой плотности (ЛПВП).

В клинической практике используют холестериновый коэффициент атерогенности :

$$K_a = (C_o - C_{ЛПВП})/C_{ЛПВП},$$

где C_o - концентрация общего холестерина; $C_{ЛПВП}$ - концентрация липидов высокой плотности.

Высокие значения холестеринового коэффициента являются диагностическим показателем атеросклероза.

Липидным компонентом у липопротеинов очень низкой и низкой плотности является холестерин, у липопротеинов высокой плотности - фосфолипиды.

ЛПППП и ЛПНП переносят в ткани в основном холестерин, поэтому они являются основной причиной образования атеросклеротических бляшек.

ЛПВП переносят холестерин из тканей в печень. В печени из холестерина синтезируются желчные кислоты.

Метаболизм холестерина в клетке связан, прежде всего, с обменом в ней липопротеинов. Клетки имеют специфические рецепторы липопротеинов.

Дислипопротеинемия с преобладанием ЛПОНП и ЛПНП ведет к нарушению клеточного метаболизма холестерина и появлению в интиме артерий пенистых клеток, с которыми связано образование атеросклеротических бляшек.

Поскольку ЛПНП переносят холестерин в ткани, повышенный уровень этих полипептидов может вызывать жировые отложения на стенках кровеносных сосудов, особенно в артериях. Уровень холестерина ЛПНП коррелирует с высоким риском развития атеросклероза. Атеросклероз может приводить к инфаркту миокарда, инсультам головного мозга и окклюзии периферических артерий.

По этой причине холестерин ЛПНП часто называют плохим холестерином в противоположность хорошему холестерину ЛПВП. Стоит отметить, что мелкие частицы ЛПНП более атерогенны, чем более крупные.

Наследственная форма заболевания с высоким уровнем ЛПНП - гиперхолестеринемия или гиперлипопротеинемия II типа.

В молекулярной диагностике проводят анализ индивидуальных белков человека для установления вида патологического процесса и определения пораженного органа, а также для установления природы патологии, например при энзимопатиях и инфекционных заболеваниях.

При разработке лекарственных препаратов основным средством изучения воздействия лекарственных средств на протеом или на совокупность всех белков органа является 2D-электрофорез. В частности, исследуется накопление лекарственных веществ в различных органах для определения органов-мишеней и критических органов.

Например, ловастатин назначают для снижения уровня холестерола в крови. В результате протеомного анализа было установлено, что основное действие этого препарата заключается не в прямом ингибировании синтеза холестерола, а в повышении активности рецепторного липопротеина, который удаляет из крови холестерин. Для снижения уровня ЛПНП применяют медикаментозные и немедикаментозные методы.

• Немедикаментозные методы снижения уровня ЛПНП. Потребление малокалорийной пищи с низким содержанием животных жиров и углеводов. Рекомендуют потреблять продукты, содержащие полиненасыщенные жирные кислоты, а также свежие овощи, фрукты, ягоды, зелень, бобовые. Рекомендуются регулярные физические нагрузки и поддержание оптимальной массы тела.

• Медикаментозные методы снижения ЛПНП. Применение различных гиполипидемических препаратов.

Для коррекции нарушений липидного обмена применяют пять основных классов лекарственных средств.

Статины - ингибиторы метилглютарил-КоА редуктазы. Снижают метаболизм холестерина на стадии мевалоната (см. выше).

Фибраты - дериваты фиброевой кислоты. Эти препараты умеренно снижают уровень ХС-ЛНП за счет уменьшения количества мелких плотных частиц ЛНП и увеличения количества больших, менее плотных ЛНП, что повышает их взаимодействие с рецепторами печени и улучшает катаболизм.

Секвестранты - вещества, усиливающие экскрецию желчных кислот и производных холестерина (холестирамины).

Производные пиридинкарбоновой (никотиновой) кислоты. Снижают уровень перекисных продуктов в крови и интенсивность переокисления липидов.

Фитопрепараты с различными механизмами действия.

4.5. ГЛИКОМИКА

Гликомика (от лат. *glikos* - «сладкий» и греч. *-omics* - «полный, целый, весь») - раздел молекулярной биологии, посвященный изучению гликома и углеводов живых организмов.

В гликомике изучают сети метаболизма углеводов и взаимодействующих с ними белков и других веществ в биологических системах.

Гликом описывает весь набор углеводов внутри клетки, ткани или организма. Развитие гликомики обусловлено совершенствованием различных экспериментальных и вычислительных методов, связанных с определением существенной роли углеводов во многих метаболических заболеваниях, таких как ожирение и сахарный диабет.

Углеводы - обязательный и наиболее значительный компонент пищи. В сутки человек потребляет 400-600 г различных углеводов. Углеводы включены практически во все метаболические сети: нуклеиновых кислот (рибозы и дезоксирибозы), белков (гликопротеины), липидов (гликолипиды) (см. главу 3) и обеспечивают энергией трансмембранный перенос ионов.

Как один из главных источников энергии, углеводы необходимы для обеспечения жизнедеятельности организма. Наиболее важны углеводы для нервной системы.

Многочисленные патологии, обусловленные нарушениями метаболизма углеводов, объединяют в группы: гипогликемии, гипергликемии, гликогенозы, гексо- и пентоземии.

В норме уровень глюкозы в плазме крови натощак составляет 65-110 мг% (3,58-6,05 ммоль/л). Гипогликемии - состояния, характеризуемые снижением уровня глюкозы в плазме крови ниже нормы. Гипергликемии - состояния, характеризуемые повышением уровня глюкозы в плазме крови выше нормы.

Гипогликемии и гипергликемии могут быть связаны с патологиями печени, расстройствами пищеварения, патологиями почек, эндокринопатиями, гексоземиями, гликогенозами.

Гексоземии - состояния, характеризуемые увеличением содержания в крови гексоз выше нормы. Наибольшую клиническую значимость имеют галакто- и фруктоземия.

Наиболее часто галактоземия, или галактозный диабет наследственного или врожденного генеза, наблюдается у детей через несколько дней или недель после рождения.

Фруктоземия приводит к накоплению фруктозо-1-фосфата в клетках (недостаточности альдолазы В), фруктозурии. Может быть обусловлена недостаточностью функций печени и почек.

4.5.1. Гликогенозы

Гликогенозы - наследственные патологии углеводного обмена, характеризуемые накоплением избытка гликогена в клетках, что приводит к нарушению жизнедеятельности организма.

Гликогенозы развиваются вследствие мутаций генов, кодирующих синтез ферментов расщепления (реже - образования) гликогена. Это приводит к низкой активности ферментов гликогенолиза, реже - синтеза гликогена.

Гликогенозы классифицируют по ферментным нарушениям (табл. 4.3).

Наиболее часто встречаются болезни Гирке и Помпе.

Болезнь Гирке - гликогеноз, обусловленный врожденным недостатком в клетках печени и почек глюкозо-6-фосфатазы (рис. 4.30).

Глюкозо-6-фосфатаза отщепляет от глюкозо-6-фосфата глюкозу, что делает возможным переход глюкозы из клеток этих органов в кровь. При недостаточности глюкозо-6-фосфатазы глюкоза задерживается внутри клеток - развивается гипогликемия. Возрастает содержание в крови молочной кислоты, в которую усиленно переходит глюкозо-6-фосфат, - развивается ацидоз.

Таблица 4.3. Классы гликогенозов (по Кори)

Дефект фермента	Тип гликогеноза	Гликогендепонирующие органы, ткани и клетки
Глюкозо-6-фосфатазы	I тип - болезнь Гирке	Печень, почки
α-1,4-глюкозидазы	II тип - болезнь Помпе	Печень, почки, мышцы, нервная ткань, селезенка, эритроциты
Амило-1,6-глюкозидазы	III тип - болезнь Кори	Печень, мышцы, лейкоциты, эритроциты
D-1,4-глюкано-α-глюкозилтрансферазы	IV тип - болезнь Андерсена	Печень, мышцы, лейкоциты

Гликогенфосфорилазы миоцитов	V тип - болезнь Мак Ардля	Скелетная мускулатура
Гликогенфосфорилазы гепатоцитов	VI тип - болезнь Гирса	Печень, лейкоциты
Фосфоглюкомутазы	VII тип - болезнь Томпсона	Печень и (или) мышцы
Фосфофруктомутазы	VIII тип - болезнь Таруи	Мышцы, эритроциты
Киназы фосфорилазы в гепатоцитах	ГХ тип - болезнь Хага	Печень

В почках и печени накапливается гликоген, что ведет к увеличению этих органов. Происходит перераспределение гликогена внутри клетки в сторону значительного накопления его в ядре. Организм страдает от углеводного голодания. Больные дети, как правило, рано умирают.

Болезнь Помпе - гликогеноз при врожденном дефиците α-глюкозидазы. Этот фермент отщепляет глюкозные остатки от молекул гликогена и расщепляет мальтозу. При дефиците α-глюкозидазы в лизосомах накапливается гликоген, который оттесняет цитоплазму, заполняет всю клетку и разрушает ее. Содержание глюкозы в крови нормальное.

Гликоген накапливается в печени, почках, сердце. Обмен веществ в миокарде нарушается, сердце увеличивается в размерах. Больные дети рано умирают от сердечной недостаточности.

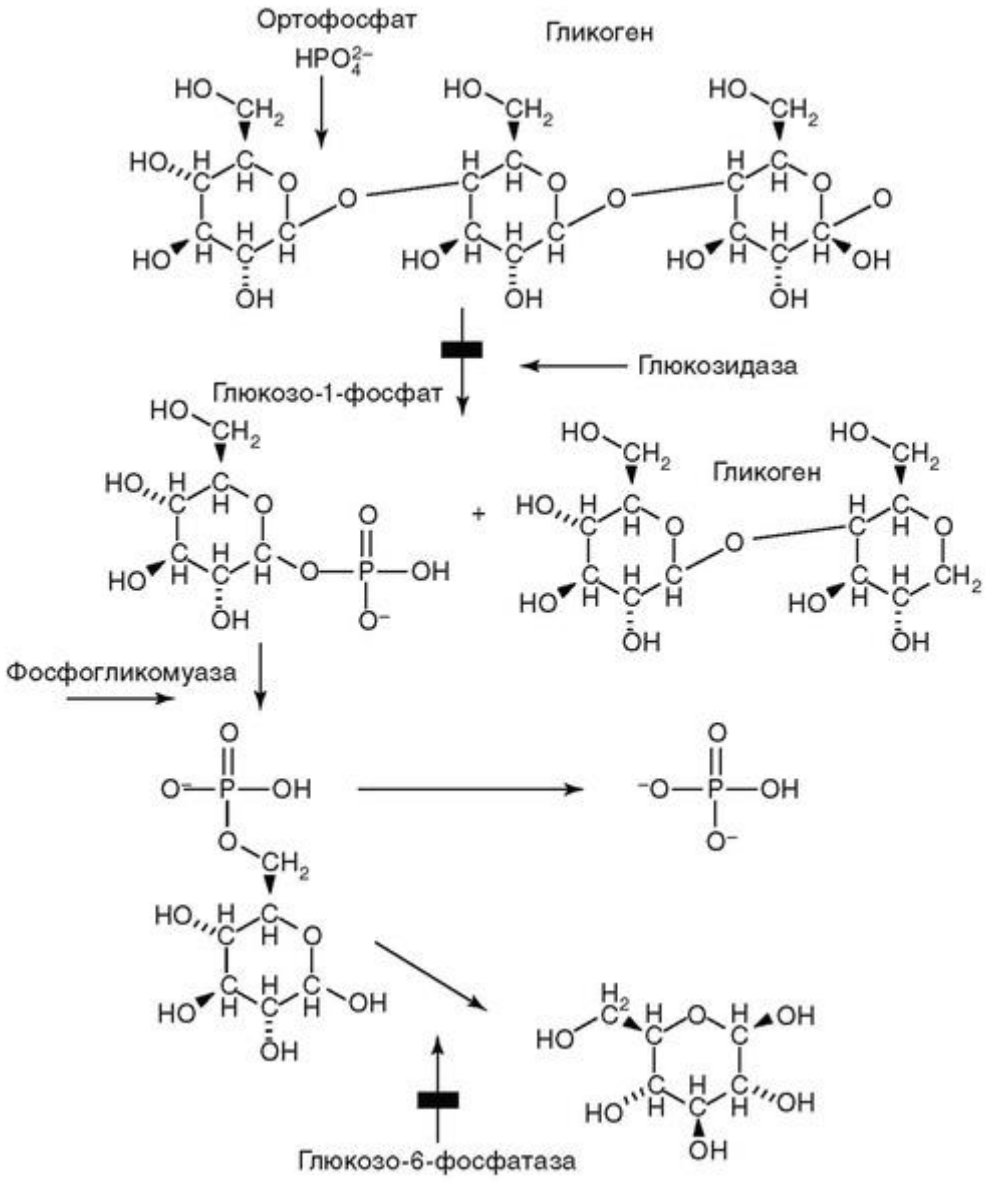


Рис. 4.30. Метаболизм гликогена при дефиците ферментов. Дефицит глюкозо-6-фосфатазы - болезнь Гирке. Дефицит α-глюкозидазы - болезнь Помпе

4.5.2. Гипергликемии

Гипергликемии - состояния, характеризуемые увеличением уровня глюкозы в плазме крови выше нормы [120 мг%, или 6,05 ммоль/л] натощак.

Гипергликемии развиваются вследствие нарушений функционирования эндокринной системы. Возрастает уровень глюкагона, глюкокортикоидов, катехоламинов, тиреоидных гормонов, соматотропного гормона.

При этом возникают различные эндокринопатии.

Для сахарного диабета характерен дефицит инсулина (гипоинсулинизм). При этом снижается утилизация глюкозы клетками, активируется глюконеогенез, усиливается гликогенолиз.

К гипергликемии могут приводить неврологические и психогенные расстройства, при которых активируются симпатоадреналовая, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая и тиреоидная системы. Гормоны этих систем (катехоламины, глюкокортикоиды, T_4 и T_3) вызывают активацию гликогенолиза, торможение гликогенеза, стимуляцию глюконеогенеза.

К гипергликемии могут приводить длительное, избыточное потребление сладостей и легкоусвояемых углеводов. Глюкоза быстро всасывается в кишечнике, что приводит к росту гипергликемии, и гепатоциты неспособны быстро включить избыток глюкозы в синтез гликогена - гликогенез.

4.5.3. Сахарный диабет

Гипергликемия при недостаточности инсулина является наиболее стойкой и выраженной. Сахарный диабет *(diabetes mellitus)* могут вызвать как панкреатическая, так и внепанкреатическая недостаточность инсулина.

Панкреатическая инсулиновая недостаточность может быть наследственной и развиваться при панкреатитах и разрушении поджелудочной железы опухолями, туберкулезом или сифилисом.

К инсулиновой недостаточности ведут атеросклероз, спазм сосудов. При этом инсулин становится неактивным.

Внепанкреатическая инсулиновая недостаточность может развиться при повышенной активности инсулиназы - фермента, расщепляющего инсулин, а также при хронических воспалительных процесса, при которых в кровь поступает много протеолитических ферментов, разрушающих инсулин.

Активность инсулина снижается при избытке в крови гидрокортизона, тормозящего гексокиназу, и при избытке неэстерифицированных жирных кислот, которые оказывают непосредственное тормозящее влияние.

В ряде случаев при сахарном диабете содержание инсулина в крови нормально или даже повышено. Предполагают, что диабет при этом обусловлен присутствием в крови антагониста инсулина, природа которого не установлена. К разрушению инсулина ведет образование антител против этого гормона.

При инсулиновой недостаточности нарушаются все виды обмена веществ. Эти нарушения особенно четко выражены при сахарном диабете.

При сахарном диабете резко снижен синтез глюкокиназы, которая почти полностью исчезает из печени. Это ведет к уменьшению образования глюкозо-6-фосфата в гепатоцитах. В результате нарушаются различные стадии обмена глюкозы.

Наряду со сниженным синтезом гликоген-синтетазы уменьшается скорость синтеза гликогена и происходит обеднение печени гликогеном (рис. 4.31).

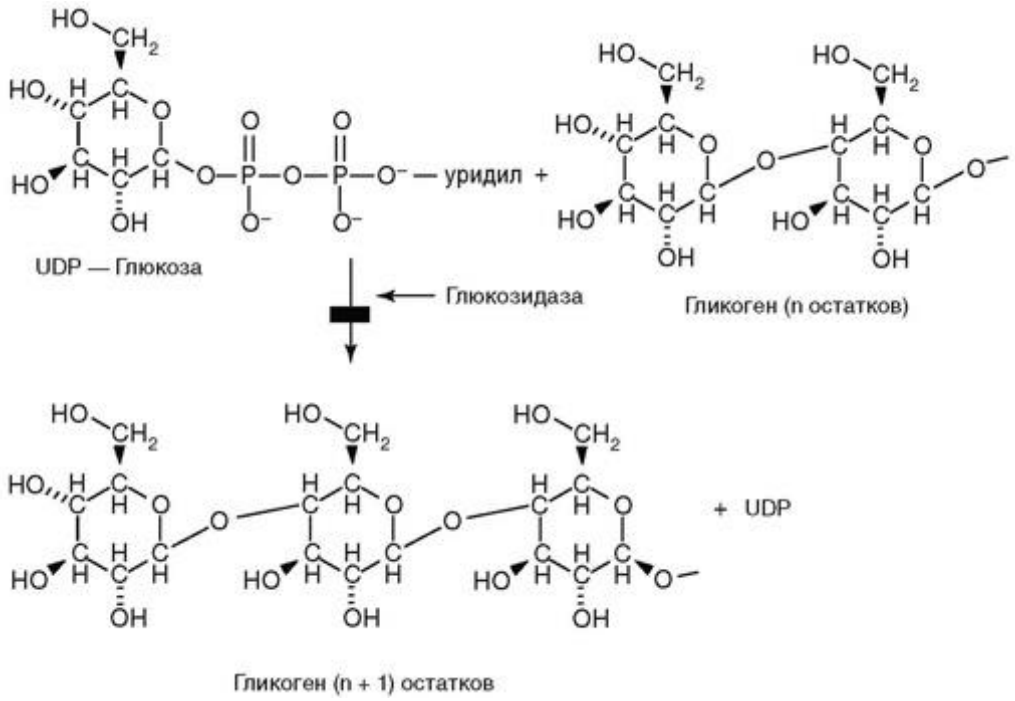


Рис. 4.31. Дефект анаболизма гликогена при сахарном диабете

Резко возрастает активность глюкозо-6-фосфатазы, поэтому глюкозо-6-фосфат дефосфорилируется и поступает в кровь в виде глюкозы. Тормозится переход глюкозы в жировые депо.

Понижается прохождение глюкозы через клеточные мембраны в ткани, резко ускоряется глюконеогенез - образование глюкозы из лактата, пирувата, аминокислот, жирных кислот и других продуктов неуглеводного обмена (см. главу 2). Ускорение глюконеогенеза обусловлено отсутствием тормозящего эффекта инсулина на ферменты (пируваткарбоксилазу, глюкозо-6-фосфатазу и др.), катализирующие глюконеогенез в гепатоцитах и нефронах.

Таким образом, при сахарном диабете имеют место избыточная продукция и недостаточное использование глюкозы тканями, вследствие чего возникает гипергликемия. Содержание сахара в крови при тяжелых формах может достигать 4-5 г/л (400-500 мг%) и выше. При этом резко возрастает осмотическое давление крови, что ведет к обезвоживанию клеток организма. В связи с обезвоживанием глубоко нарушаются функции центральной нервной системы.

Для сахарного диабета характерен атеросклероз. Атеросклеротический процесс захватывает коронарные сосуды сердца (коронарная недостаточность), сосуды почек (гломерулонефриты).

При повышении содержания сахара в крови до 1,6-2,0 г/л (160-200 мг%) и более он начинает переходить в мочу - возникает глюкозурия. При тяжелых формах сахарного диабета содержание сахара в моче может достигать 8-10%. Осмотическое давление мочи повышено, в связи с чем в окончательную мочу переходит много воды. Суточный диурез возрастает до 5-10 л и более (полиурия). Развивается обезвоживание организма и, как следствие, усиленная жажда.

При сахарном диабете широко используют различные методы молекулярной диагностики.

При нарушениях углеводного обмена определяют уровень глюкозы в крови натощак, через 1,5-2 ч после еды, перед сном, проводят глюкозотолерантный тест, определяют концентрацию глюкозы в моче, уровень гликированного гемоглобина. Также проводят гормональное тестирование.

Клинический анализ уровня глюкозы в крови проводят фотометрически с использованием ферментов (например, глюкозоксидазы). Распространенность этого метода определения глюкозы объясняется его высокой специфичностью и простотой выполнения. Метод можно реализовать с применением обычного фотоэлектроколориметра или автоматических биохимических автоанализаторов. В последнее время в клиническую практику внедряются неинвазивные портативные глюкометры, не требующие взятия крови.

В клинической практике часто исследуют изменения уровня глюкозы в крови, происходящие через некоторое время после приема 50 или 100 г глюкозы, разведенной в теплой воде (так называемая сахарная нагрузка).

В случае скрытого или латентного диабета для постановки диагноза применяют глюкозотолерантный тест (ГТТ). Этот метод сахарной нагрузки часто называют построением сахарных кривых

В лабораторной практике существует несколько видов ГТТ: простой тест с однократной нагрузкой, с двойной нагрузкой и т.д.

При тесте с однократной нагрузкой на протяжении 3 сут до его проведения пациент должен придерживаться диеты, содержащей достаточное количество углеводов, но не слишком богатой белками и жирами.

При однократной нагрузке после приема водного раствора глюкозы у пациента периодически берут пробы крови и анализируют их на содержание глюкозы.

По данным этих анализов строят график зависимости содержания глюкозы в крови от времени, прошедшего после нагрузки. Получают гликемические (сахарные) кривые (рис. 4.32), на основе изучения которых ставят диагноз.

Рис. 4.32. Гликемические (сахарные) кривые при молекулярной диагностике углеводного обмена

У здорового человека уже через 15 мин после приема глюкозы наблюдается увеличение ее содержания в крови, которое между 30-й и 60-й минутами достигает максимальной величины. Затем начинается снижение, и к 120-й минуте содержание глюкозы достигает исходного уровня, отмечавшегося натощак, или с небольшими отклонениями в сторону как повышения, так и понижения. Через 3 ч содержание сахара в крови достигает исходного уровня.

У больных сахарным диабетом уже через час после сахарной нагрузки отмечаются повышенный исходный уровень глюкозы и высокая гипергликемия (выше 130 мг%). Уровень глюкозы остается высоким (около 200 мг%). В течение следующего часа и к концу исследования (через 3 ч) уровень не возвращается к исходному. Одновременно отмечается и глюкозурия. При повторной сахарной нагрузке у здорового человека второй пик гипергликемии должен быть меньше или совсем отсутствовать. У больного, имеющего недостаточность инсулина, пик гипергликемии оказывается еще выше.

Исследование уровня глюкозы в моче проводят в разных объемах мочи: собранной за сутки или в определенные периоды суток. На результат анализа могут повлиять стресс, беременность, обильное употребление углеводов.

При оценке построенных гликемических кривых обращают внимание на время максимального подъема, высоту этого подъема и время возврата концентрации глюкозы к исходному уровню. Для диагностики используют несколько показателей.

Наиболее важное значение имеет коэффициент Бодуэна:

$$\frac{B - A}{A} 100\%,$$

где А - уровень глюкозы в крови натощак; В - максимальное содержание глюкозы в крови после нагрузки.

В норме коэффициент Бодуэна составляет около 50%. Значения, превышающие 80%, свидетельствуют о серьезном нарушении обмена углеводов. Если в результате проведенных исследований выявляются гипергликемия и глюкозурия, этого достаточно для постановки диагноза сахарного диабета.

Для прогнозирования развития осложнений сахарного диабета проводят исследование гликолизированного («засахарившегося») гемоглобина, оценивают степень компенсации и контролируют эффективность лечения в течение длительного времени. Гемоглобин в эритроцитах вначале неустойчиво и обратимо, а затем валентно связывается с глюкозой, поступающей в клетки из плазмы крови. Модифицированный белок называется гликозилированным гемоглобином (обозначается HbA_{1c}, HbA_1).

Установлено, что чем выше уровень глюкозы в крови и чем дольше он остается повышенным, тем выше уровень гликозилированного гемоглобина. Нормальным считается уровень HbA_1 3,3-5,5%, но не более 6%. Этот показатель характеризует содержание глюкозы в крови примерно за 12 нед (срок жизни эритроцитов).

Чаще всего для определения гликозилированного гемоглобина используется аффинная хроматография. Аффинная хроматография - разновидность адсорбционной (см. главу 3).

Метод определения содержания HbA_{1c}, признанный «золотым стандартом», основан на аффинной хроматографии.

Заполняющий микроколонки сорбент обеспечивает на первой стадии специфическое связывание HbA_{1c}(фракция Б) и его отделение от негликозилированной фракции (фракция А). На второй стадии происходит полное вытеснение гликозилированной фракции за счет вымывания из сорбента растворителем.

По измеренным оптическим плотностям обеих фракций при длине волны 414 нм с помощью калибровочного графика (рис. 4.33) можно определить содержание гликозилированного гемоглобина (HbA_{1c}) в анализируемом образце крови:

$$w(HbA_{1c}) = 100\% \frac{Б}{Б + 2,04А},$$

где А - оптическая плотность фракции А; Б - оптическая плотность фракции Б; 2,04 - коэффициент, зависящий от объема фракций А и Б.

Соответственно, средний уровень глюкозы в крови за 3 мес составляет (ммоль/л)

$$\frac{(33,3 \cdot HbA_{1c} - 86)}{18}.$$

Для уточнения диагноза проводят исследования гормонального обмена. При этом определяют содержание различных гормонов.

Проинсулин - вещество, образующееся в бета-клетках поджелудочной железы. Распадается на инсулин и С-пептид. Его определение необходимо, чтобы различить разные формы диабета, а также отличить диабет от других заболеваний поджелудочной железы.

Инсулин - оценивается секреторная способность бета-клеток. Определение его содержания в крови неинформативно при инсулинотерапии.

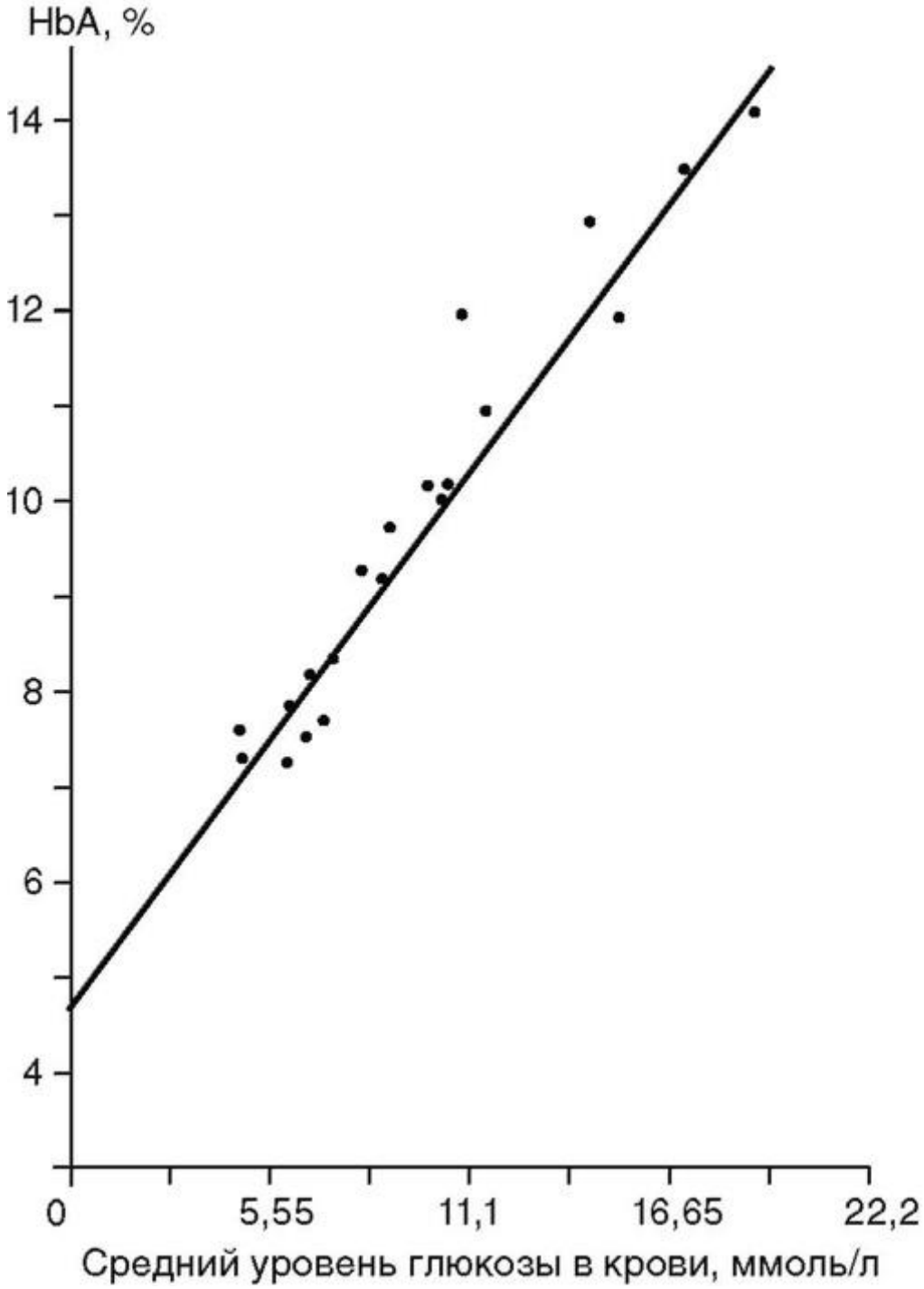


Рис. 4.33. Зависимость уровня гликозилированного гемоглобина от уровня глюкозы в крови

С-пептид - вещество, отщепляющееся от проинсулина в количествах, пропорциональных инсулину, выработанному бета-клетками. При инсулинотерапии позволяет точно определить уровень собственного инсулина.

Глюкагон - гормон, способствующий синтезу глюкозы в печени, антагонист инсулина. При сахарном диабете недостаток инсулина сопровождается избытком глюкагона.

Лептин - гормон, угнетающий действие инсулина, вызывает чувство сытости.

4.5.4. Гипогликемии

Гипогликемии - состояния, характеризуемые снижением уровня глюкозы в плазме крови ниже нормы натощак в диапазоне 65-110 мг% (3,58-6,05 ммоль/л).

Причинами гипогликемии могут быть патологии печени и почек, расстройства пищеварения в кишечнике, эндокринные патологии, углеводное голодание и длительные физические нагрузки.

При патологиях печени (хронических гепатитах, циррозе, гепатодистрофии, острых токсических поражениях) имеют место торможение гликогенеза, ферментопатии, нарушения транспорта глюкозы из крови в гепатоциты, снижение активности гликогенеза в гепатоцитах и отсутствие или малое содержание депонированного гликогена.

При патологиях почек имеют место нарушения реабсорбции глюкозы в проксимальных канальцах нефронов; дефицит или низкая активность ферментов, участвующих в реабсорбции глюкозы; нарушение структуры и состояния мембран вследствие дефицита или дефектов мембранных гликопротеинов, участвующих в реабсорбции глюкозы.

При расстройствах пищеварения в кишечнике имеют место нарушение переваривания углеводов, недостаточность амилолитических ферментов кишечника; расстройства пристеночного расщепления и абсорбции углеводов: недостаточность дисахаридаз, расщепляющих дисахариды, недостаточность ферментов трансмембранного переноса глюкозы и других моносахаридов; хронические энтериты, алкогольный панкреатит, опухоли поджелудочной железы.

При эндокринопатиях имеют место недостаток тироксина и трийодтиронина (торможение гликогенолиза в гепатоцитах), соматотропного гормона (торможение гликогенолиза и трансмембранного переноса глюкозы), катехоламинов (снижение активности гликогенолиза), глюкагона (торможение глюконеогенеза и гликогенолиза); избыток инсулина, активация усвоения глюкозы клетками, торможение глюконеогенеза, подавление гликогенолиза при инсулиномах и передозировке инсулина.

При углеводном голодании дефицит только углеводов в пище не приводит к гипогликемии в связи с активацией глюконеогенеза (образованием углеводов из неуглеводных веществ).

Длительные физические нагрузки приводят к истощению запасов гликогена, депонированного в печени и скелетных мышцах.

4.5.5. Гексоземии

Гексоземии (галактоземия и фруктоземия) - состояния, характеризуемые увеличением уровня гексоз в крови (галактозы, фруктозы и др.) (см. главу 2) выше нормы - 6,4 ммоль/л (1,15 г/л).

Галактоземия, или галактозный диабет, - наследственная патология, наиболее часто наблюдается у детей через несколько дней или недель после рождения.

Фруктоземия (в том числе врожденная непереносимость фруктозы вследствие недостаточности альдолазы В) - наследственная патология, приводит к накоплению в клетках фруктозо-1-фосфата, фруктозурии, недостаточности функций печени и почек.

Глава 5. КСЕНОМЕТАБОЛОМИКА (КСЕНОБИОТИКИ)

Ксенометаболомика - один из разделов метаболомики, основанный на анализе влияния ксенобиотиков на изменения метаболических процессов в организме человека. На этой основе проводится молекулярная диагностика патологий, обусловленных ксенобиотиками.

Ксенобиотики (от греч. *xenos* - «чужой» и *bios* - «жизнь») - любые чуждые для организма химические вещества, вызывающие нарушения процессов жизнедеятельности.

В качестве примеров ксенобиотиков можно привести тяжелые металлы (ртуть, свинец, кадмий), лекарственные средства, синтетические органические продукты бытовой и промышленной химии, синтетические полимерные материалы, нефтепродукты, пестициды, синтетические поверхностно-активные вещества (детергенты).

Попадая в организм, ксенобиотики могут вызывать различные нежелательные эффекты либо непосредственно, либо вследствие образования токсичных ксенометаболитов. К таким нежелательным эффектам относятся токсические реакции, генетические мутации, специфические заболевания, аллергические реакции, ослабление иммунитета.

Пищевые вещества - нутриенты также могут вызывать различные нежелательные эффекты либо непосредственно, либо вследствие образования токсичных метаболитов. Изучением влияния нутриентов занимается нутриномика.

Давно известно, что даже жизненно необходимые элементы и вещества в избыточном количестве могут вызывать в организме вредные последствия. Великий медик Парацельс, живший в XVI в. н.э., говорил о пользе и вреде различных веществ для организма: «Все в дозе».

Состояние организма человека зависит от очень большого числа компонентов. При решении задач метаболомики проводят серию измерений по схеме «доза - ответ». В ходе такого эксперимента постепенно повышают дозу. Одновременно регистрируют изменения состояния организма. По полученным данным строят функцию «доза - эффект».

Допустимую при воздействии дозу и, соответственно, биологический эффект должен оценивать врач.

Жизненная необходимость, дефицит, токсичность необходимых элементов и веществ могут быть представлены в виде кривой зависимости реакции организма от концентрации элемента или вещества в пищевых продуктах.

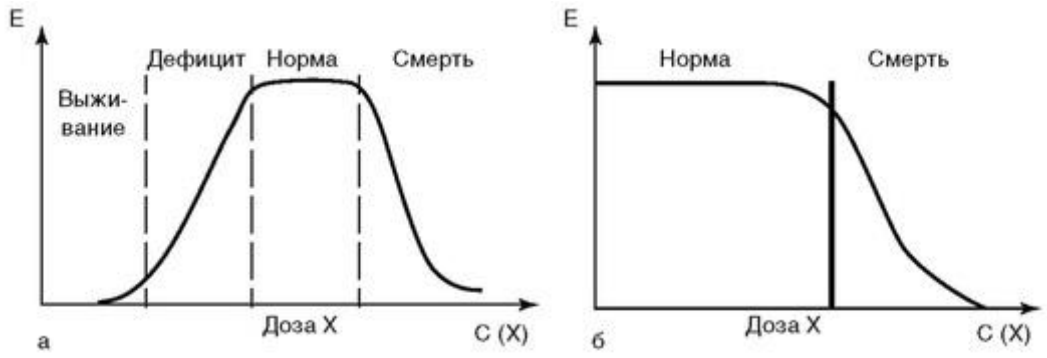


Рис. 5.1. Кривые зависимости «доза - эффект» для воздействия на организм необходимого химического агента (X) на биообъект: а - воздействие необходимого химического агента X; б - воздействие примесного химического агента X

Приблизительно горизонтальный участок кривой (плато) зависимости воздействия на организм (рис. 5.1а) необходимого химического агента описывает область концентраций, соответствующих норме: оптимальному росту, здоровью, воспроизведению. Большая протяженность плато указывает не только на малую токсичность, но и на большую способность организма к адаптации по отношению к значительным изменениям содержания этого элемента. Наоборот, узкое плато свидетельствует о значительной токсичности элемента и резком переходе от необходимых организму количеств к опасным для жизни. При выходе за плато (увеличении концентрации) все элементы становятся токсичными. Например, существенное увеличение концентрации необходимых микроэлементов может привести к летальному исходу.

Ряд примесных элементов-ксенобиотиков (серебро, ртуть, свинец, кадмий и др.) считаются токсичными. В микроколичествах они не влияют на жизнедеятельность. Но попадание их в организм в больших количествах приводит к тяжелым патологическим явлениям (рис. 5.1б).

Проблемами токсичности пищевых веществ занимается нутриномика (от лат. *nutrientia* - «пищевые вещества»).

Многие ткани являются мишенью для повреждающего действия продуктов метаболизма ксенобиотиков. Как правило, чем менее токсичен ксенобиотик, тем выше вероятность, что активные промежуточные продукты метаболизма этого вещества будут инициировать различные формы токсических процессов (рис. 5.2).

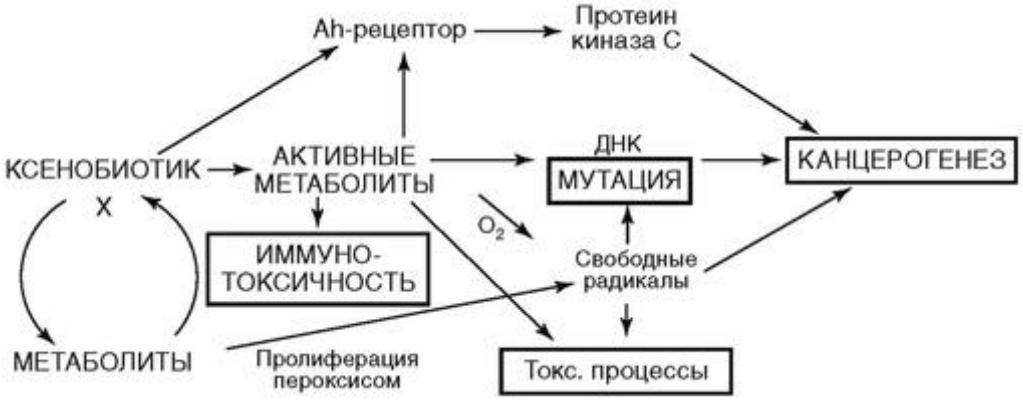


Рис. 5.2. Роль метаболических превращений ксенобиотика в развитии различных форм токсических процессов

Наиболее простой моделью, отображающей связь метаболизма ксенобиотиков и процессов повреждения органов, является модель непосредственного воздействия продуктов метаболизма на орган (рис. 5.3).

Орган-мишень воздействия токсиканта содержит весь набор активных ферментов, необходимых для биоактивации ксенобиотика. Под действием этих ферментов образуются активные метаболиты, которые и вызывают повреждение органа. Как правило, так действуют чрезвычайно активные метаболиты, неспособные к диффузии за пределы клеток, в которых они образовались.

Рис. 5.3. Модель непосредственного воздействия продуктов метаболизма на орган-мишень

В качестве мишени токсикантов часто выступает клеточная составляющая крови. Важнейшими функциями клеток крови являются транспорт кислорода, гемостаз, обеспечение иммунитета.

Гематотоксичность - свойство химических веществ избирательно нарушать функции клеток крови и ее клеточный состав. Важнейшими функциями клеток крови являются транспорт кислорода, гемостатическая функция, обеспечение иммунитета. Изменение количества форменных элементов может явиться следствием прямого разрушения клеток в кровеносном русле, нарушения клеточного деления и созревания в кроветворных органах, поступления зрелых элементов в кровь.

Частые проявления гематотоксичности:

- нарушение свойств гемоглобина (метгемоглобинемия, карбоксигемоглобинемия);
- анемии (в том числе гемолитические);
- тромбоцитопении;
- лейкопении;
- лейкемии.

По большей части токсические клеточные нарушения обратимы и исчезают после прекращения действия токсиканта. Однако встречаются и периодически проявляющиеся формы, которые заканчиваются летальным исходом в случае тяжелого повреждения костного мозга.

Механизмы, лежащие в основе токсического действия химических веществ, и закономерности токсических процессов изучаются в разделе токсикологии - токсикодинамике.

Токсикодинамические характеристики веществ необходимы для разработки медикаментозных средств профилактики и терапии интоксикаций, средств и методов предупреждения и минимизации опасных последствий развития токсического процесса. На этой основе совершенствуются методы диагностики интоксикаций, оценки функционального состояния людей, подвергшихся воздействию больших доз токсикантов и методы исследования токсичности ксенобиотиков.

Ксенобиотики биологического происхождения называют токсинами. К ним относятся бактериальные токсины, микотоксины, фитотоксины, зоотоксины, неорганические соединения естественного происхождения, синтетические токсиканты. Липофильные ксенобиотики в настоящее время вызывают особое внимание экологов и токсикологов. Эти вещества, накапливаясь в жировых тканях, способны переходить по метаболическим цепям пищи в организмы животных и человека. В результате они превращаются в более полярные и, следовательно, легче усвояемые токсичные вещества.

5.1. ЛОКАЛИЗАЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ КСЕНОБИОТИКОВ

Основным органом метаболизма ксенобиотиков в организме человека и млекопитающих является печень (рис. 5.4).

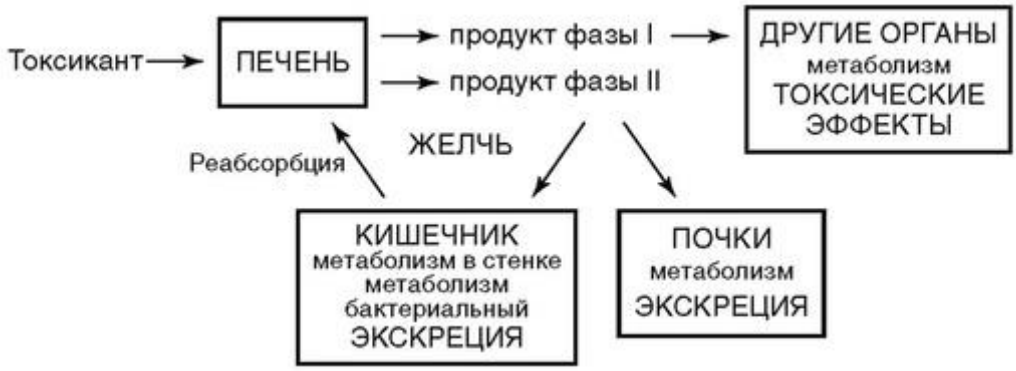


Рис. 5.4. Локализация метаболических превращений ксенобиотиков в организме

В печени сосредоточены разнообразные высокоактивные ферменты биотрансформации. Портальная система печени обеспечивает прохождение всех веществ из желудочно-кишечного тракта в общий кровоток. Это также определяет функциональное предназначение органа. Сеть печеночных капилляров и огромная площадь контакта между кровью и поверхностью микроворсинок гепатоцитов обеспечивают высокую эффективность элиминации токсикантов из печени на клеточном уровне.

Энзиматические реакции биотрансформации ксенобиотиков внутри гепатоцитов осуществляются в две фазы. В первой фазе протекают реакции окисления, восстановления и гидролиза ксенобиотиков. Во второй фазе идут реакции конъюгации ксенобиотиков с глюкуроновой кислотой, глутатионом и сульфатом, ацилирование, метилирование.

5.2. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ КСЕНОБИОТИКОВ

В первой фазе биотрансформации участвуют различные ферменты печени, низкая специфичность которых обусловливает разнообразие ксенобиотиков, способных подвергаться в организме метаболическим превращениям.

Особое значение для биотрансформации ксенобиотиков имеют микросомальные ферменты. Ферменты микросом не принимают участия в окислении эндогенных соединений, для которых существуют специфические пути метаболизма (см. главу 2). К ним относятся аминокислоты, нуклеотиды, углеводы. Однако в метаболизме ряда эндогенных соединений, например стероидов, микросомальные оксидазы печени принимают участие наряду со специфическими ферментами. Под действием этих оксидаз могут окисляться некоторые жирные кислоты, простагландины.

Реакции микросомального окисления различных веществ (RH), протекающие при участии цитохрома Р-450, как правило, зависят от содержания молекулярного кислорода (O_2) и кофермента НАДФН в среде. Молекулярный кислород активируется цитохромом Р-450 или другими цитохромами. Активация осуществляется при участии флавинсодержащей редуктазы НАДФН-цитохром Р-450. Суммарное уравнение реакции следующее:

$$RH + O_2 + НАДФН + H^+ \longrightarrow ROH + НАДФ + H_2O$$

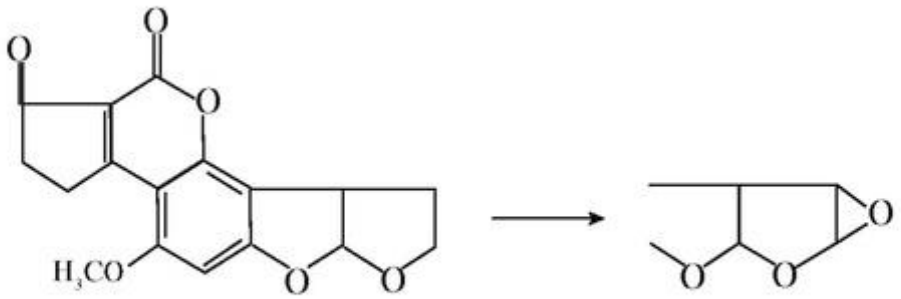
Ксенобиотики RH не связываются непосредственно с геминовой группой цитохрома Р-450. Они присоединяются к пептиду цитохрома. Поскольку цитохормы Р-450 - гемопротеины, их активность зависит от синтеза гема, то есть связана с метаболизмом железа.

Основными реакциями биотрансформации ксенобиотиков в первой фазе метаболизма являются реакции окисления при участии цитохрома Р-450. Цитохром Р-450 катализирует окисление различных классов органических веществ. Субстратами могут быть и несложные вещества, такие как хлороформ и др., а также стероиды и гетероциклические соединения, например антибиотик циклоспорин.

Цитохром Р-450 может катализировать не только окисление, но и восстановление некоторых веществ, например галоидуглеводородов, с образованием свободных радикалов. Такие реакции происходят при низком содержании кислорода в тканях.

Метаболизм полициклических и ароматических углеводородов сопровождается образованием активных промежуточных продуктов, в частности ареноксидов. Ареноксиды - канцерогены, могут вызывать некроз клеток.

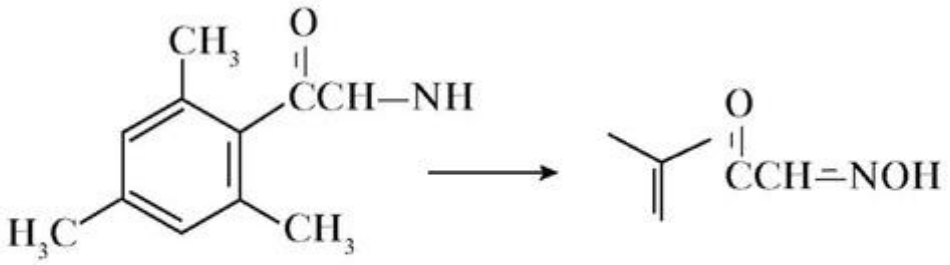
Многие алифатические и алициклические соединения с непредельными связями метаболизируют с образованием стабильных эпоксидов. Такие превращения также приводят к образованию канцерогенных продуктов, например афлатоксинов:



афлатоксин В

эпоксид
афлатоксина В

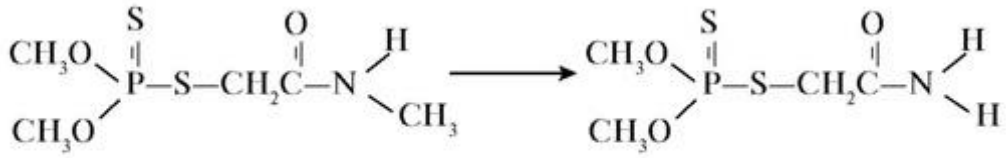
При метаболизме азотсодержащих веществ, например иминов, анилина и его производных, в результате окисления атома азота могут образоваться гидроксиламины, оксимы и N-оксиды:



триметилацетофенон имин

триметилацетофенон оксим

Под действием монооксигеназ протекают окислительное дезалкилирование и N-деалкилирование ксенобитиков. Пример:



диметоат

Флавинсодержащие монооксигеназы локализуются в эндоплазматическом ретикулуме. В отличие от цитохромов Р-450, они встречаются в тканях в одной неиндуцируемой форме. Флавинсодержащие монооксигеназы получают электрон непосредственно от НАДФН и окисляют ксенобиотики определенного класса. Это азотсодержащие вещества основного характера (гидразины, ариламины) и тиокарбамильные соединения (тиоацетамид). Примером может служить окисление никотина:

никотин

никотин-N-оксид

Многие субстраты флавинсодержащих монооксигеназ являются одновременно и субстратами цитохрома Р-450.

В разрушении водородпероксида и других пероксидов участвует обширная группа пероксидаз, превращающих пероксиды в воду и спирты. В этих реакциях образуются метаболиты-окислители. Эти окислители взаимодействуют с такими веществами, как ароматические амины, фенолы, гидрохиноны, алкены, полициклические ароматические углеводороды.

Например, пероксидазы лейкоцитов и эозинофилов разрушают водородпероксид, образованный в легких при контакте клеток крови с кислородом.

Простагландин-синтетаза активирует образование простагландинов из арахидоновой кислоты. В ходе последующего восстановления гидропероксидов окисляются другие субстраты, и среди них ксенобиотики, содержащиеся в тканях.

Окисление ксенобиотиков путем дегидроксилирования проходит в митохондриях и растворимой фазе цитозоля гепатоцитов. Такому превращению подвергаются различные спирты и альдегиды при участии алкоголь- и альдегиддегидрогеназ. Вследствие высокой активности этих ферментов печень является основным органом метаболизма спиртов. Дегидрогеназы идентифицированы также в почках и легких.

В результате окисления спиртов образуются альдегиды:

$$RCH_2OH + НАД^+ \longrightarrow RCHO + НАДН + H^+$$

В последующих превращениях альдегидов в кислоты принимают участие НАД-зависимые альдегиддегидрогеназы.

Среди веществ, окисляемых при участии рассмотренных ферментов, наибольшее токсикологическое значение имеют метанол, этиленгликоль, аллиловый спирт. При метаболизме этих веществ образуются высокотоксичные промежуточные (формальдегид, гликолиевый альдегид) и конечные (муравьиная кислота, оксалат) продукты.

В метаболизме некоторых ксенобиотиков участвуют флавопротеинредуктазы. При этом превращение, в частности, хинонов приводит к образованию свободных радикалов в клетках. Продукты превращения хинонов могут переносить электроны на молекулярный кислород, что сопровождается регенерацией исходного субстрата и инициирует каскад образования супероксид-радикалов (ROO_2').

Образование свободных супероксид-радикалов - один из общих механизмов цитотоксичности, протекает по следующей схеме (рис. 5.5).

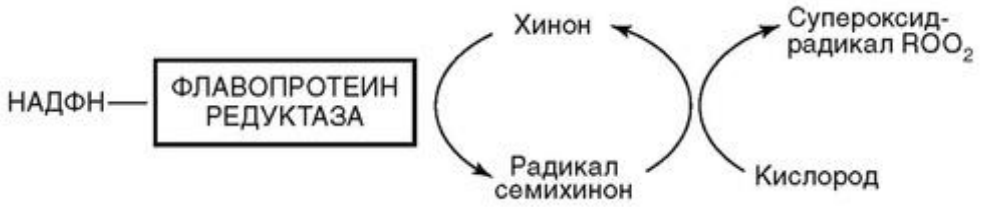


Рис. 5.5. Образование супероксид-радикалов (ROO_2') в окислительно-восстановительном цикле хинона, катализируемое флавопротеинредуктазой

Помимо хинона, по окислительно-восстановительному циклу метаболизируют нитроароматические соединения, биспиридины.

К числу токсикантов, активирующих свободнорадикальные процессы в клетке в процессе метаболизма при участии флавопротеинредуктаз, относятся цитостатик доксорубицин, антибиотик нитрофурантоин, пестицид паракват, комплексные соединения железа и меди.

В тканях человека, помимо оксидаз, содержатся ферменты-редуктазы. Редуктазы восстанавливают различные ксенобиотики. В частности, нитрозоредуктазы превращают

нитраты ($R\text{-}NO_2$) в амины ($R\text{-}NH_2$), азоредуктазы восстанавливают азогруппы до первичных аминогрупп, дегалогеназы осуществляют дегалогенирование таких веществ, как гексахлоран и ДДТ.

В тканях и жидкостях организма содержатся ферменты-эстеразы, которые гидролизуют ксеноэфиры различного строения.

В плазме крови содержатся эстеразы, расщепляющие с большой скоростью эфиры холина, прокаина и его производных, эфиры фосфорной кислоты. В результате расщепления токсичность ксенобиотиков изменяется. Некоторые ткани содержат ферменты, разрушающие амидные группировки, например дезаминидаза печени.

Превращение канцерогенных аэпоксидов в трансдигидродиолы осуществляют эпоксидгидролазы.

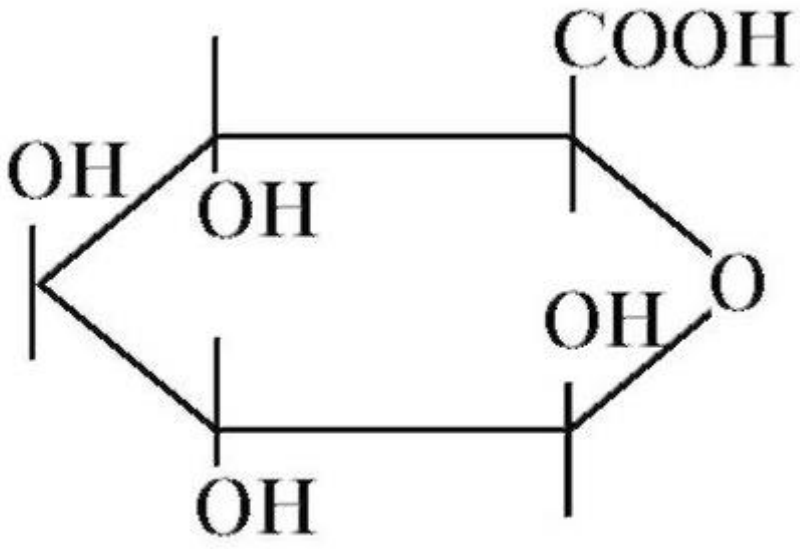
В разных тканях и крови млекопитающих обнаружен фермент флюорогидролаза, отщепляющий фтор от атома фосфора высокотоксичных фосфорорганических соединений - боевых отравляющих веществ (зарина, зомана). В результате гидролиза токсичность таких веществ резко снижается.

Во второй фазе биотрансформации ксенобиотиков участвуют различные ферменты печени, которые, как и ферменты первой фазы, обладают слабой субстратной специфичностью и участвуют в реакциях конъюгации большой группы химических веществ.

В ряде случаев при метаболизме ксенобиотиков во второй фазе может происходить токсификация - образуются токсичные продукты.

Ферменты второй фазы делят на три класса: трансферазы, формирующие эфирные или амидные связи с промежуточными метаболитами; трансферазы, активирующие конъюгацию веществ с глутатионом; лиазы, активирующие конъюгацию веществ с цистеином.

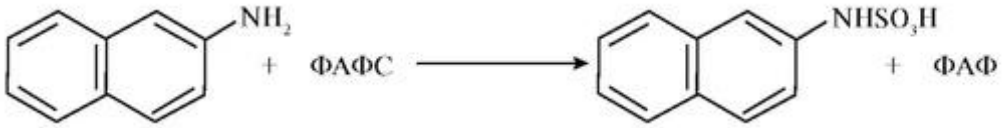
Большое значение в биотрансформации ксенобиотиков имеет глюкуроновая кислота:



Глюкуроновая кислота активно связывается (конъюгирует) с молекулами алифатических и ароматических спиртов, органических кислот, серосодержащих соединений, образуя эфиры глюкуроновой кислоты - глюкурониды. В реакцию конъюгации глюкуроновая кислота вступает в активной форме уридиндифосфоглюкуроновой кислоты (УДФГК) и переносится на молекулу-акцептор с помощью соответствующей трансферазы. Эта трансфераза идентифицирована в микросомальной фракции клеток печени, почек и других органов.

Некоторые эндогенные вещества, например стероиды и билирубин, также конъюгируют с глюкуроновой кислотой.

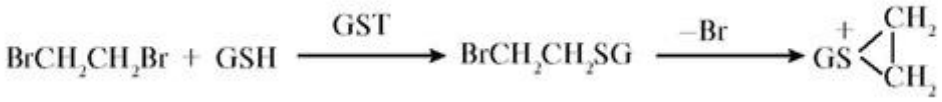
Различные соединения с фенольными группами и ароматические амины выделяются из организма под действием сульфотрансфераз в виде конъюгатов с 3-фосфоаденазин-8-фосфосульфатом (ФАФС):



Система конъюгации сульфата локализуется главным образом в цитозольной фракции гепатоцитов.

Органические вещества, содержащие в молекуле лабильные атомы водорода и галогенов, могут взаимодействовать с SH-содержащими эндогенными соединениями: цистеином, ацетилцистеином, глутатионом под действием глутатион-S-трансфераз (GST).

Например, конъюгация глутатиона (GSH) с 1,2-дигалогеналканами (дихлорэтаном, дибромэтаном) приводит к образованию продукта - S-(2-галогеналкана), который в дальнейшем превращается в активный циклический эписульфониум-ион:



Глутатион, вступивший в реакцию конъюгации, подвергается расщеплению. В результате из организма выделяется метаболит в связанной с N-ацетилцистеином форме (меркаптуровые кислоты).

Аналогичным образом происходит взаимодействие ксенобиотиков с цистеином и ацетилцистеином.

Для многих веществ биотрансформация завершается метилированием.

Метилированию могут подвергаться молекулы, содержащие гидроксильные, сульфгидрильные и аминогруппы в структуре. В качестве донора метильной группы выступает метионин в форме S-аденозинметионина (SAM). Перенос радикала осуществляют O-, S-, N-метилтрансферазы:

$$ROH + SAM \longrightarrow ROCH_3$$

По такому механизму, при участии катехол-О-метилтрансферазы, метаболизируют эндогенные вещества адреналин, норадреналин, дофамин. При этом образуются малоактивные 3-метоксипроизводные катехоламинов.

В кишечнике также протекает метаболизм ксенобиотиков при участии бактериальной микрофлоры. Под действием бактериальных ферментов расщепляются продукты второй фазы метаболизма печени. Эти продукты поступают в кишечник с желчью и образуют исходные метаболиты под действием гидролаз, разрушающих глюкурониды и сульфаты.

Кроме того, анаэробная среда кишечника обеспечивает восстановление бактериями некоторых химических веществ, например нитроароматических соединений.

Реабсорбция образовавшихся веществ замыкает цикл внутрипеченочной рециркуляции ксенобиотиков.

Глава 6. ТОКСИКОКИНЕТИКА

Токсикокинетика (от греч. *toxicon* - «яд», *kinetikos* - «движение») - наука, изучающая кинетические закономерности поступления, распределения, метаболизма и выведения токсичных веществ из организма.

Ответ организма на воздействие токсиканта есть функция дозы и времени, поэтому характеризуется токсикодинамическими и токсикокинетическими закономерностями.

Токсикодинамика изучает формирование токсического эффекта, основанное на равновесных процессах (см. главу 5). Но такие данные недостаточны для оценки токсичности вещества.

Токсический эффект, помимо биохимических свойств, определяется также изменением во времени концентраций токсиканта и его метаболитов в органах и тканях организма. Количественно эти изменения характеризуются *токсикокинетическими параметрами:* константой скорости (k), периодом полувыведения (t1/2), объемом распределения (Vd), клиренсом (CL) *токсиканта.*

Знание законов токсикокинетики необходимо для разработки системы профилактики токсических воздействий и диагностики интоксикаций. Данные токсикокинетики широко используют при создании новых противоядий и схем их оптимального применения при совершенствовании методов форсированной детоксикации.

6.1. ТОКСИКОКИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ

Токсикокинетические характеристики ксенобиотика зависят от многих факторов: физических и химических свойств вещества, объема органов и тканей, скорости кровотока, проницаемости капилляров и клеточных мембран, pH биосред и характеристик распределения между кровью и тканями.

Формализовать влияние этих факторов удается благодаря использованию токсикокинетических моделей и математическому аппарату, описывающему эти модели.

В токсикокинетике поведение токсичных веществ в организме рассматривают как движение между камерами (частями системы).

Камера отображает ограниченный в пространстве объем жидкости или ткани в организме с одинаковой концентрацией токсиканта по всему объему (рис. 6.1).

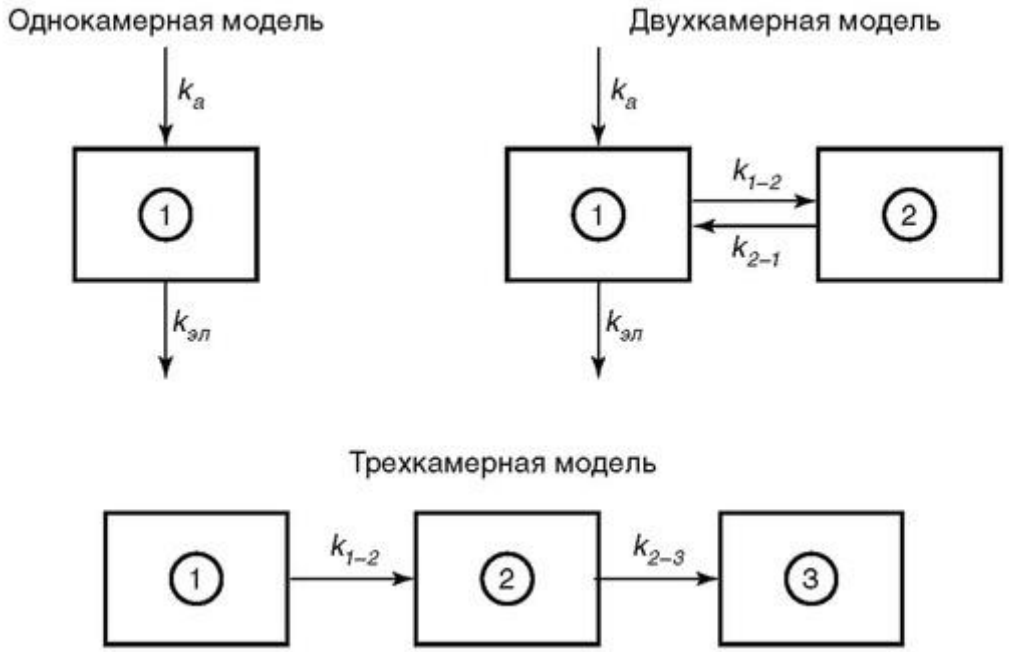


Рис. 6.1. Токсикокинетические модели: одно-, двух- и трехкамерная; k_i- константы скорости обмена веществ между камерами

Такому определению камеры могут удовлетворять кровь, лимфа, межтканевая жидкость. Между камерами происходят процессы распределения, обмена и выведения токсичного вещества.

В физиологической токсикокинетике организм рассматривается как набор уравнений массопереноса между отдельными органами и тканями. Между камерными и физиологическими моделями нет противоречий, напротив, они дополняют друг друга.

Практическая цель токсикокинетики определяется в первую очередь количественной оценкой концентрации ксенобиотика в разных средах организма во времени. Эти данные необходимы при диагностике и лечении отравлений, а также при химико-токсикологических исследованиях и судебно-химическом анализе.

Токсикокинетические характеристики ксенобиотика зависят от физических и химических свойств вещества, объема органов и тканей, скорости кровотока, проницаемости капилляров и клеточных мембран, кислотности среды и характеристик распределения вещества между кровью и тканями.

Расчет кинетических параметров обмена веществ между камерами основан на законе пропорциональности скорости обмена и концентрации вещества в камерах.

Например, скорость перехода ксенобиотика (X) из камеры 1 в камеру 2 равна:

$$V_{12} = -k_{12} \times C_{x1},$$

где C_{x1} - концентрация X в камере 1; k_{12} - константа скорости перехода вещества X из камеры 1 в камеру 2.

Скорость (V_{12}) перехода ксенобиотика (X) - величина, измеряемая убылью концентрации (X) в камере 1 в единицу времени:

$$V_{12} = -d(C_{x1})/dt,$$

где t - время.

В соответствии с законом пропорциональности скорости обмена введены показатели: $к_a$ - константа скорости абсорбции ксенобиотика из внесосудистого пространства в центральную камеру 1; $к_{эл}$ - константа скорости элиминации ксенобиотика из камеры 1; $к_{1-2}$, $к_{2-1}$, $к_{2-3}$ - константы скорости распределения ксенобиотика между камерами 1, 2 и 3 соответственно.

Компартментные (частевые) токсикокинетические модели не требуют информации о физиологии ткани и ее строении. На основе таких моделей можно рассчитывать во времени концентрацию или массу токсиканта в камере при различных дозах, определять степень накопления токсиканта при хроническом поступлении и время введения антидота.

Каждый ксенобиотик имеет характерную для этого вещества токсикокинетическую кривую, отражающую изменения во времени (C_t) его содержания, например в плазме крови (рис. 6.2).

На основе кривых C_t рассчитывают токсикокинетические параметры ксенобиотика: C_{max} - максимальную концентрацию ксенобиотика в крови; t_{max} - время достижения C_{max}; $T_{1/2}$ - период полувыведения (элиминации) ксенобиотика; $к_a$, $к_{эл}$ - константы скорости абсорбции и элиминации ксенобиотика; AUC_0*(areaundercurve)* - площадь под кривой C_t от времени поступления ксенобиотика в крови до времени практически полной (99%) его элиминации.

Расчетные параметры согласовывают с экспериментальными.

Наиболее доступный и информативный способ получения экспериментальных данных об абсорбции, распределении, биотрансформации и экскреции ксенобиотика - анализ проб крови и мочи, отбираемых во времени.

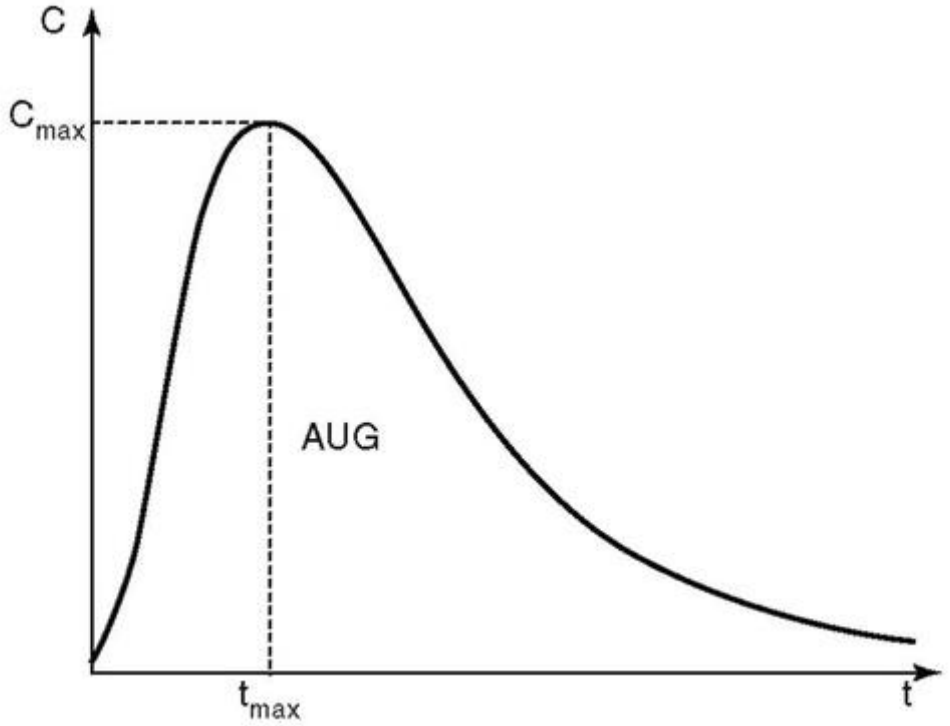


Рис. 6.2. Токсикокинетическая кривая - изменение во времени концентрации ксенобиотика в плазме крови

Элиминация ксенобиотика включает биотрансформацию, выдыхание и экскрецию. Элиминация ксенобиотика, присутствие которого в организме описывается однокамерной моделью, обычно соответствует кинетике первого порядка. Это означает, что скорость элиминации в любой момент времени пропорциональна количеству вещества в организме:

$v = к \times n.$

Простейшая токсикокинетическая модель - однокамерная (одночастевая) модель без всасывания ксенобиотика. Такая модель соответствует, например, внутривенному введению ксенобиотика в кровь (рис. 6.3а). Роль камеры, или части, в этой модели играет кровеносная система.

При внутривенном (парентеральном) введении токсиканта, когда ксенобиотик попадает непосредственно в системный кровоток, стадия всасывания отсутствует (токсикокинетическая модель без всасывания). При этом учитывают, что токсикант быстро распределяется и попадает в камеру - кровеносную систему.

При проведении токсикокинетического исследования после внутривенной инъекции через определенные промежутки времени отбирают пробы крови и измеряют концентрацию (C_x) ксенобиотика (X) в плазме. Если при этом в координатах lgC_x от *t* получают прямую линию, то кинетика ксенобиотика соответствует первому порядку и может быть описана однокамерной моделью.

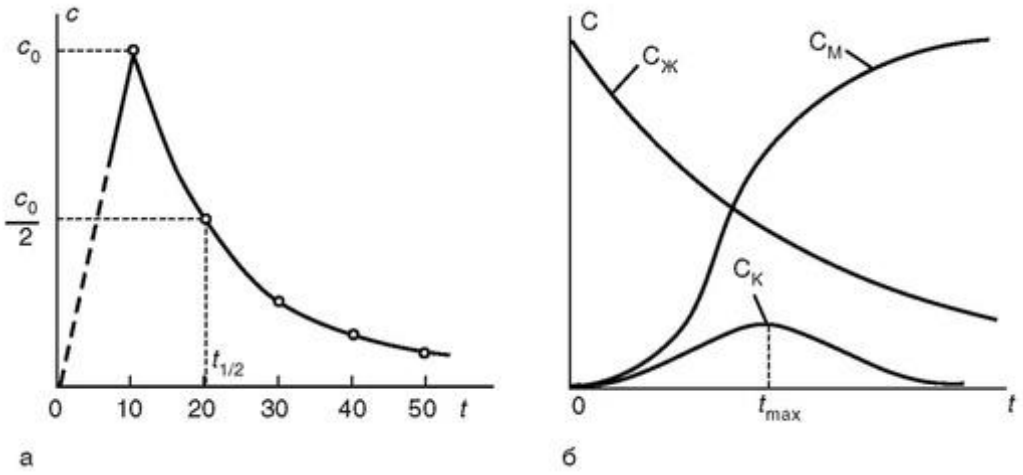


Рис. 6.3. Токсикокинетические кривые - изменение концентрации токсиканта во времени в организме человека: а - парентеральное введение, С - концентрация в крови; б - введение внутрь, $С_ж$ - концентрация в желудке, $С_к$ - в крови, $С_м$ - в моче, $Т_{max}$ - время достижения максимальной концентрации токсиканта в крови

Для оценки скорости выведения токсиканта рассчитывают константу элиминации ($к_{эл}$) и период полувыведения ($Т_{1/2} = 0{,}693/к_{эл}$). Эти параметры рассчитывают графически на основе закона пропорциональности скорости обмена.

Однако при внутривенном введении некоторых ксенобиотиков уменьшение их концентрации в плазме крови во времени не соответствует кинетике первого порядка. В таких случаях для токсикокинетического анализа используют многокамерные модели.

Двухкамерная (двухчастевая) модель отображает распределение вещества между центральной камерой (1) и периферической (2) (см. рис. 6.1). При этом учитывают, что ксенобиотик находится в динамическом равновесии между центральной и периферической камерами.

Для установления концентрационного равновесия между кровью (камера 1) и тканями (камера 2) требуется время. Стадия распределения в случае однократно введенной дозы требует определенного времени. После завершения распределения снижение концентрации в плазме крови происходит медленнее и характеризуется константой скорости $к_{эл}$.

Двухкамерная модель хорошо отображает обмен между кровью и костной тканью. Накопление токсиканта в костной ткани (депо) может увеличиваться с возрастом и зависит от экологических факторов, как это обнаружено по накоплению в организме тяжелых для зон с различной техногенной нагрузкой.

В течение жизни человека равновесие обмена ионами свинца между костной тканью и плазмой крови смещается в ту или иную сторону в зависимости от присутствия ксенобиотика в окружающей среде:

$$C_{КТ}(Pb^{2+}) \leftrightarrow C_{К}(Pb^{2+}).$$

При внесосудистом поступлении ксенобиотика используется модель со всасыванием (абсорбция в кровь). Например, при приеме внутрь токсикант распределяется между содержимым желудка, кровью и мочой и описывается трехкамерной моделью (см. рис. 6.1).

Токсикокинетика в этой модели описывается системой из трех дифференциальных уравнений, которые составляются для скорости обмена между частями на основе закона пропорциональности скорости обмена концентрации.

Интегрирование системы уравнения дает решение в виде зависимости концентраций C_s, C_x, C_p от времени.

Токсикокинетические кривые (рис. 6.3б) отражают наиболее характерные особенности обмена токсиканта между частями организма.

Кинетические кривые в координатах *C-t* отражают экспоненциальное снижение концентрации токсиканта в содержимом желудка, прохождение через максимум его содержания в крови, монотонный рост концентрации в моче.

Скорость убыли токсиканта из содержимого желудка (скорость абсорбции в кровь) прямо пропорциональна его концентрации в содержимом желудка.

Поскольку скорость накопления токсиканта в крови представляет собой разницу между скоростью поступления токсиканта из полости желудка в кровь и скоростью элиминации токсиканта из крови, то на основе интегральных кинетических уравнений можно рассчитать концентрацию токсиканта в крови в момент Т.

Исходная концентрация токсиканта в желудке ($C_ж$) монотонно уменьшается со временем. Концентрация токсиканта в крови ($C_к$) вначале возрастает, достигает максимума, затем снижается. Концентрация токсиканта в моче ($C_м$) монотонно возрастает со временем.

В фармакокинетике, например, закономерностями подобного типа описывается метаболизм лекарственных веществ.

Обычный путь лекарственного вещества в организме можно рассматривать как последовательность двух процессов: всасывания из желудка в кровь (характеризуется константой всасывания $к_в$) и выведения (элиминации) из крови в мочу (характеризуется константой выведения $к_е$).

Согласно рис. 6.3б, содержание лекарственного вещества в крови в зависимости от времени описывается кривой с максимумом. Эта особенность фармакокинетики имеет важное значение при дозировании лекарственных средств.

Максимальное содержание лекарственного вещества в крови должно быть больше некоторого минимального (действующего) значения, но не выше некоторого максимального (токсичного) значения, то есть должно находиться в терапевтической области. На основе фармакокинетической кривой можно прогнозировать вводимую дозу лекарственного вещества и время приема очередной дозы.

Время достижения максимальной концентрации токсиканта в крови рассчитывают по формуле, получаемой из уравнений токсикокинетики:

$$t_{max} = \ln(k_{эл} / k_a) / (k_{эл} / -k_a),$$

где $к_а$ - константа скорости абсорбции ксенобиотика из желудка в кровь; $к_{эл}$ - константа скорости элиминации ксенобиотика из крови.

Период полувыведения ($Т_{1/2}$) - время, необходимое для снижения концентрации ксенобиотика в крови или плазме наполовину, - можно рассчитать по формуле после определения константы элиминации ($к_{эл}$) по токсикокинетическим кривым:

$$T_{1/2} = 0{,}693/k_{эл}.$$

Важной кинетической характеристикой токсикантов является клиренс.

Клиренс (от англ. *clearance* - «очищение») - скорость очищения крови или других сред и тканей организма от ксенобиотика при его химических превращениях, перераспределении в организме и выведении из организма.

Клиренс - величина, измеряемая объемом крови, полностью освобождаемым от вещества за единицу времени.

Например, клиренс 100 мл/мин означает, что 100 мл крови, содержащей ксенобиотик, полностью очищается от него в течение 1 мин. Уменьшение обычных значений клиренса означает, что токсикант накапливается в организме из-за нарушения функций жизненно важных органов и систем.

Общая эффективность удаления химического вещества из организма характеризуется общим клиренсом, который определяется как сумма клиренсов отдельных органов.

Высокие значения клиренса указывают на эффективность и высокую скорость выведения вещества, низкий клиренс означает медленное и менее эффективное удаление ксенобиотика из организма.

Чрезвычайно важно в токсикологии, особенно в клинической, определение биодоступности ксенобиотика.

Токсикокинетические данные после внутривенного введения используют для сравнения с любым внесосудистым введением, поскольку все химические вещества в конечном счете поступают в системный кровоток.

Биодоступность (F) - величина, измеряемая долей поступления (всасывания) ксенобиотика в кровь при внесосудистом введении относительно внутривенного введения:

$$F = C_{вн} / C_{в/в},$$

где $C_{вн}$ и $C_{в/в}$ - концентрации ксенобиотика в плазме крови при внесосудистом и внутривенном способах введения.

Биодоступность (F) для химических веществ имеет значения от 0 до 1. Полное всасывание соответствует значению биодоступности F = 1. Реальные наблюдаемые значения биодоступности F <1 свидетельствуют о частичной абсорбции ксенобиотиков в системный кровоток.

На величину биодоступности влияют ограниченное всасывание ксенобиотика при приеме токсиканта внутрь, эффект первого прохождения через кишечник, эффект первого прохождения через печень, химическая природа вещества, от которой зависит, например, растворимость или способность к мицеллообразованию (для липофильных веществ), и другие факторы.

В табл. 6.1 приведены токсикокинетические параметры различных ксенобиотиков, широко используемых в фармакологии.

Таблица 6.1. Токсикокинетические параметры различных ксенобиотиков

Ксенобиотик	Биодоступность при приеме внутрь, %	Клиренс, л/ч (70 кг)	Период полувыведения, ч
Амоксициллин	93	10,8	1,7
Ампициллин	62	16,2	1,3
Аспирин	68	19	0,25
Атенолол	56	10,2	6,1
Ацикловир	23	19,8	2,4

Окончание табл. 6.1

Ксенобиотик	Биодоступность при приеме внутрь, %	Клиренс, л/ч (70 кг)	Период полувыведения, ч
Диазепам	100	1,62	43
Дигоксин	70	7,8	39
Дилтиазем	44	50,4	3,7
Индометацин	98	8,4	2,4
Метотрексат	70	9	7,2
Хлорамфеникол	80	10,2	2,7
Циклоспорин	23	24,6	5,6

Как следует из данных табл. 6.1, токсикокинетические параметры ксенобиотиков зависят от химических свойств вещества и меняются в широких пределах.

6.2. ТОКСИКОГЕНОМИКА

Токсикогеномика - научное направление молекулярной диагностики, изучающей индивидуальный тип ответа организма на воздействие токсикантов.

Фармакогеномика - раздел токсикогеномики, изучающий ответ организма на прием лекарственных препаратов. Эта область геномики определяет вклад генетического компонента в токсичность и эффективность лекарственного препарата для данного организма.

Например, обнаружено, что у людей, страдающих недостаточностью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, в ответ на противомалярийные и другие оксиданты возникает тяжелая гемолитическая анемия. Также установлено, что эффективность и токсичность противотуберкулезного препарата изониазида обусловлены скоростью инактивации этого препарата у конкретного больного.

Особенно важно проводить генетический скрининг в популяциях с высокой частотой побочных эффектов на данный лекарственный препарат. Идентификация генов резистентности к лекарственным препаратам необходима для повышения эффективности терапии инфекционных заболеваний в каждой конкретной популяции.

Токсикогеномическая методика определения токсичности вещества основана на экспозиции ДНК-чипа пациента с проверяемым веществом. При этом одни входящие в ДНК гены активируются, другие, наоборот, выключаются. По этим данным определяют степень биотоксичности вещества.

Токсикогеномическая методика более информативна по сравнению с традиционными испытаниями препаратов на животных. Традиционные испытания показывают, какие вещества действуют разрушительно на печень, что вызывает рак или приводит к врожденным физическим недостаткам. Но при этом остается неизвестной причина наблюдаемых эффектов.

Новая методика требует мало времени и позволяет значительно уменьшить количество подопытных животных. Здесь в основном используют клетки из биоптатов. Кроме того, генная активность может сигнализировать об опасности задолго до появления ее видимых симптомов, например, до появления опухоли. Генетический уровень чувствительнее физиологического.

Несмотря на сложности внедрения в медицинскую практику, по новым методикам испытывают сотни веществ с заведомой токсичностью, чтобы пополнить базу генетических данных в области токсикологии. На основе этих данных можно сравнивать эффекты веществ с неизвестными свойствами с изученными. Например, в результате такого сравнения найдены паттерны для таких токсических соединений, как разрушители гормонов, канцерогены и гепатотоксичные вещества, обнаружена большая группа генов, проявляющих специфическую активность у людей с аллергией на пенициллин.

Недостатком токсикогеномической (как и традиционной) методики является неопределенность генного диагноза при испытании комбинированных препаратов, то есть из нескольких лекарственных веществ. Кроме того, высока стоимость токсикогеномической диагностики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Биохимия / Под общ. ред. Северина Е.С. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 780 с.

Бочков Н.П. Клиническая генетика. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2002. - 448 с.

Галактионов В.Г. Иммунология. - М.: Изд-во МГУ, 1998. - 480 с.

Еремин С.А., Калетин Г.И. и др. / Под ред. Р.У. Хабриева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 752 с.

Ершов Ю.А., Попков В.А., Берлянд А.С. Общая химия. - М.: Юрайт, 2014. - 558 с.

Ершов Ю.А., Зайцева Н.И. Основы биохимии для инженеров. - М.: МГТУ, 2010 - 360 с.

Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная аналитика. - М.: Медицина, 2002. - 380 с.

Крамаренко В.Ф. Токсикологическая химия. - М.: Киев: В. ш. 1989. - 447 с.

Курляндский Б.А., Филов В.А. Общая токсикология. - М.: Медицина, 2002 - 608 с.

Куценко С.А. Основы токсикологии. - СПб.: ВМА им. С.М. Кирова, 2002 г. - 395 с.

Карягина И.Ю. Электрофорез. Клинико-диагностическая интерпретация электрофореграмм белков сыворотки крови: Учебно-методическое пособие. - СПб.: СПбГУ, 2000. - 54 с.

Ленинджер А. Основы биохимии. - М.: Мир, 1985. - 1055 с.

Николаев А.Я. Биологическая химия. - М.: МИА, 2004. - 566 с.

Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. - М.: Наука, 2002. - 248 с.

Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. - М.: МИА, 2004. - 303 с.

Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В. и др. Клиническая фармакогенетика / Под ред. В.Г. Кукеса, Н.П. Бочкова. - М.: ГЭОТАР- Медиа, 2007. - 248 с.

Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Мясоедов В.В. и др. Клиническая биохимия. - М.: Триада-Х, 2002. - 504 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Стандартная потребность в питании у взрослых людей. Указаны значения для ФРГ и по данным ФАО (продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН), относятся к людям в возрасте 25 лет. См. также табл. 2 (по *Altman, Dittmer,* 1974)

	Масса, кг	Витамины							Минеральные вещества	
		калории	белок, г/сут	тиамин, мг/сут	рибофлавин, мг/сут	ниацин, мг/сут	витамин С, мг/сут	витамин А, мг/сут	Са, г/сут	Fe, мг/сут
ФРГ										
мужчины	72	2550	72	1,7	1,8	18	75	5000	0,8	10
женщины	60	2200	60	1,5	1,8	14	75	5000	0,8	12
ФАО										

мужчины	65	3200	46	1,3	1,8	21,1	-	-	0,4	-
женщины	55	2300	39	0,9	1,3	15,2	-	-	0,5	-

Таблица 2. Рекомендуемое суточное потребление с пищей белка и энергии взрослыми людьми и детьми

	Суточная норма белка, г/кг		Суточная норма энергии, ккал (кДж)	
	мужчины	женщины	мужчины	женщины
Взрослые				
25 лет	0,9	1,0	2600 (10 900)	2200(9200)
45 лет	0,9	0,9	2400 (10 000)	2200(8400)
65 лет	1,0	0,9	2200 (9200)	1800(7500)
Беременные:				
до конца первых 5 мес		0,9		22 000(9200)
с 6-го месяца		1,5		2600 (10 900)
Кормящие матери		0,9		2800 (11 700)
Дети				
6 мес	2,5		600(2500)	
6-12 мес	2,2		900(3800)	
1-4 года	2,2		1200 (5000)	
4-7 лет	2,0		1600 (6700)	
7-10 лет	1,8		2000(8400)	
10-13 лет	1,5	1,4	2400 (10 000)	2100 (8800)

Окончание табл. 2

	Суточная норма белка, г/кг		Суточная норма энергии, ккал (кДж)	
	мужчины	женщины	мужчины	женщины
13-15 лет	1,5	1,4	2400 (11 300)	2400 (10 000)
15-19 лет	1,2	1,0	3100 (13 000)	2500 (10 500)

Примечание. Количество белка указано в г на 1 кг массы тела в сутки (±20%), количество энергии - в ккал (кДж); и то и другое в расчете на преобладание малоподвижного образа жизни. Для кормящих матерей в дополнение к указанным значениям следует добавлять 5 г белка на 100 г массы ребенка. См. также табл. 1 (по *Verbraucherdienst*, 1979)

Таблица 3. Составные части искусственного рациона, достаточного для питания человека

Аминокислоты	
L-изолейцин (незаменимая)	0,275 г
L-лейцин (незаменимая)	0,435
L-лизин HC1 (незаменимая)	0,327
L-метионин (незаменимая)	0,282 г
L-фенилаланим (незаменимая)	0,313 г
L-треонин (незаменимая)	0,275 г
L-триптофан (незаменимая)	0,085 г

L-валин (незаменимая)	0,303 г
L-аланин	0,293 г
L-аргинин-HCl	0,537 г
L-аспарагиновая кислота	0,625 г
L-глутамин	1,032 г
гликокол, глицин	0,478 г
L-гистидин-HCl x H_2O	0,133 г
L-пролин	0,329 г
L-серин	0,202 г
L-тирозин-HCl (в виде этилового эфира)	0,343 г
Всего:	6,330 г
Углеводы	
глюкоза	24,0 г
олигосахариды (из гидролизата кукурузного крахмала, полученного ферментативным путем)	45,5 г
Всего:	69,5 г
Незаменимые жирные кислоты	
сафлоровое масло	0,22 г
Витамины и прочие вещества	
витамин А (ацетат)	0,287 мг (834 МЕ)

Окончание табл. 3

Витамины и прочие вещества	
витамин С, аскорбиновая кислота	11,7 мг
витамин D_2	1,67 мг (67 МЕ)
витамин Е, токоферол (ацетат)	3,33 мг
витамин B_1, аневрин, тиамин (гидрохлорид)	0,2 мг
D-биотин, витамин Н	0,033 мг
D-пантотенат кальция, витамин B_5	1,67 мг
холингидротартрат	14,17 мг
витамин B_{12}, цианкобаламин	0,83 мг
фолацин, витамин Вс (в виде фолиевой кислоты)	0,017 мг
миоинозит, мезоинозит	19,42 мг
никотинамид, витамин РР	2,22 мг
витамин B_6, пиридоксин (гидрохлорид)	0,33 мг
витамин B_2, рибофлавин (натриевая соль 5-фосфорного эфира)	0,2 мг
витамин K_1, фитоменадион	0,02 мг
глицерофосфат натрия	430,0 мг
σ-лактон глюконовой кислоты	1,06 г
сорбиновая кислота	150,0 мг
Минеральные вещества и микроэлементы	
хлорид натрия	978,0 мг
хлорид калия	672,0 мг
хлорид кальция	489,0 мг
окись магния	43,2 мг
сульфат железа (II)	8,26 мг
ацетат меди (II)	1,03 мг
ацетат марганца (II)	2,09 мг

хлорид цинка	0,14 мг
иодид калия	0,03 мг

Примечание. Приведенные здесь количества соответствуют образованию 300 ккал (1225 кДж). О потребности человека в витаминах см. табл. 6. МЕ - международные единицы (по *Grimme,* 1975; с изменениями)

Таблица 4. Потребление энергии человеком при различной физической деятельности

Деятельность	Потребление энергии в течение 10 ч	
	ккал	кДж
Пешеходная прогулка	50-200	200-800
Езда на велосипеде	100-300	400-1200
Поднятие тяжестей	200-400	800-1600
Бег на длинные дистанции	200-400	800-1600

Окончание табл. 4

Деятельность	Потребление энергии в течение 10 ч	
	ккал	кДж
Танцы	300-400	1200-1600
Футбол	400-500	1600-2000
Теннис	400-500	1600-2000
Плавание	200-600	800-2400
Тренировочный бег	500-1000	2000-4000
Бег на лыжах	400-800	1600-3200

Примечание. Указана величина энергии, выделяемой за час в результате основного обмена (по Forster, 1980.) Основной обмен 7200 кДж/сут --300 кДж/ч

Таблица 5. Состав различных продуктов питания и их энергетическая ценность

	Вода, г	Белки, г	Жиры, г	Углеводы, г	Энергетическая ценность	
					ккал	кДж
Апельсины	87,1	1,0	0,2	12,2	49	205
Арбузы	92,6	0,5	0,2	6,4	26	109
Бананы	75,7	1,1	0,2	22,2	85	356
Виноград	81,4	0,6	0,3	17,3	67	280
Вишни	83,4	1,2	0,4	14,6	60	251
Земляника	89,9	0,7	0,5	8,4	37	155
Изюм	18,0	2,5	0,2	77,4	289	1210
Ревень	94,9	0,5	0,1	3,8	16	67
Сливы	85,7	0,7	0,1	12,3	50	210
Яблоки (сладкие)	84,0	0,3	0,6	15,0	58	243
Капуста белокочанная	92,1	1,4	0,2	5,7	25	105
Капуста брюссельская	84,8	4,7	0,4	8,7	47	197

Капуста квашеная	92,8	1,0	0,2	4,0	18	75
Капуста цветная	91,0	2,7	0,2	5,2	27	113
Картофель	79,8	2,1	0,1	17,7	76	318
Лук репчатый	87,8	2,0	0,3	9,4	44	184
Луковые овощи	89,1	1,5	0,1	8,7	38	159
Морковь	88,6	1,1	0,2	9,1	40	167
Огурцы	95,6	0,8	0,1	3,0	13	55
Перец (зеленый)	92,8	1,2	0,2	5,3	24	100
Помидоры	93,5	1,1	0,2	4,7	22	92
Редис	93,7	1,1	0,1	3,6	18	75
Салат кочанный	95,1	1,3	0,2	2,5	14	59
Свекла столовая	87,3	1,6	0,1	9,9	43	180
Сельдерей	88,4	1,8	0,3	8,5	40	167

Продолжение табл. 5

	Вода, г	Белки, г	Жиры, г	Углеводы, г	Энергетическая ценность	
					ккал	кДж
Спаржа	92,9	2,1	0,2	4,1	21	88
Фасоль белая	11,6	21,3	1,6	61,6	338	1415
Шпинат	90,7	3,2	0,3	4,3	26	109
Белые грибы	88,6	2,8	0,4	5,9	31	130
Дрожжи пекарские	71,0	12,1	0,4	11,0	87	360
Шампиньоны	90,8	2,8	0,2	3,7	22	92
Грецкие орехи	3,5	14,8	64,0	15,8	651	2725
Земляные орехи (жареные)	1,8	26,2	48,7	20,6	582	2436
Кокосовые орехи	48,0	4,2	34,0	12,8	351	1469
Лесные орехи	6,0	12,7	60,9	18,0	627	2624
Миндаль	4,7	18,6	54,2	19,5	598	2503
Булочки	34,0	6,8	0,5	58,0	269	1126
Овсяные хлопья	10,3	13,8	6,6	67,6	387	1620
Пшеничная мука	12,6	12,1	2,1	71,5	331	1385
Пшеничные проростки	11,5	26,6	10,9	46,7	363	1519
Ржаная мука	14,3	10,8	1,5	71,8	310	1297
Ржаной хлеб	38,5	6,4	1,0	52,7	227	950
Спагетти	10,4	12,5	1,2	75,2	369	1544
Виноградный сахар (глюкоза)	0,0	0,0	0,0	99,5	385	1611
Марципан	8,8	8,0	18,0	64,0	428	1792
Мед	17,2	0,3	0,0	82,3	304	1272

Молочный шоколад	0,9	7,7	32,3	56,9	520	2176
Маргарин	19,7	0,5	78,4	0,4	698	2921
Масло сливочное	17,4	0,6	81,0	0,7	716	1996
Рыбий жир	0,0	0,0	99,9	0,0	901	3771
Свиное сало	1,0	0,0	99,0	0,0	901	3771
Яйца куриные	74,0	12,8	11,5	0,7	162	678
Йогурт	86,1	4,8	3,8	4,5	71	297
Камамбер	51,3	18,7	22,8	1,8	287	1201
Молоко коровье	88,5	3,2	3,7	4,6	64	268
Сбитые сливки	64,1	2,2	30,4	2,9	288	1205
Творог нежирный	79,4	17,2	0,6	1,8	86	360
Эмментальский сыр	34,9	27,4	30,5	3,4	398	1666
Баранья котлета	52,0	14,9	32,0	0,0	352	1473
Говядина (филейная часть)	75,1	19,2	4,4	0,0	122	511
Зайчатина	73,0	22,3	0,9	0,2	103	431
Колбаса любительская	65,2	11,1	21,7	0,0	241	1009

Окончание табл. 5

	Вода, г	Белки, г	Жиры, г	Углеводы, г	Энергетическая ценность	
					ккал	кДж
Курица жареная	72,7	20,6	5,6	0,0	138	578
Свиная котлета	53,9	15,2	30,6	0,0	341	1427
Свинина	71,2	18,6	9,9	0,0	168	703
Сервелат	55,6	12,5	27,6	1,8	256	1072
Телячья котлета	70,0	19,5	9,0	0,0	164	686
Телячья печень	70,7	19,2	4,7	4,1	140	586
Утка	54,0	16,0	28,6	0,0	326	1365
Пикша	80,5	18,3	0,1	0,0	79	331
Сазан, карп	72,4	18,9	7,1	0,0	145	607
Селедка	62,8	17,3	18,8	0,0	243	1017
Тунец	52,5	23,8	20,9	0,0	290	1214
Форель (пресноводные формы лососевых)	77,6	19,2	2,1	0,0	101	423
Виноградные улитки	82,0	15,0	0,8	2,0	75	314
Кальмары	82,2	15,3	0,8	0,0	73	306
Мидии	84,1	11,7	1,9	2,2	76	318
Устрицы	83,0	9,0	1,2	4,8	68	285
Креветки	78,2	18,7	2,2	0,0	97	406
Омары	78,5	16,9	1,9	0,5	91	381

Примечание. В расчете на 100 г продукта соответствующие значения для частей растений (см. *Documenta Geigy*, 1975)

Таблица 6. Суточная потребность человека в витаминах (по *Karlson,* 1980; с изменениями)

A	Ретинол	1,5-2 мг
D	Кальциферол	0,02 мг
E	Токоферол	20 мг
K	Менахинон	1 мг[2]
B1	Тиамин, аневрин	1,4 мг
	Рибофлавин	1,7 мг
PP	Никотинамид	20 мг
Bc	Фолиевая кислота	0,4 мг
B5	Пантотеновая кислота	10 мг
B6	Пиридоксин	2 мг
	Кобаламин	0,005 мг
C	Аскорбиновая кислота	60 мг
H	Биотин	0,25 мг

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

С-пептид 295

А

Аддиция. См. Синергизм суммированный

Аденозилтрифосфат 107, 118, 121, 165

синтез 167

Алкалоз 37

Алкаптонурия 136, 253, 266

Аллергопротеомика 272

Аллопуринол 238

Альбинизм 136, 253, 266

Амилаза 36, 82

Аминокислота(ы) 58, 61, 63, 132,

251

классификация 61

нарушения обмена 251

Амплификация 206, 208, 209

Амфолит 29

Анаболизм 113,114

белков 130

жирных кислот 142

Анемия пернициозная 126

Анион 66

Ареноксиды 302

Атеросклероз 99, 279, 283

Ацетил-КоА 116

Ацидоз 37

Б

Белок 15, 58, 64, 65, 67

виды 68

гидролиз 129

денатурация 68

синтез 130, 172

Биогеохимические провинции 56

Биодоступность 315

Биоинформатика 213

Болезнь

Альцгеймера 246

Вильсона 136

Гирке 286

Ниманна-Пика 96, 278

Паркинсона 253

Хартнупа 136

Буферная емкость 38, 39

Буферная(ые) система(ы)

белковая 42

водородкарбонатная 40

крови 40

фосфатная 42

В

Вода 16

Водородный показатель среды 33

Г

Галактоза 78

Галактоземия 127, 296

Гексоземия 286, 296

Гематотоксичность 300

Гемоглобин 69

гликозилированный 293

Ген 102, 109

Геном 110, 224

человека 111

Геномика 12, 218, 224

функциональная 232

Гепарин 89

Гиалуоронидаза 89

Гидролиз 138

сахарозы 167

Гипергликемия 286, 287

Гиперглицинемия 253

Гипогликемия 286, 295

Гистидин 257

Гистидинемия 251, 257

Гистоны 105

Гликоген 81

Гликозаминогликаны 88

Гликоконъюгаты 82

Гликолиз 118, 165

анаэробный 118

Гликолипиды 82, 96, 125

Гликолипопротеиды 125

Гликомика 285

Гликопротеиды 82, 84, 125

Гликофорин 86

Глицин 253

Глицинурия 251, 255

Глюкагон 295

Глюкоза 78, 115

распад 169

Глюконеогенез 117, 123

Гомеостаз концентрационный 21

Гомоцистеин 256

Гомоцистинурия 256

Д

Декстрины 82

Денатурация белка 68

Дерматансульфат 89

Диабет сахарный 289

Дисахариды 79

Дислипопротеидемия 284

Диссоциации
константа 25

степень 23

Диссоциация 23, 24, 30

ступенчатая 27

электролитическая 22

З

Закон

Генри 19

Дальтона 20

разведения Оствальда 26

Сеченова 20

Зона буферного действия 40

И

Изоэлектрическая точка белка 65

Иммуноглобулины 131, 137, 272

Инсулин 78, 295

Интрон 110

Ионизация 22

Ионное произведение воды 32

К

Катаболизм 113, 114

Каталаза 71

Катион 66

Кератин 68

Кислота 29, 30

арахидоновая 138

аскорбиновая 69

глюкуроновая 88

дезоксирибонуклеиновая 100, 101, 102, 103, 239

денатурация 107

синтез 160, 162

структура 109

линоленовая 138

нейраминовая 98

нуклеиновая

структура 104

рибонуклеиновая 101, 103

сиаловая 98

соляная 73

тейхоевая 125

фолиевая 269

фосфорная 104

хенодезоксихолевая 282

холевая 282

Кислотность 37

Кислоты

жирные 93

биосинтез 141

катаболизм 140

незаменимые 94

нуклеиновые 15, 100, 125

катаболизм 152

Клиренс 314

Кодон 109

Коллаген 68

Концентрация 17

моляльная 18

молярная 18

Кофактор 70

Кофермент 70

Коэффициент

растворимости 19

Коэффициент атерогенности 283

Крахмал 81

Кривая титрования 37

Ксенобиотики 297, 298, 301

биотрансформация 301, 302

Ксенометаболомика 297

Л

Лактаза 80

Лактоза 80

Лейциноз 268

Лептин 295

Липаза 138

Липидомика 218, 277

Липиды 15, 91

стероидные 99

функции 92

Липопротеины 148

классификация 148

М

Макроэлементы 46, 48, 51, 52

Мальтоза 80

Метаболизм 9, 112, 113

пищевых веществ 114

углеводов 115

Метаболические пути 112

Метаболом 7, 9, 21, 111

белков 50

человека интегральный 15

электролитов 22

элементный 47

Метаболомика 7, 10, 11, 189, 198, 218

Метабономика 7, 10, 13

Металлофермент 71

Микрокомпоненты 15

Микроэлементы 47, 51, 52

Миоглобин 69

Моносахариды 76

Мутация 109
Н

Нуклеотиды 102, 103

свободные 107

Нутриномика 298

О

Обмен

аминокислот

нарушения 251

липидов 138

нарушения 147

Оксалат 256

Олигосахариды 76, 79

классификация 79

Органогены 46, 52

Основание 29, 30

П

Пенициллин 84

Пептидогликан 83

Пищеварения этапы 114

Полимеразная цепная реакция 206, 209, 211, 234

оценка результатов 209

стадии 207

Полисахариды 15, 76, 81, 124

Праймеры 206

Прион 247

Проинсулин 295

Протеом 241

Протеомика 7, 218

функциональная 245

Проферменты 73

Р

Растворимость 18

Растворитель 16, 30

Растворы 16

буферные кислотно-основные 38

нейтральные 32

Репликация 157

Рибонуклеотиды

биосинтез 153

С

Сахароза 80

Секвенирование 65, 210, 213

полное 111

Секвестранты 285

Соли жирных кислот 93

Статины 285

Супераддиция. См. Синергизм

потенцированный

Сфингозин 96

Сфинголипиды 95, 171

Сфингомиелины 99

Т

Теория кислот и оснований про

тонная 29

Терпены 100

Тирозинемия 262

Тирозиноз 253

Токсикогеномика 316

Токсикогеномическая методика 316

Токсикодинамика 300, 308

Токсикокинетика 308

Токсины 300

Токсический эффект 308

Толерантность. См. Привыкание

Транскриптом 234, 236

Транскриптомика 7, 218, 234

Транскрипция 158

Триацилглицериды 93

Триглицериды 281

Трипсин 73

У

Углеводсодержащие соединения 84

Углеводы 76, 285

функции 90

Ультрамикроэлементы 47

Уреотелические организмы 134

Ф

Фармакогеномика 316

Фенилаланин 259

Фенилкетонурия 136, 251, 260, 262

Ферментов активаторы и ингиби

торы 73

Фермент(ы) 70

классификация 71

классы 72

Фибраты 285

Фибронектин 87

Фолдинг белка 247

Фосфоглицериды 99, 143

Фосфолипиды 94, 143, 283

Фруктоза 79

Фруктоземия 296

Х

Хиломикроны 138, 150, 280, 282

Холестерин 99, 280

биосинтез 145

Холин 94

Хондроитин 89

Хроматография аффинная 294
Хромосома 105

Ц

Целлюлоза 82

Цереброзиды 97

Цикл Кребса 119, 121, 165

Цистиноз 136

Э

Экзон 110

Экспрессия генов 231

Эластин 68, 69

Электролит 22

Электролитов сила 23

Электролиты 22, 23

Элементы

биогенные 48

жизненно необходимые 47

примесные 47

Эндемические заболевания 56

Эритропоэтин 271

Эритроцит 43